

I

(Actos cuja publicação é uma condição da sua aplicabilidade)

DIRECTIVA 2004/73/CE DA COMISSÃO**de 29 de Abril de 2004**

que adapta ao progresso técnico pela vigésima nona 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,

Tendo em conta o Tratado que institui a Comunidade Europeia,

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 perigosas¹ e, nomeadamente, o seu artigo 28.º,

Considerando o seguinte:

- (1) O anexo I da Directiva 67/548/CEE contém uma lista de substâncias perigosas, bem como elementos da classificação e da rotulagem de cada substância. Torna-se necessário actualizar essa lista, de modo a incluir mais novas substâncias notificadas e mais substâncias existentes, e adaptar as entradas actuais ao progresso técnico (estabelecendo, por exemplo, limites de concentração para o ambiente para determinadas substâncias). É igualmente necessário eliminar as entradas correspondentes a determinadas substâncias e subdividir outras entradas, por a classificação já não se aplicar a todas as substâncias abrangidas pelas mesmas. Por outro lado, a rotulagem das substâncias que contêm 1,3-butadieno deve ser alterada, de modo a reflectir o facto de essa substância ir ser classificada de mutagénica pela presente directiva.
- (2) 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. É conveniente alterar o referido anexo de modo a reduzir ao mínimo o número de animais utilizados para fins experimentais, em conformidade com a Directiva 86/609/CEE do Conselho, de 24 de Novembro de 1986, relativa à aproximação das disposições legislativas, regulamentares, e administrativas dos Estados-Membros respeitantes à protecção dos animais utilizados para fins

¹ JO 196 de 16.8.1967, p. 1. Directiva com a última redacção que lhe foi dada pela Directiva 2001/59/CE da Comissão (JO L 225 de 6.8.2001, p. 1).

experimentais e outros fins científicos². Os métodos referentes à toxicidade oral subcrónica previstos nos capítulos B.1, B.4, B.5, B.31 e B.35 devem ser revistos em conformidade. Para que se passe a dispor de um método mais afinado de determinação da toxicidade oral subcrónica, deve ser aditado ao anexo V um capítulo B.42. Finalmente, para possibilitar a determinação de propriedades ainda não suficientemente cobertas pelos métodos já constantes do anexo V, devem ser aditados um capítulo A.21, sobre propriedades físico-químicas, um capítulo B.43, sobre toxicidade oral subcrónica, e um conjunto de capítulos, C.21 a C.24, sobre toxicidade ambiental.

- (3) O disposto na presente directiva é conforme 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,

ADOPTOU A PRESENTE DIRECTIVA:

Artigo 1.º

A Directiva 67/548/CEE é alterada do seguinte modo:

1. O anexo I é alterado do seguinte modo:
 - a) A nota K do preâmbulo passa a ter a redacção constante do anexo 1A;
 - b) As entradas correspondentes às entradas constantes do anexo 1B da presente directiva passam a ter a redacção constante do mesmo anexo;
 - c) As entradas constantes do anexo 1C da presente directiva são inseridas em conformidade com a sequência de entradas do anexo I da Directiva 67/548/CEE;
 - d) As entradas com os números de índice 604-050-00-X, 607-050-00-8, 607-171-00-6 e 613-130-00-3 são eliminadas;
 - e) A entrada com o número de índice 048-002-00-0 é substituída pelas entradas com os números de índice 048-002-00-0 e 048-011-00-X constantes do anexo 1D da presente directiva;
 - f) A entrada com o número de índice 609-006-00-3 é substituída pelas entradas com os números de índice 609-006-00-3 e 609-065-00-5 constantes do anexo 1D da presente directiva;
 - g) A entrada com o número de índice 612-039-00-6 é substituída pelas entradas com os números de índice 612-039-00-6 e 612-207-00-9 constantes do anexo 1D da presente directiva.
2. O anexo V é alterado do seguinte modo:
 - a) O texto constante do anexo 2A da presente directiva é aditado como capítulo A.21;
 - b) O capítulo B.1bis é substituído pelo texto constante do anexo 2B da presente directiva;

² JO L 358 de 18.12.1986, p. 1. Directiva com a última redacção que lhe foi dada pela Directiva 2003/65/CE do Parlamento Europeu e do Conselho (JO L 230 de 16.9.2003, p. 32).

- c) O capítulo B.1tris é substituído pelo texto constante do anexo 2C da presente directiva;
- d) O capítulo B.4 é substituído pelo texto constante do anexo 2D da presente directiva;
- e) O capítulo B.5 é substituído pelo texto constante do anexo 2E da presente directiva;
- f) O capítulo B.31 é substituído pelo texto constante do anexo 2F da presente directiva;
- g) O capítulo B.35 é substituído pelo texto constante do anexo 2G da presente directiva;
- h) O texto constante do anexo 2H da presente directiva é aditado como capítulo B.42 e capítulo B.43;
- i) O texto constante do anexo 2I da presente directiva é aditado como capítulos C.21 a C.24.

Artigo 2.º

1. Os Estados-Membros adoptarão e publicarão as disposições legislativas, regulamentares e administrativas necessárias para dar cumprimento à presente directiva o mais tardar em 31 de Outubro de 2005. Os Estados-Membros comunicarão imediatamente à Comissão o texto dessas disposições e um quadro de correspondência das mesmas com as disposições da presente directiva. Quando os Estados-Membros adoptarem tais disposições, estas devem incluir uma referência à presente directiva ou ser acompanhadas dessa referência aquando da sua publicação oficial. As modalidades dessa referência serão adoptadas pelos Estados-Membros.
2. Os Estados-Membros comunicarão à Comissão o texto das principais disposições de direito interno que adoptarem no domínio regido pela presente directiva.

Artigo 3.º

A presente directiva entra em vigor 20 dias após a sua publicação no *Jornal Oficial da União Europeia*.

Artigo 4.º

Os Estados-Membros são os destinatários da presente directiva.

Feito em Bruxelas, em 29 de Abril de 2004.

Pela Comissão

Margot WALLSTRÖM
Membro da Comissão

ANEXO 1A

Nota K:

Não é necessário classificar a substância como cancerígena ou mutagénica se for possível provar que a substância contém menos de 0,1 % m/m, de 1,3-butadieno (número EINECS 203-450-8). Se a substância não for classificada como cancerígena ou mutagénica, devem ser aplicadas pelo menos as frases S (2-)9-16. A presente nota aplica-se apenas a determinadas substâncias complexas do anexo I derivadas do petróleo.

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
006-005-00-4	tirame dissulfureto de tetrametilurama		205-286-2	137-26-8	Xn; R20/22-48/22 Xi; R36/38 R43 N; R50-53	Xn; N R: 20/22-36/38-43-48/22-50/53 S: (2)-26-36/37-60-61	C ≥ 25 %: Xn, N; R20/22-36/38-43-48/22-50/53 20 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R36/38-43-48/22-50/53 10 % ≤ C < 20 %: Xn, N; R43-48/22-50/53 2,5 % ≤ C < 10 %: Xi, N; R43-50/53 1 % ≤ C < 2,5 %: Xi, N; R43-51/53 0,25 % ≤ C < 1 %: N; R51/53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: R52/53	
006-006-01-7	cianeto de hidrogénio ...% ácido cianídrico ...%	B	200-821-6	74-90-8	T+; R26/27/28 N; R50-53	T+; N R: 26/27/28-50/53 S: (1/2)-7/9-16-36/37-38-45-60-61	C ≥ 25 %: T+, N; R26/27/28-50-53 7 % ≤ C < 25 %: T+, N; R26/27/28-51-53 2,5 % ≤ C < 7 %: T, N; R23/24/25-51-53 1 % ≤ C < 2,5 %: T, N; R23/24/25-52-53 0,25 % ≤ C < 1 %: Xni; R20/21/22-52-53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: Xn; R20/21/22	
006-012-00-2	zitrime (ISO) bis(N,N-dimetilditiocarbamato) de zinco		205-288-3	137-30-4	T+; R26 Xn; R22-48/22 Xi; R37-41 R43 N; R50-53	T+; N R: 22-26-37-41-43-48/22-50/53 S: (1/2)-22-26-28-36/37/39-45-60-61	C ≥ 25 %: T+, N; R22-26-37-41-43-48/22-50-53 20 % ≤ C < 25 %: T+, N; R26-37-41-43-48/22-50-53 10 % ≤ C < 20 %: T+, N; R26-41-43-48/22-50-53 7 % ≤ C < 10 %: T+, N; R26-36-43-50-53 5 % ≤ C < 7 %: T, N; R23-36-43-50-53 1 % ≤ C < 5 %: T, N; R23-43-50-53 0,25 % ≤ C < 1 %: Xn, N; R20-50-53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: Xn, N; R20-51-53 0,025 % ≤ C < 0,1 %: N; R51-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: R52-53	
006-021-00-1	Linurão 3-(3,4-diclorofenil)-1-metil-1-	E	206-356-5	330-55-2	Repr. Cat. 2; R61 Repr. Cat. 3; R62	T; N R: 61-22-40-48/22-62-		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
	metoXitureia				Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22-48/22 N; R50-53	50/53 S: 53-45-60-61		
006-044-00-7	Isoproturão 3-(4-isopropilfenil)-1,1-dimetilureia		251-835-4	34123-59-6	Carc. Cat. 3; R40 N; R50-53	Xn; N R: 40-50/53 S: (2-)36/37-60-61	C ≥ 2,5 %: Xn, N; R40-50-53 1 % ≤ C < 2,5 %: Xn, N; R40-51-53 0,25 % ≤ C < 1 %: N; R51-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: R52-53	
006-072-00-X	N,N-dipropilcarbamatato de S-benzilo		401-730-6	52888-80-9	Xn; R22 R43 N; R51-53	Xn; N R: 22-43-51/53 S: (2-)24-37-61		
006-089-00-2	Dióxido de cloro		233-162-8	10049-04-4	O; R8 R6 T+; R26 C; R34 N; R50	O; T+; N R: 6-8-26-34-50 S: (1/2-)23-26-28-36/37/39-38-45-61	C ≥ 5 %: T+; N; R26-34-50 1 % ≤ C < 5 %: T+; N; R26-36/37/38-50 0,5 % ≤ C < 1 %: T; N; R23-36/37/38-50 0,2 % ≤ C < 0,5 %: T; N; R23-50 0,02 % ≤ C < 0,2 %: Xn; N; R20-50	
006-089-01-X	Dióxido de cloro . . . %	B	233-162-8	10049-04-4	T; R25 C; R34 N; R50	T; N R: 25-34-50 S: (1/2-)23-26-28-36/37/39-45-61	C ≥ 25 %: T; N; R25-34-50 10 % ≤ C < 25 %: C; N; R22-34-50 3 % ≤ C < 10 %: Xn; N; R22-36/37/38-50 0,3 % ≤ C < 3 %: Xi; R36	
007-001-00-5	amoníaco, anidro		231-635-3	7664-41-7	R10 T; R23 C; R34 N; R50	T; N R: 10-23-34-50 S: (1/2-)9-16-26-36/37/39-45-61	C ≥ 25 %: T; N; R23-34-50 5 % ≤ C < 25 %: T; R23-34 0,5 % ≤ C < 5 %: Xn; R20-36/37/38	
007-008-00-3	hidrazina	E	206-114-9	302-01-2	R10 Carc. Cat. 2; R45 T; R23/24/25 C; R34 R43 N; R50-53	T; N R: 45-10-23/24/25-34-43-50/53 S: 53-45-60-61	C ≥ 25 %: T; N; R45-23/24/25-34-43-50/53 10 % ≤ C < 25 %: T; N; R45-20/21/22-34-43-51/53 3 % ≤ C < 10 %: T; N; R45-20/21/22-36/38-43-51/53 2,5 % ≤ C < 3 %: T; N; R45-43-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R45-43-52/53 0,25 % ≤ C < 1 %: T; R45-52/53	

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
007-010-00-4	nitrito de sódio		231-555-9	7632-00-0	O; R8 T; R25 N; R50	O; T; N R: 8-25-50 S: (1/2-)45-61	0,1 % ≤ C < 0,25 %; T; R45 C ≥ 25 %; T; N; R25-50 5 % ≤ C < 25 %; T; R25 1 % ≤ C < 5 %; Xn; R22	
007-011-00-X	nitrito de potássio		231-832-4	7758-09-0	O; R8 T; R25 N; R50	O; T; N R: 8-25-50 S: (1/2-)45-61	C ≥ 25 %; T; N; R25-50 5 % ≤ C < 25 %; T; R25 1 % ≤ C < 5 %; Xn; R22	
007-013-00-0	1,2-dimetil-hidrazina	E	-	540-73-8	Carc. Cat. 2; R45 T; R23/24/25 N; R51-53	T; N R: 45-23/24/25-51/53 S: 53-45-61	C ≥ 25 %; T; N; R45-23/24/25-51/53 3 % ≤ C < 25 %; T; R45-20/21/22-52/53 2,5 % ≤ C < 3 %; T; R45-52/53 0,01 % ≤ C < 2,5 %; T; R45	
007-017-00-2	nitrito de isobutilo	E	208-819-7	542-56-3	F; R11 Xn; R20/22 Carc. Cat. 2; R45 Mutag. Cat. 3; R68	F; T R: 11-20/22-45-68 S: 53-45		
007-027-00-7	1,6-bis(3,3-bis((1-metilpentilidienimino)propil)ureid o)hexano		420-190-2	-	Xn; R21/22-48/21 C; R34 R43 N; R50-53	C; N R: 21/22-34-43-48/21-50/53 S: (1/2-)7-26-36/37/39-45-60-61		
008-003-00-9	peróxido de hidrogénio em solução ... % água oxigenada ... %	B	231-765-0	7722-84-1	R5 O; R8 C; R35 Xn; R20/22	O; C R: 5-8-20/22-35 S: (1/2-)17-26-28-36/37/39-45	C ≥ 70 %; C; R20/22-35 50 % ≤ C < 70 %; C; R20/22-34 35 % ≤ C < 50 %; Xn; R22-37/38-41 8 % ≤ C < 35 %; Xn; R22-41 5 % ≤ C < 8 %; Xi; R36 Footnote: C ≥ 70 %; R5, O; R8 50 % ≤ C < 70 %; O; R8	
009-015-00-7	difluoreto de sulfúrio		220-281-5	2699-79-8	T; R23 Xn; R48/20 N; R50	T; N R: 23-48/20-50 S: (1/2-)45-63-60-61		
015-002-00-7	Fósforo vermelho		231-768-7	7723-14-0	F; R11 R16 R52-53	F R: 11-16-52/53 S: (2-)7-43-61		
015-014-00-2	fosfato de tributilo		204-800-2	126-73-8	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22	Xn R: 22-38-40		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
015-015-00-8	fosfato de tricresilo fosfato de tritolilo o-o-o, o-o-m, o-o-p, o-m-m, o-m-p, o-p-p	C	201-103-5	78-30-8	Xi; R38 T; R39/23/24/25-51/53 N; R51-53	S: (2-)36/37-46 T; N R: 39/23/24/25-51/53 S: (1/2-)20/21-28-45-61	C ≥ 25 %: T, N; R39/23/24/25-51/53 2,5 % ≤ C < 25 %: T; R39/23/24/25-52/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R39/23/24/25 0,2 % ≤ C < 1 %: Xn; R68/20/21/22	
015-016-00-3	fosfato de tricresilo fosfato de tritolilo m-m-m, m-m-p, m-p-p, p-p-p	C	201-105-6	78-32-0	Xn; R21/22 N; R51-53	Xn; N R: 21/22-51/53 S: (2-)28-61	C ≥ 25 %: Xn, N; R21/22-51/53 5 % ≤ C < 25 %: Xn; R21/22-52/53 2,5 % ≤ C < 5 %: R52/53	
015-020-00-5	mevinfos (ISO) fosfato de 1-metil-2-metoxicarbonilvinilo e de dimetilo		232-095-1	7786-34-7	T+; R27/28 N; R50-53	T+; N R: 27/28-50/53 S: (1/2-)23-28-36/37-45-60-61	C ≥ 7 %: T+, N; R27/28-50-53 1 % ≤ C < 7 %: T, N; R24/25-50-53 0,1 % ≤ C < 1 %: Xn, N; R21/22-50-53 0,0025 % ≤ C < 0,1 %: N; R50-53 0,00025 % ≤ C < 0,0025 %: N; R51-53 0,00025 % ≤ C < 0,00025 %: R52-53	
015-021-00-0	triclorfona (ISO) 2,2,2-tricloro-1-hidroxiethylfosfonato de dimetilo		200-149-3	52-68-6	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)24-37-60-61	C ≥ 25 %: Xn, N; R22-43-50-53 1 % ≤ C < 25 %: Xi, N; R43-50-53 0,025 % ≤ C < 1 %: N; R50-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: N; R51-53 0,00025 % ≤ C < 0,0025 %: R52-53	
015-027-00-3	sulfotepe (ISO) ditiopirofosfato de O.O.O.O-tetraetilo		222-995-2	3689-24-5	T+; R27/28 N; R50-53	T+; N R: 27/28-50/53 S: (1/2-)23-28-36/37-45-60-61	C ≥ 7 %: T+, N; R27/28-50-53 1 % ≤ C < 7 %: T, N; R24/25-50-53 0,1 % ≤ C < 1 %: Xn, N; R21/22-50-53 0,025 % ≤ C < 0,1 %: N; R50-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: N; R51-53	

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
015-032-00-0	protoato (ISO) ditiofosfato de <i>O,O</i> -dietilo e isopropilcarbamoilmetilo		218-893-2	2275-18-5	T+; R27/28 R52-53	T+ R: 27/28-52/53 S: (1/2-)/28-36/37-45-61	0,00025 % ≤ C < 0,0025 %: R52-53	
015-033-00-6	furato (ISO) fosforoiato de <i>O,O</i> -dietilo e etiltiommetilo		206-052-2	298-02-2	T+; R27/28 N; R50-53	T+; N R: 27/28-50/53 S: (1/2-)/28-36/37-45-60-61	C ≥ 7 %: T+; N; R27/28-50-53 1 % ≤ C < 7 %: T, N; R24/25-50-53 0,1 % ≤ C < 1 %: Xn, N; R21/22-50-53 0,025 % ≤ C < 0,1 %: N; R50-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: N; R51-53 0,00025 % ≤ C < 0,0025 %: R52-53	
015-034-00-1	paratião (ISO) fosforoiato de <i>O,O</i> -dietilo e <i>O</i> -4-nitrofenilo		200-271-7	56-38-2	T+; R26/28 T; 24-48/25 N; R50-53	T+; N R: 24-26/28-48/25-50/53 S: (1/2-)/28-36/37-45-60-61	C ≥ 25 %: T+; N; R24-26/28-48/25-50-53 10 % ≤ C < 25 %: T+; N; R21-26/28-48/25-50-53 7 % ≤ C < 10 %: T+; N; R21-26/28-48/22-50-53 3 % ≤ C < 7 %: T, N; R21-23/25-48/22-50-53 1 % ≤ C < 3 %: T, N; R23/25-48/22-50-53 0,25 % ≤ C < 1 %: Xn, N; R20/22-50-53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: Xn, N; R20/22-51-53 0,025 % ≤ C < 0,1 %: N; R51-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: R52-53	
015-035-00-7	paratião- metilo (ISO) fosforoiato de <i>O,O</i> -dimetilo e <i>O</i> -4-nitrofenilo		206-050-1	298-00-0	R5 R10 T+; R26/28 T; R24 Xn; R48/22 N; R50-53	T+; N R: 5-10-24-26/28-48/22-50/53 S: (1/2-)/28-36/37-45-60-61	C ≥ 25 %: T+; N; R24-26/28-48/22-50-53 10 % ≤ C < 25 %: T+; N; R21-26/28-48/22-50-53 7 % ≤ C < 10 %: T+; N; R21-26/28-50-53 3 % ≤ C < 7 %: T, N; R21-23/25-50-53 1 % ≤ C < 3 %: T, N; R23/25-50-53 0,25 % ≤ C < 1 %: Xn, N;	

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
015-041-00-X	malatião (ISO) ditiófosfato de 1,2-bis(oxocarbonil)etil e <i>O,O</i> -dimetilo (dimetoxifosfioil) succinato de dietilo		204-497-7	121-75-5	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)24-60-61	R20/22-50-53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: Xn, N; R20/22-51-53 0,025 % ≤ C < 0,1 %: N; R51-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: R52-53	
015-042-00-5	cloritião (denominação vulgar não adoptada pela ISO) monotiofosfato de <i>O</i> -(3-cloro-4-nitrofenilo) e de <i>O,O</i> -dimetilo		207-902-5	500-28-7	Xn; R20/21/22 N; R50-53	Xn; N R: 20/21/22-50/53 S: (2-)13-60-61	C ≥ 25 %: Xn, N; R22-50-53 0,25 % ≤ C < 25 %: N; R50-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: N; R51-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: R52-53	
015-047-00-2	etião (ISO) <i>S,S'</i> -metilenodi (fosforoditioato) de <i>O,O,O',O'</i> -tetraetilo		209-242-3	563-12-2	T; R25 Xn; R21 N; R50-53	T; N R: 21-25-50/53 S: (1/2-)25-36/37-45-60-61	C ≥ 25 %: T, N; R21-25-50-53 3 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R22-50-53 0,0025 % ≤ C < 3 %: N; R50-53 0,00025 % ≤ C < 0,00025 %: N; R51-53 0,000025 % ≤ C < 0,000025 %: R52-53	
015-052-00-X	fenclorfos (ISO) tiofosfato de <i>O,O</i> -dimetilo e <i>O</i> -2,4,5-triclorofenilo		206-082-6	299-84-3	Xn; R21/22 N; R50-53	Xn; N R: 21/22-50/53 S: (2-)25-36/37-60-61		
015-055-00-6	nalede (ISO) fosfato de 1,2-dibromo-2,2-dicloroetil e de dimetilo		206-098-3	300-76-5	Xn; R21/22 Xi; R36/38 N; R50	Xn; N R: 21/22-36/38-50 S: (2-)36/37-61	C ≥ 25 %: Xn, N; R21/22-36/38-50 20 % ≤ C < 25 %: Xi, N; R36/38-50 0,025 % ≤ C < 20 %: N; R50	
015-063-00-X	dioxatião (ISO) di(fosforoditioato) de 1,4-dioxano-2,3-dilo e <i>O,O,O',O'</i> -tetraetilo		201-107-7	78-34-2	T+; R26/28 T; R24 N; R50-53	T+; N R: 24-26/28-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61	C ≥ 25 %: T+, N; R24-26/28-50-53 7 % ≤ C < 25 %: T+, N; R21-26/28-50-53 3 % ≤ C < 7 %: T, N; R21-23/25-50-53	

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
015-065-00-0	ditiofosfato de <i>S</i> -(etil-sulfonilmetil) e de <i>O,O</i> -dimetilo		-	2703-37-9	T+; R26/27/28 N; R51-53	T+; N R: 26/27/28-51/53 S: (1/2-)13-28-45-61	1 % ≤ C < 3 %: T, N; R23/25-50-53 0,1 % ≤ C < 1 %: Xn, N; R20/22-50-53 0,025 % ≤ C < 0,1 %: N; R50-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: N; R51-53 0,00025 % ≤ C < 0,0025 %: R52-53	
015-076-00-0	Potassan tiofosfato de <i>O,O</i> -dietilo e de <i>O</i> - (4-metil-7-cumaril)il		-	299-45-6	T+; R26/27/28 N; R50-53	T+; N R: 26/27/28-50/53 S: (1/2-)13-28-45-60-61	C ≥ 7 %: T+, N; R26/27/28-50-53 1 % ≤ C < 7 %: T, N; R23/24/25-50-53 0,1 % ≤ C < 1 %: Xn, N; R20/21/22-50-53 0,025 % ≤ C < 0,1 %: N; R50-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: N; R51-53 0,00025 % ≤ C < 0,0025 %: R52-53	
015-078-00-1	demeton- <i>S</i> -metil-sulfona tiofosfato de <i>S</i> -2-etil-sulfonilmetil e de dimetilo		241-109-5	17040-19-6	T; R25 Xn; R21 N; R51-53	T; N R: 21-25-51/53 S: (1/2-)22-28-36/37-45-61		
015-083-00-9	bensulida (ISO) ditiofosfato de 2- fenil-sulfonilamidoetil e <i>O,O</i> - diisopropilo		212-010-4	741-58-2	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)24-36-60-61		
015-084-00-4	clorpirifos (ISO) fosforotioato de <i>O,O</i> -dietilo e <i>O</i> - 3,5,6-tricloro-2-piridilo		220-864-4	2921-88-2	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2-)45-60-61	C ≥ 25 %: T, N; R25-50-53 3 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R22-50-53 0,0025 % ≤ C < 3 %: N; R50-53 0,00025 % ≤ C < 0,0025 %: N; R51-53 0,000025 % ≤ C < 0,00025 %: R52-53	
015-095-00-4	metamidofos (ISO) tiofosforamidato de <i>O,S</i> -dimetilo		233-606-0	10265-92-6	T+; R26/28 T; R24	T+; N R: 24-26/28-50		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
015-096-00-X	oxidissulfato ditiofosfato de <i>O,O</i> -dietilo e de <i>S</i> -(2-etilsulfimietilo)		219-679-1	2497-07-6	N; R50 T+; R28 T; R24 N; R50-53	S: (1/2-)28-36/37-45-61 T+; N R: 24-28-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61	C ≥ 25 %: T+; N; R24-28-50-53 7 % ≤ C < 25 %: T+; N; R21-28-50-53 3 % ≤ C < 7 %: T; N; R21-25-50-53 1 % ≤ C < 3 %: T; N; R25-50-53 0,25 % ≤ C < 1 %: Xn; N; R22-50-53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: Xn; N; R22-51-53 0,025 % ≤ C < 0,1 %: R52-53	
015-097-00-5	fentoato (ISO) 2-(dimetoxifosfonotioilto)-2-fenilacetato de etilo		219-997-0	2597-03-7	Xn; R21/22 N; R50-53	Xn; N R: 21/22-50/53 S: (2-)22-36/37-60-61	C ≥ 25 %: Xn; N; R21/22-50-53 0,25 % ≤ C < 25 %: N; R50-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: N; R51-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: R52-53	
015-100-00-X	foxima (ISO)(DCI) α -(dietoxifosfinotioilimino)fenilacetotrilto		238-887-3	14816-18-3	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 21/22-50/53 S: (2-)36-60-61	C ≥ 25 %: Xn; N; R22-50-53 0,025 % ≤ C < 25 %: N; R50-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: N; R51-53 0,00025 % ≤ C < 0,0025 %: R52-53	
015-101-00-5	fosmete (ISO) fosforoditioato de <i>O,O</i> -dimetilo e de italimidometilo		211-987-4	732-11-6	Xn; R21/22 N; R50-53	Xn; N R: 21/22-50/53 S: (2-)22-36/37-60-61	C ≥ 25 %: Xn; N; R21/22-50-53 0,25 % ≤ C < 25 %: N; R50-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: N; R51-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: R52-53	
015-105-00-7	fosfito de trifenilo		202-908-4	101-02-0	Xi; R36/38 N; R50-53	Xi; N R: 36/38-50/53 S: (2-)28-60-61	C ≥ 25 %: Xi; N; R36/38-50/53 5 % ≤ C < 25 %: Xi; N; R36/38-51/53 2,5 % ≤ C < 5 %: N; R51/53 0,25 % ≤ C < 2,5 %: R52/53	
015-107-00-8	etoprofos (ISO) ditiofosfato de etilo e <i>S,S</i> -		236-152-1	13194-48-4	T+; R26/27 T; R25	T+; N R: 25-26/27-43-50/53		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
	dipropilo				R43 N; R50-53	S: (1/2-)27/28-36/37/39-45-60-61		
015-108-00-3	bromofos (ISO) tiofosfato de <i>O</i> -4-bromo-2,5-diclorofenilo e <i>O</i> , <i>O</i> -dimetilo		218-277-3	2104-96-3	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)36-60-61	C ≥ 25 %: Xn, N; R22-50-53 0,25 % ≤ C < 25 %: N; R50-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: N; R51-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: R52-53	
015-109-00-9	crotofos (ISO) 3-(dimetoxifosfiniloxi)isocrotonato de 1-feniloetilo		231-720-5	7700-17-6	T; R24/25 N; R50-53	T; N R: 24/25-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61	C ≥ 25 %: T, N; R24/25-50-53 3 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R21/22-50-53 2,5 % ≤ C < 3 %: N; R50-53 0,25 % ≤ C < 2,5 %: N; R51-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: R52-53	
015-110-00-4	cianoefos (ISO) feniltiofosfato de <i>O</i> -4-cianoefenilo e de <i>O</i> -etilo		-	13067-93-1	T; R25-39/25 Xn; R21 Xi; R36 N; R51-53	T; N R: 21-25-36-39/25-51/53 S: (1/2-)36/37-45-61		
015-114-00-6	clormefos (ISO) ditiiofosfato de <i>S</i> -clorometilo e de <i>O</i> , <i>O</i> -dietilo		246-538-1	24934-91-6	T+; R27/28 N; R50-53	T+; N R: 27/28-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61		
015-115-00-1	clortiofos (ISO)		244-663-6	21923-23-9	T+; R28 T; R24 N; R50-53	T+; N R: 24-28-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61		
015-122-00-X	tiofosfato de >O, <i>O</i> .it.-dimetilo e de <i>O</i> ,6-etoxi-2-etilpirimidin-4-ilo etirimfos		253-855-9	38260-54-7	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)60-61	C ≥ 25 %: Xn, N; R22-50-53 2,5 % ≤ C < 25 %: N; R50-53 0,25 % ≤ C < 2,5 %: N; R51-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: R52-53	
015-123-00-5	fenamifos (ISO) <i>N</i> -isopropilfosforamidato de etilo e de 4-metilto- <i>m</i> -tolilo		244-848-1	22224-92-6	T+; R28 T; R24 N; R50-53	T+; N R: 24-28-50/53 S: (1/2-)23-28-36/37-45-60-61	C ≥ 25 %: T+; N; R24-28-50-53 7 % ≤ C < 25 %: T+; N; R21-28-50-53 3 % ≤ C < 7 %: T, N; R21-25-50-53 1 % ≤ C < 3 %: T, N; R25-50-53 0,25 % ≤ C < 1 %: Xn, N; R22-50-53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: Xn, N; R22-51-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: N; R51-53	

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
015-126-00-1	heptenofos (ISO) fosfato de 7-clorobicyclo(3,2,0)hepta-2,6-dieno-6-ilo e de dimetilo		245-737-0	23560-59-0	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2-)23-28-37-45-60-61	0,0025 % ≤ C < 0,025 %; R52-53 C ≥ 25 %; T; N; R25-50-53 3 % ≤ C < 25 %; Xn; N; R22-50-53 0,25 % ≤ C < 3 %; N; R50-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %; N; R51-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %; R52-53	
015-127-00-7	iprobefos tiofosfato de S-benzilo e de diisopropilo		247-449-0	26087-47-8	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2-)61		
015-128-00-2	IPSP ditiofosfato de O,O-diisopropilo e de S-etilsulfimilmetilo		-	5827-05-4	T+; R27 T; R25 N; R50-53	T+; N R: 25-27-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61	C ≥ 25 %; T+; N; R25-27-50-53 7 % ≤ C < 25 %; T+; N; R22-27-50-53 3 % ≤ C < 7 %; T; N; R22-24-50-53 1 % ≤ C < 3 %; T; N; R24-50-53 0,25 % ≤ C < 1 %; Xn; N; R21-50-53 0,1 % ≤ C < 0,25 %; Xn; N; R21-51-53 0,025 % ≤ C < 0,1 %; N; R51-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %; R52-53	
015-129-00-8	isofenfos (ISO) N-isopropiltiofosforamido de O-etilo e de O-2-isopropoxi-carbonilfenilo		246-814-1	25311-71-1	T; R24/25 N; R50-53	T; N R: 24/25-50/53 S: (1/2-)36/37-45-60-61	C ≥ 25 %; T; N; R24/25-50-53 3 % ≤ C < 25 %; Xn; N; R21/22-50-53 0,25 % ≤ C < 3 %; N; R50-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %; N; R51-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %; R52-53	
015-131-00-9	Isoxatão (ISO) tiofosfato de O,O-dietilo e O-5-feniltioxazol-3-ilo		242-624-8	18854-01-8	T; R24/25 N; R50-53	T; N R: 24/25-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61		
015-132-00-4	ditiofosfato de S-(clorofeniltiometo) e de O,O-dimetilo		-	953-17-3	T; R24/25 N; R50-53	T; N R: 24/25-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-	C ≥ 25 %; T; N; R24/25-50-53 3 % ≤ C < 25 %; Xn; N; R21/22-50-53	

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
						60-61	0,025 % ≤ C < 3 %; N; R50-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %; N; R51-53 0,00025 % ≤ C < 0,0025 %; R52-53	
015-133-00-X	piperfos (ISO) difosfato de <i>O,O</i> -dipropilo e de <i>S,S</i> -2-metipiperidinocarbomilmetilo		-	24151-93-7	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)-60-61	C ≥ 25 %; Xn, N; R22-50-53 2,5 % ≤ C < 25 %; N; R50-53 0,25 % ≤ C < 2,5 %; N; R51-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %; R52-53	
015-134-00-5	pirimifos-metil (ISO) tiofosfato de <i>O</i> -(2-dietilamino-6- metilpirimidina-4-il) e de <i>O,O</i> - dimetilo		249-528-5	29232-93-7	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)-60-61		
015-135-00-0	tiofosfato de <i>O</i> -(4-bromo-2- clorofenilo) de <i>O</i> -etilo e de <i>S</i> - propilo profenofos (ISO)		255-255-2	41198-08-7	Xn; R20/21/22 N; R50-53	Xn; N R: 20/21/22-50/53 S: (2-)-36/37-60-61	C ≥ 25 %; Xn, N; R20/21/22- 50-53 0,025 % ≤ C < 25 %; N; R50- 53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %; N; R51-53 0,00025 % ≤ C < 0,0025 %; R52-53	
015-136-00-6	(etilamido)tiofosfato de <i>O</i> -etilo e de <i>O</i> -[(2-isopropoxicarbomil)-1- metil]vinilo		250-517-2	31218-83-4	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2-)-37-45-60-61	C ≥ 25 %; T, N; R25-50-53 3 % ≤ C < 25 %; Xn, N; R22- 50-53 0,25 % ≤ C < 3 %; N; R50-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %; N; R51- 53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %; R52- 53	
015-138-00-7	quinalfos (ISO) tiofosfato de <i>O,O</i> -dietilo e de <i>O</i> - quinoxalín-2-ilo		237-031-6	13593-03-8	T; R25 Xn; R21 N; R50-53	T; N R: 21-25-50/53 S: (1/2-)-22-36/37-45- 60-61	C ≥ 25 %; T, N; R21-25-50-53 3 % ≤ C < 25 %; Xn, N; R22- 50-53 0,025 % ≤ C < 3 %; N; R50-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %; N; R51-53 0,00025 % ≤ C < 0,0025 %; R52-53	
015-139-00-2	tiofosfato de <i>S-tert</i> -butiltrometilo e de <i>O,O</i> -dietilo terbufos (ISO)		235-963-8	13071-79-9	T+; R27/28 N; R50-53	T+; N R: 27/28-50/53 S: (1/2-)-36/37-45-60- 61	C ≥ 7 %; T+, N; R27/28-50-53 1 % ≤ C < 7 %; T, N; R24/25- 50-53 0,1 % ≤ C < 1 %; Xn, N; R21/22-50-53	

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
015-154-00-4	ácido 2-cloroetilfosfónico		240-718-3	16672-87-0	Xn; R20/21 C; R34 R52-53	C R: 20/21-34-52/53 S: (1/2-)26-28-36/37/39-45-61	0,025 % ≤ C < 0,1 %; N; R50-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %; N; R51-53 0,00025 % ≤ C < 0,0025 %; R52-53	
015-179-00-0	Produto da condensação UVCB de: cloro de tetraquis-hidroximetilfosfónio, ureia e C16-18 sebo-alkilamina hidrogenada destilada		422-720-8	166242-53-1	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22-48/22 C; R34 R43 N; R50-53	C; N R: 22-34-40-43-48/22-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61	C ≥ 25 %; C; R20/21-34-52/53 10 % ≤ C < 25 %; C; R34 5 % ≤ C < 10 %; Xi; R36/37/38	
016-001-00-4	sulfureto de hidrogénio		231-977-3	7783-06-4	F+; R12 T+; R26 N; R50	F+; T+; N R: 12-26-50 S: (1/2-)9-16-36-38-45-61		
016-008-00-2	polissulfuretos de amónio		232-989-1	9080-17-5	R31 C; R34 N; R50	C; N R: 31-34-50 S: (1/2-)26-45-61	C ≥ 25 %; C; N; R31-34-50 5 % ≤ C < 25 %; C; R31-34 1 % ≤ C < 5 %; Xi; R31-36/38	
016-012-00-4	dicloreto de dióxofe cloro de enxofre		233-036-2	10025-67-9	R14 T; R25 Xn; R20 R29 C; R35 N; R50	T; C; N R: 14-20-25-29-35-50 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61	C ≥ 25 %; T; C; N; R20-25-35-50 10 % ≤ C < 25 %; C; R22-35 5 % ≤ C < 10 %; C; R22-34 3 % ≤ C < 5 %; Xn; R22-36/37/38 1 % ≤ C < 3 %; Xi; R36/37/38	
016-013-00-X	dicloreto de enxofre		234-129-0	10545-99-0	R14 C; R34 Xi; R37 N; R50	C; N R: 14-34-37-50 S: (1/2-)26-45-61	C ≥ 25 %; C; N; R34-50 10 % ≤ C < 25 %; C; R34 5 % ≤ C < 10 %; Xi; R36/37/38	
016-014-00-5	tetracloro de enxofre		-	13451-08-6	R14 C; R34 N; R50	C; N R: 14-34-50 S: (1/2-)26-45-61	C ≥ 25 %; C; N; R34-50 10 % ≤ C < 25 %; C; R34 5 % ≤ C < 10 %; Xi; R36/37/38	
016-021-00-3	metanoíol metilmercaptano		200-822-1	74-93-1	F+; R12 T; R23 N; R50-53	F+; T+; N R: 12-23-50/53 S: (2-)16-25-60-61		
016-023-00-4	sulfato de dimetilo	E	201-058-1	77-78-1	Carc. Cat. 2; R45 Mutat. Cat. 3; R68	T+ R: 45-25-26-34-43-68	C ≥ 25 %; T+; R45-R25-R26- R34-R43-R68	

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
016-059-00-0	N,N',N'-tetrametilnitrobis(etileno)diamina, dicloridrato		405-300-9	17339-60-5	T+; R26 T; R25 C; R34 R43	S: 53-45	10 % ≤ C < 25 %; T+; R45-R22-R26-R34-R43-R68 7 % ≤ C < 10 %; T+; R45-R22-R26-R36/37/38-R43-R68 5 % ≤ C < 7 %; T; R45-R22-R23-R36/37/38-R43-R68 3 % ≤ C < 5 %; T; R45-R22-R23-R43-R68 1 % ≤ C < 3 %; T; R45-R23-R43-R68 0,1 % ≤ C < 1 %; T; R45-R20-R68 0,01 % ≤ C < 0,1 %; T; R45-R68	
017-003-00-8	clorato de bário		236-760-7	13477-00-4	O; R9 Xn; R20/22 N; R51-53	O; Xn; N R: 9-20/22-51/53 S: (2-)13-27-61		
017-004-00-3	clorato de potássio		223-289-7	3811-04-9	O; R9 Xn; R20/22 N; R51-53	O; Xn; N R: 9-20/22-51/53 S: (2-)13-16-27-61		
017-005-00-9	clorato de sódio		231-887-4	7775-09-9	O; R9 Xn; R22 N; R51-53	O; Xn; N R: 9-22-51/53 S: (2-)13-17-46-61		
017-011-00-1	hipoclorito de sódio, solução ... % Cl activo	B	231-668-3	7681-52-9	C; R34 R31 N; R50	C; N R: 31-34-50 S: (1/2-)28-45-50-61	C ≥ 25 %; C, N; R31-34-50 10 % ≤ C < 25 %; C; R31-34 5 % ≤ C < 10 %; Xi; R31-36/38	
017-012-00-7	hipoclorito de cálcio		231-908-7	7778-54-3	O; R8 Xn; R22 R31 C; R34 N; R50	O; C; N R: 8-22-31-34-50 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61	C ≥ 25 %; C, N; R22-34-50 10 % ≤ C < 25 %; C; R34 3 % ≤ C < 10 %; Xi; R37/38-41 0,5 % ≤ C < 3 %; Xi; R36	
024-001-00-0	trióxido de crómio (VI)	E	215-607-8	1333-82-0	O; R9 Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 Repr. Cat. 3; R62 T+; R26 T; R24/25-48/23	O; T+; N R: 45-46-9-24/25-26-35-42/43-48/23-62-62-50/53 S: 53-45-60-61	C ≥ 25 %; T+; N; R24/25-26-35-42/43-45-46-48/23-50/53-62 10 % ≤ C < 25 %; T+; N; R21/22-26-35-42/43-45-46-48/23-51/53-62	

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
024-002-00-6	dicromato de potássio	E	231-906-6	7778-50-9	C; R35 R42/43 N; R50-53		7 % ≤ C < 10 %: T+, N; R21/22-26-34-42/43-45-46-48/20-51/53-62 5 % ≤ C < 7 %: T, N; R21/22-23-34-42/43-45-46-48/20-51/53-62 3 % ≤ C < 5 %: T, N; R21/22-23-36/37/38-42/43-45-46-48/20-51/53 2,5 % ≤ C < 3 %: T, N; R23-36/37/38-42/43-45-46-48/20-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R23-36/37/38-42/43-45-46-48/20-52/53 0,25 % ≤ C < 1 %: T; R20-45-46-52/53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: T; R20-45-46	3
024-002-00-6	dicromato de potássio	E	231-906-6	7778-50-9	O; R8 Carc. Cat. 2; R45 Muia. Cat. 2; R46 Repr. Cat. 2; R60-61 T+; R26 T; R25-48/23 Xn; R21 C; R34 R42/43 N; 50-53	T+; N; O R; 45-46-60-61-8-21-25-26-34-42/43-48/23-50/53 S; 53-45-60-61	C ≥ 25 %: T+, N; R45-46-60-61-21-25-26-34-42/43-48/23-50/53 10 % ≤ C < 25 %: T+, N; R45-46-60-61-22-26-34-42/43-48/23-51/53 7 % ≤ C < 10 %: T+, N; R45-46-60-61-22-26-36/37/38-42/43-48/20-51/53 5 % ≤ C < 7 %: T, N; R45-46-60-61-22-23-36/37/38-42/43-48/20-51/53 3 % ≤ C < 5 %: T, N; R45-46-60-61-22-23-42/43-48/20-51/53 2,5 % ≤ C < 3 %: T, N; R45-46-60-61-23-42/43-48/20-52/53 0,5 % ≤ C < 1 %: T; R45-46-60-61-20-42/43-52/53 0,25 % ≤ C < 0,5 %: T; R45-46-20-42/43-52/53 0,2 % ≤ C < 0,25 %: T; R45-46-20-42/43 0,1 % ≤ C < 0,2 %: T; R45-46-20	3

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
024-003-00-1	dicromato de amónio	E	232-143-1	7789-09-5	E; R2 O; R8 Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 2; R46 Repr. Cat. 2; R60-61 T+; R26 T; R25-48/23 Xn; R21 C; R34 R42/43 N; R50-53	E; T+; N R: 45-46-60-61-2-8-21-25-26-34-42/43-48/23-50/53 S: 53-45-60-61	C ≥ 25 %: T+; N; R45-46-60-61-21-25-26-34-42/43-48/23-50/53 10 % ≤ C < 25 %: T+; N; R45-46-60-61-22-26-34-42/43-48/23-50/53 7 % ≤ C < 10 %: T+; N; R45-46-60-61-22-26-36/37/38-42/43-48/20-50/53 5 % ≤ C < 7 %: T; N; R45-46-60-61-22-23-36/37/38-42/43-48/20-51/53 3 % ≤ C < 5 %: T; N; R45-46-60-61-22-23-42/43-48/20-51/53 2,5 % ≤ C < 3 %: T; N; R45-46-60-61-23-42/43-48/20-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R45-46-60-61-23-42/43-48/20-52/53 0,5 % ≤ C < 1 %: T; R45-46-60-61-20-42/43-52/53 0,25 % ≤ C < 0,5 %: T; R45-46-20-42/43-52/53 0,2 % ≤ C < 0,25 %: T; R45-46-20-42/43 0,1 % ≤ C < 0,2 %: T; R45-46-20	3
024-004-00-7	dicromato de sódio anidro	E	234-190-3	10588-01-9	O; R8 Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 2; R46 Repr. Cat. 2; R60-61 T+; R26 T; R25-48/23 Xn; R21 C; R34 R42/43 N; 50-53	T+; N; O R: 45-46-60-61-8-21-25-26-34-42/43-48/23-50/53 S: 53-45-60-61	C ≥ 25 %: T+; N; R45-46-60-61-21-25-26-34-42/43-48/23-50/53 10 % ≤ C < 25 %: T+; N; R45-46-60-61-22-26-34-42/43-48/23-51/53 7 % ≤ C < 10 %: T+; N; R45-46-60-61-22-26-36/37/38-42/43-48/20-51/53 5 % ≤ C < 7 %: T; N; R45-46-60-61-22-23-36/37/38-42/43-48/20-51/53 3 % ≤ C < 5 %: T; N; R45-46-60-61-22-23-42/43-48/20-51/53 2,5 % ≤ C < 3 %: T; N; R45-46-60-61-23-42/43-48/20-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R45-46-60-61-23-42/43-48/20-52/53	3

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
024-004-01-4	dicromato de sódio, dihidrato	E	234-190-3	7789-12-0	O: R8 Carc. Cat.2; R45 Mutua. Cat. 2; R46 Repr. Cat. 2; R60-61 T+; R26 T; R25-48/23 Xn; R21 C; R34 R42/43 N; R50-53	T+; N; O R: 45-46-60-61-8-21-25-26-34-42/43-48/23-50/53 S: 53-45-60-61	0,5 % ≤ C < 1 %; T; R45-46-60-61-20-42/43-52/53 0,25 % ≤ C < 0,5 %; T; R45-46-20-42/43-52/53 0,2 % ≤ C < 0,25 %; T; R45-46-20-42/43 0,1 % ≤ C < 0,2 %; T; R45-46-20	3
024-011-00-5	bis(1-(3,5-dinitro-2-óxido-fenilazo)-3-(N-fenilcarbamoil)-2-naftolato)cromato(1-) de amónio		400-110-2	-	F; R11 N; R50-53	F; N R: 11-50/53 S: (2-)33-60-61	C ≥ 25 %; T+; N; R45-46-60-61-21-25-26-34-42/43-48/23-50/53 10 % ≤ C < 25 %; T+; N; R45-46-60-61-22-26-34-42/43-48/23-51/53 7 % ≤ C < 10 %; T+; N; R45-46-60-61-22-26-36/37/38-42/43-48/20-51/53 5 % ≤ C < 7 %; T; N; R45-46-60-61-22-23-36/37/38-42/43-48/20-51/53 3 % ≤ C < 5 %; T; N; R45-46-60-61-22-23-42/43-48/20-51/53 2,5 % ≤ C < 3 %; T; N; R45-46-60-61-23-42/43-48/20-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %; T; R45-46-60-61-23-42/43-48/20-52/53 0,5 % ≤ C < 1 %; T; R45-46-60-61-20-42/43-52/53 0,25 % ≤ C < 0,5 %; T; R45-46-20-42/43-52/53 0,2 % ≤ C < 0,25 %; T; R45-46-20-42/43 0,1 % ≤ C < 0,2 %; T; R45-46-20	
024-018-00-3	cromato de sódio	E	231-889-5	7775-11-3	Carc. Cat. 2; R45 Mutua. Cat. 2; R46 Repr. Cat.2; R60-61 T+; R26 T; R25-48/23 Xn; R21	T+; N R: 45-46-60-61-21-25-26-34-42/43-48/23-50/53 S: 53-45-60-61	C ≥ 25 %; T+; N; R45-46-60-61-21-25-26-34-42/43-48/23-50/53 10 % ≤ C < 25 %; T+; N; R45-46-60-61-22-26-34-42/43-48/23-51/53	3

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
027-004-00-5	dicloreto de cobalto	E	231-589-4	7646-79-9	Carc. Cat. 2; R49 Xn; R22 R42/43 N; R50-53	T; N R: 49-22-42/43-50/53 S: (2-)22-53-45-60-61	7 % ≤ C < 10 %: T+, N; R45-46-60-61-22-26-36/37/38-42/43-48/20-51/53 5 % ≤ C < 7 %: T, N; R45-46-60-61-22-23-36/37/38-42/43-48/20-51/53 3 % ≤ C < 5 %: T, N; R45-46-60-61-22-23-42/43-48/20-51/53 2,5 % ≤ C < 3 %: T, N; R45-46-60-61-23-42/43-48/20-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R45-46-60-61-23-42/43-48/20-52/53 0,5 % ≤ C < 1 %: T; R45-46-60-61-20-42/43-52/53 0,25 % ≤ C < 0,5 %: T; R45-46-20-42/43-52/53 0,2 % ≤ C < 0,25 %: T; R45-46-20-42/43 0,1 % ≤ C < 0,2 %: T; R45-46-20	I
027-005-00-0	sulfato de cobalto	E	233-334-2	10124-43-3	Carc. Cat. 2; R49 Xn; R22 R42/43 N; R50-53	T; N R: 49-22-42/43-50/53 S: (2-)22-53-45-60-61	C ≥ 25 %: T, N; R49-22-42/43-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %: T, N; R49-22-42/43-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R49-42/43-52/53 0,25 % ≤ C < 1 %: T; R49-52/53 0,01 % ≤ C < 0,25 %: T; R49	I
029-002-00-X	óxido de cobre (I) óxido cuproso		215-270-7	1317-39-1	Xn; R22 N; 50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)22-60-61	C ≥ 25 %: T, N; R49-22-42/43-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %: T, N; R49-42/43-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R49-42/43-52/53 0,25 % ≤ C < 1 %: T; R49-52/53 0,01 % ≤ C < 0,25 %: T; R49	
030-001-00-1	zinco em pó (não estabilizado)		231-175-3	7440-66-6	F; R15-17 N; R50-53	F; N R: 15-17-50/53 S: (2-)43-46-60-61		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
030-002-00-7	zinco em pó (estabilizado)		231-175-3	7440-66-6	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
030-003-00-2	cloreto de zinco		231-592-0	7646-85-7	Xn; R22 C; R34 N; R50-53	C; N R: 22-34-50/53 S: (1/2)-26-36/37/39-45-60-61	C ≥ 25 %: C, N; R22-34-50/53 10 % ≤ C < 25 %: C, N; R34-51/53 5 % ≤ C < 10 %: Xn, N; R36/37/38-51/53 2,5 % ≤ C < 5 %: N; R51/53 0,25 % ≤ C < 2,5 %: R52/53	
030-006-00-9	sulfato de zinco (hidratado) (mono-, hexa-, e hepta-hidratado)		231-793-3 [1] 231-793-3 [2]	7446-19-7 [1] 7733-02-0 [2]	Xn; R22 R41 N; R50-53	Xn; N R: 22-41-50/53 S: (2)-22-26-39-46-60-61		
033-001-00-X	arsénio		231-148-6	7440-38-2	T; R23/25 N; R50-53	T; N R: 23/25-50/53 S: (1/2)-20/21-28-45-60-61		
033-002-00-5	compostos de arsénio, com excepção dos expressamente referidos no presente anexo	A	-	-	T; R23/25 N; R50-53	T; N R: 23/25-50/53 S: (1/2)-20/21-28-45-60-61	C ≥ 25 %: T, N; R23/25-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %: T, N; R23/25-51/53 0,25 % ≤ C < 2,5 %: T; R23/25-52/53 0,2 % ≤ C < 0,25 %: T; R23/25 0,1 % ≤ C < 0,2 %: Xn; R20/22	I
042-002-00-4	hexa-μ-oxotetra-μ3-oxodi-μ5-oxotetra-decaoxooctamolibdato(4-) de tetraquis(dimetil)ditetradecilamónio		404-760-8	117342-25-3	T; R23 Xi; R41 R53	T R: 23-41-53 S: (1/2)-26-37/39-45-61		
048-001-00-5	compostos de cádmio, com excepção do sulfoseleneto de cádmio (xCdS.yCdSe), do sulfureto misto de cádmio e zinco (xCdS.yZnS), do sulfureto misto de cádmio e mercúrio (xCdS.yHgS) e dos expressamente referidos no presente anexo	A	-	-	Xn; R20/21/22 N; R50-53	Xn; N R: 20/21/22-50/53 S: (2)-60-61	C ≥ 25 %: Xn, N; R20/21/22-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R20/21/22-51/53 0,25 % ≤ C < 2,5 %: Xn; R20/21/22-52/53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: Xn; R20/21/22	I
048-003-00-6	formato de cádmio		224-729-0	4464-23-7	T; R23/25 R33 Xn; R68	T; N R: 23/25-33-68-50/53 S: (1/2)-22-45-60-61	C ≥ 25 %: T, N; R23/25-33-50/53-68 10 % ≤ C < 25 %: T, N;	

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
048-004-00-1	cianeto de cádmio		208-829-1	542-83-6	T+; R26/27/28 R32 R33 Xn; R68 N; R50-53	T+; N R: 26/27/28-32-33-68-50/53 S: (1/2-)7-28-29-45-60-61	R23/25-33-51/53-68 2,5 % ≤ C < 10 %: Xn, N; R20/22-33-51/53-68 1 % ≤ C < 2,5 %: Xn; R20/22-33-52/53-68 0,1 % ≤ C < 1 %: Xn; R20/22-33-52/53 0,25 % ≤ C < 0,1 %: Xn; R20/22-33-52/53	
048-005-00-7	hexafluorossilicato de cádmio		241-084-0	17010-21-8	T; R23/25 R33 Xn; R68 N; R50-53	T; N R: 23/25-33-68-50/53 S: (1/2-)22-45-60-61	C ≥ 25 %: T, N; R23/25-33-50/53-68 10 % ≤ C < 25 %: T, N; R23/25-33-51/53-68 2,5 % ≤ C < 10 %: Xn, N; R20/22-33-51/53-68 1 % ≤ C < 2,5 %: Xn; R20/22-33-52/53-68 0,25 % ≤ C < 1 %: Xn; R20/22-33-52/53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: Xn; R20/21/22-33	
048-006-00-2	fluoreto de cádmio	E	232-222-0	7790-79-6	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 2; R46 Repr. Cat. 2; R60-61 T+; R26 T; R25-48/23/25 N; R50-53	T+; N R: 45-46-60-61-25-26-48/23/25-50/53 S: 53-45-60-61	C ≥ 25 %: T, N; R45-46-60-61-25-26-48/23/25-50/53 10 % ≤ C < 25 %: T, N; R45-46-60-61-25-26-48/23/25-51/53 7 % ≤ C < 10 %: T, N; R45-46-60-61-22-26-48/23/25-51/53 2,5 % ≤ C < 7 %: T, N; R45-46-60-61-22-23-48/20/22-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R45-46-60-61-22-23-48/20/22-52/53	

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
048-007-00-8	iodeto de cádmio		232-223-6	7790-80-9	T; R23/25 R33 Xn; R68 N; R50-53	T; N R: 23/25-33-68-50/53 S: (1/2)-22-45-60-61	0,5 % ≤ C < 1 %: T; R45-46-60-61-20/22-48/20/22-52/53 0,25 % ≤ C < 0,5 %: T; R45-46-20/22-48/20/22-52/53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: T; R45-46-20/22-48/20/22 0,01 % ≤ C < 0,1 %: T; R45	
048-008-00-3	cloreto de cádmio	E	233-296-7	10108-64-2	Carc. Cat. 2; R45 Mutag. Cat. 2; R46 Repr. Cat. 2; R60-61 T+; R26 T; R25-48/23/25 N; R50-53	T+; N R: 45-46-60-61-25-26-48/23/25-50/53 S: 53-45-60-61	C ≥ 25 %: T+; N; R45-46-60-61-25-26-48/23/25-50/53 10 % ≤ C < 25 %: T+; N; R45-46-60-61-25-26-48/23/25-51/53 2,5 % ≤ C < 10 %: Xn; N; R20/22-33-51/53-68 1 % ≤ C < 2,5 %: Xn; R20/22-33-52/53-68 0,25 % ≤ C < 1 %: Xn; R20/22-33-52/53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: Xn; R20/22-33	
048-009-00-9	sulfato de cádmio	E	233-331-6	10124-36-4	Carc. Cat. 2; R45 Mutag. Cat. 2; R46 Repr. Cat. 2; R60-61 T; R48/23/25 T+; R26 T; R25 N; R50-53	T+; N R: 45-46-60-61-25-26-48/23/25-50/53 S: 53-45-60-61	C ≥ 25 %: T+; N; R45-46-60-61-25-26-48/23/25-50/53 10 % ≤ C < 25 %: T+; N; R45-46-60-61-25-26-48/23/25-51/53 7 % ≤ C < 10 %: T+; N; R45-46-60-61-22-26-48/23/25-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R45-46-60-61-22-23-48/20/22-52/53 0,5 % ≤ C < 1 %: T; R45-46-60-61-20/22-48/20/22-52/53 0,25 % ≤ C < 0,5 %: T; R45-46-20/22-48/20/22-52/53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: T; R45-46-20/22-48/20/22 0,01 % ≤ C < 0,1 %: T; R45	

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
048-010-00-4	sulfureto de cádmio	E	215-147-8	1306-23-6	Carc. Cat. 2; R45 Mutua. Cat. 3; R68 Repr. Cat. 3; R62-63 T; R48/23/25 Xn; R22 R53	T; N R: 45-22-48/23/25-62-63-68-53 S: 53-45-61	51/53 2,5 % ≤ C < 7 %; T; N; R45-46-60-61-22-23-48/20/22-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %; T; R45-46-60-61-22-23-48/20/22-52/53 0,5 % ≤ C < 1 %; T; R45-46-60-61-20/22-48/20/22-52/53 0,25 % ≤ C < 0,5 %; T; R45-46-20/22-48/20/22-52/53 0,1 % ≤ C < 0,25 %; T; R45-46-20/22-48/20/22-52/53 0,01 % ≤ C < 0,1 %; T; R45	I
050-001-00-5	tetracloro de estanho		231-588-9	7646-78-8	C; R34 R52-53	C R: 34-52/53 S: (1/2-)/7/8-26-45-61	C ≥ 25 %; T; R45-22-48/23/25-62-63-68-53 10 % ≤ C < 25 %; T; R45-22-48/23/25-62-63-68 5 % ≤ C < 10 %; T; R45-48/20/22-62-63-68 1 % ≤ C < 5 %; T; R45-48/20/22-68 0,1 % ≤ C < 1 %; T; R45-48/20/22	
050-005-00-7	compostos de trimetilestanho com excepção dos expressamente referidos no presente anexo	A	-	-	T+; R26/27/28 N; R50-53	T+; N R: 26/27/28-50/53 S: (1/2-)/26-27-28-45-60-61	C ≥ 25 %; T+; N; R26/27/28-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %; T+; N; R26/27/28-51/53 0,5 % ≤ C < 2,5 %; T+; R26/27/28-52/53 0,25 % ≤ C < 0,5 %; T; R23/24/25-52/53 0,1 % ≤ C < 0,25 %; T; R23/24/25 0,05 % ≤ C < 0,1 %; Xn; R20/21/22	I
050-006-00-2	compostos de trietilestanho com excepção dos expressamente referidos no presente anexo	A	-	-	T+; R26/27/28 N; R50-53	T+; N R: 26/27/28-50/53 S: (1/2-)/26-27-28-45-60-61	C ≥ 25 %; T+; N; R26/27/28-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %; T+; N; R26/27/28-51/53 0,5 % ≤ C < 2,5 %; T+; R26/27/28-52/53 0,25 % ≤ C < 0,5 %; T+; R26/27/28-52/53 0,1 % ≤ C < 0,25 %; T+; R26/27/28-52/53 0,05 % ≤ C < 0,1 %; T; R26/27/28-52/53	I

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
050-007-00-8	compostos de tripropilstanho com excepção dos expressamente referidos no presente anexo	A	-	-	T; R23/24/25 N; R50-53	T; N R: 23/24/25-50/53 S: (1/2-)>26-27-28-45-60-61	R23/24/25-52/53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: T; R23/24/25 0,05 % ≤ C < 0,1 %: Xn; R20/21/22	I
050-008-00-3	compostos de tributilstanho com excepção dos expressamente referidos no presente anexo	A	-	-	T; R25-48/23/25 Xn; R21 Xi; R36/38 N; R50-53	T; N R: 21-25-36/38-48/23/25-50/53 S: (1/2-)>35-36/37/39-45-60-61	C ≥ 25 %: T, N; R21-25-36/38-48/23/25-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %: T, N; R21-25-36/38-48/23/25-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R21-25-36/38-48/23/25-52/53 0,25 % ≤ C < 1 %: Xn; R22-48/20/22-52/53	I
050-009-00-9	fluorotripropilstanho [1] hexapentildestanoxano [2]		243-546-7 [1] 247-143-7 [2]	20153-49-5 [1] 25637-27-8 [2]	Xn; R20/21/22 N; R50-53	Xn; N R: 20/21/22-50/53 S: (2-)>26-28-60-61	C ≥ 25 %: Xn, N; R20/21/22-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R20/21/22-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: Xn; R20/21/22-52/53 0,25 % ≤ C < 1 %: R52/53	I
050-010-00-4	fluorotrihexilstanano		243-547-2	20153-50-8	Xn; R20/21/22 N; R50-53	Xn; N R: 20/21/22-50/53 S: (2-)>26-28-60-61	C ≥ 25 %: Xn, N; R20/21/22-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R20/21/22-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: Xn; R20/21/22-52/53 0,25 % ≤ C < 1 %: R52/53	I
050-011-00-X	compostos de trietilstanho com excepção dos expressamente referidos no presente anexo	A	-	-	T; R23/24/25 N; R50-53	T; N R: 23/24/25-50/53 S: (1/2-)>26-27-28-45-60-61	C ≥ 25 %: T, N; R23/24/25-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %: T, N; R23/24/25-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R23/24/25-52/53	I

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
050-012-00-5	tetraciclohexildestano [1] clorotriciclohexildestano [2] butiltriciclohexildestano [3]	A	215-910-5 [1] 221-437-5 [2] 230-358-5 [3]	1449-55-4 [1] 3091-32-5 [2] 7067-44-9 [3]	Xn; R20/21/22 N; R50-53	Xn; N R: 20/21/22-50/53 S: (2-)26-28-60-61	C ≥ 25 %: Xn; N; R20/21/22-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %: Xn; N; R20/21/22-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: Xn; R20/21/22-52/53 0,25 % ≤ C < 1 %: R52/53	I
050-013-00-0	compostos de triocildestano com exceção dos expressamente referidos no presente anexo	A	-	-	Xi; R36/37/38 R53	Xi R: 36/37/38-53 S: (2-)61	C ≥ 25 %: Xi; R36/37/38-53 1 % ≤ C < 25 %: Xi; R36/37/38	I
051-002-00-3	pentacloreto de antimónio		231-601-8	7647-18-9	C; R34 N; R51-53	C; N R: 34-51/53 S: (1/2-)26-45-61	C ≥ 25 %: C; N; R34-51/53 10 % ≤ C < 25 %: C; R34-52/53 5 % ≤ C < 10 %: Xi; R36/37/38-52/53 2,5 % ≤ C < 5 %: R52/53	
051-003-00-9	compostos de antimónio, com exceção do tetróxido (Sb ₂ O ₄), do pentóxido (Sb ₂ O ₅), do trissulfureto (Sb ₂ S ₃), do pentassulfureto (Sb ₂ S ₅) e dos expressamente referidos no presente anexo	A	-	-	Xn; R20/22 N; R51-53	Xn; N R: 20/22-51/53 S: (2-)61	C ≥ 25 %: Xn; N; R20/22-51/53 2,5 % ≤ C < 25 %: Xn; R20/22-52/53 0,25 % ≤ C < 2,5 %: Xn; R20/22	I
080-002-00-6	compostos minerais de mercúrio, com exceção do sulfureto mercúrico (cinábrio) e dos expressamente referidos no presente anexo	A	-	-	T+; R26/27/28 R33 N; R50-53	T+; N R: 26/27/28-33-50/53 S: (1/2-)13-28-45-60-61	C ≥ 25 %: T+; N; R26/27/28-33-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %: T+; N; R26/27/28-33-51/53 2 % ≤ C < 2,5 %: T+; R26/27/28-33-52/53 0,5 % ≤ C < 2 %: T; R23/24/25-33-52/53 0,25 % ≤ C < 0,5 %: Xn; R20/21/22-33-52/53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: Xn; R20/21/22-33	I
080-004-00-7	compostos orgânicos de mercúrio, com exceção dos expressamente referidos no presente anexo	A	-	-	T+; R26/27/28 R33 N; R50-53	T+; N R: 26/27/28-33-50/53 S: (1/2-)13-28-36-45-60-61	C ≥ 25 %: T+; N; R26/27/28-33-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %: T+; N; R26/27/28-33-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T+;	I

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
080-007-00-3	dimetilmercúrio [1] dietilmercúrio [2]		209-805-3 [1] 211-000-7 [2]	593-74-8 [1] 627-44-1 [2]	T+; R26/27/28 R33 N; R50-53	T+; N R: 26/27/28-33-50/53 S: (1/2-1)3-28-36-45-60-61	R26/27/28-33-52/53 0,5 % ≤ C < 1 %: T; R23/24/25-33-52/53 0,25 % ≤ C < 0,5 %: Xn; R20/21/22-33-52/53 0,05 % ≤ C < 0,25 %: Xn; R20/21/22-33	I
082-001-00-6	compostos de chumbo, com excepção dos expressamente referidos no presente anexo	AE	-	-	Repr. Cat. 1; R61 Repr. Cat. 3; R62 Xn; R20/22 R33 N; R50-53	T; N R: 61-20/22-33-62-50/53 S: 53-45-60-61	C ≥ 25 %: T, N; R61-20/22-33-62-50/53 5 % ≤ C < 25 %: T, N; R61-20/22-33-62-51/53 2,5 % ≤ C < 5 %: T, N; R61-20/22-33-62-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R61-20/22-33-52/53 0,5 % ≤ C < 1 %: T; R61-33-52/53 0,25 % ≤ C < 0,5 %: R52/53	I
082-002-00-1	alquilos de chumbo	AE	-	-	Repr. Cat. 1; R61 Repr. Cat. 3; R62 T+; R26/27/28 R33 N; R50-53	T+; N R: 61-26/27/28-33-62-50/53 S: 53-45-60-61	C ≥ 25 %: T+; N; R61-26/27/28-33-62-50/53 5 % ≤ C < 25 %: T+; N; R61-26/27/28-33-62-51/53 2,5 % ≤ C < 5 %: T+; N; R61-26/27/28-33-51/53 0,5 % ≤ C < 2,5 %: T+; R61-26/27/28-33-52/53 0,25 % ≤ C < 0,5 %: T; R61-26/27/28-33-52/53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: T; R61-23/24/25-33 0,05 % ≤ C < 0,1 %: Xn; R20/21/22-33	I
601-010-00-3	etano		200-815-3	74-85-1	F+; R12	F+		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
	etileno				R67	R: 12-67 S: (2-)9-16-33-46		
601-014-00-5	isopreno (estabilizado) 2-metil-1,3-butadieno	D	201-143-3	78-79-5	F+; R12 Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 R52-53	F+; T R: 45-12-68-52/53 S: 53-45-61		
601-017-00-1	ciclohexano		203-806-2	110-82-7	F; R11 Xn; R65 Xi; R38 R67 N; R50-53	F; Xn; N R: 11-38-65-67-50/53 S: (2-)9-16-25-33-60-61-62		4, 6
601-020-00-8	benzeno	E	200-753-7	71-43-2	F; R11 Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 T; R48/23/24/25 Xn; R65 Xi; R36/38	F; T R: 45-46-11-36/38-48/23/24/25-65 S: 53-45		
601-021-00-3	tolueno		203-625-9	108-88-3	F; R11 Repr. Cat. 3; R63 Xn; R48/20-65 Xi; R38 R67	F; Xn R: 11-38-48/20-63-65-67 S: (2-)36/37-62-46		4, 6
601-025-00-5	mexileno 1,3,5-trimetilbenzeno		203-604-4	108-67-8	R10 Xi; R37 N; R51-53	Xi; N R: 10-37-51/53 S: (2-)61	C ≥ 25 %: Xi, N; R37-51/53 2,5 % ≤ C < 25 %: R52/53	
601-027-00-6	2-fenilpropeno α-metilstireno		202-705-0	98-83-9	R10 Xi; R36/37 N; R51-53	Xi; N R: 10-36/37-51/53 S: (2-)61	C ≥ 25 %: Xi, N; R36/37-51/53 2,5 % ≤ C < 25 %: R52/53	
601-028-00-1	2-metilstireno 2-viniltolueno		210-256-7	611-15-4	Xn; R20 N; R51-53	Xn; N R: 20-51/53 S: (2-)24-61	C ≥ 25 %: Xn, N; R20-51/53 2,5 % ≤ C < 25 %: R52/53	
601-032-00-3	benzol/αfleriseno benzol/βlpireno		200-028-5	50-32-8	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 2; R46 Repr. Cat. 2; R60-61 R43 N; R50-53	T; N R: 45-46-60-61-43-50/53 S: 53-45-60-61	C ≥ 25 %: T, N; R43-45-46-50-53-60-61 2,5 % ≤ C < 25 %: T, N; R43-45-46-51-53-60-61 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R43-45-46-52-53-60-61 0,5 % ≤ C < 1 %: T; R45-46-52-53-60-61 0,25 % ≤ C < 0,5 %: T; R45-46-52-53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: T; R45-46	

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
601-037-00-0	n-hexano		203-777-6	110-54-3	F; R11 Repr. Cat. 3; R62 Xn; R65-48/20 Xi; R38 R67 N; R51-53	F; Xn; N R: 11-38-48/20-62-65-67-51/53 S: (2-)-9-16-29-33-36/37-61-62	0,01 % ≤ C < 0,1 %; T; R45 C ≥ 25 %; Xn; N; R38-48/20-62-51/53 20 % ≤ C < 25 %; Xn; R38-48/20-62-52/53 5 % ≤ C < 20 %; Xn; R48/20-62-52/53 2,5 % ≤ C < 5 %; R52/53	4 6
601-041-00-2	dibenzol(a,h)lantraceno		200-181-8	53-70-3	Carc. Cat. 2; R45 N; R50-53	T; N R: 45-50/53 S: 53-45-60-61	C ≥ 25 %; T; N; R45-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %; T; N; R45-51/53 0,25 % ≤ C < 2,5 %; T; R45-52/53 0,01 % ≤ C < 0,25 %; T; R45	
601-048-00-0	criseno		205-923-4	218-01-9	Carc. Cat. 2; R45 Muita. Cat. 3; R68 N; R50-53	T; N R: 45-68-50/53 S: 53-45-60-61		
601-052-00-2	naftaleno		202-049-5	91-20-3	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-40-50/53 S: (2-)-36/37-46-60-61		
601-053-00-8	nonilfenol [1] 4-nonilfenol, ramificado [2]		246-672-0 [1] 284-325-5 [2]	25154-52-3 [1] 84852-15-3 [2]	Repr. Cat. 3; R62 Repr. Cat. 3; R63 Xn; R22 C; R34 N; R50-53	C; N R: 22-34-62-63-50/53 S: (1/2-)-26-36/37/39-45-46-60-61		
602-003-00-8	dibromometano		200-824-2	74-95-3	Xn; R20 R52-53	Xn R: 20-52/53 S: (2-)-24-61	C ≥ 25 %; Xn; R20-52/53 12,5 % ≤ C < 25 %; Xn; R20	
602-008-00-5	tetracloreto de carbono tetraclorometano		200-262-8	56-23-5	Carc. Cat. 3; R40 T; R23/24/25-48/23 R52-53 N; R59	T; N R: 23/24/25-40-48/23-59-52/53 S: (1/2-)-23-36/37-45-59-61	C ≥ 25 %; T; N; R23/24/25-40-48/23-52/53-59 1 % ≤ C < 25 %; T; N; R23/24/25-40-48/23-59 0,2 % ≤ C < 1 %; Xn; N; R20/21/22-48/20-59 0,1 % ≤ C < 0,2 %; N; R59	
602-010-00-6	1,2-dibromoetano	E	203-444-5	106-93-4	Carc. Cat. 2; R45 T; R23/24/25 Xi; R36/37/38 N; R51-53	T; N R: 45-23/24/25-36/37/38-51/53 S: 53-45-61	C ≥ 25 %; T; N; R45-23/24/25-36/37/38-51/53 20 % ≤ C < 25 %; T; N; R45-23/24/25-36/37/38-52/53 2,5 % ≤ C < 20 %; T; N; R45-23/24/25-52/53	

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
602-011-00-1	1,1-dicloroetano		200-863-5	75-34-3	F; R11 Xn; R22 Xi; R36/37 R52-53	F; Xn R: 11-22-36/37-52/53 S: (2-)16-23-61	1 % ≤ C < 2,5 %; T; R45-23/24/25 0,1 % ≤ C < 1 %; T; R45-20/21/22	
602-014-00-8	1,1,2-tricloroetano		201-166-9	79-00-5	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R20/21/22 R66	Xn R: 20/21/22-40-66 S: (2-)9-36/37-46	C ≥ 5 %; Xn; R20/21/22	
602-015-00-3	1,1,2,2-tetracloroetano		201-197-8	79-34-5	T+; R26/27 N; R51-53	T+; N R: 26/27-51/53 S: (1/2-)38-45-61	C ≥ 25 %; T+; N; R26/27-51/53 7 % ≤ C < 25 %; T+; R26/27-52/53 2,5 % ≤ C < 7 %; T; R23/24-52/53 1 % ≤ C < 2,5 %; T; R23/24 0,1 % ≤ C < 1 %; Xn; R20/21	
602-016-00-9	1,1,2,2-tetrabromoetano		201-191-5	79-27-6	T+; R26 Xi; R36 R52-53	T+ R: 26-36-52/53 S: (1/2-)24-27-45-61	C ≥ 25 %; T+; R26-36-52/53 20 % ≤ C < 25 %; T+; R26-36 7 % ≤ C < 20 %; T+; R26 1 % ≤ C < 7 %; T; R23 0,1 % ≤ C < 1 %; Xn; R20	
602-017-00-4	pentacloroetano		200-925-1	76-01-7	Carc. Cat. 3; R40 T; R48/23 N; R51-53	T; N R: 40-48/23-51/53 S: (1/2-)23-36/37-45-61	C ≥ 25 %; T; N; R40-48/23-51/53 2,5 % ≤ C < 25 %; T; R40-48/23-52/53 1 % ≤ C < 2,5 %; T; R40-48/23 0,2 % ≤ C < 1 %; Xn; R48/20	
602-019-00-5	1-bromopropano brometo de n-propilo		203-445-0	106-94-5	F; R11 Rep. Cat. 2; R60 Rep. Cat. 3; R63 Xn; R48/20 Xi; R36/37/38 R67	T; F R: 60-11-36/37/38-48/20-63-67 S: 53-45		
602-025-00-8	1,1-dicloroetileno cloro de vinilo	D	200-864-0	75-35-4	F; R12 Carc. Cat. 3; R40 Xn; R20	F+; Xn R: 12-20-40 S: (2-)7-16-29-36/37-46	C ≥ 12,5 %; Xn; R20-40 1 % ≤ C < 12,5 %; Xn; R40	
602-026-00-3	1,2-dicloroetileno	C	208-750-2	540-59-0 1	F; R11	F; Xn	C ≥ 25 %; Xn; R20-52/53	

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
	[1] <i>cis</i> -dicloroetileno [2] <i>trans</i> -dicloroetileno [3]		[1] 205-859-7 [2] 205-860-2 [3]	156-59-2 [2] 156-60-5 [3]	Xn; R20 R52-53	R: 11-20-52/53 S: (2-)-7-16-29-61	12,5 % ≤ C < 25 %; Xn; R20	
602-029-00-X	3-cloropropeno cloroeto de alilo	D	203-457-6	107-05-1	F; R11 Carc. Cat. 3; R40 Muta. Cat. 3; R68 Xn; R20/21/22-48/20 Xi; R36/37/38 N; R50	F; Xn; N R: 11-20/21/22-36/37/38-40-48/20-68-50 S: (2-)-16-25-26-36/37-46-61		
602-033-00-1	clorobenzeno		203-628-5	108-90-7	R10 Xn; R20 N; R51-53	Xn; N R: 10-20-51/53 S: (2-)-24/25-61	C ≥ 25 %; Xn; N; R20-51/53 5 % ≤ C < 25 %; Xn; N; R20-52/53 2,5 % ≤ C < 5 %; R52/53	
602-034-00-7	1,2-diclorobenzeno <i>o</i> -diclorobenzeno		202-425-9	95-50-1	Xn; R22 Xi; R36/37/38 N; R50-53	Xn; N R: 22-36/37/38-50/53 S: (2-)-23-60-61	C ≥ 25 %; Xn; N; R22-36/37/38-50/53 20 % ≤ C < 25 %; Xn; N; R22-36/37/38-51/53 5 % ≤ C < 20 %; Xn; N; R22-51/53 2,5 % ≤ C < 5 %; N; R51/53 0,25 % ≤ C < 2,5 %; R52/53	
602-035-00-2	1,4-diclorobenzeno <i>p</i> -diclorobenzeno		203-400-5	106-46-7	Xi; R36 Carc. Cat. 3; R40 N; R50-53	Xn; N R: 36-40-50/53 S: (2-)-36/37-46-60-61		
602-036-00-8	2-cloro-1,3-butadieno cloropreno (estabilizado)	D E	204-818-0	126-99-8	F; R11 Carc. Cat. 2; R45 Xn; R20/22-48/20 Xi; R36/37/38	F; T R: 45-11-20/22-36/37/38-48/20 S: 53-45		
602-039-00-4	policlorodifenilos PCB	C	215-648-1	1336-36-3	R33 N; R50-53	Xn; N R: 33-50/53 S: (2-)-35-60-61	C ≥ 25 %; Xn; N; R33-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %; Xn; N; R33-51/53 0,25 % ≤ C < 2,5 %; Xn; N; R33-52/53 0,005 % ≤ C < 0,25 %; Xn; R33	
602-043-00-6	lindano γ -1,2,3,4,5,6-hexaclorociclohexano		200-401-2	58-89-9	T; R25 Xn; R20/21-48/22 R64 N; R50-53	T; N R: 20/21-25-48/22-64-50/53 S: (1/2-)-36/37-45-60-	C ≥ 25 %; T; N; R20/21-25-48/22-64-50-53 10 % ≤ C < 25 %; Xn; N; R22-48/22-64-50-53	

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
602-062-00-X						61	3 % ≤ C < 10 %: Xn, N; R22-64-50-53 2,5 % ≤ C < 3 %: N; R64-50-53 1 % ≤ C < 2,5 %: N; R64-51-53 0,25 % ≤ C < 1 %: N; R51-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: R52-53	
602-062-00-X	1,2,3-tricloropropano	D	202-486-1	96-18-4	Carc. Cat. 2; R45 Repr. Cat. 2; R60 Xn; R20/21/22	T R: 45-60-20/21/22 S: 53-45		
602-073-00-X	1,4-diclorobut-2-eno	E	212-121-8	764-41-0	Carc. Cat. 2; R45 T+; R26 T; R24/25 C; R34 N; R50-53	T+; N R: 45-24/25-26-34-50/53 S: 53-45-60-61	C ≥ 25 %: T+, N; R45-24/25-26-34-50/53 10 % ≤ C < 25 %: T+, N; R45-21/22-26-34-51/53 7 % ≤ C < 10 %: T+, N; R45-21/22-26-36/37/38-51/53 5 % ≤ C < 7 %: T, N; R45-21/22-23-36/37/38-51/53 3 % ≤ C < 5 %: T, N; R45-21/22-23-51/53 2,5 % ≤ C < 3 %: T, N; R45-23-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R45-23-52/53 0,25 % ≤ C < 1 %: T; R45-20-52/53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: T; R45-20 0,01 % ≤ C < 0,1 %: T; R45	
603-006-00-7	Isómeros de pentanol, excepto outros mencionados no presente anexo	C	250-378-8	30899-19-5	R10 Xn; R20 Xi; R37 R66	Xn R: 10-20-37-66 S: (2-)-46		
603-007-00-2	2-metil-2-butanol álcool terc-amilico		200-908-9	75-85-4	F; R11 Xn; R20 Xi; R37/38	F; Xn R: 11-20-37/38 S: (2-)-46		
603-029-00-2	éter 2,2'-dicloroetilico		203-870-1	111-44-4	R10 Carc. Cat. 3; R40 T+; R26/27/28	T+ R: 10-26/27/28-40 S: (1/2-)/7/9-27-28-36/37-45	C ≥ 7 %: T+; R26/27/28-40 1 % ≤ C < 7 %: T; R23/24/25-40 0,1 % ≤ C < 1 %: Xn; R20/21/22	
603-030-00-8	2-aminoetanol etanolamina		205-483-3	141-43-5	Xn; R20/21/22 C; R34	C R: 20/21/22-34 S: (1/2-)/26-36/37/39-	C ≥ 25 %: C; R20/21/22-34 10 % ≤ C < 25 %: C; R34 5 % ≤ C < 10 %: Xi; R36/37/38	

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
603-031-00-3	1,2-dimetoxietano etilenglicoldimetiléter		203-794-9	110-71-4	Repr. Cat. 2; R60 Repr. Cat. 2; R61 F; R11 R19 Xn; R20	45 F; T R: 60-61-11-19-20 S: 53-45		
603-054-00-9	éter n-butílico dibutiléter		205-575-3	142-96-1	R10 Xi; R36/37/38 R52-53	Xi R: 10-36/37/38-52/53 S: (2-)61	C ≥ 10 %; Xi; R36/37/38	
603-063-00-8	2,3-epoxipropano-1-ol 2,3-epoxi-1-propanol glicídol	E	209-128-3	556-52-5	Carc. Cat. 2; R45 Mutag. Cat. 3; R68 Repr. Cat. 2; R60 T; R23 Xn; R21/22 Xi; R36/37/38	T R: 45-60-21/22-23-36/37/38-68 S: 53-45		
603-066-00-4	1-epoxietil-3,4-epoxiciclohexano diepoxido de vinilciclohexano		203-437-7	106-87-6	T; R23/24/25 Xn; R68	T R: 23/24/25-68 S: (1/2-)23-24-45	C ≥ 1 %; T; R23/24/25-68 0,1 % ≤ C < 1 %; Xn; R20/21/22	
603-067-00-X	1,2-epoxi-3-fenoxipropano éter 2,3-epoxipropil fenílico éter fenil glicídico	E	204-557-2	122-60-1	Carc. Cat. 2; R45 Mutag. Cat. 3; R68 Xn; R20 Xi; R37/38 R43 R52-53	T R: 45-20-37/38-43-68-52/53 S: 53-45-61		
603-070-00-6	2-amino-2-metilpropanol		204-709-8	124-68-5	Xi; R36/38 R52-53	Xi R: 36/38-52/53 S: (2-)61	C ≥ 25 %; Xi; R36/38-52/53 10 % ≤ C < 25 %; Xi; R36/38	
603-074-00-8	produto de reação: bisfenol-A- (epicloridrina) resinas epoxídicas (peso molecular médio ≤ 700)		500-033-5	25068-38-6	Xi; R36/38 R43 N; R51-53	Xi; N R: 36/38-43-51/53 S: (2-)28-37/39-61	C ≥ 25 %; Xi, N; R36/38-43-51/53 5 % ≤ C < 25 %; Xi; R36/38-43-52/53 2,5 % ≤ C < 5 %; Xi; R43-52/53 1 % ≤ C < 2,5 %; Xi; R43	
603-076-00-9	but-2-ino-1,4-diol 2-butino-1,4-diol	D	203-788-6	110-65-6	C; R34 T; R23/25 Xn; R21-48/22 R43	C; T R: 21-23/25-34-43-48/22 S: (1/2-)25-26-36/37/39-45-46	C ≥ 50 %; T, C; R21-23/25-34-48/22-43 25 % ≤ C < 50 %; T; R21-23/25-36/38-48/22-43 10 % ≤ C < 25 %; Xn; R20/22-48/22-43 3 % ≤ C < 10 %; Xn; R20/22-43	

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
603-095-00-2	2-(propiloxi)etanol		220-548-6	2807-30-9	Xn; R21 Xi; R36	Xn R: 21-36 S: (2-)26-36/37-46	1 % ≤ C < 3 %; Xi; R43	
603-105-00-5	furano	E	203-727-3	110-00-9	F+; R12 R19 Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 Xn; R20/22-48/22 Xi; R38 R52-53	F+; T R: 45-12-19-20/22-38-48/22-68-52/53 S: 53-45-61		
604-001-00-2	fenol ácido carbólico monohidroxibenzeno álcool fenílico		203-632-7	108-95-2	Muta. Cat. 3; R68 T; R23/24/25 Xn; R48/20/21/22 C; R34	T; C R: 23/24/25-34-48/20/21/22-68 S: (1/2-)24/25-26-28-36/37/39-45	C ≥ 10 %; T; R23/24/25-48/20/21/22-34-68 3 % ≤ C < 10 %; C; Xn; R20/21/22-34-68 1 % ≤ C < 3 %; Xn; R36/38-68	
604-009-00-6	piregalol 1,2,3-trihidroxibenzeno		201-762-9	87-66-1	Muta. Cat. 3; R68 Xn; R20/21/22 R52-53	Xn R: 20/21/22-68-52/53 S: (2-)36/37-61	C ≥ 25 %; Xn; R20/21/22-68-52/53 10 % ≤ C < 25 %; Xn; R20/21/22-68 1 % ≤ C < 10 %; Xn; R68	
604-010-00-1	resorcinol 1,3-benzenodiol 1,3-diidroxibenzeno		203-585-2	108-46-3	Xn; R22 Xi; R36/38 N; R50	Xn; N R: 22-36/38-50 S: (2-)26-61	C ≥ 25 %; Xn; N; R22-36/38-50 20 % ≤ C < 25 %; Xn; R22-36/38 10 % ≤ C < 20 %; Xn; R22	
604-012-00-2	4-cloro- <i>o</i> -cresol 4-cloro-2-metil fenol		216-381-3	1570-64-5	T; R23 C; R35 N; R50	T; C; N R: 23-35-50 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61	C ≥ 25 %; T, C, N; R23-35-50 10 % ≤ C < 25 %; C; R20-35 5 % ≤ C < 10 %; C; R20-34 3 % ≤ C < 5 %; Xn; R20-36/37/38 1 % ≤ C < 3 %; Xi; R36/37/38	
604-013-00-8	2,3,4,6-tetraclorofenol		200-402-8	58-90-2	T; R25 Xi; R36/38 N; R50-53	T; N R: 25-36/38-50/53 S: (1/2-)26-28-37-45-60-61	C ≥ 25 %; T, N; R25-36/38-50/53 20 % ≤ C < 25 %; T, N; R25-51/53 5 % ≤ C < 20 %; T, N; R25-36/38-51/53 2,5 % ≤ C < 5 %; Xn, N; R22-51/53 0,5 % ≤ C < 2,5 %; Xn; R22-52/53	

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
604-014-00-3	clorocresol 4-cloro- <i>m</i> -cresol 4-cloro-3-metilfenol		200-431-6	59-50-7	Xn; R21/22 Xi; R41 R43 N; R50	Xn; N R: 21/22-41-43-50 S: (2-)26-36/37/39-61	0,25 % ≤ C < 0,5 %; R52/53 C ≥ 25 %; Xn; N; R21/22-41-43-50 10 % ≤ C < 25 %; Xn; R21/22-41-43 5 % ≤ C < 10 %; Xn; R21/22-36-43 1 % ≤ C < 5 %; Xi; R43	
604-015-00-9	2,2'-metileno-bis(3,4,6-triclorofenol) hexaclorofeno		200-733-8	70-30-4	T; R24/25 N; R50-53	T; N R: 24/25-50/53 S: (1/2-)20-37-45-60-61	C ≥ 25 %; T; N; R24/25-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %; T; N; R24/25-51/53 2 % ≤ C < 2,5 %; T; R24/25-52/53 0,25 % ≤ C < 2 %; Xn; R21/22-52/53 0,2 % ≤ C < 0,25 %; Xn; R21/22	
604-017-00-X	2,4,5-triclorofenol		202-467-8	95-95-4	Xn; R22 Xi; R36/38 N; R50-53	Xn; N R: 22-36/38-50/53 S: (2-)26-28-60-61	C ≥ 25 %; Xn; N; R22-36/38-50/53 20 % ≤ C < 25 %; Xn; N; R22-36/38-51/53 5 % ≤ C < 20 %; Xn; N; R36/38-51/53 2,5 % ≤ C < 5 %; N; R51/53 0,25 % ≤ C < 2,5 %; R52/53	
604-030-00-0	Bisfenol-A 4,4'-isopropilidenedifenol		201-245-8	80-05-7	Repr. Cat. 3; R62 Xi; R37-41 R43	Xn R: 37-41-43-62 S: (2-)26-36/37-39-46		
605-002-00-0	1,3,5-trioxano trioximetileno		203-812-5	110-88-3	F; R11 Repr. Cat. 3; R63 Xi; R37	F; Xn R: 11-37-63 S: (2-)36/37-46		
605-016-00-7	glicoxal...% etanodial...%	B	203-474-9	107-22-2	Muita. Cat. 3; R68 Xn; R20 Xi; R36/38 R43	Xn R: 20-36/38-43-68 S: (2-)36/37	C ≥ 10 %; Xn; R20-36/38-43-68 1 % ≤ C < 10 %; Xn; R43-68	
605-020-00-9	safrole 5-allyl-1,3-benzodioxole	E	202-345-4	94-59-7	Carc. Cat. 2; R45 Muita. Cat. 3; R68 Xn; R22	T R: 45-22-68 S: 53-45		
605-022-00-X	glutaral glutaraldeído		203-856-5	111-30-8	T; R23/25 C; R34	T; N R: 23/25-34-42/43-50	C ≥ 50 %; T; N; R23/25-34-42/43-50	

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
	1,5-pentanodial				R42/43 N; R50	S: (1/2-)26-36/37/39-45-61	25 % ≤ C < 50 %: T; R22-23-34-42/43 10 % ≤ C < 25 %: C; R20/22-34-42/43 2 % ≤ C < 10 %: Xn; R20/22-37/38-41-42/43 1 % ≤ C < 2 %: Xn; R36/37/38-42/43 0,5 % ≤ C < 1 %: Xi; R36/37/38-43	
605-025-00-6	cloroacetaldéido		203-472-8	107-20-0	Carce. Cat. 3; R40 T+; R26 T; R24/25 C; R34 N; R50	T+; N R: 24/25-26-34-40-50 S: (1/2-)26-28-36/37/39-45-61	C ≥ 25 %: T+; N; R24/25-26-34-40-50 10 % ≤ C < 25 %: T+; R21/22-26-34-40 7 % ≤ C < 10 %: T+; R21/22-26-36/37/38-40 5 % ≤ C < 7 %: T; R21/22-23-36/37/38-40 3 % ≤ C < 5 %: T; R21/22-23-40 1 % ≤ C < 3 %: T; R23-40 0,1 % ≤ C < 1 %: Xn; R20	
606-037-00-4	triadimefão (ISO) 1-(4-clorofenoxi)-3,3-dimetil-1-(1,2,4-triazol-1-il)butanona		256-103-8	43121-43-3	Xn; R22 R43 N; R51-53	Xn; N R: 22-43-51/53 S: (2-)24-37-61		
606-048-00-4	2'-anilino-3'-metil-6'-dipentilaminoespiro(isobenzofurano-1(1H),9'-xanteno)-3-ona		406-480-1	-	R53	R: 53 S: 61		
607-004-00-7	ácido tricloroacético		200-927-2	76-03-9	C; R35 N; R50-53	C; N R: 35-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61	C ≥ 25 %: C, N; R35-50/53 10 % ≤ C < 25 %: C, N; R35-51/53 5 % ≤ C < 10 %: C, N; R34-51/53 2,5 % ≤ C < 5 %: Xi, N; R36/37/38-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: Xi; R36/37/38-52/53 0,25 % ≤ C < 1 %: R52/53	
607-019-00-9	cloroformato de metilo		201-187-3	79-22-1	F; R11 T+; R26 Xn; R21/22 C; R34	F; T+ R: 11-21/22-26-34 S: (1/2-)26-14-28-36/37-39-36/37/39-45-46-63		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
607-049-00-2	mecopropo (ISO) [1] e seus sais ácido 2-(4-cloro- <i>o</i> -toliloxi)propiónico (<i>RS</i>)-ácido 2-(4-cloro- <i>o</i> -toliloxi)propiónico [1] ácido 2-(4-cloro-2-metilfenoxi)propiónico [2]		230-386-8 [1] 202-264-4 [2]	7085-19-0 [1] 93-65-2 [2]	Xn; R22 Xi; R38-41 N; R50-53	Xn; N R: 22-38-41-50/53 S: (2-)13-26-37/39-60-61	C ≥ 25 %; Xn, N; R22-38-41-50-53 20 % ≤ C < 25 %; Xi, N; R38-41-50-53 10 % ≤ C < 20 %; Xi, N; R41-50-53 5 % ≤ C < 10 %; Xi, N; R36-50-53 0,25 % ≤ C < 5 %; N; R50-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %; N; R51-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %; R52-53	
607-053-00-4	MCPB (ISO) ácido 4-(4-cloro- <i>o</i> -toliloxi)butírico		202-365-3	94-81-5	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
607-061-00-8	ácido acrílico ácido 2-propenóico	D	201-177-9	79-10-7	R10 Xn; R20/21/22-35-50 C; R35 N; R50	C; N R: 10-20/21/22-35-50 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61	C ≥ 25 %; C, N; R20/21/22-35-50 10 % ≤ C < 25 %; C; R35 5 % ≤ C < 10 %; C; R34 1 % ≤ C < 5 %; Xi; R36/37/38	
607-064-00-4	clorofornato de benzilo		207-925-0	501-53-1	C; R34 N; R50-53	C; N R: 34-50/53 S: (1/2-)26-45-60-61	C ≥ 25 %; C, N; R34-50/53 10 % ≤ C < 25 %; C, N; R34-51/53 5 % ≤ C < 10 %; Xi, N; R36/37/38-51/53 2,5 % ≤ C < 5 %; N; R51/53 0,25 % ≤ C < 2,5 %; R52/53	
607-072-00-8	acrilato de 2-hidroxiethyl	D	212-454-9	818-61-1	T; R24 C; R34 R43 N; R50	T; N R: 24-34-43-50 S: (1/2-)26-36/39-45-61	C ≥ 25 %; T; R24-34-43-50 10 % ≤ C < 25 %; T; R24-34-43 5 % ≤ C < 10 %; T; R24-36/38-43 2 % ≤ C < 5 %; T; R24-43 0,2 % ≤ C < 2 %; Xn; R21-43	
607-086-00-4	ftalato de dialil		205-016-3	131-17-9	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)24/25-60-61	C ≥ 25 %; Xn, N; R22-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %; N; R51/53 0,25 % ≤ C < 2,5 %; R52/53	
607-091-00-1	ácido trifluoroacético . . . %	B	200-929-3	76-05-1	Xn; R20 C; R35 R52-53	C R: 20-35-52/53 S: (1/2-)9-26-27-28-45-61	C ≥ 25 %; C; R20-35-52/53 10 % ≤ C < 25 %; C; R20-35 5 % ≤ C < 10 %; C; R34 1 % ≤ C < 5 %; Xi; R36/38	

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
607-094-00-8	ácido peracético . . . %		201-186-8	79-21-0	R10 O; R7 Xn; R20/21/22 C; R35 N; R50	O; C; N R: 7-10-20/21/22-35-50 S: (1/2-3)/7-14-36/37/39-45-61	C ≥ 25 %: C, N; R20/21/22-35-50 10 % ≤ C < 25 %: C; R20/21/22-35 5 % ≤ C < 10 %: C; R34 1 % ≤ C < 5 %: Xi, R36/37/38	
607-107-00-7	acrilato de 2-etilhexilo	D	203-080-7	103-11-7	Xi; R37/38 R43	Xi R: 37/38-43 S: (2-3)/37-46		
607-113-00-X	metacrilato de isobutilo	D	202-613-0	97-86-9	R10 Xi; R36/37/38 R43 N; R50	Xi; N R: 10-36/37/38-43-50 S: (2-24-37-61	C ≥ 25 %: Xi, N; R36/37/38-43-50 20 % ≤ C < 25 %: Xi; R36/37/38-43 1 % ≤ C < 20 %: Xi; R43	
607-116-00-6	acrilato de ciclohexilo	D	221-319-3	3066-71-5	Xi; R37/38 N; R51-53	Xi; N R: 37/38-51/53 S: (2-361	C ≥ 25 %: Xi, N; R37/38-51/53 10 % ≤ C < 25 %: Xi; R37/38-52/53 2,5 % ≤ C < 10 %: R52/53	
607-133-00-9	monoalquilo ou monoarilo ou monoalquilarilo ésteres de ácido acrílico, com excepção dos expressamente referidos no presente anexo	A	-	-	Xi; R36/37/38 N; R51-53	Xi; N R: 36/37/38-51/53 S: (2-26-28-61	C ≥ 25 %: Xi, N; R36/37/38-51/53 10 % ≤ C < 25 %: Xi; R36/37/38-52/53 2,5 % ≤ C < 10 %: R52/53	
607-151-00-7	propargite (ISO) sulfito de 2-(4- <i>tert</i> -butilfenoxi)etanolhexilo e de prop-2-inoilo		219-006-1	2312-35-8	Carc. Cat.3; R40 T; R23 Xi; R38-41 N; R50-53	T; N R: 23-38-40-41-50/53 S: (1/2-26-36/37/39-45-60-61	C ≥ 25 %: T, N; R23-38-40-41-50-53 20 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R20-38-40-41-50-53 10 % ≤ C < 20 %: Xn, N; R20-40-41-50-53 5 % ≤ C < 10 %: Xn, N; R20-40-36-50-53 3 % ≤ C < 5 %: Xn, N; R20-40-50-53 2,5 % ≤ C < 3 %: Xn, N; R40-50-53 1 % ≤ C < 2,5 %: Xn, N; R40-51-53 0,025 % ≤ C < 1 %: N; R51-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: R52-53	
607-189-00-4	ácido trimetilenodiaminotetracético		400-400-9	1939-36-2	Xn; R22 Xi; R41 N; R50-53	Xn; N R: 22-41-50/53 S: (2-22-26-39-60-61		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
607-244-00-2	acrilato de isooctilo		249-707-8	29590-42-9	Xi; R36/37/38 N; R50-53	Xi; N R: 36/37/38-50/53 S: (2-)26-28-60-61	C ≥ 25 %: Xi, N; R36/37/38-50/53 10 % ≤ C < 25 %: Xi, N; R36/37/38-51/53 2,5 % ≤ C < 10 %: N; R51/53 0,25 % ≤ C < 2,5 %: R52/53	
607-245-00-8	acrilato de <i>tert</i> -butilo	D	216-768-7	1663-39-4	F; R11 Xi; R20/21/22 Xi; R37/38 R43 N; R52-53	F; Xn R: 11-20/21/22-37/38-43-52/53 S: (2-)16-25-37-61	C ≥ 25 %: Xn; R20/21/22-37/38-43-52-53 20 % ≤ C < 25 %: Xi; R37/38-43 1 % ≤ C < 20 %: Xi; R43	
607-247-00-9	metaacrilato de dodecilo		205-570-6	142-90-5	Xi; R36/37/38 N; R50-53	Xi; N R: 36/37/38-50/53 S: (2-)26-28-60-61	C ≥ 25 %: Xi, N; R36/37/38-50/53 10 % ≤ C < 25 %: Xi, N; R36/37/38-51/53 2,5 % ≤ C < 10 %: N; R51/53 0,25 % ≤ C < 2,50 %: R52/53	
607-249-00-X	diacrilato de (1-metil-1,2-etanodiol)bis(oxi(metil-2,1-etanodilo))		256-032-2	42978-66-5	Xi; R36/37/38 R43 N; R51-53	Xi; N R: 36/37/38-43-51/53 S: (2-)24-37-61	C ≥ 25 %: Xi, N; R36/37/38-43-51/53 10 % ≤ C < 25 %: Xi; R36/37/38-43-52/53 2,5 % ≤ C < 10 %: Xi; R43-52/53 1 % ≤ C < 2,5 %: Xi; R43	
608-003-00-4	acrilonitrilo	D E	203-466-5	107-13-1	F; R11 Carc. Cat. 2; R45 T; R23/24/25 Xi; R37/38-41 R43 N; R51-53	F; T; N R: 45-11-23/24/25-37/38-41-43-51/53 S: 9-16-53-45-61	C ≥ 25 %: T, N; R45-23/24/25-37/38-41-43-51/53 20 % ≤ C < 25 %: T; R45-23/24/25-37/38-41-43-52/53 10 % ≤ C < 20 %: T; R45-23/24/25-41-43-52/53 5 % ≤ C < 10 %: T; R45-23/24/25-36-43-52/53 2,5 % ≤ C < 5 %: T; R45-23/24/25-43-52/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R45-23/24/25-43 0,2 % ≤ C < 1 %: T; R45-20/21/22 0,1 % ≤ C < 0,2 %: T; R45	
608-006-00-0	bromoximil (ISO) e seus sais 3,5-dibromo-4-hidroxibenzoitrilo		216-882-7	1689-84-5	Repr. Cat. 3; R63 T+; R26 T; R25	T+; N R: 25-26-43-63-50/53 S: (1/2-)27/28-36/37-	C ≥ 25 %: T+; N; R25-26-43-63-50-53 7 % ≤ C < 25 %: T+; N; R22-	

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
	bromoximil fenol				R43 N; R50-53	45-63-60-61	26-43-63-50-53 5 % ≤ C < 7 %: T, N; R22-23-43-63-50-53 3 % ≤ C < 5 %: T, N; R22-23-43-50-53 2,5 % ≤ C < 3 %: T, N; R23-43-50-53 1 % ≤ C < 2,5 %: T, N; R23-43-51-53 0,25 % ≤ C < 1 %: Xn, N; R20-51-53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: Xn; R20-52-53 0,025 % ≤ C < 0,1 %: R52-53	
608-007-00-6	ioxinil (ISO) e seus sais 4-hidroxi-3,5-diiodobenzonitrilo		216-881-1	1689-83-4	Repr. Cat. 3; R63 T; R23/25 Xn; R21-48/22 Xi; R36 N; R50-53	T; N R: 21-23/25-36-48/22-63-50/53 S: (1/2-)/36/37-45-60-61-63	C ≥ 25 %: T, N; R21-23/25-36-48/22-63-50-53 20 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R20/22-36-48/22-63-50-53 10 % ≤ C < 20 %: Xn, N; R20/22-48/22-63-50-53 5 % ≤ C < 10 %: Xn, N; R20/22-63-50-53 3 % ≤ C < 5 %: Xn, N; R20/22-50-53 2,5 % ≤ C < 3 %: N; R50-53 0,25 % ≤ C < 2,5 %: N; R51-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: R52-53	
608-010-00-2	metaacrilonitrilo 2-metil-2-propenonitrilo	D	204-817-5	126-98-7	F; R11 T; R23/24/25 R43	F; T R: 11-23/24/25-43 S: (1/2-)/9-16-18-29-45	C ≥ 1 %: T; R23/24/25-43 0,2 % ≤ C < 1 %: Xn; R20/21/22-43	
608-014-00-4	clorotalonil (ISO) tetracloroisofaltonitrilo		217-588-1	1897-45-6	Carc. Cat. 3; R40 T+; R26 Xi; R41 Xi; R37 R43 N; R50-53	T+; N R: 26-37-40-41-43-50/53 S: (2-)/28-36/37/39-45-60-61	C ≥ 20 %: T+; N; R26-37-40-41-43-50-53 10 % ≤ C < 20 %: T+; N; R26-40-41-43-50-53 7 % ≤ C < 10 %: T+; N; R26-40-36-43-50-53 5 % ≤ C < 7 %: T, N; R23-40-36-43-50-53 2,5 % ≤ C < 5 %: T, N; R23-40-43-50-53 1 % ≤ C < 2,5 %: T, N; R23-40-43-51-53 0,25 % ≤ C < 1 %: Xn, N; R20-51-53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: Xn; R20-52-53	

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
608-017-00-0	octanoato de bromoximil (ISO) octanoato de 2,6-dibromo-4-cianofenilo		216-885-3	1689-99-2	Repr. Cat. 3; R63 T; R23 Xn; R22 R43 N; R50-53	T; N R: 22-23-43-63-50/53 S: (1/2-)36/37-45-63-60-61	0,025 % ≤ C < 0,1 %; R52-53 C ≥ 25 %; T; N; R22-23-43-63-50-53 5 % ≤ C < 25 %; Xn; N; R20-43-63-50-53 3 % ≤ C < 5 %; Xn; N; R20-43-50-53 2,5 % ≤ C < 3 %; Xi; N; R43-50-53 1 % ≤ C < 2,5 %; Xi; N; R43-51-53 0,25 % ≤ C < 1 %; N; R51-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %; R52-53	
608-018-00-6	octanoato de ioximil (ISO) octanoato de 4-ciano-2,6-diiodofenilo		223-375-4	3861-47-0	Repr. Cat. 3; R63 T; R25 Xi; R36 R43 N; R50-53	T; N R: 25-36-43-63-50/53 S: (1/2-)26-36/37-45-60-61	C ≥ 25 %; T; N; R25-36-43-63-50-53 20 % ≤ C < 25 %; Xn; N; R22-36-43-63-50-53 5 % ≤ C < 20 %; Xn; N; R22-43-63-50-53 3 % ≤ C < 5 %; Xn; N; R22-43-50-53 2,5 % ≤ C < 3 %; N; R43-50-53 1 % ≤ C < 2,5 %; N; R43-51-53 0,25 % ≤ C < 1 %; N; R51-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %; R52-53	
608-021-00-2	3-(2-(diaminometilnamino)flazole-4-ilmetil)propionitrilo		403-710-2	76823-93-3	Xn; R22 R43	Xn R: 22-43 S: (2-)22-24-37		
609-007-00-9	2,4-dinitrotolueno dinitrotolueno, técnico [1] dinitrotolueno [2]	E	204-450-0 [1] 246-836-1 [2]	121-14-2 1 25321-14-6 [2]	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 Repr. Cat. 3; R62 T; R23/24/25 Xn; R48/22 N; R51-53	T; N R: 45-23/24/25-48/22-62-68-51/53 S: 53-45-61		
609-023-00-6	dinocape (ISO)	E	254-408-0	39300-45-3	Repr. Cat. 2; R61 Xn; R20-48/22 Xi; R38 R43 N; R50-53	T; N R: 61-20-22-38-43-48/22-50/53 S: 53-45-60-61		
609-043-00-5	quintozeno (ISO) pentacloronitrobenzeno		201-435-0	82-68-8	R43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2-)13-24-37-60-61		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
609-049-00-8	2,6-dinitrotolueno	E	210-106-0	606-20-2	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 Repr. Cat. 3; R62 T; R23/24/25 Xn; R48/22 R52-53	T R: 45-23/24/25-48/22- 62-68-52/53 S: 53-45-61		
609-050-00-3	2,3-dinitrotolueno	E	210-013-5	602-01-7	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 Repr. Cat. 3; R62 T; R23/24/25 Xn; R48/22 N; R50-53	T; N R: 45-23/24/25-48/22- 62-68-50/53 S: 53-45-60-61		
609-051-00-9	3,4-dinitrotolueno	E	210-222-1	610-39-9	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 Repr. Cat. 3; R62 T; R23/24/25 Xn; R48/22 N; R51-53	T; N R: 45-23/24/25-48/22- 62-68-51/53 S: 53-45-61		
609-052-00-4	3,5-dinitrotolueno	E	210-566-2	618-85-9	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 Repr. Cat. 3; R62 T; R23/24/25 Xn; R48/22 R52-53	T R: 45-23/24/25-48/22- 62-68-52/53 S: 53-45-61		
609-055-00-0	2,5-dinitrotolueno	E	210-581-4	619-15-8	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 Repr. Cat. 3; R62 T; R23/24/25 Xn; R48/22 N; R51-53	T; N R: 45-23/24/25-48/22- 62-68-51/53 S: 53-45-61		
609-056-00-6	2,2-dibromo-2-nitrotolueno		412-380-9	69094-18-4	E; R2 Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22-48/22 C; R35 R43 N; R50-53	E; C; N R: 2-22-35-40-43- 48/22-50/53 S: (1/2-23-26-35- 36/37/39-45-60-61	C ≥ 25 %: C, N; R22-35-40-43- 48/22-50/53 10 % ≤ C < 25 %: C, N; R22- 35-40-43-48/22-51/53 5 % ≤ C < 10 %: C, N; R34-40- 43-51/53 2,5 % ≤ C < 5 %: Xn, N; R36/37/38-40-43-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: Xn; R36/37/38-40-43-52/53 0,25 % ≤ C < 1 %: R52/53	
610-005-00-5	1-cloro-4-nitrobenzeno		202-809-6	100-00-5	Carc. Cat. 3; R40	T; N		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
611-001-00-6	azobenzeno	E	203-102-5	103-33-3	Mut. Cat. 3; R68 T; R23/24/25 Xn; R48/20/21/22 N; R51-53	R; 23/24/25-40-48/20/21/22-68-51/53 S: (1/2-)28-36/37-45-61		
611-060-00-8	Mistura de: 5-[8-[4-[4-[17-(3,5-dicarboxilatofenilazo)-2-hidroxi-3,6-dissulfonatofalenilo]-1-ilamino]-6-hidroxi]-1,3,5-triazina-2-il]-2,5-dimetilpiperazina-1-il]-6-hidroxi-1,3,5-triazina-2-ilamino]-1-hidroxi-3,6-dissulfonatofaleno-2-ilazo]-isofalato de sódio; 5-[8-[4-[4-[17-(3,5-dicarboxilatofenilazo)-8-hidroxi-3,6-dissulfonatofaleno-1-ilamino]-6-hidroxi]-1,3,5-triazina-2-il]-2,5-dimetilpiperazina-1-il]-6-hidroxi-1,3,5-triazina-2-ilamino]-1-hidroxi-3,6-dissulfonatofaleno-2-ilazo]-isofalato de amónio; ácido 5-[8-[4-[4-[17-(3,5-dicarboxilatofenilazo)-8-hidroxi-3,6-dissulfonatofaleno-1-ilamino]-6-hidroxi]-1,3,5-triazina-2-il]-2,5-dimetilpiperazina-1-il]-6-hidroxi-1,3,5-triazina-2-ilamino]-1-hidroxi-3,6-dissulfonatofaleno-2-ilazo]-isofalico		413-180-4	-	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)22-26-39		
611-063-00-4	[4-(8-acetilamino-3,6-dissulfonato-2-naftilazo)-4''-(6-benzolamino-3-sulfonato-2-naftilazo)-bifenil-1,3',3'',1'''-tetraolato-O,O',O'',O''']cobre(II) de trissódio		413-590-3	164058-22-4	Carce. Cat. 2; R45	T R: 45 S: 53-45		
612-008-00-7	anilina		200-539-3	62-53-3	Carce. Cat. 3; R40 Muta. Cat. 3; R68 T; R23/24/25-48/23/24/25-68-50 48/23/24/25	T; N R: 23/24/25-40-41-43-48/23/24/25-68-50 S: (1/2-)26-27-	C ≥ 25 %: T, N; R23/24/25-40-41-43-48/23/24/25-50-68 10 % ≤ C < 25 %: T; R20/21/22-40-41-43-	

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
612-009-00-2	saís de anilina	A	-	-	Xi; R41 R43 N; R50	36/37/39-45-46-61-63	48/23/24/25-68 1% ≤ C < 10%; T; R20/21/22-40-43-48/23/24/25-68 0,2% ≤ C < 1%; Xn; R48/20/21/22	
612-010-00-8	cloroanilinas (excepto outras mencionadas no presente anexo)	C	-	-	Carc. Cat. 3; R40 Muta. Cat. 3; R68 T; R23/24/25 Xi; R41 R43 N; R50	T; N R: 23/24/25-40-41-43-48/23/24/25-68-50 S: (1/2-)/26-27-36/37/39-45-61-63	C ≥ 25%; T, N; R23/24/25-40-41-43-48/23/24/25-50-68 10% ≤ C < 25%; T; R20/21/22-40-41-43-48/23/24/25-68 1% ≤ C < 10%; T; R20/21/22-40-43-48/23/24/25-68 0,2% ≤ C < 1%; Xn; R48/20/21/22	
612-022-00-3	2-naftilamina	E	202-080-4	91-59-8	Carc. Cat. 1; R45 Xn; R22 N; R51-53	T; N R: 23/24/25-33-50/53 S: (1/2-)/28-36/37-45-60-61	C ≥ 25%; T, N; R45-22-51/53 2,5% ≤ C < 25%; T; R45-52/53 0,01% ≤ C < 2,5%; T; R45	
612-023-00-9	fenilidrazina [1] cloreto de fenilidrazina [2] hidroclorato de fenilidrazina [3] sulfato de fenilidrazina (1:2) [4]	E	202-873-5 [1] 200-444-7 [2] 248-259-0 [3] 257-622-2 [4]	100-63-0 [1] 59-88-1 [2] 27140-08-5 [3] 52033-74-6 [4]	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 T; R23/24/25-48/23/24/25 Xi; R36/38 R43 N; R50	T; N R: 45-23/24/25-36/38-43-48/23/24/25-68-50 S: 53-45-61		
612-025-00-X	Nitrotoluidinas, com excepção das expressamente referidas no presente anexo	C	-	-	T; R23/24/25 R33 N; R51-53	T; N R: 23/24/25-33-51/53 S: (1/2-)/28-36/37-45-61		
612-035-00-4	2-metoxianilina o-anisidina	E	201-963-1	90-04-0	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 T; R23/24/25	T R: 45-23/24/25-68 S: 53-45		
612-042-00-2	benzidina 1,1'-bifenil-4,4'-diamina 4,4'-diaminobifenilo bifenil-4,4'-metilenediamina	E	202-199-1	92-87-5	Carc. Cat. 1; R45 Xn; R22 N; R50-53	T; N R: 45-22-50/53 S: 53-45-60-61	C ≥ 25%; T, N; R45-22-50/53 2,5% ≤ C < 25%; T, N; R45-51/53 0,01% ≤ C < 2,5%; T; R45	
612-051-00-1	4,4'-diaminodifenilmetano	E	202-974-4	101-77-9	Carc. Cat. 2; R45	T; N		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
	4,4'-metilenedianilina				Muta. Cat. 3; R68 T; R39/23/24/25 Xn; R48/20/21/22 R43 N; R51-53	R; 45-39/23/24/25-43-48/20/21/22-68-51/53 S: 53-45-61		
612-054-00-8	N,N-dietilanilina		202-088-8	91-66-7	T; R23/24/25 R33 N; R51-53	T; N R; 23/24/25-33-51/53 S: (1/2)-28-37-45-61	C ≥ 25 %: T, N; R23/24/25-33-51/53 5 % ≤ C < 25 %: T; R23/24/25-33-52/53 2,5 % ≤ C < 5 %: Xn; R20/21/22-33-52/53 1 % ≤ C < 2,5 %: Xn; R20/21/22-33	
612-056-00-9	N,N-dimetil- <i>p</i> -toluidina [1] N,N-dimetil- <i>m</i> -toluidina [2] N,N-dimetil- <i>o</i> -toluidina [3]	C	202-805-4 [1] 204-495-6 [2] 210-199-8 [3]	99-97-8 1 121-72-2 2 609-72-3 3	T; R23/24/25 R33 R52-53	T R; 23/24/25-33-52/53 S: (1/2)-28-36/37-45-61	C ≥ 25 %: T; R23/24/25-33-52-53 5 % ≤ C < 25 %: T; R23/24/25-33 1 % ≤ C < 5 %: Xn; R20/21/22-33	
612-059-00-5	3,6-diazoctano-1,8-diamina trietilenoetramina		203-950-6	112-24-3	Xn; R21 C; R34 R43 R52-53	C R; 21-34-43-52/53 S: (1/2)-26-36/37/39-45-61	C ≥ 25 %: C; R21-34-43-52/53 10 % ≤ C < 25 %: C; R34-43 5 % ≤ C < 10 %: Xi; R36/38-43 1 % ≤ C < 5 %: Xi; R43	
612-060-00-0	3,6,9-triazaundecano-1,11-diamino tetraetilenopentamina		203-986-2	112-57-2	Xn; R21/22 C; R34 R43 N; R51-53	C; N R; 21/22-34-43-51/53 S: (1/2)-26-36/37/39-45-61	C ≥ 25 %: C, N; R21/22-34-43-51/53 10 % ≤ C < 25 %: C; R34-43-52/53 5 % ≤ C < 10 %: Xi; R36/38-43-52/53 2,5 % ≤ C < 5 %: Xi; R43-52/53 1 % ≤ C < 2,5 %: Xi; R43	
612-064-00-2	3,6,9,12-tetraazatetradecano-1,14-diamina pentaetilenohexamina		223-775-9	4067-16-7	C; R34 R43 N; R50-53	C; N R; 34-43-50/53 S: (1/2)-26-36/37/39-45-60-61	C ≥ 25 %: C, N; R34-43-50/53 10 % ≤ C < 25 %: C, N; R34-43-51/53 5 % ≤ C < 10 %: Xi, N; R36/38-43-51/53 2,5 % ≤ C < 5 %: Xi, N; R43-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: Xi; R43-52/53 0,25 % ≤ C < 1 %: R52/53	

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
612-065-00-8	polietilenopoliamicinas com excepção das expressamente referidas no presente anexo		-	-	Xn; R21/22 C; R34 R43 N; R50-53	C; N R: 21/22-34-43-50/53 S: (1/2)-26-36/37/39-45-60-61	C ≥ 25 %: C, N; R21/22-34-43-50/53 10 % ≤ C < 25 %: C, N; R34-43-51/53 5 % ≤ C < 10 %: Xi, N; R36/38-43-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: Xi; R43-52/53 0,25 % ≤ C < 1 %: R52/53	
612-066-00-3	diciclohexilamina		202-980-7	101-83-7	Xn; R22 C; R34 N; R50-53	C; N R: 22-34-50/53 S: (1/2)-26-36/37/39-45-60-61	C ≥ 25 %: C, N; R22-34-50/53 10 % ≤ C < 25 %: C, N; R34-51/53 2,5 % ≤ C < 10 %: Xi, N; R36/38-51/53 2 % ≤ C < 2,5 %: Xi; R36/38-52/53 0,25 % ≤ C < 2 %: R52/53	
612-067-00-9	3-aminometil-3,5,5-trimetilciclohexilamina		220-666-8	2855-13-2	Xn; R21/22 C; R34 R43 R52-53	C R: 21/22-34-43-52/53 S: (1/2)-26-36/37/39-45-61	C ≥ 25 %: C; R21/22-34-43-52/53 10 % ≤ C < 25 %: C; R34-43 5 % ≤ C < 10 %: Xi; R36/38-43 1 % ≤ C < 5 %: Xi; R43	
612-077-00-3	dimetilnitrosoamina N-nitrosodimetilamina	E	200-549-8	62-75-9	Carce. Cat. 2; R45 T+; R26 T; R25-48/25 N; R51-53	T+; N R: 45-25-26-48/25-51/53 S: 53-45-61	C ≥ 25 %: T+; N; R45-25-26-48/25-51/53 10 % ≤ C < 25 %: T+; R45-22-26-48/25-52/53 7 % ≤ C < 10 %: T+; R45-22-26-48/22-52/53 3 % ≤ C < 7 %: T; R45-22-23-48/22-52/53 2,5 % ≤ C < 3 %: T; R45-23-48/22-52/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R45-23-48/22 0,1 % ≤ C < 1 %: T; R45-20 0,001 % ≤ C < 0,1 %: T; R45	
612-086-00-2	amitraz (ISO) N,N-bis(2,4-xililiminometil)metilamina		251-375-4	33089-61-1	Xn; R22-48/22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-48/22-50/53 S: (2)-22-60-24-61-36/37	C ≥ 25 %: Xn; N; R22-43-48/22-50-53 10 % ≤ C < 25 %: Xn; N; R43-48/22-50-53 2,5 % ≤ C < 10 %: N; R43-50-53 1 % ≤ C < 2,5 %: N; R43-51-53 0,25 % ≤ C < 1 %: N; R51-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: R52-53	

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
612-087-00-8	guazatina		236-855-3	13516-27-3	T+; R26 Xn; R21/22 Xi; R37/38-41 N; R50-53	T+; N R: 21/22-26-37/38-41-50/53 S: (1/2-)26-28-36/37/39-38-45-46-60-61-63		
612-094-00-6	4-(2-cloro-4-trifluorometil)fenoxi-2-fluoroanilina, cloridrato		402-190-4	-	T; R48/25 Xn; R22-48/20 Xi; R41 R43 N; R50-53	R: 22-41-43-48/20-48/25-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61		
612-121-00-1	aminas, polietilenopoli-HEPA		268-626-9	68131-73-7	Xn; R21/22 C; R34 R43 N; R50-53	C; N R: 21/22-34-43-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61	C ≥ 25 %; C, N; R21/22-34-43-50/53 10 % ≤ C < 25 %; C, N; R34-43-51/53 5 % ≤ C < 10 %; Xi, N; R36/38-43-51/53 2,5 % ≤ C < 5 %; Xi, N; R43-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %; Xi; R43-52/53 0,25 % ≤ C < 1 %; R52/53	
612-136-00-3	<i>N</i> -isopropil- <i>N'</i> -fenil- <i>p</i> -fenilenediamina		202-969-7	101-72-4	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)24-37-60-61	C ≥ 25 %; Xn, N; R22-43-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %; Xi, N; R43-51/53 0,25 % ≤ C < 2,5 %; Xi; R43-52/53 0,1 % ≤ C < 0,25 %; Xi; R43	
612-151-00-5	diaminotolueno, técnico - mistura de [2] e [3] metil-fenilenediamina [1] 4-metil- <i>m</i> -fenilenediamina [2] 2-metil- <i>m</i> -fenilenediamina [3]	E	246-910-3 [1] 202-453-1 [2] 212-513-9 [3]	25376-45-8 [1] 95-80-7 [2] 823-40-5 [3]	Carc. Cat. 2; R45 T; R25 Xn; R20/21 Xi; R36 R43 N; R51-53	T; N R: 45-20/21-25-36-43-51/53 S: 53-45-61		
613-009-00-5	2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina cloreto de cianurilo		203-614-9	108-77-0	T+; R26 Xn; R22 C; R34 R43 R14	T+; C R: 14-22-26-34-43 S: (1/2-)26-28-36/37/39-45-46-63	C ≥ 25 %; T+; R22-26-34-43 10 % ≤ C < 25 %; T+; R26-34-43 7 % ≤ C < 10 %; T+; R26-36/37/38-43 5 % ≤ C < 7 %; T; R23-36/37/38-43	

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
613-011-00-6	amitrole (ISO) 1,2,4-triazol-3-ilamina		200-521-5	61-82-5	Repr. Cat.3; R63 Xn; R48/22 N; R51-53	Xn; N R: 48/22-63-51/53 S: (2-)13-36/37-61	1 % ≤ C < 5 %; T; R23-43 0,1 % ≤ C < 1 %; Xn; R20	
613-033-00-6	2-metilaziridina propilimina	E	200-878-7	75-55-8	F; R11 Carc. Cat. 2; R45 T+; R26/27/28 Xi; R41 N; R51-53	F; T+; N R: 45-11-26/27/28-41-51/53 S: 53-45-61	C ≥ 25 %; T+; N; R45- 26/27/28-41-51/53 10 % ≤ C < 25 %; T+; R45- 26/27/28-41-52/53 7 % ≤ C < 10 %; T+; R45- 26/27/28-36-52/53 5 % ≤ C < 7 %; T; R45- 23/24/25-36-52/53 2,5 % ≤ C < 5 %; T; R45- 23/24/25-52/53 1 % ≤ C < 2,5 %; T; R45- 23/24/25 0,1 % ≤ C < 1 %; T; R45- 20/21/22 0,01 % ≤ C < 0,1 %; T; R45	
613-040-00-4	azazonazole (ISO) 1-[12-(2,4-diclorofenil)-1,3-dioxolan-2-il]metil]-1H-1,2,4-triazole		262-102-3	60207-31-0	Xn; R22	Xn R: 22 S: (2-)46		
613-043-00-0	Sulfato de imazalil (ISO) em pó hidrogenossulfato de 1-[2-(aliloxi)etil-2-(2,4-diclorofenil)]-1H-imidazólio [1] hidrogenossulfato de (±)-1-[2-(aliloxi)etil-2-(2,4-diclorofenil)]-1H-imidazólio [2]		261-351-5 [1] 281-291-3 [2]	58594-72-2 [1] 83918-57-4 [2]	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)24/25-37-46-60-61		
613-048-00-8	carbendazima (ISO) benzimidazole-2-ilcarbamato de metilo		234-232-0	10605-21-7	Muta. Cat. 2; R46 Repr. Cat.2; R60-61 N; R50-53	T; N R: 46-60-61-50/53 S: 53-45-60-61		
613-049-00-3	benomilo (ISO) 1-(butilcarbamoi)benzimidazole-2-ilcarbamato de metilo		241-775-7	17804-35-2	Muta. Cat. 2; R46 Repr. Cat.2; R60-61 Xi; R37/38 R43 N; R50-53	T; N R: 46-60-61-37/38-43-50/53 S: 53-45-60-61	C ≥ 20 %; T; N; R46-60-61-37/38-43-50-53 2,5 % ≤ C < 20 %; T; N; R46-60-61-43-50-53 1 % ≤ C < 2,5 %; T; N; R46-60-61-43-51-53 0,5 % ≤ C < 1 %; T; N; R46-	

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
613-051-00-4	molinato (ISO) 1-perhidroazepinacarbotoato de S-etilo		218-661-0	2212-67-1	Carc. Cat3; R40 Repr. Cat3; R62 Xn; R20/22 Xn; R48/22 R43 N; R50-53	T; N R: 20/22-40-43-48/22-63-50/53 S: (2-)36/37-46-60-61	60-61-51-53 0,25 % ≤ C < 0,5 %; T; N; R46-51-53 0,1 % ≤ C < 0,25 %; T; R46-52-53 0,025 % ≤ C < 0,1 %; R52-53	
613-058-00-2	3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato de <i>m</i> -fenoxibenzilo permetrina (ISO)		258-067-9	52645-53-1	Xn; R20/22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 20/22-43-50/53 S: (2-)13-24-36/37/39-60-61	C ≥ 25 %; Xn, N; R20/22-40-43-48/22-62-50-53 10 % ≤ C < 25 %; Xn, N; R40-43-48/22-62-50-53 5 % ≤ C < 10 %; Xn, N; R40-43-62-50-53 1 % ≤ C < 5 %; Xn, N; R40-43-50-53 0,25 % ≤ C < 1 %; N; R50-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %; N; R51-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %; R52-53	
613-075-00-5	1,3-dicloro-5-etil-5-metilimidazolidina-2,4-diona		401-570-7	89415-87-2	O; R8 T; R23 C; R34 Xn; R22 R43 N; R50	O; T; N R: 8-22-23-34-43-50 S: (1/2-)8-26-36/37/39-45-61	C ≥ 25 %; Xn, N; R20/22-43-50-53 1 % ≤ C < 25 %; N; R43-50-53 0,025 % ≤ C < 1 %; N; R50-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %; N; R51-53 0,00025 % ≤ C < 0,0025 %; R52-53	
613-088-00-6	1,2-benzisotiazol-3(2 <i>H</i>)-ona		220-120-9	2634-33-5	Xn; R22 Xi; R38-41 R43 N; R50	Xn; N R: 8-22-38-41-43-50 S: (2-)24-26-37/39-61	C ≥ 25 %; Xn, N; R22-38-41-43-50 20 % ≤ C < 25 %; Xi; R38-41-43 10 % ≤ C < 20 %; Xi; R41-43 5 % ≤ C < 10 %; Xi; R36-43 0,05 % ≤ C < 5 %; Xi; R43	
613-112-00-5	2-octil-2 <i>H</i> -isotiazole-3-ona		247-761-7	26530-20-1	T; R23/24 Xn; R22 C; R34	T; N R: 22-23/24-34-43-50/53	C ≥ 25 %; T; N; R22-23/24-34-43-50/53 10 % ≤ C < 25 %; C; N;	

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
613-124-00-0	fenpropimorfe <i>cis</i> -4-[3-(<i>p-tert</i> -Butilfenil)-2-metilpropil]-2,6-dimetilmorfolina		266-719-9	67564-91-4	R43 N; R50-53	S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61	R20/21-34-43-51/53 5 % ≤ C < 10 %: Xn, N; R20/21-36/38-43-51/53 3 % ≤ C < 5 %: Xn, N; R20/21-43-51/53 2,5 % ≤ C < 3 %: Xi, N; R43-51/53 0,25 % ≤ C < 2,5 %: Xi; R43-52/53 0,05 % ≤ C < 0,25 %: Xi; R43	
613-129-00-8	4-amino-3-metil-6-fenil-1,2,4-triazina-5-ona		255-349-3	41394-05-2	Xn; R22 N; R50	Xn; N R: 22-50 S: (2-)61		
613-167-00-5	mistura de: 5-cloro-2-metil-2 <i>H</i> -isotiazole-3-ona [N, CE 247-500-7] and 2-metil-2 <i>H</i> -isotiazole-3-ona [N, CE 220-239-6] (3:1) mistura de: 5-cloro-2-metil-4-isotiazolona-3-ona [N, CE 247-500-7] e 2-metil-4-isotiazolona-3-ona [N, CE 220-239-6] (3:1)		-	55965-84-9	T; R23/24/25 C; R34 R43 N; R50-53	T; N R: 23/24/25-34-43-50/53 S: (2-)26-28-36/37/39-45-60-61	C ≥ 25 %: T, N; R23/24/25-34-43-50/53 3 % ≤ C < 25 %: C, N; R20/21/22-34-43-51/53 2,5 % ≤ C < 3 %: C, N; R34-43-51/53 0,6 % ≤ C < 2,5 %: Xi; R34-43-52/53 0,25 % ≤ C < 0,6 %: Xi; R33/38-43-52/53 0,06 % ≤ C < 0,25 %: Xi; R36/38-43 0,0015 % ≤ C < 0,06 %: Xi; R43	
613-175-00-9	Epoxiconazol (2 <i>R,S</i> ,3 <i>S,R</i>)-3-(2-clorofenil)-2-(4-fluorofenil)-[(1 <i>H</i> -1,2,4-triazole-1- <i>il</i>)metil]oxirano		406-850-2	133855-98-8	Carc. Cat. 3; R40 Repr. Cat. 3; R62 Repr. Cat. 3; R63 N; R51-53	Xn; N R: 40-62-63-51/53 S: (2-)36/37-46-61		
615-001-00-7	isocianato de metilo		210-866-3	624-83-9	F+; R12 Repr. Cat. 3; R63 T+; R26 T; R24/25 R42/43 Xi; R37/38-41	F+; T+ R: 12-24/25-26-37/38-41-42/43-63 S: (1/2-)26-27/28-36/37/39-45-63		
615-004-00-3	compostos orgânicos do ácido tiocianico	A	-	-	Xn; R20/21/22 R32	Xn R: 20/21/22-32-52/53		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
615-006-00-4	diisocianato de 2-metil- <i>m</i> -fenileno 2,4-diisocianato de tolueno [1] diisocianato de 4-metil- <i>m</i> -fenileno 2,6-diisocianato de tolueno [2] diisocianato de <i>m</i> -tolilideno [3]	202-039-0 [1] 209-544-5 [2] 247-722-4 [3]	91-08-7 [1] 584-84-9 [2] 26471-62-5 [3]	Carc. Cat. 3; R40 T+; R26 Xi; R36/37/38 R42/43 R52-53	S: (2-)13-61 T+ R: 26-36/37/38-40-42/43-52/53 20% ≤ C < 25%: T+; R26-36/37/38-40-42/43 7% ≤ C < 20%: T+; R26-40-42/43 1% ≤ C < 7%: T; R23-40-42/43 0,1% ≤ C < 1%: Xn; R20-42	C ≥ 25%: T+; R26-36/37/38-40-42/43-52/53 20% ≤ C < 25%: T+; R26-36/37/38-40-42/43 7% ≤ C < 20%: T+; R26-40-42/43 1% ≤ C < 7%: T; R23-40-42/43 0,1% ≤ C < 1%: Xn; R20-42		
615-008-00-5	isocianato de 3-isocianatometil-3,5,5-trimetilcicloexilo diisocianato de isoforona	223-861-6	4098-71-9	T; R23 Xi; R36/37/38 R42/43 N; R51-53	T; N R: 23-36/37/38-42/43-51/53 S: (1/2-)26-28-38-45-61	C ≥ 25%: T, N; R23-36/37/38-42/43-51/53 20% ≤ C < 25%: T; R23-36/37/38-42/43-52/53 2,5% ≤ C < 20%: T; R23-42/43-52/53 2% ≤ C < 2,5%: T; R23-42/43 0,5% ≤ C < 2%: Xn; R20-42/43	2	
615-015-00-3	tiocianatoacetato de 1,7,7-trimetilbicyclo(2,2,1)hept-2-ilo	204-081-5	115-31-1	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)24/25-60-61			
616-015-00-6	alacoloro (ISO) 2-cloro-2',6'-dietil- <i>N</i> -(metoximetil)acetanilida	240-110-8	15972-60-8	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-40-43-50/53 S: (2-)36/37-46-60-61	C ≥ 25%: Xn, N; R22-40-43-50-53 1% ≤ C < 25%: Xn, N; R40-43-50-53 0,25% ≤ C < 1%: N; R50-53 0,025% ≤ C < 0,25%: N; R51-53 0,0025% ≤ C < 0,025%: R52-53		
616-024-00-5	2-(4,4-dimetil-2,5-dioxoazolidina-1-il)-2-cloro-5-(2-(2,4-di-terc-pentilfenoxi)butiramido)-4,4-dimetil-3-oxovaleramilida	402-260-4	-	R53	R: 53 S: 61			
617-002-00-8	hidroperóxido de α,α-dimetilbenzilo hidroperóxido de cumeno	201-254-7	80-15-9	O; R7 T; R23 Xn; R21/22-48/20/22 C; R34 N; R51-53	O; T; N R: 7-21/22-23-34-48/20/22-51/53 S: (1/2-)37-14-36/37/39-45-50-61	C ≥ 25%: T, N; R21/22-23-34-48/20/22-51/53 10% ≤ C < 25%: C; R20-34-48/20/22-52/53 3% ≤ C < 10%: Xn; R20-37/38-41-52/53 2,5% ≤ C < 3%: Xi; R36/37-		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
617-004-00-9	hidroperóxido de 1,2,3,4-tetrahidro-1-naftilo		212-230-0	771-29-9	O; R7 Xn; R22 C; R34 N; R50-53	O; C; N R: 7-22-34-50/53 S: (1/2-)/3/7-14-26-36/37/39-45-60-61	52/53 1 % ≤ C < 2,5 %; Xi; R36/37	
648-043-00-X	óleo de creosote, fracção de acenafeno, sem acenafeno óleo de lavagem redestilado O óleo remanescente após remoção, por um processo de cristalização de acenafeno de óleo de acenafeno de alcatrão de carvão. É constituído principalmente por naftaleno e alquinafthalenos.	H	292-606-9	90640-85-0	Carc. Cat. 2; R45	T R: 45 S: 53-45	C ≥ 25 %; C, N; R22-34-50/53 10 % ≤ C < 25 %; C, N; R34-51/53 5 % ≤ C < 10 %; Xi, N; R36/37/38-51/53 2,5 % ≤ C < 5 %; N; R51/53 0,25 % ≤ C < 2,5 %; R52/53	
648-080-00-1	resíduos (alcatrão de carvão), da destilação de óleo de creosote óleo de lavagem redestilado O resíduo da destilação fracionada de óleo de creosote que destila no intervalo de aproximadamente 270°C a 330°C. É constituído predominantemente por hidrocarbonetos aromáticos dinucleares e compostos heterocíclicos.	H	295-506-3	92061-93-3	Carc. Cat. 2; R45	T R: 45 S: 53-45		
648-098-00-X	óleo de creosote, fracção de acenafeno óleo de lavagem Uma combinação complexa de hidrocarbonetos produzida pela destilação de alcatrão de carvão e que destila no intervalo de aproximadamente 240°C a 280°C. É constituída principalmente por acenafeno, naftaleno e alquinafthaleno.	H	292-605-3	90640-84-9	Carc. Cat. 2; R45	T R: 45 S: 53-45		
648-099-00-5	óleo de creosoto	H	263-047-8	61789-28-4	Carc. Cat. 2; R45	T		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
648-100-00-9	<p>Uma combinação complexa de hidrocarbonetos obtida pela destilação de alcatrão de carvão. É constituída principalmente por hidrocarbonetos aromáticos e pode conter quantidades apreciáveis de ácidos do alcatrão e de bases do alcatrão. Destila no intervalo aproximado de 200°C a 325°C.]</p> <p>óleo de creosoto, destilado de ponto de ebulição elevado óleo de lavagem</p> <p>[A fracção da destilação com ponto de ebulição elevado obtida da carbonização a temperatura elevada de carvão betuminoso que é posteriormente refinada para remover o excesso de sais cristalinos. É constituída principalmente por óleo de creosoto com alguns dos sais normais aromáticos polinucleares, que são constituintes de destilados de alcatrão de carvão, removidos. Não apresenta cristais a aproximadamente 5°C.]</p>	H	274-565-9	70321-79-8	Carc. Cat. 2; R45	T R: 45 S: 53-45		
648-101-00-4	<p>creosoto</p> <p>[O destilado do alcatrão de carvão produzido pela carbonização a temperatura elevada de carvão betuminoso. É constituído principalmente por hidrocarbonetos aromáticos, ácidos do alcatrão e bases do alcatrão.]</p>	H	232-287-5	8001-58-9	Carc. Cat. 2; R45	T R: 45 S: 53-45		
648-102-00-X	<p>resíduos de extração (carvão), ácidos de óleo de creosoto</p> <p>Extracto de resíduo de óleo de lavagem</p> <p>Uma combinação complexa de hidrocarbonetos da fracção liberta de bases da destilação de alcatrão de carvão, destilando no intervalo de aproximadamente 250°C a 280°C. É constituída</p>	H	310-189-4	122384-77-4	Carc. Cat. 2; R45	T R: 45 S: 53-45		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
648-138-00-6	predominantemente por bifenilo e difenilnaftalenos isoméricos óleo de creosoto, destilado de ponto de ebulição baixo óleo de lavagem A fração da destilação com ponto de ebulição baixo obtida da carbonização a temperatura elevada de carvão betuminoso, que é posteriormente refinada para remover o excesso de sais cristalinos. É constituída principalmente por óleo de creosote com alguns dos sais normais aromáticos polinucleares, que são constituintes de destilados de alcatrão de carvão, removidos. Não apresenta cristais a aproximadamente 38°C.]	H	274-566-4	70321-80-1	Carc. Cat. 2; R45	T R: 45 S: 53-45		
649-001-00-3	extractos (petróleo), de solvente de destilado nafténico leve	H	265-102-1	64742-03-6	Carc. Cat. 2; R45	T R: 45 S: 53-45		
649-002-00-9	extractos (petróleo), de solvente de destilado parafínico pesado	H	265-103-7	64742-04-7	Carc. Cat. 2; R45	T R: 45 S: 53-45		
649-003-00-4	extractos (petróleo), de solvente de destilado parafínico leve	H	265-104-2	64742-05-8	Carc. Cat. 2; R45	T R: 45 S: 53-45		
649-004-00-X	extractos (petróleo), de solvente de destilado nafténico pesado	H	265-111-0	64742-11-6	Carc. Cat. 2; R45	T R: 45 S: 53-45		
649-005-00-5	extractos (petróleo), de solvente de gásóleo leve de vácuo	H	295-341-7	91995-78-7	Carc. Cat. 2; R45	T R: 45 S: 53-45		
649-006-00-0	hidrocarbonetos, C ₂₆₋₅₅ , ricos em aromáticos	H	307-753-7	97722-04-8	Carc. Cat. 2; R45	T R: 45 S: 53-45		
649-062-00-6	gases (petróleo), produtos de cabeça do despropanizador da nafta do cracking catalítico, ricos em C ₃ e sem ácidos Gases de petróleo liquefeitos Uma combinação complexa de hidrocarbonetos obtida por fraccionamento de hidrocarbonetos do cracking	H K	270-755-0	68477-73-6	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
649-063-00-1	catalítico tratada para remoção de impurezas ácidas. É constituída por hidrocarbonetos com números de átomos de carbono na gama de C ₂ até C ₄ , predominantemente C ₃ -1	H K	270-756-6	68477-74-7	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-064-00-7	gases (petróleo), do cracker catalítico Gases de petróleo liquefeitos Uma combinação complexa de hidrocarbonetos produzida pela destilação dos produtos de um processo de cracking catalítico. É constituída predominantemente por hidrocarbonetos alifáticos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₆ .	H K	270-757-1	68477-75-8	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-065-00-2	gases (petróleo), de cabeça do estabilizador da nafta polimerizada cataliticamente, ricos em C ₂₋₄ Gases de petróleo liquefeitos Uma combinação complexa de hidrocarbonetos obtida por estabilização do fracionamento de nafta polimerizada cataliticamente. É constituída por hidrocarbonetos alifáticos com números de átomos de carbono na gama de C ₂ até C ₆ , predominantemente C ₂ até C ₄ .	H K	270-758-7	68477-76-9	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-066-00-8	gases (petróleo), do reformer catalítico, ricos em C ₃₋₄	H K	270-760-8	68477-79-2	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
	Gases de petróleo liquefeitos Uma combinação complexa de hidrocarbonetos produzida por destilação de produtos de um processo de reforming catalítico. É constituída por hidrocarbonetos com números de átomos de carbono na gama de C ₁ até C ₆ , predominantemente C ₁ até C ₄ .					S: 53-45		
649-067-00-3	gases (petróleo), C _{3,5} olefinícos-parafínicos de carga de alquilação Gases de petróleo liquefeitos Uma combinação complexa de hidrocarbonetos olefinícos e parafínicos com números de átomos de carbono na gama de C ₃ até C ₅ usada como carga de um processo de alquilação. A temperatura crítica destas combinações é normalmente inferior à temperatura ambiente.	H K	270-765-5	68477-83-8	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-068-00-9	gases (petróleo), ricos em C ₄ Gases de petróleo liquefeitos Uma combinação complexa de hidrocarbonetos produzida por destilação de produtos de um processo de fracionamento catalítico. É constituída por hidrocarbonetos alifáticos com números de átomos de carbono na gama de C ₃ até C ₅ , predominantemente C ₄ .	H K	270-767-6	68477-85-0	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-069-00-4	gases (petróleo), de cabeça do desetanizador Gases de petróleo liquefeitos Uma combinação complexa de hidrocarbonetos produzida por destilação das fracções de gás e gasolina do processo de cracking catalítico. Contém predominantemente etano e etileno.	H K	270-768-1	68477-86-1	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-070-00-X	gases (petróleo), de cabeça da coluna do desisobutanizador Gases de petróleo liquefeitos	H K	270-769-7	68477-87-2	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
649-071-00-5	Uma combinação complexa de hidrocarbonetos produzida pela destilação atmosférica de uma fracção de butanos-butilenos. É constituída por hidrocarbonetos alifáticos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₃ até C ₄ .	H K	270-772-3	68477-90-7	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-072-00-0	gases (petróleo), secos do despropanizador, ricos em propeno Gases de petróleo liquefeitos Uma combinação complexa de hidrocarbonetos produzida pela destilação de produtos das fracções de gás e gasolina de um processo de cracking catalítico. É constituída predominantemente por propileno com algum etano e propano.	H K	270-773-9	68477-91-8	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-073-00-6	gases (petróleo), de cabeça do despropanizador de uma unidade de recuperação de gases Gases de petróleo liquefeitos Uma combinação complexa de hidrocarbonetos obtida por fracçãoamento de várias fracções de hidrocarbonetos. É constituída predominantemente por hidrocarbonetos com números de átomos de carbono na gama de C ₁ até C ₄ , predominantemente propano.	H K	270-777-0	68477-94-1	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
649-074-00-1	gases (petróleo), de alimentação da unidade Girbatol Gases de petróleo liquefeitos Uma combinação complexa de hidrocarbonetos usada como alimentação da unidade Girbatol para remoção de sulfureto de hidrogénio. É constituída por hidrocarbonetos alifáticos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₂ até C ₄ .	H K	270-778-6	68477-95-2	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-075-00-7	gases (petróleo), da coluna de fracionamento da nafta isomerizada, ricos em C ₄ , sem sulfureto de hidrogénio Gases de petróleo liquefeitos	H K	270-782-8	68477-99-6	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-076-00-2	gás residual (petróleo), do tanque de refluxo do fracionamento de óleo clarificado de cracking catalítico e resíduo de vácuo de cracking térmico Gases de petróleo liquefeitos Uma combinação complexa de hidrocarbonetos obtida por fracionamento de óleo clarificado de cracking catalítico e resíduo de vácuo de cracking térmico. É constituída predominantemente por hidrocarbonetos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₆ .	H K	270-802-5	68478-21-7	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-077-00-8	gás residual (petróleo), da torre de absorção de estabilização da nafta do cracking catalítico Gases de petróleo liquefeitos Uma combinação complexa de hidrocarbonetos obtida por estabilização da nafta do cracking catalítico. É constituída predominantemente por hidrocarbonetos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de	H K	270-803-0	68478-22-8	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
649-078-00-3	C ₁ até C ₆ .] gás residual (petróleo), do fracionador de correntes combinadas do cracker catalítico, reformer catalítico e hidrogenodessulfurizador Gases de petróleo liquefeitos Uma combinação complexa de hidrocarbonetos obtida do fracionamento de produtos dos processos de cracking catalítico, reforming catalítico e hidrogenodessulfurização tratados para remoção de impurezas ácidas. São constituídos predominantemente por hidrocarbonetos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₅ .	H K	270-804-6	68478-24-0	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-079-00-9	gás residual (petróleo), do estabilizador do fracionamento de nafta do reforming catalítico Gases de petróleo liquefeitos Uma combinação complexa de hidrocarbonetos obtida da estabilização do fracionamento de nafta do reforming catalítico. É constituída predominantemente por hidrocarbonetos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₄ .	H K	270-806-7	68478-26-2	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-080-00-4	gás residual (petróleo), saturado de várias origens, rico em C ₄ Gases de petróleo liquefeitos Uma combinação complexa de hidrocarbonetos obtida por estabilização do fracionamento de gás de destilação, nafta de destilação directa e gás do estabilizador da do reforming catalítico da nafta. É constituída por hidrocarbonetos com números de átomos de carbono na gama de C ₃ até C ₆ , predominantemente	H K	270-813-5	68478-32-0	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
	butano e isobutano.]							
649-081-00-X	gás residual (petróleo), saturado da unidade recuperação de gases, rico em C _{1,2} Gases de petróleo liquefeitos Uma combinação complexa de hidrocarbonetos obtida por fracionamento do gás de destilação, nafta de destilação directa e gás do estabilizador dos produtos do reforming catalítico da nafta. É constituída predominantemente por hidrocarbonetos com números de átomos de carbono na gama de C ₁ até C ₅ , predominantemente metano e etano.]	H K	270-814-0	68478-33-1	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-082-00-5	gás residual (petróleo), do cracker térmico dos resíduos de vácuo Gases de petróleo liquefeitos Uma combinação complexa de hidrocarbonetos obtida do cracking térmico de resíduos de vácuo. É constituída por hidrocarbonetos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₅ .	H K	270-815-6	68478-34-2	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-083-00-0	hidrocarbonetos, ricos em C _{3,4} , destilado do petróleo Gases de petróleo liquefeitos Uma combinação complexa de hidrocarbonetos produzida por destilação e condensação de petróleo bruto. É constituída por hidrocarbonetos com números de átomos de carbono na gama de C ₃ até C ₅ , predominantemente de C ₃ até C ₄ .	H K	270-990-9	68512-91-4	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-084-00-6	gases (petróleo), do desexanzador da nafta de destilação directa Gases de petróleo liquefeitos Uma combinação complexa de hidrocarbonetos obtida pelo	H K	271-000-8	68513-15-5	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
649-085-00-1	fracionamento da nafta de destilação directa. É constituída por hidrocarbonetos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₂ até C ₆ .]	H K	271-001-3	68513-16-6	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-086-00-7	gases (petróleo), do despropanizador de um processo de hidrocracking, ricos em hidrocarbonetos: Gases de petróleo liquefeitos Uma combinação complexa de hidrocarbonetos produzida pela destilação de produtos de um processo de hidrocracking. É constituída predominantemente por hidrocarbonetos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₄ . Pode conter também pequenas quantidades de hidrogénio e sulfureto de hidrogénio.]	H K	271-002-9	68513-17-7	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-087-00-2	gases (petróleo), do estabilizador da nafta leve de destilação directa Gases de petróleo liquefeitos Uma combinação complexa de hidrocarbonetos obtida pela estabilização de nafta leve de destilação directa. É constituída por hidrocarbonetos alifáticos saturados com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₂ até C ₆ .]	H K	271-010-2	68513-66-6	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
	resíduos (petróleo), do splitter da alquilação, ricos em C ₄ Gases de petróleo liquefeitos Um resíduo complexo da destilação de frações de várias operações de uma refinaria. É constituído por hidrocarbonetos com números de átomos de carbono na gama de C ₄ até C ₅ , predominantemente butano e destila no intervalo de							

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
649-088-00-8	aproximadamente -11,7°C a 27,8°C.] hidrocarbonetos, C ₁₋₄ Gases de petróleo liquefeitos [Uma combinação complexa de hidrocarbonetos produzida por cracking térmico e operações de absorção e por destilação de petróleo bruto. É constituída por hidrocarbonetos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₄ e destila no intervalo de aproximadamente menos 164°C a menos 0,5°C.]	H K	271-032-2	68514-31-8	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-089-00-3	hidrocarbonetos, C ₁₋₄ , tratados (sweetened) Gases de petróleo liquefeitos [Uma combinação complexa de hidrocarbonetos obtida submetendo hidrocarbonetos gasosos a um processo de sweetening para conversão de mercaptans ou remoção de impurezas ácidas. É constituída por hidrocarbonetos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₄ e destila no intervalo de aproximadamente -164°C a -0,5°C.]	H K	271-038-5	68514-36-3	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-090-00-9	hidrocarbonetos, C ₁₋₃ Gases de petróleo liquefeitos [Uma combinação complexa de hidrocarbonetos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₃ e que destila no intervalo de aproximadamente menos 164°C a menos 42°C.]	H K	271-259-7	68527-16-2	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-091-00-4	hidrocarbonetos, C ₁₋₄ , fração do desbutanizador Gases de petróleo liquefeitos	H K	271-261-8	68527-19-5	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
649-092-00-X	gases (petróleo), C ₁₋₅ , húmidos Gases de petróleo liquefeitos Uma combinação complexa de hidrocarbonetos produzida pela destilação de petróleo bruto e/ou cracking de gasóleo de vácuo. É constituída por hidrocarbonetos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₅ .	H K	271-624-0	68602-83-5	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-093-00-5	hidrocarbonetos; C ₂₋₄ Gases de petróleo liquefeitos	H K	271-734-9	68606-25-7	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-094-00-0	hidrocarbonetos; C ₃ Gases de petróleo liquefeitos	H K	271-735-4	68606-26-8	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-095-00-6	gases (petróleo), de alimentação da alquilação Gases de petróleo liquefeitos Uma combinação complexa de hidrocarbonetos produzida pelo cracking catalítico do gasóleo. É constituída por hidrocarbonetos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₃ até C ₄ .	H K	271-737-5	68606-27-9	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-096-00-1	gases (petróleo), do fracionamento dos produtos de cauda do despropanizador Gases de petróleo liquefeitos Uma combinação complexa de hidrocarbonetos obtida do fracionamento dos produtos de cauda do despropanizador. É constituída predominantemente por butano, isobutano e butadieno.	H K	271-742-2	68606-34-8	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-097-00-7	gases (petróleo), de mistura gases da refinaria Gases de petróleo liquefeitos Uma combinação complexa obtida das várias unidades de uma refinaria. É constituída por hidrogénio, sulfureto de hidrogénio e hidrocarbonetos com	H K	272-183-7	68783-07-3	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
649-098-00-2	números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₅ . gases (petróleo), do cracking catalítico Gases de petróleo liquefeitos Uma combinação complexa de hidrocarbonetos produzida pela destilação dos produtos de um processo de cracking catalítico. É constituída predominantemente por hidrocarbonetos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₃ até C ₅ .	H K	272-203-4	68783-64-2	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-099-00-8	gases (petróleo), C ₂ +4, tratados (sweetened) Gases de petróleo liquefeitos Uma combinação complexa de hidrocarbonetos obtida por tratamento de uma fracção petrolífera por um processo de sweetening para conversão de mercaptans ou remoção de impurezas ácidas. É constituída predominantemente por hidrocarbonetos saturados e insaturados com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₂ até C ₄ e destila no intervalo de aproximadamente -5 °C a -34°C.	H K	272-205-5	68783-65-3	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-100-00-1	gases (petróleo), do fracionamento de petróleo bruto Gases de petróleo liquefeitos Uma combinação complexa de hidrocarbonetos produzida pelo fracionamento de petróleo bruto. É constituída por hidrocarbonetos alifáticos saturados com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₅ .	H K	272-871-7	68918-99-0	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-101-00-7	gases (petróleo), do	H K	272-872-2	68919-00-6	Carc. Cat. 1; R45	T		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
649-102-00-2	desexantizador Gases de petróleo liquefeitos Uma combinação complexa de hidrocarbonetos obtida pelo fracionamento de várias frações de nafta combinadas. É constituída por hidrocarbonetos alifáticos saturados com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₃ .	H K	272-878-5	68919-05-1	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-103-00-8	gases (petróleo), do stripper da unidade de dessulfurização unifiner de nafta Gases de petróleo liquefeitos Uma combinação complexa de hidrocarbonetos produzida por um processo de dessulfurização unifiner da nafta e separada desta. É constituída por hidrocarbonetos alifáticos saturados com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₄ .	H K	272-879-0	68919-06-2	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-104-00-3	gases (petróleo), do reforming catalítico da nafta de destilação directa Gases e petróleo liquefeitos Uma combinação complexa de hidrocarbonetos obtida pelo reforming catalítico de nafta de destilação directa e fracionamento do efluente total.	H K	272-882-7	68919-09-5	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
	É constituída por metano, etano, e propano.]							
649-105-00-9	gases (petróleo), de cabeça do separador do cracker catalítico de leito fluidizado Gases de petróleo liquefeitos [Uma combinação complexa de hidrocarbonetos produzida pelo fracionamento da carga ao separador C ₃ -C ₄ . É constituída predominantemente por hidrocarbonetos em C ₃]	H K	272-893-7	68919-20-0	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-106-00-4	gases (petróleo), do estabilizador da destilação directa Gases de petróleo liquefeitos [Uma combinação complexa de hidrocarbonetos obtida do fracionamento do líquido da primeira coluna usada na destilação de petróleo bruto. É constituída por hidrocarbonetos alifáticos saturados com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₄ .]	H K	272-883-2	68919-10-8	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45 S: 53-45		
649-107-00-X	gases (petróleo), do desbutanizador de nafta do cracking catalítico Gases de petróleo liquefeitos [Uma combinação complexa de hidrocarbonetos obtida do fracionamento da nafta do cracking catalítico. É constituída por hidrocarbonetos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₄ .]	H K	273-169-3	68952-76-1	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-108-00-5	gás residual (petróleo), do estabilizador do destilado e da nafta do cracking catalítico Gases de petróleo liquefeitos [Uma combinação complexa de hidrocarbonetos obtida pelo fracionamento da nafta e de destilado do cracking catalítico. É	H K	273-170-9	68952-77-2	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
649-109-00-0	constituída predominantemente por hidrocarbonetos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₄ . gás residual (petróleo), de destilado do cracking térmico e da coluna de absorção de gásóleo e nafta Gases de petróleo liquefeitos Uma combinação de hidrocarbonetos obtida da separação de destilados do cracking térmico, nafta e gásóleo. É constituída predominantemente por hidrocarbonetos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₆ .	H K	273-175-6	68952-81-8	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-110-00-6	gás residual (petróleo), do estabilizador do fracionamento de hidrocarbonetos do cracking térmico, coking de petróleo Gases de petróleo liquefeitos Uma combinação complexa de hidrocarbonetos obtida por estabilização do fracionamento de produtos do cracking térmico de hidrocarbonetos de um processo de coking de petróleo. É constituída por hidrocarbonetos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₆ .	H K	273-176-1	68952-82-9	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-111-00-1	gases (petróleo), leves do steam-cracking, concentrado de butadieno Gases de petróleo liquefeitos Uma combinação de hidrocarbonetos produzida pela destilação dos produtos de um processo de cracking térmico. É constituída por hidrocarbonetos com números de átomos de carbono predominantemente de C ₄ .	H K	273-265-5	68955-28-2	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
649-112-00-7	gases (petróleo), de cabeça do estabilizador do reformer catalítico da nafta de destilação directa Gases de petróleo liquefeitos Uma combinação complexa de hidrocarbonetos obtida pelo reforming catalítico de nafta de destilação directa e fraccionamento do efluente total. É constituída por hidrocarbonetos alifáticos saturados com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₂ até C ₄ .	H K	273-270-2	68955-34-0	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-113-00-2	hidrocarbonetos, C ₄ Gases de petróleo liquefeitos	H K	289-339-5	87741-01-3	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-114-00-8	alcanos, C ₁₋₄ , ricos em C ₃ Gases de petróleo liquefeitos	H K	292-456-4	90622-55-2	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-115-00-3	gases (petróleo), ricos em C ₃ do steam-cracker Gases de petróleo liquefeitos Uma combinação complexa de hidrocarbonetos produzida pela destilação de produtos de um processo de steam-cracking. É constituída predominantemente por propileno com algum propano no intervalo de aproximadamente menos 70°C a 0°C.	H K	295-404-9	92045-22-2	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-116-00-9	hidrocarbonetos, C ₄ , destilado do steam-cracker Gases de petróleo liquefeitos Uma combinação complexa de hidrocarbonetos produzida pela destilação dos produtos de um processo de steam-cracking. É constituída predominantemente por hidrocarbonetos com números de átomos de carbono de C ₄ , predominantemente 1-buteno e 2-buteno, contendo também algum butano e isobuteno e destila no	H K	295-405-4	92045-23-3	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
649-117-00-4	intervalo de aproximadamente menos 12°C a 5°C.] gases de petróleo, liquefeitos, tratados (sweetened), fracção C ₄ Gases de petróleo liquefeitos Uma combinação complexa de hidrocarbonetos obtida submetendo uma mistura de gases de petróleo liquefeitos a um processo de sweetening para oxidar mercaptans ou para remover impurezas ácidas. E constituída predominantemente por hidrocarbonetos em C ₄ saturados e insaturados.]	HKS	295-463-0	92045-80-2	F+; R12 Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	F+; T R: 12-45-46 S: 53-45		
649-119-00-5	refinados (petróleo, fracção C ₄ do steam-cracking extraída com acetato de amónio cuproso, C _{3,5} e C _{4,5} -insaturados, sem butadieno Gases de petróleo liquefeitos	H K	307-769-4	97722-19-5	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-120-00-0	gases (petróleo), de alimentação do processo de tratamento com aminas Gás de Refinaria O gás de alimentação ao sistema de tratamento com aminas para remoção de sulfureto de hidrogénio. É constituído por presentes monóxido de carbono, dióxido de carbono, sulfureto de hidrogénio e hidrocarbonetos alifáticos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₅ .	H K	270-746-1	68477-65-6	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-121-00-6	gases (petróleo), do hidrogenodessulfurizador da unidade de benzeno Gás de refinaria Gases produzidos na unidade de benzeno. São constituídos principalmente por hidrogénio. Podem também estar presentes monóxido de carbono e hidrocarbonetos com números de	H K	270-747-7	68477-66-7	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
649-122-00-1	átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₆ , incluindo benzeno.]	H K	270-748-2	68477-67-8	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-123-00-7	gases (petróleo), de mistura de hidrocarbonetos, ricos em hidrogénio e azoto Gás de refinaria Uma combinação complexa de hidrocarbonetos obtida por destilação de uma mistura de hidrocarbonetos. É constituída principalmente por hidrogénio de azoto com pequenas quantidades variáveis de monóxido de carbono, dióxido de carbono, e hidrocarbonetos alifáticos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₅ .	H K	270-749-8	68477-68-9	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-124-00-2	gases (petróleo), de cabeça do estabilizador da nafta do reforming catalítico Gás de refinaria Uma combinação complexa de hidrocarbonetos obtida por estabilização da nafta do reforming catalítico. É constituída por hidrogénio e hidrocarbonetos alifáticos saturados com números de átomos de carbono predominantemente na gama de	H K	270-759-2	68477-77-0	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
	C ₁ até C ₄ .							
649-125-00-8	gases (petróleo), do reciclo do reformer catalítico da fracção C ₆₋₈ Gás de refinaria Uma combinação complexa de hidrocarbonetos produzida por destilação de produtos do reforming catalítico de fracção C ₆₋₈ e reciclada para conservar hidrogénico. É constituída principalmente por hidrogénio. Pode também conter pequenas quantidades variáveis de monóxido de carbono, dióxido de carbono, azoto, e hidrocarbonetos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₆ .	H K	270-761-3	68477-80-5	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-126-00-3	gases (petróleo), do reformer catalítico da fracção C ₆₋₈ Gás de refinaria Uma combinação complexa de hidrocarbonetos produzida por destilação dos produtos do reforming catalítico da fracção C ₆₋₈ . É constituída por hidrocarbonetos com números de átomos de carbono na gama de C ₁ até C ₃ ;e hidrogénio.	H K	270-762-9	68477-81-6	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-127-00-9	gases (petróleo), reciclados C ₆₋₈ do reforming catalítico, ricos em hidrogénio Gás de refinaria	H K	270-763-4	68477-82-7	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-128-00-4	gases (petróleo), fluxo de retorno em C ₂ Gás de refinaria Uma combinação complexa de hidrocarbonetos obtida pela extração de hidrogénio de uma corrente gasosa constituída principalmente por hidrogénio com pequenas quantidades de azoto, monóxido de carbono, metano, etano, e etileno. Contém predominantemente	H K	270-766-0	68477-84-9	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
649-129-00-X	hidrocarbonetos tais como metano, etano, e etileno com pequenas quantidades de hidrogénio, azoto e monóxido de carbono.]	H K	270-774-4	68477-92-9	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-130-00-5	gases (petróleo), da destilação da coluna de reabsorção de bases concentrados Gás de refinaria [Uma combinação complexa de hidrocarbonetos produzida por destilação dos produtos de misturas de correntes gasosas numa coluna de reabsorção de um processo de concentração de gases. É constituída predominantemente por hidrogénio, monóxido de carbono, dióxido de carbono, azoto, sulfureto de hidrogénio e hidrocarbonetos com números de átomos de carbono na gama de C ₁ até C ₃ .]	H K	270-776-5	68477-93-0	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-131-00-0	gases (petróleo), da coluna de absorção de hidrogénio Gás de refinaria [Uma combinação complexa obtida por absorção de hidrogénio a partir de uma fracção rica em hidrogénio. É constituída por hidrogénio, monóxido de carbono, azoto, e metano com pequenas quantidades de	H K	270-779-1	68477-96-3	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
649-132-00-6	hidrocarbonetos em C ₂ . gases (petróleo), ricos em hidrogénio Gás de refinaria Uma combinação complexa separada como um gás por arrefecimento de uma fracção de hidrocarbonetos gasosos. É constituída principalmente por hidrogénio com pequenas quantidades variáveis de monóxido de carbono, azoto, metano, e hidrocarbonetos em C ₂ .	H K	270-780-7	68477-97-4	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-133-00-1	gases (petróleo), de reciclo de misturas de hidrocarbonetos da unidade de tratamento com hidrogénio, ricos em hidrogénio e azoto Gás de refinaria Uma combinação complexa obtida de misturas de hidrocarbonetos de gás de reciclo tratado com hidrogénio. É constituído principalmente por hidrogénio e azoto com pequenas quantidades variáveis de monóxido de carbono, dióxido de carbono e hidrocarbonetos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₃ .	H K	270-781-2	68477-98-5	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-134-00-7	gases (petróleo), de reciclo, ricos em hidrogénio Gás de refinaria Uma combinação complexa obtida dos gases de reciclo. É constituída principalmente por hidrogénio com pequenas quantidades variáveis de monóxido de carbono, dióxido de carbono, azoto, sulfureto de hidrogénio, e hidrocarbonetos alifáticos saturados com números de átomos de carbono na gama de C ₁ até C ₃ .	H K	270-783-3	68478-00-2	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
649-135-00-2	gases (petróleo), de make-up do reformer catalítico, ricos em hidrogénio Gás de refinaria Uma combinação complexa obtida do efluente dos reformers. É constituída por principalmente de hidrogénio com pequenas quantidades variáveis de monóxido de carbono e hidrocarbonetos alifáticos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₅ .	H K	270-784-9	68478-01-3	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-136-00-8	gases (petróleo), da unidade de hidroforming Gás de refinaria Uma combinação complexa obtida do processo de hidroforming. É constituída predominantemente por hidrogénio, metano, e etano com pequenas quantidades variáveis de sulfureto de hidrogénio e hidrocarbonetos alifáticos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₃ até C ₅ .	H K	270-785-4	68478-02-4	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-137-00-3	gases (petróleo), da unidade de hidroforming, ricos em hidrogénio e metano Gás de refinaria Uma combinação complexa obtida do processo de hidroforming. É constituída predominantemente por hidrogénio e metano com pequenas quantidades variáveis de monóxido de carbono, dióxido de carbono, azoto e hidrocarbonetos alifáticos saturados com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₂ até C ₅ .	H K	270-787-5	68478-03-5	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
649-138-00-9	gases (petróleo), de make-up da unidade de hidroforming, ricos em hidrogénio Gás de refinaria Uma combinação complexa obtida do processo de hidroforming. É constituída predominantemente por hidrogénio com pequenas quantidades variáveis de monóxido de carbono e hidrocarbonetos alifáticos saturados, com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₃ .	H K	270-788-0	68478-04-6	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-139-00-4	gases (petróleo), da destilação dos produtos do cracking térmico Gás de refinaria Uma combinação complexa obtida produzida por destilação de produtos de um processo de cracking térmico. É constituída por hidrogénio, sulfureto de carbono, monóxido de carbono, dióxido de carbono e hidrocarbonetos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₆ .	H K	270-789-6	68478-05-7	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-140-00-X	gás residual (petróleo), da torre de absorção de uma unidade de refinação de um cracker catalítico Gás de refinaria Uma combinação complexa de hidrocarbonetos obtida do refinação de produtos de uma unidade de cracking catalítico. É constituída por hidrogénio e hidrocarbonetos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₃ .	H K	270-805-1	68478-25-1	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-141-00-5	gás residual (petróleo), do separador da nafta do reforming	H K	270-807-2	68478-27-3	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
	<p>catalítico</p> <p>Gás de refinaria</p> <p> Uma combinação complexa de hidrocarbonetos obtida dos produtos do reforming catalítico da nafta de destilação directa. É constituída por hidrogénio e hidrocarbonetos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C₁ até C₆. </p>					S: 53-45		
649-142-00-0	<p>gás residual (petróleo), do estabilizador de nafta do reforming catalítico</p> <p>Gás de refinaria</p> <p> Uma combinação complexa de hidrocarbonetos obtida da estabilização de nafta do reforming catalítico. É constituída por hidrogénio e hidrocarbonetos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C₁ até C₆. </p>	H K	270-808-8	68478-28-4	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-143-00-6	<p>gás residual (petróleo), do separador da unidade de tratamento com hidrogénio de destilados de cracking</p> <p>Gás de refinaria</p> <p> Uma combinação complexa de hidrocarbonetos obtida por tratamento de destilados de cracking com hidrogénio na presença de um catalisador. É constituída por hidrogénio e hidrocarbonetos alifáticos saturados com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C₁ até C₅. </p>	H K	270-809-3	68478-29-5	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-144-00-1	<p>gás residual (petróleo), do separador da nafta de destilação directa hidrogenodessulfurizada</p> <p>Gás de refinaria</p> <p> Uma combinação complexa de hidrocarbonetos obtida da hidrogenodessulfurização de</p>	H K	270-810-9	68478-30-8	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
649-145-00-7	nafta de destilação directa. É constituída por hidrogénio e hidrocarbonetos alifáticos saturados com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₆ .	H K	270-999-8	68513-14-4	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-146-00-2	gases (petróleo), do tanque de flash a alta pressão do efluente do reformer Gás de refinaria Uma combinação complexa de hidrocarbonetos obtida do reforming catalítico de nafta de destilação directa seguido de fraccionamento do efluente total. É constituída por hidrogénio, metano, etano e propano.	H K	271-003-4	68513-18-8	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-147-00-8	gases (petróleo), do tanque de flash a baixa pressão do efluente do reformer Gás de refinaria Uma combinação complexa produzida por separação a alta pressão do efluente do reactor de reforming. É constituída principalmente por hidrogénio com pequenas quantidades variáveis de metano, etano, e propano.	H K	271-005-5	68513-19-9	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-148-00-3	gases (petróleo), da destilação de gás de refinaria	H K	271-258-1	68527-15-1	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
649-149-00-9	Gás de refinaria Uma combinação complexa separada por destilação de uma corrente gasosa contendo hidrogénio, monóxido de carbono, dióxido de carbono e hidrocarbonetos com números de átomos de carbono na gama de C ₁ até C ₆ ou obtida por cracking de etano e propano. É constituída por hidrocarbonetos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₂ , hidrogénio, azoto, e monóxido de carbono.		271-623-5	68602-82-4	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	S: 53-45		
		H K				T R: 45-46 S: 53-45		
649-150-00-4	gases (petróleo), de cabeça do despentanizador da unidade de tratamento com hidrogénio da unidade de benzeno Gás de refinaria Uma combinação complexa produzida por tratamento da carga da unidade de benzeno com hidrogénio na presença de um catalisador seguido de despentanização. É constituída principalmente por hidrogénio, etano e propano com pequenas quantidades variáveis de azoto, monóxido de carbono, dióxido de carbono e hidrocarbonetos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₆ . Pode conter vestígios de benzeno.		271-625-6	68602-84-6	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
		H K						
	gases (petróleo), da coluna de absorção secundária, do fraccionador dos produtos de cabeça do cracker catalítico de leito fluidizado Gás de refinaria Uma combinação complexa produzida pelo fraccionamento dos produtos de cabeça do processo de cracking catalítico no cracker catalítico de leito fluidizado. É constituída por							

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
649-151-00-X	hidrogénio, azoto, e hidrocarbonetos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₃ . produtos petrolíferos, gases de refinaria Gás de refinaria Uma combinação complexa constituída principalmente por hidrogénio com pequenas quantidades variáveis de metano, etano, e propano.	H K	271-750-6	68607-11-4	Car. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-152-00-5	gases (petróleo), do separador de baixa pressão do hidrocracking Gás de refinaria Uma combinação complexa obtida por separação líquido-vapor do efluente do reactor do processo de hidrocracking. É constituída predominantemente por hidrogénio e hidrocarbonetos saturados com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₃ .	H K	272-182-1	68783-06-2	Car. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-153-00-0	gases (petróleo), de refinaria Gás de refinaria Uma combinação complexa obtida de várias operações de refinação de petróleo. É constituída predominantemente por hidrogénio e hidrocarbonetos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₃ .	H K	272-338-9	68814-67-5	Car. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-154-00-6	gases (petróleo), do separador dos produtos do platformer Gás de refinaria Uma combinação complexa obtida do reforming químico de naftenos a aromáticos. É constituída por hidrogénio e hidrocarbonetos alifáticos saturados, com números de	H K	272-343-6	68814-90-4	Car. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
649-155-00-1	átomos de carbono predominantemente na gama de C ₂ até C ₄]	H K gases (petróleo), do despentanizador estabilizador de petróleo com enxofre tratado com hidrogénio Gás de refinaria Uma combinação complexa obtida da estabilização no despentanizador de petróleo tratado com hidrogénio. É constituída principalmente por hidrogénio, metano, etano, e propano com pequenas quantidades variáveis de azoto, sulfureto de hidrogénio, monóxido de carbono e hidrocarbonetos com números de átomos de carbono predominantemente na gama C ₄ até C ₅ .	272-775-5	68911-58-0	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-156-00-7	gases (petróleo), do tanque de flash de petróleo com enxofre tratado com hidrogénio Gás de refinaria Uma combinação complexa obtida do tanque de flash da unidade de tratamento de petróleo contendo enxofre com hidrogénio na presença de um catalisador. É constituída principalmente por hidrogénio e metano com pequenas quantidades variáveis de azoto, monóxido de carbono, e hidrocarbonetos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₂ até C ₅ .	H K	272-776-0	68911-59-1	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-157-00-2	gases (petróleo), do stripper do destilado da dessulfurização unifiner Gás de refinaria Uma combinação complexa separada do produto líquido do processo de dessulfurização	H K	272-873-8	68919-01-7	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
649-158-00-8	unifiner. É constituída por sulfureto de hidrogénio, metano, etano, e propano.] gases (petróleo), do fracionamento dos produtos do cracker catalítico de leito fluidizado Gás de refinaria Uma combinação complexa obtido pela fracionamento do produto de cabeça do processo de cracking catalítico em leito fluidizado. É constituída por hidrogénio, sulfureto de hidrogénio, azoto, e hidrocarbonetos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₃ .	H K	272-874-3	68919-02-8	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-159-00-3	gases (petróleo), da torre de absorção secundária da separação de gases de um cracker catalítico de leito fluidizado Gás de refinaria Uma combinação complexa obtida por lavagem do gás de cabeça de um cracker catalítico de leito fluidizado. É constituída por hidrogénio, azoto, metano, etano e propano.	H K	272-875-9	68919-03-9	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-160-00-9	gases (petróleo), do stripper da unidade de hidrogenodessulfurização de um destilado pesado Gás de refinaria Uma combinação complexa separado do produto líquido de um processo de hidrogenodessulfurização de um destilado pesado. É constituída por hidrogénio, sulfureto de hidrogénio e hidrocarbonetos alifáticos saturados com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₃ .	H K	272-876-4	68919-04-0	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
649-161-00-4	gases (petróleo), do estabilizador do platformer, produtos de cauda leves do fraccionamento Gás de refinaria Uma combinação complexa obtida pelo fraccionamento dos produtos de cauda leves dos reactores de platina da unidade platformer. É constituída por hidrogénio, metano, etano, e propano.	H K	272-880-6	68919-07-3	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-162-00-X	gases (petróleo), da coluna de pré-flash, da destilação de petróleo bruto Gás de refinaria Uma combinação complexa produzida na coluna de pré-flash utilizada na destilação de petróleo bruto. É constituída por azoto e hidrocarbonetos alifáticos saturados com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₅ .	H K	272-881-1	68919-08-4	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-163-00-5	gases (petróleo), do fraccionador do resíduo atmosférico Gás de refinaria Uma combinação complexa obtida pelo fraccionamento do resíduo atmosférico. É constituída por hidrogénio e hidrocarbonetos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₅ .	H K	272-884-8	68919-11-9	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-164-00-0	gases (petróleo), do stripper da unidade unifier Gás de refinaria Uma combinação de hidrogénio e metano obtida pelo fraccionamento dos produtos da unidade unifier.	H K	272-885-3	68919-12-0	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-165-00-6	gás residual (petróleo), do separador da nafta	H K	273-173-5	68952-79-4	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
	hidrogenodessulfurizada cataliticamente Gás de refinaria Uma combinação complexa de hidrocarbonetos obtida da hidrogenodessulfuração de nafta. É constituída por hidrogénio, metano, etano, e propano.]					S: 53-45		
649-166-00-1	gás residual (petróleo), do hidrogenodessulfurizador da nafta de destilação directa Gás de refinaria Uma combinação complexa obtida da hidrogenodessulfurização da nafta de destilação directa. É constituída por hidrogénio e hidrocarbonetos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ a C ₃ .	H K	273-174-0	68952-80-7	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-167-00-7	gases (petróleo), da coluna de absorção (leanoil), do fracionamento de produtos do cracker catalítico de leito fluidizado e do produto de cabeça do dessulfurizador de gásóleo Gás de refinaria Uma combinação complexa obtida pelo fraccionamento dos produtos de um craker catalítico de leito fluidizado e do dessulfurizador de gásóleo. É constituída por hidrogénio e hidrocarbonetos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ a C ₄ .	H K	273-269-7	68955-33-9	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-168-00-2	gases (petróleo), da destilação e cracking catalítico de petróleo bruto Gás de refinaria Uma combinação complexa produzida por processos de destilação e de cracking catalítico de petróleo bruto. É constituída	H K	273-563-5	68989-88-8	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
649-169-00-8	por hidrogénio, sulfureto de carbono e hidrocarbonetos parafínicos e olefínicos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₆ . gases (petróleo), da lavagem de gasóleos com dietanolamina Gás de refinaria Uma combinação complexa produzida por dessulfurização de gasóleos com dietanolamina. É constituída predominantemente por sulfureto de hidrogénio, hidrogénio e hidrocarbonetos alifáticos com números de átomos de carbono na gama de C ₁ até C ₅ .	H K	295-397-2	92045-15-3	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-170-00-3	gases (petróleo), efluentes da hidrogenodessulfurização de gasóleo Gás de refinaria Uma combinação complexa obtida por separação da fase líquida do efluente da reacção de hidrogenação. É constituída predominantemente por hidrogénio, sulfureto de hidrogénio e hidrocarbonetos alifáticos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₄ .	H K	295-398-8	92045-16-4	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-171-00-9	gases (petróleo), da purga de hidrogenodessulfurização Gás de refinaria Uma combinação complexa de gases obtida do reformer e das purgas do reactor de hidrogenação. É constituída predominantemente por hidrogénio e hidrocarbonetos alifáticos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₄ .	H K	295-399-3	92045-17-5	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-172-00-4	gases (petróleo), do tanque de	H K	295-400-7	92045-18-6	Carc. Cat. 1; R45	T		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
649-173-00-X	flash do hidrogenador Gás de refinaria Uma combinação complexa de gases obtida do flash dos efluentes após a reação de hidrogenação. É constituída predominantemente por hidrogénio e hidrocarbonetos alifáticos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₆ .		295-401-2	92045-19-7	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	R: 45-46 S: 53-45		
	gases (petróleo), residuais e de alta pressão do steam-cracking de nafta Gás de refinaria Uma combinação complexa obtida como uma mistura de fracções não condensáveis dos produtos do processo de steam-cracking da nafta e de gases residuais obtidos durante a preparação dos produtos subsequentes. É constituída predominantemente por hidrogénio e hidrocarbonetos parafínicos e olefínicos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₃ com os quais também pode estar misturado gás natural.	H K			Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-174-00-5	gases (petróleo), da viscorredução de resíduos Gás de refinaria Uma combinação complexa obtida por redução de viscosidade de resíduos num forno. É constituída predominantemente por sulfureto de hidrogénio e hidrocarbonetos parafínicos e olefínicos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₃ .	H K	295-402-8	92045-20-0	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-177-00-1	gases (petróleo), C ₃₋₄ Gases de petróleo liquefeitos Uma combinação complexa de	H K	268-629-5	68131-75-9	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
649-178-00-7	hidrocarbonetos produzida por destilação de produtos do cracking de petróleo bruto. É constituída por hidrocarbonetos com números de átomos de carbono na gama de C ₃ até C ₄ , predominantemente propano e propileno, e destila no intervalo de aproximadamente -51°C a -1°C.]	H K	269-617-2	68307-98-2	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-179-00-2	gás residual (petróleo), do estabilizador do fraccionamento da nafta polimerizada cataliticamente Gases de petróleo liquefeitos Uma combinação complexa de hidrocarbonetos da destilação dos produtos de destilados do cracking catalítico e de nafta do cracking catalítico. É constituída predominantemente por hidrocarbonetos com números de átomos de carbono na gama de C ₁ até C ₄ .	H K	269-618-8	68307-99-3	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-180-00-8	gás residual (petróleo), do estabilizador do fraccionamento da nafta do reforming catalítico, sem sulfureto de hidrogénio Gases de petróleo liquefeitos Uma combinação complexa de hidrocarbonetos obtida da estabilização do fraccionamento	H K	269-619-3	68308-00-9	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
649-181-00-3	de nafta do reforming catalítico e da qual foi renovado o sulfureto de hidrogénio por tratamento com aminas. É constituída predominantemente por hidrocarbonetos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₄ .]	H K	269-620-9	68308-01-0	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-182-00-9	gás residual (petróleo), da unidade de hidrogenodessulfurização de destilado da destilação directa, sem sulfureto de hidrogénio Gases de petróleo liquefeitos Uma combinação complexa de hidrocarbonetos obtida do tratamento de destilados do cracking térmico com hidrogénio na presença de um catalisador. É constituída predominantemente por hidrocarbonetos saturados com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₆ .]	H K	269-630-3	68308-10-1	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-183-00-4	gás residual (petróleo), da torre de absorção do cracking catalítico de gasóleo	H K	269-623-5	68308-03-2	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
649-184-00-X	Gases de petróleo liquefeitos Uma combinação complexa de hidrocarbonetos obtida da destilação de produtos do cracking catalítico de gasóleo. É constituída predominantemente por hidrocarbonetos com número de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₅ .	H K	269-624-0	68308-04-3	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-185-00-5	gás residual (petróleo), da unidade de recuperação de gases Gases de petróleo liquefeitos Uma combinação complexa de hidrocarbonetos da destilação de produtos de várias frações de hidrocarbonetos. É constituída predominantemente por hidrocarbonetos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₅ .	H K	269-625-6	68308-05-4	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-186-00-0	gás residual (petróleo), do desetanizador da unidade de recuperação de gases Gases de petróleo liquefeitos Uma combinação complexa de hidrocarbonetos da destilação de produtos de várias frações de hidrocarbonetos. É constituída por hidrocarbonetos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₄ .	H K	269-626-1	68308-06-5	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
649-187-00-6	hidrogenodessulfurizados e tratada para remoção de impurezas ácidas. É constituída predominantemente por hidrocarbonetos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₅ .	H K	269-627-7	68308-07-6	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-188-00-1	gás residual (petróleo), do estabilizador da nafta leve de destilação directa, sem sulfureto de hidrogénio Gases de petróleo liquefeitos Uma combinação complexa de hidrocarbonetos obtida da estabilização por stripping de gásóleo de vácuo hidroenodessulfurizado cataliticamente e da qual o sulfureto de hidrogénio foi removido por tratamento com aminas. E constituída predominantemente por hidrocarbonetos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₆ .	H K	269-629-8	68308-09-8	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-189-00-7	gás residual (petróleo), do desetinizador da alimentação de	H K	269-631-9	68308-11-2	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
649-190-00-2	alquilação propano-propileno Gases de petróleo liquefeitos Uma combinação complexa de hidrocarbonetos obtida da destilação dos produtos da reacção de propano com propileno. É constituída por hidrocarbonetos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₄ .					S: 53-45		
649-190-00-2	gás residual (petróleo), do hidrogenodessulfurizador do gásóleo de vácuo, sem sulfureto de hidrogénio Gases de petróleo liquefeitos Uma combinação complexa de hidrocarbonetos obtida da hidrogenodessulfurização catalítica de gásóleo de vácuo e da qual foi renovido o sulfureto de hidrogénio por tratamento com aminas. É constituída predominantemente por hidrocarbonetos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₆ .	H K	269-632-4	68308-12-3	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-191-00-8	gases (petróleo), de cabeça da destilação de produtos de cracking catalítico Gases de petróleo liquefeitos Uma combinação complexa de hidrocarbonetos produzida pela destilação de produtos do processo de cracking catalítico. É constituída predominantemente por hidrocarbonetos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₃ até C ₅ e destila no intervalo de aproximadamente -48°C a 32°C.	H K	270-071-2	68409-99-4	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-193-00-9	alcanos, C ₁₋₂ Gases de petróleo liquefeitos	H K	270-651-5	68475-57-0	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-194-00-4	alcanos, C ₃₋₃	H K	270-652-0	68475-58-1	Carc. Cat. 1; R45	T		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
	Gases de petróleo liquefeitos				Muta. Cat. 2; R46	R: 45-46 S: 53-45		
649-195-00-X	alcanos, C ₃₋₄ Gases de petróleo liquefeitos	H K	270-653-6	68475-59-2	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-196-00-5	alcanos, C ₄₋₅ Gases de petróleo liquefeitos	H K	270-654-1	68475-60-5	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-197-00-0	gases combustíveis Gases de petróleo liquefeitos [Uma combinação de gases leves. É constituída predominantemente por hidrogénio e/ou hidrocarbonetos de peso molecular baixo.]	H K	270-667-2	68476-26-6	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-198-00-6	gases combustíveis, destilados de petróleo bruto Gases de petróleo liquefeitos [Uma combinação complexa de gases leves, produzida por destilação de petróleo bruto e por reforming catalítico da nafta. É constituída por hidrogénio e hidrocarbonetos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₄ e destila no intervalo de aproximadamente -217°C a -12°C.]	H K	270-670-9	68476-29-9	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-199-00-1	hidrocarbonetos, C ₃₋₄ Gases de petróleo liquefeitos	H K	270-681-9	68476-40-4	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-200-00-5	hidrocarbonetos, C _{1,5} Gases de petróleo liquefeitos	H K	270-682-4	68476-42-6	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-201-00-0	hidrocarbonetos, C ₂₋₄ , ricos em C ₃ Gases de petróleo liquefeitos	H K	270-689-2	68476-49-3	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-202-00-6	gases del petróleo, liquefeitos Gases de petróleo liquefeitos [Uma combinação complexa de hidrocarbonetos produzida pela destilação de petróleo bruto. É constituída por hidrocarbonetos com números de átomos de carbono predominantemente na	HKS	270-704-2	68476-85-7	F+; R12 Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	F+; T R: 12-45-46 S: 53-45		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
649-203-00-1	gama de C ₃ até C ₇ e destila no intervalo de aproximadamente -40 °C a 80 °C.] gases del petróleo, liquefeitos, tratados (sweetened) Gases de petróleo liquefeitos [Uma combinação complexa de hidrocarbonetos obtida submetendo uma mistura de gases de petróleo liquefeitos a um processo de sweetening para converter mercaptans ou remover impurezas ácidas. E constituída por hidrocarbonetos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₃ até C ₇ e destila no intervalo de aproximadamente -40 °C a 80 °C.]	HKS	270-705-8	68476-86-8	F+; R12 Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	F+; T R: 12-45-46 S: 45-53		
649-204-00-7	gases (petróleo), C ₃₋₄ , ricos em isobutano Gases de petróleo liquefeitos [Uma combinação complexa de hidrocarbonetos da destilação de hidrocarbonetos saturados e insaturados normalmente com números de átomos de carbono na gama de C ₃ até C ₆ , predominantemente butano e isobutano. E constituída por hidrocarbonetos saturados e insaturados com números de átomos de carbono na gama de C ₃ até C ₄ , predominantemente isobutano.]	H K	270-724-1	68477-33-8	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-205-00-2	destilados (petróleo), C ₃₋₆ , ricos em piperlenos Gases de petróleo liquefeitos [Uma combinação complexa de hidrocarbonetos da destilação de hidrocarbonetos alifáticos saturados e insaturados normalmente com números de átomos de carbono na gama de C ₃ até C ₆ . E constituída por hidrocarbonetos saturados e	H K	270-726-2	68477-35-0	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
649-206-00-8	insaturados com números de átomos de carbono na gama de C ₃ até C ₆ , predominantemente piperílenos.]	H K	270-750-3	68477-69-0	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-207-00-3	gases (petróleo), C ₂₋₃ Gases de petróleo liquefeitos]Uma combinação complexa de hidrocarbonetos produzida pela destilação de produtos de um processo de fraccionamento catalítico. É constituída predominantemente por etano, etileno, propano, e propileno.]	H K	270-751-9	68477-70-3	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-208-00-9	gases (petróleo), produtos de cauda da coluna de despropanização do gasóleo do cracking catalítico, rico em C ₄ sem ácidos Gases de petróleo liquefeitos]Uma combinação complexa de hidrocarbonetos obtida por fraccionamento do efluente de hidrocarbonetos do gasóleo do cracking catalítico e tratada para remoção de sulfureto de hidrogénio e outros compostos ácidos. É constituída por hidrocarbonetos com números de átomos de carbono na gama de C ₃ até C ₅ , predominantemente C ₄ .]	H K	270-752-4	68477-71-4	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-209-00-4	gases (petróleo), produtos de cauda do desbutanizador de nafta do cracking catalítico, ricos em C ₃₋₅	H K	270-754-5	68477-72-5	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
	Gases de petróleo liquefeitos Uma combinação complexa de hidrocarbonetos obtida por estabilização da nafta do cracking catalítico. É constituída por hidrocarbonetos alifáticos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₃ até C ₅ .							
649-210-00-X	gás residual (petróleo), do estabilizador do fraccionamento da nafta isomerizada Gases de petróleo liquefeitos Uma combinação complexa de hidrocarbonetos obtida da estabilização do fraccionamento dos produtos da nafta isomerizada. É constituída predominantemente por hidrocarbonetos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₁ até C ₄ .	H K	269-628-2	68308-08-7	Carc. Cat. 1; R45 Mutua. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-224-00-6	gasóleos, fuel Gasóleo - não especificado Uma combinação complexa de hidrocarbonetos produzida pela destilação de petróleo bruto. É constituída predominantemente por hidrocarbonetos com números de átomos de carbono predominantemente na gama de C ₉ até C ₂₀ e destila no intervalo de aproximadamente 163°C a 357°C.	H N	269-822-7	68334-30-5	Carc. Cat. 3; R40	Xn R: 40 S: (2-)36/37		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
005-009-00-3	butiltrifenilborato de tetrabutílamónio		418-080-4	120307-06-4	R 43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2-)24-37-56-61		
005-010-00-9	tetraquis(pentafluórfenil)borato de N,N-dimetilamónio		422-050-6	118612-00-3	Carc. Cat.3; R40 Xn; R22 Xi; R38-41	Xn R: 22-38-40-41 S: (2-)22-26-36/37/39		
005-012-00-X	Butiltrifenilborato(1-) de dietil 4- 1,5,5-tris(4-dietilamíniofenil)pena-2,4-dienilideno ciclohexa-2,5-dienilideno amónio		418-070-1	141714-54-7	R 43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
011-007-00-3	propoxicarbazona de sódio		-	-	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61	C ≥ 2,5 %; N; R50/53 0,25 % ≤ C < 2,5 %; N; R51/53 0,025 ≤ C < 0,25 %; R52/53	
013-009-00-X	((n-butil)x(etil)y-1,5-dihidro)aluminato de sódio x=0,5 y=1,5		418-720-2	-	F; R11 R14/15 R 17 Xn; R20 C; R35	F; C R: 11-14/15-17-20-35 S: (1/2-)6-16-26-30-36/37/39-43-45		
014-026-00-5	dicloro-(3-(3-cloro-4-fluórfenil)propil)metilsilano		407-180-3	-	C; R35	C R: 35 S: (1/2-)26-36/37/39-45		
014-027-00-0	cloro(3-(3-cloro-4-fluórfenil)propil)dimetilsilano		410-270-5	-	C; R35	C R: 35 S: (1/2-)8-26-28-36/37/39-45		
014-028-00-6	α-3-(1-oxoprop-2-enil)-1-oxipropil dimetoxisiloxi- <i>o</i> -[3-(1-oxoprop-2-enil)-1-oxipropil dimetoxisilipoli(dimetilsiloxano)		415-290-8	-	R 43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		
014-029-00-1	O,O'-(etenilmetilsilileno)di(4-metilpentano-2-ona)oxíma]		421-870-1	-	Repr. Cat.3; R62 Xn; R22-48/22	Xn R: 22-48/22-62 S: (2-)36/37		
014-030-00-7	[(dimetilsilileno)bis(1,2,3,3a,7a-η)-1H-indeno-1-ilideno)dimetil]hafnio		422-060-0	137390-08-0	T+; R28	T+ R: 28 S: (1/2-)6-22-28-36/37-45		
014-031-00-2	bis(1-metiletil)-dimetoxisilano		421-540-7	18230-61-0	R 10 Xi; R38 R43 R 52-53	Xi R: 10-38-43-52/53 S: (2-)24-37-61		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
014-032-00-8	diciclopentildimetoxisilano		404-370-8	126990-35-0	Xi; R38-41 N; R50-53	Xi; N R: 38-41-50/53 S: (2-)26-37/39-60-61		
015-180-00-6	ácido [R-(R*,S*)]-[2-metil-1-(1-oxopropoxi)propoxi]-(4-fenilbutil)fosfinil acético, (-)-cinconidina (1:1) sal		415-820-8	137590-32-0	Xi; R41 R 43 R 52-53	Xi R: 41-43-52/53 S: (2-)24-26-37/39-61		
015-181-00-1	fosfina		232-260-8	7803-51-2	F+; R12 R17 T+; R26 C; R34 N; R50	F+; T+; N R: 12-17-26-34-50 S: (1/2-)28-36/37-45-61-63		
015-184-00-8	sais de glifosato, excepto outros mencionados no presente anexo		-	-	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
015-186-00-9	Clorpirifos- metilo		227-011-5	5598-13-0	R43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2-)36/37-60-61	C ≥ 1 %; N; R43-50-53 0,0025 % ≤ C < 1 %; N; R50-53 0,00025 % ≤ C < 0,0025 %; N; R51-53 0,000025 % ≤ C < 0,00025 %; R52-53	
015-187-00-4	Mistura de: ((2-hidroxi)imino)bis(metileno)bisfosfonato de tetrassódio, N-óxido; ((tetra-hidro-2-hidroxi-4H-1,4,2-oxazafosforin-4-il)-metil)fosfonato de trissódio, N-óxido, P-óxido		417-540-1	-	Xi; R41 N; R51-53	Xi; N R: 41-51/53 S: (2-)26-39-61		
015-189-00-5	óxido de fenil bis(2,4,6-trimetilbenzoi)-fosfina		423-340-5	162881-26-7	R43 R53	Xi R: 43-53 S: (2-)22-24-37-61		
016-086-00-8	10-amino-6,13-dicloro-3-(3-(4-(2,5-dissulfonatoanilino)-6-fluoro-1,3,5-triazina-2-ilamino)prop-3-ilamino)-5,12-dioxa-7,14-diazapentaceno-4,11-dissulfonato de tetrassódio		402-590-9	109125-56-6	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)22-26-39		
016-087-00-3	Mistura de: bishexafluorofosfato de tiobis(4,1-fenileno)-S,S',S'-tetrafenil dissulfonio hexafluorofosfato de difenil(4-		403-490-8	74227-35-3	Xi; R36 R 43 N; R50-53	Xi; N R: 36-43-50/53 S: (2-)24-26-37-60-61		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
	feniltiofenil)sulfonio propylene carbonate							
016-088-00-9	ácido 4-(bis(4-(dietilamino)fenil)metil)benzeno-1,2-dimetanossulfónico		407-280-7	71297-11-5	R 52-53	R: 52/53 S: 61		
016-089-00-4	Mistura de estéres de 5,5',6,6',7,7'-hexahidroxi-3,3',3'-tetrametil-1,1'-spiroindano e 2-diazo-1,2-dihidro-1-oxo-5-sulfonaftaleno		413-840-1	-	E; R2 F; R11 R 53	E R: 2-11-53 S: (2-)33-35-40-61		
016-090-00-X	4-metil-N-(metilsulfonil)benzenossulfonamida		415-040-8	14653-91-9	Xn; R22 Xi; R37-41	Xn R: 22-37-41 S: (2-)26-39		
016-091-00-5	1-amino-9,10-di-hidro-9,10-dioxo-4-(2,4,6-trimetilamino)-antraçeno-2-sulfonato de tert-alquil(C12-C14)amónio		414-110-5	-	Xi; R41 N; R50-53	Xi; N R: 41-50/53 S: (2-)26-39-60-61		
016-093-00-6	Mistura (2:1) de: tris(6-diazo-5,6-dihidro-5-oxonaftaleno-1-sulfonato) de 4-(7-hidroxi-2,4,4-trimetil-2-cromani)resorcinol-4-ilo bis(6-diazo-5,6-dihidro-5-oxonaftaleno-1-sulfonato) de 4-(7-hidroxi-2,4,4-trimetil-2-cromani)resorcinol		414-770-4	140698-96-0	F; R11 Care. Cat.3; R40	F; Xn R: 11-40 S: (2-)7-36/37		
016-095-00-7	Mistura de: produto da reacção de 4,4'-metilenobis[2-(4-hidroxibenzil)-3,6-dimetilfenol] e 6-diazo-5,6-dihidro-5-oxonaftalenossulfonato (1:2) Produto da reacção de 4,4'-metilenobis[2-(4-hidroxibenzil)-3,6-dimetilfenol] e 6-diazo-5,6-dihidro-5-oxonaftalenossulfonato (1:3)		417-980-4	-	F; R11 Care. Cat.3; R40	F; Xn R: 11-40 S: (2-)7-36/37		
016-096-00-2	tifensulfurão-metilo		-	79277-27-3	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
017-015-00-3	cloridrato de cloreto de (2-(aminoetil)fenil)acetilo		417-410-4	61807-67-8	Xn; R22 C; R35	C R: 22-35-43		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
					R43	S: (1/2-)26-36/37/39-45 Xn: N R: 21/22-38-41-51/53 S: (2-)22-26-36/37/39-61		
017-016-00-9	cloreto de metiltrifetilfosfónio		418-400-2	1031-15-8	Xn; R21/22 Xi; R38-41 N; R51-53			
017-017-00-4	Cloreto de (Z)-1,3-docosenil-N,N-bis(2-hidroxietil)-N-metil-amónio		426-210-6	120086-58-0	C; R34 N; R50-53	C; N R: 34-50/53 S: (2-)26-36/37/39-45-60-61		
017-018-00-X	cloreto de N,N,N-trimetil-2,3-bis(estereóiloxi)propilamónio		405-660-7	-	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
017-019-00-5	cloridrato de (R)-1,2,3,4-tetrahidro-6,7-dimetoxi-1-veratrilisoquinolina		415-110-8	54417-53-7	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2-)22-61		
017-020-00-0	cloreto de etilpropoxialumínio		421-790-7	-	C; R35 F; R14/15	C; F R: 14/15-35 S: (1/2-)16-23-26-30-36/37/39-43-45		
017-021-00-6	cloreto de becnamidopropil-dimetil-(di-hidroxi)propilamónio		423-420-1	136920-10-0	Xi; R41 R43 N; R50-53	Xi; N R: 41-43-50/53 S: (2-)26-36/37/39-60-61		
020-003-00-0	Mistura de: (bis(2-hidroxi-5-tetrapropenilmetil)metilamin a)di-hidróxido de cálcio (tris(2-hidroxi-5-tetrapropenilmetil)metilamin a)tri-hidróxido de tri-cálcio poli((2-hidroxi-5-tetrapropenilmetil)metilamin a)hidróxido de cálcio		420-470-4	-	Xi; R36/38 R43	Xi R: 36/38-43 S: (2-)24-26-37		
024-019-00-9	Componente principal ATAN-MAP: {6-(2 ou 3 ou 4)-amino-(4 ou 5 ou 6)-hidroxifenilazol-5''-(fenilsulfamoi)-3-sulfonatonafialeno-2-azobenzeno-1,2''-diolato}-[6''- 1-(fenilcarbamoil)etilazol]-5'''-(fenilsulfamoi)-3''-sulfonatonafialeno-2''-azobenzeno-1'',2'''-diolato} cromato (III) de trissódio subproduto I ATAN-ATAN; bis[6- 1-(fenilcarbamoil)etilazol]-		419-230-1	-	R 43 R52-53	Xi R: 43-52/53 S: (2-)22-24-37-61		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
024-020-00-4	5-(fenilsulfonil)-3-sulfononaftaleno-2-azobenzeno-1,2'-diolato) cromato (III) de trissódio subproduto 2 MAP-MAP: bis[6-(2 ou 3 ou 4)-amino-(4 ou 5 ou 6)-hidroxifenilazo]-5-(fenilsulfamoil)-3-sulfononaftaleno-2-azobenzeno-1,2'-diolato) cromato (III) de trissódio		418-220-4	-	R43 R52-53	Xi R: 43-52/53 S: (2-)22-24-37-61		
025-005-00-5	Mistura de: [29H,31H-ftalocianina-C,C,C-trissulfonato (6-)-N29,N30,N31,N32] manganato (3-) de trissódio [29H,31H-ftalocianina-C,C,C-tetrassulfonato (6-)-N29,N30,N31,N32] manganato (3-) de tetrassódio [29H,31H-ftalocianina-C,C,C,C-pentassulfonato (6-)-N29,N30,N31,N32] manganato (3-) de pentassódio		417-660-4	-	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
029-012-00-4	((N-(3-trimetilamóniopropil)sulfamoil)m etilsulfonatoftalocianinato)cobre(II) de sódio		407-340-2	124719-24-0	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		
029-013-00-X	(2-(α-(3-(4-fluoro-6-(2-(vinilsulfonil)etoxi)etilamino)-1,3,5-triazina-2-ilamino)-2,6-óxido-5-sulfonato)fenilazo)benzilidenhidrazina)-4-sulfonato)benzoato)cobre(II) de trissódio		407-580-8	130201-51-3	Xi; R41 R52-53	Xi R: 41-52/53 S: (2-)24-37-61		
030-011-00-6	bis(ortofosfato) de tri/zinco		231-944-3	7779-90-0	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
030-013-00-7	óxido de zinco		215-222-5	1314-13-2	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
034-003-00-3	selenito de sódio		233-267-9	10102-18-8	T+; R28 T; R23 R31 R43 N; R51-53	T+; N R: 23-28-31-43-51/53 S: (1/2)-28-36/37-45-61		
053-005-00-5	tetraquis(pentafluorofenil)borato (1-) de (4-(1-metiletil)fenil)-(4-metilfenil)iodónio		422-960-3	178233-72-2	Xn; R21/22-48/22 N; R50-53	Xn; N R: 21/22-48/22-50/53 S: (2)-22-36/37-60-61		
601-056-00-4	Mistura de isómeros: metil difenilmetano dimetildifenilmetano		405-470-4	-	Xi; R38 N; R50-53	Xi; N R: 38-50/53 S: (2)-37-60-61		
601-057-00-X	tosilato de N-dodecil-1,3-(4-dimetilamino)benzamido)-propil dimetilamónio		421-130-8	156679-41-3	Xi; R41 R43 N; R50-53	Xi; N R: 41-43-50/53 S: (2)-24-26-37/39-60-61		
601-058-00-5	di-L-para-menteno		417-870-6	-	Xi; R38 R43 N; R50-53	Xi; N R: 38-43-50/53 S: (2)-23-24-37-60-61		
601-059-00-0	2-Benzilideno-3-oxobutirato de metilo		420-940-9	15768-07-7	Xi; R36/38 N; R51-53	Xi; N R: 36/38-51/53 S: (2)-26-37/39-61		
601-060-00-6	1,2-bis(4-fluoro-6-[4-sulfo-5-(2-(4-sulfo-naftaleno-3-ilazo)-1-hidroxi-3,6-dissulfo-8-aminonaftaleno-7-ilazo)fenilamino]-1,3,5-triazin-2-ilamino)etano; sais de x-sódio, y-potássio x=7,755 y=0,245		417-610-1	155522-09-1	R43	Xi R: 43 S: (2)-22-24-37		
601-061-00-1	(etil-1,2-etanodil)-2-[[[2-(hidroxietil)metilamino]acetil]-propil]o-(nonilfenoxi)poli[oxi-(metil-1,2-etanodil)to]		418-960-8	-	C; R34 R43 N; R51-53	C; N R: 34-43-51/53 S: (1/2)-26-28-36/37/39-45-61		
601-062-00-7	Mistura de: tricontano ramificado dotricontano ramificado tetratricontano ramificado hexatricontano ramificado		417-030-9	151006-59-6	R53	R: 53 S: 61		
601-063-00-2	Mistura de isómeros de tetracosano ramificado		417-060-2	151006-61-0	Xn; R20 R53	Xn R: 20-53		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
601-064-00-8	hexatricontano ramificado		417-070-7	151006-62-1	R53	S: (2-)61		
601-065-00-3	Mistura de: (1'- α ,3'- α ,6'- α -2,2,3',7',7'-pentametilspiro(1,3-dioxano-5,2'-norcarano)(1 α ,3 β ,6 α -2,2,3',7',7'-pentametilspiro(1,3-dioxano-5,2'-norcarano)		416-930-9	-	Xn; R48/22 Xi; R41 N; R51-53	Xn; N R: 41-48/22-51/53 S: (2-)22-26-37/39-61		
601-066-00-9	1-(4-(trans-4-heptilciclohexil)etil)etano		426-820-2	78531-60-9	R43 R53	Xi R: 43-53 S: (2-)24-37-61		
601-067-00-4	arsenato de trietil		427-700-2	15606-95-8	Care. Cat. 1; R45 T; R23/25 N; R50-53	T; N R: 45-23/25-50/53 S: 53-45-60-61		
601-068-00-X	1,2-diacetoxibut-3-eno		421-720-5	18085-02-4	Xn; R22	Xn R: 22 S: (2-)		
601-069-00-5	brometo de 2-etil-1-(2-(1,3-dioxanil)etil)-piridínio		422-680-1	-	R52-53	R: 52/53 S: 61		
601-071-00-6	1-dimetoximetil-2-nitrobenzeno		423-830-9	20627-73-0	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
601-073-00-7	1-bromo-3,5-difluorbenzeno		416-710-2	461-96-1	R10 Xn; R22-48/22 Xi; R38 R43 N; R50-53	Xn; N R: 10-22-38-43-48/22-50/53 S: (2-)24-36/37-60-61		
601-074-00-2	Mistura de: 4-(2,2,3-trimetilcyclopent-3-en-1-il)-1-metil-2-oxabicyclo[2,2,2]octano 1-(2,2,3-trimetilcyclopent-3-en-1-il)-5-metil-6-oxabicyclo[3,2,1]octano espiro[ciclo-hex-3-en-1-il-(4,5,6,6a-tetra-hidro-3,6',6',6'a-tetrametil)-1,3'(3'aH)-[2H]cyclopenta[b]furan]o espiro[ciclo-hex-3-en-1-il-(4,5,6,6A-tetra-hidro-4,6',6',6'A-tetrametil)-1,3'(3'AH)-[2H]cyclopenta[B]furan]o		422-040-1	-	Xi; R36/38 N; R51-53	Xi; N R: 36/38-51/53 S: (2-)26-37-61		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
602-093-00-9	$\alpha,\alpha,4$ -tetraclorotolueno Tricloreto de <i>p</i> -clorobenzilo	E	226-009-1	5216-25-1	Carc. Cat.2; R45 Repr. Cat.3; R62 T; R48/23 Xn; R21/22 Xi; R37/38	T R: 45-21/22-37/38-48/23-62 S: 53-45		
602-094-00-4	Éter difenílico, derivado octabromado		251-087-9	32536-52-0	Repr. Cat.2; R61 Repr. Cat.3; R62	T R: 61-62 S: 53-45		
602-096-00-5	malachite green, cloridrato; C.I. Basic Green 4		209-322-8	569-64-2 1 1 18015-76-4 [2]	Xn; R22 Xi; R41 Repr. Cat. 3; R63 N; R50-53	Xn; N R: 22-41-63-50/53 S: (2-)26-36/37-39-46-60-61		
602-097-00-0	malachite green, oxalato	[1]	219-441-7	[2]				
602-097-00-0	1-bromo-9-(4,4,5,5,5-pentafluoropentil)nonano	[2]	422-850-5	148757-89-5	R43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
603-167-00-3	3,3',5,5'-tetra- <i>terc</i> -butilbifenil-2,2'-diol		407-920-5	6390-69-8	R 53	R: 53 S: 61		
603-168-00-9	3-(2-etilhexiloxi)propano-1,2-diol		408-080-2	70445-33-9	Xi; R41 R 52-53	Xi R: 41-52/53 S: (2-)26-39-61		
603-169-00-4	(+/-) <i>trans</i> -4-(4-fluorfenil)-3-hidroximetil-N-metilpiperidina		415-550-0	109887-53-8	Xn; R22 Xi; R41 N; R51-53	Xn; N R: 22-41-51/53 S: (2-)22-26-39-61		
603-170-00-X	Mistura de: 2-metil-1-(6-metilbicyclo[2.2.1]heptano-5-eno-2-il)pentano-1-eno-3-ol 2-metil-1-(1-metilbicyclo[2.2.1]heptano-5-eno-2-il)-pentano-1-eno-3-ol 2-metil-1-(5-metilbicyclo[2.2.1]heptano-5-eno-2-il)pentano-1-eno-3-ol		415-990-3	67739-11-1	Xi; R36 N; R51-53	Xi; N R: 36-51/53 S: (2-)26-61		
603-171-00-5	5-tiazolilmetanol		414-780-9	38585-74-9	Xi; R41 R 52-53	Xi R: 41-52/53 S: (2-)26-39-61		
603-172-00-0	<i>trans</i> -butenodiolato de mono-2-[2-(4-dibenzol[b,f][1,4]iazepina-1-il)piperazínio-1-il]etoxi]etanol		415-180-1	-	Xn; R22 Xi; R41 N; R51-53	Xn; N R: 22-41-51/53 S: (2-)22-26-39-61		
603-173-00-6	4,4-dimetil-3,5,8-trioxabicyclo[5.1.0]octano		421-750-9	57280-22-5	Xi; R36 R 43	Xi R: 36-43 S: (2-)26-36/37		
603-174-00-1	4-ciclo-hexil-2-metil-2-butanol		420-630-3	83926-73-2	Xi; R41	Xi; N		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
603-175-00-7	2-(2-hexiloxietoxi)etanol DEGHE Éter mono-hexílico de dietilenoglicol 3,6-dioxo-1-dodecanohexilcarbitol		203-988-3	112-59-4	N; R51-53 Xn; R21 Xi; R41	R: 41-51/53 S: (2-)26-39-61 Xn R: 21-41 S: (2-)26-36/37-46		
603-176-00-2	1,2-bis(2-metoxietoxi)etano TEGDME éter dimetílico de trietilenoglicol triglime		203-977-3	112-49-2	R19 Repr. Cat.2; R61 Repr. Cat.3; R62	T R: 61-19-62 S: 53-45		
603-177-00-8	1-etoxipropan-2-ol 2PG1EE 1-etoxi-2-propanol propilenoglicol etil éter éter etílico do propilenoglicol [1] acetato de 2-etoxi-1-metiletil 2PG1EEA [2]		216-374-5 [1] 259-370-9 [2]	1569-02-4 [1] 54839-24-6 [2]	R10 R67	R: 10-67 S: (2-)24		
603-178-00-3	2-hexiloxietanol éter mono-hexílico de etilenoglicol n-hexilglicol		203-951-1	112-25-4	Xn R21/22 C; R34	C R: 21/22-34 S: (1/2-)26-36/37/39-45		
603-179-00-9	ergocalciferol		200-014-9	50-14-6	T+; R26 T; R24/25-48/25	T+ R: 24/25-26-48/25 S: (1/2-)28-36/37-45		
603-180-00-4	colecalfiferol		200-673-2	67-97-0	T+; R26 T; R24/25-48/25	T+ R: 24/25-26-48/25 S: (1/2-)28-36/37-45		
603-181-00-X	Éter metil- <i>tert</i> -butílico MTBE 2-Metoxi-2-metilpropano		216-653-1	1634-04-4	F; R11 Xi; R38	F; Xi R: 11-38 S: (2-)9-16-24		
603-183-00-0	2-[2-(2-butoxi)etoxi]etanol TEGBE Éter monobutílico de trietilenoglicol Butoxietrietenoglicol		205-592-6	143-22-6	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39-46	C ≥ 30 %; Xi; R41 20 % ≤ C < 30 %; Xi; R36	
603-184-00-6	2-(hidroximetil)-2-[2-hidroxil-3-(isooctadeciloxi)propoxilmetil]-1,3-propanodiol		416-380-1	146925-83-9	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
603-185-00-1	2,4-dicloro-3-etil-6-nitrofenol		420-740-1	99817-36-4	T; R25 Xi; R41 R43 N; R50-53	T; N R: 25-41-43-50/53 S: (1/2)-26-36/37/39-45-60-61		
603-186-00-7	trans-(5RS,6SR)-6-amino-2,2-dimetil-1,3-dioxepan-5-ol		419-050-3	79944-37-9	R 43	Xi R: 43 S: (2)-22-24/25-26-37		
603-187-00-2	dicloreto de 2-((4,6-bis(4-(2-(1-metil-piridínio-4-il)víni)fenilamino)-1,3,5-triazin-2-il)(2-hidroxietil)amino)etanol		419-360-9	163661-77-6	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
603-189-00-3	Mistura de complexos de: titânio, 2,2'-oxidietanol, lactato de amónio, nitrilotris(2-propanol) e etilenoglicol		405-250-8	-	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
603-191-00-4	2-(4,6-bis(2,4-dimetilfenil)-1,3,5-triazin-2-il)-5-(3-(2-etilhexil)oxi)-2-hidroxi)propoxi)fenol		419-740-4	137658-79-8	R53	R: 53 S: 61		
603-195-00-6	2-[4-(4-Metoxifenil)-6-fenil-1,3,5-triazin-2-il]-fenol		430-810-3	154825-62-4	R52-53	R: 52/53 S: 61		
603-196-00-1	2-(7-Etil-1H-indol-3-il)etanol		431-020-1	41340-36-7	Xn; 22-48/22 N; R51-53	Xn; N R: 22-48/22-51/53 S: (2)-36/37/39-61		
603-197-00-7	1-(4-clorofenil)-4,4-dimetil-3-(1,2,4-triazol-1-ilmetil)pentan-3-ol		403-640-2	107534-96-3	Repr. Cat.3; R63 Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53-63 S: (2)-22-36/37-61		
603-199-00-8	etoxazol		-	153233-91-1	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61	C ≥ 0,25 %; N; R50/53 0,025 % ≤ C < 0,25 %; N; R51/53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %; R52/53	
604-065-00-1	4,4',4''-(1-metilpropano-1-il-3-ilideno)tris(2-ciclohexil-5-metilfenol)		407-460-5	111850-25-0	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
604-066-00-7	Mistura de: fenol, 6-(1,1-dimetil)etil)-4-tetrapropil-2-(2-hidroxi-5-tetrapropil)metil (C41) e metano, 2,2'-bis[6-(1,1-dimetil)etil]-1-hidroxi-4-tetrapropilfenil]- (C45)		414-550-8	-	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
604-067-00-2	2,6-bis(1,1-dimetil-4-tetrapropilfenol e 2-(1,1-dimetil)-4-tetrapropilfenol dimetil)-4-tetrapropilfenol 2,6-bis(6-(1,1-dimetil)-1-hidroxi-4-tetrapropilfenil)metil-4-(tetrapropil)fenol e 2-(6-(1,1-dimetil)-1-hidroxi-4-tetrapropilfenil)metil-6-1-tetrapropilfenil-4-(tetrapropil)fenol		414-520-4	-	Xi; R38-41 N; R50-53	Xi; N R: 38-41-50/53 S: (2-)26-37/39-60-61		
604-068-00-8	Mistura de: 2,2'-[[2-(hidroxietil)imino]bis(metileno)bis[4-dodecifenol]] formaldeído, oligómero com 4-dodecifenol e 2-aminoetanol(n=2) formaldeído, oligómero com 4-dodecifenol e 2-aminoetanol(n=3, 4 ou mais)		415-170-5	99095-19-9	Xn; R20/22 R 43	Xn R: 20/22-43 S: (2-)24-26-37		
604-069-00-3	(+/-)-4-[2-[[3-(4-hidroxifenil)-1-metilpropil]amino]-1-hidroxietil]fenol hidrocloreto		421-740-4	51390-14-8	C; R34 N; R51-53	C; N R: 34-51/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61		
604-070-00-9	trilosano		222-182-2	3380-34-5	Xi; R36/38 N; R50-53	Xi; N R: 36/38-50/53 S: 26-39-46-60-61	C ≥ 20%: Xi, N; R36/38-50/53 0,25 % ≤ C < 20 %: N; R50/53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: N; R51/53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: R52/53	
605-031-00-9	Mistura de: 2,2-dimetoxietanal (esta substância é considerada anidra em termos de identidade, estrutura e composição. No entanto, o 2,2-dimetoxietanal existe numa forma hidratada. 60% da forma anidra é equivalente a 70,4% da forma hidratada)		421-890-0	-	R43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		
	água (incluindo água livre e água de hidratação de 2,2-dimetoxietanal)							

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
606-062-00-0	tetrahidropirano-3-carboxaldeído		407-330-8	61571-06-0	Repr. Cat.2; R61 Xi; R41 R 52-53	T R: 61-41-52/53 S: 53-45-61		
606-063-00-6	(E)-3-(2-clorofenil)-2-(4-fluórfenil)propenal		410-980-5	112704-51-5	Xi; R36 R 43	Xi R: 36-43 S: (2-)24-26-37		
606-064-00-1	pregn-5-eno-3,20-diona bis(etilenoquetalo)		407-450-0	7093-55-2	R 53	R: 53 S: 61		
606-065-00-7	1-(4-morfolinofenil)butano-1-ona		413-790-0	-	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
606-066-00-2	(E)-5[(4-clorofenil)metileno-2,2-dimetilciclopentanona]		410-440-9	131984-21-9	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
606-067-00-8	Mistura de: 1-(2,3,6,7,8,9-hexahidro-1,1-dimetil-1H-benz(g)indeno-4-il)etanona 1-(2,3,5,6,7,8-hexahidro-1,1-dimetil-1H-benz(f)indeno-4-il)etanona 1-(2,3,6,7,8,9-hexahidro-1,1-dimetil-1H-benz(g)indeno-5-il)etanona 1-(2,3,6,7,8,9-hexahidro-3,3-dimetil-1H-benz(g)indeno-5-il)etanona		414-870-8	96792-67-5	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
606-068-00-3	2,7,11-trimetil-13-(2,6,6-trimetilciclo-hex-1-en-1-il)trideca-hexaen-2,4,6,8,10,12-al		415-770-7	1638-05-7	Xn; R48/22 R 43 R 52-53	Xn R: 43-48/22-52/53 S: (2-)22-36/37-61		
606-069-00-9	espiro[1,3-dioxolano-2,5'-(4,4',8',8'-tetrametil-hexahidro-3',9'-metanonaftaleno)]		415-460-1	154171-77-4	N; R51-53	N R: 51/53 S: 24-61		
606-070-00-4	5-(3-butiril-2,4,6-trimetilfenil)-2-[1-(totoximino)propil]-3-hidroxiciclohexano-2-eno-1-ona		414-790-3	138164-12-2	Repr. Cat.3; R62-63 Xn; R22 Xi; R38 N; R50-53	Xn; N R: 22-38-62-63-50/53 S: (2-)22-36/37-60-61		
606-071-00-X	17-espiro(5,5-dimetil-1,3-dioxan-2-il)androsta-1,4-dien-3-ona		421-050-3	13258-43-0	N; R50-53	N R: 50/53 S: 22-60-61		
606-072-00-5	3-acetil-1-fenilpirrolidina-2,4-diona		421-600-2	719-86-8	Xn; R48/22 N; R51-53	Xn; N R: 48/22-51/53		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
606-073-00-0	4,4'-bis(dimetilamino)benzofenona Cetona de Michler		202-027-5	90-94-8	Carc. Cat.2; R45 Muta. Cat.3; R68 Xi; R41	S: (2-)22-36/37-61 T R: 45-41-68 S: 53-45		
606-075-00-1	1-benzil-5-etoxiimidazolidina-2,4-diona		417-340-4	65855-02-9	Xn; R22	Xn R: 22 S: (2-)22		
606-076-00-7	1-(2-quinolinil-carbonyl)oxi)-2,5-pirrolidindiona		418-630-3	136465-99-1	Xi; R41 R43	Xi R: 41-43 S: (2-)24-26-37/39		
606-077-00-2	(3S,4S)-3-hexil-4-(R)-2-hidroxitridecil]-2-oxetanona		418-650-2	104872-06-2	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
606-078-00-8	1-octilazepina-2-ona		420-040-6	59227-88-2	C; R34 R43 N; R51-53	C; N R: 34-43-51/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61		
606-079-00-3	2-n-butil-benzol]isotiazol-3-ona		420-590-7	-	C; R34 R43 N; R50-53	C; N R: 34-43-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61		
606-080-00-9	Produto da reação de 3-hidroxi-5,7-di-tert-butilbenzofuran-2-ona com o-xileno		417-100-9	-	R 53	R: 53 S: 61		
606-081-00-4	(3β, 5α, 6β)-3-(acetiloxi)-5-bromo-6-hidroxi-androstan-17-ona		419-790-7	4229-69-0	R43 R52-53	Xi R: 43-52/53 S: (2-)22-36/37-61		
606-082-00-X	Mistura de: butan-2-ona oxima sin-O,O'-di(butan-2-ona oxima) dietoxisilano		406-930-7	96-29-7	T; R48/22 R43 R52-53	T R: 43-48/25-52/53 S: (1/2-)25-36/37-45-61		
606-083-00-5	2-cloro-5-sec-hexadecil-hidroquinona		407-750-1	-	Xi; R36/38 R43 R52-53	Xi R: 36/38-43-52/53 S: (2-)24-26-37-61		
606-084-00-0	1-(4-metoxi-5-benzofurani)-3-fenil-1,3-propanodiona		414-540-3	484-33-3	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
606-085-00-6	(1R,4S)-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-ona		418-530-1	79200-56-9	Xn; R22 Xi; R41 R43	Xn R: 22-41-43 S: (2-)24-26-37/39		
606-086-00-1	1-(3,3-dimetilciclo-hexilo)pent-4-en-1-one		422-330-8	56973-87-6	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
606-087-00-7	6-etil-5-fluór-4(3H)-pirimidona		422-460-5	137234-87-8	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)60-61		
606-088-00-2	2,4,4,7-tetrametil-6-octen-3-ona		422-520-0	74338-72-0	Xi; R38 N; R51-53	Xi; N R: 38-51/53 S: (2-)37-61		
606-089-00-8	Mistura de: 1,4-diamino-2-cloro-3-fenoxiantraquinona 1,4-diamino-2,3-bisfenoxiantraquinona		423-220-2	12223-77-7	R53	R: 53 S: 61		
606-091-00-9	6-cloro-5-(2-cloroetil)-1,3-dihidroindol-2-ona		421-320-0	118289-55-7	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
606-092-00-4	Mistura de: (E)-oxáciclo-hexadec-12-en-2-ona (E)-oxáciclo-hexadec-13-en-2-ona a) (Z)-oxáciclo-hexadec-(12)-en-2-ona, b) (Z)-oxáciclo-hexadec-(13)-en-2-ona		422-320-3	111879-80-2	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
607-379-00-7	Mistura de: 2-[N-(2-hidroxi)etil]stearamido etil stearato bis[2-(stearil)etil]amino metilsulfonato bis(2-sodio bis(2-hidroxi)etil]amino metilsulfonato amino metilsulfonato N,N-bis(2-hidroxi)etil]stearamida		401-230-8	55349-70-7	R52-53	R: 52/53 S: 61		
607-380-00-2	Mistura de: 1,2-bis(hexiloxycarbonil)etanossulfonato de amónio 1-hexiloxycarbonil-2-octiloxycarbonil-etanossulfonato de amónio 2-hexiloxycarbonil-1-octiloxycarbonil-etanossulfonato de amónio		407-320-3	-	Xi; R38-41 R 52-53	Xi R: 38-41-52/53 S: (2-)26-37/39-61		
607-381-00-8	Mistura de triésteres de 2,2-bis(hidroxi)etil)butanol com ácido C7-alcanoico e ácido 2-etilhexanoico		413-710-4	-	R 53	R: 53 S: 61		
607-382-00-3	ácido 2-(4-amino-2-		411-260-3	117907-43-4	Xi; R41	Xi		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
	nitrofenil(amino)benzóico				R 43 R 52-53	R: 41-43-52/53 S: (2-)24-26-37/39-61		
607-383-00-9	Mistura de: hexadecanoato de 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-ilo octadecanoato de 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-ilo		415-430-8	86403-32-9	Xi; R41 R 43 N; R50-53	Xi; N R: 41-43-50/53 S: (2-)24-26-37/39-60-61		
607-384-00-4	Mistura de: ésteres de álcoois ramificados C14-C15 com ácido 3,5-di-t-butil-4-hidroxifenilpropiónico 3,5-bis(1,1-dimetil)etil-4-hidroxi-benzenopropanoato de alquilo linear e ramificado C15 3,5-bis(1,1-dimetil)etil-4-hidroxi-benzenopropanoato de alquilo linear e ramificado C13		413-750-2	171090-93-0	R 53	R: 53 S: 61		
607-385-00-X	Copolímero de álcool vinílico e acetato de vinilo parcialmente acetilizado com metilsulfato de 4-(2-(4-formilfenil)etenil)-1-metilpiridínio		414-590-6	125229-74-5	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
607-386-00-5	Mistura de: ácido tetradecanóico (42,5-47,5%) estères de poli(1-7)lactato do ácido tetradecanóico (52,5-57,5%)		412-580-6	174591-51-6	Xi; R38-41 R 43 N; R50-53	Xi; N R: 38-41-43-50/53 S: (2-)24-26-37/39-60-61		
607-387-00-0	Mistura de: ácido dodecanóico (35-40%) estères de poli(1-7)lactato do ácido dodecanóico (60-65%);		412-590-0	58856-63-6	Xi; R38-41 R 43 N; R50-53	Xi; N R: 38-41-43-50/53 S: (2-)24-26-37/39-60-61		
607-388-00-6	ácido 4-etilamino-3-nitrobenzóico		412-090-2	2788-74-1	Xn; R22 R 43 R 52-53	Xn R: 22-43-52/53 S: (2-)22-24-37-61		
607-389-00-1	N,N-bis(carboximetil)-3-amino-2-hidroxipropionato de trissódio		414-130-4	119710-96-2	Xn; R22	Xn R: 22		
607-390-00-7	1,2,3,4-tetra-hidro-6-nitroquinaxalina		414-270-6	41959-35-7	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2-)22-61		
607-391-00-2	ciclopropano-1,1-dicarboxilato de dimetilo		414-240-2	6914-71-2	R 52-53	R: 52/53		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
607-392-00-8	4-(5-ciano-1,6-dihidro-2-hidroxi-1,4-dimetil-6-oxo-3-piridinil)azo)benzoato de 2-fenoxietilo		414-260-1	88938-37-8	R 53	S: 61 R: 53 S: 61		
607-393-00-3	ácido 3-(cis-1-propenil)-7-amino-8-oxo-5-tia-1-azabicyclo[4,2,0]octano-2-eno-2-carboxílico		415-750-8	106447-44-3	R 43	Xi R: 43 S: (2-)22-24-37		
607-394-00-9	ácido 5-metilpirazina-2-carboxílico		413-260-9	5521-55-1	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		
607-395-00-4	Mistura de: 1-tridecil-4-alil-(2 o 3)-sulfobutandioato de sódio 1-dodecil-4alil-(2 o 3)-sulfobutandioato de sódio		410-230-7	-	C; R34 R 43 N; R51-53	C; N R: 34-43-51/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61		
607-396-00-X	2-(4-metoxibenzilideno)malonato de bis(1,2,2,6,6-pentametil-4-piperidilo)		414-840-4	147783-69-5	N; R50-53	N R: 50/53 S: 22-60-61		
607-397-00-5	Mistura de: salicilatos de cálcio (alquilados com C10-14 e C18-30 ramificados) fenatos de cálcio (alquilados com C10-14 e C18-30 ramificados) fenatos de cálcio sulfurados (alquilados com C10-14 e C18-30 ramificados)		415-930-6	-	R 43	Xi R: 43 S: (2-)36/37		
607-398-00-0	N-(5-cloro-3-(4-(dietilamino)-2-metilfenilimino)-4-metil-6-oxo-1,4-ciclohexadienil)carbamato de etilo		414-820-5	125630-94-6	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
607-399-00-6	propanoato de 2,2-dimetilo e 3-metil-3-butenilo		415-610-6	104468-21-5	Xi; R38 R52-53	Xi R: 38-52/53 S: (2-)37-61		
607-400-00-X	3-[[[(dibutilamino)ioxometil]tio]propanoato de metilo		414-400-1	32750-89-3	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
607-401-00-5	3-hidroxi-5-oxo-3-ciclohexeno-1-carboxilato de etilo		414-450-4	88805-65-6	Xi; R38-41 R 43	Xi R: 38-41-43 S: (2-)24-26-37/39		
607-402-00-0	N-(feniloxicarbonil)-L-valinato		414-500-5	153441-77-1	R 52-53	R 52-53		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
	de metilo					R: 52/53 S: 61		
607-403-00-6	Mistura de: succinato de bis(1S,2S,4S)-(1-benzil-4-terebutoxicarboxamido-2-hidroxi-5-fenil)pentilammonio alcohol isopropílico		414-810-0	-	Xn; R48/22 Xi; R41 N; R50-53	Xn; N R: 41-48/22-50/53 S: (2-)22-26-36/39-60-61		
607-404-00-1	Mistura de: ácido ((Z)-3,7-dimetil-2,6-octadienil)oxycarbonilpropanóico butanodioato de di-((E)-3,7-dimetil-2,6-octadienilo) butanodioato de di-((Z)-3,7-dimetil-2,6-octadienilo) butanodioato de (Z)-3,7-dimetil-2,6-octadienilo ácido ((E)-3,7-dimetil-2,6-octadienil)oxycarbonilpropanóico		415-190-4	-	R 43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		
607-405-00-7	p-hidroxibenzoato de 2-hexildecilo		415-380-7	148348-12-3	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
607-406-00-2	2,5-diclorobenzoato de potássio		415-700-5	-	Xn; R22 Xi; R41	Xn R: 22-41 S: (2-)26-39		
607-407-00-8	2-carboxi-3-(2-fenil)propionato de etilo		415-680-8	143468-96-6	Xi; R38-41 R 43	Xi R: 38-41-43 S: (2-)24-26-37/39		
607-408-00-3	N-(4-fluorofenil)glicinato de potássio		415-710-1	-	Xn; R48/22 Xi; R41 R 43 R 52-53	Xn R: 41-43-48/22-52/53 S: (2-)22-26-36/37/39-61		
607-409-00-9	Mistura de: ácido (3R)-[1S-(1a, 2a, 6β-(2S)-2-metil-1-oxobutoxi)-8a, gamma.)hexahidro-2,6-dimetil-1-naftalenol]-3,5-dihidroxi-heptanóico biomassa inerte de <i>Aspergillus terreus</i>		415-840-7	-	R 43 R 52-53	Xi R: 43-52/53 S: (2-)36/37-61		
607-410-00-4	2-(hexadecano-2-enil)butanodioato de mono[2-(dimetilamino)etil]monohidrogeno e/ou 3-(hexadecano-2-enil)butanodioato de mono[2-(dimetilamino)etil]monohidrogeno		415-880-5	-	Xi; R38-41 R 43 N; R50-53	Xi; N R: 38-41-43-50/53 S: (2-)24-26-37/39-60-61		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
607-411-00-X	o oxitranmetamol, 4- metilbenzenossulfonato, (S)-		417-210-7	70987-78-9	Carc. Cat.2; R45 Muta. Cat.3; R68 Xi; R41 R43 N; R51-53	T; N R: 45-41-43-51/53 S: 53-45-61		
607-412-00-5	2-(1-cianociclohexil)acetato de etilo		415-970-4	133481-10-4	Xn; R22-48/22 R 52-53	Xn R: 22-48/22-52/53 S: (2-)36/37-61		
607-413-00-0	trans-4-fenil-L-prolina		416-020-1	96314-26-0	Repr. Cat.3; R62 R 43	Xn R: 43-62 S: (2-)22-36/37		
607-414-00-6	tris(2-etilhexilo)-4,4',4''-(1,3,5-triazin-2,4,6-triiltriimino)tribenzoato		402-070-1	88122-99-0	R53	R: 53 S: 61		
607-415-00-1	poli(metil metacrilato)-co-(butil metacrilato)-co-(4-acriloxibutil-isopropenil- α .alpha.-dimetilbenzil carbamato)-co-(amidrido maleico)		419-590-1	-	F; R11 R 43	F; Xi R: 11-43 S: (2-)24-37-43		
607-416-00-7	4-(2-carboximetil)etoxi-1-hidroxi-5-isobutylloxycarbonilamino-N-(3-dodeciloxypropil)-2-naftamida		420-730-7	-	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
607-418-00-8	4-aminobenzoato de 2-etilhexilo		420-170-3	26218-04-2	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
607-419-00-3	ácido (3'-carboximetil-5-(2-(3-etil-3H-benzotiazol-2-ildeno)-1-metil-etilideno)-4,4'-dioxo-2-tioxo-(2,5')bitiazolidinidien-3-4l)-acético		422-240-9	166596-68-5	Xi; R41 R 43	Xi R: 41-43 S: (2-)26-36/37/39		
607-420-00-9	ácido 2,2-bis(hidroxi)metil)butanóico		424-090-1	10097-02-6	Xi; R41 R52-53	Xi R: 41-52/53 S: (2-)26-39-61		
607-421-00-4	cipermetrina <i>cis/trans</i> +/- 40/60 (1RS,3RS; 1RS,3SR)-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato de (RS)- α -ciano-3-fenoxibenzilo		257-842-9	52315-07-8	Xn; R20/22 Xi; R37 N; R50-53	Xn; N R: 20/22-37-50/53 S: (2-)24-36/37/39-60-61		
607-422-00-X	α -cipermetrina		257-842-9	67375-30-8	T; R25	T; N		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
607-423-00-5	ésteres de mecoprop e de mecoprop-P		-	-	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)13-36/37-60-61		
607-424-00-0	trifloxistrobina Ester metílico do ácido (R)-2-(2,6-dimetilfenil)-metoxiacetilamino]propiónico		-	141517-21-7	R43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2-)24-37-46-60-61		
607-425-00-6	metaxilil (ISO) N-(2,6-dimetilfenil)-N-(metoxiacetil)-DL-alaninato de metilo		260-979-7	57837-19-1	Xn; R22 R43 R52-53	Xn R: 22-43-52/53 S: (2-)13-24-37-46-61		
607-426-00-1	Ácido 1,2-benzenodicarboxílico, éster dipentílico, ramificado e linear [1] [2] Fralato de n-pentil-isopentilo [1] [2] Fralato de di-n-pentilo [3] Fralato de di-isopentilo [4]		284-032-2 [1] - [2] 205-017-9 [3] 210-088-4 [4]	84777-06-0 [1] - [2] 131-18-0 [3] 605-50-5 [4]	Repr. Cat. 2; R60-61 N; R50	T; N R: 60-61-50 S: 53-45-61		
607-427-00-7	Heptanoato de bromoxinilo (ISO) heptanoato de 2,6-dibromo-4-cianoifenilo		260-300-4	56634-95-8	Repr. Cat.3; R63 Xn; R20/22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 20/22-43-63-50/53 S: (2-)36/37-46-60-61		
607-430-00-3	BBP Fralato de benzilbutilo		201-622-7	85-68-7	Repr. Cat.2; R61 Repr. Cat.3; R62 N; R50-53	T; N R: 61-62-50/53 S: 53-45-60-61		
607-431-00-9	Praletrina ETOC 2,2-Dimetil-3-(2-metilprop-1-enil)ciclopropanocarboxilato de 2-metil-4-oxo-3-(prop-2-imil)ciclopent-2-en-1-ilo		245-387-9	23031-36-9	T; R23 Xn; R22 N; R50-53	T; N R: 22-23-50/53 S: (1/2-)45-60-61		
607-432-00-4	S-metolaclo Mistura de (S)-2-cloro-N-(2-etil-6-metil-fenil)-N-(2-metoxi-1-metil-etil)-acetamida (80-100%)		- [1] - [2]	87392-12-9 [1] 178961-20-1 [2]	R43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
	[1] S-metolaclor (R)-2-cloro-N-(2-etil-6-metil-fenil)-N-(2-metoxi-1-metil-etil)-acetamida (0-20%)							
	[2] cipermetrina <i>cis/trans</i> +/- 80/20 (1RS, 3RS; 1RS, 3SR)-3-(2,2-Diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato de (RS)- α -ciano-3-fenoxibenzilo		257-842-9	52315-07-8	Xn; R22 Xi; R37/38 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-37/38-43-50/53 S: (2-)36/37/39-60-61		
607-434-00-5	mecoprop-P II e seus sais ácido (R)-2-(4-cloro-2-metilfenoxi)propionico		240-539-0	16484-77-8	Xn; R22 Xi; R41 N; R51-53	Xn; N R: 22-41-51/53 S: (2-)13-26-37/39-46-61		
607-435-00-0	2,2-dihidroxiacetato de 2S-isopropil-5R-metil-1R-ciclohexilo		416-810-6	111969-64-3	Xn; R48/22 Xi; R41 N; R51-53	Xn; N R: 41-48/22-51/53 S: (2-)22-26-36/39-61		
607-436-00-6	neodecanoato de 2-hidroxi-3-(2-etil-4-metilimidazol)propilo		417-350-9	-	Xi; R38-41 N; R50-53	Xi; N R: 38-41-50/53 S: (2-)26-28-37/39-60-61		
607-437-00-1	ácido 3-(4-aminofenil)-2-ciano-2-propenoico		417-480-6	-	R43	Xi R: 43 S: (2-)22-24-37		
607-438-00-7	2-[(aminossulfonil)metil]benzoato de metilo		419-010-5	-	Xn; R22 Xi; R36	Xn R: 22-36 S: (2-)22-26		
607-439-00-2	tetra-hidro-2-furanocarboxilato de metilo		420-670-1	37443-42-8	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		
607-440-00-8	2-aminossulfonil-6-(trifluorometil)piridina-3-carboxilato de metilo		421-220-7	144740-59-0	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)22-24-37-61		
607-441-00-3	ácido 3-[3-(2-dodeciloxi-5-metilfenilcarbamoil)-4-hidroxi-1-naftilil]propionico		421-490-6	167684-63-1	R53	R: 53 S: 57-61		
607-442-00-9	acetato de benzilo e [hidroxi-(4-fenilbutil)fosfinilo]		416-050-5	87460-09-1	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-36/39		
607-443-00-4	bis(2,4-di-tert-butil-6-metilfenil)etilfosfato		416-140-4	145650-60-8	R 53	R: 53 S: 61		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
607-444-00-X	Mistura de: dibenzoato de cis-1,4-dimetilciclohexilo dibenzoato de trans-1,4-dimetilciclohexilo		416-230-3	35541-81-2	R 53	R: 53 S: 61		
607-445-00-5	tris(4-Metilbenzenossulfonato) de ferro (III)		420-960-8	77214-82-5	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)24-26-39		
607-446-00-0	2-[4-(2-cloro-4-nitrofenilazo)-3-(1-oxopropil)amino]fenilaminopropionato de metilo		416-240-8	155522-12-6	R 43 R 53	Xi R: 43-53 S: (2-)22-24-37-61		
607-447-00-6	4-[4-(4-hidroxi)fenilazo]fenilamino]-3-nitrobenzenossulfonato de sódio		416-370-5	156738-27-1	R 43 R52-53	Xi R: 43-52/53 S: (2-)22-24-37-61		
607-448-00-1	ácido 2,3,5,6-tetrafluorbenzóico		416-800-1	652-18-6	Xi; R38-41	Xi R: 38-41 S: (2-)22-26-37/39		
607-449-00-7	Mistura de: 4,4'-(2,4,6-trioxo-1,3,5(2H,4H,6H)-triazin-1,3,5-triil)tris(metileno(3,5,5-trimetil-3,1-ciclohexanodil)iminocarboniloxi-2,1-etanodil(etil)amino) tris(benzeno diazónitri)bis(2-metilpropil)naftalenossulfonato 4,4',4''-(1,5,5'-[carbonil-bis]imino(1,5,5-trimetil-3,1-ciclohexanodil)metileno) -2,4,6-trioxo-1,3,5(2H,4H,6H)-triazin-1,1',3,3'-tetrail tetraquis(metileno(3,5,5-trimetil-3,1-ciclohexanodil)imino-carboniloxi-2,1-etanodil(etil)-amino) tetraquis-benzenodiazólio tetra bis(2-metilpropil)naftalenossulfonato		417-080-1	-	E; R2 R43 N; R50-53	E; Xi; N R: 2-43-50/53 S: (2-)24-35-37-60-61		
607-450-00-2	isopropoxiiminoacetato de 2-mercaptobenzotiazolil-(Z)-(2-aminotiazol-4-il)-2-(tert-butoxicarbonilo)		419-040-9	89604-92-2	R 53	R: 53 S: 61		
607-451-00-8	ácido 4-[4-amino-5-hidroxi-3-(4-(2-sulfoxi)etil)fenilazo]-		417-640-5	161935-19-9	Xi; R41 R43	Xi R: 41-43		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
	2,7-dissulfonaft-6-ilazolo-6-[3-(4-amino-5-hidroxi-3-(4-(2-sulfoxietilsulfonil)-fenilazo)-2,7-dissulfonaft-6-ilazolo]-fenilcarbonilamino]-benzenossulfónico, sal de sódio					S: (2-)22-24-26-37/39		
607-453-00-9	bis(2,2-dimetiloctanoato) de 4-benzil-2,6-di-hidroxi-4-aza-heptileno		418-100-1	172964-15-7	R 43 R 53	Xi R: 43-53 S: (2-)24-37-61		
607-454-00-4	Mistura de: ácido trans-2-(1-metiletil)-1,3-dioxano-5-carboxílico; ácido cis-2-(1-metiletil)-1,3-dioxano-5-carboxílico		418-170-3	-	Xi; R41 R52-53	Xi R: 41-52/53 S: (2-)25-26-39-61		
607-455-00-X	ácido 1-amino-4-(3-[4-cloro-6-(2,5-dissulfonilamino)-1,3,5-triazin-2-ilamino]-2,2-dimetil-propilamino)-antraquinona-2-sulfónico, sal de sódio/lítio		419-520-8	172890-93-6	R 43	Xi R: 43 S: (2-)22-24-37		
607-456-00-5	ácido 3-amino-4-clorobenzoico, éster hexadecílico		419-700-6	143269-74-3	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
607-457-00-0	di-hidrogeno-1,1"-di-hidroxi-8,8"-[p-fenilbis(amino-[6-[4-(2-aminoetil)piperazin-1-il]-1,3,5-triazin-4,2-dilimino)]bis(2,2'-azonaftaleno-1',3,6-trissulfonato) de tetrassódio		420-350-1	172277-97-3	Xi; R41 N; R51-53	Xi; N R: 41-51/53 S: (2-)26-39-61		
607-458-00-6	Mistura de: 2-etil-1,2,6-dibromo-4-[1-[3,5-dibromo-4-(2-hidroxietoxi)fenil]-1-metiletil]fenoxi propenoato dipropenoato de 2,2'-dietil-[4,4'-bis(2,6-dibromofenoxi)-1-metiletilideno] 2,2'-(1-metiletilideno)bis[2,6-dibromo-4,1-fenileno]oxi etanol		420-850-1	-	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
607-459-00-1	4-[2-[5-ciano-1,2,3,6-tetra-hidro-1-(2-isopropoxietoxi-carbonilmetil)-4-metil-2,6-dioxo-3-piridilideno]hidrazino]benzoato de isopentilo		418-930-4	-	R 53	R: 53 S: 61		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
607-460-00-7	9-octadecenoato de 3-trideciloisopropilamónio		418-990-1	-	Xn; R48/22 Xi; R36/38 N; R50-53	Xn; N R: 36/38-48/22-50/53 S: (2)-23-26-37/39-60-61		
607-461-00-2	Mistura de: 2-[4-{3-metil-4-[6-sulfonato-4-(2-sulfonato-fenilazo)-naftalen-1-ilazo]-fenilamino}-6-[3-(2-sulfato-etanosulfoni)-fenilamino]-1,3,5-triazin-2-ilamino]-benzeno-1,4-dissulfonato de pentassódio 2-[4-{3-metil-4-[7-sulfonato-4-(2-sulfonato-fenilazo)-naftalen-1-ilazo]-fenilamino}-6-[3-(2-sulfato-etanosulfoni)-fenilamino]-1,3,5-triazin-2-ilamino]-benzeno-1,4-dissulfonato de pentassódio		421-160-1	-	R 52-53	R: 52/53 S: 61		
607-462-00-8	Mistura de: acetato de 1-hexilo acetato de 2-metil-1-pentilo acetato de 3-metil-1-pentilo acetato de 4-metil-1-pentilo misturas de outros acetatos de alquilo(C6) lineares e ramificados		421-230-1	88230-35-7	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
607-463-00-3	ácido 3-(fenotiazin-10-il)propiónico		421-260-5	362-03-8	N; R51-53	N R: 51/53 S: 24/25-61		
607-464-00-9	Mistura de: ácido 7-cloro-1-etil-6-fluoro-1,4-di-hidro-4-oxo-quinolina-3-carboxílico ácido 5-cloro-1-etil-6-fluoro-1,4-di-hidro-4-oxo-quinolina-3-carboxílico		421-280-4	68077-26-9	R 52-53	R: 52/53 S: 61		
607-465-00-4	7-[4-[4-(2-cianoamino-4-hidroxi-6-oxidopirimidin-5-ilazo)benzamido]-2-etoxifenilazo]naftaleno-1,3-dissulfonato de tris(2-hidroxietil)amónio		421-440-3	-	R 52-53	R: 52/53 S: 61		
607-466-00-X	Mistura de: 1-(1-[2-cloro-5-(hexadeciloxycarbonil)fenil]carbamol)-3,3-dimetil-2-oxobutyl)-1H-2,3,3a,7a-tetra-hidrobenzotriazol-		421-480-1	-	N; R51-53	N R: 51/53 S: 37/39-61		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
607-467-00-5	5-carboxilato de fenilo 2-(1-(2-cloro-5-(hexadeciloxycarbomil)fenilcarbamoi)-3,3-dimetil-2-oxobutil)-1H-2,3,3a,7a-tetra-hidrobenzotriazol-5-carboxilato de fenilo 3-(1-(2-cloro-5-(hexadeciloxycarbomil)fenilcarbamoi)-3,3-dimetil-2-oxobutil)-1H-2,3,3a,7a-tetra-hidrobenzotriazol-5-carboxilato de fenilo		419-430-9	56533-00-7	Xn: R21/22-48/22 C; R34 N; R50-53	C; N R: 21/22-34-48/22-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61		
607-468-00-0	1,3-Di-estanoxidicaprilato de 1,1,3,3-tetrabutilo		419-450-8	-	R43	Xi R: 43 S: (2-)22-24-37		
607-469-00-6	Mistura dos sais monossódico do ácido 4-((4-(5-sulfonato-2-metoxifenilamino)-6-cloro-1,3,5-triazina-2-il)amino)-2-((1,4-dimetil-6-oxido-2-oxo-5-sulfonatometil)-1,2-dihidropiridina-3-il)azo)benzenossulfónico dissódico do ácido 4-((4-(5-sulfonato-2-metoxifenilamino)-6-cloro-1,3,5-triazina-2-il)amino)-2-((1,4-dimetil-6-oxido-2-oxo-5-sulfonatometil)-1,2-dihidropiridina-3-il)azo)benzenossulfónico		419-460-2	120029-06-3	R52-53	R: 52/53		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
607-470-00-1	triazina-2-ilamino)-4-hidroxi-3-(4-(4-sulfonatonfenilazo)fenilazo)-2-naftalenossulfonato dissódico		414-100-0		Xi; R41 R52-53	Xi R: 41-52/53 S: (2-)39-22-26-61		
607-472-00-2	6,1,3-Dicloro-3,10-bis[2-[4-[3-(2-hydroxisulfonil)oxetanosulfonil]fenilamino]-6-(2,5-dissulfonatonfenilamino)-1,3,5-triazin-2-ilamino]etilamino]benzol[5,6][1,4-loxazino]2,3-b)fenoxazina-4,11-dissulfonato de potássio e sódio		400-660-3	111687-36-6	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
607-474-00-3	ácido (4-(4-(4-dimetilaminobenzilideno-1-il)-3-metil-5-oxo-2-pirazolina-1-il)benzóico		410-430-4	117573-89-4	R53	R: 53 S: 61		
607-475-00-9	Mistura (50/50) de: 7-(4-[4-cloro-6-ilmetil-(3-sulfonatonfenil)amino]-1,3,5-triazina-2-ilamino]-2-ureidofenilazo)naftaleno-1,3,6-trissulfonato de tetrassódio 7-(4-[4-cloro-6-ilmetil-(4-sulfonatonfenil)amino]-1,3,5-triazina-2-ilamino]-2-ureidofenilazo)naftaleno-1,3,6-trissulfonato de tetrassódio		412-940-2	148878-18-6	R43	Xi R: 43 S: (2-)22-24-37		
607-476-00-4	N,N-bis(carboximetil)-β-alanina de trissódio		414-070-9	129050-62-0	C; R34 R52-53	C R: 34-52/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61		
607-478-00-5	ftalato de tetrametilammonio e hidrogeno		416-900-5	79723-02-7	T; R25 Xn; R48/22 N; R50	T; N R: 25-48/22-50 S: (1/2-)25-36-45-61		
607-479-00-0	4-cloro-3-[2-(5,5-dimetil-2,4-dioxo-1,3-oxazolidin-3-il)-4,4-dimetil-3-oxopentamido]benzoato de hexadecilo		418-550-9	168689-49-4	R53	R: 53 S: 61		
607-480-00-6	Ésteres dialquílicos (C7-11), ramificados e lineares, de ácido		271-084-6	68515-42-4	Repr. Cat. 2; R61 Repr. Cat. 3; R62	T R: 61-62		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
	1,2-benzenodicarboxílico					S: 53-45		
607-487-00-4	Mistura de: 4-(3-etoxicarbonil-4-(5-(3-etoxicarbonil-5-hidroxi-1-(4-sulfonatofenil)pirazol-4-il)pent-2,4-dienilideno)-4,5-dihidro-5-oxopirazol-1-il)benzenossulfonato de dissódio 4-(3-etoxicarbonil-4-(5-(3-etoxicarbonil-5-óxido-1-(4-sulfonatofenil)pirazol-4-il)pent-2,4-dienilideno)-4,5-dihidro-5-oxopirazol-1-il)benzenossulfonato de trissódio		402-660-9	-	Repr.Cat.2; R61 R52-53	T R: 61-52/53 S: 53-45-61		
607-488-00-X	(2-acetilamino-5-fluoro-4-isotiocianatofenoxi)acetato de etilo		414-210-9	147379-38-2	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
607-489-00-5	Mistura de: linolenato, linoleato e oleato de 2-etilhexilo epoxi oleato de 2-etilhexilo diepoxi linoleato de 2-etilhexilo triepoxi linolenato de 2-etilhexilo		414-890-7	71302-79-9	R43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		
607-490-00-0	glicinato de N-[2-hidroxi-3-(C12-16-alkilooxi)propil]-N-metilo		415-060-7	-	Xi; R41 R43	Xi R: 41-43 S: (2-)24-26-37/39		
607-492-00-1	propanoato de 2-(1-(3,3'-dimetil-1'-ciclohexil)etoxi)-2-metilo e propilo		415-490-5	141773-73-1	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
607-493-00-7	(3aR,4R,7aR)-2-metil-4-(1S,2R,3-triacetoxipropil)-3a,7a-dihidro-4H-pirano[3,4-d]oxazole-6-carboxilato de metilo		415-670-3	78850-37-0	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		
607-494-00-2	octilfosfonato de bis(2-etil-hexilo)		417-170-0	52894-02-7	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
607-495-00-8	4-sulfonil-6-((1-oxonil)amino)hexanoato de sódio		417-550-6	168151-92-6	R43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		
607-496-00-3	fosfito de 2,2'-merftenobis(4,6-di-tert-butil-fenil)-2-etilhexilo		418-310-3	126050-54-2	R53	R: 53 S: 61		
607-497-00-9	isosteatoato de óxido de cerio		419-760-3	-	R53			

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
607-498-00-4	hexadecanoato de (E)-3,7-dimetil-2,6-octadienilo		421-370-3	3681-73-0	Xi; R38 R53	R: 53 S: 61		
607-499-00-X	1,2-etanodiol-bis(2-hexadecenilsuccinato) de bis(dimetil-(2-hidroxietil)amónio)		421-660-1	-	Xi; R41 R43 N; R51-53	Xi; N R: 41-43-51/53 S: (2-)24-26-37/39-61		
607-500-00-3	2,2-bis[(5-tetrapropileno-2-hidroxi)fenil]etanoato de cálcio		421-670-4	-	Xi; R38 N; R50-53	Xi; N R: 38-50/53 S: (2-)37-60-61		
607-501-00-9	Mistura de: tiofosfato de trifênilo e derivados terciários de fenilo butilado		421-820-9	-	R53	R: 53 S: 61		
607-502-00-4	4-dodecylbenzenossulfonato de (N-benzil-N,N,tributyl)amónio		422-200-0	-	C; R34 Xn; R22 N; R51-53	C; N R: 22-34-51/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61		
607-503-00-X	2,4,6-tri-n-propil-2,4,6-trioxo-1,3,5,2,4,6-trioxatrisforinano		422-210-5	68957-94-8	C; R34	C R: 34 S: (1/2-)26-36/37/39-45		
607-505-00-0	7-(4-(4-(5-amino-4-sulfonato-2-(4-(2-(sulfonato-etoxi)sulfoni)fenilazo)fenilamino)-6-cloro-1,3,5-triazin-2-il)amino-2-ureidofenilazo)naftaleno-1,3,6-trissulfonatoftaleno-1,3,6-trissulfonato de pentassódio		422-930-1	171599-84-1	R52-53	R: 52/53 S: 22-61		
607-506-00-6	Mistura de: (4-cloro-2-(4,5-dihidro-3-metil-5-oxo-1-(3-sulfonatofenil)-1H-pirazole-4-il)azo)-5-metil)benzenossulfonato de éstroncio (4-cloro-2-(4,5-dihidro-3-metil-5-oxo-1-(3-sulfonatofenil)-1H-pirazole-4-il)azo)-5-metil)benzenossulfonato de díssódio		422-970-8	136248-04-9	N; R51-53	N R: 51/53 S: 22-61		
607-507-00-1	2,4-diamino-3-[4-(2-sulfonatoetoxi)sulfoni]fenilazo]-5-[4-(2-sulfonatoetoxi)sulfoni]-2-sulfonatofenilazo]-benzenossulfonato de		422-980-2	187026-95-5	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)22-26-39		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
	potássio/sódio							
607-508-00-7	3,3'-[iminobis(sulfonil-4,1-fenileno-(5-hidroxi-3-metilpirazol-1,4-dil)azo-4,1-fenileno)sulfonilimino-(4-amino-6-hidroxipirimidina-2,5-dil)azo-4,1-fenileno)sulfonilimino(4-amino-6-hidroxipirimidina-2,5-dil)azo]bis(benzenossulfonato)] de dissódio		423-110-4	-	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)22-26-39		
607-512-00-9	2,4-diamino-3,5-bis-[4-(2-sulfonatoetoxi)sulfoni]fenilazo]benzenossulfonato de trissódio		423-970-0	182926-43-8	R52-53	R: 52/53 S: 22-61		
607-513-00-4	Mistura de: 4-Benzoilamino-6-(6-etenossulfonil-1-sulfato-naftalen-2-ilazo)-5-hidroxi-naftaleno-2,7-dissulfonato trissódico 5-Benzoilamino-4-hidroxi-3-((1-sulfo-6-(2-(sulfoxi)etil)sulfonil)-2-naftil)azo)naftaleno-2,7-dissulfonato sódico Ácido 5-benzoilamino-4-hidroxi-3-((1-sulfo-6-(2-(sulfoxi)etil)sulfonil)-2-naftil)azo)naftaleno-2,7-dissulfónico		423-200-3	-	Xi; R41 R43 R52-53	Xi R: 41-43-52/53 S: 22-26-36/37/39-61		
607-515-00-5	Mistura de: Dissulfonato dissódico do éter hexidifenílico Dissulfonato dissódico do éter dihexidifenílico		429-650-7	147732-60-3	Xi; R36 N; R51-53	Xi; N R: 36-51/53 S: (2-)26-61		
607-516-00-0	N,N'-bis(trifluoroacetil)-S,S'-bis-L-homocisteína		429-670-6	105996-54-1	Xi; R41 R43	Xi R: 41-43 S: (2-)24-26-37/39		
607-517-00-6	Ácido (S)- α -(acetilil)benzenopropânico		430-300-0	76932-17-7	Xn; R22 Xi; R41 R43	Xn R: 22-41-43 S: (2-)22-26-36/37/39		
607-526-00-5	cartape		-	15263-53-3	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
607-527-00-0	Mistura de: dodecanodicoato de 1-		423-180-6	-	Xn; R48/22	Xn		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
	(1°H,1°H,2°H,2°H-tridecafluorooctil) 12-tridecafluorooctil) 12-(1°H,1°H,2°H,2°H-tridecafluorooctil) dodecanodioato de 1-(1°H,1°H,2°H,2°H-tridecafluorooctil) 12-(1°H,1°H,2°H,2°H-heptadecafluorododecilo) dodecanodioato de 1-(1°H,1°H,2°H,2°H-tridecafluorooctil) 12-(1°H,1°H,2°H,2°H-heicosafluorododecilo) dodecanodioato de 1-(1°H,1°H,2°H,2°H-tridecafluorooctil) 12-(1°H,1°H,2°H,2°H-pentacosafuorotetradecilo) dodecanodioato de 1-(1°H,1°H,2°H,2°H-heptadecafluorododecilo) 12-(1°H,1°H,2°H,2°H-heptadecafluorododecilo) 12-(1°H,1°H,2°H,2°H-heicosafluorododecilo)					R: 48/22 S: (2-)36		
608-031-00-7	2-benzil-2-metil-3-butenonitrilo		407-870-4	97384-48-0	Xn; R22 R 52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2-)61		
608-033-00-8	N-butil-3-(2-cloro-4-nitrofenilhidrazono)-1-ciano-2-metilprop-1-eno-1,3-dicarboximida		407-970-8	75511-91-0	R 43 R 52-53	Xi R: 43-52/53 S: (2-)24-37-61		
608-034-00-3	Clorfenapir 4-Bromo-2-(4-clorofenil)-1-etoximetil-5-trifluorometilpirrol-3-carbonitrilo		-	122453-73-0	T; R23 Xn; R22 N; R50-53	T; N R: 22-23-50/53 S: (1/2-)13-36/37-45-60-61		
608-035-00-9	(+/-)-α-[(2-acetil-5-metilfenil)amino]-2,6-diclorobenzeno-acetonitrilo		419-290-9	-	R43 R53	Xi R: 43-53 S: (2-)24-37-61		
608-036-00-4	3-(2-[4-[2-(4-		419-060-8	79026-02-1	R 53			

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
	Cianofenil vinil fenil vinil benzo nitrilo					R: 53 S: 61		
608-037-00-X	Mistura de: (E)-2,12-tridecadienonitrilo (E)-3,12-tridecadienonitrilo (Z)-3,12-tridecadienonitrilo		422-190-8	124071-40-5	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
608-038-00-5	2,2,4-trimetil-4-fenilbutanitrilo		422-580-8	75490-39-0	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2-)61		
608-039-00-0	2-fenil-hexanonitrilo		423-460-8	3508-98-3	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)23-60-61		
608-040-00-6	4,4'-ditiobis(5-amino-1-(2,6-dicloro-4-(trifluorometil)fenil)-1H-pirazol-3-carbonitrilo)		423-490-1	130755-46-3	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
608-041-00-1	4'-(2-butil-4-oxo-1,3-diazapiról[4,4]non-1-en-3-il)metil(1,1'-bifenil)-2-carbonitrilo		423-500-4	138401-24-8	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
608-043-00-2	3-(cis-3-hexeniloxi)propanonitrilo		415-220-6	142653-61-0	T; R23 Xn; R22 N; R50-53	T; N R: 22-23-50/53 S: (1/2-)13-36/37-45-60-61		
609-064-00-X	mesotriona		-	104206-82-8	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
609-066-00-0	3-Amino-10-[4-(10-amino-6,13-dicloro-4,11-dissulfonatobenzol[5,6]1,4]oxazino[2,3-b]fenoxazina-3-ilamino)-6-metil(2-sulfonatoetil)amino]-1,3,5-triazin-2-ilamino]-6,13-diclorobenzol[5,6]1,4]oxazino[2,3-b]fenoxazina-4,11-dissulfonato de lítio e sódio		418-870-9	154212-58-5	Xn; R20/21/22-68/20/21/22	Xn R: 20/21/22-68/20/21/22 S: (2-)36/37		
609-067-00-6	4-(3-aminopropilamino)-2,6-bis[3-(4-metoxi-2-sulfonilazolo)-4-hidroxi-2-sulfo-7-naftilamino]-1,3,5-triazin de sódio e potássio		416-280-6	156769-97-0	R 43	Xi R: 43 S: (2-)22-24-37		
609-068-00-1	Almíscar de xileno 5- <i>tert</i> -butil-2,4,6-trinitro- <i>m</i> -xileno		201-329-4	81-15-2	Carc. Cat. 3; R40 E; R2 N; R50-53	E; Xn; N R: 2-40-50/53 S: (2-)36/37-46-60-61		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
609-070-00-2	1,4-dicloro-2-(1,1,2,3,3,3-hexafluorpropoxi)-5-nitrobenzeno		415-580-4	130841-23-5	Xn; R22 R 43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)36/37/39-60-61		
609-071-00-8	Mistura de: 2-metilsulfanil-4,6-bis(2-hidroxi-4-metoxi-fenil)-1,3,5-triazin 2-(4,6-bis-metilsulfanil-1,3,5-triazin-2-il)-5-metoxifenol		423-520-3	156137-33-6	R43	Xi R: 43 S: (2-)22-24-37		
611-099-00-0	dicloreto de (metilenobis(4,1-fenilenazo(1-(3-(dimetilamino)propil)-1,2-dihidro-6-hidroxi-4-metil-2-oxopiridina-5,3-diiil)))-1,1'-dipiridínio, dicloridrato		401-500-5	-	Carc. Cat.2; R45 N; R51-53	T; N R: 45-51/53 S: 53-45-61		
611-100-00-4	3,3'-(3(ou4)-metil-1,2-fenilenobis(imino(6-cloro)-1,3,5-triazina-4,2-dilimino(2-acetamido-5-metoxi)-4,1-fenilenazo)dinaftaleno-1,5-dissulfonato de potássio e sódio		403-810-6	140876-13-7	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		
611-101-00-X	2'-(4-cloro-3-ciano-5-formil-2-tienil)azo-5'-dietilaminoacetamida		405-200-5	104366-25-8	R43	Xi R: 43 S: (2-)22-24-37		
611-103-00-0	(1-(3-carboxilato-2-óxido-5-sulfonato)fenilazo)-5-hidroxi-7-sulfonatoaftaleno-2-amido)niquel(II) de trissódio		407-110-1	-	Xi; R41 R 43 N; R51-53	Xi; N R: 41-43-51/53 S: (2-)24-26-37/39-61		
611-104-00-6	Mistura de: (2,4(ou 2,6 ou 4,6)-bis(3,5-dinitro-2-oxidofenilazo)-5-hidroxi)fenolato(2(ou 4 ou 6)-(3,5-dinitro-2-oxidofenilazo)-5-hidroxi-4(ou 2 ou 6)-(4-(4-nitro-2-sulfonatoamino)fenilazo)fenolato)fertrato(1-) de trissódio bis(2,4(ou 2,6 ou 4,6)-bis(3,5-dinitro-2-oxidofenilazo)-5-hidroxi)fenolato)fertrato(1-) de trissódio (2,4(ou 2,6 ou 4,6)-bis(3,5-dinitro-2-oxidofenilazo)-5-		406-870-1	-	R 43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
	hidroxifenolato)(2 ou 4 ou 6)-(3,5-dinitro-2-óxido)fenilazo)-5-hidroxi-4-(ou 2 ou 6)-(4-nitro-2-sulfonato)fenilazo)fenolato)ferrato (1-) de trissódio (2,4)(ou 2,6 ou 4,6)-bis(3,5-dinitro-2-óxido)fenilazo)-5-hidroxi)fenolato)(2 ou 4 ou 6)-(3,5-dinitro-2-óxido)fenilazo)-5-hidroxi-4-(ou 2 ou 6)-(3-sulfonato)fenilazo)fenolato)ferrato (1-) de trissódio 3,3'-(2,4-dihidroxi-1,3)(ou 1,5 ou 3,5)-fenilendiazo)dibenzenossulfonato de dissódio		407-800-2	136213-75-7	R 43 N; R5 1-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)22-24-37-61		
611-105-00-1	4-(4-cloro-6-(N-etilamino)-1,3,5-triazina-2-ilamino)-2-(1-(2-clorofenil)-5-hidroxi-3-metil-1H-pirazolo-4-ilazo)benzenossulfonato de sodio		410-180-6	-	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		
611-106-00-7	4,4'-dihidroxi-3,3'-bis[2-sulfonato-4-(4-sulfonato)fenilazo)fenilazo]-7,7'[p-fenilenobis(imino(6-cloro-1,3,5-triazin-4,2-dil)imino)]dinaftaleno-2-sulfonato de hexassódio		412-490-7	-	R 43	Xi R: 43 S: (2-)22-24-37		
611-107-00-2	4-(4-cloro-6-(3,6-dissulfonato-7-(5,8-dissulfonato-naftaleno-2-ilazo)-8-hidroxi-naftaleno-1-ilamino)-1,3,5-triazin-2-ilamino)-5-hidroxi-6-(4-(2-sulfatoetanossulfoni)-fenilazo)-naftaleno-1,7-dissulfonato de potássio e sódio		413-600-6	6527-62-4	R 52-53	R: 52/53 S: 61		
611-108-00-8	5-((4-(4-cloro-3-sulfonato)fenilazo)-1-naftil)azo)-8-(fenilamino)-1-naftalenossulfonato de dissódio		407-710-3	-	N; R5 1-53	N R: 51/53 S: 61		
611-109-00-3	Produtos da reação de: sulfato de cobre(II) e 2,4-bis(6-(2-metoxi-5-sulfonato)fenilazo)-5-hidroxi-7-							

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
611-110-00-9	sulfonato-2-naftilamino]-6-(2-hidroxi-etilamino)-1,3,5-triazina de tetrassódio (2:1)		408-210-8	124605-82-9	R 43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-28-37-61		
611-111-00-4	2-[1-(4-(2-cloroetil) sulfoni)fenil]-[2-hidroxi-5-sulfo-3-[3-(2-(2-(sulfoxi)etil) sulfoni)etil]azo]-4-sulfo]benzoato(3-)cuprato(1-) de dissódio		414-230-8	-	R 43	Xi R: 43 S: (2-)22-24-37		
611-112-00-X	4-hidroxi-5-[4-[3-(2-sulfatoetansulfoni)fenilamino]-6-morfolina-4-il-1,3,5-triazina-2-ilamino]-3-(1-sulfonato)naftaleno-2-ilazo)naftaleno-2,7-dissulfonato de tetrassódio		413-070-6	-	R 43	Xi R: 43 S: (2-)22-24-37		
611-113-00-5	(2-(((5-(2,5-diclorofenil)azo)-2-hidroxi)fenil)metileno)amino)benzoato(2-))(2-(4,5-di-hidro-3-metil-5-oxo-1-fenil-1H-pirazol-4-il)azo)-5-sulfo]benzoato(3-) cromato(2-) de lítio e sódio		414-280-0	149626-00-6	N; R51-53	N R: 51/53 S: 24/25-61		
611-114-00-0	(4-((5-cloro-2-hidroxi)fenil)azo)-2,4-di-hidro-5-metil-3H-pirazol-3-onato(2-))(3-((4,5-di-hidro-3-metil-1-(4-metil)fenil)-5-oxo-1H-pirazol-4-il)azo)-4-hidroxi-5-nitro]benzenosulfonato(3-) cromato(2-) de lítio e sódio		414-250-7	149564-66-9	Xn; R22 Xi; R41 R 52-53	Xn R: 22-41-52/53 S: (2-)22-26-39-61		
611-115-00-6	bis(4-(4-(di)etilamino)-2-hidroxi)fenil)azo)-3-hidroxi-1-naftalenosulfonato(3-) cromato(3-) de trilitio		414-290-5	149564-65-8	Xn; R22 R 52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2-)22-61		
611-116-00-1	Mistura de: 5-[4-(4-cloro-6-[2-(2,6-dicloro-5-cianopirimidin-4-ilamino)-propilamino]-1,3,5-triazin-2-ilamino)-4-hidroxi-3-(1-sulfonato)naftaleno-2-ilazo)-naftaleno-2,7-dissulfonato de		414-620-8	-	Xi; R41 R 43	Xi R: 41-43 S: (2-)22-24-26-37/39		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
611-117-00-7	trissódio 5-[4-cloro-6-[2-(2,6-dicloro-5-cianopirimidin-4-ilamino)-1-metil-etilamino]-1,3,5-triazin-2-ilamino]-4-hidroxi-3-(1-sulfonato-naftaleno-2-ilazo)-naftaleno-2,7-dissulfonato de trissódio 5-[4-cloro-6-[2-(4,6-dicloro-5-cianopirimidin-2-ilamino)-propilamino]-1,3,5-triazin-2-ilamino]-4-hidroxi-3-(1-sulfonato-naftaleno-2-ilazo)-naftaleno-2,7-dissulfonato de trissódio 5-[4-cloro-6-[2-(4,6-dicloro-5-cianopirimidin-2-ilamino)-1-metil-etilamino]-1,3,5-triazin-2-ilamino]-4-hidroxi-3-(1-sulfonato-naftaleno-2-ilazo)-naftaleno-2,7-dissulfonato de trissódio		415-100-3	149850-29-3	R 43	Xi R: 43 S: (2-)22-24-37		
611-118-00-2	1,3-bis[4-[4-(4-(4-sulfenilazo)-2-sulfenilazo]-2-ureído)-fenilamino]-6-fluoro-1,3,5-triazin-2-ilamino]-propano, sal de lítio e sódio		413-990-8	149850-31-7	R 43	Xi R: 43 S: (2-)22-24-37		
611-119-00-8	4-[4-cloro-6-(4-metil-2-sulfenilamino)-1,3,5-triazin-2-ilamino]-6-(4,5-dimetil-2-sulfenilazo)-5-hidroxi-naftaleno-2,7-dissulfonato de tetrassódio		415-400-4	148878-22-2	Xi; R41 R 43	Xi R: 41-43 S: (2-)22-24-26-37/39		
611-120-00-3	ácido 5-[4-[5-amino-2-[4-(2-sulfoxetil-sulfonil)fenilazo]-4-sulfo-fenilamino]-6-cloro-1,3,5-triazin-2-ilamino]-4-hidroxi-3-(1-sulfonaftalen-2-ilazo)-naftaleno-2,7-dissulfónico, sal de sódio		418-340-7	157707-94-3	Xi; R41 R 52-53	Xi R: 41-52/53 S: (2-)22-26-39-61		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
611-121-00-9	Componente principal 6 (isómero): assim. 1:2 crómio(III)-complexo: A: ácido 3-hidroxi-4-(2-hidroxi-naftaleno-1-ilazo)-naftaleno-1-sulfónico, sal de sódio e B: 1-[2-hidroxi-5-(4-metoxi-fenilazo)-fenilazo]-naftaleno-2-ol Componente principal 8 (isómero): assim. 1:2 crómio-complexo: A: ácido 3-hidroxi-4-(2-hidroxi-naftaleno-1-ilazo)-naftaleno-1-sulfónico, sal de sódio e B: 1-[2-hidroxi-5-(4-metoxi-fenilazo)-fenilazo]-naftaleno-2-ol		417-280-9	30785-74-1	Xi; R41 N; R50-53	Xi; N R: 41-50/53 S: (2-)26-39-60-61		
611-122-00-4	(di)N-(3-(4-[5-(5-amino-3-metil-1-fenilpirazol-4-il-azo)-2,4-dissulfo-anilino]-6-cloro-1,3,5-triazin-2-ilamino)fenil)-sulfamoil(dissulfo)-ftalocianinato)níquel de hexassódio		417-250-5	151436-99-6	Xi; R41 R 43	Xi R: 41-43 S: (2-)22-24-26-37/39		
611-123-00-X	lactato de 3-(2,4-bis(4-(5-(4,6-bis(2-aminopropilamino)-1,3,5-triazin-2-ilamino)-4-hidroxi-2,7-dissulfonaftalen-3-il)azo)fenilamino)-1,3,5-triazin-6-ilamino)propil dietilamónio		424-310-4	178452-66-9	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		
611-124-00-5	Mistura de: 5-amino-3-(5-[4-cloro-6-[4-(2-sulfoxetoxissulfonato)fenilamino]-1,3,5-triazin-2-ilamino]-2-sulfonato)fenilazo)-6-[5-(2,3-dibromopropionilamino)-2-sulfonato]fenilazo]-4-hidroxi-naftaleno-2,7-dissulfonato de pentassódio 5-amino-6-[5-(2-bromoacrilolamino)-2-sulfonato]fenilazo]-3-(5-[4-cloro-6-[4-(2-sulfoxetoxissulfonato)fenilamino]-1,3,5-triazin-2-ilamino]-2-sulfonato)fenilazo)-4-hidroxi-naftaleno-2,7-dissulfonato		424-320-9	180778-23-8	Xi; R41 N; R51-53	Xi; N R: 41-51/53 S: (2-)26-39-61		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
	de pentassódio 5-amino-3-[5-[4-cloro-6-[4-(vinilsulfonil)fenilamino]-1,3,5-triazin-2-ilamino]-2-sulfonato]fenilazol-6-[5-(2,3-dibromopropionilamino)-2-sulfonato]fenilazol-4-hidroxi naftaleno-2,7-dissulfonato de tetrassódio							
611-125-00-0	Mistura de: complexo de cobre (II) do sal de dissódio do ácido 4-((8-oxido-7-(2-oxido-4-etenilsulfonil)-5-(metoxifenil)azo)-6-sulfonato)naftalen-2-ilazo)-5-oxo-1-(4-sulfatofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxílico complexo de cobre (II) do sal de dissódio do ácido 4-((8-oxido-7-(2-oxido-4-(2-hidroxiethylsulfonil)-5-(metoxifenil)azo)-6-sulfonato)naftalen-2-ilazo)-5-oxo-1-(4-sulfatofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxílico		423-940-7	-	Xi; R41 N; R51-53	Xi; N R: 41-51/53 S: (2-)26-39-61		
611-126-00-6	2,6-bis(2-(4-(4-amino-fenilamino)-fenilazo)-1,3-dimetil-3H-imidazólio)-4-dimetilamino-1,3,5-triazin, dicloreto		424-120-1	174514-06-8	Xi; R41 N; R50-53	Xi; N R: 41-50/53 S: (2-)26-39-60-61		
611-127-00-1	4-amino-6-(5-(4-(2-etilfenilamino)-6-(2-sulfatoetanossulfonil)-1,3,5-triazin-2-ilamino)-2-sulfonato]fenilazo)-5-hidroxi-3-(4-(2-sulfatoetanossulfonil)fenilazo)naftaleno-2,7-dissulfonato de pentassódio		423-790-2	-	R 5 Xi; R41 R 43 R 52-53	Xi R: 5-41-43-52/53 S: (2-)22-26-36/37/39-41-61		
611-128-00-7	N,N'-bis[6-cloro-4-[6-(4-vinilsulfonil)fenilazo]-2,7-(ácido dissulfónico)-5-hidroxi naft-4-ilamino]-1,3,5-triazin-2-il)-N-(2-hidroxiethyl)etano-1,2-diamina, sal de sódio		419-500-9	171599-85-2	Xi; R41 R 43	Xi R: 41-43 S: (2-)22-24-26-37/39		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
611-129-00-2	Mistura de: ácido 5-[4-(7-amino-1-hidroxi-3-sulfo-2-naftil)azo]-2,5-dietoxifenil)azo]-2-[(3-fosfonofenil)azo]benzóico ácido 5-[4-(7-amino-1-hidroxi-3-sulfo-2-naftil)azo]-2,5-dietoxifenil)azo]-3-[(3-fosfonofenil)azo]benzóico		418-230-9	163879-69-4	E; R2 Repr. Cat. 3; R62 Xn; R48/22 R 43 N; R51-53	E; Xn; N R: 2-43-48/22-62-51/53 S: (2-)26-35-36/37-61		
611-130-00-8	2-[6-(7-(2-carboxil-ato-fenilazo)-8-hidroxi-3,6-dissulfonato-1-naftilamino)-4-hidroxi-1,3,5-triazin-2-ilamino] benzoato de tetramónio		418-520-5	183130-96-3	Xi; R36 N; R50-53	Xi; N R: 36-50/53 S: (2-)26-39-60-61		
611-131-00-3	2-[2-hidroxi-3-(2-clorofenil)carbamoil-1-naftilazo]-7-[2-hidroxi-3-(3-metilfenil)carbamoil-1-naftilazo]fluoreno-9-ona		420-580-2	-	Repr. Cat. 2; R61 R 53	T R: 61-53 S: 53-45-61		
611-132-00-9	bis[7-[4-(1-butil-5-ciano-1,2-dihidro-2-hidroxi-4-metil-6-oxo-3-piridilazo)fenil]sulfonilamino]-5-nitro-3,3'-dissulfonatonaftaleno-2-azobenzeno-1,2'-diolato] cromato (III) de pentassódio		419-210-2	-	Xi; R41 R 52-53	Xi R: 41-52/53 S: (2-)26-39-61		
611-133-00-4	Produto-por-processo complexo de ferro de corantes azóicos obtidos por acoplamento com resorcina de uma mistura de 2-amino-1-hidroxi-benzeno-4-sulfamida diazotizada e 2-amino-1-hidroxi-benzeno-4-sulfonamida, sendo a mistura obtida subsequentemente submetida a uma segunda reacção de acoplamento com uma mistura de ácido 3-aminobenzeno-1-sulfónico diazotizado (ácido metanílico) e ácido 4-amino-4-nitro-1,1'-difenilamina-2-sulfónico e metalização com cloreto férrico, sal de sódio		419-260-5	-	Xi; R41 N; R51-53	Xi; N R: 41-51/53 S: (2-)26-39-61		
611-134-00-X	2-[α(2-hidroxi-3-[4-cloro-6-[4-(2,3-dibromopropionilamino)-2-		423-770-3	-	Xi; R41 N; R51-53	Xi; N R: 41-51/53		

	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
-3,5-					S: (2-)22-26-39-61		
ilideno- benzoato de cobre							
ácido 2- lazo]-5-		424-250-9	-	Xi; R41 R52-53	Xi R: 41-52/53 S: (2-)26-39-61		
benzenoss							
uída de ivado ondente, sio/sódio							
[4- etoxi-4-		424-260-3	-	Repr.Cat.3; R62 Xi; R41 N; R51-53	Xn; N R: 41-62-51/53 S: (2-)22-26-36/37/39-61		
o]-1,3,5-							
idecil- olo[5,1-c]-		419-870-1	159038-16-1	R 53	R: 53 S: 61		
-butil-1H- iazole		415-910-7	152828-25-6	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)22-24-37-61		
		-	68049-83-2	T; R48/22 Repr. Cat. 2; R61 Repr. Cat. 3; R62 N; R50-53	T; N R: 61-48/22-62-50/53 S: 53-45-60-61	C ≥ 0,025 %: N; R50/53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: N; R51/53 0,00025 % ≤ C < 0,0025 %: R52/53	
til-2'- enzofuran o]-3-ona		403-830-5	89331-94-2	R 52-53	R: 52/53 S: 61		
oxi)- ,N-		407-400-8	59493-72-0	Xi; R41 N; R50-53	Xi; N R: 41-50/53 S: (2-)26-39-60-61		
oxi-8-		406-770-8	149057-64-7	Xn; R48/22 Xi; R41	Xn; N R: 41-43-48/22-50/53		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
	ilideno(dimetilamónio)				R 43 N; R50-53	S: (2-)22-26-36/37/39-60-61		
612-187-00-1	2,3,4-trifluoroanilina		407-170-9	3862-73-5	Xn; R21/22-48/22 Xi; R38-41 N; R51-53	Xn; N R: 21/22-38-41-48/22-51/53 S: (2-)23-26-36/37/39-61		
612-188-00-7	4,4'-(9H-fluoreno-9-ilideno)bis(2-cloroanilina)		407-560-9	107934-68-9	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
612-189-00-2	4-amino-2-(aminometil)fenol cloridrato		412-510-4	135043-64-0	Xn; R22 R 43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)22-24-37-60-61		
612-190-00-8	4,4'-metilenobis(2-isopropil-6-metilanelina)		415-150-6	16298-38-7	Xn; R48/22 N; R51-53	Xn; N R: 48/22-51/53 S: (2-)36-61		
612-191-00-3	Polímero de cloridrato de allilamina		415-050-2	71550-12-4	Xn; R22 R 43	Xn R: 22-43 S: (2-)36/37		
612-192-00-9	2-isopropil-4-(N-metilaminometil)iazole		414-800-6	154212-60-9	Xn; R21/22 Xi; R38-41 N; R51-53	Xn; N R: 21/22-38-41-51/53 S: (2-)26-36/37/39-61		
612-193-00-4	3-metilaminometilfenilamina		414-570-7	18759-96-1	Xn; R21/22 C; R34 R 43 N; R50-53	C; N R: 21/22-34-43-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61		
612-194-00-X	cloreto de 2-hidroxi-3-[(2-hidroxietil)-12-(1-oxotetradecil)amino]etilamino-N,N,N-trimetil-1-propanamónio		414-670-0	141890-30-4	Xn; R22 Xi; R41 N; R50-53	Xn; N R: 22-41-50/53 S: (2-)26-39-60-61		
612-195-00-5	1,5-naftalenodissulfonato de bis[tributyl(4-metilbenzil)amónio]		415-210-1	-	Xn; R20/22 Xi; R41 N; R50-53	Xn; N R: 20/22-41-50/53 S: (2-)26-36/39-60-61		
612-196-00-0	4-cloro- <i>o</i> -toluidina [1] Cloridrato de 4-cloro- <i>o</i> -toluidina [2]	E	202-441-6 [1] 221-627-8 [2]	95-69-2 [1] 3165-93-3 [2]	Carc. Cat.2; R45 Muta. Cat.3; R68 T; R23/24/25 N; R50-53	T; N R: 45-23/24/25-68-50/53 S: 53-45-60-61		
612-197-00-6	2,4,5-trimetilanelina [1] Cloridrato de 2,4,5-trimetilanelina [2]	E	205-282-0 [1] - [2]	137-17-7 [1] 21436-97-5 [2]	Carc. Cat.2; R45 T; R23/24/25 N; R51-53	T; N R: 45-23/24/25-51/53 S: 53-45-61		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
612-198-00-1	4,4'-trodianilina e seus sais	E	205-370-9	139-65-1	Carc. Cat.2; R45 Xn; R22 N; R51-53	T; N R: 45-22-51/53 S: 53-45-61		
612-199-00-7	4,4'-oxidianilina e seus sais Éter <i>p</i> -aminofenílico	E	202-977-0	101-80-4	Carc. Cat.2; R45 Muta. Cat.2; R46 Repr. Cat.3; R62 T; R23/24/25 N; R51-53	T; N R: 45-46-23/24/25-62-51/53 S: 53-45-61		
612-200-00-0	2,4-diaminoanisole 4-Metoxi- <i>m</i> -fenilenediamina [1] Sulfato de 2,4-diaminoanisol [2]		210-406-1 [1] 254-323-9 [2]	615-05-4 [1] 39156-41-7 [2]	Carc. Cat.2; R45 Muta. Cat.3; R68 Xn; R22 N; R51-53	T; N R: 45-22-68-51/53 S: 53-45-61		
612-201-00-6	<i>N,N,N',N'</i> -Tetrametil-4,4'-metilenedianilina		202-959-2	101-61-1	Carc. Cat.2; R45 N; R50-53	T; N R: 45-50/53 S: 53-45-60-61		
612-202-00-1	3,4-dicloroanilina		202-448-4	95-76-1	T; R23/24/25 Xi; R41 R43 N; R50-53	T; N R: 23/24/25-41-43-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61		
612-204-00-2	Violeta básico C.1. nº 3 Clorato de 4-[4,4'-bis(dimetilamino)-benzidrideno]ciclohexa-2,5-dien-1-ilideno dimetilamónio		208-953-6	548-62-9	Carc. Cat.3; R40 Xn; R22 Xi; R41 N; R50-53	Xn; N R: 22-40-41-50/53 S: (2-)26-36/37/39-46-60-61		
612-205-00-8	Violeta básico C.1. nº 3 com teor de cetona de Michler não superior a 0,1% (n.º CE 202-027-5)	E	208-953-6	548-62-9	Carc. Cat.2; R45 Xn; R22 Xi; R41 N; R50-53	T; N R: 45-22-41-50/53 S: 53-45-60-61		
612-206-00-3	famoxadona 3-Anilino-5-metil-5-(4-fenoxifenil)-1,3-oxazolidina-2,4-diona		-	131807-57-3	Xn; R48/22 N; R50-53	Xn; N R: 48/22-50/53 S: (2-)46-60-61		
612-209-00-X	6-metoxi- <i>m</i> -toluidina <i>p</i> -cresidina	E	204-419-1	120-71-8	Carc. Cat.2; R45 Xn; R22	T R: 45-22 S: 53-45		
612-210-00-5	5-nitro- <i>o</i> -toluidina [1] Cloridrato de 5-nitro- <i>o</i> -toluidina [2]		202-765-8 [1] 256-960-8 [2]	99-55-8 [1] 51085-52-0 [2]	Carc. Cat.3; R40 T; R23/24/25 R52-53	T R: 23/24/25-40-52/53 S: (1/2-)36/37-45-61		
612-211-00-0	N-[(benzotriazol-1-il)metil]-4-		416-470-9	-	Xi; R36	Xi; N		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
	carboxibenzenossulfonamida				N; R51-53	R: 36-51/53 S: (2-)26-61		
612-212-00-6	2,6-dicloro-4-trifluorometilammina		416-430-0	24279-39-8	Xn; R20/22 Xi; R38 R43 N; R50-53	Xn; N R: 20/22-38-43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
612-213-00-1	isobutilideno-(2-(2-isopropil-4,4-dimetiloxazolidin-3-il)-1,1-dimetil)ammina		419-850-2	148348-13-4	C; R34 R52-53	C R: 34-52/53 S: (1/2-)23-26-36/37/39-45-61		
612-214-00-7	4-(2,2-difenil)etil)-N,N-difenilbenzenamina		421-390-2	89114-90-9	R 53	R: 53 S: 61		
612-215-00-2	3-cloro-2-(isopropil)ammina		421-700-6	179104-32-6	Xi; R38 N; R51-53	Xi; N R: 38-51/53 S: (2-)37-61		
612-217-00-3	1-metoxi-2-propilammina		422-550-4	37143-54-7	F; R11 C; R34 Xn; R22 R52-53	F; C R: 11-22-34-52/53 S: (1/2-)9-26-36/37/39-45-61		
613-181-00-1	5,5-dimetil-perhidro-pirimidin-2-ona α -(4-trifluorometil)etil)- α -(4-trifluorometil)cinnamildienohidrazona		405-090-9	67485-29-4	T; R48/25 Xn; R22 Xi; R36 N; R50-53	T; N R: 22-36-48/25-50/53 S: (1/2-)22-26-36/37-45-60-61		
613-182-00-7	cloreto de 1-(1-naftilmetil)quinolinio		406-220-7	65322-65-8	Carc. Cat.3; R40 Muta. Cat.3; R68 Xn; R22 Xi; R38-41 R 52-53	Xn R: 22-38-40-41-52/53-68 S: (2-)22-26-36/37/39-61		
613-183-00-2	Mistura de: 5-(N-metilperfluorocetilsulfonamido)metil-3-octadecil-1,3-oxazolidina-2-ona 5-(N-metilperfluorheptilsulfonamido)metil-3-octadecil-1,3-oxazolidina-2-ona		413-640-4	-	Xn; R48/22 N; R50-53	Xn; N R: 48/22-50/53 S: (2-)36-60-61		
613-184-00-8	2-etilhexanato de nitrilotrietilenoamóniopropano-2-ol		413-670-8	-	Xi; R36 R 43	Xi R: 36-43 S: (2-)24-26-37		
613-185-00-3	2,3,5,6-tetrahidro-2-metil-2H-		407-630-9	82633-79-2	T; R25	T; N		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
	ciclopental di-1,2-tiazolE-3-on				Xi; R41 R 43 N; R50-53	R: 25-41-43-50/53 S: (1/2-)22-26-36/37/39-45-60-61		
613-186-00-9	acetato de (2R,3R)-3-((R)-1-(tert-butildimetilsiloxi)etil)-4-oxazetidina-2-ilo		408-050-9	76855-69-1	Xi; R36 R 43 N; R51-53	R: 36-43-51/53 S: (2-)24-26-37-61		
613-188-00-X	1-(3-(4-flúorfenoxi)propil)-3-metoxi-4-piperidina		411-500-7	116256-11-2	Xn; R22 Xi; R41 R 43 N; R51-53	Xn; N R: 22-41-43-51/53 S: (2-)22-24-26-37/39-61		
613-189-00-5	1,4,7,10-tetraquis(p-toluenossulfonil)-1,4,7,10-tetraazaciododecano		414-030-0	52667-88-6	R 43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
613-190-00-0	1-amino-4-(2-(5-cloro-6-fluoropirimidin-4-ilamino-metil)-4-metil-6-sulfo-fenilamino)-9,10-dioxo-9,10-di-hidroantraceno-2-sulfonato de dissódio		414-040-5	149530-93-8	Xn; R22 R 43	Xn R: 22-43 S: (2-)22-24-37		
613-191-00-6	3-etil-2-metil-2-(3-metilbutil)-1,3-oxazolidina		421-150-7	143860-04-2	Repr. Cat.2; R60 C; R34 N; R50-53	T; N R: 60-34-50/53 S: 53-45-60-61		
613-193-00-7	heptalactato de pentaquis[3-(dimetilammonio)propilsulfamoil]-[(6-hidroxi-4,4,8,8-tetrametil-4,8-diazonia undecano-1,11-diildissulfamoil)di]ftalcianinaco bre(II)]		414-930-3	-	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
613-194-00-2	ácido 6,13-dicloro-3,10-bis[2-(4-fluoro-6-(2-sulfofenilamino)-1,3,5-triazin-2-ilamino)propilamino]benzo[5,6]1,4[oxazino]2,3-b]fenoxazina-4,11-dissulfónico, sal de lítio e sódio		418-000-8	163062-28-0	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)22-26-39		
613-195-00-8	2,2-(1,4-fenileno)bis((4H-3,1-benzoxazin-4-ona)		418-280-1	18600-59-4	R 43 R 53	Xi R: 43-53 S: (2-)24-37-61		
613-196-00-3	ácido 5-[[4-cloro-6-[[2-[[4-fluoro-6-[[5-hidroxi-6-[(4-metoxi-2-sulfofenil)azo]-7-sulfo-		418-380-5	168113-78-8	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
613-197-00-9	2-naftalenil[amino]-1,3,5-triazin-2-il[amino]-1-metil[amino]-1,3,5-triazin-2-il[amino]-3-[[4-(etenilsulfoni)fenil]azo]-4-hidroxi-naftaleno-2,7-dissulfónico, sal de sódio		420-390-1	187547-46-2	R 43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
613-199-00-X	Mistura de: 2,4,6-tri(butylcarbamoil)-1,3,5-triazin 2,4,6-tri(metilcarbamoil)-1,3,5-triazin [(2-butil-4,6-dimetil)tricarbamoi]-1,3,5-triazin [(2,4-dibutyl-6-metil)tricarbamoi]-1,3,5-triazin		421-550-1	-	Carc. Cat.2; R45 Repr. Cat.2; R61 R 43 R 52-53	T R: 45-61-43-52/53 S: 53-45-61		
613-200-00-3	Produto da reacção de: cobre, (29H,31H-ftalocianinato(2-)-N29,N30,N31,N32), ácido clorossulfúrico e 3-(2-sulfoxiethylsulfoni)amilina, sais de sódio		420-980-7	-	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)22-26-39		
613-201-00-9	(R)-5-bromo-3-(1-metil-2-pirrolidinilmetil)-1H-indol		422-390-5	143322-57-0	Repr. Cat.3; R62 T; R39-48/25 Xn; R20/22 Xi; R41 R 43 N; R50-53	T; N R: 20/22-39-41-43-48/25-62-50/53 S: (1/2-)53-45-60-61		
613-202-00-4	pimetrozina (E)-4,5-Dihidro-6-metil-4-(3-piridilmetilenoamino)-1,2,4-triazin-3(2H)-ona		-	123312-89-0	Carc. Cat3; R40 R52-53	Xn R: 40-52/53 S: (2-)36/37-61		
613-203-00-X	piraflutena-étilo [1] piraflutena		- [1] - [2]	129630-19-9 [1] 129630-17-7	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
	[2]			[2]				
613-204-00-5	oxadiargil (ISO) 3-[2,4-Dicloro-5-(2-propinilo)fenil]-5-(1,1-dimetil-1H-imidazol-2-íli)-ona 5- <i>tert</i> -Butil-3-[2,4-dicloro-5-(prop-2-inoxi)fenil]-1,3,4-oxadiazol-2(3 <i>H</i>)-ona		254-637-6	39807-15-3	Repr.Cat3; R63 Xn: R48/22 N: R50-53	Xn; N R: 48/22-63-50/53 S: (2-)36/37-46-60-61		
613-205-00-0	propiconazole (+)-1-[2-(2,4-Diclorofenil)-4-propil-1,3-dioxolan-2-ilmetil]-1 <i>H</i> -1,2,4-triazol		262-104-4	60207-90-1	Xn; R22 R43 N: R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)36/37-46-60-61		
613-206-00-6	fenamídon (ISO) (S)-5-Metil-2-metil-5-fenil-3-fenilamino-3,5-dihidromidazol-4-ona		-	161326-34-7	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
613-207-00-1	Imazalil-sulfato, solução aquosa hidrogenossulfato de 1-[2-(alilo)etil-2-(2,4-diclorofenil)-1 <i>H</i> -imidazólio hidrogenossulfato de (±)-1-[2-(alilo)etil-2-(2,4-diclorofenil)-1 <i>H</i> -imidazólio		261-351-5 281-291-3	58594-72-2 83918-57-4	Xn; R22 C; R34 R43 N: R50-53	C; N R: 22-34-43-50/53 S: (2-)26-36/37/39-45-60-61	C > 50 %; C, Xn, N; R22-34-43-50-53 30 % < C ≤ 50 %; Xn, N; R22-38-41-43-50-53 25 % ≤ C ≤ 30 %; Xn, N; R22-41-43-50-53 15 % < C < 25 %; Xi, N; R41-43-51-53 5 % ≤ C ≤ 15 %; Xi, N; R36-43-51-53 2,5 % ≤ C < 5 %; Xi, N; R43-51-53 1 % ≤ C < 2,5 %; Xi; R43-52-53 0,25 % ≤ C < 1 %; R52-53	
613-208-00-7	imazamox		-	114311-32-9	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
613-209-00-2	cloridrato de cis-1-(3-cloropropil)-2,6-dimetilpiperidina		417-430-3	63645-17-0	T; R25 Xn; R48/22 R43 N; R51-53	T; N R: 25-43-48/22-51/53 S: (1/2-)22-36/37-45-61		
613-210-00-8	2-(3-cloropropil)-2,5,5-trimetil-1,3-dioxano		417-650-1	88128-57-8	Xn; R48/22 R52-53	Xn R: 48/22-52/53 S: (2-)23-25-36-61		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
613-211-00-3	metilsulfato de N-metil-4-(p-formilestiril)piridínio		418-240-3	74401-04-0	R43 R52-53	Xi R: 43-52/53 S: (2-)22-24-37-61		
613-212-00-9	4-[4-(2-etil-hexiloxi)fenil](1,4-tiazinano-1,1-dióxido)		418-320-8	133467-41-1	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)22-60-61		
613-213-00-4	cis-1-benzoil-4[(4-metilsulfonil)oxi]-L-prolina		416-040-0	120807-02-5	R 52-53	R: 52/53 S: 61		
613-214-00-X	N,N-di-n-butil-2-(1,2-dihidro-3-hidroxi-6-isopropil-2-quinolilideno)-1,3-dioxindano-5-carboxamida		416-260-7	147613-95-4	R 53	R: 53 S: 61		
613-215-00-5	cloroto de 2-clorometil-3,4-dimetoxipiridínio		416-440-5	72830-09-2	Xn; R21/22-48/22 Xi; R38-41 R43 N; R51-53	Xn; N R: 21/22-38-41-43-48/22-51/53 S: (2-)26-36/37/39-61		
613-216-00-0	6-terc-butil-7-(6-dietilamino-2-metil-3-piridilimino)-3-(3-metilfenil)pirazolol[3,2-c][1,2,4]triazole		416-490-8	-	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
613-217-00-6	4-[3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxi)fenil]propioniloxi 1-[2-[3-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxi)fenil]propioniloxi]etil]-2,2,6,6-tetrametilpiperidina		416-770-1	73754-27-5	R 53	R: 53 S: 61		
613-218-00-1	6-hidroxi-indol		417-020-4	2380-86-1	Xn; R22 Xi; R41 R43 N; R51-53	Xn; N R: 22-41-43-51/53 S: (2-)24-26-37/39-61		
613-219-00-7	7a-etil-3,5-bis(1-metiletil)-2,3,4,5-tetrahidrooxazolol[3,4-c]-2,3,4,5-tetrahidrooxazole		417-140-7	79185-77-6	Xi; R38 N; R51-53	Xi; N R: 38-51/53 S: (2-)37-61		
613-220-00-2	7,7-dióxido de trans-(4S,6S)-5,6-di-hidro-6-metil-4H-tieno[2,3-b]tiopirano-4-ol		417-290-3	147086-81-5	Xn; R22	Xn R: 22 S: (2-)36		
613-221-00-8	2-cloro-5-metil-piridina		418-050-0	18368-64-4	Xn; R21/22 Xi; R38 R52-53	Xn R: 21/22-38-52/53 S: (2-)23-25-36/37-61		
613-222-00-3	4-(1-oxo-2-propenil)-morfolina		418-140-1	5117-12-4	Xn; R22-48/22	Xn		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
613-223-00-9	N-isopropil-3-(4-fluorofenil)-1H-indol		418-790-4	93957-49-4	R 53	R: 22-41-43-48/22 S: (2-)23-26-36/37/39		
613-224-00-4	2,5-dimercaptometil-1,4-ditiano		419-770-8	136122-15-1	Xn; R22 C; R34 R43 N; R50-53	R: 22-34-43-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61		
613-225-00-X	Mistura de: [2-(antraquinon-1-ilamino)-6-[(5-benzolilamino)-antraquinon-1-ilamino]-4-fenil]-1,3,5-triazin 2,6-bis-[(5-benzolilamino)-antraquinon-1-ilamino]-4-fenil-1,3,5-triazin.		421-290-9	-	Xn; R48/22 R53	Xn R: 48/22-53 S: (2-)22-36-61		
613-226-00-5	dicloreto de 1-(2-etil(4-(4-(4-(etil(2-piridinoetil)amino)-2-metilfenilazo)benzolilamino)-fenilazo)-3-metilfenil)amino)etil-piridino		420-950-3	163831-67-2	Xi; R41 N; R50-53	Xi; N R: 41-50/53 S: (2-)26-39-60-61		
613-227-00-0	(+/-) [(R* R*) e (R* S*)]-6-fluoro-3,4-di-hidro-2-oxiramil-2H-1-benzopirano		419-600-2	-	R 43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-28-36/37-61		
613-228-00-6	(+/-)-(R*, S*)-6-fluoro-3,4-di-hidro-2-oxiramil-2H-1-benzopirano		419-630-6	-	N; R51-53	N R: 51/53 S: 24-61		
613-230-00-7	florasulame (ISO) 2',6',8'-Trifluoro-5-metoxi-5-triazolo[1,5-c]pirimidino-2-sulfonamida		-	145701-23-1	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
613-233-00-3	4,4'-(oxi-(bismetileno))-bis-1,3-dioxolano		423-230-7	56552-15-9	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		
614-028-00-1	Mistura de: mono-D-glucopiranosida de 2-ethylhexilo di-D-glucopiranosida de 2-ethylhexilo		414-420-0	-	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		
614-029-00-7	Isómeros constitutivos de penta-O-aliil-β-D-fructofuranosil-α-D-		419-640-0	68784-14-5	Xn; R22	Xn R: 22		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
	glucopiranosídeo Isómeros constitutivos de hexa-O- α -D-fructofuranosil- α -D-glucopiranosídeo Isómeros constitutivos de hepta-O- α -D-fructofuranosil- α -D-glucopiranosídeo					S: (2-)		
615-030-00-5	Sais de metais alcalinos, alcalino terrosos e outros sais de ácido tiocianico não mencionados no presente Anexo	A	-	-	Xn; R20/21/22 R32 R52-53	Xn R: 20/21/22-32-52/53 S: (2-)-13-61		
615-031-00-0	sais de tálio do ácido tiocianico	A	222-571-7	3535-84-0	Xn; R20/21/22 R32 N; R51-53	Xn; N R: 20/21/22-32-51/53 S: (2-)-13-61		
615-032-00-6	Sais metálicos de ácido tiocianico não mencionados no presente Anexo	A	-	-	Xn; R20/21/22 R32 N; R50-53	Xn; N R: 20/21/22-32-50/53 S: (2-)-13-60-61		
616-092-00-6	Produto da reacção polimérica de bíciclo[2.2.1]hepta-2,5-dieno, eteno, 1,4-hexadieno, 1-propeno com N,N-di-2-propenilformamida		404-035-6	-	R 43 R 53	Xi R: 43-53 S: (2-)-24-37-61		
616-093-00-1	Produtos da reacção de: condensado de anilina, tereftalaldeído e o-toluidina com anidrido maléico		406-620-1	129217-90-9	R 43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)-24-37-61		
616-094-00-7	3,3'-dicitohexil-1,1'-metilenobis(4,1-fenileno)diureia		406-370-3	58890-25-8	R 43 R 53	Xi R: 43-53 S: (2-)-24-37-61		
616-095-00-2	3,3'-dicoctadecil-1,1'-metilenobis(4,1-fenileno)diureia		406-690-3	43136-14-7	R 53	R: 53 S: 61		
616-096-00-8	N-(3-hexadeciloxi-2-hidroxi-prop-1-il)-N-(2-hidroxi-1-palmitamida		408-110-4	110483-07-3	R 53	R: 53 S: 61		
616-097-00-3	N,N'-1,4-fenilenobis(2-(2-metoxi-4-nitrofenil)azo)-3-oxobutanimida		411-840-6	83372-55-8	R 53	R: 53 S: 61		
616-098-00-9	1-[4-cloro-3-(2,2,3,3,3-pentafluoropropoxi)metil]fenil]-5-fenil-1H-1,2,4-triazole-3-		411-750-7	119126-15-7	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
	carboxamida							
616-099-00-4	2-[4-(4-hidroxi-fenil)sulfonil]fenoxi]-4,4-dimetil-N-[5-(metilsulfoni)amino]-2-[4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenoxi]fenil]-3-oxopentanamida		414-170-2	135937-20-1	R 53	R: 53 S: 61		
616-100-00-8	1,3-dimetil-1,3-bis(trimetilsilil)ureia		414-180-7	10218-17-4	Xn; R22 Xi; R38	Xn R: 22-38 S: (2-)36/37		
616-101-00-3	(S)-N-terc-butil-1,2,3,4-tetrahidro-3-isoquinolincarboxamida		414-600-9	149182-72-9	Xn; R22 R 52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2-)61		
616-102-00-9	Mistura de: α -[3-(3-mercaptopropanoxicarbonilamino)metilfenilaminocarbonil]- ω -[3-(3-mercaptopropanoxicarbonilamino)metilfenilaminocarbonil]oxi]-poli(oxietileno-co-oxipropileno) 1,2-(ou 1,3)-bis[α -(3-mercaptopropanoxicarbonilamino)metilfenilaminocarbonil]- ω -oxi]-poli(oxietileno-co-oxipropileno)]-3-(ou 2)-propanol 1,2,3-tris[α -(3-mercaptopropanoxicarbonilamino)metilfenilaminocarbonil]- ω -oxi]-poli(oxietileno-co-oxipropileno)]propanol		415-870-0	-	R 43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)36/37-61		
616-103-00-4	(S,S)-trans-4-(acetilamino)-5,6-dihidro-6-metil-7,7-dioxo-4H-tieno[2,3-b]tiopirano-2-sulfonamida		415-030-3	120298-38-6	R43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
616-104-00-X	Benalaxil N-(2,6-Dimetilfenil)-N-(fenilacetil)-DL-alaninato de metilo		275-728-7	71626-11-4	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
616-105-00-5	Clorotolurão 3-(3-Cloro- <i>p</i> -tolil)-1,1-dimetilureia		239-592-2	15545-48-9	Carc. Cat. 3; R40 Repr. Cat. 3; R63 N; R50-53	Xn; N R: 40-63-50/53 S: (2-)36/37-26-46-60-60		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
616-106-00-0	femmedífame (ISO) 3-(3-Metilcarbanililoxi)carbamilato de metilo		237-199-0	13684-63-4	N; R50-53	61 N R: 50/53 S: 60-61		
616-108-00-1	Iodossulfúrio metil-sódico		-	144550-36-7	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
616-109-00-7	Sulfossulfúrio 1-(4,6-Dimetoxipirimidin-2-il)-3-(2-etilsulfonilimidazol-1,2-a[piridin-3-il]sulfonilureia		-	141776-32-1	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
616-110-00-2	ciclamida Ácido 1-(2,4-dicloroantilnocarbonil)ciclopropa no-carboxílico		419-150-7	113136-77-9	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2-)61		
616-111-00-8	Fenexamida		422-530-5	126833-17-8	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
616-112-00-3	oxasulfúrio Oxetan-3-il 2-[(4,6-dimetilpirimidin-2-il)-carbamoi]sulfamoil]benzoato		-	144651-06-9	Xn; R48/22 N; R50-53	Xn; N R: 48/22-50/53 S: (2-)46-60-61		
616-113-00-9	desmedífame 3-Fenilcarbomoi]oxifenilcarbomato de etilo		237-198-5	13684-56-5	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61	C ≥ 2,5 %; N; R50/53 0,25 % ≤ C < 2,5 %; N; R51/53 0,025 % ≤ C < 0,25 %; R52/53	
616-114-00-4	dodecanamida, N,N'-(9,9',10,10'-tetra-hidro-9,9',10,10'-tetraoxo(1,1'-biantraceno)-4,4'-diil)bis-		418-010-2	136897-58-0	R53	R: 53 S: 22-61		
616-115-00-X	N-(3-acetil-2-hidroxi)fenil)-(4-fenilbutoxi)benzamida		416-150-9	136450-06-1	R 53	R: 53 S: 61		
616-116-00-5	N-(4-dimetilaminopiridinium)-3-metoxi-4-(1-metil-5-nitroindol-3-ilmetil)-N-(o-tolilsulfonil)benzamidato		416-790-9	-	R 53	R: 53 S: 61		
616-117-00-0	N-[2-(3-acetil-5-nitrotiofeno-2-ilazo)-5-dietilaminofenil]acetamida		416-860-9	-	Repr. Cat.3; R62 R43 N; R50-53	Xn; N R: 43-62-50/53 S: (2-)22-36/37-60-61		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
616-118-00-6	cloridrato de N-(2,6-dimetilfenil)-2-piperidinacboxamida		417-950-0	65797-42-4	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2-)22-61		
616-119-00-1	2-(1-butil-3,5-dioxo-2-fenil-(1,2,4)-triazolidin-4-il)-4,4-dimetil-3-oxo-N-(2-metoxi-5-(2-dodecil-1-sulfonil)propionilamino)-fenil)-pentanamida		418-060-5	118020-93-2	R 53	R: 53 S: 61		
616-120-00-7	Mistura de: N-(3-dimetilamino-4-metilfenil)-benzamida N-(3-dimetilamino-2-metilfenil)-benzamida N-(3-dimetilamino-3-metilfenil)-benzamida		420-600-1	-	Xn; R48/22 N; R51-53	Xn; N R: 48/22-51/53 S: (2-)36/37-61		
616-121-00-2	2,4-Di-hidroxi-N-(2-metoxifenil)benzamida		419-090-1	129205-19-2	R 43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
616-123-00-3	N-[3-[4-(dietilamino)-2-metilfenil]imino]-6-oxo-1,4-ciclohexadienil]acetamida		414-740-0	96141-86-5	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
616-124-00-9	bis(trifluórometilsulfonil)imida de lítio		415-300-0	90076-65-6	T; R24/25 C; R34 R 52-53	T R: 24/25-34-52/53 S: (1/2-)22-26-36/37/39-45-61		
616-125-00-4	3-ciano-N-(1,1-dimetil)androsta-3,5-dieno-17-β-carboxamida		415-730-9	151338-11-3	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
616-127-00-5	Mistura de: N,N'-Etano-1,2-dilbis(decanamida) 12-Hidroxi-N-[2-[1-oxidecil]amino]etil]octadecanamida; N,N'-Etano-1,2-dilbis(12-hidroxi octadecanamida)		430-050-2	-	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
616-128-00-0	N-(2-(1-aliil-4,5-dicianoimidazol-2-ilazo)-5-(dipropilamino)fenil)-acetamida		417-530-7	123590-00-1	R53	R: 53 S: 61		
616-129-00-6	N,N'-bis(2,2,6,6-tetrametil-4-piperidil)isofalamicida		419-710-0	42774-15-2	Xn; R22 Xi; R36	Xn R: 22-36		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
616-130-00-1	N-(3-(2-(4,4-dimetil-2,5-dioxoimidazolin-1-il)-4,4-dimetil-3-oxo-pentanoilamino)-4-metoxifenil)octadecanamida		421-780-2	150919-56-5	R53	S: (2-)22-25-26 R: 53 S: 61		
616-132-00-2	N-[4-(4-ciano-2-furfurilideno-2,5-dihidro-5-oxo-3-furil)fenil]butano-1-sulfonamida		423-250-6	130016-98-7	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
616-133-00-8	N-ciclohexil-S,S-dioxobenzolb[ti]ofeno-2-carboxamida		423-990-1	149118-66-1	Xn; R22 Xi; R41 N; R50-53	Xn; N R: 22-41-50/53 S: (2-)22-26-39-60-61		
616-134-00-3	3,3'-bis(dioctiloxitriofosfinitro)-N,N'-oxibis(metileno)dipropionamida		401-820-5	-	R52-53	R: 52/53 S: 61		
616-135-00-9	(3S,4aS,8aS)-2-[(2R,3S)-3-amino-2-hidroxi-4-fenilbutil]-N-tert-butildeca-hidro-isoquinolina-3-carboxamida		430-230-0	136522-17-3	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2-)22-61		
616-142-00-7	1,3-Bis(vinilsulfonacetamido)propa no		428-350-3	93629-90-4	Muita.Cat.3; R68 Xi; R41 R 43 R 52-53	Xn R: 41-43-68-52/53 S: (2-)22-26-36/37/39-61		
616-143-00-2	N,N'-dihexadecil-N,N'-bis(2-hidroxiethyl)propanodiamida		422-560-9	149591-38-8	Xn; Repr. Cat. 3; R62 Xi; R36 R53	Xn R: 62-36-53 S: (2-)26-36/37-61		
617-018-00-5	Mistura de: peróxido de 1-metil-1-(3-(1-metiletil)fenil)etil-1-peróxido de 1-metil-1-(4-(1-metiletil)fenil)etil-1-metil-1-feniletileto, 31% em peso		410-840-3	71566-50-2	O; R7 N; R51-53	O; N R: 7-51/53 S: (2-)3/7-14-36/37/39-61		
617-019-00-0	ácido 6-(ftalimido)peroxihexanóico		410-850-8	128275-31-0	O; R7 Xi; R41 N; R50	O; Xi; N R: 7-41-50 S: (2-)3/7-14-26-36/37/39-61		
617-020-00-6	bis(Neodecanoilperóxido) de 1,3-di(prop-2,2-dil)benzeno		420-060-5	117663-11-3	R10 O; R7 N; R51-53	O; N R: 7-10-51/53 S: (2-)7-14-36/37/39-47-61		
650-042-00-4	Produto de reação de:		417-450-2	-	Xi; R36/38	Xi		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
650-043-00-X	polietileno-poliamina-álquil(C16-C18)amidas com fosfonatos de monotio-álquil(C2)	Produto da reacção de: ácido 3,5-bis-tert-butilsalicílico e sulfato de alumínio	420-310-3	-	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)22-56-60-61		
650-044-00-5	mistura de álcoois lineares e ramificados C14-15 etoxilados, produto de reacção com epícloridrina		420-480-9	158570-99-1	Xi; R38 R43 N; R50-53	Xi; N R: 38-43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
650-045-00-0	Produto da reacção de ácido 1,2,3-propanotricarboxílico, 2-hidroxi, éster dietílico, 1-propanol com tetra-n-propanolato de zircónio		417-110-3	-	F; R11 Xi; R38-41 N; R51-53	F; Xi; N R: 11-38-41-51/53 S: (2-)9-16-26-37/39-61		
650-046-00-6	disulfonato de di(tetrametilamónio)(29H,31H-ftalocianin-N29,N30,N31,N32)disulfonamida, complexo de cuprato(2-), derivados		416-180-2	-	Xn; R22-48/22 N; R51-53	Xn; N R: 22-48/22-51/53 S: (2-)22-36-61		
650-047-00-1	hexafluoroantimoniato de dibenzilfentilsulfónio		417-760-8	134164-24-2	T; R48/25 Xn; R22 Xi; R41 R43 N; R51-53	T; N R: 22-41-43-48/25-51/53 S: (1/2-)22-26-36/37/39-45-61		
650-048-00-7	Produto de reacção de: bórax, peróxido de hidrogénio, anidrido acético e ácido acético		420-070-1	-	O; R7 Xn; R20/21/22 C; R35 N; R50	O; C; N R: 7-20/21/22-35-50 S: (1/2-)3/7-14-26-36/37/39-45-61		
650-049-00-2	hidrogenomaleato de 2-alcoioxietilo, sendo o grupo alcoilo constituído por 70 a 85% (em massa) de octadecilo insaturado, 0,5 a 10% de octadecilo saturado e 2 a 18% de hexadecilo saturado		417-960-5	-	Xi; R38-41 R43 N; R50-53	Xi; N R: 38-41-43-50/53 S: (2-)24-26-37/39-60-61		
650-050-00-8	Mistura de: 3,5-1,1-dimetil-4-hidroxidi-hidroxinamato de 1-metil-3-hidroxipropilo e/ou 3,5-		423-600-8	-	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		

Nº de índice	designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	Nº CE	Nº CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
650-055-00-5	[1,1-dimetiletil]-4-hidroxi-di-hidrocinnamato de 3-hidroxi-butilo isómeros de bis[3-(3'-(1,1-dimetil)4'-hidroxifenil)propionato] de 1,3-butanodiol isómeros de bis[3-(3',5'-(1,1-dimetil)4'-hidroxifenil)propionato] de 1,3-butanodiol		422-570-3	-	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
	hidrogenofosfato de prata sódio e zirconio							

ANEXO 2A

A.21. PROPRIEDADES DE COMBURÊNCIA (LÍQUIDOS)

1. MÉTODO

1.1 INTRODUÇÃO

O presente método de ensaio destina-se à determinação do potencial de uma substância líquida de aumentar a velocidade ou intensidade de combustão de uma substância combustível, ou de formar misturas homogêneas com uma substância combustível que possam sofrer ignição espontânea. O método baseia-se no ensaio da ONU para líquidos comburentes(1), ao qual é equivalente. Todavia, uma vez que o método A.21 se destina essencialmente a satisfazer as exigências da Directiva 67/548/CEE, apenas é necessária a comparação com uma substância de referência. Caso se preveja que os resultados do ensaio sejam utilizados para outros fins, pode ser necessário efectuar ensaios complementares e comparações com outras substâncias de referência¹.

Não é necessário realizar o ensaio se uma análise simples da fórmula estrutural da substância permitir estabelecer com um grau de confiança elevado que a mesma não reage exotermicamente com matérias combustíveis.

Antes de realizar o ensaio, é conveniente obter informações sobre eventuais propriedades explosivas da substância.

O método não é aplicável a sólidos, gases e outras substâncias explosivas ou altamente inflamáveis, nem a peróxidos orgânicos.

Não é necessário realizar o ensaio se existirem dados referentes à substância em estudo obtidos por aplicação do ensaio da ONU para líquidos comburentes(1).

1.2 DEFINIÇÕES E UNIDADES

O **tempo médio necessário para o aumento da pressão** é a média dos tempos determinados necessários para que a pressão da mistura em estudo aumente de 690 kPa para 2070 kPa acima da pressão atmosférica.

1.3 SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA

Utiliza-se como substância de referência uma solução aquosa a 65%, em massa, de ácido nítrico de qualidade analítica.²

Caso o experimentador preveja que os resultados do ensaio sejam utilizados para outros fins,¹ pode revelar-se adequado efectuar ensaios com outras substâncias de referência.³

4 PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

O líquido em estudo é misturado, na proporção 1:1, em massa, com fibras de celulose, e introduzido num recipiente pressurizado. Se, durante o processo de mistura ou enchimento, ocorrer ignição espontânea, não é necessário prosseguir o ensaio.

Caso não ocorra ignição espontânea, realiza-se o ensaio na sua totalidade. A mistura é aquecida no recipiente pressurizado, determinando-se o tempo médio necessário para que a pressão aumente de 690 kPa para 2070 kPa acima da pressão atmosférica. Este tempo é comparado com o tempo médio necessário para o aumento da pressão da mistura na proporção de 1:1 da(s) substância(s) de referência com celulose.

1.5 CRITÉRIOS DE QUALIDADE

Os resultados de uma série de cinco ensaios com uma determinada substância não devem diferir em mais de 30 % da média aritmética. Devem desprezar-se os resultados que mostrem uma divergência superior a 30 % relativamente à média, alterando-se os procedimentos de mistura e enchimento, após o que deve repetir-se o ensaio.

¹ Por exemplo, o ensaio no âmbito da regulamentação da ONU relativa ao transporte de mercadorias perigosas.

² O ácido deve ser titulado antes do ensaio, de modo a confirmar a sua concentração.

³ Na referência 1, por exemplo, utilizam-se ácido perclórico a 50%, em massa, e clorato de sódio a 40%, em massa.

1.6 DESCRIÇÃO DO MÉTODO

1.6.1 **Preparação**

1.6.1.1 *Substância combustível*

Utilizam-se como matéria combustível fibras de celulose secas, de comprimento compreendido entre 50 e 250 μm e diâmetro médio 25 μm .⁴ As fibras são secas a massa constante, numa placa de espessura não superior a 25 mm, a 105 °C, durante 4 horas, e mantidas num exsiccador com exsicante, até ao arrefecimento e utilização. O teor de humidade da celulose seca deve ser inferior a 0,5% em relação à massa seca⁵. Para tal, se necessário, deve prolongar-se o tempo de secagem.⁶ Deve utilizar-se o mesmo lote de celulose em todo o ensaio.

1.6.1.2 *Equipamento*

1.6.1.2.1 *Dispositivo pressurizado*

Deve utilizar-se um dispositivo constituído por um recipiente pressurizado de aço de forma cilíndrica, com 89 mm de comprimento e 60 mm de diâmetro externo (ver figura 1). São maquinadas duas superfícies planas em lados opostos, reduzindo a secção local do recipiente para 50 mm, de modo a facilitar a imobilização durante a colocação dos obturadores de ignição e de ventilação. O recipiente, com um diâmetro interno de 20 mm, é rebaixado internamente em ambas as extremidades até uma profundidade de 19 mm e roscado para tubos normalizados BSP (*British Standard Pipe*) de 1", ou o seu equivalente no sistema métrico. É enroscada à superfície curva do recipiente pressurizado uma tomada de pressão, a 35 mm de uma das extremidades, perpendicularmente às superfícies planas maquinadas. O encaixe, roscado para receber a rosca da tomada de pressão (tubo normalizado BSP de 1/2", ou o seu equivalente no sistema métrico), é realizado a uma profundidade de 12 mm. Se necessário, é instalada uma junta de material inerte, de modo a assegurar estanquidade aos gases. A tomada de pressão tem um comprimento exterior de 55 mm relativamente ao corpo do dispositivo e um furo axial com 6 mm de diâmetro. A extremidade da tomada de pressão é rebaixada e roscada de forma a receber um transdutor de pressão com diafragma. Pode utilizar-se qualquer dispositivo de medição de pressão que não seja atacado pelos gases de combustão ou produtos de decomposição e seja adequado a aumentos de pressão de 690-2070 kPa em não mais de 5 minutos.

A extremidade do recipiente pressurizado mais distante da tomada de pressão é tapada com um obturador de ignição e munida de dois eléctrodos, um dos quais isolado do corpo do obturador e o outro ligado à massa. A extremidade oposta do recipiente é fechada por um disco de ruptura adequado a uma pressão de ruptura de 2200 kPa, mantido em posição por um obturador de retenção com um furo axial de 20 mm de diâmetro. Se necessário, é instalada uma junta de material inerte, de modo a assegurar estanquidade aos gases. Durante a utilização, o dispositivo é mantido na posição correcta por meio de um suporte (figura 2), geralmente constituído por uma placa de aço macio com 235 mm x 184 mm x 6 mm e um tubo de 185 mm de comprimento e secção quadrada de 70 mm x 70 mm x 4 mm.

São cortados dois lados opostos na extremidade do tubo, de modo a obter uma estrutura constituída por uma secção de tubo intacto com 86 mm de comprimento prolongada por dois lados até à base. As extremidades destes lados são cortadas de modo a formar um ângulo de 60° com a horizontal e soldadas à placa de aço macio que constitui a base. É maquinada num dos lados da extremidade superior da base uma fenda com 22 mm de largura e 46 mm de profundidade, de modo que, ao colocar o dispositivo pressurizado com o obturador de ignição para baixo, a tomada de pressão encaixe na fenda. É soldada à face interna do lado inferior do tubo um espaçador de aço com 30 mm de largura e 6 mm de espessura. O dispositivo pressurizado é mantido firmemente em posição por dois parafusos de orelhas de 7 mm, colocados no lado oposto, e apoiado inferiormente por dois elementos prismáticos de aço de 12 mm de largura e 6 mm de espessura, soldados às peças laterais na base da porção intacta do tubo.

⁴ Por exemplo, celulose Whatman para cromatografia em coluna, referência CF 11, nº de catálogo 4021 050

⁵ Confirmado, por exemplo, através de uma titulação de Karl Fisher

⁶ Como alternativa, pode obter-se o teor de humidade em causa por aquecimento a 105 °C, sob vácuo, durante 24 h.

1.6.1.2.2 *Sistema de ignição*

O sistema de ignição é constituído por um cabo de níquel-crómio de 25 cm de comprimento e 0,6 mm de secção, com uma resistência de 3,85 ohm/m. O cabo é enrolado em forma de bobina por recurso a uma haste de 5 mm de secção, e ligado aos eléctrodos do obturador de ignição. A bobina deve apresentar uma das configurações que se ilustram na figura 3. A distância entre a extremidade inferior do recipiente e a superfície interior da bobina de ignição deve ser de 20 mm. Caso os eléctrodos não sejam ajustáveis, as extremidades do cabo de ignição entre a bobina e a base do recipiente devem ser isoladas por um elemento de cerâmica. O cabo é aquecido por acção de uma corrente contínua de intensidade mínima 10 A.

1.6.2 **Realização do ensaio**⁷

O dispositivo completo, incluindo o transdutor de pressão e o sistema de aquecimento, mas sem o disco de ruptura na respectiva posição, é colocado com o obturador de ignição para baixo. Com o auxílio de um agitador de vidro⁸, misturam-se num recipiente de vidro 2,5 g do líquido em estudo com 2,5 g de celulose seca. Por motivos de segurança, a mistura deve ser executada com um dispositivo de segurança interposto entre o operador e a mistura. Em caso de ignição durante os processos de mistura ou o enchimento, não é necessário prosseguir o ensaio. A mistura é vertida em pequenas porções no recipiente pressurizado, agitando ligeiramente, devendo assegurar-se a acumulação em torno da bobina de ignição, de forma a estabelecer um bom contacto. A bobina não deve ser distorcida durante o processo de enchimento, facto que poderia determinar resultados erróneos⁹. O disco de ruptura é colocado na respectiva posição e o obturador de retenção enroscado firmemente. O recipiente carregado, com o disco de ruptura no topo, é transferido para o suporte, que deve estar colocado numa chaminé ou câmara com protecção. A fonte de alimentação é ligada aos terminais externos do obturador de ignição, aplicando-se uma corrente de 10 A. O tempo decorrido entre o início da mistura e o estabelecimento da corrente eléctrica não deve exceder 10 minutos.

O sinal produzido pelo transdutor de pressão é transmitido a um sistema adequado que permita a detecção e o registo contínuos da alteração da pressão (por exemplo, um detector em contínuo acoplado a um registador). A mistura é aquecida até à ruptura do disco de ruptura ou até terem decorrido, pelo menos, 60 segundos. Caso o disco não sofra ruptura, deve deixar-se arrefecer a mistura antes de desmontar cuidadosamente o dispositivo, tomando as precauções inerentes a uma eventual pressurização. Realizam-se cinco ensaios com a substância em estudo e a(s) substância(s) de referência. Regista-se o tempo necessário para a pressão aumentar de 690 kPa para 2070 kPa acima da pressão atmosférica, calculando-se então o tempo médio necessário para o aumento da pressão.

Algumas substâncias produzem um aumento de pressão excessivo ou demasiado reduzido, determinado por reacções químicas independentes das propriedades de comburência das substâncias. Nesses casos, pode ser necessário repetir o ensaio, utilizando uma substância inerte, como, por exemplo, terra de diatomáceas (*kieselguhr*), em vez da celulose, de modo a esclarecer a natureza da reacção.

⁷ As misturas de substâncias comburentes com celulose devem ser consideradas potencialmente explosivas, devendo manipular-se com os devidos cuidados.

⁸ Na prática, pode preparar-se uma quantidade de mistura na proporção 1:1 do líquido em estudo com celulose superior à necessária para o ensaio, transferindo $5 \pm 0,1$ g da mesma para o recipiente pressurizado. A mistura deve ser preparada antes de cada ensaio.

⁹ Deve evitar-se, em especial, o contacto entre espiras adjacentes da bobina.

2 DADOS

Tempos necessários para o aumento da pressão da(s) substância(s) em estudo e de referência.
Tempos necessários para o aumento da pressão no caso dos ensaios com substâncias inertes, se for caso disso.

2.1 TRATAMENTO DOS RESULTADOS

Calculam-se os tempos médios necessários para o aumento da pressão da(s) substância(s) em estudo e de referência.

Calcula-se o tempo médio necessário para o aumento da pressão no ensaio com a substância inerte, se realizado.

O quadro 1 fornece alguns exemplos de resultados:

Quadro 1
Exemplos de resultados ^{d)}

Substância ^{c)}	Tempo médio necessário para o aumento da pressão (mistura com celulose na proporção 1:1) (ms)
Solução aquosa saturada de dicromato de amónio	20800
Solução aquosa saturada de nitrato de cálcio	6700
Solução aquosa saturada de nitrato férrico	4133
Solução aquosa saturada de perclorato de lítio	1686
Solução aquosa saturada de perclorato de magnésio	777
Solução aquosa saturada de nitrato de níquel	6250
Ácido nítrico a 65 %	4767 ^{a)}
Ácido perclórico a 50 %	121 ^{a)}
Ácido perclórico a 55 %	59
Solução aquosa a 30% de nitrato de potássio	26690
Solução aquosa saturada de nitrato de prata	_{b)}
Solução aquosa a 40 % de clorato de sódio	2555 ^{a)}
Solução aquosa a 45 % de nitrato de sódio	4133
<i>Substância inerte</i>	
Água:celulose	_{b)}

a) Valor médio com base em ensaios de comparação interlaboratorial

b) Sem atingir a pressão máxima de 2070 kPa

c) As soluções saturadas devem ser preparadas à temperatura de 20 °C

d) Ver a referência (1) para a classificação no âmbito da regulamentação da ONU em matéria de transporte de mercadorias perigosas.

3 RELATÓRIO

3.1 RELATÓRIO DE ENSAIO

O relatório de ensaio deve incluir as seguintes informações:

- identidade, composição, grau de pureza, etc., da substância em estudo;
- concentração da substância em estudo;
- procedimento utilizado para a secagem da celulose;
- teor de humidade da celulose utilizada;
- resultados das determinações;
- resultados dos ensaios com substâncias inertes, se for caso disso;
- tempos médios necessários para o aumento da pressão determinados;
- quaisquer eventuais alterações do método e respectiva motivação;
- quaisquer informações complementares ou observações úteis para a interpretação dos resultados;

3.2 INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS¹⁰

Os resultados do ensaio são interpretados com base nos seguintes critérios:

- a) eventual ignição espontânea da mistura da substância em estudo com celulose; e
- b) comparação do tempo médio necessário para o aumento da pressão de 690 kPa para 2070 kPa com idêntico parâmetro da(s) substância(s) de referência.

Uma substância líquida é considerada comburentes se:

- a) uma mistura da substância com celulose na proporção 1:1, em massa, exibir ignição espontânea; ou
- b) uma mistura na proporção 1:1, em massa, exibir um tempo médio necessário para o aumento da pressão inferior ou igual ao tempo médio necessário para o aumento da pressão de uma mistura na proporção 1:1, em massa, de solução aquosa de ácido nítrico a 65% (em massa) e celulose.

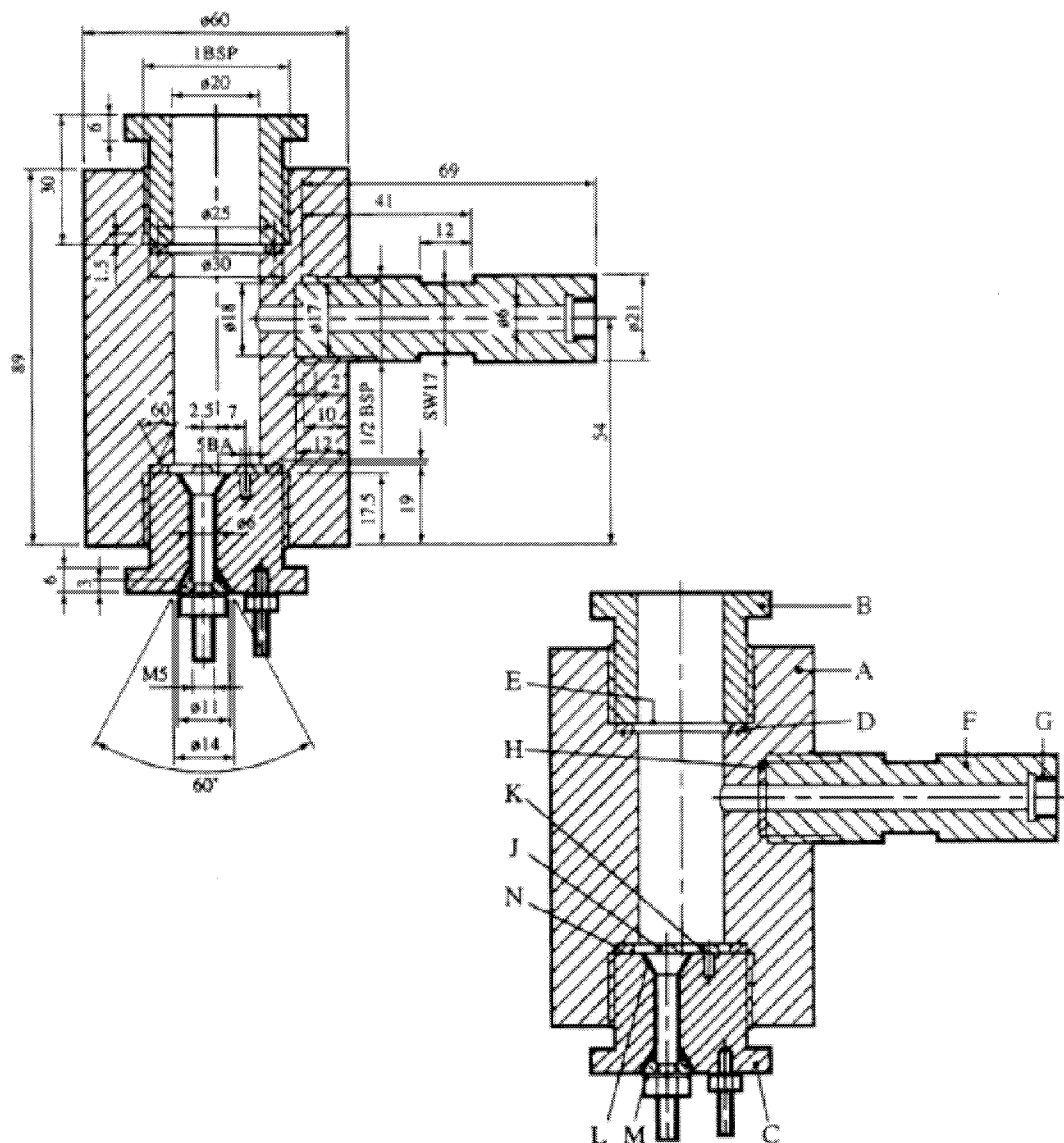
De modo a evitar falsos resultados positivos, podem ser também tidos em conta na interpretação dos resultados, se tal for considerado necessário, os resultados obtidos num ensaio da substância em estudo com uma substância inerte.

4 REFERÊNCIAS

- (1) *Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Manual of Tests and Criteria* 3ª edição revista. Publicação da ONU No: ST/SG/AC.10/11/Rev. 3, 1999, pág. 342. *Test O.2: Test for oxidizing liquids.*

¹⁰ Ver a referência nº 1 para a interpretação dos resultados no âmbito da regulamentação da ONU relativa ao transporte de mercadorias perigosas, utilizando várias substâncias de referência.

Figura 1



Dispositivo pressurizado

(A) Corpo do recipiente pressurizado
 (D) Junta de chumbo macio
 (G) Cabeça do transdutor de pressão
 (K) Eléctrodo ligado à massa
 (N) Ranhura de distorção da junta

(B) Obturador de suporte do disco de ruptura
 (E) Disco de ruptura
 (H) Junta
 (L) Isolador

(C) Obturador de ignição
 (F) Tomada de pressão
 (J) Eléctrodo isolado
 (M) Cone de aço

Figura 2

Suporte do dispositivo

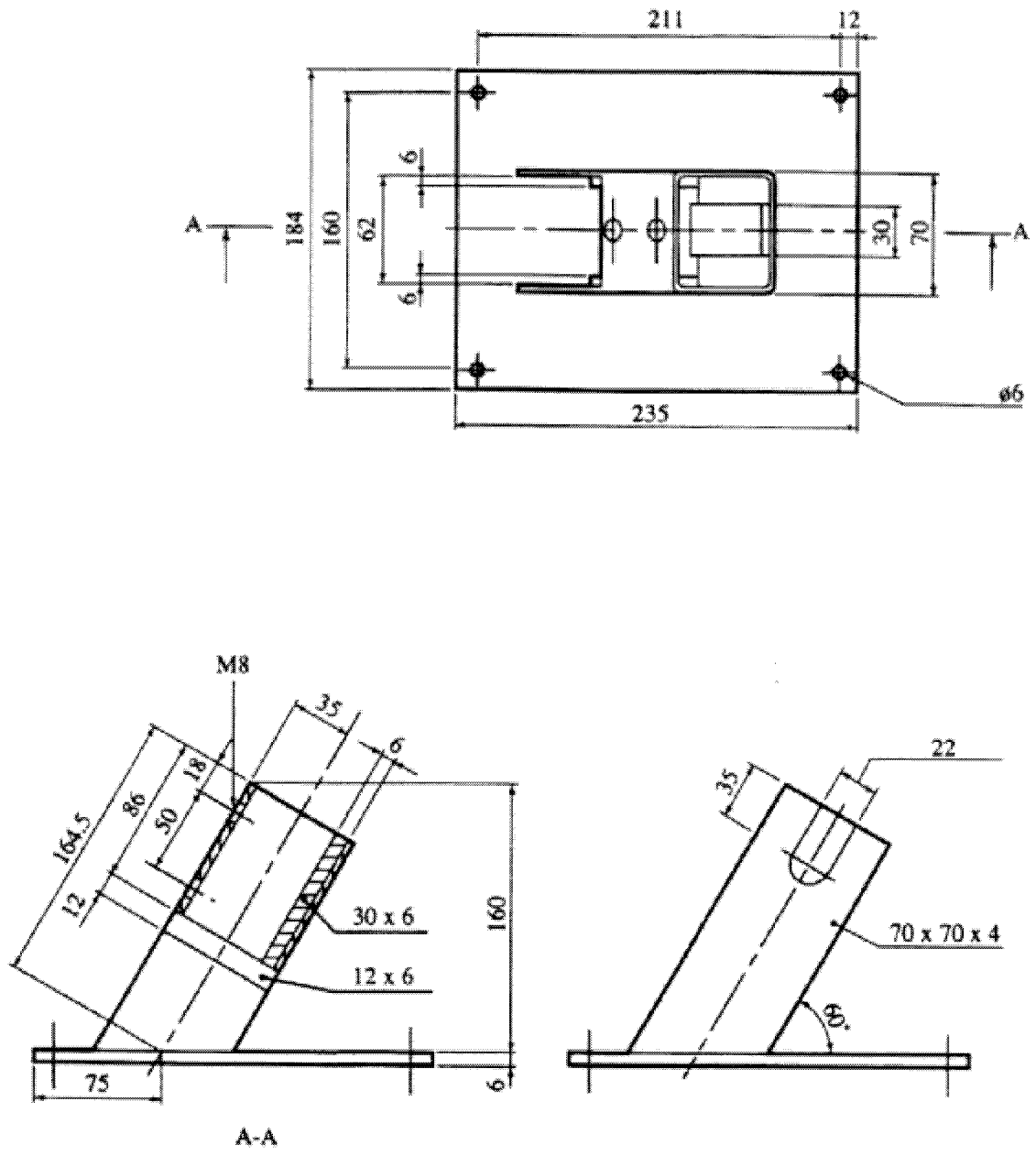
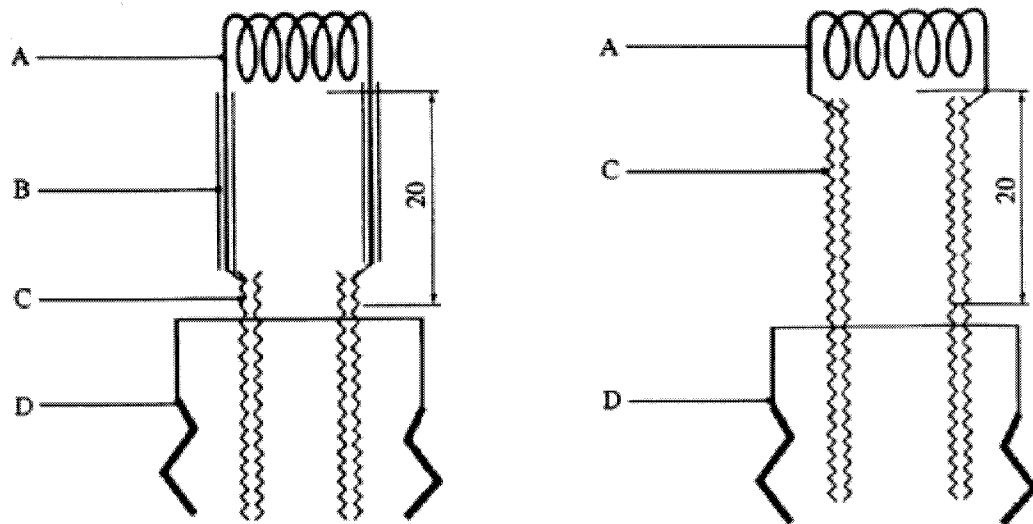


Figura 3

Sistema de ignição



(A) Bobina de ignição

(B) Isolador

(C) Eléctrodos

(D) Obturador de ignição

Nota: Cada uma destas duas configurações pode ser utilizada.

ANEXO 2B

B.1 bis. TOXICIDADE ORAL AGUDA – PROCEDIMENTO DE DOSE FIXA

1. MÉTODO

O presente método é equivalente ao “Test Guideline” TG 420 da OCDE (2001)

1.1 INTRODUÇÃO

Os métodos tradicionais de avaliação de toxicidade aguda utilizam a morte dos animais como critério específico. Em 1984, foi sugerida pela British Toxicology Society uma nova abordagem ao ensaio da toxicidade aguda com base na administração de uma série de doses fixas (1). Esta abordagem evitava a utilização da morte dos animais como um critério específico. O novo método baseava-se na observação de sinais evidentes de toxicidade ocorrentes a determinado valor de uma série de doses fixas. Em 1992 e no seguimento dos estudos de validação *in vivo* efectuados tanto no Reino Unido (2) como internacionais (3), o procedimento foi adoptado como método de ensaio. Subsequentemente, as propriedades estatísticas do Procedimento de Dose Fixa foram avaliadas em vários estudos utilizando modelos matemáticos (4)(5)(6). Em conjunto os estudos *in vivo* e de modelação mostraram que o procedimento é reprodutível, utiliza um menor número de animais e causa menor sofrimento do que os métodos tradicionais, permitindo classificar as substâncias de um modo semelhante a outros métodos de ensaio de toxicidade aguda.

No Documento de Orientação sobre Ensaio de Toxicidade Oral Aguda (7) podem consultar-se as orientações sobre a selecção do método de ensaio mais apropriado a determinado fim. Este Documento de Orientação contém igualmente informação adicional sobre o procedimento e interpretação do Método de Ensaio B.1.

Um dos princípios básicos do presente método consiste na utilização de doses moderadamente tóxicas no estudo principal, evitando a administração de doses previsivelmente letais. Além disso, não é necessário administrar doses para as quais se sabe previamente que causam dor e sofrimento óbvios, devido à sua acção corrosiva ou fortemente irritante. Os animais moribundos ou os animais que apresentam sinais óbvios de dor ou sofrimento grave e continuado devem ser sacrificados sem dor e, na interpretação dos resultados do ensaio, devem ser considerados do mesmo modo que os animais que morrem durante o ensaio. Os critérios sobre a decisão de sacrificar animais moribundos ou em sofrimento grave, bem como as orientações sobre a identificação de morte previsível ou iminente, estão incluídos separadamente num Documento de Orientação (8).

O presente método permite obter informação sobre a perigosidade e possibilita a graduação e classificação da substância em conformidade com o Sistema Harmonizado ao Nível Mundial (GHS) para a classificação de substâncias químicas que causam toxicidade aguda (9).

Antes de efectuar o estudo, o laboratório de ensaio deve ter em conta toda a informação disponível sobre a substância de ensaio. Esta informação incluirá a identificação e a estrutura química da substância, as suas propriedades físico-químicas, os resultados de quaisquer outros ensaios de toxicidade da substância *in vitro* ou *in vivo*, dados toxicológicos sobre substâncias estruturalmente semelhantes e a(s) utilização(ões) prevista(s) para a substância. Esta informação é necessária para satisfazer todos os envolvidos em relação à relevância do ensaio ao nível da protecção da saúde humana e será útil na determinação de uma dose inicial apropriada.

1.2 DEFINIÇÕES

Toxicidade oral aguda: refere-se ao conjunto de efeitos adversos que se manifestam após a administração oral de uma dose única da substância ou de várias doses num período de 24 horas.

Morte retardada: significa que o animal não morre nem aparenta estar moribundo num período de 48 horas, mas morre mais tarde, no decorrer do período de observação de 14 dias.

Dose: quantidade aplicada da substância de ensaio. O valor da dose é expresso em peso de substância de ensaio por unidade de peso do animal (mg/kg).

Toxicidade evidente: termo geral que descreve a ocorrência de sinais óbvios de toxicidade na sequência da administração da substância de ensaio (consultar os exemplos descritos em [3]) no qual a dose fixa mais elevada seguinte pode induzir, na maior parte dos animais, dor intensa, sinais persistentes de distúrbios graves, estado moribundo (os respectivos critérios são apresentados no Documento de Orientação de Critérios Específicos sem Dor (8) ou, provavelmente, mortalidade.

GHS: Sistema Harmonizado ao Nível Mundial (Globally Harmonised System) para a Classificação de Substâncias Químicas e Misturas. Trat-se de um trabalho conjunto da OCDE (saúde humana e ambiente), do Comité de Peritos em Transporte de Mercadorias Perigosas das Nações Unidas (propriedades físico-químicas) e da OIT (notificação de perigos) e coordenado pelo Programa Interorganizações para a Boa Gestão das Substâncias Químicas (Interorganisation Programme for the Sound Management of Chemicals [IOMC]).

Morte iminente: situação em que se prevê a ocorrência de estado moribundo ou morte antes da próxima observação planeada. Alguns dos sinais indicativos deste estado em roedores incluem convulsões, posição lateral, posição deitada e tremores. (Consultar o Documento de Orientação de Critérios Específicos sem Crueldade [8] para mais detalhes.)

DL₅₀ (Dose Letal Média): dose única, calculada estatisticamente, de uma substância susceptível de causar a morte de 50 % dos animais quando administrada por via oral. O valor da DL₅₀ é expresso em peso, de substância de ensaio, por unidade de peso do animal de ensaio (mg/kg).

Teste-limite refere-se a uma dose com o valor limite superior admitido pelo ensaio (2000 ou 5000 mg/kg).

Estado moribundo: encontrar-se num estado de morte ou de incapacidade de sobrevivência, mesmo com tratamento. (Consultar o Documento de Orientação de Critérios Específicos sem Dor [8] para mais detalhes.)

Morte previsível: presença de sinais clínicos indicativos de ocorrência de morte em determinada altura (antes do final planeado da experiência, por exemplo): incapacidade de alcançar água ou comida. (Consultar o Documento de Orientação de Critérios Específicos sem Dor [8] para mais detalhes.)

1.3 PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

São administradas doses gradualmente crescentes a grupos de animais do mesmo sexo, usando as doses fixas de 5, 50, 300 e 2000 mg/kg (excepcionalmente pode utilizar-se uma dose fixa adicional de 5000 mg/kg; consultar a secção 1.6.2). A dose inicial é escolhida com base num estudo preliminar de determinação de amplitude como a dose para qual é previsível obter alguns sinais de toxicidade sem causar efeitos tóxicos graves ou mortalidade. Os sinais clínicos e as condições associadas com dor, sofrimento e morte iminente, são descritos detalhadamente num Documento de Orientações da OCDE separado (8). Outros grupos de animais poderão ser sujeitos a dosagens, com doses fixas superiores ou inferiores, consoante a presença ou ausência de sinais de toxicidade ou mortalidade. Repete-se este procedimento até identificação da dose que causa toxicidade evidente ou que provoque uma e apenas uma morte ou até à dose mais elevada no caso de não serem observados quaisquer efeitos. O procedimento é imediatamente interrompido no caso de se registarem mortes à dose mais baixa.

1.4 DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.4.1 Seleção de espécies animais

A espécie preferida para ensaio é o rato, mas podem ser utilizadas outras espécies de roedores. Normalmente, utilizam-se fêmeas (7). Tal escolha deve-se ao facto de uma análise da literatura científica relativa aos ensaios convencionais de DL₅₀ revelar que, habitualmente, a diferença de sensibilidade entre os sexos é pequena e, nos casos em que são observadas diferenças, as fêmeas são, de um modo geral, ligeiramente mais sensíveis (10). No entanto, devem utilizar-se machos caso as propriedades toxicológicas ou toxicocinéticas descritas para substâncias químicas estruturalmente semelhantes indicarem que estes podem revelar maior sensibilidade. Quando o ensaio é efectuado com machos, deve ser apresentada uma justificação adequada.

Devem ser utilizados animais adultos, jovens e saudáveis e pertencentes a estirpes laboratoriais de uso corrente. As fêmeas devem ser núlparas e não-grávidas. No início da administração das doses, todos os animais devem ter idades compreendidas entre as 8 e as 12 semanas e um peso compreendido no intervalo de $\pm 20\%$ do peso médio dos animais aos quais foram anteriormente administradas doses.

1.4.2 Condições de alojamento e alimentação

A temperatura do compartimento experimental dos animais deve ser de 22°C ($\pm 3^\circ\text{C}$). A humidade relativa deverá ser 50-60%, embora sejam aceitáveis valores entre um mínimo de 30% e um máximo que, de preferência, não deverá exceder 70%, salvo durante os períodos de limpeza do compartimento. A iluminação deve ser artificial, com sequências de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. A alimentação pode basear-se em dietas de laboratório convencionais, com fornecimento ilimitado de água para beber. Os animais aos quais é administrada a mesma dose, podem ser agrupados na mesma gaiola desde que, o número de animais em cada gaiola não impeça a observação clara de cada um deles.

1.4.3 **Preparação dos animais**

Os animais são escolhidos ao acaso, marcados de modo a permitir uma identificação individualizada e mantidos nas suas gaiolas durante, pelo menos, 5 dias antes do início da administração das doses de modo a permitir que se aclimatem às condições laboratoriais.

1.4.4 **Preparação das doses**

De um modo geral, as substâncias de ensaio devem ser administradas num volume constante ao longo de toda a gama de doses a ensaiar através da variação da concentração na preparação da dose. No entanto, para o caso do ensaio de um produto ou de uma mistura no estado líquido, pode ser mais relevante para a avaliação de risco subsequente, a utilização da substância de ensaio sem qualquer diluição, ou seja, a concentração constante, sendo este um requisito apresentado por algumas autoridades competentes. Em qualquer dos casos, não deve ser excedido o volume máximo da dose a ser administrada. O volume máximo de líquido que pode ser administrado de cada vez, depende do tamanho do animal de ensaio. No caso de roedores, em condições normais o volume não deve exceder 1 ml/100 g de peso corporal. Para soluções aquosas, contudo, pode ser considerada a dose de 2 ml/100 g de peso corporal. Recomenda-se que, sempre que possível, seja considerada em primeiro lugar a utilização de uma solução/suspensão/emulsão aquosa; caso tal não seja viável, pode considerar-se o uso de uma solução/suspensão/emulsão em óleo (por exemplo, óleo de milho); em última instância, poderá eventualmente recorrer-se ao uso de soluções noutros excipientes. Devem conhecer-se as características tóxicas dos excipientes que não sejam a água. As doses devem ser preparadas pouco tempo antes da sua administração, a menos que a estabilidade da preparação ao longo do período de utilização seja conhecida e tenha sido considerada aceitável.

1.5 **PROCEDIMENTO**

1.5.1 **Administração de doses**

A administração deve ser feita numa toma única, por sonda esofágica, usando tubo estomacal ou cânula de intubação apropriada. Nos casos raros em que não é possível a administração de uma toma única, a dose pode ser administrada em fracções menores ao longo de um período não superior a 24 horas.

Os animais devem ser sujeitos a jejum antes da administração das doses (por exemplo, no caso de ratos, não deve dar-se comida durante a noite, mas deve manter-se o fornecimento de água; no caso de ratinhos, a comida deve ser suspensa durante 3-4 horas e deve ser mantida o fornecimento de água). Após o período de jejum, os animais devem ser pesados e deve ser administrada a substância de ensaio. Após a administração da substância, pode evitar dar-se comida durante 3-4 horas para ratos e 1-2 horas para ratinhos. Nos casos de administração fraccionada da dose durante um certo lapso de tempo, pode ser necessário dar comida e água aos animais consoante a duração do período de administração.

1.5.2 **Estudo de determinação de amplitude**

O objectivo do estudo de determinação de amplitude consiste em seleccionar a dose inicial apropriada para o estudo principal. A substância de ensaio é administrada a um único animal de uma forma sequencial segundo os fluxogramas do Anexo 1. O estudo de determinação de amplitude termina quando se pode seleccionar a dose inicial para o estudo principal (ou se for registada uma morte à dose fixa mais baixa).

Para o estudo de determinação de amplitude, a dose inicial é seleccionada de entre as doses fixas de 5, 50, 300 e 2000 mg/kg, como sendo a dose que se prevê, poder causar toxicidade evidente com base, se possível, nas evidências de dados *in vivo* e *in vitro* da mesma substância química ou de substâncias químicas estruturalmente semelhantes. Na ausência de tal informação, a dose inicial será de 300 mg/kg.

O intervalo de aplicação de doses a cada animal será de, pelo menos, 24 horas. Todos os animais devem ser observados durante um período de, pelo menos, 14 dias.

Excepcionalmente e apenas quando justificado por necessidades regulamentares específicas, pode ser considerada a utilização de uma dose fixa superior adicional de 5000 mg/kg (consultar o Anexo 3). Por razões de protecção dos animais, é desencorajado o ensaio de animais na Categoria 5 do SHG (2000-5000 mg/kg). Esta dose só deve ser considerada quando existe uma elevada probabilidade dos resultados deste ensaio terem relevância directa na protecção dos animais, da saúde humana ou do ambiente.

Nos casos em que o animal de ensaio morre no estudo de determinação de amplitude quando se aplica a dose fixa mais baixa (5 mg/kg), o procedimento normal consiste em terminar o estudo e classificar a substância na Categoria 1 do GHS (tal como se indica no Anexo 1). No entanto, se for necessária uma confirmação adicional, pode ser efectuado um procedimento experimental suplementar, tal como se descreve seguidamente. Aplica-se uma dose de 5 mg/kg a um segundo animal. Se o segundo animal morrer confirma-se a Categoria 1 do GHS e o estudo é imediatamente terminado. Se o segundo animal sobreviver, será então administrada a dose de 5 mg/kg a um máximo de mais três animais. Dado que neste caso o risco de mortalidade é elevado, a administração das doses a estes animais deve ser feita de um modo sequencial, de modo a proteger os animais. O intervalo, entre a aplicação da dose a cada um dos animais, deve ser suficiente para assegurar a provável sobrevivência do animal anterior. Se ocorrer uma segunda morte, a sequência de aplicação da dose será terminada imediatamente e não serão ensaiados mais animais. Dado que, a ocorrência de uma segunda morte (independentemente do número de animais ensaiados até ao final do estudo) é classificável no resultado A (2 ou mais mortes), segue-se a regra de classificação do Anexo 2 para a dose fixa de 5 mg/kg (Categoria 1, se ocorrerem 2 ou mais mortes, ou Categoria 2, se não ocorrer mais do que 1 morte). Além disso, apresentam-se no Anexo 4 as orientações sobre a classificação segundo o sistema da UE, válido até à implementação do novo GHS.

1.5.3 **Estudo principal**

1.5.3.1 *Número de animais e doses*

Nos do Anexo 2 apresentam-se os procedimentos a seguir após o ensaio com a dose inicial. É necessário proceder de uma das três formas seguintes: terminar os ensaios e classificar a substância na classe de perigosidade apropriada, prosseguir os ensaios com uma dose fixa superior, ou prosseguir os ensaios com uma dose fixa inferior. No entanto, por uma questão de protecção dos animais, a dose que causou morte, no estudo de determinação de amplitude, não deve ser repetida no estudo principal (consultar Anexo 2). A experiência prévia é indicativa de que o resultado mais provável da dose inicial será a possibilidade de classificação da substância, o que torna desnecessários quaisquer ensaios adicionais.

Será normalmente utilizado um total de cinco animais do mesmo sexo para cada dose investigada. O grupo de cinco animais será constituído por um animal do estudo prévio, ao qual foi administrada a dose seleccionada e de quatro outros animais (excepto, em casos raros, se a dose utilizada no estudo principal não tiver sido incluída no estudo de determinação de amplitude).

O intervalo de tempo entre a aplicação de doses em cada nível é determinado pelo aparecimento, duração e gravidade dos sinais de toxicidade. O tratamento dos animais com a dose seguinte deve ser adiado até ser possível estabelecer com segurança a sobrevivência dos animais previamente tratados. Recomenda-se um período de 3 ou 4 dias entre a administração das doses para cada nível de dosagem, se necessário, de modo a permitir a detecção de efeitos tóxicos retardados. O intervalo de tempo pode ser ajustado se necessário, por exemplo, em caso de resposta inconclusiva.

No caso de se considerar a utilização da dose fixa máxima de 5000 mg/kg, deve proceder-se em conformidade com o procedimento descrito no Anexo 3. (Consultar igualmente a secção 1.6.2.)

1.5.3.2 *Teste-limite*

O teste-limite é utilizado, essencialmente, em situações nas quais o analistatém informação indicativa de o material de ensaio não ser provavelmente tóxico, ou seja, só apresenta toxicidade acima das doses-limite regulamentadas. A informação sobre a toxicidade do material de ensaio pode ser obtida a partir de ensaios em compostos semelhantes ou de ensaios de misturas ou produtos semelhantes, tendo em consideração a identificação e percentagem dos componentes cuja relevância toxicológica é conhecida. Nos casos em que a informação sobre a toxicidade, do material de ensaio, é limitada ou inexistente, ou nos casos em que é previsível que o material a ensaiar seja tóxico, deve ser efectuado o estudo principal.

Usando o procedimento normal para este ensaio, o teste-limite pode ser efectuado graças a um estudo de determinação de amplitude com uma dose inicial de 2000 mg/kg (ou, excepcionalmente, de 5000 mg/kg), seguido da administração da dose a mais quatro animais.

1.6 **OBSERVAÇÕES**

Após a aplicação da dose, os animais devem ser observados individualmente pelo menos uma vez durante os primeiros 30 minutos e periodicamente durante as primeiras 24 horas, com especial cuidado nas primeiras 4 horas. Seguidamente, é necessário observar os animais diariamente durante um período de 14 dias, excepto se for necessário retirá-los do estudo e sacrificá-los, sem dor, por motivo do bem-estar dos animais, ou se forem encontrados mortos. No entanto, a duração do período de observação não deve ser estabelecida de uma forma rígida, mas determinada com base nas reacções de toxicidade, velocidade do seu aparecimento e duração do período de recuperação, que pode ser prolongado, se for considerado necessário. O momento em que os sinais de toxicidade aparecem e desaparecem são importantes, sobretudo se os sinais de toxicidade tendem a aparecer de uma forma retardada (11). Todas as observações são registadas sistematicamente, mantendo-se uma ficha individual para cada animal.

Serão necessárias observações adicionais se os animais continuarem a apresentar sinais de toxicidade. As observações devem incluir alterações na pele e pêlos, olhos e membranas mucosas, aparelho respiratório, aparelho circulatório, sistema nervoso autónomo e central, assim como da actividade somatomotora e comportamental. Devem ser observados com especial atenção os tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sono e coma. Devem ser tomados em consideração os princípios e critérios resumidos no Documento de Orientação de Critérios Específicos sem Dor (8). Os animais que forem encontrados em estado moribundo e os animais que apresentarem dores violentas ou sinais de sofrimento grave e continuado devem ser sacrificados sem dor. Quando os animais forem sacrificados a fim de evitar dor ou se forem encontrados mortos, deve ser registado o momento da morte com o maior rigor possível.

1.6.1 **Peso corporal**

O peso individual dos animais deve ser determinado pouco antes da administração da substância de ensaio e, seguidamente, pelo menos uma vez por semana. Devem ser calculadas e registadas todas as variações de peso. No final do ensaio, os animais sobreviventes são pesados e, seguidamente, sacrificados sem dor.

1.6.2 **Patologia**

Todos os animais de ensaio (incluindo os que morreram durante o ensaio ou que foram retirados do ensaio por motivos de preservação do seu bem-estar) devem ser sujeitos a uma autópsia pouco pormenorizada. Devem ser registadas as alterações patológicas principais observadas em cada animal. Deve também ser considerada a realização de um exame microscópico dos órgãos que mostrem sinais de patologia grave em animais que sobreviveram, no mínimo, durante 24 horas após a aplicação da dose inicial, já que este exame pode fornecer informação útil.

1

2

2 **DADOS**

Devem ser apresentados os dados individuais para cada animal. Adicionalmente, todos os dados devem ser resumidos em forma tabular, mostrando, para cada grupo de ensaio, o número de animais utilizado, o número de animais que apresentaram sinais de toxicidade, o número de animais que foram encontrados mortos durante o ensaio ou que foram sacrificados a fim de evitar dor, o momento da morte de cada um dos animais, a descrição e evolução temporal dos efeitos de toxicidade e sua reversibilidade, assim como os resultados da autópsia.

3

3 **RELATÓRIO**

3.1

RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deverá incluir as seguintes informações:

Substância de ensaio:

- natureza física, pureza e propriedades físico-químicas relevantes (incluindo isomerização);
- dados relativos à identificação química, incluindo número CAS.

Excipiente (se apropriado):

- caso o excipiente não seja água, uma justificação para a sua escolha.

Animais de ensaio:

- espécie/estirpe usada;
- estado microbiológico do animal, caso seja conhecido;
- número, idade e sexo dos animais (incluindo, quando necessário, uma justificação para o uso de machos em vez de fêmeas);
- proveniência, condições de alojamento, dieta, etc.;

Condições do ensaio:

- informação pormenorizada sobre a formulação da substância de ensaio, incluindo informação detalhada sobre a forma física do material administrado;
- informação pormenorizada sobre a administração da substância de ensaio, incluindo volume das doses e momento de aplicação;
- informação pormenorizada sobre a qualidade dos alimentos e da água (incluindo tipo e origem da dieta e origem da água)
- justificação para a escolha da dose inicial.

Resultados:

- tabela dos dados de resposta e da dose para cada animal (ou seja, animais que apresentaram sinais de toxicidade, incluindo mortalidade, natureza, gravidade e duração dos efeitos);
- tabela com indicação do peso corporal e suas variações;
- pesos individuais de animais no dia em que é aplicada a dose, uma vez por semana no restante período e na altura da sua morte ou sacrifício;
- data e momento da morte, no caso de ocorrência de morte antes do sacrifício previsto;
- evolução temporal do aparecimento de sintomas de toxicidade e sua reversibilidade, para cada animal;
- resultados da autópsia e resultados histopatológicos para cada animal, caso se encontrem disponíveis.

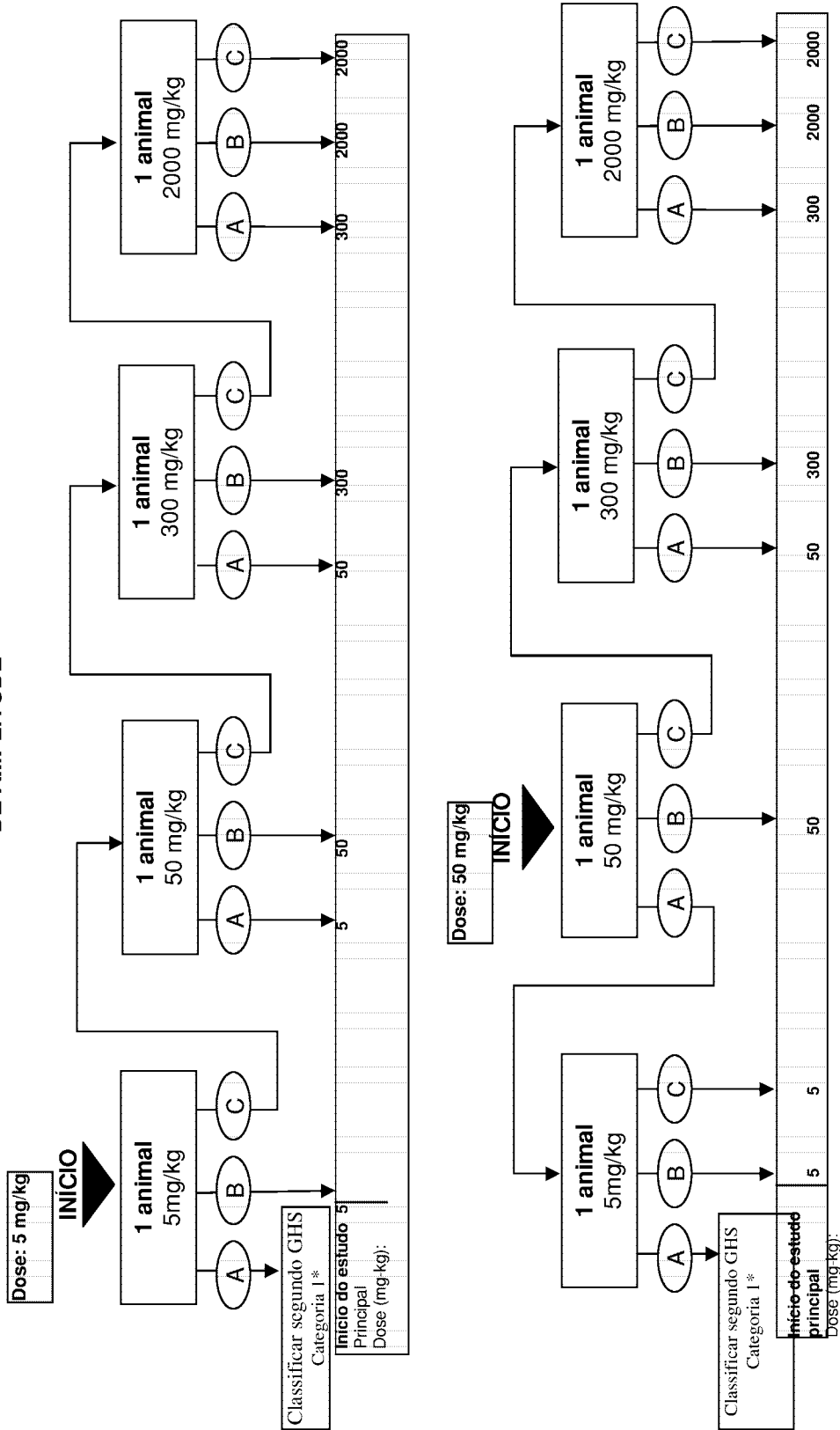
Análise dos resultados.

Conclusões.

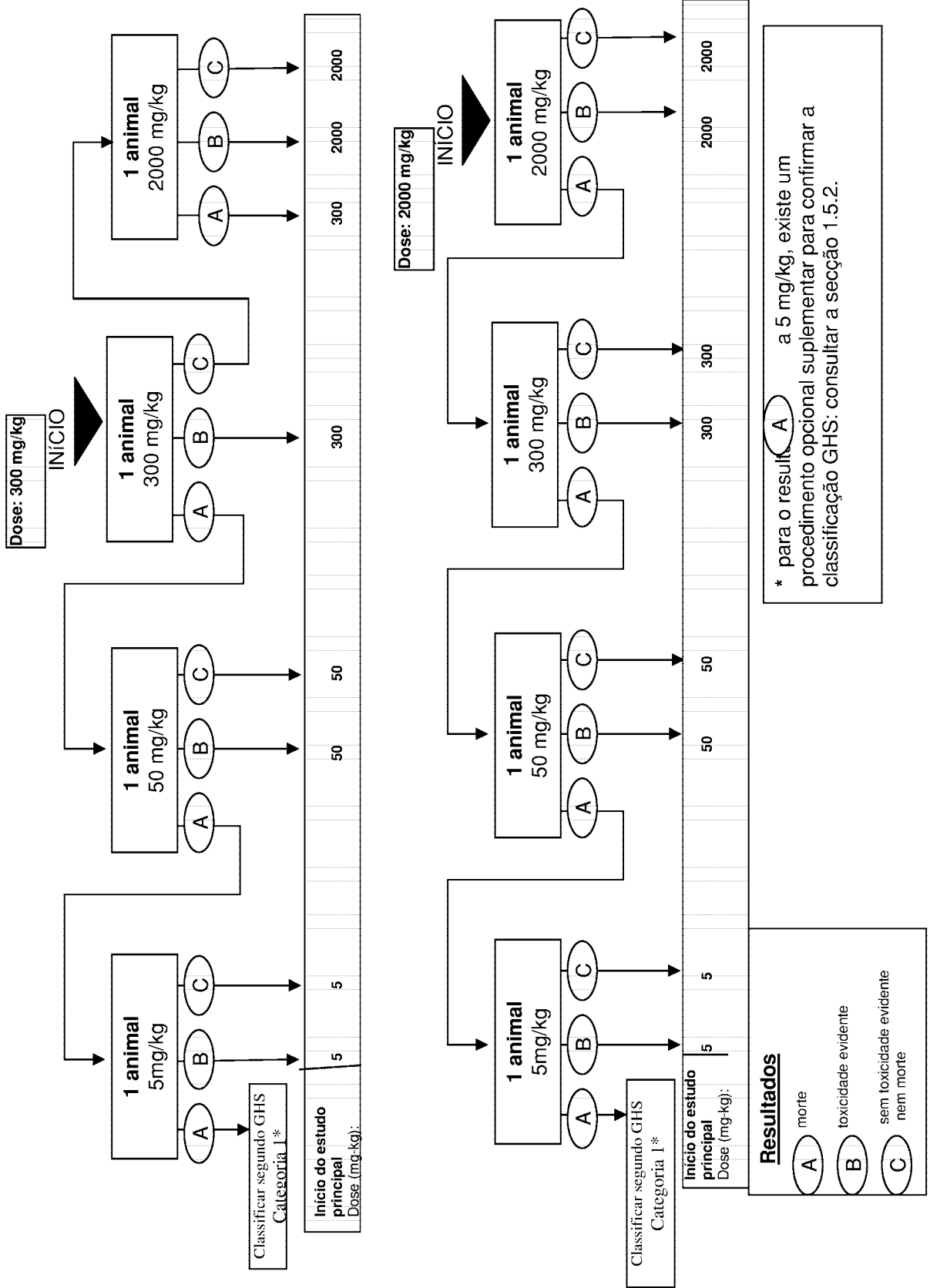
4**REFERÊNCIAS**

- (1) British Toxicology Society Working Party on Toxicity (1984). Special report: a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. *Biometrics*, **20**, 385.
- (2) Van den Heuvel, M.J., Dayan, A.D. e Shillaker, R.O. (1987). Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity. *Human Toxicol.*, **6**, 279-291.
- (3) Van den Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, R.J., Koundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., Pelling, D., Tomlinson, N.J. e Walker, A.P. (1990). The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD₅₀ test. *Fd. Chem. Toxicol.* **28**, 469-482.
- (4) Whitehead, A. e Curnow, R.N. (1992). Statistical evaluation of the fixed-dose procedure. *Fd. Chem. Toxicol.*, **30**, 313-324.
- (5) Stallard, N. e Whitehead, A. (1995). Reducing numbers in the fixed-dose procedure. *Human Exptl. Toxicol.* **14**, 315-323.
- (6) Stallard, N., Whitehead, A. and Ridgeway, P. (2002). Statistical evaluation of the revised fixed dose procedure. *Hum. Exp. Toxicol.*, **21**, 183-196.
- (7) OECD (2001). Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris
- (8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 19.
- (9) OECD (1998). Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [<http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html>].
- (10) Lipnick, R.L., Cotruvo, J.A., Hill, R.N., Bruce, R.D., Stitzel, K.A., Walker, A.P., Chu, I., Goddard, M., Segal, L., Springer, J.A. e Myers, R.C. (1995). Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD₅₀, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures. *Fd. Chem. Toxicol.* **33**, 223-231.
- (11) Chan P.K e A.W. Hayes (1994) Chapter 16 Acute Toxicity and Eye Irritation . Em: *Principles and Methods of Toxicology*. 3^a Edição. A.W. Hayes , Editor. Raven Press, Ltd. New York, USA.

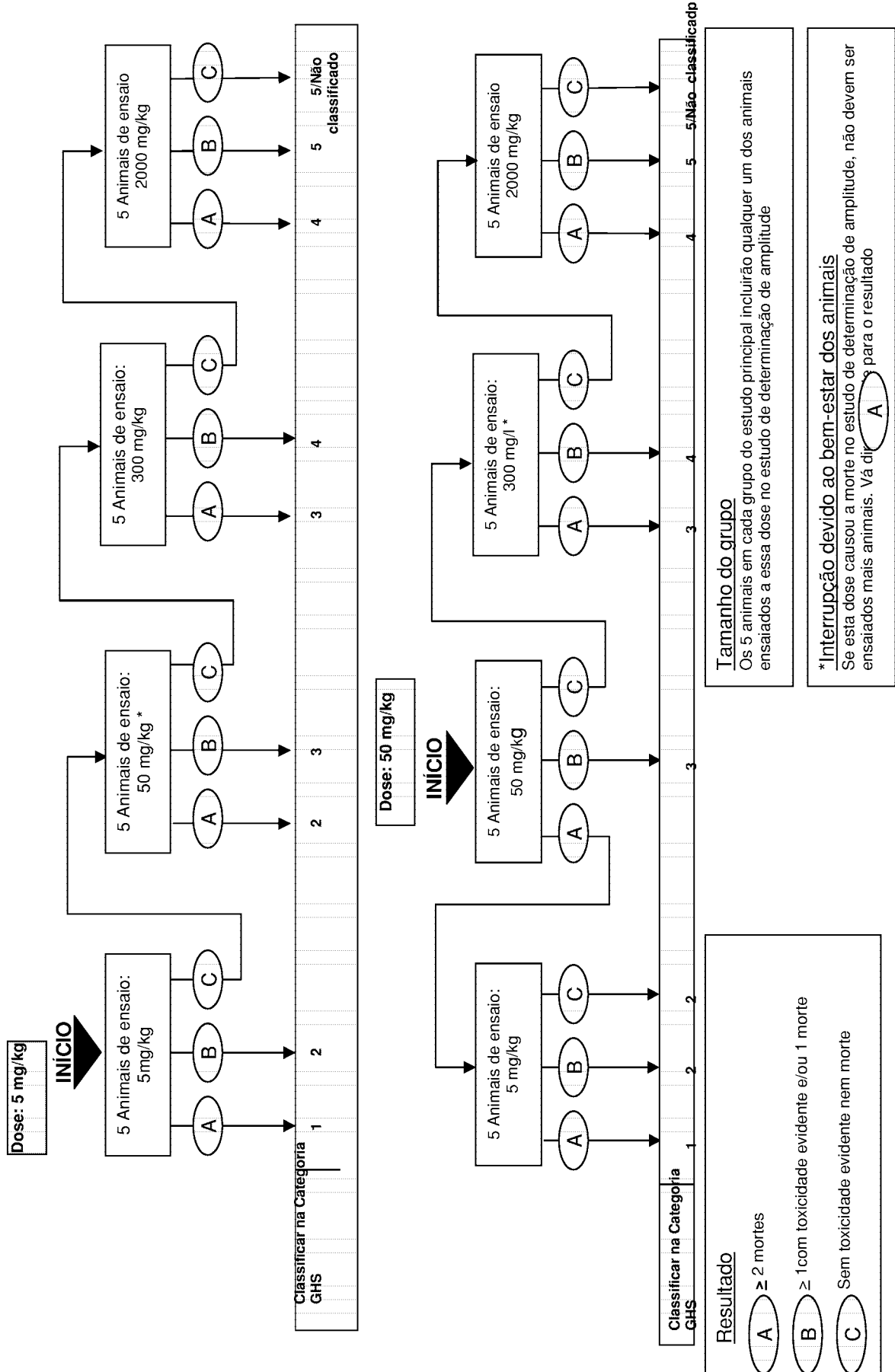
ANEXO 1 FLUXOGRAMA PARA O ESTUDO DE DETERMINAÇÃO DE AMPLITUDE



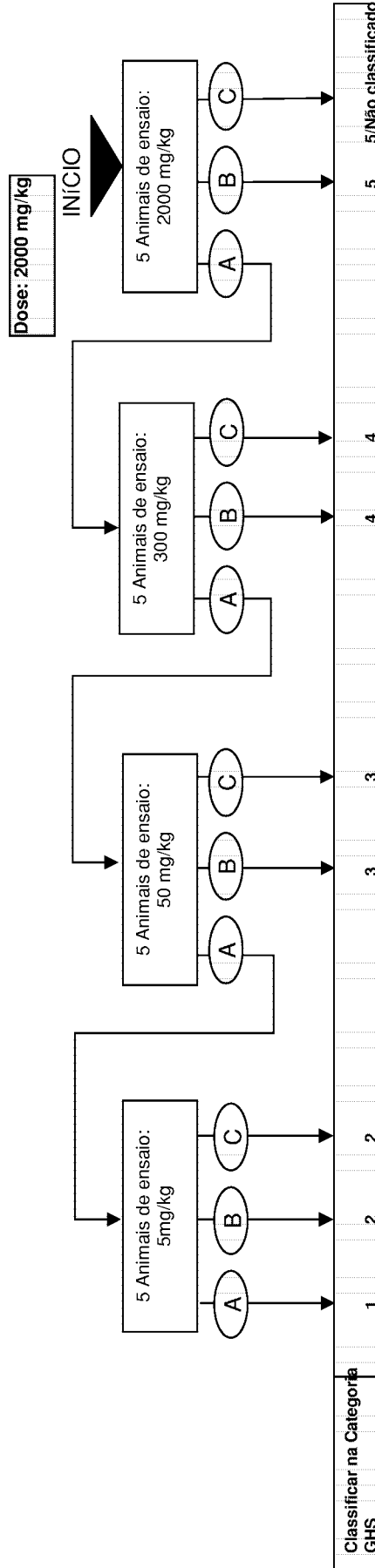
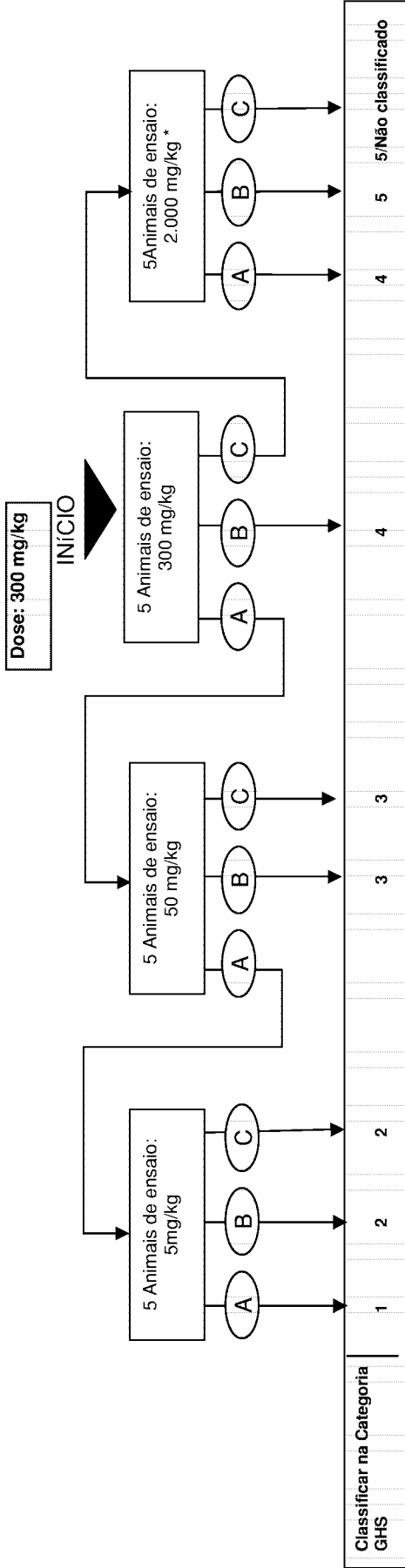
ANEXO 1 FLUXOGRAMA PARA O ESTUDO DE DETERMINAÇÃO DE AMPLITUDE



ANEXO 2 FLUXOGRAMA PARA O ESTUDO PRINCIPAL



ANEXO 2 FLUXOGRAMA PARA O ESTUDO PRINCIPAL



Resultado

A ≥ 2 mortes

B ≥ 1 com toxicidade evidente e/ou 1 morte

C Sem toxicidade evidente nem morte

Tamanho do grupo
Os 5 animais em cada grupo do estudo principal incluirão qualquer um dos animais ensaiados a essa dose no estudo de determinação de amplitude

***Interrupção devido ao bem-estar dos animais**
Se esta dose causou a morte no estudo de determinação de amplitude, não devem ser ensaiados mais animais. Vá dig **A** para o resultado

ANEXO 3

CRITÉRIOS PARA A CLASSIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS DE ENSAIO COM VALORES PREVISÍVEIS DE LD₅₀ SUPERIORES A 2000 MG/KG PARA AS QUAIS NÃO É NECESSÁRIO EFECTUAR ENSAIO.

Os critérios para a Categoria 5 de perigosidade destinam-se a permitir a identificação de substâncias de ensaio que representam um perigo de toxicidade aguda relativamente baixo, mas que, em certas circunstâncias, podem representar perigo para populações vulneráveis. É previsível que estas substâncias apresentem valores de DL₅₀ orais ou dérmicos na gama de 2000-5000 mg/kg ou dose equivalente para outras vias. As substâncias de ensaio podem ser classificadas na categoria de perigosidade definida por: 2000mg/kg <DL₅₀ < 5000mg/kg (Categoria 5 do GHS) nos seguintes casos:

- a) se classificadas nesta categoria por qualquer dos esquemas de ensaio do Anexo 2, baseados nas incidências de mortalidade;
- b) se houver prova fiável indicativa de que os valores de DL₅₀ se encontram na gama correspondente à Categoria 5 ou se outros estudos em animais ou sobre efeitos de toxicidade em seres humanos forem indicativos de preocupação acentuada em relação à salvaguarda da saúde humana;
- c) através de extrapolação, estimativa ou medição de dados, desde que não seja garantida a atribuição a uma classe mais perigosa, e
 - quando existe informação fiável indicativa de efeitos de toxicidade significativos em seres humanos, ou
 - quando não é registada mortalidade nos ensaios por via oral até doses correspondentes aos valores para a Categoria 4, ou
 - quando os especialistas são da opinião de que não se verificam sintomas clínicos de toxicidade significativos para ensaios até doses com valores correspondentes à Categoria 4, com excepção de diarreia, errecção pilosa ou má aparência, ou
 - nos casos em que os especialistas confirmem a existência de informação fiável, proveniente de outros estudos com animais, indicativa da existência de potenciais efeitos agudos significativos.

ENSAIOS COM DOSES SUPERIORES A 2000 MG/KG

Apenas pode ser considerada a utilização de uma dose fixa superior adicional de 5000 mg/kg, em casos excepcionais e justificados por necessidades específicas legais. Devido ao reconhecimento da necessidade de proteger o bem-estar dos animais, os ensaios com doses de 5000 mg/kg são desencorajados e só devem ser considerados no caso de ser muito provável que os resultados desse ensaio tenham especial relevância para a protecção animal ou da saúde humana (9).

Estudo de determinação de amplitude

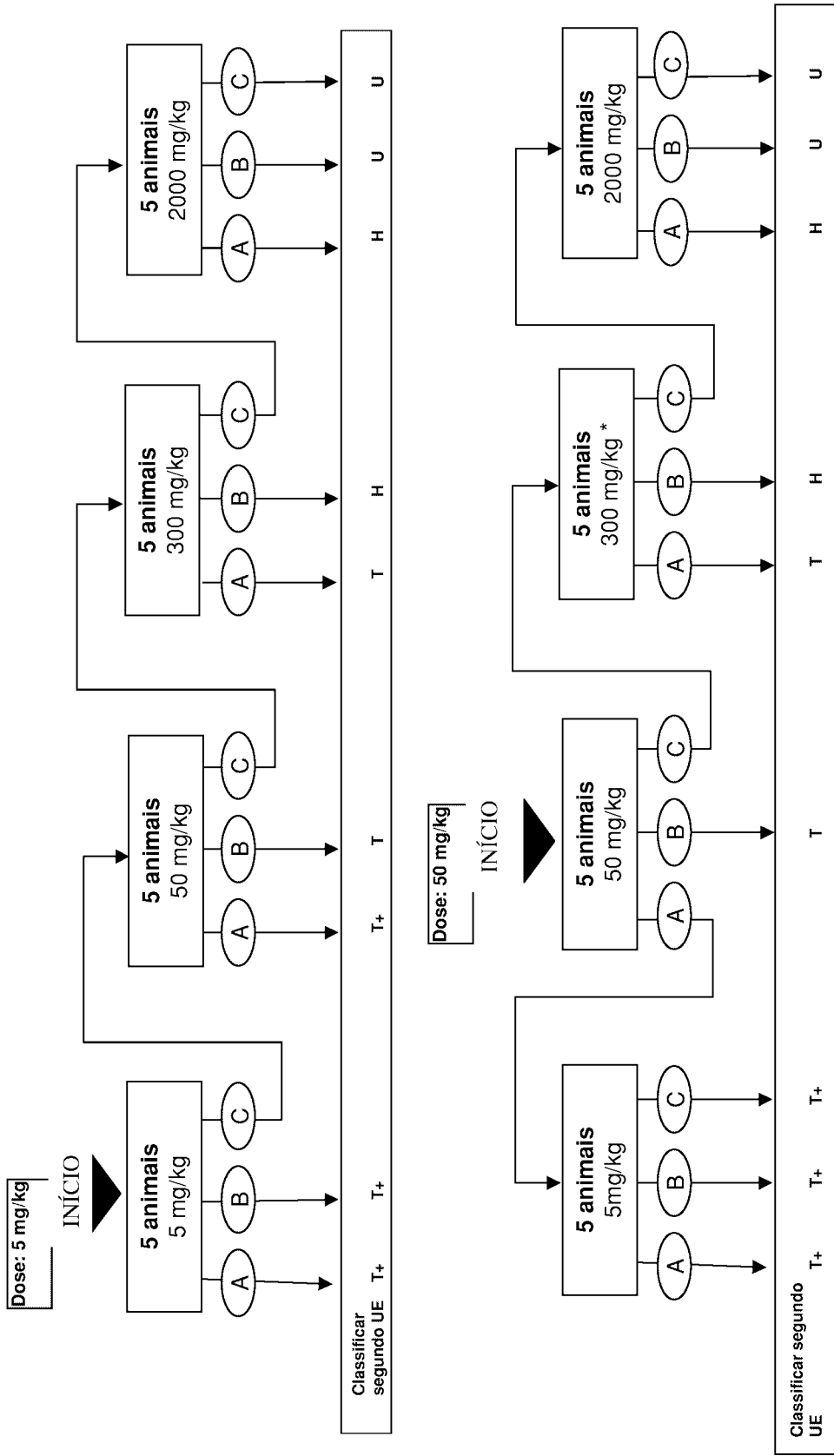
As regras de decisão para o procedimento sequencial apresentado, no Anexo 1, serão aplicadas ao ensaio com dose de 5000 mg/kg. Assim, quando se utiliza uma dose de 5000 mg/kg no estudo de determinação de amplitude, o resultado A (morte) requer o ensaio com um segundo animal com uma dose de 2000 mg/kg. Os resultados B e C (toxicidade evidente ou sem toxicidade) permitem a selecção da dose de 5000 mg/kg, como dose inicial do estudo principal. De igual modo, para uma dose inicial diferente de 5000 mg/kg, o ensaio é realizado até à dose de 5000 mg/kg se o resultado da dose de 2000 mg/kg for B ou C. No caso de se obter um resultado A na subsequente dose de 5000 mg/kg, a dose inicial do estudo principal deverá ser 2000 mg/kg, enquanto para resultados B ou C deve utilizar-se uma dose inicial de 5000 mg/kg no estudo principal.

Estudo principal

As regras de decisão para o procedimento sequencial apresentado, no Anexo 2, serão aplicadas ao ensaio com dose de 5000 mg/kg. Assim, quando se utiliza uma dose de 5000 mg/kg no estudo principal, o resultado A (≥ 2 mortes) requer o ensaio com um segundo grupo, com uma dose de 2000 mg/kg. Os resultados B (toxicidade evidente e/ou ≤ 1 morte) ou C (sem toxicidade) não permitem a classificação da substância em conformidade com o GHS. De igual modo, para uma dose inicial diferente de 5000 mg/kg, o ensaio é realizado até à dose de 5000 mg/kg se o resultado da dose de 2000 mg/kg for C. No caso de se obter um resultado A na subsequente dose de 5000 mg/kg, a substância será classificada na Categoria 5 do GHS, enquanto um resultado B ou C não permite a classificação da substância.

ANEXO 4

MÉTODOS DE ENSAIO B.1 bis – Orientações sobre a classificação em conformidade com o esquema transitório da UE, válido até à implementação total do Sistema de Classificação Harmonizado a Nivel Mundial (GHS) (obtido da referência (8))



Resultado

A ≥ 2 mortes

B ≥ 1 com toxicidade evidente r/ou 1 morte

C Sem toxicidade evidente nem mortes

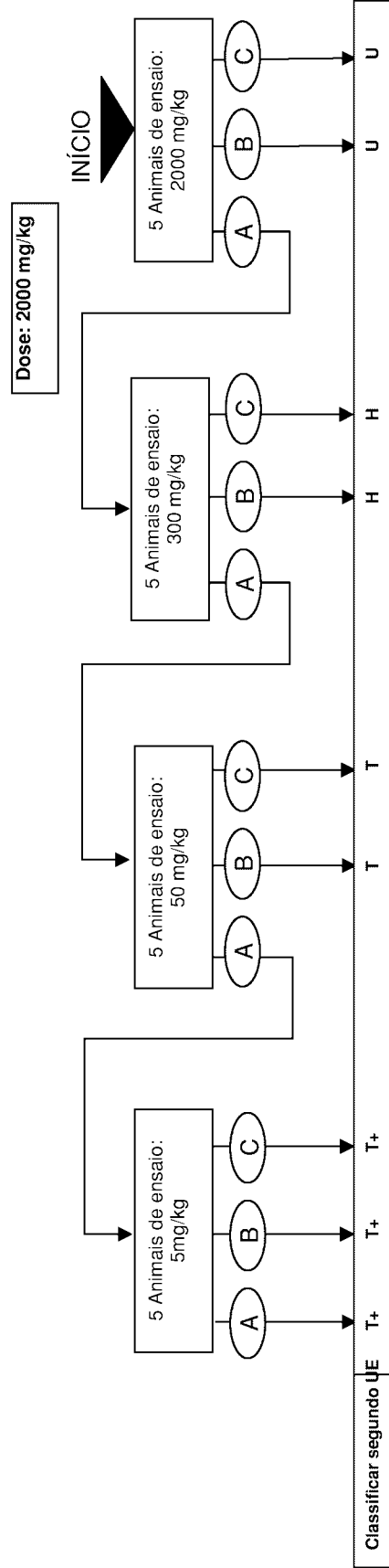
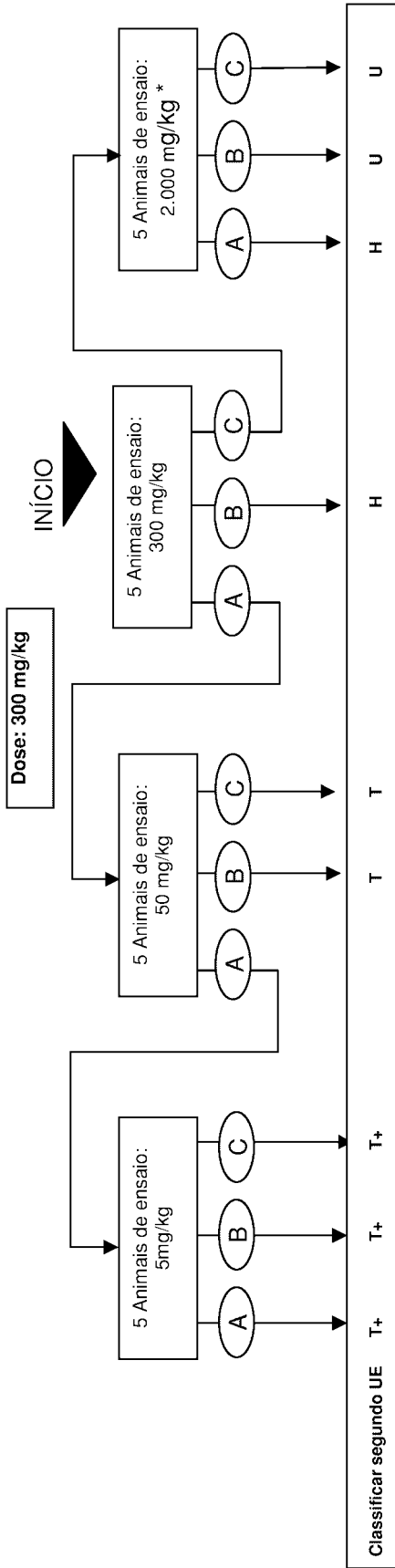
T+ = muito tóxico
 T = tóxico
 H = nocivo
 U = não classificado

* **Bem-estar animal** Se esta dose causou morte no estudo de determinação de amplitude, não devem ser ensaiados mais animais. Vá directamente para o resultado **A**

Dimensão do grupo: Os 5 animais em cada grupo do estudo principal incluirão qualquer um dos animais ensaiados a essa dose no estudo de determinação de amplitude.

ANEXO 4

MÉTODO DE ENSAIO B.1 bis – Orientações sobre a classificação em conformidade com o esquema transitório da UE, válido até à implementação total do Sistema de Classificação Harmonizado a Nivel Mundial (GHS) (obtido da referência (8))



Resultado

A ≥ 2 mortes

B ≥ 1 com toxicidade evidente e/ou 1 morte

C Sem toxicidade evidente nem mortes

T+ = muito tóxico
 T = tóxico
 H = nocivo
 U = não classificado

Dimensão do grupo
 Os 5 animais em cada grupo do estudo principal incluirão qualquer um dos animais ensaiados a essa dose no estudo de determinação de amplitude.

***Bem-estar dos animais**
 Se esta dose causou a morte no estudo de determinação de amplitude, não devem ser ensaiados mais animais **A**

ANEXO 2C

B.1 tris. TOXICIDADE ORAL AGUDA - MÉTODO DE CLASSIFICAÇÃO DE TOXICIDADE AGUDA**1. MÉTODO**

O presente método é equivalente ao "Test Guideline" TG 423 da OCDE (2001)

1.1 INTRODUÇÃO

O método de classificação de toxicidade aguda (1) estabelecido no presente ensaio é um procedimento gradual que utiliza 3 animais do mesmo sexo por etapa. Em média, consoante a mortalidade e/ou o estado moribundo dos animais, são necessárias 2-4 etapas para avaliar a toxicidade aguda da substância de ensaio. O presente procedimento é reprodutível, utiliza uma quantidade muito limitada de animais e permite classificar as substâncias de um modo semelhante a outros métodos de ensaio de toxicidade aguda. O método de classificação de toxicidade aguda baseia-se na avaliação biométrica (2)(3)(4)(5) com doses fixas, separadas apropriadamente de modo a permitir a avaliação da substância para fins de classificação e avaliação de perigosidade. O método, adoptado inicialmente em 1996, foi amplamente validado *in vivo* relativamente aos dados de LD_{50} publicados na literatura nacional (6) e internacional (7).

No Documento de Orientação sobre Ensaio de Toxicidade Oral Aguda (8) podem consultar-se as orientações sobre a selecção do método de ensaio mais apropriado a determinado fim. Este Documento de Orientação contém igualmente informação adicional sobre o procedimento e interpretação do Método de Ensaio B.1 tris.

No presente método de ensaio, não é necessário administrar doses de substâncias de ensaio, que comprovadamente causam dor e sofrimento óbvios, devido à sua acção corrosiva ou gravemente irritante. Os animais moribundos ou que apresentam sinais óbvios de dor ou sofrimento grave e continuado devem ser sacrificados sem dor e, na interpretação dos resultados do ensaio, considerados do mesmo modo que os animais que morrem durante o ensaio. Os critérios sobre a decisão de sacrificar animais moribundos ou em sofrimento, bem como as orientações sobre o reconhecimento de morte previsível ou iminente, estão incluídos separadamente num Documento de Orientação (9).

O presente método utiliza doses estabelecidas previamente e os resultados permitem classificar a substância em conformidade com o Sistema Harmonizado ao Nível Mundial (GHS) para a classificação de substâncias químicas que causam toxicidade aguda (10).

Em princípio, o método não se destina a calcular rigorosamente os valores de LD_{50} , mas permite a determinação de gamas de exposição definidas, nas quais é expectável a ocorrência de mortes, dado que um dos principais critérios específicos, do presente ensaio, é a morte de uma dada proporção de animais. O método permite determinar valores de DL_{50} somente quando, pelo menos, duas das doses utilizadas resultam numa mortalidade superior a 0% e inferior a 100%. A utilização de uma selecção de doses, previamente estabelecidas, independentemente da substância de ensaio, com a classificação especificamente dependente do número de animais observados em vários estados melhora as condições de comunicação de resultados entre laboratórios, bem como a consistência e a repetibilidade dos resultados.

Antes de efectuar o estudo, o laboratório de ensaio deve ter em conta toda a informação disponível sobre a substância de ensaio. Esta informação incluirá a identificação e a estrutura química da substância, as suas propriedades físico-químicas, os resultados de quaisquer outros ensaios de toxicidade da substância *in vitro* ou *in vivo*, dados toxicológicos sobre substâncias estruturalmente semelhantes e a(s) utilização(ões) prevista(s) para a substância. Esta informação é necessária para satisfazer todos os envolvidos em relação à relevância do ensaio ao nível da protecção da saúde humana e será útil na determinação da dose inicial mais adequada.

1.2 DEFINIÇÕES

Toxicidade oral aguda: refere-se ao conjunto de efeitos adversos que se manifestam após a administração oral de uma dose única da substância ou de várias doses num período de 24 horas.

Morte retardada: significa que o animal não morre nem aparenta estar moribundo num período de 48 horas, mas morre mais tarde, no decorrer do período de observação de 14 dias.

Dose: quantidade aplicada da substância de ensaio. O valor da dose é expresso em peso de substância de ensaio por unidade de peso de animal de ensaio (por exemplo, mg/kg).

GHS: Sistema Harmonizado ao Nível Mundial (Globally Harmonised System) para a Classificação de Substâncias Químicas e Misturas. Trata-se de um trabalho conjunto da OCDE (saúde humana e ambiente), do Comité de Peritos em Transporte de Mercadorias Perigosas das Nações Unidas (propriedades físico-químicas) e da OIT (notificação de perigos) e coordenado pelo Programa Interorganizações para a Boa Gestão das Substâncias Químicas (Interorganisation Programme for the Sound Management of Chemicals [IOMC]).

Morte iminente: situação em que se prevê a ocorrência de estado moribundo ou morte antes da próxima observação planeada. Alguns dos sinais indicativos deste estado em roedores incluem convulsões, posição lateral, posição deitada e tremores. (Para informação detalhada, consultar o Documento de Orientação sobre Critérios Específicos sem Dor[9]).

DL₅₀ (Dose Letal Média): dose única, calculada estatisticamente, de uma substância susceptível de causar a morte de 50% dos animais quando administrada por via oral. O valor da DL₅₀ é expresso em peso de substância de ensaio por unidade de peso de animal de ensaio (mg/kg).

Dose-limite refere-se a uma dose com o valor-limite superior admitido pelo ensaio (2000 ou 5000 mg/kg).

Estado moribundo: encontrar-se num estado de morte ou de incapacidade de sobrevivência, mesmo com tratamento. (Para informação detalhada, consultar o Documento de Orientação sobre Critérios Específicos sem Dor[9]).

Morte previsível: presença de sinais clínicos indicativos de ocorrência de morte em determinada altura, antes do final planeado da experiência; por exemplo: incapacidade de alcançar água ou comida. (Consultar o Documento de Orientação de Critérios Específicos sem Dor[9] para mais detalhes).

1.3 PRINCÍPIO DO ENSAIO

O princípio do presente ensaio é que, com base num procedimento gradual com a utilização de um número mínimo de animais por etapa, é possível obter informação suficiente sobre a toxicidade aguda de uma substância de ensaio, de modo a permitir a sua classificação. A substância é administrada, por via oral, a um grupo de animais de ensaio a uma das doses anteriormente definidas. A substância é ensaiada utilizando um procedimento gradual, em que cada etapa utiliza três animais do mesmo sexo (normalmente fêmeas). A existência ou inexistência de mortalidade, relacionada com composto, dos animais tratados numa dada etapa, determinará a etapa seguinte, ou seja:

- não são necessários mais ensaios,
- é administrada a mesma dose a mais três animais,
- é administrada a dose seguinte, maior ou menor, a mais três animais.

No Anexo I apresenta-se informação detalhada sobre o procedimento de ensaio. O método permitirá uma avaliação conducente à classificação da substância de ensaio numa das classes de toxicidade definidas pelos valores-limite de DL₅₀.

1.4 DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.4.1 **Seleção de espécies animais**

A espécie de roedores preferida para ensaio é o rato, mas podem ser utilizadas outras espécies de roedores. Normalmente, utilizam-se fêmeas (9). Tal escolha deve-se ao facto de uma análise da literatura científica relativa aos ensaios convencionais de DL₅₀ revelar que, habitualmente, a diferença de sensibilidade entre os sexos é pequena e, nos casos em que são observadas diferenças, as fêmeas são, de um modo geral, ligeiramente mais sensíveis (11). No entanto, devem utilizar-se machos, caso as propriedades toxicológicas ou toxicocinéticas descritas para substâncias químicas estruturalmente semelhantes indicarem que estes podem revelar maior sensibilidade. Quando o ensaio é efectuado com machos, deve ser apresentada uma justificação adequada.

Devem ser utilizados animais adultos, jovens e saudáveis e pertencentes a estirpes laboratoriais de uso corrente. As fêmeas devem ser nulíparas e não-grávidas. No início da administração das doses, todos os animais devem ter idades compreendidas entre as 8 e as 12 semanas e um peso compreendido no intervalo de $\pm 20\%$ do peso médio dos animais aos quais foram anteriormente administradas doses.

1.4.2 **Condições de alojamento e alimentação**

A temperatura do compartimento experimental dos animais deve ser 22°C ($\pm 3^\circ\text{C}$). A humidade relativa deverá ser 50%-60%, embora sejam aceitáveis valores entre um mínimo de 30% e um máximo que, de preferência, não deverá exceder 70%, salvo durante os períodos de limpeza do compartimento. A iluminação deve ser artificial, com sequências de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. A alimentação pode basear-se em dietas de laboratório convencionais, com fornecimento ilimitado de água para beber. Os animais aos quais é administrada a mesma dose podem ser agrupados na mesma gaiola, desde que o número de animais em cada gaiola não impeça a observação clara de cada um deles.

1.4.3 **Preparação dos animais**

Os animais são escolhidos ao acaso, marcados de modo a permitir uma identificação individualizada e mantidos nas suas gaiolas durante, pelo menos, 5 dias antes do início da administração das doses para que se aclimatem às condições laboratoriais.

1.4.4 **Preparação das doses**

De um modo geral, as substâncias de ensaio devem ser administradas num volume constante ao longo de toda a gama de doses a ensaiar através da variação da concentração na preparação da dose. No entanto, para o caso do ensaio de um produto ou de uma mistura no estado líquido, pode ser mais relevante para a avaliação de risco subsequente a utilização da substância de ensaio sem qualquer diluição, ou seja, a concentração constante, sendo este um requisito apresentado por algumas autoridades competentes. Em qualquer dos casos, não deve ser excedido o volume máximo da dose a ser administrada. O volume máximo de líquido que pode ser administrado de cada vez depende do tamanho do animal de ensaio. No caso de roedores, o volume não deve exceder, em condições normais, 1 ml/100 g de peso corporal. Para soluções aquosas, contudo, pode ser considerada a dose de 2 ml/100 g de peso corporal. Recomenda-se que, sempre que possível, seja considerada em primeiro lugar a utilização de uma solução/suspensão/emulsão aquosa; caso tal não seja viável, pode considerar-se o uso de uma solução/suspensão/emulsão em óleo (por exemplo, óleo de milho); em última instância, poderá eventualmente recorrer-se ao uso de soluções noutros excipientes. Devem conhecer-se as características toxicológicas dos excipientes que não sejam a água. As doses devem ser preparadas pouco tempo antes da sua administração, a menos que a estabilidade da preparação ao longo do período de utilização seja conhecida e tenha sido considerada aceitável.

1.5 PROCEDIMENTO

1.5.1 **Administração de doses**

A administração por sonda esofágica deve ser feita, de preferência, numa toma única, usando um tubo estomacal ou uma cânula de intubação apropriada. Nos casos raros em que não é possível a administração de uma toma única, a dose pode ser administrada em fracções menores ao longo de um período não superior a 24 horas.

Os animais devem ser sujeitos a jejum antes da administração das doses (por exemplo, no caso de ratos, não deve dar-se comida durante a noite, mas deve manter-se o fornecimento de água; no caso de ratinhos, a comida deve ser suspensa durante 3-4 horas e deve ser mantida o fornecimento de água). Após o período de jejum, os animais devem ser pesados e deve ser administrada a substância de ensaio. Após a administração da substância, pode evitar dar-se comida durante 3-4 horas para ratos e 1-2 horas para ratinhos. Nos casos de administração fraccionada da dose durante um certo lapso de tempo, pode ser necessário dar comida e água aos animais, consoante a duração do período de administração.

1.5.2 **Número de animais e doses**

São utilizados três animais em cada etapa. A dose a utilizar inicialmente deve ser seleccionada entre uma das quatro doses fixas de 5, 50, 300 e 2000 mg/kg de peso corporal. A dose inicial deve ser aquela que apresenta maior probabilidade de induzir mortalidade em alguns dos animais tratados. Os fluxogramas do Anexo 1 descrevem o procedimento a seguir para cada uma das doses iniciais. Apresentam-se ainda, no Anexo 4 as orientações sobre a classificação segundo o sistema da UE, em vigor até à implementação do novo GHS.

Quando a informação disponível for indicativa de que não é muito provável que ocorra mortalidade com a maior dose inicial (2000 mg/kg de peso corporal), deve efectuar-se um teste-limite. Quando não existir qualquer informação disponível sobre a substância de ensaio, recomenda-se a utilização de uma dose inicial de 300 mg/kg de peso corporal por razões de protecção dos animais.

O intervalo de tempo entre os grupos de tratamento é determinado pelo aparecimento, duração e gravidade dos sinais de toxicidade. O tratamento dos animais com a dose seguinte deve ser adiado até ser possível estabelecer com segurança a sobrevivência dos animais previamente tratados.

Excepcionalmente e apenas quando justificado por necessidades legais específicas, pode ser considerada a utilização de uma dose fixa superior adicional de 5000 mg/kg (consultar o Anexo 2). Por razões de protecção dos animais, é desencorajado o ensaio de animais na Categoria 5 do SHG (2000-5000 mg/kg) e esta dose só deve ser considerada quando existe uma elevada probabilidade dos resultados deste ensaio terem relevância directa para a protecção da saúde humana ou dos animais ou do ambiente.

1.5.3 **Teste-limite**

O teste-limite é utilizado, essencialmente, em situações nas quais o analista tem informação indicativa do material de ensaio não ser provavelmente tóxico, ou seja, só apresenta toxicidade acima das doses limite regulamentadas. A informação sobre a toxicidade do material de ensaio pode ser obtida a partir de ensaios em compostos semelhantes ou de ensaios de misturas ou produtos semelhantes, tendo em consideração a identificação e percentagem dos componentes cuja relevância toxicológica é conhecida. Nos casos em que a informação sobre a sua toxicidade é limitada ou inexistente ou nos casos em que é previsível que o material a ensaiar seja tóxico, deve ser efectuado o estudo principal.

Pode ser efectuado um teste-limite a uma dose de 2000 mg/kg de peso corporal com seis animais (três animais por etapa). Excepcionalmente, pode ser efectuado um teste-limite a uma dose de 5000 mg/kg de peso corporal com três animais (consultar o Anexo 2). Caso ocorra mortalidade na sequência da administração da substância de ensaio, pode ser necessário efectuar ensaios posteriores com a dose inferior seguinte.

1.6 **OBSERVAÇÕES**

Após a aplicação da dose, os animais devem ser observados individualmente, pelo menos uma vez durante os primeiros trinta minutos e periodicamente durante as primeiras 24 horas, com especial cuidado nas primeiras 4 horas. Em seguida, é necessário observar os animais diariamente, durante um período de 14 dias, excepto se for necessário retirá-los do estudo e sacrificá-los sem dor por motivo do bem-estar dos animais ou se forem encontrados mortos. No entanto, a duração do período de observação não deve ser estabelecido de uma forma rígida, mas determinado com base nas reacções de toxicidade, velocidade do seu aparecimento e duração do período de recuperação, que pode ser prolongado, se considerado necessário. O momento em que os sinais de toxicidade aparecem e desaparecem são importantes, sobretudo se os sinais de toxicidade tendem a aparecer de uma forma retardada (12). Todas as observações são registadas sistematicamente, mantendo-se uma ficha individual para cada animal.

Serão necessárias observações adicionais se os animais continuarem a apresentar sinais de toxicidade. As observações devem incluir alterações na pele e pêlos, olhos, membranas mucosas, aparelho respiratório, aparelho circulatório, sistema nervoso autónomo e central, assim como na actividade somatomotora e comportamental. Devem ser observados com especial atenção os tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sono e coma. Devem ser tomados em consideração os princípios e critérios resumidos no Documento de Orientação de Critérios Específicos sem Dor (9). Os animais que forem encontrados em estado moribundo e os animais que apresentarem dores violentas ou sinais de sofrimento intenso e continuado, devem ser sacrificados sem dor. Quando os animais forem sacrificados a fim de evitar dor ou se forem encontrados mortos, deve ser registado o momento da morte com o maior rigor possível.

1.6.1 **Peso corporal**

O peso individual dos animais deve ser determinado imediatamente após a administração da substância de ensaio e, seguidamente, pelo menos uma vez por semana. Devem ser calculadas e registadas todas as variações de peso. No final do ensaio, os animais sobreviventes são pesados e, seguidamente, sacrificados sem dor.

1.6.2 **Patologia**

Todos os animais de ensaio (incluindo aqueles que morreram durante o ensaio ou que foram retirados do ensaio por motivos de preservação do bem-estar do animal) devem ser sujeitos a uma autópsia pouco pormenorizada. Devem ser registadas as alterações patológicas principais observadas em cada animal. Deve também ser considerada a realização de um exame microscópico dos órgãos que mostrem sinais de patologia grave em animais que sobreviveram, no mínimo, 24 horas após a aplicação da dose inicial, já que este exame pode fornecer informação útil.

2. **DADOS**

Devem ser apresentados os dados individuais para cada animal. Adicionalmente, todos os dados devem ser resumidos em forma tabular, mostrando, para cada grupo de ensaio, o número de animais utilizado, o número de animais que apresentaram sinais de toxicidade, o número de animais que foram encontrados mortos durante o ensaio ou que foram sacrificados a fim de evitar dor, o momento da morte de cada um dos animais, a descrição e evolução temporal dos efeitos de toxicidade e sua reversibilidade, assim como os resultados da autópsia.

3. **RELATÓRIO**

3.1 **RELATÓRIO DO ENSAIO**

O relatório do ensaio deverá incluir as seguintes informações:

Substância de ensaio:

- natureza física, pureza e propriedades físico-químicas relevantes (incluindo isomerização);
- dados relativos à identificação química, incluindo o número CAS.

Excipiente (se apropriado):

- caso o excipiente não seja água, uma justificação para a sua escolha.

Animais de ensaio:

- espécie/estirpe usada;
- estado microbiológico do animal, caso seja conhecido;
- número, idade e sexo dos animais (incluindo, quando necessário, uma justificação para o uso de machos em vez de fêmeas);
- proveniência, condições de alojamento, dieta, etc.

Condições do ensaio:

- informação pormenorizada sobre a formulação da substância, incluindo informação pormenorizada sobre a forma física do material administrado;
- informação pormenorizada sobre a administração da substância de ensaio, incluindo volume das doses e o momento da aplicação;
- informação pormenorizada sobre a qualidade dos alimentos e da água (incluindo tipo e origem da dieta, origem da água).
- justificação para a escolha da dose inicial.

Resultados:

- tabela dos dados de resposta e da dose para cada animal (ou seja, animais que apresentaram sinais de toxicidade, incluindo mortalidade, natureza, gravidade e duração dos efeitos);
- tabela com indicação do peso corporal e suas variações;
- pesos individuais de animais no dia em que é aplicada a dose, uma vez por semana no restante período e na altura da sua morte ou sacrifício;
- data e momento da morte, no caso de ocorrência de morte antes do sacrifício previsto;
- evolução temporal do aparecimento de sintomas de toxicidade e sua reversibilidade para cada animal;
- resultados da autópsia e resultados histopatológicos para cada animal, caso se encontrem disponíveis.

Análise dos resultados.

Conclusões.

4

REFERÊNCIAS

- (1) Roll R., Höfer-Bosse Th. And Kayser D. (1986). New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. Toxicol. Lett., Suppl. 31, 86
- (2) Roll R., Riebschläger M., Mischke U. and Kayser D. (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien. Bundesgesundheitsblatt 32, 336-341.
- (3) Diener W., Sichha L., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1994). The Biometric Evaluation of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 68, 559-610
- (4) Diener W., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1995). The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 729-734.
- (5) Diener W., and Schlede E. (1999) Acute Toxicity Class Methods: Alterations to LD/LC₅₀ Tests. ALTEX 16, 129-134
- (6) Schlede E., Mischke U., Roll R. and Kayser D. (1992). A National Validation Study of the Acute-Toxic- Class Method – An Alternative to the LD₅₀ Test. Arch. Toxicol. 66, 455-470.
- (7) Schlede E., Mischke U., Diener W. and Kayser D. (1994). The International Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 659-670.
- (8) OECD (2001) Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.
- (9) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N 19.
- (10) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System For Human Health And Environmental Effects Of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [<http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html>].

- (11) Lipnick R L, Cotruvo, J A, Hill R N, Bruce R D, Stitzel K A, Walker A P, Chu I; Goddard M, Segal L, Springer J A and Myers R C (1995) Comparison of the Up-and Down, Conventional LD₅₀, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. *Fd. Chem. Toxicol* 33, 223-231.
- (12) Chan P.K. and A.W. Hayes. (1994). Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. *Principles and Methods of Toxicology*. Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd., New York, USA.

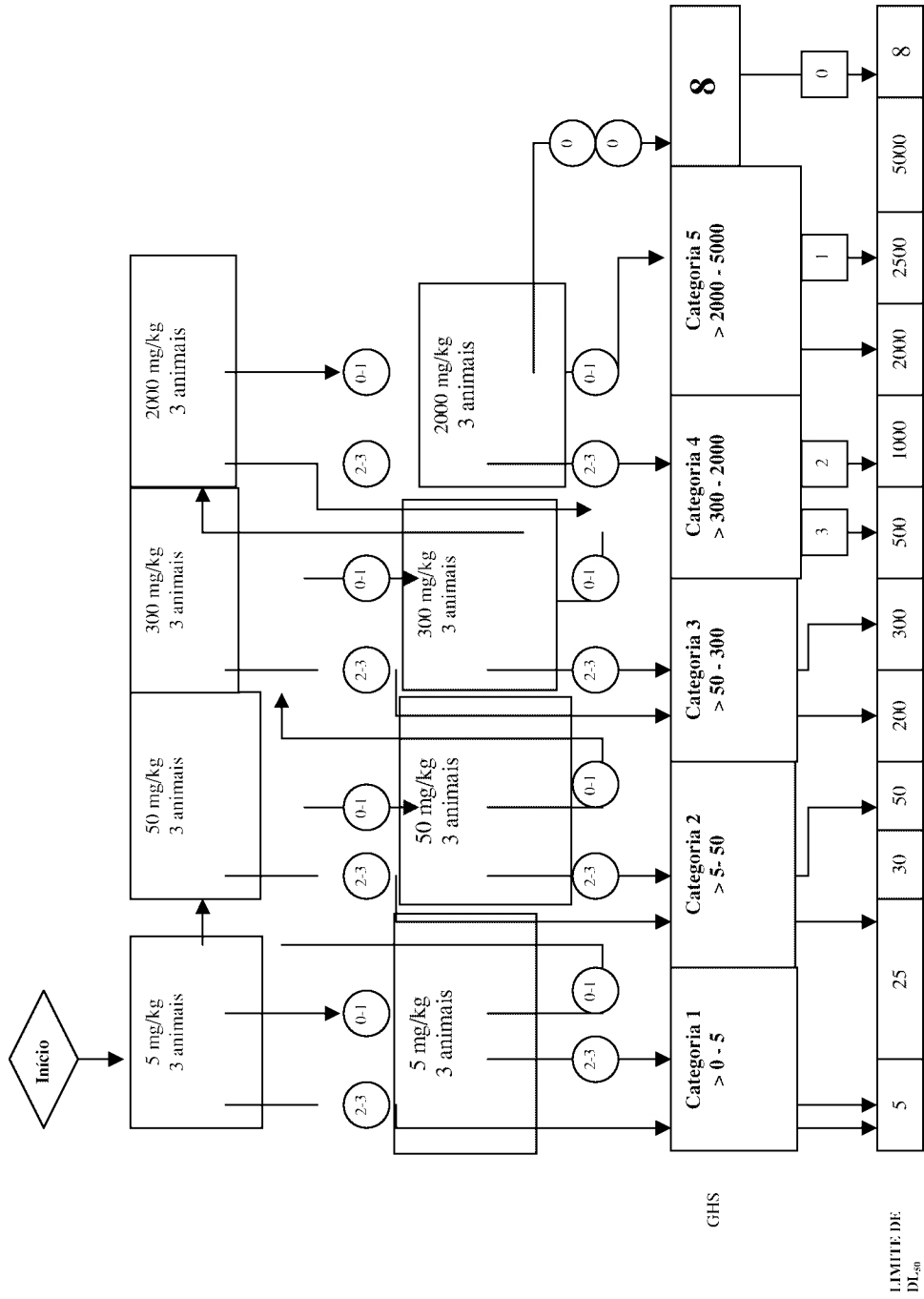
ANEXO 1**PROCEDIMENTO A SEGUIR PARA CADA UMA DAS DOSES INICIAIS***CONSIDERAÇÕES GERAIS*

Os esquemas de ensaio, descritos no presente Anexo, descrevem esquematicamente o procedimento a seguir para cada dose inicial.

- Anexo 1 a: A dose inicial é de 5 mg/kg p.c.
- Anexo 1 b: A dose inicial é de 50 mg/kg p.c.
- Anexo 1 c: A dose inicial é de 300 mg/kg p.c.
- Anexo 1 d: A dose inicial é de 2000 mg/kg p.c.

Consoante o número de animais sacrificados sem dor ou mortos, o procedimento de ensaio segue as setas respectivas.

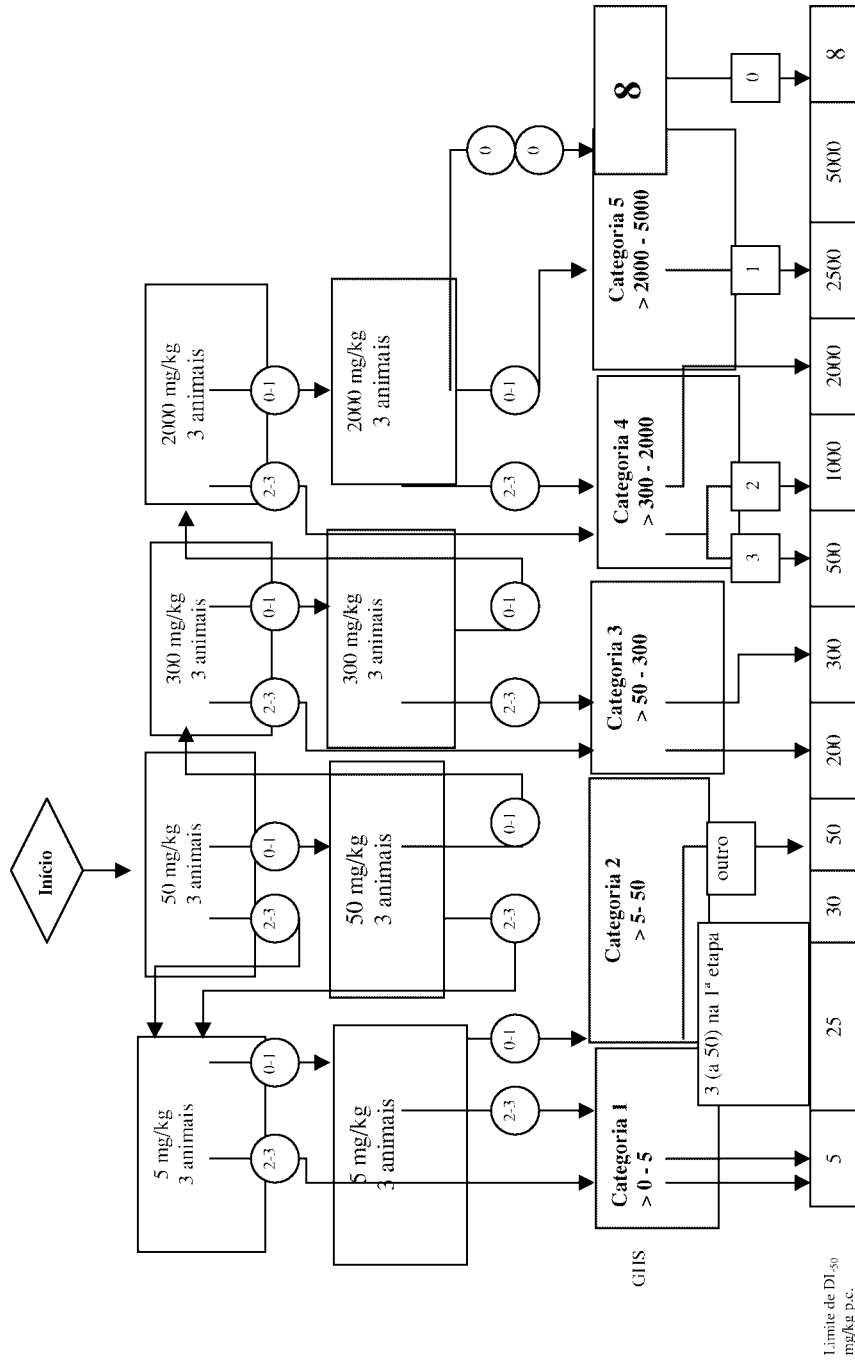
ANEXO 1 A
PROCEDIMENTO DE ENSAIO COM UMA DOSE INICIAL DE 5 MG/KG DE PESO CORPORAL



- Por etapa, são utilizados 3 animais do mesmo sexo (normalmente fêmeas)
 - 0, 1, 2, 3: número de animais moribundos ou mortos em cada etapa
 - GHS: Sistema de Classificação Harmozizado a Nível Mundial (mg/kg p.c.)

- 8: não classificada
 - Ensaio a 5000 mg/kg p.c. consultar o Anexo 2

ANEXO I B
PROCEDIMENTO DE ENSAIO COM UMA DOSE INICIAL DE 50 MG/KG DE PESO CORPORAL



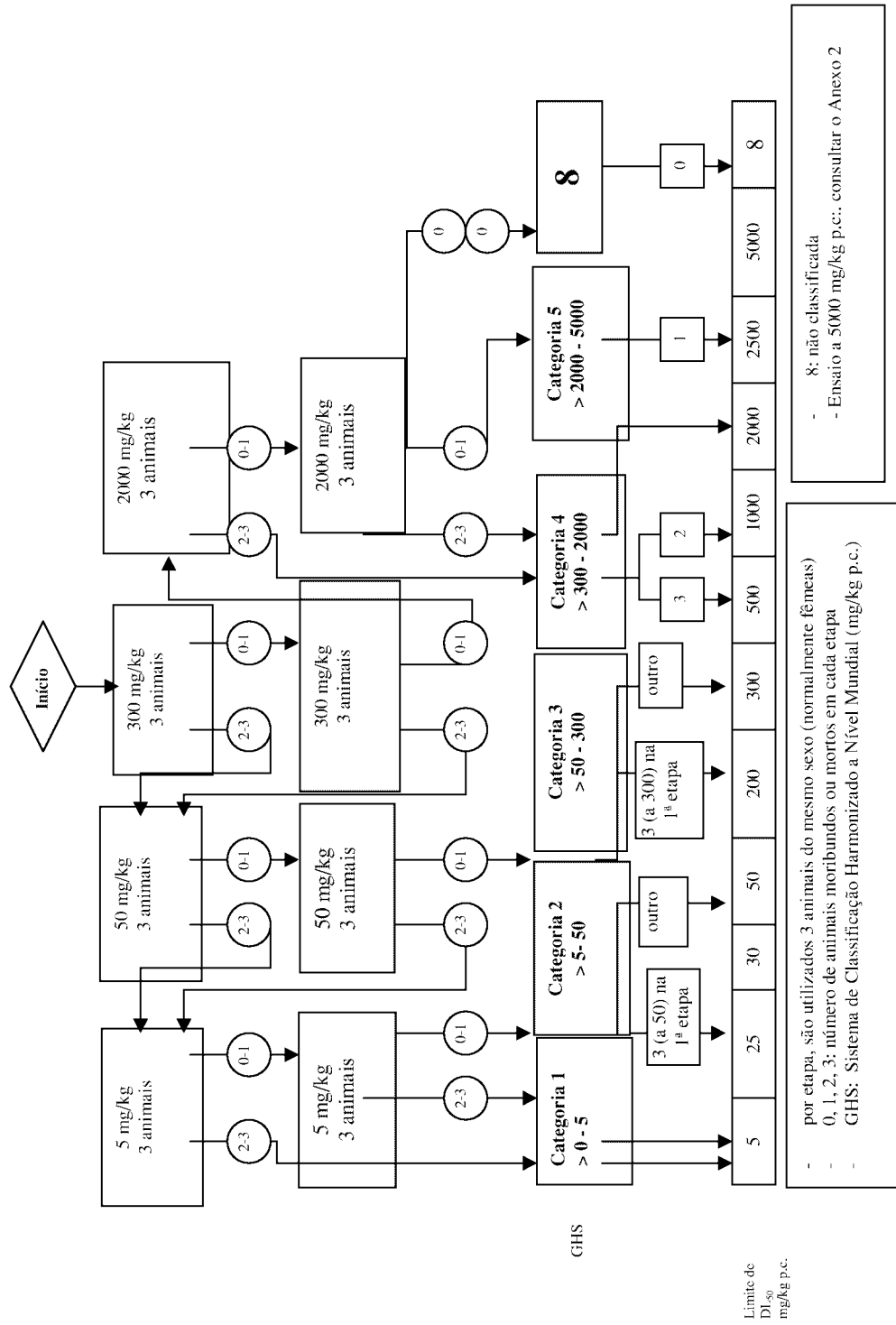
GHS

Limite de DL₅₀
mg/kg p.c.

- Por etapa, são utilizados 3 animais do mesmo sexo (normalmente fêmeas)
- 0, 1, 2, 3: número de animais moribundos ou mortos em cada etapa
- GHS: Sistema de Classificação Harmonizado a Nível Mundial (mg/kg p.c.)

- 8: não classificada
- Ensaio a 5000 mg/kg p.c.: consultar o Anexo 2

ANEXO 1 C
PROCEDIMENTO DE ENSAIO COM UMA DOSE INICIAL DE 300 MG/KG DE PESO CORPORAL



CRITÉRIOS PARA A CLASSIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS DE ENSAIO COM VALORES PREVISÍVEIS DE LD₅₀ SUPERIORES A 2000 MG/KG SEM NECESSIDADE DE EFECTUAR ENSAIO

Os critérios para a Categoria de Perigosidade 5 destinam-se a permitir a identificação de substâncias de ensaio que representam um perigo de toxicidade aguda relativamente baixo, mas que, em certas circunstâncias, podem representar perigo para populações vulneráveis. É previsível que tais substâncias apresentem valores de DL₅₀ por via oral ou dérmica na gama de 2000-5000 mg/kg ou dose equivalente para outras vias. As substâncias de ensaio podem ser classificadas na categoria de perigosidade definida por: 2000 mg/kg <DL₅₀ < 5000 mg/kg (Categoria 5 do GHS) nos seguintes casos:

a) se classificadas nesta categoria por qualquer dos esquemas de ensaio do Anexo Ia-Id, baseados nas incidências de mortalidade;

b) se existir prova fiável indicativa de que os valores de DL₅₀ se encontram na gama correspondente à Categoria 5 ou se outros estudos em animais ou sobre efeitos de toxicidade em seres humanos forem indicativos de preocupação acentuada em relação à salvaguarda da saúde humana;

c) através de extrapolação, estimativa ou medição de dados, desde que não seja garantida a atribuição a uma classe mais perigosa, e

- quando existe informação fiável indicativa de efeitos de toxicidade significativos em seres humanos, ou
- quando não é registada mortalidade nos ensaios por via oral até doses correspondentes aos valores para a Categoria 4, ou
- quando o perito é de opinião de que não se verificam sintomas clínicos de toxicidade significativos para ensaios até doses com valores correspondentes à Categoria 4, com excepção de diarreia, erecção pilosa ou má aparência, ou
- nos casos em que o perito confirme a existência de informação fiável, proveniente de outros estudos em animais que seja indicativa da existência de potenciais efeitos agudos significativos.

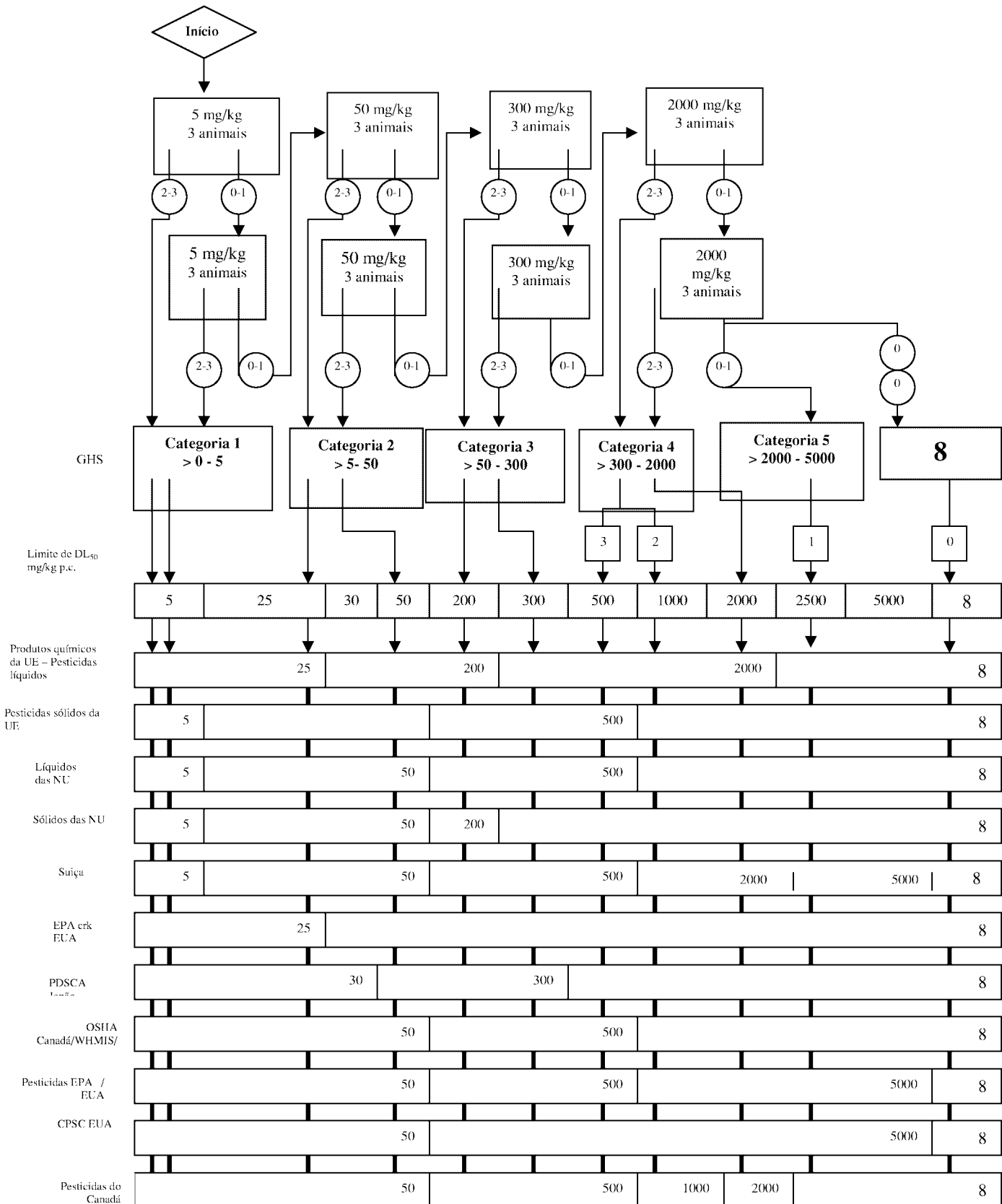
ENSAIOS COM DOSES SUPERIORES A 2000 MG/KG

Devido ao reconhecimento da necessidade de proteger o bem-estar dos animais, os ensaios de animais na Categoria 5 (5000 mg/kg) são desencorajados e só devem ser considerados no caso de ser muito provável que os resultados desse ensaio tenham especial relevância para a protecção da saúde humana ou animal (10). Não devem ser efectuados ensaios a doses superiores.

Quando é necessário efectuar o ensaio com uma dose de 5000 mg/kg, só é necessária uma etapa (ou seja, três animais). Se o primeiro animal tratado morre, o ensaio prossegue a uma dose de 2000 mg/kg, em conformidade com os fluxogramas do Anexo I. Se o primeiro animal sobrevive, são tratados dois outros animais. Se somente um dos três animais morrer, é de prever que o valor de DL₅₀ seja superior a 5000 mg/kg. Se ambos os animais morrerem, o ensaio prossegue com uma dose de 2000 mg/kg.

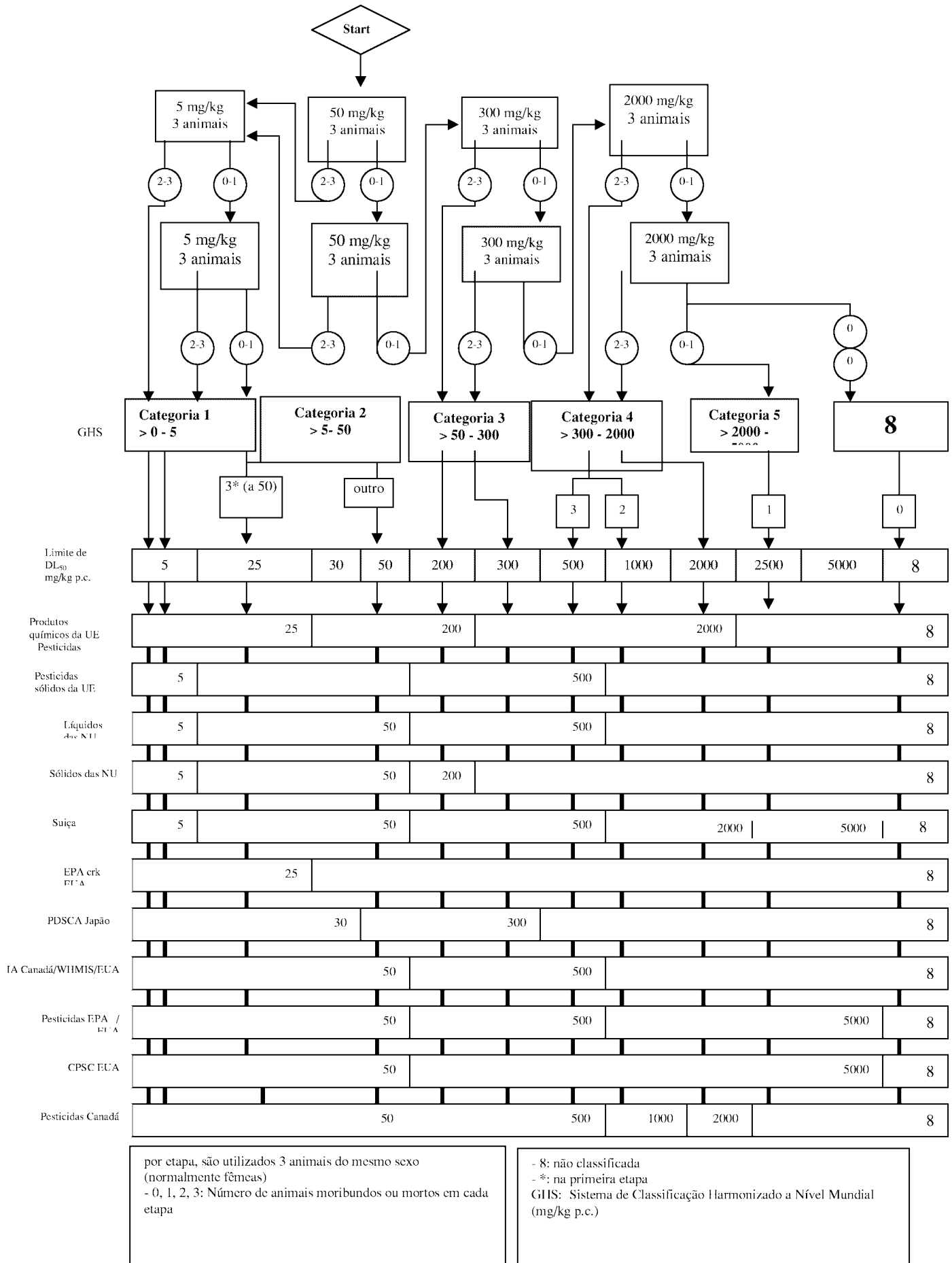
ANEXO 3

MÉTODO DE ENSAIO B.1 tris: Orientações sobre a classificação em conformidade com o esquema transitório da UE em vigor até à implementação total do Sistema de Classificação Harmonizado ao Nível Mundial (GHS) (obtido da referência [8])



por etapa, são utilizados 3 animais do mesmo sexo
(normalmente fêmeas)
- 0, 1, 2, 3: número de animais moribundos ou mortos em cada
etapa

- 8: não classificada
GHS: Sistema de Classificação Harmonizado Nível Mundial
(mg/kg p.c.)

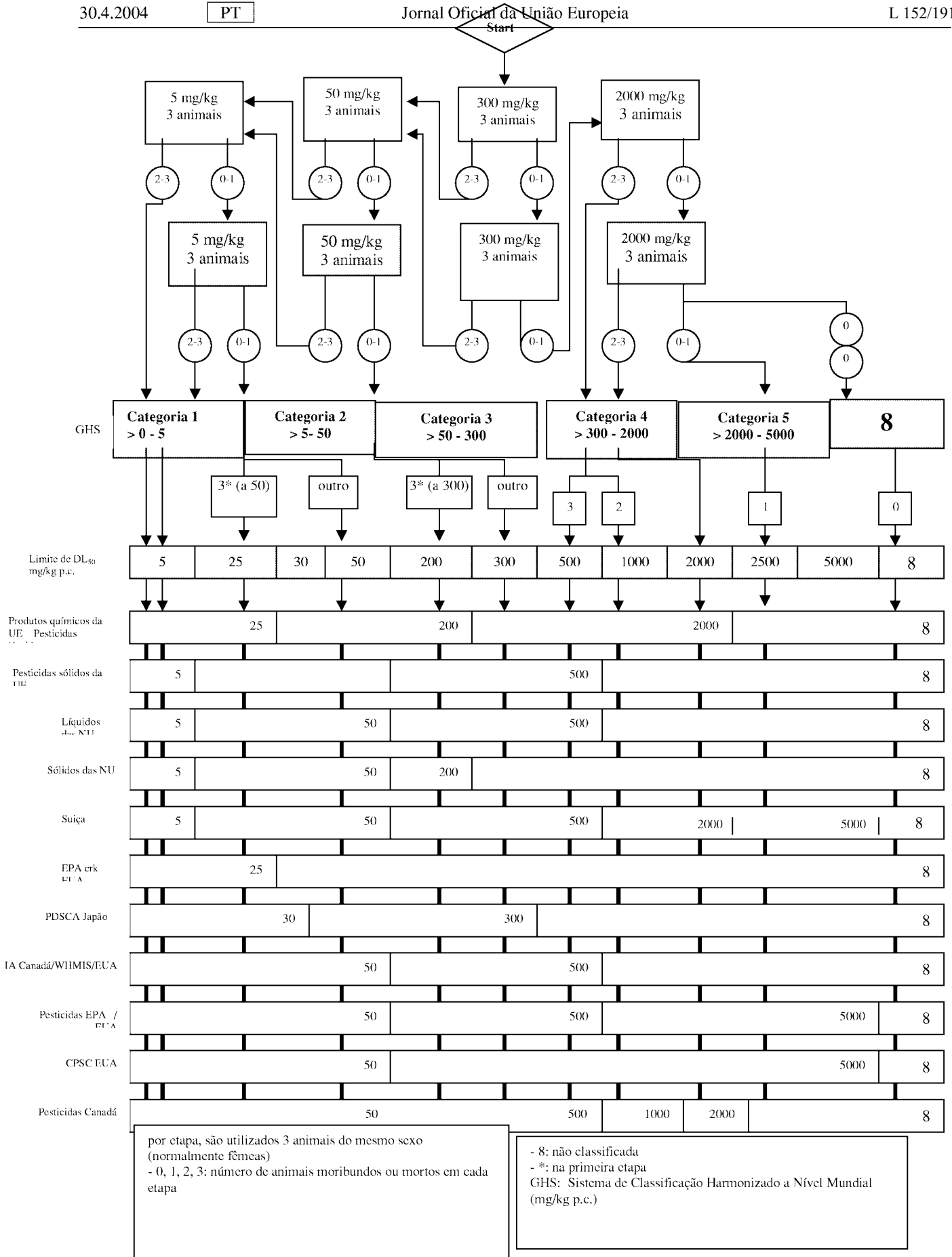


por etapa, são utilizados 3 animais do mesmo sexo (normalmente fêmeas)
 - 0, 1, 2, 3: Número de animais moribundos ou mortos em cada etapa

- 8: não classificada
 - *: na primeira etapa
 GHS: Sistema de Classificação Harmonizado a Nível Mundial (mg/kg p.c.)

ANEXO 3 (CONTINUAÇÃO 2)

MÉTODO DE ENSAIO B.1 tris: Orientações sobre a classificação em conformidade com o esquema transitório da UE, em vigor até à implementação total do Sistema de Classificação Harmonizado ao Nível Mundial (GHS) (obtido

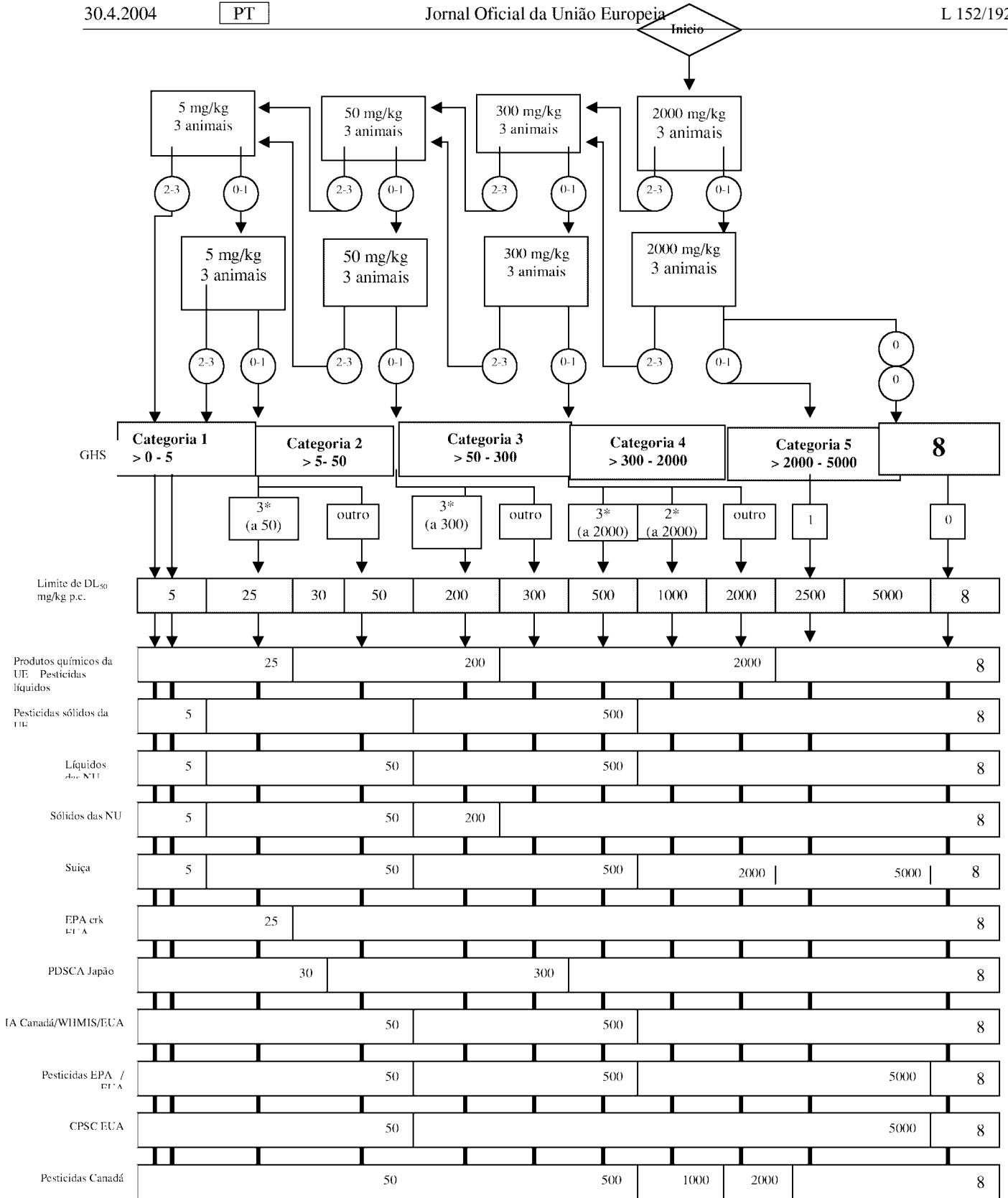


por etapa, são utilizados 3 animais do mesmo sexo (normalmente fêmeas)
 - 0, 1, 2, 3: número de animais moribundos ou mortos em cada etapa

- 8: não classificada
 - *: na primeira etapa
 GHS: Sistema de Classificação Harmonizado a Nível Mundial (mg/kg p.c.)

ANEXO 3 (CONTINUAÇÃO 3)

MÉTODO DE ENSAIO B.1 tris: Orientações sobre a classificação em conformidade com o esquema transitório da UE, em vigor até à implementação total do Sistema de Classificação Harmonizado ao Nível Mundial (GHS) (obtido da referência [8])



por etapa, são utilizados 3 animais do mesmo sexo (normalmente fêmeas)
 - 0, 1, 2, 3: número de animais moribundos ou mortos em cada etapa

- 8: não classificada
 - *: na primeira etapa
 GHS: Sistema de Classificação Harmonizado a Nível Mundial (mg/kg p.c.)

ANEXO 2D

B. 4. TOXICIDADE AGUDA: IRRITAÇÃO /CORROSÃO DÉRMICA

1. MÉTODO

O presente método baseia-se na publicação OECD TG 404 (2002) (normas de ensaio da OCDE).

1.1 INTRODUÇÃO

Na preparação do presente método otimizado foi dada especial atenção aos possíveis melhoramentos através da avaliação de toda a informação já existente sobre a substância de ensaio, de modo a evitar testes desnecessários em animais de laboratório e assim ter em consideração a problemática da protecção dos animais. O presente método inclui a recomendação de se levar a cabo uma análise da importância das provas de todos os dados relevantes existentes antes de se efectuar o ensaio *in vivo* descrito para irritação/corrosão pela substância. No caso de não se encontrarem disponíveis dados suficientes, estes podem ser obtidos através da aplicação de ensaios sequenciais (1). A estratégia de ensaio recomendada inclui a execução de ensaios *in vitro* validados e aceites e é fornecida como Anexo ao presente método. Além disso, quando for apropriado, recomenda-se a aplicação sucessiva (não simultânea) de três pensos de ensaio ao animal no ensaio *in vivo* inicial.

Tendo em consideração o interesse científico e a protecção dos animais, não devem ser efectuados ensaios *in vivo* até se proceder a uma avaliação de todos os dados disponíveis relevantes à potencial corrosibilidade/irritabilidade dérmica de uma substância mediante uma análise de importância das provas. Os dados devem incluir resultados de estudos em humanos e/ou animais de laboratório, provas de corrosibilidade/irritabilidade de uma ou mais substâncias estruturalmente relacionadas, ou de misturas dessas substâncias, dados que demonstrem elevada acidez ou alcalinidade da substância (2)(3) e resultados de ensaios *in vitro* ou *ex vivo* validados e aceites (4)(5)(5a). Esta análise deve reduzir a necessidade de ensaios *in vivo* da corrosibilidade/irritabilidade dérmica de substâncias para as quais já existem dados suficientes provenientes de outros estudos em relação a estes dois factores.

Junta-se em Anexo ao presente Método uma estratégia de ensaio sequencial preferível, que inclui a execução de ensaios validados e aceites *in vitro* ou *ex vivo* para irritação/corrosão. A estratégia foi desenvolvida num grupo de trabalho (*workshop*) da OCDE (6), no qual foi recomendada por unanimidade dos participantes, tendo sido adoptada como estratégia de ensaio recomendada pelo sistema harmonizado a nível mundial para a classificação de substâncias químicas (GHS) (7). Apesar de esta estratégia de ensaio sequencial não ser parte integrante do método de ensaio B.4, recomenda-se que a mesma seja adoptada antes da realização de ensaios *in vivo*. No caso de novas substâncias recomenda-se uma metodologia de ensaio por etapas para a obtenção de dados científicos sobre a corrosibilidade/irritabilidade da substância. No caso de substâncias já existentes, mas cujos dados insuficientes sobre irritação/corrosão dérmica são insuficientes, recomenda-se a adopção desta estratégia para a obtenção dos dados em falta. Caso se opte por uma estratégia ou procedimento de ensaio diferente ou se decida não aplicar uma metodologia de ensaio por etapas, deve apresentar-se uma justificação para a opção feita.

Um ensaio *in vivo*, apenas deve ser considerado caso não seja possível determinar a corrosibilidade, ou a irritabilidade, através da análise de importância das provas e de acordo com a estratégia de ensaio sequencial (ver Anexo).

1.2 DEFINIÇÕES

Irritação dérmica: consiste na produção de danos reversíveis na pele após a aplicação da substância de ensaio, por um período não superior a 4 horas.

Corrosão dérmica: consiste na produção de danos irreversíveis na pele - por exemplo, necrose visível através da epiderme e que atinge a derme, após a aplicação de uma substância de ensaio por um período não superior a 4 horas. As reacções corrosivas típicas são úlceras, sangramento, crostas ensanguentadas e, após o período de observação de 14 dias, empalidecimento devido à descoloração da pele, áreas alargadas de alopecia e cicatrizes. Deve ser considerada uma análise histopatológica na avaliação de lesões duvidosas.

1.3 PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

A substância de ensaio é aplicada em dose única na pele de um animal de experiência; as áreas de pele não tratadas do animal de experiência são utilizadas como controlo. O grau de irritação/corrosão é observado e registado em intervalos determinados e detalhadamente descrito de modo a permitir uma avaliação completa dos efeitos. A duração do estudo deve ser suficiente para avaliar a reversibilidade ou irreversibilidade dos efeitos observados.

Os animais que apresentarem sinais de se encontrarem em grave perigo e/ou apresentarem sinais de dor durante qualquer das etapas do ensaio devem ser abatidos e a substância deve ser classificada de acordo com estas observações. Os critérios para a decisão de abater animais moribundos e animais em grave sofrimento podem ser consultados na referência (8).

1.4 DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

Preparação do ensaio *in vivo*

1.4.1. *Seleção de espécies animais*

O coelho albino é o animal de laboratório mais adequado, devendo ser usados coelhos jovens adultos saudáveis. A utilização de outras espécies deve ser justificada.

1.4.1.2. *Preparação dos animais*

Aproximadamente 24 horas antes do ensaio, o pêlo deve ser removido por corte curto da área dorsal do tronco dos animais. Deve ter-se o cuidado de não ferir a pele do animal e só devem ser usados animais com pele saudável e intacta.

Algumas estirpes de coelhos têm tufos densos de pêlo, que são mais proeminentes em certas épocas do ano. Estas áreas de crescimento denso de pêlo não devem ser utilizadas como local de ensaio.

1.4.1.3. *Condições de alojamento e alimentação*

Os animais devem ser alojados individualmente. A temperatura do biotério para os coelhos deve ser de 20°C ($\pm 3^\circ\text{C}$). Embora a humidade relativa deva ser de, pelo menos, 30% e, de preferência, não exceder os 70%, excepto durante o período de limpezas, o valor pretendido deve ser de 50-60%. A iluminação deve ser artificial, com uma sequência de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de escuridão. Na alimentação, podem ser utilizadas dietas convencionais de laboratório e deve ser fornecida água de beber sem restrições.

1.4.2. **Protocolo de ensaio**

1.4.2.1. *Aplicação da substância de ensaio*

A substância de ensaio deve ser aplicada numa pequena área de pele (aproximadamente 6 cm²) e coberta com um penso de gaze, colado com fita adesiva não-irritante. Nos casos em que não é possível aplicação directa (por exemplo, líquidos e algumas pastas), a substância de ensaio deve ser aplicada num penso de gaze, que é, por sua vez, aplicado à pele. Durante o período de exposição, o penso deve estar em contacto com a pele de uma forma ligeiramente solta através de uma ligadura semi-oclusiva adequada. Se a substância de ensaio for aplicada num penso, este deve ser mantido sobre a pele de modo a assegurar um bom contacto e uma distribuição uniforme da substância na pele. Deve ser evitado o acesso do animal ao penso e a ingestão ou inalação da substância de ensaio.

As substâncias de ensaio líquidas são geralmente utilizadas sem diluição. Quando se ensaiam sólidos (que podem ser pulverizados, caso tal seja considerado necessário), a substância de ensaio deve ser humedecida com a menor quantidade de água (ou, se necessário, com outro excipiente adequado) suficiente para assegurar um bom contacto com a pele. No caso de serem utilizados excipientes que não água, a influência potencial do excipiente na irritação da pele pela substância de ensaio deve ser mínima ou nula.

No final do período de exposição, que é normalmente de 4 horas, a substância de ensaio residual deve ser removida, caso tal seja praticável, utilizando água ou um solvente apropriado, que não altere a resposta ou a integridade da epiderme.

1.4.2.2 *Nível de dosagem*

Aplica-se ao local de ensaio uma dose de 0,5 ml de líquido ou de 0,5 g de sólido ou pasta.

1.4.2.3 *Ensaio inicial (ensaio in vivo de irritação/corrosão dérmica utilizando um animal)*

Recomenda-se vivamente que o ensaio *in vivo* seja efectuado inicialmente utilizando apenas um animal, sobretudo quando se suspeita que a substância é potencialmente corrosiva. Tal procedimento está em conformidade com a estratégia de ensaio sequencial (ver Anexo 1).

No caso de uma substância ter sido considerada corrosiva com base numa análise de importância das provas, não são necessários ensaios adicionais em animais. Para a maior parte das substâncias que se suspeite serem corrosivas, não são normalmente necessários ensaios *in vivo* adicionais. No entanto, nos casos em que, devido a insuficiência de provas, se considere necessária a obtenção de dados adicionais, pode ser efectuado um número restrito de ensaios em animais utilizando a seguinte metodologia: aplicação sequencial de até três pensos de ensaio ao animal. O primeiro penso é removido após três minutos. Caso não se observe qualquer reacção grave na pele, aplica-se um segundo penso, que é removido ao fim de uma hora. Se nesta etapa as observações indicarem que se pode aumentar o tempo de exposição para quatro horas em condições não-agressivas para o animal, aplica-se um terceiro penso, que é removido após quatro horas, sendo a resposta devidamente graduada.

Caso seja observado um efeito corrosivo após qualquer das três exposições sequenciais, o ensaio é imediatamente finalizado. Caso não se observe qualquer efeito corrosivo após a remoção do último penso, o animal é observado durante 14 dias, excepto se desenvolver corrosão antes do final desse período.

Nos casos em que a substância de ensaio não seja susceptível de provocar corrosão, mas que possa ser irritante, deve ser aplicado um único penso a um animal durante quatro horas.

1.4.2.4 *Ensaio de confirmação (ensaio in vivo de irritação dérmica com animais adicionais)*

Se não for observado um efeito corrosivo no ensaio inicial, a resposta irritante ou negativa deve ser confirmada utilizando até dois animais adicionais, cada um com um penso e por um período de exposição de quatro horas. Se for observado um efeito irritante no ensaio inicial, o ensaio de confirmação pode ser efectuado de uma forma sequencial ou através da exposição simultânea de dois animais adicionais. No caso excepcional de não ser efectuado um ensaio inicial, podem tratar-se dois ou três animais com um penso único, que é removido quatro horas após a aplicação. No caso de se utilizarem dois animais e ambos apresentarem a mesma resposta, não é necessário efectuar mais ensaios. Caso contrário, o terceiro animal é igualmente ensaiado. Pode ser necessária a utilização de animais adicionais para confirmar respostas equívocas.

1.4.2.5 *Período de observação*

O período de observação deve ter uma duração suficiente para uma avaliação completa da reversibilidade dos efeitos observados. No entanto, a experiência deve ser interrompida em qualquer altura caso o animal apresente sintomas continuados de dor intensa ou de se encontrar em situação de perigo. Para a determinação da reversibilidade dos efeitos, os animais devem ser observados durante 14 dias após a remoção dos pensos. No caso de se observar reversibilidade antes do fim do período de 14 dias, deve interromper-se a experiência.

1.4.2.6 *Observações clínicas e graduação das reacções da pele*

Todos os animais devem ser examinados para sintomas de eritema e edema, sendo as respostas avaliadas aos 60 minutos e às 24, 48 e 72 horas após a remoção do penso. No ensaio inicial com um animal, o local de ensaio é igualmente examinado imediatamente após a remoção do penso. As reacções dérmicas são graduadas e registadas de acordo com a graduação da Tabela infra. Caso ocorram danos na pele que não possam ser identificados como irritação ou corrosão após 72 horas, pode ser necessário efectuar observações até ao dia 14 para determinar a reversibilidade dos efeitos. Além da observação de irritação, todos os efeitos tóxicos locais, tais como perda de gordura cutânea e quaisquer efeitos sistémicos adversos (por exemplo, efeitos em sintomas de toxicidade e efeitos no peso corporal), devem ser descritos e registados pormenorizadamente. Poderá ser efectuado um exame histopatológico para clarificar respostas equívocas.

A graduação das respostas dérmicas é necessariamente subjectiva. O pessoal que executa as observações deve ser treinado adequadamente no sistema de graduação utilizado (ver Tabela infra) para se promover a harmonização da graduação da resposta dérmica e auxiliar os laboratórios de ensaio e as pessoas envolvidas na obtenção e interpretação das observações. Poderá ser útil a consulta de um guia ilustrado para graduação da irritação dérmica e outras lesões (9). (não está na versão em inglês)

2. **DADOS**

2.1 **TRATAMENTO DOS RESULTADOS**

Os resultados do estudo devem ser resumidos sob a forma de tabela no relatório final de ensaio e devem abranger todos os itens descritos na secção 3.1.

2.2 **ANÁLISE DOS RESULTADOS**

Os resultados de irritação dérmica devem ser avaliados conjuntamente com a natureza e a gravidade das lesões e a sua reversibilidade ou ausência de reversibilidade. As respostas individuais não representam um padrão absoluto das propriedades irritantes do material, já que são também avaliados outros efeitos do material de ensaio. Pelo contrário, os resultados individuais devem ser encarados como valores de referência, que necessitam de ser avaliados conjuntamente com todas as outras observações efectuadas durante o estudo.

Deve ser considerada a reversibilidade das lesões dérmicas na avaliação da resposta irritante. Nos casos em que ocorrerem respostas como alopecia (área limitada), hiperqueratose, hiperplasia e descamação persistentes no final do período de 14 dias de observação, a substância de ensaio deve ser considerada irritante.

3. RELATÓRIO

3.1 RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deverá incluir as seguintes informações:

Fundamentação lógica para o ensaio *in vivo*: análise de importância das provas dos dados de ensaio pré-existent, incluindo os resultados da estratégia de ensaio sequencial:

- descrição dos dados relevantes disponíveis de ensaios anteriores;
- dados obtidos em cada etapa da estratégia de ensaio;
- descrição dos ensaios *in vitro* efectuados, incluindo detalhes sobre o protocolo, resultados obtidos com substâncias de ensaio/referência;
- análise de importância das provas para a realização do estudo *in vivo*.

Substância de ensaio:

- dados de identificação (por exemplo, número CAS, origem, grau de pureza, impurezas conhecidas, número de lote);
- natureza física e propriedades físico-químicas (por exemplo, pH, volatilidade, solubilidade, estabilidade);
- no caso de misturas, composição e percentagens relativas dos componentes.

Excipiente:

- identificação, concentração (quando apropriado), volume utilizado;
- justificação para a escolha do excipiente.

Animais de ensaio:

- espécie/estirpe utilizada, fundamentação lógica para a utilização de outro tipo de animais que não coelhos albinos;
- número de animais de cada sexo;
- peso individual dos animais no início e no final do ensaio;
- idade no início do estudo;
- origem dos animais, condições de alojamento, dieta, etc.

Condições do ensaio:

- técnica de preparação do local de aplicação do penso;
- descrição pormenorizada dos materiais utilizados no penso e da técnica de aplicação do penso;
- descrição pormenorizada da preparação, aplicação e remoção da substância de ensaio.

Resultados:

- Tabelas com a classificação das respostas de irritação/corrosão para cada animal em cada observação;
- descrição de todas as lesões observadas;
- descrição pormenorizada da natureza e grau da irritação ou corrosão observadas e de quaisquer observações histo-patológicas;
- descrição de quaisquer outros efeitos adversos locais (por ex., perda de gordura cutânea) e efeitos sistémicos, além da irritação ou corrosão dérmica.

Análise dos resultados

4.

REFERÊNCIAS

- (1) Barratt, M.D., Castell, J.V., Chamberlain, M., Combes, R.D., Dearden, J.C., Fentem, J.H., Gerner, I., Giuliani, A., Gray, T.J.B., Livingston, D.J., Provan, W.M., Rutten, F.A.J.J.L., Verhaar, H.J.M., Zbinden, P. (1995) The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, 410-429.
- (2) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. *Toxicol. In Vitro*, 2, 19-26.
- (3) Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Liebsch, M. (1998) Evaluation of the proposed OECD Testing Strategy for skin corrosion. ATLA 26, 709-720.
- (4) ECETOC (1990) Monograph No. 15, "Skin Irritation", European Chemical Industry, Ecology and Toxicology Centre, Brussels.
- (5) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. e 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.
- (5a) Método de Ensaio B.40. Corrosão Dérmica.
- (6) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22 - 24 January 1996 (<http://www1.oecd.org/ehs/test/background.htm>).
- (7) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (<http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
- (8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 19 (<http://www1.oecd.org/ehs/test/monos.htm>).
- (9) EPA (1990). Atlas of Dermal Lesions, (20T-2004). United States Environmental Protection Agency, Office of Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC, August 1990. [Disponível no Secretariado da OCDE].

TABELA I: GRADUAÇÃO DE REACÇÕES DÉRMICAS**Formação de eritema e escara**

Ausência de eritema	0
Eritema muito ligeiro (fracamente discernível)	1
Eritema bem definido	2
Eritema moderado a grave	3
Eritema grave (vermelhidão cor de carne) e formação de escara que impede a graduação do eritema.....	4

Máximo possível: 4

Formação de edema

Ausência de edema	0
Edema muito ligeiro (fracamente discernível)	1
Edema ligeiro (bordos da área bem definidos por elevação delineada)	2
Edema moderado (com uma elevação de aproximadamente 1 mm)	3
Edema grave (com uma elevação superior a 1 mm e excedendo a área de exposição)	4

Máximo possível: 4

Poderá ser efectuado um exame histopatológico para clarificar respostas equívocas.

ANEXO

Uma Estratégia de Ensaio Sequencial para a Irritação e Corrosão Dérmica

CONSIDERAÇÕES GERAIS

No sentido de atender aos interesses quer científicos, quer da protecção dos animais, torna-se importante evitar o uso desnecessário de animais e minimizar os ensaios que possam causar reacções graves em animais. Deve ser avaliada toda a informação sobre a substância que seja relevante para a sua potencial capacidade irritante/corrosibilidade dérmica antes de se considerarem os ensaios *in vivo*. É possível que existam já dados suficientes para classificar a substância de ensaio segundo o seu potencial irritante ou corrosivo dérmico, sem necessidade de recorrer a ensaios em animais de laboratório. Assim, a utilização de uma análise de importância das provas e de uma estratégia de ensaio sequencial minimizará a necessidade de ensaios *in vivo*, especialmente no caso de substâncias com elevada probabilidade de produzirem reacções graves.

Recomenda-se a utilização da análise de importância das provas para avaliar a informação existente sobre irritação e corrosão dérmica de substâncias, a fim de determinar a necessidade de se efectuarem estudos adicionais, diferentes dos estudos dérmicos *in vivo*, que sejam úteis para caracterizar o referido potencial. No caso de serem necessários estudos adicionais, recomenda-se a utilização de uma estratégia de ensaio sequencial para a obtenção dos dados experimentais relevantes. No caso de substâncias para as quais não exista nenhuma história de ensaios, deve ser utilizada a estratégia de ensaio sequencial para a obtenção dos dados necessários para avaliar a sua irritação/corrosão dérmica. A estratégia de ensaio descrita no presente Anexo foi desenvolvida num grupo de trabalho (*workshop*) da OCDE (1). Foi subsequentemente confirmada e ampliada no sistema harmonizado e integrado de classificação de perigos para a saúde humana e efeitos ambientais de substâncias químicas, tal como foi aprovado pela 28ª sessão conjunta do comité das substâncias químicas e do grupo de trabalho de substâncias químicas, em Novembro de 1998 (2).

Apesar da presente estratégia de ensaio não fazer parte integrante do método de ensaio B.4, ela expressa a metodologia recomendada para a determinação das características de irritação/corrosão dérmica. Esta metodologia representa não só a melhor prática como também um ponto de referência ético para o ensaio *in vivo* para irritação/corrosão dérmica. O método de ensaio fornece uma orientação para a realização do ensaio *in vivo* e resume os factores que devem ser considerados antes de ponderar a execução deste ensaio. A estratégia fornece uma metodologia para a avaliação dos dados existentes sobre as propriedades de irritação/corrosão dérmica de substâncias de ensaio e uma metodologia em séries para a obtenção de dados relevantes sobre substâncias para as quais sejam necessários estudos adicionais ou não tenham sido efectuados quaisquer estudos. Também se recomenda a realização de ensaios *in vitro* ou *ex vivo* validados e aceites para o estudo de irritação/corrosão dérmica em circunstâncias específicas.

DESCRIÇÃO DA ESTRATÉGIA DE AVALIAÇÃO E ENSAIO

Antes da realização dos ensaios como parte da estratégia de ensaio sequencial (Figura), deve ser avaliada toda a informação disponível de modo a determinar a necessidade de realização de ensaios dérmicos *in vivo*. Apesar de ser possível obter informação significativa a partir da avaliação de um só parâmetro (por exemplo, pH extremo), deve ser avaliada a totalidade da informação existente. Para uma decisão baseada na análise da importância das provas, devem ser avaliados todos os dados relevantes sobre os efeitos da substância em causa ou dos seus análogos estruturais, e deve apresentar-se uma justificação fundamentada para a decisão tomada. Deve dar-se especial relevância aos dados existentes sobre a substância relativamente a humanos e animais e, em seguida, aos resultados dos ensaios *in vitro* ou *ex vivo*. Sempre que possível, devem ser evitados estudos *in vivo* de substâncias corrosivas. Os factores considerados na estratégia de ensaio incluem:

Avaliação dos dados existentes sobre humanos e animais (etapa 1). Devem considerar-se em primeiro lugar os dados existentes sobre humanos - por exemplo, estudos clínicos e ocupacionais, relatórios de casos clínicos e/ou dados de ensaios em animais como, por exemplo, dados obtidos em estudos de toxicidade de exposição dérmica simples ou repetida, já que estes dados fornecem informação directamente relacionada com os efeitos na pele. As substâncias que apresentem capacidade irritante ou corrosiva conhecidas, assim como aquelas para as quais existem dados claros de não serem corrosivas nem irritantes, não necessitam de ser ensaiadas em estudos *in vivo*.

Análise de relações estrutura-atividade (SAR) (etapa 2). Devem ser considerados os resultados de ensaios de substâncias químicas estruturalmente semelhantes desde que se encontrem disponíveis. No caso de existirem dados suficientes sobre humanos e/ou animais relativos aos efeitos de substâncias estruturalmente semelhantes, ou misturas deste tipo de substâncias, indicativos do seu potencial de irritação/corrosão dérmica, pode presumir-se que a substância de ensaio em avaliação produzirá as mesmas respostas. Nestes casos, poderá não ser necessário proceder a ensaios da substância de ensaio. Os dados negativos obtidos de estudos de substâncias estruturalmente semelhantes ou misturas dessas substâncias não constituem prova suficiente de não-corrosibilidade/não-irritabilidade da substância segundo a estratégia de ensaio sequencial. Devem ser utilizadas abordagens de SAR validadas e aceites para identificação do potencial de irritação e de corrosão dérmica.

Propriedades físico-químicas e reactividade química (etapa 3). As substâncias que apresentam um pH extremo, tal como $\leq 2,0$ ou $\geq 11,5$, podem ter efeitos locais fortes. Se o pH extremo servir como base de identificação da substância como corrosiva para a pele, a sua reserva ácida/alcalina (ou poder tampão) deve ser também tida em consideração (3)(4). Se o poder tampão indicar que a substância pode não ser corrosiva para a pele, devem ser efectuados ensaios adicionais para confirmar esta indicação, de preferência utilizando ensaios *in vitro* ou *ex vivo* validados e aceites (ver etapas 5 e 6).

Toxicidade dérmica (etapa 4). Caso se tenha provado que uma substância química é muito tóxica por via dérmica, pode não ser exequível um estudo *in vivo* de irritação/corrosão dérmica por a quantidade de substância de ensaio normalmente aplicada poder exceder a dose muito tóxica, resultando conseqüentemente na morte ou em sofrimento grave dos animais. Além disso, pode não ser necessário efectuar ensaios dérmicos de irritação/corrosão adicionais quando os estudos de toxicidade dérmica utilizando coelhos albinos tenham sido efectuados até um nível de dosagem limite de 2000 mg/kg de peso corporal ou superior e não tenha sido observada qualquer irritação ou corrosão dérmica. Deve ter-se em conta uma série de considerações aquando da avaliação da toxicidade dérmica aguda em estudos efectuados anteriormente. Por exemplo, a informação contida no relatório sobre lesões dérmicas pode estar incompleta. Os ensaios e as observações podem ter sido efectuados noutra espécie que não o coelho, podendo as várias espécies diferir grandemente na sensibilidade das respostas apresentadas. A forma como a substância de ensaio foi aplicada aos animais pode não ter sido adequada à avaliação da irritação/corrosão da pele (por exemplo, diluição das substâncias para ensaio da toxicidade dérmica (5)). No entanto, nos casos em que os estudos de toxicidade dérmica em coelhos foram projectados e efectuados correctamente, os resultados negativos podem ser considerados prova suficiente de que a substância não é irritante nem corrosiva.

Resultados de ensaios in vitro ou ex vivo (etapas 5 e 6). Não é necessário proceder a ensaios em animais com substâncias que tenham apresentado propriedades corrosivas ou de irritação grave num ensaio *in vitro* ou *ex vivo* validado e aceite (6)(7) que tenha sido desenvolvido para avaliar especificamente estes efeitos. Pode considerar-se que tais substâncias produzirão efeitos graves semelhantes *in vivo*.

Ensaio in vivo em coelhos (etapas 7 e 8): Caso seja tomada a decisão de efectuar um ensaio *in vivo* com base numa análise da importância das provas, este deve começar por um ensaio inicial usando um animal. Se os resultados deste ensaio indicarem que a substância é corrosiva para a pele, não devem ser efectuados outros ensaios. Se o ensaio inicial não revelar quaisquer efeitos corrosivos, a resposta irritante ou negativa deve ser confirmada utilizando até dois animais adicionais com um período de exposição de quatro horas. No caso de se observar um efeito irritante no ensaio inicial, o ensaio de confirmação deve ser efectuado de uma forma sequencial ou através da exposição de dois animais adicionais simultaneamente.

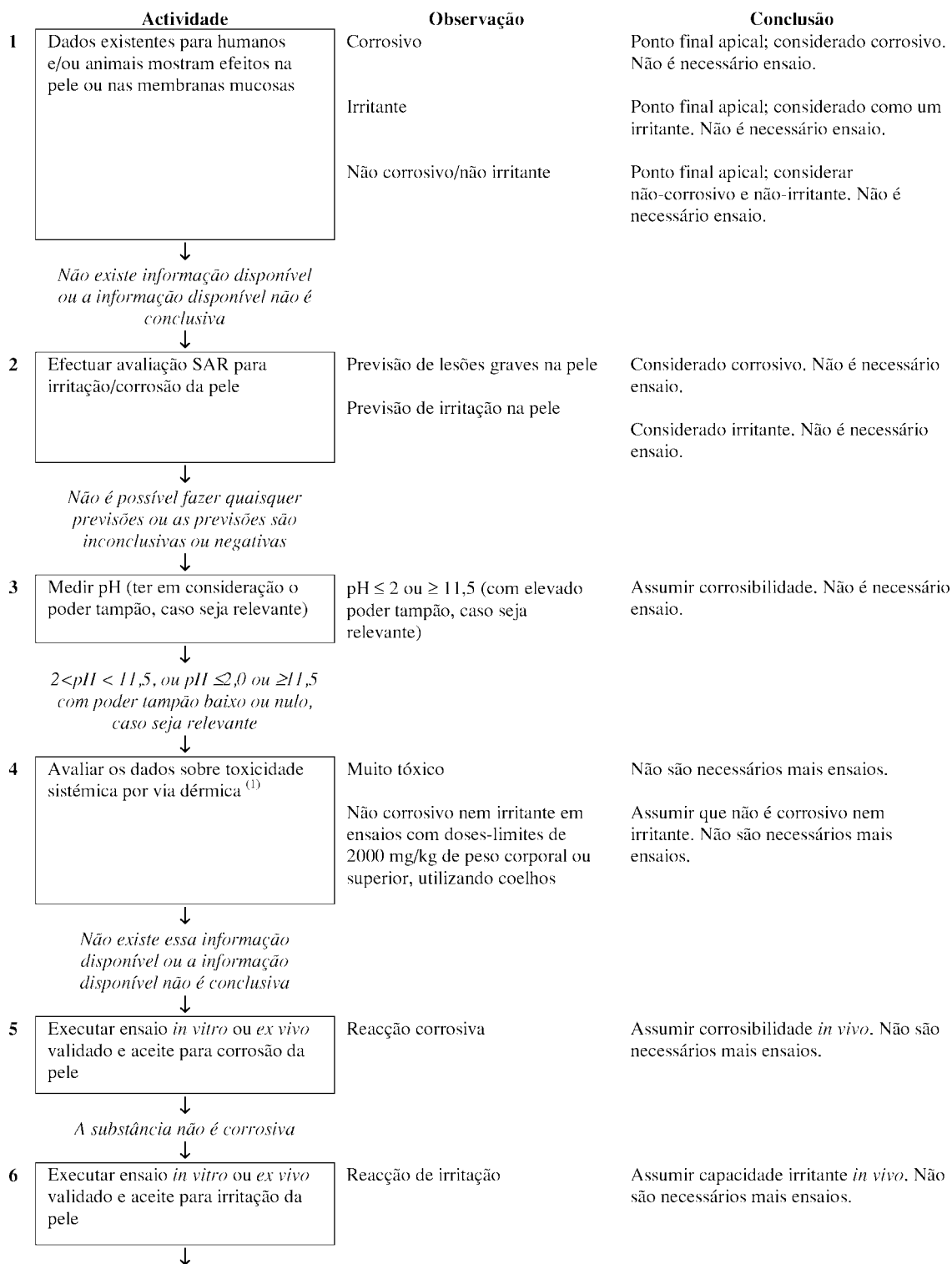
REFERÊNCIAS

- (1) OECD (1996). Test Guidelines Programme: Final Report on the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held on Solna, Sweden, 22–24 January 1996 (<http://www1.oecd.org/ehs/test/background.htm>).
- (2) OECD (1998). Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (<http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
- (3) 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**, 709-720.
- (4) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth, W.M.H. (1988). Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substances, Without Testing on Animals. *Toxic In Vitro*, **2** (1) pp. 19-26.
- (5) Patil, S.M., Patrick, E., Maibach, H.I. (1996) Animal, Human, and In Vitro Test Methods for Predicting Skin Irritation, in: Francis N. Marzulli e Howard I. Maibach (organizadores): *Dermatotoxicology*. Fifth Edition ISBN 1-56032-356-6,

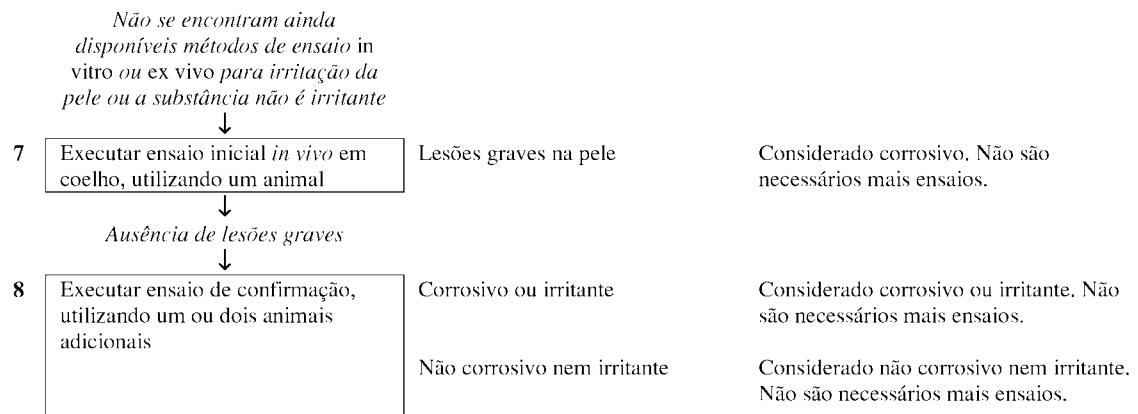
- (6) Método de Ensaio B.40.
- (7) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. e Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. *Toxicology in Vitro* 12, pp.483–524.

FIGURA

ESTRATÉGIA DE ENSAIO E AVALIAÇÃO PARA IRRITAÇÃO/CORROSÃO DÉRMICA



⁽¹⁾ Pode ser tido em consideração antes das etapas 2 e 3.



ANEXO 2E

B. 5. TOXICIDADE AGUDA: IRRITAÇÃO/CORROSÃO OCULAR

1. MÉTODO

O presente método baseia-se na publicação OECD TG 405 (2002) (normas de ensaio da OCDE).

1.1 INTRODUÇÃO

Na preparação do presente método otimizado foi dada especial importância aos possíveis melhoramentos resultantes da avaliação de toda a informação já existente sobre a substância de ensaio, de modo a evitar ensaios desnecessários em animais de laboratório e assim ter em consideração a problemática da protecção dos animais. O presente método inclui a recomendação de se efectuar uma análise da importância das provas (1) dos dados relevantes existentes antes de se efectuar o ensaio *in vivo* descrito para irritação/corrosão ocular aguda. No caso de não se encontrarem disponíveis dados suficientes, recomenda-se a obtenção desses dados através da aplicação de ensaios sequenciais (2) (3). A estratégia de ensaio recomendada inclui a execução de ensaios *in vitro* validados e aceites e é fornecida como Anexo ao método de ensaio. Além disso, recomenda-se o uso de um ensaio *in vivo* de irritação/corrosão dérmica para previsão da corrosão ocular antes de se considerar um ensaio ocular *in vivo*.

Tendo em consideração o interesse científico e a protecção dos animais, não devem ser considerados ensaios *in vivo* até se proceder a uma avaliação de todos os dados disponíveis relevantes à potencial corrosibilidade/capacidade irritante ocular de uma substância para uma análise da importância das provas. Os dados devem incluir provas de estudos existentes em humanos e/ou animais de laboratório, provas de corrosibilidade/capacidade irritante de uma ou mais substâncias estruturalmente relacionadas, ou de misturas dessas substâncias, dados que demonstrem elevada acidez ou alcalinidade da substância (4)(5) e resultados de ensaios *in vitro* ou *ex vivo*, validados e aceites, para corrosão e irritação da pele (6)(6a). Estes estudos podem ter sido efectuados previamente ou como resultado de uma análise de importância das provas.

Uma análise deste tipo pode indicar, para algumas substâncias, a necessidade de estudos *in vivo* do potencial de irritação/corrosão ocular da substância. Em todos estes casos, antes de considerar a utilização de um ensaio ocular *in vivo*, deve efectuar-se preferencialmente um estudo *in vivo* prévio sobre os efeitos dérmicos da substância, avaliados de acordo com o método de ensaio B.4 (7). A aplicação de uma análise de importância das provas e a estratégia de ensaio sequencial deverão reduzir a necessidade de ensaios *in vivo* para a corrosibilidade/capacidade irritante ocular de substâncias para as quais existem suficientes provas prévias de outros estudos. Caso a determinação do potencial de corrosão ou irritação ocular não possa ser efectuada utilizando a estratégia de ensaio sequencial, mesmo após a realização de um estudo *in vivo* da corrosão e irritação dérmica, pode ser efectuado um ensaio *in vivo* de irritação/corrosão ocular.

Junta-se o Anexo do presente método de ensaio uma estratégia de ensaio sequencial preferível, que inclui a execução de ensaios validados *in vitro* ou *ex vivo* para irritação/corrosão. A estratégia foi desenvolvida num grupo de trabalho (*workshop*) da OCDE (8), no qual foi recomendada por unanimidade dos participantes, tendo sido adoptada como estratégia de ensaio recomendada pelo sistema harmonizado a nível mundial para a classificação de substâncias químicas (GHS) (9). Recomenda-se que a estratégia de ensaio sequencial seja adoptada antes de realizar ensaios *in vivo*. No caso de substâncias novas, recomenda-se uma metodologia de ensaio por etapas para a obtenção de dados científicos sobre a corrosibilidade/capacidade irritante da substância. No caso de substâncias já existentes mas cujos dados sobre irritação/corrosão dérmica e ocular são insuficientes, recomenda-se a adopção desta estratégia para a obtenção dos dados em falta. Caso se opte por uma estratégia ou protocolo de ensaio diferente ou se decida não aplicar uma metodologia de ensaio por etapas, deverá apresentar-se uma justificação fundamentada.

1.2 DEFINIÇÕES

Irritação ocular: consiste na produção de alterações oculares após a aplicação de uma substância de ensaio à superfície anterior do olho, alterações essas que são completamente reversíveis no intervalo de 21 dias após a aplicação.

Corrosão ocular: consiste na produção de lesões do tecido ocular ou enfraquecimento físico grave da visão após aplicação da substância de ensaio à superfície anterior do olho, não reversíveis no intervalo de 21 dias após a aplicação.

1.3 PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

A substância de ensaio é aplicada em dose única a um dos olhos do animal de experiência; o olho que não sofre tratamento é utilizado como controlo. O grau de irritação/corrosão ocular é avaliado pelas lesões de perfuração da conjuntiva, da córnea e da íris, a intervalos determinados. São também descritos outros efeitos sobre o olho e efeitos sistémicos adversos, de modo a permitir uma avaliação completa dos efeitos. A duração do estudo deve ser suficiente para avaliar a reversibilidade ou irreversibilidade dos efeitos.

Os animais que apresentem sinais continuados de se encontrarem em grave perigo e/ou apresentarem sinais de dor durante qualquer das etapas do ensaio devem ser abatidos e a substância deve ser classificada de acordo com estas observações. Os critérios para a decisão de abater animais moribundos e animais em grave sofrimento podem ser consultados na referência (10).

1.4 DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.4.1 **Preparação para o ensaio *in vivo***

1.4.1.1 *Seleção de espécies*

O coelho albino é o animal de laboratório mais adequado, devendo ser usados animais adultos, jovens e saudáveis. A utilização de outras estirpes ou espécies deve ser justificada.

1.4.1.2 *Preparação dos animais*

Devem examinar-se ambos os olhos do animal seleccionado provisoriamente para o ensaio, 24 horas antes do início do ensaio. Não devem ser usados animais que apresentem irritação ocular, defeitos oculares ou lesão pré-existente da córnea.

1.4.1.3 *Condições de alojamento e alimentação*

Os animais devem ser alojados individualmente. A temperatura do biotério para os coelhos deve ser de 20°C (\pm 3°C). A humidade relativa deve ser no mínimo de 30% e, preferivelmente, não exceder 70%, excepto durante a lavagem do biotério, devendo no entanto manter-se idealmente a valores de 50-60%. A iluminação deve ser artificial, com uma sequência de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. Como alimentação, podem ser utilizadas dietas de laboratório convencionais com fornecimento ilimitado de água para beber.

1.4.2 **Protocolo de ensaio**

1.4.2.1 *Apliação da substância de ensaio*

A substância de ensaio deve ser colocada no saco conjuntival de um dos olhos de cada animal, depois de ter separado cuidadosamente a pálpebra inferior do globo ocular. Fecham-se as pálpebras cuidadosamente durante cerca de um segundo de modo a evitar a perda de material. O outro olho, que permanece sem tratamento, é utilizado como controlo.

1.4.2.2 *Irrigação*

Os olhos dos animais de ensaio não devem ser lavados pelo menos nas 24 horas seguintes à instilação da substância de ensaio, excepto para o caso de sólidos (consultar a secção 1.4.2.3.2) e no caso de ocorrência imediata de efeitos corrosivos ou irritantes. Após 24 horas, desde que se considere apropriada, pode ser efectuada uma lavagem.

Não se recomenda a utilização de um grupo satélite de animais para investigar a influência da lavagem, excepto se tal se justificar cientificamente. Se for necessário um grupo satélite de animais, devem utilizar-se dois coelhos. As condições de lavagem devem ser cuidadosamente documentadas, por exemplo, data e hora da lavagem; composição e temperatura da solução de lavagem; duração, volume e velocidade de aplicação.

1.4.2.3 *Nível de dosagem*

1.4.2.3.1 *Ensaio de líquidos*

No caso do ensaio de líquidos, usa-se uma dose de 0,1 ml. Não devem ser utilizados nebulizadores de bomba para instilação directa da substância no olho. O nebulizado líquido deve ser expelido e recolhido num recipiente antes de se instilar 0,1 ml no olho.

1.4.2.3.2 *Ensaio de sólidos*

No caso de ensaio de substâncias sólidas, pastas ou substâncias em partículas, a quantidade usada deve ter um volume de 0,1 ml ou uma massa não superior a 100 mg. O material de ensaio deve ser pulverizado a um pó fino. O volume de material sólido deve ser medido após compactação suave, por exemplo, através de batidas do recipiente que o contém. Se ao tempo da primeira observação, 1 hora após o tratamento, a substância de ensaio sólida não tiver sido removida do olho do animal de ensaio através de mecanismos fisiológicos, o olho pode ser lavado com soro fisiológico ou água destilada.

1.4.2.3.3 *Ensaio de aerossóis*

Recomenda-se a recolha do conteúdo de todos os nebulizadores de bomba e aerossóis antes de instilação no olho. A única excepção é para substâncias em recipientes de aerossol pressurizados, que não podem ser recolhidos devido à sua vaporização. Nestes casos, deve manter-se o olho aberto e administrar-se a substância de ensaio no olho numa aplicação única de duração aproximada de um segundo, mantendo o recipiente directamente à frente do olho a uma distância de 10 cm. Esta distância pode variar em função da pressão do nebulizador e do seu conteúdo. Devem ser tomadas precauções adequadas para não danificar o olho devido à pressão do nebulizador. Em casos apropriados, pode ser necessário avaliar o potencial de lesão "mecânica" do olho pela força da nebulização.

Pode obter-se uma estimativa da dose de um aerossol através de simulação do ensaio da seguinte forma: nebuliza-se a substância para um papel de pesagem através de uma abertura do tamanho do olho de coelho, colocada directamente em frente do papel. Utiliza-se o aumento de peso do papel como uma aproximação da quantidade nebulizada para o olho. Para substâncias voláteis, a dose pode ser estimada por pesagem do recipiente de recolha antes e após a remoção do material de ensaio.

1.4.2.4 *Ensaio inicial (ensaio in vivo de irritação/corrosão ocular utilizando um animal)*

Tal como articulado na estratégia de ensaio sequencial (ver Anexo 1), recomenda-se vivamente que o ensaio *in vivo* seja efectuado inicialmente utilizando um animal.

Se, utilizando o protocolo descrito, os resultados deste ensaio indicarem que a substância é corrosiva ou fortemente irritante para o olho, não devem ser efectuados outros ensaios de irritação ocular.

1.4.2.5 *Anestesia local*

A utilização de anestesia local pode ser feita, mas analisando a sua necessidade caso a caso. Se a análise de importância das provas indicarem que a substância pode causar dor ou se os ensaios iniciais revelarem ocorrência de reacção dolorosa, pode utilizar-se um anestésico local antes da instilação da substância de ensaio. A selecção do tipo, concentração e dose de anestésico local deve ser feita cuidadosamente de modo a assegurar que a sua utilização não altere a reacção à substância de ensaio. O olho de controlo deve ser anestesiado de igual forma.

1.4.2.6 *Ensaio de confirmação (ensaio in vivo de irritação ocular com animais adicionais)*

Se não for observado um efeito corrosivo no ensaio inicial, a resposta irritante ou negativa deve ser confirmada utilizando até dois animais adicionais. Se for observado no ensaio inicial um efeito francamente irritante, indicativo de um efeito possivelmente forte (irreversível) no ensaio de confirmação, recomenda-se que se efectue o ensaio de confirmação de uma forma sequencial num animal de cada vez, em vez de expor dois animais adicionais simultaneamente. Se o segundo animal apresentar efeitos corrosivos ou fortemente irritantes, não se deve continuar o ensaio. Pode ser necessária a utilização de animais adicionais para confirmar respostas de irritação fracas ou moderadas.

1.4.2.7 *Período de observação*

A duração do período de observação deve ser suficiente para uma avaliação completa da magnitude e reversibilidade dos efeitos observados. No entanto, a experiência deve ser interrompida em qualquer altura se o animal apresentar sintomas continuados de dor intensa ou de se encontrar em situação de perigo (9). Para a determinação da reversibilidade dos efeitos, os animais devem ser examinados normalmente durante 21 dias após a administração da substância de ensaio. No caso de se observar reversibilidade antes do fim do período de 21 dias, deve interromper-se a experiência.

1.4.2.7.1 *Observações clínicas e graduação das reacções oculares*

Os olhos devem ser examinados 1, 24, 48 e 72 horas após a aplicação da substância de ensaio. Os animais só devem ser mantidos sob ensaio durante o tempo necessário para obter informação definitiva. Os animais que apresentem sintomas continuados de dor intensa ou de perigo devem ser abatidos sem demora, sendo a substância classificada de acordo com estes resultados. Os animais que apresentem as seguintes lesões oculares posteriores à instilação devem ser abatidos: perfuração da córnea; ulceração significativa da córnea, incluindo estafiloma; sangue na câmara anterior do olho; opacidade da córnea de grau 4 persistente durante 48 horas; ausência de reflexo à luz (resposta da íris de grau 2) persistente durante 72 horas; ulceração da membrana conjuntival; necrose da conjuntiva ou da membrana nictitante; ou formação de crosta. Este procedimento é devido ao facto de normalmente este tipo de lesões ser irreversível.

Os ensaios com animais que não desenvolvam lesões oculares podem ser interrompidos, mas não antes de 3 dias após a instilação. Os animais que apresentem lesões fracas a moderadas devem permanecer sob observação até cura de todas as lesões ou durante o período de 21 dias, após o qual o estudo é finalizado. As observações devem ser efectuadas 7, 14 e 21 dias após a aplicação de modo a determinar o estado das lesões e a sua reversibilidade ou irreversibilidade.

Os graus da reacção ocular (conjuntiva, córnea e íris) devem ser anotados em cada exame (Tabela I). Quaisquer outras lesões do olho (por exemplo, *pannus* da córnea, coloração) ou efeitos sistémicos adversos devem igualmente ser incluídos no relatório.

O exame das reacções pode ser facilitado pela utilização de uma lupa binocular, de uma lâmpada de fenda manual, de um biomicroscópio ou de outro instrumento apropriado. Após anotação das observações no final de 24 horas, o exame aos olhos pode ser feito recorrendo a fluoresceína.

A graduação das respostas oculares é necessariamente subjectiva. O pessoal que executa as observações deve ser treinado adequadamente no sistema de graduação utilizado para promover a harmonização da graduação da resposta ocular e auxiliar os laboratórios de ensaio e as pessoas envolvidas na obtenção e interpretação das observações.

2. **DADOS**

2.2 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados de irritação ocular devem ser avaliados conjuntamente com a natureza e gravidade das lesões e a sua reversibilidade ou ausência de reversibilidade. As respostas individuais não representam um padrão absoluto das propriedades irritantes do material, já que são também avaliados outros efeitos do material de ensaio. Pelo contrário, os resultados individuais devem ser encarados como valores de referência que só são significativos quando corroborados por uma descrição e avaliação completas de todas as observações.

3. RELATÓRIO

3.1 RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deverá incluir as seguintes informações:

Fundamentação lógica para o ensaio *in vivo*: análise de importância das provas dos dados de ensaio pré-existent, incluindo os resultados da estratégia de ensaio sequencial

- descrição dos dados relevantes disponíveis de ensaios anteriores;
- dados obtidos em cada etapa da estratégia de ensaio;
- descrição dos ensaios *in vitro* efectuados, incluindo detalhes sobre o protocolo, resultados obtidos com substâncias de ensaio/referência;
- descrição do estudo efectuado *in vivo* sobre irritação/corrosão dérmica, incluindo os resultados obtidos;
- análise de importância das provas para a realização do estudo *in vivo*

Substância de ensaio:

- dados de identificação (por exemplo, número CAS, origem, grau de pureza, impurezas conhecidas, número de lote);
- natureza física e propriedades físico-químicas (por exemplo, pH, volatilidade, solubilidade, estabilidade, reactividade com água);
- no caso de misturas, composição e percentagens relativas dos componentes;
- no caso de utilização de um anestésico local, identificação, grau de pureza, tipo, dose e interacção potencial com a substância de ensaio.

Excipiente:

- identificação, concentração (quando apropriado), volume utilizado;
- justificação para a escolha do excipiente.

Animais de ensaio:

- espécie/estirpe utilizada, fundamentação lógica para a utilização de outro tipo de animais que não coelhos albinos;
- idade de cada animal no início do estudo;
- número de animais de cada sexo no ensaio e nos grupos de controlo (se necessário);
- peso individual dos animais no início e no final do ensaio;
- origem, condições de alojamento, dieta, etc.

Resultados:

- descrição do método utilizado para medir a irritação em cada observação (por exemplo, lâmpada de fenda manual, biomicroscópio, fluoresceína);
- disposição em tabelas dos dados sobre a resposta irritante/corrosiva para cada animal em cada observação até remoção do animal do ensaio;
- descrição pormenorizada do grau e natureza da irritação ou corrosão observadas;
- descrição de quaisquer outras lesões do olho observadas (por exemplo, vascularização, formação de *pannus* da córnea, adesões, coloração);
- descrição de efeitos não-oculares locais e efeitos sistémicos adversos e, caso sejam efectuadas, das observações histopatológicas.

3.2 INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

A extrapolação dos resultados dos estudos de irritação ocular em animais de laboratório para humanos tem uma validade limitada. Em muitos casos, o coelho albino é mais sensível do que os humanos a substâncias irritantes ou corrosivas oculares.

A interpretação dos dados deve ser feita cuidadosamente de modo a excluir irritação resultante de infecções secundárias.

4.

REFERÊNCIAS

- (1) Barratt, M.D., Castell, J.V., Chamberlain, M., Combes, R.D., Dearden, J.C., Fentem, J.H., Gerner, I., Giuliani, A., Gray, T.J.B., Livingston, D.J., Provan, W.M., Rutten, F.A.J.J.L., Verhaar, H.J.M., Zbinden, P. (1995) The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, 410-429.
- (2) de Silva, O., Cottin, M., Dami, N., Roguet, R., Catroux, P., Toufic, A., Sicard, C., Dossou, K.G., Gerner, I., Schlede, E., Spielmann, H., Gupta, K.C., Hill, R.N. (1997) Evaluation of Eye Irritation Potential: Statistical Analysis and Tier Testing Strategies. Food Chem. Toxicol 35, 159-164.
- (3) Worth A.P. e Fentem J.H. (1999) A general approach for evaluating stepwise testing strategies ATLA 27, 161-177.
- (4) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. *In Vitro*, 2, 19-26.
- (5) Neun, D.J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227-231.
- (6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsaile, D.J., Holzhutter, H.G. e 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.
- (6a) Método de Ensaio B.40 para Corrosão da Pele.
- (7) Método de Ensaio B.4. Toxicidade aguda: irritação/corrosão dérmica.
- (8) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22 - 24 January 1996 (<http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm>).
- (9) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (<http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
- (10) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 19 (<http://www.oecd.org/ehs/test/monos.htm>).

TABELA I: GRADUAÇÃO DE LESÕES OCULARES

Córnea

Opacidade: grau de densidade (as medições devem ser efectuadas na área mais densa)*

Sem ulceração nem opacidade	0
Áreas de opacidade escassas ou difusas (para além de uma pequena perda do lustre normal); detalhes da íris claramente visíveis	1
Área translúcida claramente discernível; detalhes da íris ligeiramente obscurecidos	2
Área nacarada; não são visíveis os detalhes da íris; o tamanho da pupila é dificilmente discernível	3
Córnea opaca; a íris não é discernível através da opacidade	4

Máximo possível: 4

* Deve ser anotada qual a área de opacidade da córnea

Íris

Normal	0
Rugas marcadamente profundas, congestão, tumefacção, hiperemia ao redor da córnea moderada; ou injeção; íris reactiva à luz (considera-se que uma reacção lenta é um efeito)	1
Hemorragia, destruição maciça ou ausência de reacção à luz.....	2

Máximo possível: 2

Conjuntiva

Vermelhidão (refere-se à conjuntiva palpebral e bulbar; excluindo a córnea e a íris) Normal	0
Alguns vasos sanguíneos com hiperemia (injectados)	1
Cor carmesim difusa; vasos individuais não são claramente discerníveis	2
Cor vermelho-carne difusa	3

Máximo possível: 3

Quimiose

Tumefacção (refere-se às pálpebras e/ou às membranas nictantes)

Normal	0
Alguma tumefacção acima do normal	1
Tumefacção óbvia, com eversão parcial das pálpebras	2
Tumefacção, com as pálpebras semi-cerradas	3
Tumefacção, com as pálpebras mais do que semi-cerradas	4

Máximo possível: 4

ANEXO

Uma Estratégia de Ensaio Sequencial para a Irritação e Corrosão Ocular

CONSIDERAÇÕES GERAIS

No sentido de atender aos interesses quer científicos, quer da protecção dos animais, torna-se importante evitar o uso desnecessário de animais e minimizar os ensaios que possam causar reacções graves em animais. Deve ser analisada toda a informação sobre a substância que seja relevante para a sua potencial capacidade irritante/corrosibilidade ocular antes de se considerarem os ensaios *in vivo*. É possível que existam já dados suficientes para classificar a substância de ensaio segundo o seu potencial irritante ou corrosivo ocular, sem necessidade de recorrer a ensaios em animais de laboratório. Assim, a utilização de uma análise de importância das provas e de uma estratégia de ensaio sequencial minimizará a necessidade de ensaios *in vivo*, especialmente no caso de substâncias susceptíveis de produzir reacções graves.

Recomenda-se a utilização da análise de importância das provas para avaliar a informação existente sobre irritação e corrosão ocular e determinar a necessidade de se efectuar estudos adicionais, diferentes dos estudos oculares *in vivo*, que sejam úteis para caracterizar o referido potencial. No caso de serem necessários estudos adicionais, recomenda-se a utilização de uma estratégia de ensaio sequencial para a obtenção dos dados experimentais relevantes. No caso de substâncias para as quais não exista nenhuma história de ensaios, deve ser utilizada a estratégia sequencial para a obtenção dos dados necessários para avaliar a sua irritação/corrosão ocular. A estratégia de ensaio descrita no presente Anexo foi desenvolvida num grupo de trabalho (*workshop*) da OCDE (1). Foi subsequentemente confirmado e ampliado no sistema harmonizado e integrado de classificação de perigos para a saúde humana e efeitos ambientais de substâncias químicas, tal como foi aprovado pela 28ª sessão conjunta do comité das substâncias químicas e do grupo de trabalho de substâncias químicas, em Novembro de 1998 (2).

Apesar da presente estratégia de ensaio não fazer parte integrante do método de ensaio B.5, ela expressa a metodologia recomendada para a determinação das propriedades de irritação/corrosão ocular. Esta metodologia representa não só a melhor prática como também um ponto de referência ético para o ensaio *in vivo* para irritação/corrosão ocular. O método de ensaio fornece uma orientação para a realização do ensaio *in vivo* e resume os factores que devem ser considerados antes de ponderar a execução deste ensaio. A estratégia de ensaio sequencial fornece uma metodologia de análise da importância das provas para a avaliação dos dados existentes sobre as propriedades de irritação/corrosão ocular de substâncias e uma metodologia em séries para a obtenção de dados relevantes sobre substâncias para as quais sejam necessários estudos adicionais ou para os quais não tenham sido efectuados quaisquer estudos. A estratégia inclui inicialmente a realização de ensaios *in vitro* ou *ex vivo* validados e aceites e, seguidamente, do método de ensaio B.4 para o estudo de irritação/corrosão dérmica em circunstâncias específicas (3)(4).

DESCRIÇÃO DA ESTRATÉGIA DE ENSAIO POR ETAPAS

Antes da realização dos ensaios como parte da estratégia de ensaio sequencial (Figura), deve ser avaliada toda a informação disponível de modo a determinar a necessidade de realização de ensaios oculares *in vivo*. Apesar de ser possível obter informação significativa a partir da avaliação de um só parâmetro (por exemplo, pH extremo), deve ser avaliada a totalidade da informação existente. Para uma decisão baseada na análise da importância das provas, devem ser avaliados todos os dados relevantes sobre os efeitos da substância em causa, bem como dos seus análogos estruturais, e deve apresentar-se uma justificação fundamentada para a decisão tomada. Deve dar-se especial relevância aos dados existentes sobre a substância relativamente a humanos e animais e, seguidamente, aos resultados dos ensaios *in vitro* ou *ex vivo*. Sempre que possível devem ser evitados estudos *in vivo* de substâncias corrosivas. Os factores considerados na estratégia de ensaio incluem:

Avaliação dos dados existentes sobre humanos e animais (etapa 1). Devem considerar-se em primeiro lugar os dados existentes sobre humanos - por exemplo, estudos clínicos e ocupacionais, relatórios de casos clínicos e/ou dados de ensaios de estudos oculares em animais -, já que estes dados fornecem informação directamente relacionada com os efeitos nos olhos. Em seguida, devem ser avaliados os dados disponíveis sobre estudos de investigação da irritação/corrosão dérmica em humanos e/ou animais. As substâncias que apresentem evidências de corrosibilidade ou capacidade irritante grave para os olhos conhecidas não devem ser instiladas em olhos de animais. De igual forma, as substâncias que apresentem efeitos corrosivos ou irritantes para a pele, também não devem ser instiladas em olhos de animais, devendo ser consideradas igualmente corrosivas e/ou irritantes para os olhos. As substâncias que apresentem provas suficientes de não serem corrosivas ou irritantes em estudos oculares efectuados anteriormente também não devem ser ensaiadas em estudos oculares *in vivo*.

Análise de relações estrutura-actividade (SAR) (etapa 2). Devem ser considerados os resultados de ensaios de substâncias químicas estruturalmente semelhantes, caso se encontrem disponíveis. No caso de existirem dados sobre humanos e/ou animais suficientes, relativos aos efeitos de substâncias estruturalmente semelhantes ou a misturas deste tipo de substâncias, indicativos do seu potencial de irritação/corrosão ocular, pode presumir-se que a substância de ensaio produzirá as mesmas reacções. Nestes casos, poderá não ser necessário proceder a ensaios da substância. Os dados negativos obtidos de estudos de substâncias estruturalmente semelhantes ou misturas dessas substâncias não constituem prova suficiente de não-corrosibilidade/não-irritabilidade da substância sob estratégia de ensaio sequencial. Devem ser utilizadas abordagens de SAR validadas e aceites para identificação do potencial de irritação e corrosão tanto dos efeitos dérmicos como oculares.

Propriedades físico-químicas e reactividade química (etapa 3). As substâncias que apresentam pH extremos tais como $\leq 2,0$ ou $\geq 11,5$, podem ter efeitos locais fortes. Se o pH extremo servir como base de identificação da corrosibilidade ou capacidade irritante ocular de uma substância, a sua reserva ácida/alcalina (poder tampão) também deve ser tida em consideração (5)(6). Se o poder tampão indicar que a substância pode não ser corrosiva para o olho, devem ser efectuados ensaios adicionais para confirmar esta indicação, de preferência utilizando ensaios *in vitro* ou *ex vivo* validados e aceites (ver secção das etapas 5 e 6).

Consideração de outras informações existentes (etapa 4). Nesta etapa, deve ser avaliada toda a informação disponível sobre toxicidade sistémica por via dérmica. Deve ser também considerada a toxicidade dérmica aguda da substância de ensaio. Se tiver sido demonstrado que a substância é muito tóxica por via dérmica pode não ser necessário efectuar ensaios oculares. Apesar de não existir necessariamente uma relação entre a toxicidade dérmica aguda e a irritação/corrosão ocular, pode considerar-se que se um agente é muito tóxico por via dérmica também mostrará elevada toxicidade quando instilado no olho. Estes dados podem ser também considerados entre as Etapas 2 e 3.

Resultados de ensaios in vitro ou ex vivo (etapas 5 e 6). Não é necessário proceder a ensaios em animais de substâncias que tenham apresentado propriedades corrosivas ou de irritação grave em ensaios *in vitro* ou *ex vivo* (7)(8) que tenham sido validados e aceites para estimar especificamente a corrosibilidade/capacidade de irritação ocular ou dérmica. Pode considerar-se que estas substâncias produzirão efeitos graves semelhantes *in vivo*. Se não se encontrarem disponíveis ensaios *in vitro/ex vivo* validados e aceites, devem ultrapassar-se as Etapas 5 e 6 e passar-se directamente à Etapa 7.

Avaliação da capacidade irritante ou corrosibilidade dérmica in vivo de uma substância (etapa 7). Caso não existam dados suficientes para uma análise da importância das provas conclusiva sobre o potencial de irritação/corrosão de uma substância baseada nos dados dos estudos supramencionados, deve proceder-se em primeiro lugar a uma avaliação do potencial de irritação/corrosão dérmica *in vivo*, utilizando o método de ensaio B.4 (4) e o seu Anexo (9). Se a substância causar corrosão ou irritação grave da pele, deve ser considerada um irritante ocular corrosivo, excepto se existir outro tipo de informação que apoie uma conclusão alternativa. Assim, não há necessidade de efectuar um ensaio ocular *in vivo*. Se a substância não for corrosiva ou gravemente irritante para a pele, deve efectuar-se um ensaio ocular *in vivo*.

Ensaio in vivo em coelhos (Etapas 8 e 9). O ensaio ocular *in vivo* deve começar por um ensaio inicial usando um animal. Se os resultados deste ensaio indicarem que a substância provoca irritação grave ou é corrosiva para os olhos, não devem ser efectuados outros ensaios. Se o ensaio não revelar quaisquer efeitos corrosivos ou de irritação grave, deve efectuar-se um ensaio de confirmação com dois animais adicionais.

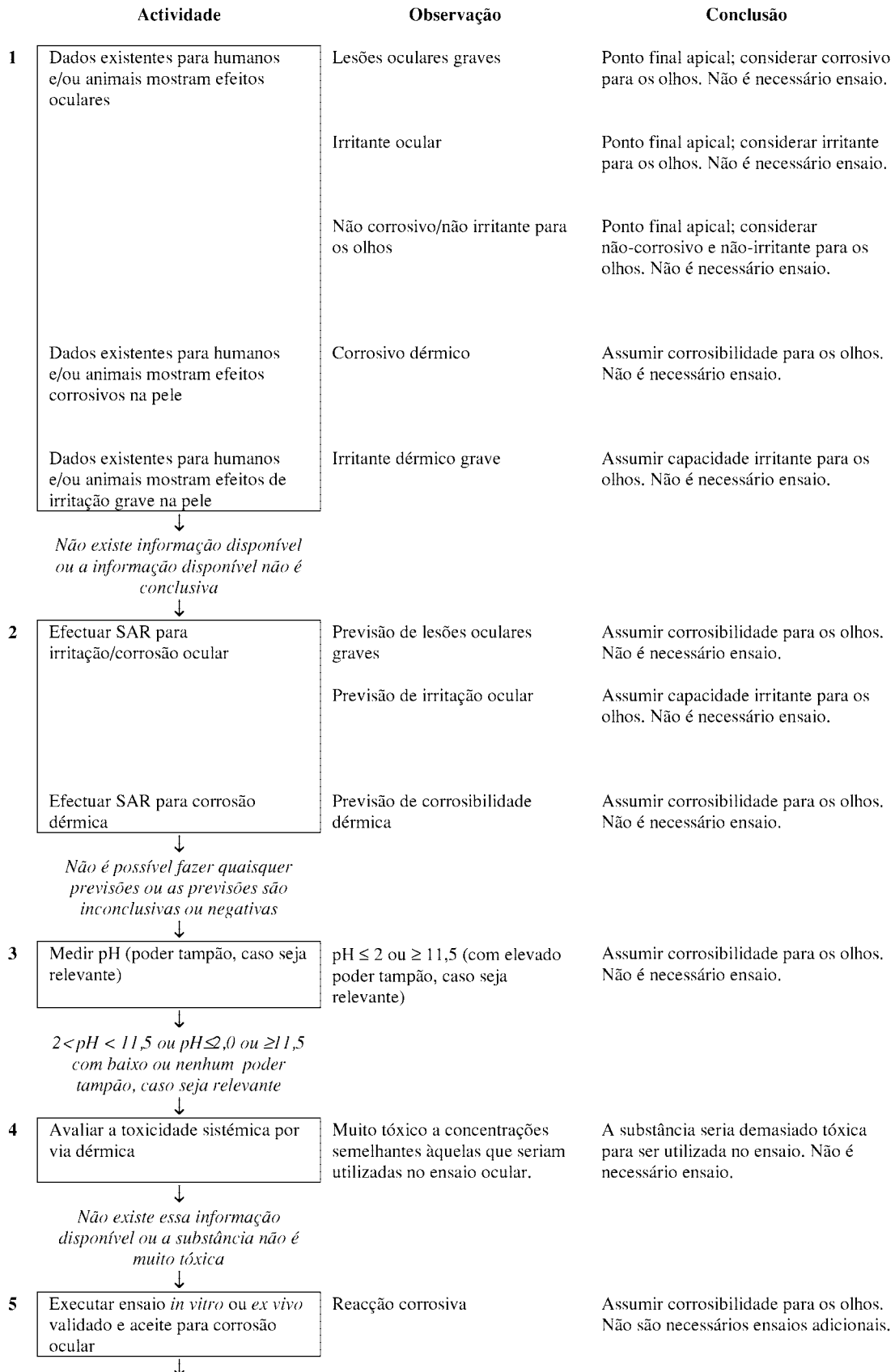
REFERÊNCIAS

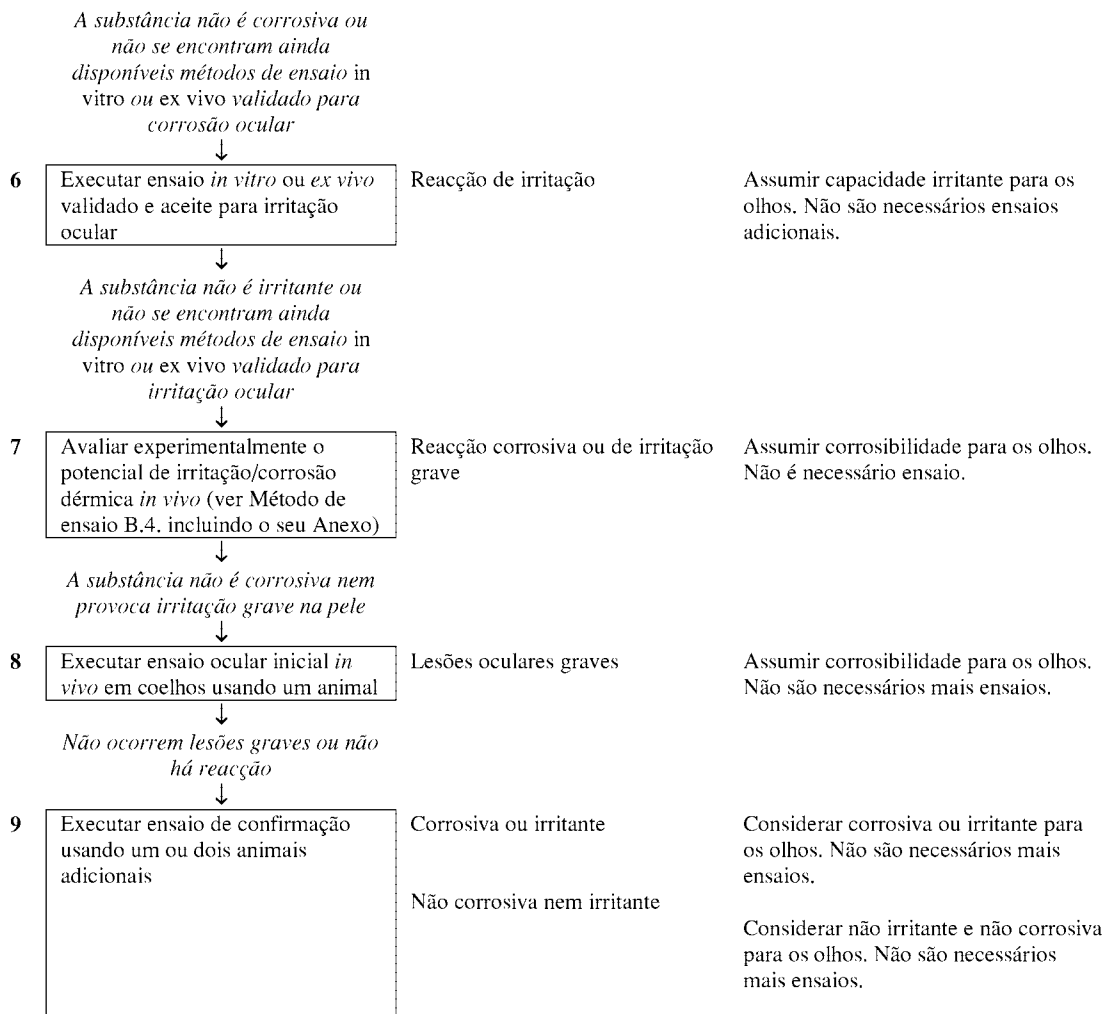
- (1) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22-24 January 1996 (<http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm>).
- (2) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (<http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
- (3) Worth, A.P. e Fentem J.H. (1999) A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies. *ATLA* 27, 161-177.
- (4) Método de ensaio B.4. Toxicidade aguda: irritação/corrosão dérmica.
- (5) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. *Toxicol. In Vitro*, 2, 19-26.
- (6) Neun, D.J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. *J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol.* 12, 227-231.

- (7) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzhutter, H.G. e 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.
- (8) Método de Ensaio B.40. Corrosão Dérmica.
- (9) Anexo ao método de ensaio B.4: Uma Estratégia de Ensaio Sequencial para Irritação e Corrosão Dérmicas.

FIGURA

ESTRATÉGIA DE ENSAIO E AVALIAÇÃO PARA IRRITAÇÃO/CORROSÃO OCULAR





ANEXO 2F

B.31. ESTUDO DE TOXICIDADE SOBRE O DESENVOLVIMENTO PRÉ-NATAL

1. MÉTODO

O presente método baseia-se na publicação OECD TG 414 (2001) (normas de ensaio da OCDE).

1.1 INTRODUÇÃO

O presente método de ensaio de toxicidade sobre o desenvolvimento destina-se a fornecer informação geral sobre os efeitos de exposição pré-natal no animal de ensaio prenhe e no organismo em desenvolvimento no útero; pode incluir a avaliação de efeitos maternos e de morte, anomalias estruturais ou alterações no crescimento do feto. Apesar de constituírem uma parte importante do desenvolvimento, as deficiências funcionais não são contempladas neste método de ensaio, poderão ser testadas num estudo independente ou em complementaridade ao presente estudo, usando o método de ensaio de neurotoxicidade sobre o desenvolvimento. Para obter informações relativas aos ensaios sobre deficiências funcionais e outros efeitos pós-natais, deverão consultar-se os métodos de ensaio para o estudo da toxicidade sobre a reprodução em duas gerações e o estudo da neurotoxicidade sobre o desenvolvimento, conforme seja apropriado.

Em situações pontuais, poderá revelar-se oportuno introduzir adaptações específicas no método de ensaio com base em informações relativas, por exemplo, às propriedades físico-químicas ou toxicológicas da substância de ensaio. Contudo, este procedimento só será aceitável quando existirem fortes razões científicas de que as alterações ao método conduzirão a um ensaio mais informativo. Nesse caso, os fundamentos científicos que justificam as adaptações introduzidas deverão ser cuidadosamente documentados no relatório do estudo.

1.2 DEFINIÇÕES

Toxicologia sobre o desenvolvimento: estudo dos efeitos adversos que se manifestam num organismo em desenvolvimento em resultado da exposição a determinada substância antes da concepção, durante o desenvolvimento pré-natal ou no período que decorre desde o nascimento até à maturação sexual. As principais manifestações de toxicidade sobre desenvolvimento incluem: 1) morte do organismo, 2) anomalia estrutural, 3) alterações no crescimento e 4) deficiência funcional. Anteriormente, a toxicologia sobre o desenvolvimento era em muitos casos designada por teratologia.

Efeito adverso: qualquer alteração à normalidade relacionada com o tratamento que diminua a capacidade de um organismo para sobreviver, reproduzir-se ou adaptar-se ao meio ambiente. No que respeita à toxicologia sobre o desenvolvimento, esta definição abrange, no seu sentido mais lato, todos os efeitos que interfiram no desenvolvimento normal do conceito, antes e após o nascimento.

Alterações no crescimento: alteração de peso ou tamanho do corpo ou de um órgão de um descendente.

Alterações (anomalias): alterações estruturais no desenvolvimento, que incluem as malformações e as variações (28).

Malformação/Anomalia Grave: alteração estrutural considerada prejudicial para o animal (pode também ser letal), cuja ocorrência é normalmente rara.

Varição/Anomalia Ligeira: alteração estrutural pouco ou nada prejudicial para o animal; pode ser transitente e ocorrer com relativa frequência na população de controlo.

Concepto: conjunto dos derivados de um óvulo fertilizado em qualquer estágio de desenvolvimento, desde a fertilização até ao nascimento, incluindo as membranas extra-embrionárias, bem como o embrião ou o feto.

Implantação (nidação): ligação do blastocisto ao revestimento epitelial do útero, incluindo a sua penetração através do epitélio uterino e a sua implantação no endométrio.

Embrião: estágio inicial ou em desenvolvimento de qualquer organismo; mais especificamente, é o produto da fertilização de um óvulo nas fases de desenvolvimento que decorrem desde o aparecimento da corda dorsal até à formação de todas as estruturas principais.

Embriotoxicidade: conjunto dos efeitos prejudiciais sobre a estrutura, desenvolvimento, crescimento e/ou viabilidade normais de um embrião.

Feto: organismo em gestação no período pós-embrionário.

Toxicidade fetal: conjunto dos efeitos prejudiciais sobre a estrutura, desenvolvimento, crescimento e/ou viabilidade normais de um feto.

Aborto: expulsão prematura do útero dos produtos da concepção: o embrião ou um feto inviável.

Reabsorção: reabsorção (presente ou passada) de um produto de concepção morto depois de implantado no útero.

Reabsorção prematura: sinais de implantação sem existência reconhecível de embrião/feto.

Reabsorção tardia: embrião ou feto morto, que apresentam alterações degenerativas externas.

NSEAO: abreviatura para nível sem efeito adverso observável; corresponde à maior dose ou ao maior nível de exposição para o qual não se observam efeitos adversos relacionados com o tratamento.

1.3 SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA

Nenhuma.

1.4 PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

Normalmente, a substância de ensaio é administrada aos animais prenhes desde o momento da implantação (pelo menos) até ao dia anterior ao previsto para o sacrifício. O dia do sacrifício deverá ser agendado o mais próximo possível da data esperada para o parto, sem que seja descurada a possibilidade de ocorrerem parto prematuro e a consequente perda de dados. O método de ensaio não se destina apenas a examinar o período da organogénese (por exemplo, dias 5-15 em roedores e dias 6-18 no coelho); permite também avaliar efeitos de toxicidade desde a pré-implantação (se apropriado) e ao longo de todo o período de gestação até ao dia anterior à operação cesariana. As fêmeas são sacrificadas pouco antes da operação cesariana, após o que os conteúdos uterinos são examinados e os fetos inspeccionados para detectar a presença de anomalias externas visíveis e alterações dos tecidos moles e do esqueleto.

1.5 DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.5.1 **Seleção de espécies animais**

Recomenda-se que o ensaio seja realizado com as espécies mais relevantes e que se utilizem as espécies e estirpes laboratoriais mais vulgarmente usadas em ensaios de toxicidade sobre o desenvolvimento pré-natal. As espécies preferidas para ensaio são o rato, no caso de roedores, e o coelho, no caso de não-roedores. O uso de outras espécies deverá ser devidamente justificado.

1.5.2 **Condições de alojamento e alimentação**

A temperatura do compartimento experimental dos animais deve ser 22°C ($\pm 3^\circ$) para roedores e 18°C ($\pm 3^\circ$) para coelhos. A humidade relativa deverá ser 50-60%, embora sejam aceitáveis valores entre um mínimo de 30% e um máximo que, preferivelmente, não deverá exceder 70%, salvo durante os períodos de limpeza do compartimento. A iluminação deve ser artificial, com sequências de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. A alimentação pode basear-se em dietas de laboratório convencionais, com fornecimento ilimitado de água para beber. O acasalamento deve ocorrer em gaiolas adequadas para o efeito. Embora seja preferível alojar individualmente os animais durante o acasalamento, considera-se aceitável o alojamento conjunto de um pequeno número de animais.

1.5.3 **Preparação dos animais**

Devem usar-se animais saudáveis que tenham permanecido nas condições laboratoriais durante pelo menos 5 dias antes do ensaio para aclimação e que não tenham sido sujeitos a experiências anteriores. Os animais de ensaio devem ser caracterizados no que respeita à espécie, estirpe, proveniência, sexo, peso e/ou idade. Os animais de todos os grupos de ensaio devem ser, tanto quanto possível, uniformes quanto ao peso e à idade. Devem usar-se fêmeas jovens, adultas e nulíparas em todos os níveis de dose. As fêmeas devem acasalar com machos da mesma espécie e estirpe, devendo evitar-se o acasalamento entre irmãos. Em roedores, considera-se o dia 0 de gestação aquele em que se observa um rolhão vaginal e/ou esperma. Em coelhos, o dia 0 é normalmente o dia do coito ou da inseminação artificial, caso esta técnica seja usada. As gaiolas devem ser dispostas de forma a minimizar possíveis efeitos derivados do seu posicionamento. Cada animal deve receber um número de identificação individualizado. As fêmeas acasaladas devem ser distribuídas pelos grupos de controlo e de tratamento de forma aleatória. Caso tenha havido alojamento conjunto de várias fêmeas durante o acasalamento, os animais de cada conjunto devem ser distribuídos uniformemente pelos grupos de ensaio. Do mesmo modo, as fêmeas inseminadas pelo mesmo macho devem ser distribuídas equitativamente pelos vários grupos.

1.6 PROCEDIMENTO

1.6.1 **Número e sexo dos animais**

Cada grupo de ensaio e de controlo deve comportar um número de fêmeas suficiente para que se obtenham cerca de 20 animais com locais de implantação no momento da necropsia. Os grupos com menos de 16 animais com locais de implantação poderão ser considerados como inadequados. A mortalidade materna não invalida necessariamente o estudo, desde que não seja superior a cerca de 10%.

1.6.2 **Preparação das doses**

Se for usado um agente de transporte ou outro aditivo para facilitar a administração das doses, deverão ser tomadas em consideração as seguintes características: efeitos na absorção, distribuição, metabolismo e retenção ou excreção da substância de ensaio; efeitos nas propriedades químicas da substância de ensaio susceptíveis de alterar as suas características tóxicas; e efeitos no consumo de alimentos, na ingestão de água ou no estado nutricional dos animais. O agente de transporte não deverá apresentar toxicidade sobre o desenvolvimento nem exercer efeitos na reprodução.

1.6.3 **Dosagem**

Normalmente, a substância de ensaio deverá ser administrada diariamente, desde a implantação (por exemplo, no dia 5 pós-acasalamento) até ao dia anterior ao previsto para a operação cesariana. Se estudos anteriores eventualmente disponíveis não indicarem um elevado potencial para perdas pré-implantação, o tratamento poderá prolongar-se de forma a abranger todo o período de gestação, desde o acasalamento até ao dia anterior ao previsto para o sacrifício. É sabido que a manipulação imprópria ou a sujeição a tensões durante a gravidez podem resultar em perdas pré-natais, pelo que devem evitar-se manipulações desnecessárias dos animais prenhes e tensões de origem externa, tais como ruído, de forma a minimizar as perdas por factores não relacionados com o tratamento.

Devem utilizar-se pelo menos três níveis de dose e um controlo simultâneo. Os animais saudáveis devem ser distribuídos aleatoriamente pelos grupos de controlo e de tratamento. Os níveis de dose devem ser espaçados de forma a produzir uma graduação de efeitos tóxicos. A escolha do nível de dose máximo deve ter como objectivo produzir alguma toxicidade sobre o desenvolvimento e/ou sobre a mãe (sinais clínicos ou diminuição do peso corporal), mas não a morte ou sofrimento agudo, salvo se existirem limitações impostas pela natureza físico-química ou pelas propriedades biológicas da substância de ensaio. Pelo menos um dos níveis de dose intermédios deverá produzir efeitos tóxicos mínimos observáveis. O nível de dose mais baixo não deverá induzir qualquer sinal de toxicidade sobre a mãe ou sobre o desenvolvimento. Deve seleccionar-se uma sequência descendente de níveis de dose que permita detectar qualquer resposta relacionada com a dosagem e determinar o nível sem efeito adverso observável (NSEAO). Frequentemente, a melhor forma de estabelecer estas sequências consiste no espaçamento das doses em série geométrica, usando factores de dois ou de quatro. A adição de um quarto grupo de ensaio é muitas vezes preferível ao uso de intervalos muito grandes entre as dosagens (ou seja, com um factor superior a 10). Embora um dos objectivos do ensaio seja a determinação do NSEAO materno, podem considerar-se aceitáveis estudos que não permitam o cálculo deste valor (1).

A escolha dos níveis de dose deverá tomar em consideração todos os dados de toxicidade existentes, bem como informações adicionais sobre o metabolismo e toxicocinética da substância de ensaio ou de substâncias relacionadas. Estas informações poderão ser também usadas para demonstrar a adequação do regime de dosagem.

Deve usar-se um grupo de controlo simultâneo, que poderá ser um grupo com tratamento simulado ou, se for usado um agente de transporte para administrar a substância de ensaio, um grupo de controlo do agente de transporte. Todos os grupos devem ser tratados com o mesmo volume da substância de ensaio ou do agente de transporte. Os animais do(s) grupo(s) de controlo devem ser manipulados de forma idêntica aos animais dos grupos de ensaio. Os grupos de controlo do agente de transporte deverão receber o volume máximo de agente de transporte utilizado no ensaio (ou seja, um volume idêntico ao do grupo do nível de dose mais baixo).

1.6.4 **Ensaio-limite**

Se um ensaio com um nível de dose oral de pelo menos 1000 mg/kg de peso corporal/dia, realizado de acordo com os procedimentos descritos neste estudo, não provocar toxicidade observável nos animais prenhes nem na sua descendência e se, para além disso, os dados existentes sobre compostos estrutural e/ou metabolicamente relacionados com a substância de ensaio não sugerirem a possível ocorrência de efeitos, poderá considerar-se desnecessário realizar um ensaio completo com três níveis de dose. Nos casos em que se preveja exposição humana, poderá ser necessário aumentar o nível de dose oral no ensaio-limite. Quando se usam outras formas de administração, como inalação ou aplicação cutânea, as propriedades físico-químicas da substância de ensaio são muitas vezes indicativas e limitantes do nível máximo de exposição praticável (por exemplo, a aplicação cutânea não deverá causar toxicidade local grave).

1.6.5 **Administração das doses**

Na maior parte dos casos, a substância de ensaio ou o agente de transporte são administrados oralmente por intubação. Se for usada outra via de administração, o experimentador deverá indicar e justificar as razões que presidiram à sua escolha; nesse caso, poderá ser necessário introduzir modificações apropriadas no método de ensaio (2)(3)(4). A substância de ensaio deve ser administrada todos os dias aproximadamente à mesma hora.

Normalmente, a dose a administrar a cada animal é calculada com base na determinação mais recente do seu peso corporal. No entanto, o ajuste das doses durante o último terço da gravidez deve ser feito com precaução. A escolha da dose deve tomar em consideração dados de estudos anteriores para evitar um excesso de toxicidade materna; contudo, se tal suceder, as mães com indícios de toxicidade excessiva devem ser sacrificadas. Se vários animais prenhes apresentarem sinais de excesso de toxicidade, deverá considerar-se a possibilidade de pôr termo ao grupo de dose a que pertencem. A administração por gavagem deve ser feita, de preferência, numa toma única, usando uma sonda gástrica ou uma cânula de intubação apropriada.

O volume máximo de líquido que pode ser administrado numa toma depende do tamanho do animal de ensaio, não devendo exceder 1 ml/100 g de peso corporal; exceptuam-se as soluções aquosas, que podem ser administradas na proporção de 2 ml/100 g de peso corporal. Quando se usa óleo de milho como agente de transporte, o volume máximo aceitável é de 0,4 ml/100 g de peso corporal. Deve minimizar-se a variabilidade do volume de ensaio efectuando ajustes nas concentrações, de forma a assegurar a constância do volume em todos os níveis de dose.

1.6.6 **Observação das mães**

Devem efectuar-se observações clínicas pelo menos uma vez por dia, de preferência sempre à(s) mesma(s) hora(s). A escolha do momento da observação deve tomar em consideração o período de efeitos máximos previsto que se verifica após a administração da dose. Estas observações devem ser descritas num registo, que deverá conter indicações sobre a condição dos animais, incluindo mortalidade, estado moribundo, alterações pertinentes do comportamento e todos os sinais de manifesta toxicidade.

1.6.7 **Peso corporal e consumo de alimento**

Os animais devem ser pesados no dia 0 de gestação (se os animais acasalados forem fornecidos por um criador externo, a pesagem poderá ser feita até ao dia 3 de gestação, o mais tardar), no primeiro dia de dosagem, de três em três dias (pelo menos) durante o período de dosagem e no dia do sacrifício.

Devem efectuar-se registos do consumo de alimento de três em três dias, coincidindo com dias da determinação do peso corporal.

1.6.8 **Inspecção pós-morte**

As fêmeas devem ser sacrificadas no dia anterior ao previsto para o parto. As fêmeas que apresentem sinais de aborto ou parto prematuro antes da data marcada para o sacrifício deverão ser mortas antecipadamente e submetidas a um exame macroscópico completo.

No momento do sacrifício ou da morte durante o estudo, as mães serão objecto de um exame macroscópico, a fim de se detectarem quaisquer anomalias estruturais ou modificações patológicas. A observação das mães durante a operação de cesariana e a subsequente análise fetal deverão ser feitas de preferência sem que os restantes animais do grupo se apercebam para evitar perturbações.

1.6.9 Exame dos conteúdos uterinos

Imediatamente após o sacrifício ou o mais cedo possível depois da morte espontânea, os úteros serão retirados para se averiguar o estado de gravidez dos animais. Os úteros que não se apresentem grávidos devem ser submetidos a exames adicionais (por exemplo, coloração com sulfureto de amónio em roedores e coloração de Salewsky ou um método alternativo apropriado em coelhos) para confirmar o estado de não-gravidez (5).

Devem pesar-se os úteros grávidos, incluindo o colo. Não serão considerados para pesagem os úteros grávidos provenientes de animais encontrados mortos durante o estudo.

Deve determinar-se o número de corpos amarelos nos animais prenhes.

Devem examinar-se os conteúdos uterinos para determinar os números de embriões ou de fetos mortos, bem como o número de fetos viáveis. Deve avaliar-se o grau de reabsorção, a fim de determinar o tempo relativo da morte do concepto (ver secção 1.2).

1.6.10 Exame dos fetos

Devem determinar-se o sexo e o peso corporal de cada feto.

Cada feto será objecto de um exame para detectar alterações externas (6).

Os fetos devem ser examinados para detectar alterações do esqueleto e dos tecidos moles (por exemplo, variações e malformações ou anomalias) (7)(8)(9)(10)(11)(12)(13)(14)(15)(16)(17)(18)(19)(20)(21)(22)(23)(24). É aconselhável (mas não obrigatório) proceder à categorização das alterações fetais, explicitando claramente os critérios usados para definir cada categoria. O aparelho reprodutor deve ser objecto de especial atenção, devendo ser inspeccionado quanto a sinais de alterações no desenvolvimento.

No caso de roedores, devem preparar-se e examinar-se cerca de metade dos animais de cada ninhada para detecção de alterações do esqueleto; os restantes animais serão preparados e examinados para determinar alterações dos tecidos moles, usando métodos aprovados de seccionamento em série ou técnicas adequadas de dissecação macroscópica cuidadosa.

No caso de não-roedores (por exemplo, o coelho), todos os fetos serão examinados para detectar alterações dos tecidos moles e do esqueleto. Os corpos serão preparados por dissecação cuidadosa e examinados quanto à existência de alterações dos tecidos moles; o exame pode incluir procedimentos adicionais para avaliação da estrutura cardíaca interna (25). Metade dos fetos será decapitada e as cabeças removidas serão processadas para avaliação de alterações de tecidos moles (incluindo olhos, cérebro, meatos nasais e língua), usando métodos correntes de seccionamento em série (26) ou outros métodos de sensibilidade idêntica. Os corpos dos fetos decapitados e os restantes fetos intactos serão processados e examinados para se detectarem alterações do esqueleto, recorrendo a métodos idênticos aos descritos para roedores.

2 DADOS

2.1 TRATAMENTO DOS RESULTADOS

Os dados relativos às mães e aos seus descendentes devem ser registados individualmente e resumidos em forma tabular, indicando, para cada grupo de ensaio, o número de animais no início do ensaio, o número de animais encontrados mortos durante o ensaio ou sacrificados por razões humanitárias, o momento de todas as mortes (espontâneas ou provocadas), o número de fêmeas grávidas, o número de animais com sinais de toxicidade, uma descrição dos sinais de toxicidade observados (incluindo o momento do aparecimento, a duração e a intensidade), os tipos de observações embrionárias/fetais e todos os dados relevantes sobre as ninhadas.

Os resultados numéricos devem ser avaliados por um método estatístico apropriado, usando a ninhada como unidade para a análise de dados. Deve usar-se um método estatístico geralmente aceite; a sua escolha deve fazer parte do planeamento do estudo e ser devidamente justificada. Devem também registar-se os dados relativos a animais que não sobreviveram até à data prevista para o sacrifício. Quando apropriado, estes dados poderão ser incluídos nas médias de grupos; contudo, a sua importância e, conseqüentemente, a sua inclusão ou exclusão em qualquer média de grupo devem ser avaliadas e justificadas caso a caso.

2.2 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os dados recolhidos no Estudo de Toxicidade sobre o Desenvolvimento Pré-Natal deverão ser analisados em termos dos efeitos observados. Esta análise deverá considerar a seguinte informação:

- resultados do ensaio relativos à mãe e ao embrião/feto, incluindo uma avaliação da relação (ou da ausência de relação) entre a exposição dos animais à substância de ensaio e a incidência e a gravidade de todos os efeitos observados;
- critérios usados para a categorização das alterações externas, dos tecidos moles e do esqueleto dos fetos, caso tenha sido feita;
- dados de controlo de estudos anteriores, quando apropriado, a fim de consolidar a interpretação dos resultados do presente estudo;
- números usados no cálculo de todas as percentagens ou índices;
- análise estatística adequada dos resultados do estudo, quando apropriado: deverá incluir informação suficiente sobre o método de análise para que um examinador/estatístico independente possa reavaliar e reconstituir a análise.

No caso de o estudo demonstrar a inexistência de qualquer efeito tóxico, deverá considerar-se a possibilidade de realizar investigações adicionais no sentido de definir a absorção e a biodisponibilidade da substância de ensaio.

2.3 INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

A finalidade do estudo de toxicidade sobre o desenvolvimento pré-natal reside na obtenção de informações relativas aos efeitos de exposição repetida a uma substância durante a gravidez tanto nas mães como no desenvolvimento intra-uterino dos seus descendentes. A interpretação dos resultados deve tomar em consideração dados de estudos subcrónicos, de reprodução e toxicocinéticos, entre outros eventualmente disponíveis. O estudo enfatiza de igual modo a toxicidade geral, que pode ser avaliada pela toxicidade sobre a mãe, e a toxicidade sobre o desenvolvimento. Assim, os resultados obtidos vão permitir estabelecer, até certo ponto, a distinção entre (i) os efeitos sobre o desenvolvimento não associados a toxicidade geral e (ii) os efeitos sobre o desenvolvimento que apenas são induzidos em níveis que também são tóxicos para a mãe (27).

3

RELATÓRIO

RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deverá incluir as seguintes informações específicas:

Substância de ensaio:

- natureza física e, quando relevante, propriedades físico-químicas;
- identificação, incluindo o número CAS, caso este seja conhecido ou esteja definido;
- pureza.

Agente de transporte (se apropriado):

- caso o agente de transporte não seja água, uma justificação para a sua escolha.

Animais de ensaio:

- espécie e estirpe usadas;
- número e idade dos animais;
- proveniência, condições de alojamento, dieta, etc.;
- pesos individuais dos animais no início do ensaio.

Condições de ensaio:

- razões que presidiram à escolha dos diferentes níveis de dose;
- informação pormenorizada sobre a formulação da substância de ensaio/preparação da dieta, concentração atingida, estabilidade e homogeneidade da preparação;
- informação pormenorizada sobre a administração da substância de ensaio;
- conversão da concentração da substância de ensaio na dieta/água de beber (ppm) para a dose real (mg/kg de peso corporal/dia), se aplicável;
- condições ambientais;
- informação pormenorizada sobre a qualidade dos alimentos e da água.

Resultados:

Dados de resposta tóxica materna por dose, incluindo, entre outras informações:

- número de animais no início do ensaio, número de animais sobreviventes, número de animais prenhes, número de animais que abortaram, número de animais com parto prematuro;
- dia da morte no decurso do estudo ou indicação dos animais sobreviventes no termo da experiência;
- os dados relativos a animais que não sobreviveram até à data prevista para o sacrifício devem ser incluídos no relatório, mas não devem ser usados em comparações estatísticas entre grupos;
- dia da observação de cada sinal de anomalia clínica e subsequente evolução dessa anomalia;
- peso corporal, alteração do peso corporal e peso do útero grávido; opcionalmente, alteração do peso corporal corrigida em relação ao peso do útero grávido;
- consumo de alimento e consumo de água (caso este tenha sido medido);
- resultados da necropsia, incluindo o peso uterino;
- deverão indicar-se os valores dos NSEAO para os efeitos maternos e para os efeitos sobre o desenvolvimento.

Desenvolvimento atingido nas ninhadas com implantes em cada nível de dose, incluindo:

- número de corpos amarelos;
- número de implantações, número e percentagem de fetos vivos e mortos e de reabsorções;
- número e percentagem de perdas pré- e pós-implantação.

Desenvolvimento atingido nas ninhadas com fetos vivos em cada nível de dose, incluindo:

- número e percentagem de descendentes vivos;
- proporção entre os sexos;
- peso corporal fetal, de preferência por sexo e nos dois sexos em conjunto;
- malformações externas, dos tecidos moles e do esqueleto, bem como outras alterações relevantes;
- critérios usados na categorização, se apropriado;
- número total e percentagem de fetos e ninhadas que apresentem qualquer alteração externa, dos tecidos moles ou do esqueleto, bem como os tipos e incidências de anomalias individuais e outras alterações relevantes.

Análise dos resultados.

Conclusões.

4

REFERÊNCIAS

- (1) Kavlock R.J. et al. (1996) A Simulation Study of the Influence of Study Design on the Estimation of Benchmark Doses for Developmental Toxicity. *Risk Analysis* 16; 399-410.
- (2) Kimmel, C.A. and Francis, E.Z. (1990) Proceedings of the Workshop on the Acceptability and Interpretation of Dermal Developmental Toxicity Studies. *Fundamental and Applied Toxicology* 14; 386-398.
- (3) Wong, B.A., et al. (1997) Developing Specialized Inhalation Exposure Systems to Address Toxicological Problems. *CIT Activities* 17; 1-8.
- (4) US Environmental Protection Agency (1985) Subpart E-Specific Organ/Tissue Toxicity, 40 CFR 798.4350: Inhalation Developmental Toxicity Study.
- (5) Salewski, E. (1964) Faerbermethode zum Makroskopischen Nachweis von Implantations Stellen am Uterus der Ratte. *Naunyn-Schmeidebergs Archiv für Pharmakologie und Experimentelle Pathologie* 247:367.
- (6) Edwards, J.A. (1968) The external Development of the Rabbit and Rat Embryo. In *Advances in Teratology*. D.H.M. Woolam (ed.) Vol. 3. Academic Press, NY.
- (7) Inouye, M. (1976) Differential Staining of Cartilage and Bone in Fetal Mouse Skeleton by Alcian Blue and Alizarin Red S. *Congenital Anomalies* 16; 171-173.
- (8) Igarashi, E. et al. (1992) Frequency Of Spontaneous Axial Skeletal Variations Detected by the Double Staining Technique for Ossified and Cartilaginous Skeleton in Rat Foetuses. *Congenital Anomalies* 32; :381-391.
- (9) Kimmel, C.A. et al. (1993) Skeletal Development Following Heat Exposure in the Rat. *Teratology* 47:229-242.
- (10) Marr, M.C. et al. (1988) Comparison of Single and Double Staining for Evaluation of Skeletal Development: The Effects of Ethylene Glycol (EG) in CD Rats. *Teratology* 37; 476.
- (11) Barrow, M.V. and Taylor, W.J. (1969) A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Foetuses. *Journal of Morphology* 127:291-306.
- (12) Fritz, H. (1974) Prenatal Ossification in Rabbits as Indicative of Foetal Maturity. *Teratology* 11; 313-320.
- (13) Gibson, J.P. et al. (1966) Use of the Rabbit in Teratogenicity Studies. *Toxicology and Applied Pharmacology* 9; :398-408.
- (14) Kimmel, C.A. and Wilson, J.G. (1973) Skeletal Deviation in Rats: Malformations or Variations? *Teratology* 8; 309-316.

- (15) Marr, M.C. et al. (1992) Developmental Stages of the CD (Sprague-Dawley) Rat Skeleton after Maternal Exposure to Ethylene Glycol. *Teratology* 46; 169-181.
- (16) Monie, I.W. et al. (1965) Dissection Procedures for Rat Foetuses Permitting Alizarin Red Staining of Skeleton and Histological Study of Viscera. *Supplement to Teratology Workshop Manual*, pp. 163-173.
- (17) Spark, C. and Dawson, A.B. (1928) The Order and Time of appearance of Centers of Ossification in the Fore and Hind Limbs of the Albino Rat, with Special Reference to the Possible Influence of the Sex Factor. *American Journal of Anatomy* 41; 411-445.
- (18) Staples, R.E. and Schnell, V.L. (1964) Refinements in Rapid Clearing Technique in the KOH-Alizarin Red S Method for Fetal Bone. *Stain Technology* 39; 61-63.
- (19) Strong, R.M. (1928) The Order Time and Rate of Ossification of the Albino Rat (*Mus Norvegicus Albinus*) Skeleton. *American Journal of Anatomy* 36; 313-355.
- (20) Stuckhardt, J.L. and Poppe, S.M. (1984) Fresh Visceral Examination of Rat and Rabbit Foetuses Used in Teratogenicity Testing. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 4; 181-188.
- (21) Walker, D.G. and Wirtschafter, Z.T. (1957) *The Genesis of the Rat Skeleton*. Thomas, Springfield, IL.
- (22) Wilson, J.G. (1965) Embryological Considerations in Teratology. In *Teratology: Principles and Techniques*, Wilson J.G. and Warkany J. (eds). University of Chicago, Chicago, IL, pp 251-277.
- (23) Wilson, J.G. and Fraser, F.C. (eds). (1977) *Handbook of Teratology*, Vol. 4. Plenum, NY.
- (24) Varnagy, L. (1980) Use of Recent Fetal Bone Staining Techniques in the Evaluation of Pesticide Teratogenicity. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* 28; 233-239.
- (25) Staples, R.E. (1974) Detection of visceral Alterations in Mammalian Foetuses. *Teratology* 9; 37-38.
- (26) Van Julsingha, E.B. and C.G. Bennett (1977) A Dissecting Procedure for the Detection of Anomalies in the Rabbit Foetal Head. In: *Methods in Prenatal Toxicology* Neubert, D., Merker, H.J. and Kwasigroch, T.E. (eds.). University of Chicago, Chicago, IL, pp. 126-144.
- (27) US Environmental Protection Agency (1991) Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment. *Federal Register* 56; 63798-63826.
- (28) Wise, D.L. et al. (1997) Terminology of Developmental Abnormalities in Common Laboratory Mammals (Version 1) *Teratology* 55; 249-292.

ANEXO 2G

B.35. ESTUDO DE TOXICIDADE SOBRE A REPRODUÇÃO EM DUAS GERAÇÕES

1. MÉTODO

O presente método baseia-se na publicação OECD TG 416 (2001) (normas de ensaio da OCDE).

1.1 INTRODUÇÃO

O presente método de ensaio de toxicidade sobre a reprodução em duas gerações destina-se a fornecer informação geral sobre os efeitos de uma substância de ensaio na integridade e no desempenho dos sistemas reprodutores de machos e fêmeas, incluindo a função gonadal, o ciclo do estro, o comportamento de acasalamento, a concepção, a gestação, a parturição, a lactação e o desmame, bem como sobre o crescimento e o desenvolvimento dos descendentes. O estudo pode também dar informações sobre os efeitos da substância de ensaio na morbidade e na mortalidade neonatais e fornecer dados preliminares relativos à toxicidade sobre o desenvolvimento pré-natal e pós-natal, podendo ainda servir de guia para ensaios subsequentes. Além de estudar o crescimento e o desenvolvimento da geração F1, este método de ensaio destina-se também a avaliar a integridade e o desempenho dos sistemas reprodutores dos machos e fêmeas dessa geração, bem como o crescimento e o desenvolvimento da geração F2. Caso seja necessário obter informações suplementares relativas à toxicidade sobre o desenvolvimento e às deficiências de desempenho, o presente protocolo pode ser complementado pela introdução de partes de outros estudos descritos em métodos para avaliar a toxicologia sobre o desenvolvimento e/ou a neurotoxicidade sobre o desenvolvimento, conforme o caso; em alternativa, aqueles tópicos podem ser investigados em estudos independentes, com recurso aos métodos de ensaio adequados.

1.2 PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

A substância de ensaio é administrada em doses graduais a vários grupos de machos e fêmeas. Os machos da geração P devem ser tratados durante o crescimento e durante pelo menos um ciclo espermatogénico completo (cerca de 56 dias no ratinho e 70 dias no rato), de forma a permitir a detecção de quaisquer efeitos nocivos na espermatogénese. Os efeitos sobre os espermatozoides são determinados por uma série de parâmetros (por exemplo, morfologia e mobilidade) e por exame histopatológico detalhado de preparações de tecidos. Caso tenham sido previamente realizados estudos de dose repetida de duração adequada (por exemplo, um estudo de 90 dias) que forneçam dados sobre a espermatogénese, não será necessário incluir os machos da geração P na avaliação. No entanto, recomenda-se que sejam guardadas amostras ou gravações digitais do esperma da geração P para possibilitar uma avaliação posterior. As fêmeas da geração P devem ser tratadas durante o crescimento e durante vários ciclos estrais completos, para permitir a detecção de quaisquer efeitos adversos causados pela substância de ensaio na normalidade do ciclo do estro. A substância de ensaio é administrada aos animais progenitores (P) durante o acasalamento, durante os períodos de gravidez resultantes e até ao desmame da descendência F1. Nesta altura, a substância de ensaio passa a ser administrada aos descendentes F1, que a deverão receber durante o crescimento até à idade adulta, o acasalamento e a produção da geração F2, até ao desmame da geração F2.

Todos os animais devem ser objecto de observações clínicas e exames patológicos para se detectarem sinais de toxicidade, devendo dedicar-se atenção especial aos efeitos sobre a integridade e o desempenho dos sistemas reprodutores masculino e feminino, bem como aos efeitos sobre o crescimento e o desenvolvimento da descendência.

1.3 DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.3.1 **Seleção da espécie animal**

A espécie preferida para ensaio é o rato. Caso se utilizem outras espécies, será necessário justificar o seu emprego e introduzir no método de ensaio as modificações apropriadas. Deve evitar-se a utilização de estirpes de fecundidade baixa ou em que se verifique frequentemente uma incidência elevada de deficiências de desenvolvimento. No início do estudo, a diferença de peso entre os animais deverá ser mínima, não podendo ultrapassar 20% do peso médio de cada sexo.

1.3.2 **Condições de alojamento e alimentação**

A temperatura do compartimento experimental dos animais deve ser 22°C (\pm 3°). A humidade relativa deverá ser 50-60%, embora sejam aceitáveis valores entre um mínimo de 30% e um máximo que, preferivelmente, não deverá exceder 70%, salvo durante os períodos de limpeza do compartimento. A iluminação deve ser artificial, com sequências de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. A alimentação pode basear-se em dietas de laboratório convencionais, com fornecimento ilimitado de água para beber. Quando a substância de ensaio for administrada pela alimentação, a escolha da dieta poderá ser condicionada pela necessidade de assegurar a dosagem adequada.

Os animais podem ser alojados individualmente ou em pequenos grupos do mesmo sexo. O acasalamento deve ocorrer em gaiolas adequadas para o efeito. Quando houver sinais de cópula, as fêmeas acasaladas devem ser colocadas em gaiolas individuais de parto ou de maternidade. Em alternativa, os ratos acasalados podem ser mantidos em grupos pequenos, separando-se apenas um ou dois dias antes do parto. As fêmeas grávidas próximas do termo devem dispor dos materiais de nidificação apropriados e reconhecidos.

1.3.3 **Preparação dos animais**

Devem usar-se animais jovens e saudáveis, que tenham permanecido nas condições experimentais durante pelo menos 5 dias antes do ensaio para aclimação e que não tenham sido sujeitos a experiências anteriores. Os animais de ensaio devem ser caracterizados no que respeita à espécie, estirpe, proveniência, sexo, peso e/ou idade. Devem conhecer-se as relações de parentesco directo entre os animais, de modo a evitar o acasalamento entre irmãos. Os animais devem ser distribuídos ao acaso pelos grupos de controlo e de tratamento (recomenda-se a estratificação por peso corporal). As gaiolas devem ser dispostas de forma a minimizar possíveis efeitos derivados do seu posicionamento. Cada animal deve receber um número de identificação individualizado. Estes procedimentos devem ser levados a efeito antes do início da dosagem dos animais da geração P e por ocasião do desmame dos animais da geração F1 seleccionados para acasalamento. Devem manter-se registos da ninhada de origem de todos os animais seleccionados da geração F1. Quando o ensaio envolve pesagem individual das crias ou quaisquer testes de desempenho, as crias devem ser identificadas individualmente o mais cedo possível depois do nascimento.

No início da dosagem, os animais progenitores (P) devem ter cerca de 5 a 9 semanas de idade. Os animais de todos os grupos de ensaio deverão ser, tanto quanto possível, uniformes quanto ao peso e à idade.

1.4 PROCEDIMENTO

1.4.1 Número e sexo dos animais

Cada grupo de ensaio e controlo deve comportar um número de animais suficiente para que se obtenham preferivelmente 20 ou mais fêmeas grávidas de termo ou próximas deste. Nos casos em que se utilizem substâncias que causam efeitos indesejáveis relacionados com o tratamento (por exemplo, esterilidade, toxicidade excessiva na dose mais elevada), poderá não ser possível cumprir este requisito. O objectivo é a obtenção de um número de fêmeas grávidas suficiente para garantir uma avaliação significativa do potencial da substância para afectar a fecundidade, a gravidez e o comportamento maternal, bem como o aleitamento, o crescimento e o desenvolvimento da prole F1, desde a concepção até à maturidade, e o desenvolvimento da sua descendência (F2) até ao desmame. Por esse motivo, a impossibilidade de obter o número desejado de animais prenhes (isto é, 20) não invalida necessariamente o estudo e deve ser avaliada caso a caso.

1.4.2 Preparação das doses

Recomenda-se que a substância de ensaio seja administrada oralmente (através da alimentação, na água de beber ou por gavagem), excepto nos casos em que se considere mais apropriado utilizar outra via de administração (por exemplo, aplicação cutânea ou inalação).

Se for necessário, a substância de ensaio pode ser dissolvida ou suspensa num agente de transporte apropriado. Recomenda-se que, sempre que possível, seja considerada em primeiro lugar a utilização de uma solução/suspensão aquosa; caso tal não seja viável, pode considerar-se o uso de uma solução/emulsão em óleo (por exemplo, óleo de milho); em última instância, poderá eventualmente recorrer-se ao uso de soluções noutros agentes de transporte. Devem conhecer-se as características tóxicas dos agentes de transporte que não sejam a água. Deve determinar-se a estabilidade da substância de ensaio no agente de transporte.

1.4.3 Dosagem

Devem utilizar-se pelo menos três níveis de dose e um controlo simultâneo. A escolha do nível de dose máximo deve ter como objectivo produzir um efeito tóxico, mas não a morte ou sofrimento forte, salvo se existirem limitações impostas pela natureza físico-química ou pelas propriedades biológicas da substância de ensaio. Normalmente, consideram-se aceitáveis estudos com mortalidade inesperada, desde que a taxa de mortalidade dos animais progenitores (P) seja inferior a cerca de 10%. Deve seleccionar-se uma sequência descendente de níveis de dose que permita detectar qualquer efeito relacionado com a dosagem e determinar o nível sem efeitos adversos observáveis (NSEAO). Em muitos casos, a melhor forma de estabelecer estas sequências consiste no espaçamento das doses em série geométrica, usando factores de dois ou de quatro. A adição de um quarto grupo de ensaio é muitas vezes preferível ao uso de intervalos muito grandes entre as dosagens (ou seja, com um factor superior a 10). Quando a substância de ensaio é administrada na alimentação, o espaçamento entre as doses não deve ser superior a um factor de 3. A escolha dos níveis de dose deverá considerar todos os dados de toxicidade existentes, em especial os resultados de estudos de dose repetida, devendo ainda levar em conta quaisquer informações relativas ao metabolismo e à cinética da substância de ensaio ou de substâncias relacionadas. Estas informações poderão também ser usadas para demonstrar a adequação do regime de dosagem.

O grupo de controlo deve ser um grupo não sujeito a tratamento ou, se for usado um agente de transporte para administrar a substância de ensaio, um grupo de controlo do agente de transporte. Os animais do grupo de controlo devem ser tratados da mesma maneira que os animais dos grupos de ensaio, com excepção do tratamento com a substância de ensaio. Se for usado um agente de transporte, o grupo de controlo deverá receber o volume máximo de agente de transporte utilizado no ensaio. Se a substância de ensaio for administrada na alimentação e causar uma diminuição da ingestão de alimentos e da sua assimilação, poderá ser necessário utilizar um grupo de controlo negativo (submetido ao mesmo regime alimentar reduzido); em alternativa, poderão usar-se os dados de estudos controlados destinados a avaliar os efeitos da diminuição do consumo de alimento nos parâmetros reprodutores.

Deverão ser tomadas em consideração as seguintes características do agente de transporte e outros aditivos: efeitos na absorção, distribuição, metabolismo ou retenção da substância de ensaio; efeitos nas propriedades químicas da substância de ensaio susceptíveis de alterar as suas características tóxicas; e efeitos no consumo de alimentos, na ingestão de água ou no estado nutricional dos animais.

1.4.4 **Ensaio-limite**

Se um estudo com um nível de dose oral de pelo menos 1000 mg/kg de peso corporal/dia (ou uma percentagem equivalente nos alimentos ou na água de beber, caso se recorra a um destes tipos de administração), realizado de acordo com os procedimentos descritos neste estudo, não provocar efeitos tóxicos observáveis nos animais progenitores nem na sua prole e se, para além disso, os dados existentes sobre compostos estrutural e/ou metabolicamente relacionados com a substância de ensaio não sugerirem a possível ocorrência de toxicidade, poderá considerar-se desnecessário realizar um ensaio completo com vários níveis de dose. O ensaio-limite é sempre válido, excepto nos casos em que se preveja exposição humana e em que seja necessário testar um nível de dose oral mais elevado. Quando se usam outras formas de administração, como inalação ou aplicação cutânea, as propriedades físico-químicas da substância de ensaio (por exemplo, a solubilidade) são muitas vezes indicativas e limitantes do nível máximo de exposição praticável.

1.4.5 **Administração das doses**

Os animais devem ser tratados com a substância de ensaio durante os sete dias da semana. A forma de administração preferida é a via oral (alimentação, água de beber ou gavagem). Se for usada outra via de administração, deverão ser indicadas as razões subjacentes à sua escolha; neste caso, poderá ser necessário introduzir modificações apropriadas no método de ensaio. Deve utilizar-se o mesmo método de administração em todos os animais durante o período experimental apropriado. A administração por gavagem deve ser feita com uma sonda gástrica. O volume de líquido administrado numa toma não deve exceder 1 ml/100 g de peso corporal (o volume máximo para óleo de milho é de 0,4 ml/100 g de peso corporal); exceptuam-se as soluções aquosas, que podem ser administradas na proporção de 2 ml/100 g de peso corporal. Deve minimizar-se a variabilidade do volume de ensaio efectuando ajustes nas concentrações, de forma a assegurar a constância do volume em todos os níveis de dose; exceptuam-se os casos em que se utilizam substâncias irritantes ou corrosivas, que normalmente exercem efeitos exacerbados quando aplicadas em concentrações mais elevadas. Normalmente, nos estudos com administração por gavagem, as crias amamentadas só recebem a substância de ensaio de forma indirecta, através do leite; a dosagem directa inicia-se apenas na altura do desmame. Nos estudos em que a substância de ensaio é administrada na alimentação ou na água de beber, as crias podem receber uma quantidade adicional da substância de ensaio quando, na última semana do período de lactação, começam a comer por si próprias.

É importante assegurar que as quantidades de substância de ensaio administradas através da alimentação ou da água de beber não interferem nas exigências normais de nutrição ou de consumo de água. Quando a substância de ensaio for incorporada na alimentação, pode utilizar-se uma concentração alimentar constante (ppm) ou, alternativamente, um nível de dose constante em relação ao peso corporal dos animais; deve especificar-se o método escolhido para o ensaio. No caso de uma substância administrada por gavagem, a dose deve ser administrada todos os dias à mesma hora, devendo ser ajustada pelo menos uma vez por semana a fim de se manter uma dose constante em relação ao peso corporal do animal; estes ajustes deverão ser feitos tendo em conta os dados relativos à distribuição placentária.

1.4.6 **Plano da experiência**

A substância de ensaio começa a ser administrada diariamente aos machos e fêmeas progenitores (P) ao atingirem entre 5 e 9 semanas de idade. A dosagem diária dos machos e fêmeas F1 deve começar na altura do desmame; importa ter presente que, quando a substância de ensaio é administrada através da alimentação ou na água de beber, pode ocorrer exposição directa das crias da geração F1 à substância de ensaio durante o período de lactação. O tratamento de ambos os sexos das gerações P e F1 deve decorrer durante pelo menos 10 semanas antes do acasalamento, prosseguindo nas duas semanas do período de acasalamento. Os machos devem ser sacrificados e examinados quando deixam de ser necessários para avaliação de efeitos sobre o aparelho reprodutor. A dosagem das fêmeas progenitoras (P) deve continuar durante a gravidez, prolongando-se até ao desmame da prole F1. O esquema de administração poderá ser modificado com base em informações relativas à substância de ensaio, incluindo dados sobre toxicidade, indução de metabolismo ou bioacumulação. Normalmente, a dose a administrar a cada animal é calculada com base na determinação mais recente do seu peso corporal. No entanto, o ajuste das doses durante o último terço da gravidez deve ser feito com precaução. O tratamento dos machos e fêmeas P e F1 deve continuar até ao momento do sacrifício. Todos os machos e fêmeas adultos P e F1 devem ser sacrificados quando deixarem de ser necessários para avaliação de efeitos sobre a reprodução. Os animais da descendência F1 não seleccionados para acasalamento e todos os descendentes F2 deverão ser sacrificados após o desmame.

1.4.7 **Processo de acasalamento**

1.4.7.1 *Acasalamento dos progenitores (P)*

Para o acasalamento, cada fêmea deve ser colocada juntamente com um único macho pertencente ao mesmo nível de dosagem (acasalamento 1:1) até que ocorra cópula ou tenham decorrido duas semanas. As fêmeas devem ser examinadas diariamente para verificar a presença de esperma ou um rolhão vaginal. Considera-se o dia 0 de gravidez aquele em que se observa um rolhão vaginal e/ou esperma. Quando a tentativa de acasalamento for mal sucedida, poderá tentar-se um novo acasalamento das fêmeas com machos do mesmo grupo comprovadamente aptos a procriar. Os pares acasalados devem ser identificados nos dados do ensaio de forma inequívoca. Deve evitar-se o acasalamento entre irmãos.

1.4.7.2 *Acasalamento de F1*

Para o acasalamento da descendência F1 e produção da geração F2, devem seleccionar-se pelo menos um macho e uma fêmea de cada ninhada, em altura de desmame, para acasalamento com outras crias pertencentes ao mesmo nível de dose mas provenientes de ninhadas diferentes. A selecção das crias de cada ninhada deve ser feita de forma aleatória, desde que não se verifiquem diferenças significativas no peso corporal ou na aparência dos animais. Caso se observem essas diferenças, devem seleccionar-se os animais mais representativos de cada ninhada. Embora a forma mais correcta de selecção seja aquela que se baseia no peso corporal, em determinadas circunstâncias poderá ser mais conveniente recorrer à aparência. A descendência F1 só deve acasalar depois de ter atingido a maturidade sexual completa.

Os casais sem descendência devem ser avaliados para determinar as causas da aparente esterilidade. Esta avaliação pode envolver novas tentativas de acasalamento com outros machos ou fêmeas comprovadamente aptos a procriar, o exame microscópico dos órgãos reprodutores e a observação dos ciclos do estro ou da espermatogénese.

1.4.7.3 *Segundo acasalamento*

Em determinadas circunstâncias, tais como situações em que se verifiquem alterações na dimensão da ninhada relacionadas com o tratamento ou em que se observe um efeito ambíguo no primeiro acasalamento, recomenda-se que os adultos P ou F1 acasalem de novo para produzir uma segunda ninhada. O segundo acasalamento de fêmeas ou machos que não tenham produzido ninhadas deverá ser feito com reprodutores comprovados do sexo oposto. Se numa das gerações for estritamente necessário produzir uma segunda ninhada, os animais devem acasalar novamente cerca de uma semana depois do desmame da última ninhada.

1.4.7.4 *Dimensão das ninhadas*

Os animais devem poder parir normalmente e criar os seus descendentes até ao desmame. A uniformização do tamanho das ninhadas é opcional; caso seja feita, deve descrever-se pormenorizadamente o método usado.

1.5 OBSERVAÇÕES

1.5.1 **Observações clínicas**

Deve efectuar-se diariamente uma observação clínica geral; nos casos em que a dose é administrada por gavagem, a escolha do momento da observação deve tomar em consideração o período de efeitos máximos previsto que se verifica após a administração da dose. Devem registar-se quaisquer modificações de comportamento, sinais de parto difícil ou prolongado e todos os sinais de toxicidade. Deverá efectuar-se uma inspecção adicional mais pormenorizada de cada animal pelo menos uma vez por semana, que por conveniência poderá coincidir com o momento da pesagem. Para além disso, cada animal deve ser observado duas vezes por dia (ou uma vez por dia durante o fim-de-semana, quando for conveniente) para avaliar morbidade e mortalidade.

1.5.2 **Peso corporal e consumo de alimento/água dos animais progenitores**

Os animais progenitores (P e F1) devem ser pesados no primeiro dia de tratamento e, em seguida, pelo menos uma vez por semana. O peso das fêmeas progenitoras (P e F1) deve ser determinado, no mínimo, nos dias 0, 7, 14 e 20 ou 21 da gestação, durante a lactação (nos dias coincidentes com a pesagem das crias) e no dia do sacrifício. Estas observações devem ser registadas individualmente para cada animal adulto. Durante os períodos de pré-acasalamento e gestação, o consumo de alimento deve ser medido pelo menos semanalmente. Se a substância de ensaio for administrada na água, o consumo de água deve ser determinado pelo menos uma vez por semana.

1.5.3 **Ciclo do estro**

A duração e a normalidade do ciclo do estro nas fêmeas P e F1 são avaliadas por observação de esfregaços vaginais obtidos antes do acasalamento, durante o acasalamento (opcional) e até existirem evidências de cópula. A remoção de células vaginais/cervicais deve ser feita cuidadosamente, de modo a evitar o distúrbio da mucosa e a subsequente indução de uma gravidez fictícia (1).

1.5.4 Parâmetros dos espermatozóides

No momento do sacrifício, deverá registar-se o peso dos testículos e do epidídimo de todos os machos P e F1 após o sacrifício. Deve reservar-se um exemplar de cada tipo de órgão para exame histopatológico (ver secções 1.5.7 e 1.5.8.1). Para a contagem de espermátídios e de espermatozóides das reservas do conduto epididimário resistentes a homogeneização, deverão usar-se, respectivamente, os testículos e os epidídimos de subgrupos de pelo menos 10 machos de cada grupo P e F1. Deve colher-se o esperma do conduto epididimário ou do canal deferente dos animais desses subgrupos para avaliar a mobilidade e a morfologia dos espermatozóides. Se forem detectados efeitos relacionados com o tratamento ou se estudos anteriores indicarem possíveis efeitos na espermatogénese, deverão analisar-se os espermatozóides de todos os machos de cada grupo de dose; caso contrário, a contagem pode restringir-se aos machos P e F1 dos grupos de controlo e de dose máxima.

Deve proceder-se à contagem do número total de espermátídios testiculares e de espermatozóides do conduto epididimário resistentes a homogeneização (2)(3). O número de espermatozóides das reservas do conduto pode ser determinado considerando o volume e a concentração de esperma na suspensão usada para a análise qualitativa e efectuando a contagem de espermatozóides após maceração e/ou homogeneização do restante tecido do conduto. As contagens devem ser feitas nos subgrupos de machos seleccionados de todos os grupos de dosagem e ser levadas a efeito imediatamente após o sacrifício dos animais, excepto se forem feitas gravações de vídeo ou digitais ou se os animais forem congelados para análise posterior. Nestes casos, podem analisar-se primeiro os grupos de controlo e de dose máxima; se não se observarem efeitos relacionados com o tratamento (por exemplo, efeitos na contagem, mobilidade ou morfologia dos espermatozóides), não será necessário avaliar os restantes grupos de dose; caso contrário, deverão analisar-se também os grupos de dosagem inferior.

A mobilidade dos espermatozóides do epidídimo (ou do canal deferente) deve ser analisada ou gravada em vídeo imediatamente após o sacrifício. O esperma deve ser retirado o mais rapidamente possível, enquanto os danos são mínimos; seguidamente, deve ser diluído para uma análise de mobilidade usando métodos aprovados (4). A determinação da percentagem de espermatozóides progressivamente móveis poderá ser tanto subjectiva como objectiva. Quando se realiza uma análise de mobilidade assistida por computador (5)(6)(7)(8)(9)(10), a determinação da mobilidade progressiva baseia-se em valores críticos definidos pelo utilizador em relação à velocidade média e à rectitude da trajectória, ou índice linear. Se existirem gravações em vídeo de amostras (11) ou outras imagens obtidas durante a necropsia, pode efectuar-se posteriormente a análise dos machos P e F1 dos grupos de controlo e de dose máxima. Se não se observarem efeitos relacionados com o tratamento, será desnecessário avaliar os restantes grupos de dose; caso contrário, deverão analisar-se também os grupos de dosagem inferior. Caso não existam imagens de vídeo ou digitais, todas as amostras de todos os grupos de tratamento devem ser analisadas no momento da necropsia.

Deve efectuar-se a análise morfológica de uma amostra de espermatozóides epididimários (ou do canal deferente). Depois de fixados, os espermatozóides (pelo menos 200 por amostra) são examinados em preparações húmidas (12) e classificados como normais ou anormais. As anomalias morfológicas em espermatozóides incluem fusão, cabeças isoladas e ausência de cabeças e/ou de caudas. A avaliação deve ser feita nos subgrupos de machos seleccionados de todos os grupos de dose, quer imediatamente após o sacrifício dos animais, quer posteriormente, usando gravações de vídeo ou digitais. Depois de fixados, os esfregaços podem também ser guardados para análise posterior. Nestas situações, podem analisar-se primeiro os grupos de controlo e de dose máxima. Se não se observarem efeitos relacionados com o tratamento (por exemplo, efeitos na morfologia dos espermatozóides), não será necessário analisar os restantes grupos de dose; caso contrário, deverão analisar-se também os grupos de dosagem inferior.

Caso um dos parâmetros de avaliação de espermatozóides acima mencionados tenha sido examinado anteriormente num estudo sistémico de toxicidade de pelo menos 90 dias, poderá considerar-se desnecessário repetir a sua avaliação no estudo em duas gerações. Recomenda-se, no entanto, que se guardem amostras ou gravações digitais de espermatozóides da geração P para possibilitar uma avaliação posterior, caso esta venha a ser necessária.

1.5.5 **Descendência**

Cada ninhada deve ser examinada o mais cedo possível após o parto (dia 0 de lactação) para se determinar o número e o sexo das crias, os nados-mortos, os nados-vivos e a presença de anomalias macroscópicas. Caso não se encontrem maceradas, as crias encontradas mortas no dia 0 devem ser examinadas para determinar eventuais malformações e a causa da morte; estes animais devem manter-se conservados. As crias vivas devem ser contadas e pesadas individualmente no momento do nascimento (dia 0 de lactação) ou no dia 1; a partir daí, os pesos devem ser avaliados em dias regulares de pesagem, por exemplo, nos dias 4, 7, 14 e 21 de lactação. Devem registar-se as alterações físicas ou de comportamento observadas nas mães ou nos descendentes.

A avaliação do desenvolvimento físico da descendência deve basear-se principalmente no aumento do peso corporal. Outros parâmetros físicos (por exemplo, abertura dos olhos e ouvidos, erupção dos dentes, crescimento de pêlo) poderão dar informações suplementares. No entanto, estes dados deverão ser considerados preferencialmente no contexto da maturação sexual (por exemplo, idade e peso corporal no momento da abertura vaginal ou da separação bálabano-prepucial) (13). Devem efectuar-se avaliações de desempenho (por exemplo, actividade motora, função sensorial e ontogenia dos reflexos) da descendência F1 antes e/ou depois do desmame, dedicando especial atenção aos aspectos relacionados com a maturação sexual, caso não tenham sido incluídas em estudos independentes. Deve determinar-se a idade da abertura vaginal e da separação do prepúcio nos animais recém-desmamados seleccionados para acasalamento. Se forem detectadas alterações na proporção entre os sexos ou no tempo de maturação sexual dos animais F1, deverá medir-se a distância anogenital das crias F2 no dia 0 pós-natal.

As observações de desempenho poderão ser omitidas em grupos que revelem claramente outros sinais de efeitos adversos (por exemplo, um decréscimo significativo na progressão do peso, etc.). Caso se realizem, as avaliações de desempenho não devem ser efectuadas em crias seleccionadas para acasalamento.

1.5.6 **Necropsia macroscópica**

Todos os animais progenitores (P e F1), bem como todas as crias apresentando anomalias externas ou sinais clínicos e uma cria seleccionada aleatoriamente das gerações F1 e F2, escolhida ao acaso quanto ao sexo e à ninhada de origem, devem ser analisados macroscopicamente no momento do sacrifício ou da morte no decurso do estudo para se detectar qualquer anomalia estrutural ou alteração patológica; deverá dedicar-se uma atenção especial aos órgãos do aparelho reprodutor. Caso não se encontrem maceradas, as crias sacrificadas, em estado moribundo ou encontradas mortas devem ser examinadas para se determinarem eventuais malformações e/ou a causa da morte; estes animais devem manter-se conservados.

Devem examinar-se os úteros de todas as fêmeas primíparas a fim de se detectarem a presença e o número de locais de implantação; este exame deverá ser feito de forma a não comprometer a avaliação histopatológica.

1.5.7 **Pesagem dos órgãos**

No momento do sacrifício, deverá determinar-se o peso do corpo e dos seguintes órgãos de todos os animais progenitores P e F1 (os órgãos pares devem ser pesados individualmente):

- Útero, ovários;
- Testículos, epidídimo (total e conduto);
- Próstata;
- Vesículas seminais, glândulas coagulantes e respectivos fluidos e próstata (como uma unidade);
- Cérebro, fígado, rins, baço, glândula pituitária, tiróide, glândulas supra-renais e órgãos-alvo conhecidos.

Devem determinar-se os pesos corporais terminais das crias F1 e F2 seleccionadas para necropsia, devendo ainda pesar-se o cérebro, o baço e o timo de uma cria seleccionada aleatoriamente quanto ao sexo e à ninhada de origem (ver secção 1.5.6).

Sempre que possível, a avaliação dos resultados da necropsia macroscópica e da pesagem de órgãos deverá ser efectuada tendo em conta os dados de outros estudos de dose repetida.

1.5.8 **Histopatologia**

1.5.8.1 *Animais progenitores*

Devem ser fixados e conservados em meio adequado para exame histopatológico os seguintes órgãos e tecidos de animais progenitores (P e F1) (ou amostras representativas):

- Vagina, útero com colo e ovários (preservados em fixador adequado);
- Um testículo (preservado em fixador de Bouin ou equivalente), um epidídimo, vesículas seminais, próstata e glândula coagulante;
- Órgão(s) alvo previamente identificado(s) de todos os animais P e F1 seleccionados para acasalamento.

Serão objecto de um exame histopatológico completo os órgãos e tecidos conservados acima mencionados de todos os animais P e F1 dos grupos de controlo e de dose máxima seleccionados para acasalamento. A inspecção dos ovários dos animais P é opcional. Serão examinados os órgãos que apresentem alterações relacionadas com o tratamento dos animais dos grupos de doses média e baixa, a fim de auxiliar a determinação do NSEAO. Adicionalmente, deverá efectuar-se a avaliação histopatológica dos órgãos reprodutores de animais dos grupos de dose média e baixa suspeitos de fertilidade reduzida (por exemplo, animais com insucesso no acasalamento, concepção, geração ou parto de uma descendência saudável, ou animais com alterações nos ciclos do estro ou no número, mobilidade ou morfologia dos espermatozóides). Deverão examinar-se todas as lesões macroscópicas, tais como atrofias ou tumores.

Os testículos devem ser objecto de um exame histopatológico pormenorizado (por exemplo, usando fixador de Bouin, inclusão em parafina e secções transversais com 4-5µm de espessura) a fim de se detectarem efeitos relacionados com o tratamento, tais como retenção de espermatídios, ausência de camadas ou tipos de células germinais, células gigantes multinucleadas ou perda de células espermatogénicas para o lúmen (14). O exame do epidídimo intacto deve abranger a cabeça, o corpo e o conduto e pode efectuar-se por observação de uma secção longitudinal. A análise do epidídimo destina-se a detectar infiltração de leucócitos, alteração na prevalência de tipos de células, tipos de células aberrantes e fagocitose de espermatozóides. Os órgãos reprodutores masculinos podem ser examinados recorrendo ao uso de PAS (ácido p-aminossalicílico) e coloração com hematoxilina.

Os ovários no período pós-lactação devem conter folículos primordiais e folículos em crescimento, bem como os grandes corpos amarelos da lactação. O exame histopatológico deverá detectar uma diminuição qualitativa da população de folículos primordiais. As fêmeas F1 devem ser submetidas a uma avaliação quantitativa dos folículos primordiais; o número de animais, a selecção da secção do ovário e o tamanho da amostra seccionada devem ser adequados, do ponto de vista estatístico, para o procedimento de avaliação usado. O exame deve incluir a contagem do número de folículos primordiais (que poderão estar combinados com pequenos folículos em crescimento) em ovários de tratamento e em ovários de controlo, para posterior comparação de resultados (15)(16)(17)(18)(19).

1.5.8.2 *Animais recém-desmamados*

Devem ser fixados e conservados em meio apropriado para exame histopatológico os tecidos e órgãos alvo com anomalias macroscópicas de todas as crias que apresentem anomalias externas ou sinais clínicos, bem como de uma cria seleccionada aleatoriamente das gerações F1 e F2, escolhida ao acaso quanto ao sexo e à ninhada de origem e que não tenha sido seleccionada para acasalamento. Deve efectuar-se a caracterização histopatológica completa do tecido conservado, dando especial atenção aos órgãos do aparelho reprodutor.

2 **DADOS**

2.1 **TRATAMENTO DOS RESULTADOS**

Os dados devem ser registados individualmente e resumidos na forma de quadros, indicando, em relação a cada grupo de ensaio e cada geração, o número de animais no início do ensaio, o número de animais encontrados mortos durante o ensaio ou sacrificados, o momento de todas as mortes ou sacrifícios, o número de animais férteis, o número de fêmeas grávidas, o número de animais com manifestações de toxicidade, uma descrição dos sinais de toxicidade observados (incluindo o momento do aparecimento, a duração e a intensidade), os tipos de observações feitas nos progenitores e nos descendentes, os tipos de alterações histopatológicas e todos os dados relevantes relativos às ninhadas.

Os resultados numéricos devem ser avaliados com um método estatístico adequado e geralmente aceite; a escolha do método estatístico deve constar do planeamento do estudo e ser devidamente justificada. Os modelos estatísticos dose-resposta podem ser úteis para a análise dos dados. O relatório deve incluir informação suficiente sobre o método de análise e o programa informático usados para que um examinador/estatístico independente possa reavaliar e reconstituir a análise.

2.2 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os dados recolhidos no estudo de toxicidade sobre a reprodução em duas gerações, incluindo os relativos aos exames microscópicos e necropsias, deverão ser analisados em termos dos efeitos observados. A análise deverá considerar a relação (ou a ausência de relação) entre a dose da substância de ensaio e a presença ou ausência, incidência e gravidade de anomalias, incluindo lesões macroscópicas, órgãos identificados como alvos, alterações da fertilidade, anomalias clínicas, alterações da reprodução e procriação, alterações do peso corporal, efeitos na mortalidade e quaisquer outros efeitos tóxicos. A análise dos resultados do ensaio deve ainda ter em conta as propriedades físico-químicas da substância de ensaio, assim como informação toxicocinética, se disponível.

Um ensaio de toxicidade sobre a reprodução bem elaborado deverá fornecer uma estimativa satisfatória do nível sem efeito e dar conhecimento dos efeitos adversos na reprodução, parturição, lactação e desenvolvimento pós-natal, incluindo o crescimento e o desenvolvimento sexual.

2.3 INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

A finalidade de um estudo de toxicidade sobre a reprodução em duas gerações consiste na obtenção de informações relativas aos efeitos de exposição repetida a uma substância durante todas as fases do ciclo reprodutor. Mais especificamente, o estudo fornece informações sobre os parâmetros reprodutores, bem como sobre o desenvolvimento, o crescimento, a maturação e a sobrevivência da descendência. A interpretação dos resultados deve tomar em consideração dados de estudos subcrónicos, de desenvolvimento pré-natal e toxicocinéticos, entre outros eventualmente disponíveis. Os resultados deste estudo podem ser usados para avaliar a necessidade de realizar ensaios suplementares sobre uma substância química. A extrapolação dos resultados para a espécie humana tem uma validade limitada; mais adequado será usar os dados do ensaio para obter informação sobre níveis sem efeito e níveis toleráveis de exposição humana (20)(21)(22)(23).

3

RELATÓRIO**RELATÓRIO DO ENSAIO**

O relatório do ensaio deverá incluir as seguintes informações:

Substância de ensaio:

- natureza física e, se relevante, propriedades físico-químicas;
- dados de identificação;
- pureza.

Agente de transporte (se apropriado):

- caso o agente de transporte não seja água, uma justificação para a sua escolha.

Animais de ensaio:

- espécie/estirpe usada;
- número, idade e sexo dos animais;
- proveniência, condições de alojamento, dieta, materiais de nidificação, etc;
- pesos individuais dos animais no início do ensaio.

Condições de ensaio:

- razões que presidiram à escolha dos diferentes níveis de doses;
- informação pormenorizada sobre a formulação da substância de ensaio/preparação da dieta, concentrações atingidas;
- estabilidade e homogeneidade da preparação;
- informação pormenorizada sobre a administração da substância de ensaio;
- conversão da concentração da substância de ensaio na dieta/água de beber (ppm) para a dose real (mg/kg de peso corporal/dia), se aplicável;
- informação pormenorizada sobre a qualidade dos alimentos e da água.

Resultados:

- consumo de alimentos, consumo de água (se disponível), eficiência do regime alimentar (aumento do peso corporal por grama de alimento consumido) e consumo da substância de ensaio pelos animais P e F1, excepto durante o período de coabitação e durante pelo menos o último terço do período de lactação;
- dados de absorção (se disponíveis);
- dados dos pesos corporais dos animais P e F1 seleccionados para acasalamento;
- pesos das ninhadas e das crias;
- peso corporal no momento do sacrifício e pesos absolutos e relativos dos órgãos dos animais progenitores;
- natureza, gravidade e duração de efeitos detectados em observações clínicas (reversíveis ou não);
- momento da morte no decurso do estudo ou indicação dos animais sobreviventes no termo da experiência;
- dados de resposta tóxica por sexo e por dose, incluindo índices de acasalamento, fertilidade, gestação, nascimento, viabilidade e lactação; os números usados para calcular estes índices devem constar do relatório;
- efeitos tóxicos (ou outros) na reprodução, descendência, crescimento pós-natal, etc.;
- resultados da necropsia;
- descrição pormenorizada de todas as observações histopatológicas;
- número de fêmeas P e F1 com ciclos normais e duração dos ciclos;
- número total de espermatozóides no conduto epididimário; percentagem de espermatozóides progressivamente móveis; percentagem de espermatozóides morfológicamente normais e percentagem de espermatozóides que apresentam cada uma das anomalias identificadas;
- duração do acasalamento, incluindo o número de dias até à sua concretização;
- duração do período de gestação;
- número de implantações, corpos amarelos, dimensão da ninhada;
- número de nados-vivos e de perdas pós-implantação;
- número de crias com anomalias macroscópicas visíveis; deve indicar-se o número de animais de tamanho inferior ao normal, caso tenha sido determinado;
- dados sobre aspectos físicos característicos das crias e outros dados de desenvolvimento pós-natal; deve ser dada uma justificação relativamente à escolha dos aspectos físicos analisados;
- dados sobre observações de desempenho nas crias e adultos, se aplicável;
- tratamento estatístico dos resultados, se apropriado.

Análise dos resultados.

Conclusões, incluindo os valores dos NSEAO para efeitos sobre as mães e os descendentes.

REFERÊNCIAS

- (1) Sadleir, R.M.F.S. (1979), Cycles and Seasons, Em: *Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization*, C.R. Auston e R.V. Short (orgs.), Cambridge, Nova Iorque.
- (2) Gray, L.E. *et al.* (1989), A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat. *Fundamental and Applied Toxicology* 12:92-108.
- (3) Robb, G.W. *et al.* (1978), Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats. *Journal of Reproduction and Fertility* 54:103-107.
- (4) Klinefelter, G.R. *et al.* (1991), The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat. *Reproductive Toxicology* 5:39-44.
- (5) Seed, J. *et al.* (1996), Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report. *Reproductive Toxicology* 10(3):237-244.
- (6) Chapin, R.E. *et al.* (1992), Methods for Assessing Rat Sperm Motility. *Reproductive Toxicology* 6:267-273.
- (7) Klinefelter, G.R. *et al.* (1992), Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration. *Journal of Andrology* 13:409-421.
- (8) Slott, V.L. *et al.* (1991), Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations. *Reproductive Toxicology* 5:449-458.
- (9) Slott, V.L. e Perreault S.D. (1993), Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer. Em: *Methods in Toxicology*, Part A., Academic, Orlando, Florida. pp. 319-333.
- (10) Toth, G.P. *et al.* (1989), The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations. *Journal of Andrology* 10: 401-415.
- (11) Working, P.K. e M. Hurtt (1987), Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility. *Journal of Andrology* 8:330-337.
- (12) Linder, R.E. *et al.* (1992), Endpoints of Spermatotoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants. *Reproductive Toxicology* 6:491-505.

- (13) Korenbrot, C.C. *et al.* (1977), Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat. *Biological Reproduction* 17:298303.
- (14) Russell, L.D. *et al.* (1990), Histological and Histopathological Evaluation of the Testis, Cache River Press, Clearwater, Florida.
- (15) Heindel, J.J. e R.E. Chapin (orgs.) (1993), Part B. Female Reproductive Systems, *Methods in Toxicology*, Academic, Orlando, Florida.
- (16) Heindel, J.J. *et al.* (1989), Histological Assessment of Ovarian Follicle Number in Mice As a Screen of Ovarian Toxicity. Em: Growth Factors and the Ovary, A.N. Hirshfield (org.), Plenum, Nova Iorque, pp. 421-426.
- (17) Manson, J.M. e Y.J. Kang (1989), Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology. Em: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (org.), Raven, Nova Iorque.
- (18) Smith, B.J. *et al.* (1991), Comparison of Random and Serial Sections in Assessment of Ovarian Toxicity. *Reproductive Toxicology* 5:379-383.
- (19) Heindel, J.J. (1999), Oocyte Quantitation and Ovarian Histology. Em: An Evaluation and Interpretation of Reproductive Endpoints for Human Health Risk Assessment, G. Daston e C.A. Kimmel (orgs.), ILSI Press, Washington, DC.
- (20) Thomas, J. A. (1991), Toxic Responses of the Reproductive System. Em: Casarett and Doull's Toxicology, M.O. Amdur, J. Doull e C.D. Klaassen (orgs.), Pergamon, Nova Iorque.
- (21) Zenick, H. e E.D. Clegg (1989), Assessment of Male Reproductive Toxicity: A Risk Assessment Approach. Em: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (org.), Raven Press, Nova Iorque.
- (22) Palmer, A.K. (1981), Em: Developmental Toxicology, Kimmel, C.A. e J. Buelke-Sam (orgs.), Raven Press, Nova Iorque.
- (23) Palmer, A.K. (1978), Em: Handbook of Teratology, Vol. 4, J.G. Wilson e F.C. Fraser (orgs.), Plenum Press, Nova Iorque.

ANEXO 2H

B.42. SENSIBILIZAÇÃO DA PELE: ENSAIO DE GÂNGLIO LINFÁTICO LOCAL

1. MÉTODO

O presente método baseia-se na publicação OECD TG 429 (2002) (normas de ensaio da OCDE).

1.1 INTRODUÇÃO

O Ensaio de Gânglio Linfático Local (LLNA) tem sido suficientemente validado e aceite de modo a justificar a sua adopção como um novo Método (1)(2)(3). Este ensaio é o segundo método para avaliar o potencial de sensibilização da pele de animais por produtos químicos. O outro método (B.6) utiliza ensaios com cobaias, nomeadamente o ensaio de maximização da cobaia e o ensaio de Buehler (4).

O LLNA constitui um método alternativo a utilizar na identificação de produtos químicos sensibilizantes da pele e na confirmação da ausência de um potencial significativo causador de sensibilização da pele por parte de certos produtos químicos. Tal facto não implica necessariamente que o LLNA seja sempre utilizado em substituição do ensaio com cobaia, mas apenas que o primeiro apresenta qualidades equivalentes ao segundo e pode ser utilizado como uma alternativa em situações nas quais não seja necessária confirmação posterior dos resultados, quer estes sejam positivos ou negativos.

O LLNA apresenta determinadas vantagens no que diz respeito tanto ao progresso científico como à protecção dos animais. O Método estuda a fase de indução da sensibilização da pele e proporciona dados quantitativos adequados para a avaliação da resposta à dosagem. Foram publicados dados detalhados sobre a validação do LLNA e uma revisão do trabalho associado (5)(6)(7)(8). Além disso, deve referir-se que os sensibilizadores intermédios/moderados, que se recomendam como substâncias adequadas para controlo positivo dos métodos de cobaia, são igualmente apropriados para utilizar com o LLNA (6)(8)(9).

O LLNA é um método *in vivo* e, conseqüentemente, não eliminará a utilização de animais na avaliação da actividade sensibilizante por contacto. Tem, no entanto, a vantagem de reduzir o número de animais requeridos para esta avaliação. Além disso, o LLNA apresenta uma melhoria substancial no modo como os animais são utilizados nos ensaios de sensibilização por contacto. O LLNA baseia-se na observação de acontecimentos imunológicos estimulados por produtos químicos durante a fase de indução da sensibilização. Ao contrário dos ensaios com cobaias, o LLNA não requer a ocorrência de reacções de hipersensibilidade dérmica provocadas por um agente externo. Além disso, o LLNA não implica que seja utilizado qualquer adjuvante, como acontece no ensaio de maximização da cobaia, reduzindo as perturbações causadas ao animal. Apesar das vantagens do LLNA em relação aos ensaios tradicionais com cobaias, importa reconhecer que existem certas limitações neste método que podem exigir a utilização de ensaios tradicionais com cobaias (por exemplo, falsos negativos no LLNA para certos metais, falsos positivos para certos irritantes da pele)(10).

Ver igualmente a Introdução, parte B.

1.2 PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

O princípio básico subjacente ao LLNA é o de que os sensibilizadores induzem uma proliferação primária de linfócitos no gânglio linfático que leva à secagem do local de aplicação do produto químico. Esta proliferação é proporcional à dose aplicada (e à potência do alérgeno) e constitui um modo simples de obter uma medida quantitativa objectiva da sensibilização. O LLNA avalia esta proliferação numa relação de dose/resposta na qual a proliferação em grupos de ensaio é comparada com a obtida em controlos tratados com o excipiente. É determinada a razão entre a proliferação nos grupos ensaiados e a observada em controlos tratados com o excipiente. Esta razão denomina-se Índice de Estimulação e deve apresentar o valor de, pelo menos, três para que uma substância de ensaio possa ser posteriormente avaliada como potencial sensibilizadora da pele. Os métodos descritos no presente documento baseiam-se na utilização de marcação radioactiva para medir a proliferação celular. Podem, no entanto, ser utilizados outros conceitos para a avaliação da proliferação desde que existam justificação e apoio científico adequado, incluindo citações integrais e uma descrição da metodologia.

1.3 DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.3.1 Preparativos

1.3.1.1 *Condições de alojamento e alimentação*

Os animais devem ser alojados individualmente. A temperatura do biotério deve ser de 22°C (\pm 3°C). Embora a humidade relativa deva ser de, pelo menos, 30% e, de preferência, não exceder os 70% excepto durante o período de limpezas, o valor pretendido deve ser de 50-60%. A iluminação deve ser artificial, com uma sequência de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de escuridão. Na alimentação podem ser utilizadas dietas convencionais de laboratório e deve ser fornecida água de beber sem restrições.

1.3.1.2 *Preparação dos animais*

Os animais são seleccionados aleatoriamente, marcados de modo a permitir a identificação individual (embora nunca se deva recorrer a marcação nas orelhas) e mantidos em gaiolas durante, pelo menos, 5 dias antes do início da aplicação da dose, de modo a permitir a aclimação às condições do laboratório. Antes do início do tratamento, todos os animais são examinados de modo a assegurar que não apresentam lesões visíveis da pele.

1.3.2 Condições do ensaio

1.3.2.1 *Animais experimentais*

O rato é a espécie de eleição para o presente ensaio. Utilizam-se ratos fêmeas adultas das estirpes CBA/Ca ou CBA/J, nulíparas e não grávidas. No início do estudo, os animais devem ter entre 8 e 12 semanas de idade e a variação de peso dos animais deve ser mínima e não deve exceder 20% do seu peso médio. Podem ser utilizadas outras estirpes e machos quando houver uma quantidade suficiente de dados que demonstrem não existirem diferenças significativas na resposta ao LLNA relacionadas com a estirpe e/ou o género do animal.

1.3.2.2 *Verificação da fiabilidade*

Utilizam-se controlos positivos a fim de demonstrar o desempenho adequado do ensaio e a competência do laboratório para levar a cabo o ensaio com sucesso. O controlo positivo deve produzir uma resposta LLNA positiva ao nível de exposição à qual se espera um aumento do índice de estimulação (SI) > 3 em relação ao grupo do controlo negativo. A dose do controlo positivo deve ser escolhida de modo que a indução seja evidente, mas não excessiva. As substâncias preferidas são o aldeído hexilcinâmico (CAS No 101-86-0, EINECS No 202-983-3) e o mercaptobenzotiazole (CAS No 149-30-4, EINECS No 205-736-8). Em certas circunstâncias e perante justificação adequada, podem ser utilizadas outras substâncias de controlo que cumpram os critérios supramencionados. Embora seja geralmente requerido um grupo de controlo positivo para cada ensaio, podem ocorrer situações nas quais os ensaios laboratoriais apresentem um historial de dados de controlos positivos que documentem a consistência de uma resposta satisfatória por um período igual ou superior a seis meses. Nessas situações, pode ser apropriado efectuar ensaios menos frequentes com controlos positivos a intervalos não superiores a 6 meses. Embora a substância de controlo positivo deva ser ensaiada no excipiente para a qual é conhecida uma resposta consistente (por exemplo, acetona, azeite), podem existir certas situações regulamentares nas quais será igualmente necessário o ensaio com um excipiente não convencional (formulação clínica e/ou quimicamente relevante). Nessas condições, deve ser ensaiada a possível interacção de um controlo positivo com este excipiente não convencional.

1.3.2.3 *Número de animais, níveis de dosagem e selecção do excipiente*

Utilizam-se quatro animais, no mínimo, em cada grupo de dosagem e um mínimo de três concentrações da substância de ensaio, além de um controlo negativo tratado apenas com o excipiente para a substância de ensaio e, caso seja apropriado, um controlo positivo. Nos casos em que devam ser recolhidos dados individuais de cada animal, são utilizados, no mínimo, cinco animais por grupo de dosagem. Os animais nos grupos de controlo devem ser manuseados de modo idêntico ao dos animais nos grupos em tratamento, com excepção da ausência de tratamento com a substância de ensaio.

A escolha da dosagem e do excipiente deve basear-se nas recomendações fornecidas na referência (1). As doses são seleccionadas a partir da seguinte série de concentrações: 100%, 50%, 25%, 10%, 5%, 2,5%, 1%, 0,5%, etc. Devem ser considerados, desde que disponíveis, quaisquer dados pré-existentes referentes a toxicidade aguda e irritação dérmica, na escolha das três concentrações consecutivas, de modo que a concentração mais alta maximize a exposição evitando ao mesmo tempo a toxicidade sistémica e a irritação local excessiva da pele (2)(11).

O excipiente deve ser escolhido com base na maximização das concentrações de ensaio e na solubilidade, produzindo também uma solução ou suspensão adequadas para aplicação da substância de ensaio. Os excipientes recomendados são, por ordem de preferência, o sistema acetona/azeite (4:1 v/v), dimetilformamida, metiletilcetona, propilenoglicol e dimetilsulfóxido (2)(10), embora possam ser utilizados outros se forem fornecidas bases científicas suficientes. Em certas situações, pode ser necessário efectuar um controlo adicional com um solvente clinicamente relevante ou uma formulação comercial na qual a substância de ensaio é comercializada. Deve ser tomado especial cuidado de modo a assegurar que os materiais hidrofílicos sejam incorporados num sistema de excipiente que molhe a pele e não escorra imediatamente. Devem ser portanto evitados os excipientes completamente aquosos.

1.3.3 **Procedimento de ensaio**

1.3.3.1 *Calendário experimental*

O calendário experimental do ensaio é o seguinte:

- *Dia 1:*
Identificar individualmente e anotar o peso de cada animal. Aplicar a descoberto no dorso de cada orelha 25 µl da diluição adequada da substância de ensaio, do excipiente sozinho ou do controlo positivo (conforme o caso).
- *Dias 2 e 3:*
Repetir o procedimento de aplicação efectuado no dia 1.
- *Dias 4 e 5:*
Não se faz tratamento.
- *Dia 6:*
Anotar o peso de cada animal. Injectar 250 µl de tampão salino de fosfato (PBS) contendo 20 µCi (7,4e + 8 Bq) de ³H-metilimidina em todos os ratos de ensaio e de controlo através da veia da cauda. Em alternativa, injectar 250 µL de PBS contendo 2 µCi (7,4e + 7 Bq) de ¹²⁵I-iododeoxiuridina e 10⁻⁵ M de fluorodeoxiuridina em todos os ratos através da veia da cauda.

Cinco horas depois, matam-se os animais. Os gânglios linfáticos auriculares em esvaziamento são cortados e demolhados em PBS, reunindo-se aqueles de cada grupo experimental (procedimento de conjunto de grupo de tratamento); em alternativa, podem cortar-se pares de gânglios linfáticos de cada animal e reuni-los em PBS para cada animal (procedimento de animal individual). Podem ser consultados pormenores e esquemas de identificação de gânglios e sua dissecação no Anexo I da referência 10.

1.3.3.2 *Preparação das suspensões celulares*

Prepara-se uma só suspensão de células de gânglio linfático (LNC) quer a partir do conjunto dos grupos de tratamento, quer a partir dos animais individuais tratados bilateralmente, por desagregação mecânica suave através de um peneiro de aço inoxidável com uma malha de 200 µm. As células de gânglio linfático são lavadas duas vezes com excesso de PBS e precipitadas com uma solução de 5% em ácido tricloroacético (TCA) a 4°C durante 18 horas (1). Os sedimentos podem ser ressuspendidos em 1 ml de TCA e transferidos para frascos de contador de cintilações contendo 10 ml de fluido de cintilação para contagem de ³H ou transferidos directamente para tubos de contagem gama para contagem de ¹²⁵I.

1.3.3.3 *Determinação da proliferação celular (radioactividade incorporada)*

A incorporação de ³H-metilimidina é medida por contagem de cintilação β em desintegrações por minuto (DPM). A incorporação de ¹²⁵I-iododeoxiuridina é medida por contagem de ¹²⁵I e exprime-se igualmente em DPM. Consoante o procedimento seguido, a incorporação será expressa em DPM/grupo de tratamento (procedimento de conjunto) ou em DPM/animal (procedimento individual).

1.3.3.4 *Observações*

1.3.3.4.1 *Observações clínicas*

Os animais devem ser cuidadosamente observados uma vez por dia com vista à detecção de quaisquer sinais clínicos quer de irritação local no ponto de aplicação quer de toxicidade sistémica. Todas as observações são sistematicamente anotadas, devendo manter-se registos individuais para cada animal.

1.3.3.4.2 *Pesos corporais*

Tal como mencionado na secção 1.3.3.1, deve ser medido o peso corporal de cada animal quer no início do ensaio quer na altura da sua morte.

1.3.4 **Análise dos resultados**

Os resultados expressam-se em Índices de Estimulação (SI). Caso se utilize o procedimento de conjunto, o SI obtém-se pela razão entre a incorporação conjunta de radioactividade para cada grupo de tratamento e a incorporação conjunta do grupo de controlo com excipiente. O valor obtido corresponde ao SI médio. Caso se utilize o procedimento individual, o SI é determinado dividindo a média do DPM/animal dentro de cada grupo de tratamento e do grupo controlo positivo pela média da DPM/animal do grupo de controlo com solvente/excipientes. O SI médio para os controlos tratados com excipiente deve ser 1.

A utilização do procedimento individual para cálculo do SI permitirá que se efectue uma análise estatística dos dados. Na escolha do método de análise estatística mais apropriado, o investigador deve estar ciente das possíveis discrepâncias das variâncias e de outros problemas relacionados que possam exigir uma transformação de dados ou uma análise estatística não paramétrica. Um procedimento adequado à interpretação dos dados consiste em avaliar individualmente todos os dados obtidos para os controlos tratados e com excipiente e determinar a curva de resposta à dosagem que melhor se ajustar a estes, tendo em conta os limites de confiança (8)(12)(13). Contudo, o investigador deve estar atento a possíveis respostas isoladas para determinados animais dentro de um grupo, que podem implicar a utilização de uma medida de resposta alternativa (por exemplo, mediana em vez de média) ou a eliminação da resposta isolada.

O processo de decisão respeitante a uma resposta positiva inclui um índice de estimulação ≥ 3 conjuntamente com a consideração da resposta à dosagem e, quando apropriado, do grau de significância estatístico (3)(6)(8)(12)(14).

Se for necessária uma clarificação dos resultados obtidos, devem ser tidas em consideração as várias propriedades da substância de ensaio, incluindo se esta possui uma estrutura química semelhante a sensibilizadores conhecidos da pele, se causa irritação excessiva da pele e qual a natureza da resposta à dosagem observada. Estas e outras considerações são analisadas detalhadamente na referência (7).

2 DADOS

Os dados devem ser apresentados resumidamente sob a forma de uma tabela da qual constem os valores médios e individuais de DPM e os índices de estimulação para cada grupo de doses (incluindo o controlo com excipiente).

3 RELATÓRIO**RELATÓRIO DO ENSAIO**

O relatório do ensaio deverá incluir as seguintes informações:

Substância de ensaio:

- dados de identificação (por exemplo, número CAS, caso exista; origem; grau de pureza; impurezas conhecidas; número de lote);
- natureza física e propriedades físico-químicas (por exemplo, volatilidade, estabilidade, solubilidade);
- caso seja uma mistura, composição e percentagens relativas dos seus componentes.

Excipiente:

- dados de identificação [grau de pureza; concentração (se adequado); volume utilizado];
- justificação para a escolha do excipiente.

Animais de ensaio:

- estirpe dos ratos utilizados;
- estado microbiológico dos animais, caso seja conhecido;
- número, idade e sexo dos animais;
- origem dos animais, condições de alojamento, dieta, etc.

Condições do ensaio:

- pormenores sobre a preparação e aplicação da substância de ensaio;
- justificação para a escolha de dosagens, incluindo os resultados do estudo de escolha de gama, caso tenha sido efectuado; concentrações do excipiente e da substância de ensaio utilizadas e quantidade total de substância aplicada;
- pormenores sobre a qualidade do alimento e da água (incluindo o tipo de dieta e a sua origem, origem da água).

Verificação da fiabilidade:

- resumo dos resultados da última verificação de fiabilidade, incluindo informação sobre a substância, concentração e excipiente utilizado;
- dados de controlo concorrentes e/ou históricos positivos e negativos para o laboratório de ensaios.

Resultados:

- pesos de cada animal no início da dosagem e na altura da sua morte;
- tabela de valores médios (procedimento de conjunto) ou individuais (procedimento individual) de DPM assim como os valores limites para as duas aproximações e os índices de estimulação para cada grupo de doses (incluindo o controlo com excipiente);
- análise estatística quando apropriado;
- aparecimento e evolução temporal de sinais de toxicidade, incluindo irritação dérmica no local de administração, caso ocorra, para cada animal.

Análise dos resultados:

- inclui um comentário breve sobre os resultados obtidos, a análise da resposta à dosagem, as análises estatísticas, caso sejam apropriadas, e uma conclusão sobre se a substância de ensaio deve ou não ser considerada como sensibilizadora da pele.

REFERÊNCIAS

- 1 Kimber, I. e Basketter, D.A. (1992). The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary. *Food and Chemical Toxicology*, 30, 165-169.
- 2 Kimber, I., Derman, R.J., Scholes E.W, e Basketter, D.A. (1994). The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicology*, 93, 13-31.
- 3 Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E., Hastings, K.L. (1998). Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 53, 563-579.
- 4 Método de Ensaio B.6.
- 5 Chamberlain, M. e Basketter, D.A. (1996). The local lymph node assay: status of validation. *Food and Chemical Toxicology*, 34, 999-1002.
- 6 Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. e Loveless, S.E (1996). The local lymph node assay - A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food and Chemical Toxicology*, 34, 985-997.
7. Basketter, D.A., Gerberick, G.F. e Kimber, I. (1998). Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food and Chemical Toxicology*, 36, 327-333.
- 8 Van Och, F.M.M, Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J., Van Loveren, H. (2000). A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicology*, 146, 49-59.
- 9 Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A. e Kimber, I. (1998). Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde. *Journal of Applied Toxicology*, 18, 281-284.
- 10 National Institute of Environmental Health Sciences (1999). The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds: The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494, Research Triangle Park, N.C. (<http://iccvam.niehs.nih.gov>).
- 11 Método de Ensaio B.4.
- 12 Basketter, D.A., Selbie, E., Scholes, E.W. Lees, D. Kimber, I. e Botham, P.A. (1993) Results with OECD recommended positive control sensitisers in the maximisation, Buehler and local lymph node assays. *Food and Chemical Toxicology*, 31, 63-67.
- 13 Basketter D.A., Lea, L.J., Dickens, A., Briggs, D., Pate, I., Dearman, R.J., Kimber, I. (1999). A comparison of statistical approaches to the derivation of EC₃ values from local lymph node assay dose responses. *J. Appl. Toxicology*, 19, 261-266.
- 14 Basketter D.A., Blaikie, L., Derman R.J., Kimber, I., Ryan, C.A., Gerberick, G.F., Harvey, P., Evans, P., White, I.R. and Rycroft RTG (2000). Use of local lymph node assay for the estimation of relative contact allergenic potency. *Contact Dermatitis*, 42, 344-348.

B.43. ESTUDO DE NEUROTOXICIDADE EM ROEDORES

1. MÉTODO

O presente método é equivalente ao “Test Guideline” TG 424 da OCDE (1997).

O presente Método de Ensaio foi concebido para obter a informação necessária para confirmar ou conseguir uma melhor caracterização da potencial neurotoxicidade de substâncias químicas em animais adultos. Pode ser combinado com Métodos de Ensaio para estudos de toxicidade de dose repetida ou efectuado como um estudo independente. Recomenda-se a consulta do Documento de Orientação da OCDE sobre Estratégias e Métodos de Ensaio de Neurotoxicidade (1) para a concepção dos estudos baseados no presente Método de Ensaio. Este facto é particularmente importante no caso de se considerarem alterações das observações ou dos procedimentos de ensaio recomendados para uso rotineiro do presente Método. O Documento de Orientação foi preparado para facilitar a selecção de outros procedimentos de ensaio para uso em circunstâncias específicas.

A avaliação de neurotoxicidade em relação ao desenvolvimento não é abrangida pelo presente Método.

1.1 INTRODUÇÃO

Na avaliação das características tóxicas das substâncias químicas, é importante considerar o potencial de efeitos neurotóxicos. O Método de Ensaio para toxicidade sistémica de dose repetida inclui observações conducentes ao rastreio de neurotoxicidade potencial. O presente Método de Ensaio pode ser utilizado na concepção de um estudo para obtenção de informação suplementar ou para confirmação dos efeitos observados nos estudos de toxicidade sistémica de dose repetida. No entanto, uma ponderação da neurotoxicidade potencial de certo tipo de substâncias químicas pode ser indicativa de esta ser avaliada mais apropriadamente utilizando o presente Método, mesmo na ausência de indicações prévias de existência de neurotoxicidade potencial provenientes de estudos de toxicidade sistémica de dose repetida. Tal ponderação pode incluir, por exemplo:

- observação dos sinais neurológicos ou lesões neuropatológicas em estudos de toxicidade diferentes dos estudos de toxicidade sistémica de dose repetida, ou
- relação estrutural ou outra informação que estabeleça uma ligação com outros neurotóxicos conhecidos.

Além disso, podem existir outras circunstâncias para as quais é apropriada a utilização do presente Método de Ensaio. Para informação detalhada, consultar a referência (1).

O presente Método foi desenvolvido de modo a poder ser adaptado às necessidades específicas para a confirmação da neurotoxicidade histopatológica e comportamental de uma substância química, bem como a permitir uma caracterização e quantificação das respostas neurotóxicas.

No passado, a neurotoxicidade foi identificada como neuropatia envolvendo lesões neuropatológicas ou anomalias neurológicas, tais como convulsão, paralisia ou tremores. Apesar da neuropatia ser uma importante manifestação de neurotoxicidade, actualmente, é claro que existem muitos outros sinais de toxicidade no sistema nervoso (por exemplo, perda de coordenação motora, deficiências sensoriais, disfunções da aprendizagem e da memória) que podem não se reflectir em neuropatia ou noutro tipo de estudos.

O presente Método de Ensaio de neurotoxicidade foi concebido para detectar os principais efeitos neurocomportamentais e neuropatológicos em roedores adultos. Apesar dos efeitos comportamentais, mesmo na ausência de alterações morfológicas, poderem reflectir um impacto nefasto no organismo, nem todas as alterações comportamentais são específicas do sistema nervoso. Assim, quaisquer alterações observadas devem ser avaliadas em conjunto com os dados histopatológicos, hematológicos ou bioquímicos relacionados, bem como, com dados provenientes de outros tipos de toxicidade sistémica. O ensaio utilizado, no presente Método, para fornecer uma caracterização e quantificação das respostas neurotóxicas inclui procedimentos histopatológicos e comportamentais específicos que podem ser confirmados por investigações electrofisiológicas e/ou bioquímicas (1)(2)(3)(4).

Os neurotóxicos podem actuar sobre o sistema nervoso em vários alvos e por diversos mecanismos. Dado que não é possível utilizar uma única série de ensaios para avaliar completamente o potencial neurotóxico de todas as substâncias, pode ser necessário utilizar outros ensaios *in vivo* ou *in vitro* específicos para o tipo de neurotoxicidade observada ou prevista.

O presente Método de Ensaio, pode também ser utilizado em conjunto com as orientações estabelecidas pelo Documento de Orientação da OCDE sobre Estratégias e Métodos de Ensaios de Neurotoxicidade (1), para a concepção de estudos destinados a uma caracterização suplementar ou um aumento da sensibilidade da quantificação da curva dose-efeito, de modo a obter uma melhor estimativa do nível sem efeito adverso observável ou a confirmar a perigosidade conhecida ou prevista de uma substância química. Por exemplo, os estudos podem ser concebidos para identificar e avaliar o(s) mecanismo(s) neurotóxico(s) ou para obter informação suplementar sobre dados previamente disponíveis a partir do uso de procedimentos de observação neurocomportamental e neuropatológica básicos. Tais estudos necessitam de dados não-replicados que seriam obtidos pelo uso dos procedimentos padronizados recomendados no presente Método, caso esses dados não se encontrem já disponíveis e não sejam considerados necessários para a interpretação dos resultados do estudo.

O presente estudo de neurotoxicidade, quer utilizado independentemente, quer em conjunto com outros métodos permite obter informação para:

- identificar se o sistema nervoso central é afectado permanente ou reversivelmente pela substância química ensaiada;
- contribuir para a caracterização das alterações do sistema nervoso central associadas à exposição à substância química e para a compreensão do mecanismo subjacente;
- determinar as curvas dose-efeito e tempo-efeito, de modo a obter uma estimativa do nível sem efeito adverso observável (que pode ser utilizado para estabelecer critérios de segurança para a substância química).

O presente Método utiliza a administração oral da substância de ensaio. Podem ser mais apropriadas outras vias de administração (por exemplo, dérmica ou por inalação), pelo que podem ser necessárias modificações dos procedimentos recomendados. A selecção ponderada, da via de administração, depende do perfil de exposição humana e da informação toxicológica e cinética disponível.

1.2 DEFINIÇÕES

Efeito adverso: qualquer alteração à normalidade relacionada com o tratamento que diminua a capacidade de um organismo para sobreviver, reproduzir-se ou adaptar-se ao meio ambiente.

Dose: quantidade aplicada da substância de ensaio. O valor da dose é expresso em peso (g, mg), de substância de ensaio por unidade de peso de animal de ensaio (por exemplo, mg/kg) ou em concentrações dietéticas constantes (ppm).

Dosagem é um termo geral que inclui a dose, a sua frequência e a duração da aplicação da dose.

Neurotoxicidade é uma alteração adversa na estrutura ou função do sistema nervoso que resulta da exposição a um agente químico, biológico ou físico.

Neurotóxico é um agente químico, biológico ou físico que apresenta potencial para causar neurotoxicidade.

NSEAO: abreviatura para nível sem efeito adverso observável; corresponde à maior dose ou ao maior nível de exposição para o qual não se observam efeitos adversos relacionados com o tratamento.

1.3 PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

A substância química de ensaio é administrada por via oral ao longo de uma gama de doses a vários grupos de roedores de laboratório. São normalmente necessárias doses repetidas e o regime de dosagem pode ser de 28 dias, subcrónico (90 dias) ou crónico (1 ano ou mais). Os procedimentos estabelecidos no presente Método de Ensaio podem também ser usados para um estudo de neurotoxicidade aguda. Os animais são ensaiados de modo a permitir a detecção ou a caracterização de anomalias comportamentais e/ou neurológicas. Durante cada período de observação é avaliada uma gama de comportamentos que podem ser afectados por neurotóxicos. No final do ensaio, um subconjunto de animais de cada sexo e de cada grupo é submetido a perfusão *in situ* e são preparadas e examinadas secções do cérebro, medula espinal e nervos periféricos.

No caso do estudo ser efectuado independentemente para rastreio de neurotoxicidade ou caracterização dos efeitos neurotóxicos, os animais de cada grupo que não são utilizados para perfusão e histopatologia subsequente (consultar a Tabela 1) podem ser utilizados em procedimentos neurocomportamentais, neuropatológicos, neuroquímicos e electrofisiológicos específicos que podem complementar os dados obtidos nos exames padronizados necessários ao presente Método (1). Estes procedimentos suplementares podem ser particularmente úteis nos casos em que as observações empíricas ou os efeitos previstos revelam um tipo ou alvo específicos de neurotoxicidade de determinado agente químico. Alternativamente, os restantes animais podem ser utilizados em avaliações, tais como as necessárias aos Métodos de Ensaio para estudos de dose repetida em roedores.

No caso de se combinarem os procedimentos do presente Método de Ensaio, com os de outros Métodos de Ensaio, é necessário um número suficiente de animais para satisfazer as necessidades de observações de ambos os estudos.

1.4 DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.4.1 Selecção de espécies animais

A espécie preferida de roedores para ensaio é o rato, mas, caso seja apresentada uma justificação, podem ser utilizadas outras espécies de roedores. Devem ser utilizadas estirpes laboratoriais de uso corrente e animais adultos, jovens e saudáveis. As fêmeas devem ser nulparas e não devem estar grávidas. A aplicação da dose deve começar o mais rapidamente possível após o desmame, preferencialmente com animais que não tenham completado ainda seis semanas e sempre com animais com menos de nove semanas. No entanto, nos casos em que o estudo é combinado com outros estudos, pode ser necessário ajustar este requisito de idade. No início do estudo, a diferença de peso entre os animais deverá ser mínima, não podendo ultrapassar 20% do peso médio de cada sexo. No caso de se efectuar um estudo de dose repetida de curta duração, como estudo preliminar do estudo de longo prazo, os animais utilizados em ambos os estudos devem ser da mesma estirpe e da mesma proveniência.

1.4.2 Condições de alojamento e alimentação

A temperatura do compartimento experimental dos animais deve ser 22°C (± 3 °C). A humidade relativa deverá ser 50%-60%, embora sejam aceitáveis valores entre um mínimo de 30% e um máximo que, de preferência, não deverá exceder 70%, salvo durante os períodos de limpeza do compartimento. A iluminação deve ser artificial, com sequências de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. Os ruídos intensos intermitentes devem ser minimizados. A alimentação pode basear-se em dietas de laboratório convencionais, com fornecimento ilimitado de água para beber. Quando a substância de ensaio for administrada pela alimentação, a escolha da dieta poderá ser condicionada pela necessidade de assegurar a dosagem adequada. Os animais podem ser alojados individualmente ou em pequenos grupos do mesmo sexo.

1.4.3 Preparação dos animais

Os animais jovens e saudáveis são distribuídos aleatoriamente pelos grupos de tratamento e de controlo. As gaiolas devem ser dispostas de forma a minimizar possíveis efeitos derivados do seu posicionamento. Os animais são marcados de modo a permitir uma identificação individualizada e mantidos nas suas gaiolas durante, pelo menos, 5 dias antes do início da administração das doses, de modo a permitir que se aclimatem às condições laboratoriais.

1.4.4 Via de administração e preparação das doses

O presente Método de Ensaio aborda especificamente a administração oral da substância de ensaio. A forma de administração pode ser por sonda esofágica, através da alimentação ou da água de beber ou por cápsulas. Podem ser mais apropriadas outras vias de administração (por exemplo, dérmica ou por inalação), pelo que podem ser necessárias modificações dos procedimentos recomendados. A selecção ponderada da via de administração depende do perfil de exposição humana e da informação toxicológica e cinética disponível. Devem ser apresentadas uma justificação para a selecção da via de administração, bem como as modificações dos procedimentos do Método de Ensaio daí resultantes.

Se for necessário, a substância de ensaio pode ser dissolvida ou suspensa num excipiente apropriado. Recomenda-se que, sempre que possível, seja considerada em primeiro lugar a utilização de uma solução/suspensão aquosa; caso tal não seja viável, pode considerar-se o uso de uma solução/suspensão em óleo (por exemplo, óleo de milho); em último caso, poderá eventualmente recorrer-se ao uso de soluções/suspensões noutros excipientes. Devem conhecer-se as características tóxicas dos excipientes. Deverão ser tomadas em consideração as seguintes características do excipiente: efeitos na absorção, distribuição, metabolismo ou retenção da substância de ensaio, que possam modificar as suas características tóxicas e efeitos no consumo de alimentos, na ingestão de água ou no estado nutricional dos animais.

1.5 PROCEDIMENTOS

1.5.1 Número e sexo dos animais

No caso de o estudo ser efectuado independentemente, devem ser utilizados pelo menos 20 animais (10 fêmeas e 10 machos) em cada grupo de dose e de controlo para a avaliação das observações clínicas e funcionais detalhadas. Pelo menos cinco machos e cinco fêmeas, seleccionados dos grupos de 10 machos e 10 fêmeas, devem ser sujeitos a perfusão e utilizados para neuro-histopatologia detalhada no final do estudo. Nos casos em que apenas é observado um número limitado de animais, num determinado grupo de dose, para detecção de efeitos neurotóxicos, deve considerar-se a inclusão destes animais no grupo seleccionado para perfusão. No caso de o estudo ser efectuado em conjunto com um estudo de toxicidade de dose repetida, deve ser utilizado um número de animais adequado de modo a cumprir os objectivos de ambos os estudos. Na Tabela 1, apresentam-se os números mínimos de animais por grupo para vários estudos combinados. No caso de se planearem grupos de mortes intermédias ou de recuperação para observação da reversibilidade, persistência ou ocorrência retardada de efeitos tóxicos pós-tratamento ou quando são consideradas observações suplementares, o número de animais deve ser aumentado de modo a assegurar que se encontra disponível o número de animais necessário para observação e histopatologia.

1.5.2 Grupos de ensaio e de controlo

Em geral, devem ser utilizados pelo menos três grupos de dose e um grupo de controlo, mas, se pela avaliação de outros dados, não forem previstos quaisquer efeitos a uma dose repetida de 1000 mg/kg de peso corporal/dia, pode ser efectuado um teste-limite. Caso não se encontrem disponíveis dados adequados, pode ser efectuado um estudo preliminar de avaliação da gama, de modo a permitir a determinação das doses a utilizar. Os animais do grupo de controlo devem ser tratados da mesma maneira que os animais dos grupos de ensaio, com excepção do tratamento com a substância de ensaio. Caso seja utilizado um excipiente, o grupo de controlo deverá receber o volume máximo de excipiente utilizado no ensaio.

1.5.3 Teste de fiabilidade

O laboratório que efectua o estudo deve apresentar dados comprovativos da sua capacidade para efectuar o estudo e relativos à sensibilidade dos procedimentos utilizados. Tais dados devem provar a capacidade de detectar e quantificar, como apropriadas, alterações nos diferentes critérios específicos recomendados para observação, tais como sinais autonómicos, reactividade sensorial, força de preensão dos membros e actividade motora. Podem ser consultadas as referências 2 a 9 para informações sobre substâncias químicas que provocam diferentes respostas neurotóxicas e que podem ser utilizadas como controlos positivos. Podem ser utilizados dados históricos desde que os procedimentos experimentais não sejam alterados. Recomenda-se uma actualização periódica dos dados históricos. Caso o laboratório executante modifique alguns elementos essenciais da execução do ensaio ou procedimentos, devem obter-se novos dados comprovativos de que a sensibilidade dos procedimentos não foi alterada.

1.5.4 Selecção da dose

A escolha dos níveis de dose deverá tomar em consideração todos os dados de toxicidade e cinética existentes para a substância de ensaio ou as substâncias relacionadas. Deve ser seleccionado, o nível de dose mais elevado que induza efeitos neurotóxicos ou efeitos tóxicos sistémicos evidentes. Deve seleccionar-se uma sequência descendente de níveis de dose, que permita detectar qualquer resposta relacionada com a dose e determinar o nível sem efeito adverso observável (NSEAO) ao nível de dose mais baixo. Em princípio, os níveis de dose devem ser estabelecidos de modo a permitir distinguir entre os efeitos tóxicos primários no sistema nervoso e os efeitos relacionados com toxicidade sistémica. Em muitos casos, a melhor forma de estabelecer estas sequências consiste no espaçamento das doses em dois a três intervalos. A adição de um quarto grupo de ensaio é muitas vezes preferível ao uso de intervalos muito grandes entre as dosagens (ou seja, com um factor superior a 10). Nos casos em que existe uma estimativa razoável da exposição humana, esta deve também ser tomada em consideração.

1.5.5 Teste-limite

Se um ensaio com um nível de dose oral de pelo menos 1000 mg/kg de peso corporal/dia, realizado de acordo com os procedimentos descritos neste estudo, não provocar efeitos neurotóxicos observáveis e se, além disso, os dados existentes sobre compostos estruturalmente relacionados com a substância de ensaio não sugerirem a possível ocorrência de toxicidade, poderá considerar-se desnecessário realizar um ensaio completo com três níveis de dose. Nos casos em que se preveja exposição humana, poderá ser necessário aumentar o nível de dose oral no ensaio-limite. Quando se usam outras formas de administração, como inalação ou aplicação cutânea, as propriedades físico-químicas da substância de ensaio são muitas vezes indicativas e limitativas do nível máximo de exposição praticável. Para a execução do estudo oral agudo, a dose para o teste-limite deve ser, no mínimo, de 2000 mg/kg.

1.5.6 Administração de doses

A aplicação da dose da substância de ensaio, nos animais, é efectuada diariamente, sete dias por semana, durante um período de pelo menos 28 dias. O uso de um período de dosagem de cinco dias ou inferior deve ser justificado. A administração por sonda esofágica deve ser feita, de preferência, numa toma única, usando um tubo estomacal ou uma cânula de intubação apropriada. O volume máximo de líquido que pode ser administrado de cada vez depende do tamanho do animal de ensaio. O volume não deve exceder 1ml/100 g de peso corporal. Para soluções aquosas, contudo, pode ser considerada a dose de 2 ml/100 g de peso corporal. Deve minimizar-se a variabilidade do volume de ensaio efectuando ajustes nas concentrações, de forma a assegurar a constância do volume em todos os níveis de dose; exceptuam-se os casos em que se utilizam substâncias irritantes ou corrosivas, que normalmente exercem efeitos exacerbados quando aplicadas em concentrações mais elevadas.

É importante assegurar que as quantidades da substância de ensaio administradas através da alimentação ou da água de beber não interferem nas exigências normais de nutrição ou de consumo de água. Quando a substância de ensaio for incorporada na alimentação, pode utilizar-se uma concentração alimentar constante (ppm) ou, alternativamente, um nível de dose constante em relação ao peso corporal dos animais; deve especificar-se o método escolhido para o ensaio. No caso de uma substância administrada por sonda esofágica, a dose deve ser administrada todos os dias à mesma hora, devendo ser ajustada pelo menos uma vez por semana a fim de se manter uma dose constante em relação ao peso corporal do animal. No caso de se efectuar um estudo de dose repetida, como estudo preliminar de um estudo de longo prazo, deve utilizar-se uma dieta semelhante em ambos os estudos. Nos estudos de toxicidade aguda, se não for possível a administração de uma toma única, a dose pode ser administrada em fracções menores ao longo de um período não superior a 24 horas.

1.6 OBSERVAÇÕES

1.6.1 Frequência das observações e ensaios

Nos estudos de dose repetida, o período de observação deve abranger o período de dosagem. Nos estudos de toxicidade aguda, deve ser observado um período de 14 dias após o tratamento. As observações devem também abranger este período para os animais em grupos-satélite que foram mantidos sem exposição durante o período após o tratamento.

As observações devem ser efectuadas com uma frequência suficiente para maximizar a probabilidade de detecção de qualquer anomalia comportamental e/ou neurológica. As observações devem ser, preferencialmente, efectuadas à mesma hora, todos os dias, tendo em conta o período de pico previsto de efeitos após aplicação da dose. Na Tabela 2, apresenta-se resumida a frequência das observações clínicas, bem como dos ensaios funcionais. No caso de existirem dados cinéticos ou outros dados obtidos em estudos prévios indicativos da necessidade de se utilizarem diferentes momentos de observação, ensaios ou períodos de observação posteriores, deve adoptar-se um calendário alternativo de modo a obter o máximo de informação. Deve apresentar-se uma justificação para as alterações introduzidas no calendário.

1.6.1.1 *Observações do estado de saúde geral e da mortalidade/morbilidade*

Todos os animais devem ser observados cuidadosamente, pelo menos uma vez por dia, para avaliar o seu estado de saúde geral, bem como, pelo menos duas vezes por dia, para avaliar a mortalidade e morbilidade.

1.6.1.2 *Observações clínicas pormenorizadas*

Devem ser efectuadas observações clínicas pormenorizadas em todos os animais seleccionados para este fim (consultar a Tabela 1) uma vez, antes da primeira exposição (de modo a permitir a comparação entre os diferentes animais) e, posteriormente, a diferentes intervalos, consoante a duração do estudo (consultar a Tabela 2). Devem ser também efectuadas observações clínicas pormenorizadas nos grupos-satélites de recuperação no final do período de recuperação. As observações clínicas pormenorizadas devem ser efectuadas no exterior do compartimento experimental, numa arena-padrão. Devem ser registadas cuidadosamente utilizando sistemas de pontuação que incluam escalas de critérios ou de pontuação para cada medição das observações. Os critérios ou escalas utilizados devem ser explicitamente definidos pelo laboratório de ensaio. Deve assegurar-se que as variações das condições de ensaio são mínimas (não sistematicamente relacionadas com o tratamento) e que as observações são efectuadas por pessoal especializado sem conhecimento do tratamento efectuado.

Recomenda-se que as observações sejam efectuadas de um modo estruturado, em que se aplicam sistematicamente critérios bem definidos (incluindo a definição de “gama” normal) a cada animal, em cada observação. A “gama normal” deve ser apropriadamente documentada. Devem ser registados todos os sinais observados. Sempre que possível, deve também ser registada a intensidade dos sinais observados. As observações clínicas devem incluir, entre outros aspectos, alterações na pele, pêlo, olhos, membranas mucosas, ocorrência de secreções e excreções e actividade autónoma (por exemplo, lacrimação, erecção pilosa, tamanho da pupila, padrão respiratório anormal e/ou respiração pela boca, quaisquer sinais pouco usuais de urina ou defecação e urina descorada).

Devem ser registadas quaisquer respostas pouco usuais relativas à posição corporal, nível de actividade (por exemplo, maior ou menor exploração da arena-padrão) e coordenação dos movimentos. Também devem ser registadas alterações na marcha (por exemplo, marcha bamboleante, ataxia), postura (por exemplo, dorso arqueado) e reactividade ao manuseamento, colocação ou outros estímulos ambientais, bem como a presença de movimentos clónicos ou tónicos, convulsões ou tremores, estereótipos (por exemplo, higiene excessiva, movimentos de cabeça pouco usuais, locomoção em círculos repetitiva) ou comportamento anómalo (por exemplo, morder ou lambem excessivamente, auto-mutilação, andar para trás, vocalização) ou agressão.

1.6.1.3 *Ensaio funcionais*

Tal como para o caso das observações clínicas pormenorizadas, devem ser efectuados ensaios funcionais uma vez antes da exposição e frequentemente após a exposição nos animais seleccionados para este fim (consultar a Tabela 1). A frequência dos ensaios funcionais depende também da duração do estudo (consultar a Tabela 2). Além dos períodos de observação, estabelecidos na Tabela 2, as observações funcionais dos grupos-satélite de recuperação devem também ser efectuadas o mais próximo possível da morte terminal. Os ensaios funcionais devem incluir, a reactividade sensorial a estímulos de várias tipos [por exemplo, estímulos auditivos, visuais e proprioceptivos (5)(6)(7)], a avaliação da força de preensão dos membros (8) e avaliação da actividade motora (9). A actividade motora, deve ser medida, com um dispositivo automático capaz de detectar tanto aumentos, como diminuições de actividade. Caso seja utilizado outro sistema definido, este deve ser quantitativo e a sua sensibilidade e fiabilidade devem ser comprovadas. Cada dispositivo deve ser ensaiado para assegurar a fiabilidade ao longo do tempo e a consistência entre os diferentes dispositivos. Nas respectivas referências apresenta-se informação detalhada sobre os procedimentos a seguir. Caso não existam quaisquer dados (por exemplo, relações estrutura-actividade, dados epidemiológicos, outros estudos toxicológicos) indicativos dos potenciais efeitos neurológicos, deve ser considerada a inclusão de ensaios mais especializados de função sensorial e motora ou de aprendizagem e memória de modo que estes possíveis efeitos sejam examinados mais pormenorizadamente. Na referência (1) apresentam-se informações adicionais sobre os ensaios especializados e sua utilização.

Excepcionalmente, os animais que apresentem sinais de toxicidade numa extensão que afecte significativamente o ensaio funcional, podem ser excluídos deste ensaio. Deve ser apresentada uma justificação para a exclusão de animais do ensaio funcional.

1.6.2 **Peso corporal e consumo de alimento/água**

Para estudos com duração até 90 dias, todos os animais devem ser pesados, pelo menos uma vez por semana, e devem ser feitas medições do consumo de alimentos (consumo de água, caso a substância de ensaio seja administrada por este meio) pelo menos semanalmente. Para estudos de longo prazo, todos os animais devem ser pesados pelo menos uma vez por semana durante as 13 primeiras semanas e, seguidamente, pelo menos de 4 em 4 semanas. Devem ser feitas medições do consumo de alimentos (consumo de água, caso a substância de ensaio seja administrada por este meio), pelo menos semanalmente, nas primeiras 13 semanas e seguidamente, com um intervalo de cerca de três meses, excepto se o estado de saúde ou as variações de peso corporal indicarem que se deve fazer com outra periodicidade.

1.6.3 **Oftalmologia**

Para estudos de duração superior a 28 dias, deve ser efectuado um exame oftalmológico, utilizando um oftalmoscópio ou um instrumento equivalente adequado, antes da administração da substância de ensaio e no final do estudo. Preferencialmente este exame deve ser feito a todos os animais ou, pelo menos, aos animais dos grupos de doses elevadas e dos grupos de controlo. Todos os animais devem ser examinados caso sejam detectadas alterações oculares ou caso os sintomas clínicos assim o indiquem. Para estudos de longo prazo, o exame oftalmológico deve também ser efectuado no final de 13 semanas. Não é necessário efectuar os exames oftalmológicos se existirem dados disponíveis de outros estudos com duração semelhante e com níveis de dose semelhantes.

1.6.4 Hemograma e química clínica

Se o estudo de neurotoxicidade for efectuado em conjunto com um estudo de toxicidade sistémica de dose repetida, devem ser efectuadas análises clínicas (hemograma e química clínica), tal como estabelecido no respectivo Método do estudo de toxicidade sistémica. A recolha das amostras deve ser efectuada de modo a minimizar quaisquer potenciais efeitos no comportamento neuronal.

1.6.5 Histopatologia

O exame neuropatológico deve ser concebido a fim de complementar e aprofundar as observações efectuadas durante a fase *in vivo* do estudo. Os tecidos provenientes de, pelo menos, 5 animais de cada grupo do mesmo sexo (consultar a Tabela 1 e o parágrafo seguinte) devem ser fixados *in situ* por utilização de técnicas de perfusão e fixação comumente adoptadas (consultar a referência 3, capítulo 5 e a referência 4, capítulo 50). Devem ser registadas quaisquer alterações importantes que sejam observadas. No caso de o estudo ser efectuado independentemente para rastreio de neurotoxicidade ou para caracterizar efeitos neurotóxicos, os animais que não sejam utilizados podem sê-lo em procedimentos neurocomportamentais (10)(11), neuropatológicos (10)(11)(12)(13), neuroquímicos (10)(11)(14)(15) e electrofisiológicos específicos que podem complementar os procedimentos e exames descritos ou podem ser acrescentados aos animais sujeitos a exame histopatológico. Estes procedimentos complementares têm um interesse especial quando as observações empíricas ou os efeitos previstos são indicativos de um tipo ou alvo específicos para a neurotoxicidade (2)(3). Os animais não utilizados podem, alternativamente, sê-lo em avaliações patológicas de rotina tal como descritas no Método para estudos de dose repetida.

Deve ser utilizada uma técnica de coloração convencional, tal como hematoxilina ou eosina (H&E), em todas as amostras de tecidos, que devem ser fixadas em parafina e examinadas ao microscópio. Caso sejam observados sintomas de neuropatia periférica ou haja suspeitas nesse sentido, devem ser examinadas amostras de tecido nervoso periférico fixado em plástico. Os sintomas clínicos podem igualmente sugerir o exame a locais adicionais ou a utilização de técnicas de coloração especiais. Podem obter-se orientações sobre os locais adicionais a examinar em (3) e (4). Pode também ser útil a utilização de técnicas de coloração especiais apropriadas à demonstração de alterações patológicas específicas (18).

Os segmentos representativos dos sistemas nervosos central e periférico devem ser sujeitos a exame histopatológico (consultar a referência 3, capítulo 5 e a referência 4, capítulo 50). As áreas a examinar devem normalmente incluir: o cérebro anterior, o centro do cérebro, incluindo uma secção através do hipocampo, o mesencéfalo, o cerebelo, a ponte de Varolio, a medulla oblongata, o olho, incluindo o nervo óptico e a retina, a espinal medula ao nível das protuberâncias cervical e lombar, os gânglios da raiz dorsal, as fibras das raízes dorsal e ventral, o nervo ciático proximal, o nervo tibial proximal (no joelho) e as ramificações do nervo tibial nos gémeos. Devem ser examinadas as secções coronal, transversal e longitudinal da espinal medula e dos nervos periféricos. Deve ser dada especial atenção à vasculatura do sistema nervoso. Deve ser igualmente analisada uma amostra de músculo esquelético, nomeadamente, gémeos. Deve ser prestada especial atenção aos locais com estrutura e padrão celular e fibroso bi SNC e SNP que se saiba serem particularmente vulneráveis a substâncias neurotóxicas.

Podem obter-se orientações sobre as alterações neuropatológicas que resultam tipicamente da exposição a substâncias tóxicas nas referências (3) e (4). Recomenda-se um exame minucioso das amostras de tecidos, no qual são inicialmente comparados os cortes seccionais obtidos no grupo de dose mais elevada com os obtidos no grupo de controlo. Caso não sejam observadas quaisquer alterações neuropatológicas nas amostras provenientes desses grupos, não é necessário efectuar quaisquer análises subsequentes. Caso sejam observadas alterações neuropatológicas no grupo de dose mais elevada, as amostras de cada um dos tecidos potencialmente afectados provenientes dos grupos de doses intermédia e reduzida devem ser codificadas e analisadas sequencialmente.

Caso sejam detectados, no decorrer do exame qualitativo, quaisquer sintomas de alterações neuropatológicas, deve ser efectuado um segundo exame a todas as regiões do sistema nervoso que apresentem tais alterações. Cortes seccionais provenientes de todos os grupos de dosagem de cada uma das regiões potencialmente afectadas devem ser codificados e examinados ao acaso, sem conhecimento do respectivo código. Devem ser registadas a frequência e gravidade de cada lesão detectada. Após a classificação de todas as regiões em todos os grupos de dosagem, o código pode ser revelado e pode ser efectuada a análise estatística de modo a avaliar as relações dose-efeito. Devem descrever-se exemplos para os diferentes graus de gravidade das várias lesões.

Os dados neuropatológicos devem ser avaliados no contexto das observações comportamentais e das medidas efectuadas, assim como de quaisquer outros dados provenientes de estudos de toxicidade sistémica da substância de ensaio efectuados anterior ou simultaneamente.

2 DADOS

2.1 TRATAMENTO DOS RESULTADOS

Devem apresentar-se os dados individuais. Além disso, todos os dados devem ser resumidos em forma tabular, indicando, para cada grupo de ensaio ou de controlo, o número de animais no início do ensaio, o número de animais encontrados mortos durante o ensaio ou sacrificados a fim de evitar dor, o momento de todas as mortes (espontâneas ou provocadas), o número de animais apresentando sintomas de toxicidade, uma descrição dos sintomas de toxicidade observados (incluindo o momento do aparecimento, a duração, o tipo e a gravidade), o número de animais que apresentam lesões, incluindo o tipo e a gravidade de tais lesões.

2.2 AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados do estudo devem ser avaliados em termos da incidência, gravidade e correlação entre os efeitos observados aos níveis neurocomportamental e neuropatológico (assim como os efeitos neuroquímicos e electrofisiológicos, caso sejam efectuados quaisquer exames complementares) e quaisquer outros efeitos adversos observados. Sempre que possível, os resultados numéricos devem ser avaliados através de um método estatístico adequado e de utilização comum. Os métodos estatísticos devem ser determinados durante o planeamento do estudo.

3 RELATÓRIO

RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deverá incluir as seguintes informações:

Substância de ensaio:

- natureza física (incluindo isómeros, pureza e propriedades físico-químicas);
- dados de identificação.

Excipiente (se apropriado):

- justificação para escolha do excipiente.

Animais de ensaio:

- espécie/estirpe usada;
- número, idade e sexo dos animais;
- proveniência, condições de alojamento, aclimatização, dieta, etc.;
- peso individual dos animais no início do ensaio.

Condições do ensaio:

- informação pormenorizada sobre a formulação da substância de ensaio/preparação da dieta, concentração atingida, estabilidade e homogeneidade da preparação;
- especificação das doses administradas, incluindo dados pormenorizados sobre o excipiente, volume e forma física do material administrado;
- informação pormenorizada sobre a administração da substância de ensaio;
- justificações para a escolha dos diferentes níveis de dosagem;
- justificações para a escolha da via de administração e a duração do ensaio;
- conversão da concentração da substância de ensaio na dieta/água de beber (ppm) para a dose real (mg/kg de peso corporal/dia), se aplicável;
- informação pormenorizada sobre a qualidade dos alimentos e da água.

Observações e procedimentos de ensaio:

- informação pormenorizada sobre a atribuição dos animais de cada grupo aos diferentes subgrupos de perfusão;
- informação pormenorizada sobre os sistemas de classificação, incluindo escalas de classificação e critérios para cada medida efectuada nas observações clínicas aprofundadas;
- informação pormenorizada sobre os ensaios funcionais da reacção sensorial aos estímulos de diferentes origens (por exemplo, auditivos, visuais e proprioceptivos); da avaliação da força de preensão dos membros e da actividade motora (incluindo informação pormenorizada sobre dispositivos automáticos de detecção de actividade); e de outros procedimentos efectuados;
- informação pormenorizada sobre os exames oftalmológicos e, caso seja adequado, análises clínicas (hemograma e química clínica) com valores relevantes de linha de base;
- informação pormenorizada sobre os procedimentos neurocomportamentais, neuropatológicos, neuroquímicos e electrofisiológicos específicos.

Resultados:

- peso corporal/alterações do peso corporal, incluindo o peso corporal na altura da morte;
- consumo de alimento e consumo de água, sempre que necessário;
- dados sobre a resposta à toxicidade para cada sexo e nível de dosagem, incluindo sintomas de toxicidade ou mortalidade;
- natureza, gravidade e duração (momento do aparecimento e desenvolvimento subsequente) dos efeitos detectados em observações clínicas aprofundadas (reversíveis ou não);
- descrição pormenorizada de todos os resultados dos ensaios funcionais;
- resultados da autópsia;
- descrição pormenorizada de todos os dados neurocomportamentais, neuropatológicos e neuroquímicos ou electrofisiológicos, caso estejam disponíveis;
- dados de absorção e metabolismo, caso estejam disponíveis;
- tratamento estatístico dos resultados, se apropriado.

Análise dos resultados.

- informação sobre a resposta à dosagem;
- relação entre quaisquer outros efeitos tóxicos de modo a tirar conclusões sobre o potencial neurotóxico da substância química de ensaio;
- nível sem efeito adverso observável.

Conclusões.

- aconselha-se a inclusão de uma declaração específica sobre a neurotoxicidade global da substância química de ensaio.

4

REFERÊNCIAS

1. OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Test Methods. OECD, Paris, (em preparação).
2. Test Guideline for a Developmental Neurotoxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Em: *Teratology*
3. World Health Organization (WHO) (1986). Environmental Health Criteria document 60: Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity associated with Exposure to Chemicals.
4. Spencer, P.S. e Schaumburg, H.H. (1980). Experimental and Clinical Neurotoxicology. Orgs. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds. Williams e Wilkins, Baltimore/London.
5. Tupper, D.E. e Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurological Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Protoplasma*, 40, 999-1003.
6. Stephan C.E. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol. Environ. Health*, 9, 691-704.
7. Moser, V.C., McDaniel, K.M. e Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of amitraz. *Toxic. Appl. Pharmacol.*, 108, 267-283.

8. Meyer, O.A., Tilson, H.A., Byrd, W.C. e Riley, M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.*, 1, 233-236.
9. Crofton, K.M., Haward, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reirer, L.W., Tilson, H.A. e MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.*, 13, 599-609.
10. Tilson, H.A., e Mitchell, C.L. orgs. (1992). *Neurotoxicology Target Organ Toxicology Series*. Raven Press, New York.
11. Chang, L.W., org. (1995). *Principles of Neurotoxicology*. Marcel Dekker, New York.
12. US EPA, (1991). Neuropathology as a screen for Neurotoxicity Assessment. *J. Amer. Coll. Toxicol.*, 10, 689-695.
13. Moser, V.C., Anthony, D.C., Sette, W.F. e MacPhail, R.C. (1992). Comparison of Subchronic Neurotoxicity of 2-Hydroxyethyl Acrylate and Acrylamide in Rats. *Fund. Appl.Toxicol.*, 18, 343-352.
14. Blaxter J.H.S. (1988). Neurotypic and Gliotypic Proteins as Biochemical Markers of Neurotoxicity. *Eurotoxicol. Teratol.*, 10, 445-452.
15. O'Callaghan J.P. e Miller, D.B. (1988). Acute Exposure of the Neonatal Rat to Triethyltin Results in Persistent Changes in Neurotypic and Gliotypic Proteins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 244, 368-378.
16. Fox, D.A., Lowndes, H.E. e Birkamper, G.G. (1982). Electrophysiological Techniques in Neurotoxicology. Em: *Nervous System Toxicology*. Mitchell, C.L. org. Raven Press, New York, pp. 299-335.
17. Johnson, B.L. (1980). Electrophysiological Methods in Neurotoxicity Testing. Em: *Experimental and Clinical Neurotoxicology*. Spencer, P.S. e Schaumburg, H.H. orgs., Williams and Wilkins Co.,. 36 pp. 726-742.
18. Bancroft, J.D. e Steven A. (1990). Theory and Praticce of Histological Techniques. Chapter 17, *Neuropathological Techniques*. Lowe, James and Cox, Gordon orgs. Churchill Livingstone.

Tabela I:

Número mínimo de animais necessários, em cada grupo, para se realizar o ensaio de neurotoxicidade de forma independente ou em conjunto com outros estudos

	MODO DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO DE TOXICIDADE			
	Estudo independente	Em combinação com o estudo de 28 dias	Em combinação com o estudo de 90 dias	Em combinação com o estudo de toxicidade crónica
Número total de animais por grupo	10 machos e 10 fêmeas	10 machos e 10 fêmeas	15 machos e 15 fêmeas	25 machos e 25 fêmeas
Número de animais escolhidos para ensaios funcionais, incluindo observações clínicas pormenorizadas	10 machos e 10 fêmeas	10 machos e 10 fêmeas	10 machos e 10 fêmeas	10 machos e 10 fêmeas
Número de animais escolhidos para perfusão <i>in situ</i> e neuro-histopatologia	5 machos e 5 fêmeas	5 machos e 5 fêmeas	5 machos e 5 fêmeas	5 machos e 5 fêmeas
Número de animais escolhidos para observações de toxicidade crónica, subcrónica ou relativa à dose, análises clínicas (hemograma, química clínica), histopatologia, etc., tal como descrito nas respectivas <i>Orientações</i>		5 machos e 5 fêmeas	10 machos [†] e 10 fêmeas [†]	20 machos [†] e 20 fêmeas [†]
Observações complementares, se apropriado	5 machos e 5 fêmeas			

[†] Inclui cinco animais escolhidos para ensaios funcionais e observações clínicas pormenorizadas como parte integrante do estudo de neurotoxicidade.

Tabela 2 :
Frequência das observações clínicas e dos ensaios funcionais

Tipo de observações	Duração do estudo			
	Aguda	28 dias	90 dias	Crónica
Em todos os animais	diária	diária	diária	diária
Estado geral de saúde	duas vezes ao dia	duas vezes ao dia	duas vezes ao dia	duas vezes ao dia
Mortalidade/morbilidade	duas vezes ao dia	duas vezes ao dia	duas vezes ao dia	duas vezes ao dia
Observações clínicas pormenorizadas	<ul style="list-style-type: none"> - antes do início do estudo - após 8 horas da administração da dose, no momento em que se espera uma resposta máxima - nos dias 7 e 14 após a administração da dose 	<ul style="list-style-type: none"> - antes do início do estudo - uma vez por semana daí em diante 	<ul style="list-style-type: none"> - antes do início do estudo - uma vez, durante a primeira ou segunda semana, após o início do ensaio - uma vez por mês daí em diante 	<ul style="list-style-type: none"> - antes do início do estudo - uma vez decorrido um mês após o início do ensaio - de três em três meses daí em diante
Ensaio funcionais	<ul style="list-style-type: none"> - antes do início do estudo - após 8 horas da administração da dose, no momento em que se espera uma resposta máxima - nos dias 7 e 14 após a administração da dose 	<ul style="list-style-type: none"> - antes do início do estudo - durante a quarta semana de tratamento e tão próximo quando possível do final do período de ensaio 	<ul style="list-style-type: none"> - antes do início do estudo - uma vez, durante a primeira ou segunda semana, após o início do ensaio - uma vez por mês daí em diante 	<ul style="list-style-type: none"> - antes do início do estudo - uma vez decorrido um mês após o início do ensaio - de três em três meses daí em diante
Nos animais escolhidos para as observações funcionais				

ANEXO 2I

C.21. MICRORGANISMOS DO SOLO: ENSAIO DE TRANSFORMAÇÃO DE AZOTO

1. MÉTODO

O presente método de ensaio baseia-se na publicação OCDE TG 216 (1999).

1.1 INTRODUÇÃO

O presente método de ensaio descreve um método laboratorial concebido para a investigação dos efeitos, a longo prazo, resultantes de uma única exposição a produtos químicos, na capacidade de transformação do azoto pelos microrganismos do solo. O ensaio baseia-se, fundamentalmente, nas recomendações da Organização Europeia e Mediterrânica para a Protecção das Plantas (1), embora tenham sido igualmente consideradas outras linhas de orientação, nomeadamente as fornecidas pelas seguintes organizações: Biologische Bundesanstalt da Alemanha (2); Agência de Protecção do Ambiente dos EUA (3); SETAC (4) e Organização Internacional de Normalização (ISO) (5). As orientações respeitantes ao número e tipo de solos a utilizar neste ensaio são as acordadas na reunião de trabalho da OCDE sobre Selecção de Solos/Sedimentos que decorreu em Belgirate, Itália, em 1995 (6). As recomendações respeitantes à recolha, manuseamento e armazenamento de amostras de solos baseiam-se nas normas ISO 10381-6 (7) e nas recomendações da reunião de Belgirate. A determinação e avaliação das características de toxicidade de determinadas substâncias de ensaio poderão requerer a determinação dos seus efeitos sobre a actividade microbiana dos solos, por exemplo, quando se pretendem conhecer os potenciais efeitos secundários de produtos utilizados na protecção de culturas agrícolas sobre a microflora do solo ou quando se prevê a exposição dos microrganismos do solo a outro tipo de substâncias químicas. O ensaio de transformação de azoto aplica-se na determinação dos efeitos destes produtos sobre a microflora do solo. No ensaio de produtos químicos agrícolas (por exemplo, produtos de protecção de culturas, fertilizantes, químicos florestais) deverão realizar-se os ensaios de transformação de azoto e de transformação de carbono. Nos ensaios de produtos químicos não-agrícolas, considera-se suficiente a realização do ensaio de transformação de azoto, ressalvando-se os casos em que os valores de CE_{50} obtidos no ensaio de transformação de azoto se encontrem dentro dos valores correspondentes aos inibidores de nitrificação comerciais (por exemplo, nitrapirina), casos em que deve ser efectuado um ensaio de transformação de carbono no sentido de se obter informação adicional.

Os solos são misturas complexas e heterogéneas de elementos vivos e não-vivos. Os microrganismos desempenham um papel importante na decomposição e transformação da matéria orgânica em solos férteis através de processos complexos em que diversas espécies contribuem de forma distinta para cada um dos factores que determinam a fertilidade do solo. Por este motivo, qualquer interferência a longo prazo nos processos bioquímicos envolvidos constitui uma potencial interferência nos ciclos nutricionais, podendo vir a afectar a fertilidade do solo. A transformação de carbono e de azoto ocorre em todos os solos férteis e, ainda que as comunidades de microrganismos responsáveis por estes processos divirjam de solo para solo, as vias e processos de transformação são essencialmente os mesmos.

O Método de Ensaio aqui descrito foi desenvolvido com o objectivo de determinar os efeitos adversos a longo prazo de uma substância no processo de transformação de azoto em solos aeróbios de superfície. Este método de ensaio permite ainda estimar os efeitos dos produtos testados sobre a transformação de carbono pela microflora dos solos. Uma vez que a formação de nitratos ocorre subsequentemente à quebra das ligações azoto-carbono, a observação de taxas idênticas de produção de nitratos em solos tratados e de referência indica que é muito elevada a probabilidade de as principais etapas de degradação do carbono se encontrarem intactas e funcionais. O substrato escolhido para o ensaio (farinha de luzerna) possui uma relação carbono/azoto adequada (geralmente entre 12/1 e 16/1). Por este motivo, a privação de carbono é reduzida durante o ensaio e, no caso de as comunidades de microrganismos serem afectadas por um produto químico, será possível a sua recuperação num período de 100 dias.

Os ensaios que serviram de base ao presente Método de Ensaio foram inicialmente desenvolvidos para substâncias relativamente às quais é possível estimar a quantidade de substância que atinge o solo. É o caso, por exemplo, dos produtos utilizados para a protecção de culturas agrícolas, uma vez que é conhecida a sua taxa de aplicação nos campos. No caso de produtos químicos agrícolas, considera-se suficiente o ensaio de duas doses relevantes, relativamente à taxa de aplicação estimada ou prevista. Os produtos químicos agrícolas podem ser testados como ingredientes activos (i.a.) ou como formulações. A aplicação deste ensaio não se limita, no entanto, a produtos químicos agrícolas. Fazendo variar simultaneamente a quantidade de substância de ensaio aplicada no solo e o método de avaliação dos dados, o ensaio poderá ser igualmente utilizado em situações em que não é conhecida a quantidade de produto químico que atinge o solo. Deste modo, para produtos químicos não-agrícolas, deverão determinar-se os efeitos de uma série de concentrações sobre a transformação de azoto e utilizar-se os dados obtidos nesses ensaios para construir uma curva de dose-resposta, a partir da qual se calculam os valores de CE_x , em que x corresponde à percentagem de efeito.

1.2 DEFINIÇÕES

Transformação de azoto: é a degradação total por microrganismos de matéria orgânica contendo azoto, através do processo de amonificação e nitrificação, até ao respectivo nitrato inorgânico final.

CE_x (Concentração Efectiva): é a concentração da substância de ensaio no solo que resulta numa percentagem *x* de inibição da transformação de azoto em nitrato.

CE₅₀ (Concentração Média Efectiva): é a concentração da substância de ensaio no solo que resulta em 50% de inibição da transformação de azoto em nitrato.

1.3 SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Nenhuma.

1.4 PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

Depois de peneirado, adiciona-se ao solo uma farinha de cereal, após o que se reserva uma parte que irá ser utilizada como controlo e se trata o restante com a substância de ensaio. No ensaio de produtos químicos agrícolas recomenda-se o teste de um mínimo de duas concentrações, que deverão ser escolhidas tendo em conta a maior concentração de substância que se prevê que venha a ser aplicada no campo. Após 0, 7, 14 e 28 dias de incubação, procede-se à extracção de amostras dos solos tratados e de controlo com um solvente adequado e determinam-se as quantidades de nitratos nos extractos. A taxa de formação de nitratos nas amostras tratadas é comparada com a taxa de formação de nitratos nas amostras de controlo e calcula-se a percentagem de desvio das amostras tratadas. Todos os ensaios têm uma duração mínima de 28 dias. Se ao 28^º dia as diferenças entre as amostras tratadas e as amostras não tratadas forem iguais ou superiores a 25%, deverão continuar a efectuar-se medições até ao limite de 100 dias. Nos ensaios de produtos químicos não-agrícolas, adiciona-se uma série de concentrações da substância de ensaio a amostras de solo, medindo-se as quantidades de nitratos formadas nas amostras tratadas e nas amostras de controlo após 28 dias de incubação. Os resultados dos ensaios com múltiplas concentrações são analisados através de um modelo de regressão, com base no qual se calculam os valores de CE_x (isto é: CE₅₀, CE₂₅ ou CE₁₀). Ver definições.

1.5 VALIDADE DO ENSAIO

As análises dos resultados dos ensaios com produtos químicos agrícolas baseiam-se em diferenças relativamente pequenas (isto é, com um valor médio de $\pm 25\%$) entre as concentrações de nitrato nas amostras de solo tratadas e nas amostras de controlo. Por este motivo, e uma vez que grandes variações entre as amostras de controlo podem conduzir a resultados falsos, a variação entre repetições das amostras de controlo deve ser inferior a $\pm 15\%$.

1.6 DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.6.1 Equipamento

Os recipientes utilizados durante o ensaio devem ser de materiais quimicamente inertes e ter uma capacidade adequada ao método usado na incubação dos solos, isto é, a granel ou numa série de amostras de solo individualizadas (ver secção 1.7.1.2). Devem tomar-se precauções no sentido de minimizar as perdas de água e permitir trocas gasosas durante o ensaio (por exemplo, os recipientes de ensaio podem ser cobertos com folhas de polietileno perfuradas). Para o ensaio de substâncias voláteis, devem ser usados recipientes seláveis e estanques com dimensões que permitam que aproximadamente um quarto do seu volume seja ocupado pela amostra de solo.

Utiliza-se, para além do equipamento corrente de laboratório, o seguinte equipamento:

- mecanismo de agitação: agitador mecânico ou equipamento equivalente;
- mecanismo de centrifugação (3000 g) ou de filtração (uso de filtro que não contenha nitratos);
- instrumento de sensibilidade e reprodutibilidade adequadas para análise de nitratos.

1.6.2 **Seleccção e número de solos**

No presente ensaio utiliza-se um único solo, cujas características recomendadas são as seguintes:

- teor de areia: não inferior a 50% e não superior a 75%;
- pH: 5,5 a 7,5;
- teor de carbono orgânico: 0,5 a 1,5%;
- a biomassa microbiana deve ser medida (8)(9) e o seu teor de carbono deve corresponder, no mínimo, a 1% do total de carbono orgânico do solo.

Na maioria dos casos, um solo com estas características representa a situação menos favorável, uma vez que nestas condições a adsorção da substância química de ensaio é mínima e a sua disponibilidade para a microflora é máxima. Por este motivo, a realização de ensaios com outros solos é geralmente desnecessária. Contudo, em determinadas circunstâncias, por exemplo, quando se prevê que a substância de ensaio venha a ser principalmente utilizada em solos específicos, tais como solos florestais ácidos, ou para produtos químicos com carga electrostática, poderá ser necessário utilizar um solo adicional.

1.6.3 **Recolha e armazenamento das amostras de solo**

1.6.3.1 *Recolha*

Deve existir, e estar disponível, informação pormenorizada sobre a história do local donde foram recolhidas as amostras de solo para o ensaio. A informação necessária inclui a localização exacta, o coberto vegetal, as datas dos tratamentos com produtos utilizados para a protecção de culturas agrícolas, os tratamentos com fertilizantes orgânicos e inorgânicos, as aplicações de materiais biológicos e as de contaminações acidentais. Deverá ser escolhido, para a recolha de solo, um local que permita o seu uso a longo prazo. Consideram-se locais adequados: as pastagens permanentes, os campos com culturas anuais de cereais (à excepção de milho) ou os campos densamente semeados para produção de adubo natural. No local escolhido para a amostragem não devem ter sido aplicados produtos de protecção de culturas agrícolas, pelo menos, durante o último ano, nem nenhum fertilizante orgânico, pelo menos, nos últimos seis meses. O uso de fertilizantes minerais apenas poderá ser aceite quando em concordância com as necessidades das culturas agrícolas e, nesse caso, a recolha de amostras de solo não deverá ser efectuada antes de passados três meses após a aplicação do fertilizante. Deve ser evitado o uso de solos tratados com fertilizantes que tenham efeitos biocidas conhecidos (por exemplo, cianamida de cálcio).

Deve ser evitada a recolha de amostras durante, ou imediatamente após, períodos longos (superiores a 30 dias) de seca ou de excessos de água. Em solos lavrados, as amostras devem ser recolhidas a uma profundidade de 0 a 20 cm. Nas pastagens ou outros solos que não são lavrados durante períodos longos (pelo menos, uma época de cultivo), a profundidade máxima de amostragem pode ser ligeiramente superior a 20 cm (por exemplo, até 25 cm).

As amostras de solo devem ser transportadas em recipientes adequados, em condições de temperatura que garantam que as propriedades iniciais do solo não são alteradas de forma significativa.

1.6.3.2 *Armazenamento*

Sempre que possível, é de preferir a utilização de amostras de solos recolhidas na altura. Nos casos em que o armazenamento em laboratório não possa ser evitado, os solos devem ser armazenados no escuro, a uma temperatura de $4\pm 2^\circ\text{C}$ e por um período máximo de três meses. Durante o armazenamento dos solos, devem ser asseguradas condições aeróbias. Se os solos forem recolhidos em zonas onde permanecem gelados por períodos iguais ou superiores a três meses por ano, poderá ser considerada a hipótese do seu armazenamento durante seis meses a uma temperatura entre 18°C negativos e 22°C negativos. A biomassa microbiana de solos armazenados é medida antes de cada experiência e o teor de carbono na biomassa não deverá ser inferior a 1% do teor total de carbono orgânico no solo (ver secção 1.6.2).

1.6.4 **Manuseamento e preparação do solo para o ensaio**

1.6.4.1 *Pré-incubação*

Se o solo esteve armazenado (ver secção 1.6.3.2), recomenda-se um período de pré-incubação de 2 a 28 dias. A temperatura e a humidade do solo durante a pré-incubação e o ensaio devem ser idênticas às utilizadas durante o ensaio (ver secções 1.6.4.2 e 1.7.1.3).

1.6.4.2 *Características físico-químicas*

Os objectos de grandes dimensões (por exemplo, pedras, pedaços de plantas, etc.) são removidos manualmente do solo e a amostra é peneirada húmida, evitando dessecação excessiva, de forma a reduzir as partículas a uma dimensão máxima de 2 mm. O teor de humidade da amostra de solo deve ser ajustado com água destilada ou desionizada para um valor entre 40% e 60% da sua capacidade máxima de retenção de água.

1.6.4.3 *Adição de substrato orgânico*

Deverá ser adicionado ao solo um substrato orgânico adequado - por exemplo, farinha de luzerna-erva-relva (componente principal: *Medicago sativa*) com uma relação C/N entre 12/1 e 16/1. A relação luzerna-solo recomendada é de 5 g de luzerna por quilograma de solo (peso seco).

1.6.5 **Preparação da substância de ensaio para aplicação no solo**

A aplicação da substância de ensaio no solo envolve, geralmente, a utilização de um excipiente (matriz de transporte), que pode ser água (para substâncias hidrossolúveis) ou um sólido inerte, como, por exemplo, areia fina de quartzo (tamanho de partículas: 0,1 a 0,5 mm). A utilização de outros excipientes líquidos (por exemplo, solventes orgânicos, como acetona, clorofórmio) deve ser evitada devido à possibilidade de virem a afectar a microflora. Nos casos em que se use areia como excipiente, esta pode ser coberta com a substância de ensaio em solução ou suspensão num solvente adequado. Nesses casos, o solvente deve ser removido por evaporação antes da mistura com o solo. De modo a otimizar a distribuição da substância de ensaio no solo, recomenda-se uma relação de 10 g de areia por quilograma de solo (peso seco). As amostras de controlo são tratadas com uma quantidade equivalente de água ou de areia de quartzo (sem adição de substância de ensaio).

Nos ensaios de produtos químicos voláteis importa, tanto quanto possível, evitar perdas durante o tratamento e procurar assegurar a homogeneidade da distribuição dos produtos no solo (por exemplo, as substâncias de ensaio devem ser injectadas em diferentes locais do solo).

1.6.6 **Concentrações de ensaio**

Nos ensaios de produtos químicos agrícolas devem ser usadas pelo menos duas concentrações. A concentração inferior deve reflectir, no mínimo, a quantidade máxima que se espera que, na prática, venha a atingir o solo, enquanto a concentração mais elevada deve ser um múltiplo da concentração inferior. As concentrações da substância de ensaio adicionada ao solo são calculadas assumindo uma incorporação uniforme até uma profundidade de 5 cm e uma densidade aparente do solo de 1,5. Para produtos químicos agrícolas que são aplicados directamente no solo ou para compostos químicos cuja quantidade que atinge o solo pode ser prevista, as concentrações recomendadas são a máxima concentração prevista no ambiente ("predicted environmental concentration", PEC) e cinco vezes o valor dessa concentração. Nos casos em que se prevê que as substâncias sejam aplicadas diversas vezes no solo durante uma mesma estação, devem ser efectuados ensaios a concentrações correspondentes à multiplicação da PEC pelo número máximo de aplicações previsto. Contudo, a concentração máxima de ensaio não deve exceder dez vezes a taxa máxima para uma única aplicação. Nos ensaios de produtos químicos não-agrícolas deve ser usada uma série geométrica de, pelo menos, cinco concentrações. As concentrações usadas devem cobrir a gama necessária para os cálculos dos valores de CE_x .

1.7 PROCEDIMENTO DO ENSAIO

1.7.1 Condições de Exposição

1.7.1.1 *Tratamento e Controlo*

Nos ensaios de produtos químicos agrícolas, o solo é dividido em três porções de igual peso. Duas porções são misturadas com o excipiente contendo o produto e a terceira é misturada apenas com o excipiente (amostra de controlo). Recomenda-se um mínimo de três repetições para ambos os solos, tratado e de controlo. Nos ensaios de produtos químicos não-agrícolas, o solo é dividido em seis porções de igual peso. Cinco das amostras são misturadas com o excipiente contendo o produto e a sexta é misturada com o excipiente não activado. Recomendam-se três repetições para ambos os solos, tratado e de controlo. Devem ser tomadas precauções de modo a assegurar uma distribuição homogénea da substância de ensaio nas amostras de solo tratadas. Durante a mistura deve evitar-se a aglomeração ou compactação do solo.

1.7.1.2 *Incubação das amostras de solo*

A incubação das amostras de solo pode ser realizada de duas formas: usando cada um dos solos, tratado e de controlo, como amostras únicas ou dividindo-os numa série de subamostras individualizadas e de igual peso. Contudo, no caso de substâncias voláteis, os ensaios devem ser realizados obrigatoriamente na forma de séries de subamostras individuais. Quando os solos são incubados como amostras únicas, preparam-se grandes quantidades de cada solo, tratado e de controlo, e vão-se retirando subamostras para análise, conforme necessário, ao longo do ensaio. A quantidade de solo inicialmente preparada para cada tratamento e para cada controlo depende do tamanho das subamostras a retirar durante o ensaio, do número de repetições a realizar e do número máximo de tempos de amostragem previsto. Os solos incubados como amostras únicas devem ser misturados vigorosamente antes de cada subamostragem. Quando os solos são incubados como uma série de amostras individualizadas, cada solo tratado e de controlo é inicialmente dividido no número de subamostras pretendido e estas utilizadas conforme necessário. Nas experiências em que se prevêem mais de dois tempos de amostragem, devem preparar-se subamostras em número suficiente para todas as repetições de todas as amostragens. Pelo menos, três repetições do solo de ensaio devem ser incubadas em condições aeróbias (ver secção 1.7.1.1). Os recipientes utilizados durante todos os testes devem possuir um volume livre suficiente para impedir o desenvolvimento de condições anaeróbias. Nos casos em que as substâncias de ensaio são voláteis, o ensaio só deve ser realizado com séries de subamostras individualizadas.

1.7.1.3 *Condições e duração dos ensaios*

O ensaio é realizado em câmara escura à temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Durante o ensaio, o teor de humidade das amostras de solo deve ser mantido entre 40% e 60% da capacidade máxima de retenção de água do solo (ver secção 1.6.4.2), com uma variação máxima de $\pm 5\%$. Sempre que necessário, pode adicionar-se água destilada ou desionizada.

A duração mínima do ensaio é de 28 dias. Nos ensaios de produtos químicos agrícolas, comparam-se as taxas de formação de nitratos nas amostras tratadas e de controlo. Se estes valores diferirem em mais de 25% após o 28.º dia, o ensaio continua até que essa diferença atinja um valor igual ou inferior a 25% ou até ao 100.º dia. Para compostos químicos não-agrícolas, o ensaio tem a duração de 28 dias. No 28.º dia, determinam-se as quantidades de nitratos nas amostras de solo tratadas e de controlo e calculam-se os valores de CE_x .

1.7.2 Amostragem e análise dos solos

1.7.2.1 *Calendário de amostragem dos solos*

Nos ensaios de produtos químicos agrícolas, analisa-se a quantidade de nitratos nas amostras de solo nos dias 0, 7, 14 e 28. Caso seja necessário prolongar o ensaio, após o 28º dia devem efectuar-se medições com intervalos de 14 dias.

Nos ensaios de produtos químicos não-agrícolas, testa-se um mínimo de cinco concentrações de ensaio e a análise de nitratos nas amostras de solo efectua-se no início (dia 0) e no fim do período de exposição (28.^o dia). Nos casos em que tal se revele necessário, podem realizar-se medições intermédias - por exemplo, ao 7.^o dia. Os dados obtidos ao 28.^o dia são utilizados para determinar o valor de CE_x para o produto químico. Se desejado, os dados obtidos para a amostra de controlo no dia 0 podem ser utilizados para indicar a quantidade inicial de nitratos no solo.

1.7.2.2 *Análise das amostras de solo*

Para cada repetição de cada amostra de solo, tratada e de controlo, determina-se a quantidade de nitratos formada em cada tempo de amostragem. Os nitratos são removidos do solo por agitação das amostras num solvente de extracção adequado - por exemplo, uma solução 0,1 M de cloreto de potássio. Recomenda-se uma razão de 5 ml de solução de KCl por equivalente de grama de solo (peso seco). Para otimizar a extracção, a mistura da amostra de solo com a solução de extracção não deve ocupar mais de metade do volume do recipiente de extracção. As misturas são agitadas a 150 rpm durante 60 minutos e em seguida centrifugadas ou filtradas, sendo a fase líquida resultante analisada para detecção de nitratos. Os extractos líquidos livres de partículas sólidas podem ser armazenados antes de analisados, devendo ser mantidos a $20 \pm 5^\circ\text{C}$ negativos até um máximo de seis meses.

2 **DADOS**

2.1 **TRATAMENTO DE RESULTADOS**

Nos ensaios efectuados com produtos químicos agrícolas, regista-se a quantidade de nitratos formada em cada repetição de cada amostra de solo e os valores médios do conjunto de repetições devem ser apresentados numa tabela. As taxas de transformação de azoto devem ser analisadas usando métodos estatísticos usuais e adequados (por exemplo, Teste-F, nível de significância de 5%). As quantidades de nitratos formados expressam-se em mg nitrato/kg solo (peso seco)/dia. A taxa de formação de nitratos em cada tratamento é comparada com a da respectiva amostra de controlo, calculando-se o desvio, em percentagem, da amostra de teste relativamente ao controlo.

Nos ensaios efectuados com produtos químicos não-agrícolas, determina-se a quantidade de nitratos formados em cada repetição e traça-se uma curva de dose-resposta para estimar os valores de CE_x . As quantidades de nitratos - isto é, mg nitrato/kg solo (peso seco) - obtidas para as amostras tratadas, após 28 dias são comparadas com as quantidades obtidas para as amostras de controlo. A partir destes resultados, calcula-se a percentagem de inibição para cada concentração de ensaio. As percentagens obtidas são representadas num gráfico em função da concentração e, usando procedimentos estatísticos, determinam-se os valores de CE_x . Os limites de confiança ($p = 0,95$) para os valores de CE_x calculados são igualmente determinados usando métodos-padrão (10)(11)(12).

No caso de conterem quantidades elevadas de azoto, as substâncias de ensaio podem contribuir para as quantidades de nitratos formadas durante o ensaio. Por este motivo, em ensaios com elevadas concentrações dessas substâncias (por exemplo, compostos químicos que se prevê que venham a ser usados em aplicações repetidas), devem ser incluídas amostras de controlo adequadas (isto é, uma mistura de solo com a substância de ensaio, sem a farinha vegetal). Os dados dessas amostras de controlo devem ser tidos em conta nos cálculos de CE_x .

2.2 **INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS**

Quando, na avaliação dos resultados dos ensaios com produtos químicos agrícolas, a diferença entre as taxas de formação de nitratos entre o tratamento com a menor concentração (isto é, correspondente à máxima concentração prevista para a situação real) e a respectiva amostra de controlo for igual ou inferior a 25% em qualquer amostragem efectuada após o 28.^o dia, o produto pode ser considerado como não tendo influência a longo prazo na transformação de azoto dos solos. Para ensaios envolvendo produtos químicos não-agrícolas, os valores CE_{50} , CE_{25} ou CE_{10} são utilizados como indicadores.

3

RELATÓRIO

O relatório do ensaio deve incluir a seguinte informação:

Identificação completa do solo utilizado, incluindo:

- referência geográfica do local (latitude, longitude);
- informação sobre a caracterização histórica do local (isto é, coberto vegetal, tratamentos com produtos de protecção das culturas agrícolas, tratamentos com fertilizantes, contaminações acidentais, etc.);
- uso do solo (por exemplo, solo agrícola, floresta, etc.);
- profundidade de amostragem (cm);
- teor de areia/lama/argila (% peso seco);
- pH (em água);
- teor de carbono orgânico (% peso seco);
- teor de azoto (% peso seco);
- concentração inicial de nitratos (mg nitratos/kg peso seco);
- capacidade de permuta catiónica (mmol/kg);
- biomassa microbiana, em termos de percentagem de carbono orgânico total;
- referência dos métodos usados na determinação de cada parâmetro;
- toda a informação relacionada com a recolha e armazenamento das amostras de solo;
- pormenores sobre a pré-incubação do solo, quando existir.

Substância de ensaio:

- natureza física e, quando relevante, propriedades físico-químicas;
- dados de identificação química, sempre que relevantes, incluindo fórmula estrutural, pureza (teor do componente activo, em percentagem, no caso dos produtos de protecção das culturas agrícolas), teor de azoto.

Substrato:

- origem do substrato;
- composição (isto é, farinha de luzerna, farinha de luzerna-erva-relva);
- teor de carbono e azoto (% peso seco);
- diâmetro dos peneiros (mm).

Condições de ensaio:

- pormenores sobre a adição de substrato orgânico ao solo;
- número de concentrações do produto químico de ensaio que foram testadas e, quando adequado, justificação das concentrações de ensaio escolhidas;
- pormenores sobre a aplicação da substância de ensaio no solo;
- temperatura de incubação;
- teor de humidade do solo no início e durante o ensaio;
- método usado na incubação do solo (isto é, como amostra única ou como séries de subamostras individualizadas);
- número de repetições;
- tempos de amostragem;
- método usado para extracção de nitratos do solo;

Resultados:

- procedimento analítico e equipamento usado na análise de nitratos;
- tabelas de resultados, incluindo valores individuais e valores médios para as medições de nitratos;
- variação entre repetições nas amostras tratadas e nas amostras de controlo;
- explicação das correcções efectuadas nos cálculos, quando relevantes;
- a variação percentual da taxa de formação de nitratos em cada ponto de amostragem ou, quando adequado, o valor de CE_{50} com um limite de confiança de 95%, outros valores de CE_x (isto é, CE_{25} ou CE_{10}), com os respectivos intervalos de confiança, e a representação gráfica da curva de dose-resposta;
- tratamento estatístico dos resultados;
- toda a informação e observações úteis para a interpretação dos resultados.

4

REFERÊNCIAS

- (1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Capítulo 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1-16, 1994.
- (2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2ª edição, 1990).
- (3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. 28 de Setembro de 1987.
- (4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M. R. Lynch, Pub. SETAC-Europa, Bruxelas.
- (5) ISO/DIS 14238 (1995). Soil Quality - Determination of Nitrogen Mineralisation and Nitrification in Soils and the Influence of Chemicals on these Processes. Comité Técnico ISO/TC 190/SC 4: *Soil Quality - Biological Methods*.
- (6) OCDE (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgrate, Itália, 18-20 de Janeiro de 1995.
- (7) ISO 10381-6 (1993). Soil quality - Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
- (8) ISO 14240-1 (1997). Soil quality - Determination of soil microbial biomass - Part 1: Substrate-induced respiration method.
- (9) ISO 14240-2 (1997). Soil quality - Determination of soil microbial biomass - Part 2: Fumigation-extraction method.
- (10) Litchfield, J. T. e Wilcoxon F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.
- (11) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3ª edição, Cambridge, Londres e Nova Iorque.
- (12) Finney, D. J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, Reino Unido.

C.22. MICRORGANISMOS DO SOLO: ENSAIO DE TRANSFORMAÇÃO DE CARBONO

MÉTODO

O presente método de ensaio baseia-se na publicação OCDE TG 217 (1999).

1.1 INTRODUÇÃO

O presente método de ensaio descreve um método laboratorial concebido para a investigação dos potenciais efeitos, a longo prazo, resultantes de uma única exposição a produtos de protecção de culturas agrícolas, e possivelmente outras substâncias químicas, na capacidade de transformação do carbono pelos microrganismos do solo. O ensaio baseia-se, fundamentalmente, nas recomendações da Organização Europeia e Mediterrânica para a Protecção das Plantas (1), embora tenham sido igualmente consideradas outras linhas de orientação, nomeadamente as fornecidas pelas seguintes organizações: Biologische Bundesanstalt da Alemanha (2); Agência de Protecção do Ambiente dos EUA (3) e SETAC (4). As orientações respeitantes ao número e tipo de solos a utilizar neste ensaio são as acordadas na reunião de trabalho da OCDE sobre Selecção de Solos/Sedimentos que decorreu em Belgirate, Itália, em 1995 (5). As recomendações respeitantes à recolha, manuseamento e armazenamento de amostras de solos baseiam-se nas normas ISO 10381-6 (6) e nas recomendações da reunião de Belgirate.

A determinação e avaliação das características de toxicidade de determinadas substâncias de ensaio poderão requerer a determinação dos seus efeitos sobre a actividade microbiana dos solos, por exemplo, quando se pretende conhecer os potenciais efeitos secundários de produtos utilizados na protecção de culturas agrícolas sobre a microflora do solo ou quando se prevê a exposição dos microrganismos do solo a outro tipo de substâncias químicas. O ensaio de transformação de carbono aplica-se na determinação dos efeitos destes produtos sobre a microflora do solo. No ensaio de produtos químicos agrícolas (por exemplo, produtos de protecção de culturas, fertilizantes, químicos florestais) devem realizar-se os ensaios de transformação de carbono e de transformação de azoto. Nos ensaios de produtos químicos não-agrícolas, considera-se suficiente a realização do ensaio de transformação de azoto, ressaltando-se os casos em que os valores de CE_{50} obtidos no ensaio de transformação de azoto se encontrem dentro dos valores correspondentes aos inibidores de nitrificação comerciais (por exemplo, nitrapirina), casos em que deve ser efectuado um ensaio de transformação de carbono no sentido de se obter informação adicional.

Os solos são misturas complexas e heterogéneas de elementos vivos e não-vivos. Os microrganismos desempenham um papel importante na decomposição e transformação da matéria orgânica em solos férteis através de processos complexos em que diversas espécies contribuem de forma distinta para cada um dos factores que determinam a fertilidade do solo. Por este motivo, qualquer interferência a longo prazo nos processos bioquímicos envolvidos constitui uma potencial interferência nos ciclos nutricionais, podendo vir a afectar a fertilidade do solo. A transformação de carbono e de azoto ocorre em todos os solos férteis e, ainda que as comunidades de microrganismos responsáveis por estes processos divirjam de solo para solo, as vias e processos de transformação são essencialmente os mesmos.

O Método de Ensaio aqui descrito foi desenvolvido com o objectivo de determinar os efeitos adversos a longo prazo, de uma substância, no processo de transformação de carbono em solos aeróbios de superfície. O ensaio é sensível a alterações na dimensão e actividade das comunidades microbianas responsáveis pela transformação do carbono, na medida em que sujeita essas comunidades simultaneamente a condições de stress químico e de privação de carbono. Utiliza-se um solo arenoso pobre em matéria orgânica. O solo é tratado com a substância de ensaio e incubado em condições tais que permitem um rápido metabolismo microbiano, e sob as quais as fontes de carbono acessíveis no solo se esgotam rapidamente. O processo provoca o empobrecimento de carbono, causando simultaneamente a morte das células microbianas e a indução do estado de letargia ou esporulação. Se o teste decorrer durante um período superior a 28 dias, o somatório destas reacções pode ser medido em amostras de controlo (solo não tratado) como uma perda progressiva da biomassa microbiana metabolicamente activa (7). Se a biomassa de um solo em stress por privação de carbono, nas condições de ensaio, é afectada pela presença de um produto químico, a recuperação do solo poderá não se verificar até ao mesmo nível que o solo de controlo. Por este motivo, as perturbações causadas pela substância de ensaio, em qualquer momento do ensaio, mantêm-se geralmente até ao final do mesmo.

Os ensaios que serviram de base ao presente Método de Ensaio foram inicialmente desenvolvidos para substâncias relativamente às quais é possível estimar a quantidade de substância que atinge o solo. É o caso, por exemplo, dos produtos utilizados para a protecção de culturas agrícolas, uma vez que é conhecida a sua taxa de aplicação nos campos. No caso de produtos químicos agrícolas, considera-se suficiente o ensaio de duas doses relevantes, relativamente à taxa de aplicação estimada ou prevista. Os produtos químicos agrícolas podem ser testados como ingredientes activos (i.a.) ou como formulações. A aplicação deste ensaio não se limita, no entanto, a produtos químicos agrícolas. Fazendo variar simultaneamente a quantidade de substância de ensaio aplicada no solo e o método de avaliação dos dados, o ensaio poderá ser igualmente utilizado em situações em que não é conhecida a quantidade de produto químico que atinge o solo. Deste modo, para produtos químicos não-agrícolas, deverão determinar-se os efeitos de uma série de concentrações sobre a transformação de carbono e utilizar-se os dados obtidos nesses ensaios para construir uma curva de dose-resposta, a partir da qual se calculam os valores de CE_x , em que x corresponde à percentagem de efeito.

1.2 DEFINIÇÕES

Transformação de carbono: é a degradação da matéria orgânica por microrganismos até formar um produto final inorgânico, o dióxido de carbono.

CE_x (Concentração Efectiva): é a concentração da substância de ensaio no solo que resulta numa percentagem x de inibição da transformação de carbono em dióxido de carbono.

CE_{50} (Concentração Média Efectiva): é a concentração da substância de ensaio no solo que resulta em 50% de inibição da transformação de carbono em dióxido de carbono.

1.3 SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Nenhuma.

1.4 PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

O solo peneirado é tratado com a substância de ensaio ou deixado por tratar (controlo). No ensaio de produtos químicos agrícolas recomenda-se o teste de um mínimo de duas concentrações, que deverão ser escolhidas tendo em conta a maior concentração de substância que se prevê que venha a ser aplicada no campo. Após 0, 7, 14 e 28 dias de incubação, amostras do solo tratadas e de controlo são misturadas com glucose e a taxa de respiração induzida pela glucose é medida durante 12 horas consecutivas. As taxas de respiração são expressas em termos de dióxido de carbono libertado (mg dióxido de carbono/kg solo seco/h) ou de oxigénio consumido (mg oxigénio/kg solo/h). A taxa média de respiração nas amostras tratadas é comparada com a das respectivas amostras de controlo e calcula-se a percentagem de desvio das amostras tratadas relativamente às de controlo. Todos os ensaios têm uma duração mínima de 28 dias. Se ao 28º dia as diferenças entre as amostras tratadas e as amostras não tratadas forem iguais ou superiores a 25%, devem continuar a efectuar-se medições, em intervalos de 14 dias, até ao limite de 100 dias. Nos ensaios de produtos químicos não-agrícolas, adiciona-se uma série de concentrações da substância de ensaio a amostras de solo e medem-se as taxas de respiração induzida por glucose (isto é, a média das quantidades de dióxido de carbono formado ou de oxigénio consumido) após 28 dias. Os resultados dos ensaios com múltiplas concentrações são analisados através de um modelo de regressão, com base no qual se calculam os valores de CE_x (isto é: CE_{50} , CE_{25} ou CE_{10}). Ver definições.

1.5 VALIDADE DO ENSAIO

As análises dos resultados dos ensaios com produtos químicos agrícolas baseiam-se em diferenças relativamente pequenas (isto é, com um valor médio de $\pm 25\%$) entre as quantidades de dióxido de carbono libertado ou de oxigénio consumido nas (ou pelas) amostras de solo tratadas e nas (ou pelas) amostras de controlo. Por este motivo, e uma vez que grandes variações entre as amostras de controlo podem conduzir a resultados falsos, a variação entre repetições das amostras de controlo deve ser inferior a $\pm 15\%$.

1.6 DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.6.1 Equipamento

Os recipientes utilizados durante o ensaio devem ser de materiais quimicamente inertes e ter uma capacidade adequada ao método usado na incubação dos solos, isto é, a granel ou numa série de amostras de solo individualizadas (ver secção 1.7.1.2). Devem tomar-se precauções no sentido de minimizar as perdas de água e permitir trocas gasosas durante o ensaio (por exemplo, os recipientes de ensaio podem ser cobertos com folhas de polietileno perfuradas). Para o ensaio de substâncias voláteis, devem ser usados recipientes seláveis e estanques com dimensões que permitam que aproximadamente um quarto do seu volume seja ocupado pela amostra de solo.

Para a determinação da taxa de respiração induzida pela glucose, são necessários sistemas de incubação e instrumentos para medir a produção de dióxido de carbono ou o consumo de oxigénio. Na literatura encontram-se exemplos destes sistemas e instrumentos (8) (9) (10) (11).

1.6.2 Selecção e número de solos

No presente ensaio utiliza-se um único solo, cujas características recomendadas são as seguintes:

- teor de areia: não inferior a 50% e não superior a 75%;
- pH: 5,5 a 7,5;
- teor de carbono orgânico: 0,5 a 1,5%;
- a biomassa microbiana deve ser medida (12)(13) e o seu teor de carbono deve corresponder, no mínimo, a 1% do carbono orgânico total do solo.

Na maioria dos casos, um solo com estas características representa a situação menos favorável, uma vez que nestas condições a adsorção da substância química de ensaio é mínima e a sua disponibilidade para a microflora é máxima. Por este motivo, a realização de ensaios com outros solos é geralmente desnecessária. Contudo, em determinadas circunstâncias, por exemplo, quando se prevê que a substância de ensaio venha a ser principalmente utilizada em solos específicos, tais como solos florestais ácidos, ou para produtos químicos com carga electrostática, poderá ser necessário utilizar um outro tipo de solo.

1.6.3 Recolha e armazenamento das amostras de solo

1.6.3.1 *Recolha*

Deve existir, e estar disponível, informação pormenorizada sobre a história do local donde foram recolhidas as amostras de solo para o ensaio. A informação necessária inclui a localização exacta, o coberto vegetal, as datas dos tratamentos com produtos utilizados para a protecção de culturas agrícolas, dos tratamentos com fertilizantes orgânicos e inorgânicos, das aplicações de materiais biológicos ou de contaminações acidentais. Deverá ser escolhido, para a recolha de solo, um local que permita o seu uso a longo prazo. Consideram-se locais adequados: as pastagens permanentes, os campos com culturas anuais de cereais (à excepção de milho) ou os campos densamente semeados para produção de adubo verde. No local escolhido para a amostragem não devem ter sido aplicados produtos de protecção de culturas agrícolas, pelo menos, durante o último ano, nem nenhum fertilizante orgânico, pelo menos, nos últimos seis meses. O uso de fertilizantes minerais apenas poderá ser aceite quando em concordância com as necessidades das culturas agrícolas e, nesse caso, a recolha de amostras de solo não deverá ser efectuada antes de passados três meses após a aplicação do fertilizante. Deve ser evitado o uso de solos tratados com fertilizantes que tenham efeitos biocidas conhecidos (por exemplo, cianamida de cálcio).

Deve ser evitada a recolha de amostras durante, ou imediatamente após, períodos longos (superiores a 30 dias) de seca ou de exploração de águas. Em solos lavrados, as amostras devem ser recolhidas a uma profundidade de 0 a 20 cm. Nas pastagens ou outros solos que não são lavrados durante períodos longos (pelo menos, uma época de cultivo), a profundidade máxima de amostragem pode ser ligeiramente superior a 20 cm (por exemplo, até 25 cm). As amostras de solo devem ser transportadas em recipientes adequados e em condições de temperatura que garantam que as propriedades iniciais do solo não são alteradas de forma significativa.

1.6.3.2 *Armazenamento*

Sempre que possível, é preferível a utilização de amostras de solos recolhidas na altura. Nos casos em que o armazenamento em laboratório não possa ser evitado, os solos devem ser armazenados no escuro, a uma temperatura de $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ e por um período máximo de três meses. Durante o armazenamento dos solos, devem ser asseguradas condições aeróbias. Se os solos forem recolhidos em zonas onde permanecem gelados por períodos iguais ou superiores a três meses por ano, poderá ser considerada a hipótese do seu armazenamento durante seis meses a uma temperatura de 18°C negativos. A biomassa microbiana de solos armazenados é medida antes de cada experiência e o teor de carbono na biomassa não deverá ser inferior a 1% do teor total de carbono orgânico no solo (ver secção 1.6.2).

1.6.4 **Manuseamento e preparação do solo para o ensaio**

1.6.4.1 *Pré-incubação*

Se o solo esteve armazenado (ver secção 1.6.3.2), recomenda-se um período de pré-incubação de 2 a 28 dias. A temperatura e a humidade do solo durante a pré-incubação e o ensaio devem ser idênticas às utilizadas durante o ensaio (ver secções 1.6.4.2 e 1.7.1.3).

1.6.4.2 *Características físico-químicas*

Os objectos de grandes dimensões (por exemplo, pedras, pedaços de plantas, etc.) são removidos manualmente do solo e a amostra é peneirada húmida, evitando a dessecação excessiva, de forma a reduzir as partículas a uma dimensão máxima de 2 mm. O teor de humidade da amostra de solo deve ser ajustado com água destilada ou desionizada para um valor entre 40% e 60% da sua capacidade máxima de retenção de água.

1.6.5 **Preparação da substância de ensaio para aplicação no solo**

A aplicação da substância de ensaio no solo envolve, geralmente, a utilização de um excipiente (matriz de transporte), que pode ser água (para substâncias hidrossolúveis) ou um sólido inerte, como, por exemplo, areia fina de quartzo (tamanho de partículas: 0,1 a 0,5 mm). A utilização de outros excipientes líquidos (por exemplo, solventes orgânicos, como acetona, clorofórmio) deve ser evitada devido à possibilidade de virem a afectar a microflora. Nos casos em que se use areia como excipiente, esta pode ser coberta com a substância de ensaio em solução ou suspensão num solvente adequado. Nesses casos, o solvente deve ser removido por evaporação antes da mistura com o solo. De modo a otimizar a distribuição da substância de ensaio no solo, recomenda-se uma relação de 10 g de areia por quilograma de solo (peso seco). As amostras de controlo são tratadas com uma quantidade equivalente de água ou de areia de quartzo (sem adição de substância de ensaio).

Nos ensaios de produtos químicos voláteis importa, tanto quanto possível, evitar perdas durante o tratamento e procurar assegurar a homogeneidade da distribuição dos produtos no solo (por exemplo, as substâncias de ensaio devem ser injectadas em diferentes locais do solo).

1.6.6 **Concentrações de ensaio**

Nos ensaios de produtos utilizados para protecção de culturas agrícolas, ou outros produtos químicos cujas concentrações ambientais possam ser previstas, devem ser usadas, pelo menos, duas concentrações. A concentração inferior deve reflectir, no mínimo, a quantidade máxima que se espera que, na prática, venha a atingir o solo, enquanto a concentração mais elevada deve ser um múltiplo da concentração inferior. As concentrações da substância de ensaio adicionada ao solo são calculadas assumindo uma incorporação uniforme até uma profundidade de 5 cm e uma densidade aparente do solo de 1,5. Para produtos químicos agrícolas que são aplicados directamente no solo ou para compostos químicos cuja quantidade que atinge o solo pode ser prevista, as concentrações recomendadas são a máxima concentração prevista no ambiente ("predicted environmental concentration", PEC) e cinco vezes o valor dessa concentração. Nos casos em que se prevê que as substâncias sejam aplicadas diversas vezes no solo durante uma mesma estação, devem ser efectuados ensaios a concentrações correspondentes à multiplicação da PEC pelo número máximo de aplicações previsto. Contudo, a concentração máxima de ensaio não deve exceder dez vezes a taxa máxima para uma única aplicação.

Nos ensaios de produtos químicos não-agrícolas deve ser usada uma série geométrica de, pelo menos, cinco concentrações. As concentrações usadas devem cobrir a gama necessária para os cálculos dos valores de CE_x .

1.7 PROCEDIMENTO DO ENSAIO

1.7.1 Condições de Exposição

1.7.1.1 *Tratamento e Controlo*

Nos ensaios de produtos químicos agrícolas, o solo é dividido em três porções de igual peso. Duas porções são misturadas com o excipiente contendo o produto e a terceira é misturada apenas com o excipiente (amostra de controlo). Recomenda-se um mínimo de três repetições para ambos os solos, tratado e de controlo. Nos ensaios de produtos químicos não-agrícolas, o solo é dividido em seis porções de igual peso. Cinco das amostras são misturadas com o excipiente contendo o produto e a sexta é misturada com o excipiente não activado. Recomendam-se três repetições para ambos os solos, tratado e de controlo. Devem ser tomadas precauções de modo a assegurar uma distribuição homogénea da substância de ensaio nas amostras de solo tratadas. Durante a mistura deve evitar-se a aglomeração ou compactação do solo.

1.7.1.2 *Incubação das amostras de solo*

A incubação das amostras de solo pode ser realizada de duas formas: usando cada um dos solos, tratado e de controlo, como amostras únicas, ou dividindo-os numa série de subamostras individualizadas e de igual peso. Contudo, no caso de substâncias voláteis, os ensaios devem ser realizados obrigatoriamente na forma de séries de subamostras individuais. Quando os solos são incubados como amostras únicas, preparam-se grandes quantidades de cada solo, tratado e de controlo, e vão-se retirando subamostras para análise, conforme necessário, ao longo do ensaio. A quantidade de solo inicialmente preparada para cada tratamento e para cada controlo depende do tamanho das subamostras a retirar durante o ensaio, do número de repetições a realizar e do número máximo de tempos de amostragem previsto. Os solos incubados como amostras únicas devem ser misturados vigorosamente antes de cada subamostragem. Quando os solos são incubados como uma série de amostras individualizadas, cada solo tratado e de controlo é inicialmente dividido no número de subamostras pretendido e estas utilizadas conforme necessário. Nas experiências em que se prevêem mais de dois tempos de amostragem, devem preparar-se subamostras em número suficiente para todas as repetições de todas as amostragens. Pelo menos, três repetições do solo de ensaio devem ser incubadas em condições aeróbias (ver secção 1.7.1.1). Os recipientes utilizados durante todos os testes devem possuir um volume livre suficiente para impedir o desenvolvimento de condições anaeróbias. Nos casos em que as substâncias de ensaio são voláteis, o ensaio só deve ser realizado com séries de subamostras individualizadas.

1.7.1.3 *Condições e duração dos ensaios*

O ensaio é realizado em câmara escura à temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Durante o ensaio, o teor de humidade das amostras de solo deve ser mantido entre 40% e 60% da capacidade máxima de retenção de água do solo (ver secção 1.6.4.2), com uma variação máxima de $\pm 5\%$. Sempre que necessário, pode adicionar-se água destilada ou desionizada.

A duração mínima do ensaio é de 28 dias. Nos ensaios de produtos químicos agrícolas, comparam-se as quantidades de dióxido de carbono libertado ou de oxigénio consumido entre as amostras tratadas e de controlo. Se estes valores diferirem em mais de 25% após o 28.º dia, o ensaio continua até que essa diferença atinja um valor igual ou inferior a 25% ou até ao 100º dia. Para compostos químicos não-agrícolas, o ensaio tem a duração de 28 dias. No 28.º dia, determinam-se as quantidades de dióxido de carbono libertado ou de oxigénio consumido nas amostras de solo tratadas e de controlo e calculam-se os valores de CE_x .

1.7.2 Amostragem e análise dos solos

1.7.2.1 *Calendário de amostragem dos solos*

Nos ensaios de produtos químicos agrícolas, analisam-se as taxas de respiração induzida pela glucose através das quantidades de dióxido de carbono libertado ou de oxigénio consumido nas amostras de solo nos dias 0, 7, 14 e 28. Caso seja necessário prolongar o ensaio, após o 28.º dia devem efectuar-se medições com intervalos de 14 dias.

Nos ensaios de produtos químicos não-agrícolas, testa-se um mínimo de cinco concentrações de ensaio e a análise da taxa de respiração induzida pela glucose efectua-se no início do ensaio (dia 0) e no fim do período de exposição (28.º dia). Nos casos em que tal se revele necessário, podem realizar-se medições intermédias - por exemplo ao 7.º dia. Os dados obtidos ao 28.º dia são utilizados para determinar o valor de CE_x para o produto químico. Se desejado, os dados obtidos para a amostra de controlo no dia 0 podem ser utilizados para indicar as quantidades iniciais de biomassa microbiana metabolicamente activa no solo(12).

1.7.2.2 *Medida das taxas de respiração induzida por glucose*

Para cada repetição de cada amostra de solo, tratada e de controlo, determina-se a taxa de respiração induzida por glucose em cada tempo de amostragem. As amostras de solo são misturadas com uma quantidade de glucose suficiente para provocar uma resposta máxima de respiração imediata. A quantidade de glucose necessária para provocar a resposta máxima de respiração de um dado solo pode ser determinada através de um teste preliminar usando uma série de concentrações de glucose (14). Contudo, para solos arenosos com 0,5 a 1,5% de carbono orgânico, 2000 a 4000 mg de glucose por kg de solo (peso seco) são, em geral, suficientes. A glucose pode ser pulverizada com areia limpa de quartzo [10 g areia/kg de solo (peso seco)] e misturada com o solo de forma homogénea.

As amostras de solo adicionadas de glucose são incubadas num aparelho adequado para a determinação de taxas de respiração, em regime contínuo, de hora a hora ou de duas em duas horas (ver secção 1.6.1) a $20 \pm 2^\circ\text{C}$. O dióxido de carbono libertado, ou o oxigénio consumido, é medido durante 12 horas consecutivas e as medições devem iniciar-se logo que possível, isto é, 1 ou 2 horas após o suplemento de glucose. A partir dos dados obtidos, determinam-se as quantidades totais de dióxido de carbono libertado, ou de oxigénio consumido, durante as 12 horas, assim como as taxas médias de respiração.

2 **DADOS**

2.1 **TRATAMENTO DE RESULTADOS**

Nos ensaios efectuados com produtos químicos agrícolas, regista-se a quantidade de dióxido de carbono libertado, ou de oxigénio consumido, em cada repetição de cada amostra de solo e os valores médios do conjunto de repetições devem ser apresentados numa tabela. Os resultados devem ser avaliados usando métodos estatísticos usuais e adequados (por exemplo, Teste-F, nível de significância de 5%). As taxas de respiração induzida pela glucose expressam-se em mg dióxido de carbono/kg solo (peso seco)/h ou mg oxigénio/kg solo (peso seco)/h. A taxa média de formação de dióxido de carbono, ou a taxa média de consumo de oxigénio, em cada tratamento é comparada com a da amostra de controlo, calculando-se o desvio, em percentagem, da amostra de teste relativamente ao controlo.

Nos ensaios efectuados com produtos químicos não-agrícolas, determinam-se as quantidades de dióxido de carbono libertado, ou de oxigénio consumido, em cada repetição e traça-se uma curva de dose-resposta para estimar os valores de CE_x . As taxas de respiração induzida pela glucose (isto é, mg dióxido de carbono/kg solo (peso seco)/h ou mg oxigénio/kg solo (peso seco)/h) obtidas para as amostras tratadas após 28 dias são comparadas com as obtidas para as amostras de controlo. A partir destes resultados, calculam-se os valores percentuais de inibição para cada concentração de ensaio. As percentagens obtidas são representadas num gráfico em função da concentração e, usando procedimentos estatísticos, determinam-se os valores de CE_x . Os limites de confiança ($p = 0,95$) para os valores de CE_x calculados são igualmente determinados usando métodos-padrão (15)(16)(17).

2.2 **INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS**

Quando, na avaliação dos resultados dos ensaios com produtos químicos agrícolas, a diferença entre as taxas de respiração entre o tratamento com a menor concentração (isto é, correspondente à máxima concentração prevista para a situação real) e a respectiva amostra de controlo for igual ou inferior a 25% em qualquer amostragem efectuada após o 28.º dia, o produto pode ser considerado como não tendo influência a longo prazo na transformação de carbono dos solos. Para ensaios envolvendo produtos químicos não-agrícolas, os valores CE_{50} , CE_{25} ou CE_{10} são utilizados como indicadores.

3

RELATÓRIO**RELATÓRIO DO ENSAIO**

O relatório do ensaio deve incluir a seguinte informação:

Identificação completa do solo utilizado, incluindo:

- referência geográfica do local (latitude, longitude);
- informação sobre a caracterização histórica do local (isto é, coberto vegetal, tratamentos com produtos de protecção das culturas agrícolas, tratamentos com fertilizantes, contaminações acidentais, etc.);
- uso do solo (por exemplo, solo agrícola, floresta, etc.);
- profundidade de amostragem (cm);
- teor de areia/lama/argila (% peso seco);
- pH (em água);
- teor de carbono orgânico (% peso seco);
- teor de azoto (% peso seco);
- capacidade de permuta cationica (mmol/kg);
- biomassa microbiana inicial, em termos de percentagem de carbono orgânico total;
- referência dos métodos usados na determinação de cada parâmetro;
- toda a informação relacionada com a recolha e armazenamento das amostras de solo;
- pormenores sobre a pré-incubação do solo, quando exista.

Substância de ensaio:

- natureza física e, quando relevante, propriedades fisico-químicas;
- dados de identificação química, sempre que relevantes, incluindo fórmula estrutural, pureza (teor do componente activo, em percentagem, no caso dos produtos de protecção de culturas agrícolas), teor de azoto.

Condições de ensaio:

- pormenores sobre a correcção do solo com substrato orgânico;
- número de concentrações do produto químico de ensaio que foram testadas e, quando adequado, justificação das concentrações de ensaio escolhidas;
- pormenores sobre a aplicação da substância de ensaio no solo;
- temperatura de incubação;
- teor de humidade do solo no início e durante o ensaio;
- método usado na incubação do solo (isto é, como amostra única ou como séries de subamostras individualizadas);
- número de repetições;
- tempos de amostragem;

Resultados:

- método e equipamento usado para a medição das taxas de respiração;
- tabelas de resultados, incluindo valores individuais e valores médios para as quantidades de dióxido de carbono ou oxigénio;
- variação entre repetições nas amostras tratadas e nas amostras de controlo;
- explicação das correcções efectuadas nos cálculos, quando relevantes;
- a variação percentual da taxa de respiração induzida pela glucose em cada ponto de amostragem ou, quando adequado, o valor de CE_{50} com um limite de confiança de 95%, ou outros valores de CE_x (isto é, CE_{25} ou CE_{10}), com os respectivos intervalos de confiança, e a representação gráfica da curva de dose-resposta;
- tratamento estatístico dos resultados, quando apropriado;
- toda a informação e observações úteis para a interpretação dos resultados.

REFERÊNCIAS

- (1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1-16, 1994.
- (2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2ª edição, 1990).
- (3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. 28 de Setembro de 1987.
- (4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M. R. Lynch, Pub. SETAC-Europa, Bruxelas.
- (5) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgrate, Itália, 18-20 de Janeiro de 1995.
- (6) ISO 10381-6 (1993). Soil quality - Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
- (7) Anderson, J. P. E. (1987). Handling and Storage of Soils for Pesticide Experiments, in "Pesticide Effects on Soil Microflora", Eds. L. Somerville and M. P. Greaves, Capítulo 3: 45-60.
- (8) Anderson, J. P. E. (1982). Soil Respiration, in "Methods of Soil Analysis - Part 2: Chemical and Microbiological Properties". Agronomy Monograph N° 9. Eds. A. L. Page, R. H. Miller and D. R. Keeney. 41: 831- 871.
- (9) ISO 11266-1. (1993). Soil Quality - Guidance on Laboratory Tests for Biodegradation in Soil: Part 1. Aerobic Conditions.
- (10) ISO 14239 (1997E). Soil Quality - Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.
- (11) Heinemeye, O., Insam, H., Kaiser, E. A, e Walenzik, G. (1989). Soil microbial biomass and respiration measurements; an automated technique based on infrared gas analyses. Plant and Soil, 116: 77-81.
- (12) ISO 14240-1 (1997). Soil quality - Determination of soil microbial biomass - Part 1: Substrate-induced respiration method.
- (13) ISO 14240-2 (1997). Soil quality - Determination of soil microbial biomass - Part 2: Fumigation-extraction method.
- (14) Malkomes, H.-P. (1986). Einfluß von Glukosemenge auf die Reaktion der Kurzzeit-Atmung im Boden Gegenüber Pflanzenschutzmitteln, Dargestellt am Beispiel eines Herbizide. (Influence of the Amount of Glucose Added to the Soil on the Effect of Pesticides in Short-Term Respiration, using a Herbicide as an Example). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., Braunschweig, 38: 113-120.
- (15) Litchfield, J. T. e Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.
- (16) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3ª edição, Cambridge, Londres e Nova Iorque.
- (17) Finney D. J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, Reino Unido.

C.23. TRANSFORMAÇÕES AERÓBIAS E ANAERÓBIAS NO SOLO

1. MÉTODO

O presente método baseia-se na publicação OECD TG 307 (2002).

1.1 INTRODUÇÃO

O presente Método de Ensaio baseia-se nas orientações existentes (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9). O método descrito no presente Método de Ensaio foi concebido para avaliar as transformações aeróbias e anaeróbias de produtos químicos no solo. As experiências a realizar têm como objectivo a determinação (i) da taxa de transformação da substância de ensaio e (ii) da natureza e taxas de formação e degradação de produtos de transformação a que as plantas e organismos do solo possam ser expostos. Os estudos descritos neste Método de Ensaio são requeridos quer para produtos químicos directamente aplicados no solo quer para substâncias que o possam vir a atingir. Os resultados dos presentes estudos laboratoriais poderão igualmente vir a ser utilizados para o desenvolvimento de protocolos de amostragem e análise em áreas de estudo relacionadas.

Para a avaliação das vias de transformação, é geralmente suficiente a realização de estudos aeróbios e anaeróbios com um único tipo de solo (8)(10)(11). Pelo contrário, a determinação das taxas de transformação deverá basear-se em análises efectuadas em, pelo menos, mais três solos diferentes (8)(10).

O número e tipos de solos que devem ser utilizados no presente ensaio foram acordados numa reunião de trabalho da OCDE sobre selecção de solos e sedimentos, que decorreu em Belgirate, Itália, em 1995 (10). Os tipos de solos a ensaiar devem ser representativos das condições ambientais onde a substância de ensaio virá a ser utilizada ou libertada no ambiente. Por exemplo, os produtos químicos que podem vir a ser libertados em climas subtropicais a tropicais devem ser ensaiados com Ferrasoles ou Nitosoles (sistema FAO). Da referida reunião saíram igualmente recomendações relativas à recolha, manipulação e armazenamento das amostras de solos, tendo como base a Orientação ISO (15). No presente método considera-se igualmente a utilização de solos de arrozais paddy.

1.2 DEFINIÇÕES

Substância de ensaio: Qualquer substância, quer se trate do composto inicial ou de produtos de transformação relevantes.

Produtos de transformação: Todas as substâncias resultantes de reacções de transformação bióticas ou abióticas da substância de ensaio, incluindo CO₂ e produtos presentes nos resíduos ligados.

Resíduos ligados: Os "resíduos ligados" representam compostos presentes no solo, planta ou animal, que, após extracção, persistam na matriz, quer na forma da substância inicial quer como um dos seus metabolitos/produtos de transformação. O método de extracção não poderá alterar substancialmente nem os próprios compostos nem a estrutura da matriz. A natureza da ligação poderá ser parcialmente determinada utilizando métodos extractivos que alterem a matriz e através de técnicas analíticas sofisticadas. Têm sido identificadas deste modo, por exemplo, ligações do tipo covalente, iónico e de absorção/adsorção, assim como encapsulação. De um modo geral, a formação de resíduos ligados reduz significativamente a bioacessibilidade e a bio-disponibilidade das substâncias (12) [adaptado de IUPAC 1984 (13)].

Transformação aeróbia: Reacções que ocorrem na presença de oxigénio molecular (14).

Transformação anaeróbia: Reacções que ocorrem na ausência de oxigénio molecular (14).

Solo: Mistura de componentes abióticos (constituintes químicos minerais e orgânicos, em que os últimos incluem compostos com elevado conteúdo de carbono e azoto e de peso molecular elevado) e bióticos (pequenos organismos vivos, maioritariamente microrganismos). O solo pode ser manuseado em dois estados distintos:

- (a) não perturbado, tal como se desenvolveu ao longo do tempo, em camadas características de vários tipos de solos;
- (b) perturbado, tal como é normalmente encontrado em campos aráveis ou como se apresenta quando a recolha de amostras para utilização no presente método de ensaio é feita por escavação (14).

Mineralização: Degradação completa de um composto orgânico em CO_2 e H_2O , em condições aeróbias, ou em CH_4 , CO_2 e H_2O em condições anaeróbias. No contexto do presente método de ensaio, quando se utiliza um composto marcado com ^{14}C , o termo mineralização refere-se à sua degradação extensa, envolvendo a oxidação de um átomo de carbono marcado e a libertação da quantidade correspondente de $^{14}\text{CO}_2$ (14).

Semi-vida: $t_{0,5}$, é o tempo necessário para a transformação de 50% da substância de ensaio, nos casos em que a transformação pode ser descrita por uma cinética de primeira ordem. A semi-vida da substância é independente da sua concentração.

DT₅₀ (Tempo de Desaparecimento 50): Tempo necessário para reduzir a concentração da substância de ensaio em 50%; nos casos em que a transformação não segue uma cinética de primeira ordem, o valor de DT₅₀ é diferente de $t_{0,5}$ (semi-vida).

DT₇₅ (Tempo de Desaparecimento 75): Tempo necessário para reduzir a concentração da substância de ensaio em 75%.

DT₉₀ (Tempo de Desaparecimento 90): Tempo necessário para reduzir a concentração da substância de ensaio em 90%.

1.3 SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

A caracterização e/ou identificação dos produtos de transformação através de métodos espectroscópicos e cromatográficos deverá envolver a utilização de substâncias de referência.

1.4 APLICABILIDADE DO ENSAIO

O método é aplicável a todas as substâncias químicas (não marcadas ou marcadas radioactivamente) para as quais se encontre disponível um método analítico suficientemente sensível e preciso. É aplicável a compostos ligeiramente voláteis, não voláteis, solúveis ou insolúveis em água. O ensaio não deve ser aplicado a compostos químicos muito voláteis a partir do solo (por exemplo, fumigantes, solventes orgânicos) já que estes, nas condições experimentais descritas, não podem ser mantidos no solo.

1.5 INFORMAÇÃO SOBRE A SUBSTÂNCIA DE ENSAIO

Enquanto para a medição da taxa de transformação poderão ser utilizadas substâncias de ensaio marcadas ou não marcadas, para o estudo da via de transformação e para o estabelecimento do balanço de massa é necessária a utilização de compostos marcados. A marcação recomendada é com ^{14}C , embora a utilização de outros isótopos, tais como ^{13}C , ^{15}N , ^3H e ^{32}P , possa igualmente revelar-se útil. A marcação deve ser feita, tanto quanto possível, na(s) zona(s) mais estável(eis) da molécula¹. A pureza da substância de ensaio deve ser de, pelo menos, 95 %.

Antes de efectuar um ensaio sobre transformação aeróbia ou anaeróbia no solo, deve estar disponível a seguinte informação sobre a substância de ensaio:

- (a) solubilidade em água (Método A.6)
- (b) solubilidade em solventes orgânicos;
- (c) pressão de vapor (Método A.4) e constante da lei de Henry;
- (d) coeficiente de partição n-octanol/água (Método A.8);
- (e) estabilidade química no escuro (hidrólise) (Método C.7);
- (f) pK_a se a molécula puder sofrer protonação ou desprotonação [Norma de Ensaio 112 da OCDE] (16).

Poderão ser úteis outras informações como, por exemplo, a existência de dados relativos à toxicidade da substância de ensaio para os microrganismos do solo [Métodos de Ensaio C.21 e C.22] (16).

Deverão estar disponíveis métodos analíticos (incluindo métodos de extracção e erradicação) que permitam a quantificação e identificação tanto da substância de ensaio como dos seus produtos de transformação.

¹ Por exemplo, se a estrutura da substância de ensaio inclui um anel, este deverá ser marcado; no caso de a substância de ensaio possuir dois ou mais anéis, poderá ser necessário efectuar estudos independentes de modo a avaliar o destino de cada um dos anéis marcados e obter informação adequada sobre a formação dos produtos de transformação.

1.6 PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

As amostras de solo são tratadas com a substância de ensaio e incubadas no escuro em balões biométricos ou em sistemas de fluxo em condições laboratoriais controladas (com temperatura e humidade do solo constantes). A intervalos de tempo adequados, extraem-se amostras de solo que são analisadas relativamente à substância inicial e aos seus produtos de transformação. Os produtos voláteis são igualmente recolhidos para análise utilizando dispositivos de absorção adequados. A utilização de material marcado com ^{14}C permite a determinação das várias taxas de mineralização da substância de ensaio através da recolha do $^{14}\text{CO}_2$ libertado e o estabelecimento de um balanço de massa que inclui a formação de resíduos ligados ao solo.

1.7 CRITÉRIOS DE QUALIDADE

1.7.1 Recuperação

A extração e análise de amostras de solo, pelo menos em duplicado imediatamente após a adição da substância de ensaio, fornece uma primeira indicação relativa à repetitividade do método analítico e à uniformidade do procedimento de aplicação da substância de ensaio. Os valores de recuperação em fases mais adiantadas das experiências são obtidos através dos respectivos balanços de massa. Os valores de recuperação devem variar entre 90% e 110% no caso de produtos químicos marcados (8) e entre 70% e 110% no caso de produtos químicos não marcados (3).

1.7.2 Repetitividade e sensibilidade do método analítico

A repetitividade do método analítico (com excepção da eficiência de extração inicial) na quantificação da substância de ensaio e dos produtos de transformação pode ser verificada pela análise em duplicado do mesmo extracto de solo, após incubação durante o tempo suficiente para que ocorra a formação de produtos de transformação.

O limite de detecção (LD) do método analítico, tanto para a substância de ensaio como para os produtos de transformação, deve corresponder, no mínimo, ao menor dos seguintes valores: $0,01 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de solo (como substância de ensaio) ou 1% da dose aplicada. Deve ser igualmente especificado o limite de quantificação (LQ).

1.7.3 Precisão dos dados de transformação

A análise de regressão das concentrações da substância de ensaio em função do tempo fornece informação apropriada sobre a fiabilidade da curva de transformação e permite o cálculo dos limites de confiança para as semi-vidas (no caso de cinética de pseudoprimeira ordem) ou os valores de DT_{50} e, se adequado, os valores de DT_{75} e de DT_{90} .

1.8 DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.8.1 Equipamento e reagentes químicos

Os sistemas de incubação consistem em sistemas estáticos fechados ou em sistemas de fluxo adequados (7)(17), dos quais se representam exemplos nas figuras 1 (aparelho adequado para a incubação de solos em sistema de fluxo) e 2 (balão biométrico). Ambos os tipos de sistemas de incubação apresentam vantagens e limitações (7)(17).

Para além do material corrente de laboratório, é necessário o seguinte:

- Instrumentos analíticos, tais como equipamento de GLC, HPLC, TLC, incluindo os sistemas de detecção apropriados para a análise de substâncias marcadas radioactivamente ou não marcadas ou o método de diluição inversa de isótopos;
- Instrumentos para fins de identificação (por exemplo, MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR, etc.);
- Contador de cintilações;
- Câmara de combustão oxidante para combustão do material radioactivo;
- Centrífuga;
- Aparelhos de extração (por exemplo, tubos de centrífuga para extração a frio e aparelho de Soxhlet para extração contínua em refluxo);

- Instrumentação para concentração de soluções e extractos (por exemplo, evaporador rotativo);
- Banho de água;
- Dispositivo para mistura mecânica (por exemplo, máquina de amassar, misturador rotativo).

Os reagentes químicos a utilizar incluem, por exemplo:

- NaOH, qualidade analítica, $2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, ou outra base adequada (por exemplo, KOH, etanolamina);
- H_2SO_4 , qualidade analítica, $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$;
- Etilenoglicol, qualidade analítica;
- Materiais sólidos de adsorção, tais como cal de soda e pastilhas de poliuretano;
- Solventes orgânicos, qualidade analítica, tais como acetona, metanol, etc.;
- Líquido de cintilação.

1.8.2 Aplicação da substância de ensaio

Com vista à sua adição e distribuição no solo, a substância de ensaio pode ser dissolvida em água (desionizada ou destilada) ou, quando necessário, em quantidades mínimas de acetona ou de outros solventes orgânicos (6) em que a substância de ensaio seja suficientemente solúvel e estável. Neste caso, a quantidade do solvente seleccionado não deverá ter uma influência significativa na actividade microbiana do solo (ver secções 1.5 e 1.9.2-1.9.3). Deverá igualmente evitar-se a utilização de solventes que inibam a actividade microbiana, tais como clorofórmio, diclorometano e outros solventes halogenados.

A substância de ensaio pode também ser adicionada na forma sólida, por exemplo, misturada com areia de quartzo (6) ou com uma pequena sub-amostra do solo a ensaiar que tenha sido previamente seca ao ar e esterilizada. Neste caso, se a substância de ensaio foi adicionada utilizando um solvente, dever-se-á permitir a evaporação deste antes da adição da subamostra contendo a substância de ensaio à amostra original, não-estéril, de solo.

No caso de produtos químicos de ocorrência comum, cuja via principal de entrada no solo é através de lamas de esgotos ou actividades agrícolas, a substância de ensaio deverá ser adicionada às lamas que são em seguida introduzidas na amostra de solo (ver secções 1.9.2 e 1.9.3).

Embora a utilização sistemática de produtos formulados não seja recomendada, em algumas situações, como por exemplo, no caso de substâncias de ensaio pouco solúveis, a utilização deste tipo de produtos pode constituir uma alternativa apropriada.

1.8.3 Solos

1.8.3.1 *Seleção de solos*

Para a determinação da via de transformação, poderá utilizar-se um solo representativo. Nestes casos, recomenda-se a escolha de um solo areno-limoso, franco-limoso, limoso ou limo-arenoso [de acordo com a classificação da FAO e da USDA (18)] com um pH entre 5,5-8,0, um conteúdo de carbono orgânico entre 0,5-2,5% e uma biomassa microbiana de, pelo menos, 1% do carbono orgânico total (10).

Para estudos de taxas de transformação, devem utilizar-se pelo menos mais três solos, que deverão ser representativos de uma gama de solos relevante e cujo teor em carbono orgânico, pH, argila e biomassa microbiana deverá variar (10).

Todos os solos deverão ser caracterizados, pelo menos, em relação à sua textura (% de areia, % de silte, % de argila) [de acordo com a classificação da FAO e da USDA (18)], pH, capacidade de troca catiónica, carbono orgânico, densidade aparente, características de retenção de água² e biomassa microbiana (apenas no caso de estudos aeróbios); no entanto, a disponibilidade de outras informações relativas às propriedades do solo poderá ser útil para a interpretação dos resultados. Com vista à determinação das características do solo, podem ser utilizados os métodos recomendados nas referências (19)(20)(21)(22)(23). A biomassa microbiana deverá ser determinada pelo método da respiração induzida pelo substrato (SIR) (25)(26) ou por métodos alternativos (20).

² As características de retenção de água de um solo podem ser medidas como capacidade de campo, capacidade de retenção de água ou tensão de sucção de água (pF). Consultar o Anexo 1 para mais pormenores. No relatório deverá referir-se se as características de retenção de água e densidade aparente dos solos foram determinadas em amostras de campo não perturbadas ou em amostras perturbadas (processadas).

1.8.3.2 *Recolha, manuseamento e armazenamento de solos*

Deve estar disponível informação pormenorizada sobre a história do local de recolha do solo a ensaiar, que inclua: a localização exacta, o coberto vegetal, o eventual tratamento com produtos químicos, fertilizantes orgânicos e inorgânicos, a adição de matéria biológica ou outras contaminações. No caso de terem sido tratados com a substância de ensaio ou seus análogos estruturais nos quatro anos imediatamente anteriores, os solos não devem ser utilizados para estudos de transformação (10)(15).

A amostra de solo deverá ter sido recolhida recentemente (do horizonte A ou até 20 cm da camada superior) e o seu conteúdo de água deverá ser tal que facilite a crivagem. Para outros solos que não os provenientes de arrozais paddy, deve evitar-se a amostragem durante ou imediatamente após longos períodos (> 30 dias) de seca, gelo ou inundação (14). Na medida do possível, as amostras devem ser transportadas de modo a minimizar alterações no conteúdo de água do solo e devem ser mantidas no escuro, em condições de boa ventilação. Para este fim, é geralmente adequada a utilização de sacos de polietileno fechados frouxamente.

Após a recolha, o solo deverá ser processado tão depressa quanto possível. Após a remoção da vegetação, fauna macroscópica e pedras, o solo é passado através de um peneiro de 2 mm, que remove as pequenas pedras e restos da fauna e plantas. Antes da crivagem, devem evitar-se a secagem e o esmagamento extensivos do solo (15).

Nos casos em que a recolha das amostras é difícil durante o Inverno (solo congelado ou coberto de camadas de neve), a amostragem poderá ser feita a partir de um lote de solo armazenado numa estufa e coberto por vegetação (por exemplo, erva ou misturas de erva e trevo). Embora haja uma acentuada preferência por estudos efectuados com solos recolhidos na altura, nos casos em que o solo recolhido e processado tenha de ser armazenado antes do início do estudo, as condições de armazenamento devem ser adequadas e de curta duração ($4 \pm 2^\circ\text{C}$ durante três meses, no máximo) de modo a manter a actividade microbiana³. Nas referências (8)(10)(15)(26)(27) podem encontrar-se instruções pormenorizadas sobre a recolha, o manuseamento e o armazenamento de solos para utilização em experiências de biotransformação.

Antes da utilização do solo processado para o presente ensaio, este deve ser pré-incubado de modo a permitir a germinação e remoção das sementes e o restabelecimento do equilíbrio do metabolismo microbiano após a passagem de condições de amostragem ou armazenamento para condições de incubação. De modo a aproximar as condições de temperatura e humidade daquelas que serão utilizadas no ensaio, a pré-incubação durante um período de 2 a 28 dias) é geralmente adequada (15). No total, os períodos de armazenamento e pré-incubação não devem exceder três meses.

1.9 PROCEDIMENTO DO ENSAIO

1.9.1 **Condições do ensaio:**

1.9.1.1 *Temperatura de ensaio*

Ao longo de todo o período do ensaio, os solos devem ser incubados no escuro e a uma temperatura constante e representativa das condições climáticas onde ocorrerá o uso ou libertação da substância. Relativamente a todas as substâncias de ensaio que possam vir a atingir o solo em climas temperados, a temperatura recomendada é de $20 \pm 2^\circ\text{C}$. A temperatura deve ser monitorizada.

No caso de produtos químicos aplicados ou libertados em climas mais frios (por exemplo, em países do Norte, durante o Outono ou o Inverno), devem ser incubadas amostras de solo adicionais a uma temperatura inferior (por exemplo, $10 \pm 2^\circ\text{C}$).

³ Resultados de investigações recentes indicam que solos provenientes de zonas temperadas podem igualmente ser armazenados a -20°C durante períodos superiores a três meses (28)(29) sem se registarem perdas significativas de actividade microbiana.

1.9.1.2 *Teor de humidade*

No caso de ensaios de transformação em condições aeróbias, o teor de humidade do solo⁴ deve ser ajustado e mantido a um valor de pF entre 2,0 e 2,5 (3). O teor de humidade do solo é expresso em massa de água por massa de solo seco e deve ser controlado regularmente (por exemplo, de 2 em 2 semanas) por pesagem dos balões de incubação, devendo as perdas de água ser compensadas por adição de água (de preferência, água da torneira esterilizada por filtração). Durante a adição de água devem tomar-se precauções com vista a evitar ou minimizar perdas da substância de ensaio e/ou dos produtos de transformação por volatilização e/ou fotodegradação (caso ocorra).

No caso de ensaios de transformação em condições anaeróbias ou de solos paddy, o solo é saturado com água por inundação.

1.9.1.3 *Condições de incubação aeróbia*

No caso de sistemas de fluxo, as condições aeróbias serão mantidas através de ciclos de lavagem ou por ventilação contínua com ar humidificado. No caso de balões biométricos, a permuta de ar é mantida por difusão.

1.9.1.4 *Condições aeróbias estéreis*

Com vista à obtenção de informações relativas à relevância da transformação abiótica de uma substância de ensaio, as amostras de solo podem ser esterilizadas (para informações sobre métodos de esterilização, consultar as referências 16 e 29), tratadas com a substância de ensaio estéril (por exemplo, por adição da solução através de um filtro estéril) e arejadas com ar humidificado estéril, tal como descrito na secção 1.9.1.3. No caso de solos paddy, tanto o solo como a água devem ser esterilizados e a incubação deve ser efectuada tal como descrito na secção 1.9.1.6.

1.9.1.5 *Condições de incubação anaeróbia*

De modo a estabelecer e manter condições anaeróbias, o solo tratado com a substância de ensaio é inicialmente incubado em condições aeróbias durante 30 dias, uma semi-vida ou DT_{50} (escolher a opção mais curta), após o que é coberto de água (camada de água de 1-3 cm) e o sistema de incubação lavado com um gás inerte (por exemplo, azoto ou argón)⁵. O sistema de ensaio deve permitir a realização de medições de pH, concentração de oxigénio e potencial redox, e incluir dispositivos de retenção de produtos voláteis. O sistema de balões biométricos deve ser fechado de modo a evitar a entrada de ar por difusão.

1.9.1.6 *Condições de incubação paddy*

De modo a estudar a transformação em solos de arrozais paddy, o solo é coberto com uma camada de água de 1-5 cm e a substância de ensaio é aplicada na fase aquosa (9). A profundidade mínima do solo recomendada é de 5 cm. O sistema é ventilado com ar, tal como descrito para as condições aeróbias. Os valores de pH, concentração de oxigénio e potencial redox da camada aquosa devem ser monitorizados e incluídos no relatório. O início dos estudos de transformação deve ser precedido de um período de pré-incubação de, pelo menos, duas semanas (ver secção 1.8.3.2).

⁴ O solo não deve estar nem demasiado molhado nem demasiado seco de modo a manter uma ventilação e alimentação adequadas da microflora. Os teores de humidade recomendados para um crescimento microbiano óptimo variam entre 40% e 60% da capacidade de retenção de água (WHC) e entre 0,1 e 0,33 bar (6). Este último intervalo é equivalente a uma gama de pF entre 2,0 e 2,5. No Anexo 2 apresentam-se os teores de humidade típicos para vários tipos de solos.

⁵ As condições aeróbias são as que predominam em solos superficiais e mesmo em solos subsuperficiais, tal como foi demonstrado num projecto de investigação financiado pela UE [K. Takagi et al. (1992). Microbial diversity and activity in subsoils: Methods, field site, seasonal variation in subsoil temperatures and oxygen contents. Proc. Internat. Symp. Environm. Aspects Pesticides Microbiol., 270-277, 17-21 August 1992, Siguna, Sweden]. A ocorrência de condições anaeróbias é ocasional, verificando-se apenas durante a inundação dos solos após precipitação intensa ou quando são estabelecidas condições paddy (em arrozais).

1.9.1.7 *Duração do ensaio*

Os estudos de taxa e via de transformação não devem normalmente exceder 120 dias⁶ (3)(6)(8), pois após este período é de esperar uma diminuição da actividade microbiana do solo num sistema laboratorial artificial e isolado dos sistemas naturais de reposição de nutrientes. Sempre que seja necessário caracterizar o desaparecimento da substância de ensaio e a formação e desaparecimento dos principais produtos de transformação, os estudos poderão ser prolongados (por exemplo, 6 ou 12 meses) (8). O prolongamento do ensaio deverá ser justificado no relatório de ensaio e acompanhado de medições de biomassa realizadas durante e no final desses períodos.

1.9.2 **Princípio do ensaio**

Em cada balão de incubação (ver Figuras 1 e 2 do Anexo 3) coloca-se cerca de 50g a 200 g de solo (peso seco), que é tratado com a substância de ensaio utilizando um dos métodos descritos na secção 1.8.2. Caso se utilizem solventes orgânicos para a aplicação da substância de ensaio, estes devem ser removidos do solo por evaporação. O solo deverá ser muito bem mexido, utilizando uma espátula e/ou por agitação do balão. Se o ensaio for conduzido em condições de arrozal paddy, o solo e a água devem ser muito bem misturados após a aplicação da substância de ensaio. De modo a verificar a uniformidade da distribuição da substância de ensaio, esta deverá ser analisada em pequenas alíquotas (por exemplo, 1 g) dos solos tratados. Em alternativa, poderá ser utilizado um outro método, que se descreverá mais à frente.

A taxa de tratamento deverá corresponder à maior taxa de aplicação de um produto de protecção de culturas que é recomendada nas instruções de utilização e a uma incorporação uniforme até uma profundidade adequada no campo (por exemplo, camada superficial de 10 cm de solo⁷). Por exemplo, para produtos químicos aplicados na folhagem ou no solo sem incorporação, a profundidade apropriada para o cálculo de quantidade de produto químico a adicionar a cada balão é de 2,5 cm. No caso de produtos químicos incorporados no solo, a profundidade apropriada é a profundidade de incorporação especificada nas instruções de utilização. No caso de produtos químicos de ocorrência comum, a taxa de aplicação deve ser estimada com base na via de entrada mais relevante. Por exemplo, quando as lamas de esgotos constituem a principal via de entrada no solo, o produto químico deve ser adicionado às lamas a uma concentração que reflecte a sua concentração esperada e a quantidade de lamas adicionadas ao solo deve reflectir a sua carga habitual em solos agrícolas. Se esta concentração não for suficientemente elevada para que se possam identificar os principais produtos de transformação, poderá ser útil a incubação de amostras de solo independentes contendo taxas mais elevadas, embora devam ser evitadas taxas excessivas que possam influenciar as funções microbianas do solo (ver secções 1.5 e 1.8.2).

Alternativamente, poderá tratar-se uma maior quantidade de solo (ou seja, 1 kg a 2 kg) com a substância de ensaio; depois de ser cuidadosamente misturado numa máquina misturadora apropriada, o solo tratado será então dividido em pequenas porções de 50 g a 200 g e transferido para os balões de incubação (por exemplo, utilizando divisores de amostras). Também neste caso deverão ser analisadas pequenas alíquotas do lote de solo tratado (por exemplo, 1 g), de modo a determinar a uniformidade da distribuição da substância de ensaio. Este procedimento apresenta a vantagem de permitir uma distribuição mais uniforme da substância de ensaio no solo, pelo que será preferível a sua utilização.

Deverão ser igualmente incubadas, nas mesmas condições (aeróbias), que as amostras tratadas com a substância de ensaio, amostras de solo não tratadas; estas amostras serão utilizadas para medições de biomassa durante e no final dos estudos.

⁶ Os estudos aeróbios poderão ser terminados muito antes de decorridos 120 dias, desde que se tenha manifestamente atingido o final da mineralização e da via de transformação. A conclusão do teste poderá ocorrer após 120 dias ou quando pelo menos 90% da substância de ensaio tiver sido transformada, mas apenas se se tiver formado, no mínimo, 5% de CO₂.

⁷ O cálculo da concentração inicial com base na área utiliza a seguinte equação:

$$C_{\text{solo}} [\text{mg} / \text{kg}_{\text{solo}}] = \frac{A [\text{kg} / \text{ha}] \cdot 10^6 [\text{mg} / \text{kg}]}{l [\text{m}] \cdot 10^4 [\text{m}^2 / \text{ha}] \cdot d [\text{kg}_{\text{solo}} / \text{m}^3]}$$

C_{solo} = Concentração inicial no solo [mg·kg⁻¹]

A = Taxa de aplicação [kg·ha⁻¹]; l = espessura da camada de solo no campo [m]; d = densidade aparente do solo seco [kg·m⁻³].

Em geral, uma taxa de aplicação de 1 kg·ha⁻¹ resulta numa concentração no solo de aproximadamente 1 mg·kg⁻¹, numa camada de 10 cm (assumindo uma densidade aparente de 1 g·cm⁻³).

Nos casos em que a substância de ensaio é aplicada no solo dissolvida em solvente(s) orgânico(s), deverão ser incubadas, nas mesmas condições (aeróbias) que as amostras tratadas com a substância de ensaio, amostras de solo tratadas com a mesma quantidade de solvente(s) (sem adição da substância em ensaio). Estas amostras são utilizadas para medições de biomassa no início, durante e no final dos estudos de modo a verificar os efeitos do(s) solvente(s) na biomassa microbiana.

Os balões contendo o solo tratado podem ser ligados ao sistema de fluxo descrito na Figura 1 ou tapados com a coluna de absorção ilustrada na Figura 2 (ver Anexo 3).

1.9.3 Amostragem e medição

A intervalos de tempo apropriados, removem-se dois balões de incubação, extraem-se as respectivas amostras de solo com solventes apropriados de polaridade diferente e analisa-se a substância de ensaio e/ou os produtos de transformação. Um estudo bem planeado deverá incluir um número de balões suficiente para que possam ser utilizados dois balões em cada ponto de amostragem. A intervalos de tempo variados durante a incubação de cada amostra de solo (intervalos de 7 dias durante o primeiro mês e de 17 dias nos meses subsequentes), e no final do período de incubação, as soluções de absorção ou os materiais sólidos de absorção deverão ser removidos e analisados relativamente à presença de produtos voláteis. Para além de uma amostra de solo recolhida imediatamente após a aplicação da substância de ensaio (amostra do dia 0), deverão ser incluídos, pelo menos, 5 pontos de amostragem. Os intervalos de tempo deverão ser escolhidos de modo a possibilitar o estabelecimento do padrão de desaparecimento da substância de ensaio e dos padrões de formação e desaparecimento dos produtos de transformação (por exemplo, 0, 1, 3, 7 dias; 2, 3 semanas; 1, 2, 3 meses, etc.).

No caso de se utilizar uma substância de ensaio marcada com ^{14}C , a radioactividade não extractável será quantificada por combustão e será calculado um balanço de massa para cada intervalo de amostragem.

No caso de incubação anaeróbia ou paddy, as fases de solo e água podem ser analisadas conjuntamente para a substância de ensaio e produtos de transformação ou ser separadas por filtração ou centrifugação antes da extracção e análise.

1.9.4 Ensaios opcionais

A fim de estimar a influência da temperatura e humidade do solo nas taxas de transformação de uma substância de ensaio e/ou dos seus produtos de transformação no solo, poderá ser útil realizar estudos em condições aeróbias, não-estéreis, noutras condições de temperatura e humidade.

Pode tentar-se uma caracterização mais aprofundada da radioactividade não extractável utilizando, por exemplo, extracção com fluidos supercríticos.

2 DADOS

2.1 TRATAMENTO DOS RESULTADOS

As quantidades de substância de ensaio, produtos de transformação, substâncias voláteis (apenas em percentagem) e produtos não-extractáveis, devem ser indicadas na forma de percentagem da concentração aplicada inicialmente e, quando apropriado, em $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de solo (com base em peso de solo seco), para cada intervalo de amostragem. Para cada um destes intervalos deverá ainda apresentar-se um balanço de massa, em percentagem da concentração aplicada inicialmente. A representação gráfica das concentrações da substância de ensaio em função do tempo permitirá estimar a sua semi-vida de transformação, ou DT_{50} . Os produtos de transformação principais devem ser identificados e os valores das suas concentrações devem também ser representados graficamente em função do tempo a fim de evidenciar as suas taxas de formação e desaparecimento. Considera-se um produto de transformação principal qualquer produto cuja concentração seja $\geq 10\%$ da dose aplicada em qualquer altura ao longo do estudo.

Os produtos voláteis retidos fornecem alguma indicação sobre a capacidade de volatilização, a partir do solo, de uma substância de ensaio e dos seus produtos de transformação.

Devem ser determinados valores mais precisos para as semi-vidas ou DT_{50} e se apropriado, para DT_{75} e DT_{90} , através da aplicação de modelos cinéticos apropriados. Os valores de semi-vida e de DT_{50} devem ser apresentados conjuntamente com a descrição do modelo utilizado, da ordem da cinética da reacção e do coeficiente de determinação (r^2). É preferível assumir uma cinética de primeira ordem, excepto se $r^2 < 0,7$. Quando apropriado, os cálculos devem ser igualmente aplicados aos produtos de transformação principais. As referências 31 a 35 descrevem exemplos de modelos apropriados.

No caso de estudos de taxas conduzidos a várias temperaturas, as taxas de transformação devem ser descritas em função da temperatura, dentro da gama de temperaturas utilizada experimentalmente, através duma relação de Arrhenius do tipo:

$$k = A \cdot e^{-B/T} \quad \text{ou} \quad \ln k = \ln A - \frac{B}{T},$$

em que $\ln A$ e B correspondem, respectivamente, aos parâmetros de regressão ordenada na origem e declive da melhor correlação linear obtida entre $\ln k$ e $1/T$, k representa a constante de velocidade à temperatura T e T representa a temperatura em kelvin. Deve ter-se em atenção que a relação de Arrhenius é válida para um intervalo limitado de temperatura, no caso de a transformação ser influenciada pela acção microbiana.

2.2 AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Apesar de os estudos serem efectuados num sistema laboratorial artificial, os resultados permitirão obter uma estimativa da taxa de transformação da substância de ensaio, assim como da taxa de formação e desaparecimento dos produtos de transformação em condições de campo (36)(37).

O estudo da via de transformação de uma substância de ensaio fornece informação sobre o modo como a substância aplicada é estruturalmente modificada no solo por reacções químicas e microbianas.

3 RELATÓRIO

RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deve incluir o seguinte:

Substância de ensaio:

- Nome vulgar, nome químico, número CAS, fórmula estrutural (com indicação da(s) posição(s) de marcação no caso da utilização de material marcado radioactivamente) e propriedades físico-químicas relevantes (ver secção 1.5);
- pureza (impurezas) da substância de ensaio;
- pureza radioquímica do produto químico marcado e actividade específica (quando apropriado);

Substâncias de referência

- nome químico e estrutura das substâncias de referência utilizadas para a caracterização e/ou identificação dos produtos de transformação;

Solos utilizados no ensaio:

- características do local de recolha;
- data e procedimento utilizado para a recolha de amostras do solo;
- propriedades dos solos, tais como, pH, teor de carbono orgânico, textura (% de areia, % de silte, % de argila), capacidade de troca catiónica, densidade aparente, características de retenção de água e biomassa microbiana;
- duração e condições de armazenamento do solo (caso tenha sido armazenado);

Condições do ensaio:

- datas em que os estudos foram efectuados;
- quantidade de substância de ensaio aplicada;
- solventes utilizados e método de aplicação da substância de ensaio;
- peso do solo inicialmente tratado e retirado para análise em cada intervalo de tempo;
- descrição do sistema de incubação utilizado;
- taxas de fluxo de ar (apenas para sistemas de fluxo);
- temperatura do sistema experimental;
- teor de humidade do solo durante a incubação;
- biomassa microbiana no início, durante e no final dos estudos aeróbios;
- pH, concentração de oxigénio e potencial redox no início, durante e no final dos estudos anaeróbios e paddy;
- método(s) de extracção;
- métodos de quantificação e identificação da substância de ensaio e principais produtos de transformação no solo e materiais de absorção;
- número de repetições (duplicados) e número de controlos.

Resultados:

- resultado da determinação da actividade microbiana;
- repetitividade e sensibilidade dos métodos analíticos utilizados;
- taxas de recuperação (na secção 1.7.1 indicam-se os valores percentuais que deverão verificar-se para um estudo válido);
- tabelas de resultados expressos como percentagens da dose inicial aplicada e, quando apropriado, como $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de solo (com base no peso seco);
- balanço de massa durante e no final dos estudos;
- caracterização da radioactividade não extractável (ligada) ou de resíduos presentes no solo;
- quantificação do CO_2 e outros compostos voláteis libertados;
- gráficos representativos da concentração de substância de ensaio no solo e, quando apropriado, dos produtos de transformação principais, em função do tempo;
- valores de semi-vida ou DT_{50} , DT_{75} e DT_{90} para a substância de ensaio e, quando apropriado, para os produtos de transformação principais, incluindo os limites de confiança;
- estimativa da taxa de degradação abiótica em condições estéreis;
- uma avaliação da cinética de transformação da substância de ensaio e, quando apropriado, dos produtos de transformação principais;
- vias de transformação propostas, quando apropriado;
- discussão e interpretação dos resultados;
- dados experimentais (ou seja, exemplos de cromatogramas, exemplos de cálculos de taxas de transformação e métodos utilizados para identificar os produtos de transformação).

4

REFERÊNCIAS

- (1) US Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.
- (2) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada.
- (3) Directiva 95/36/CE de 14 de Julho de 1995 que altera a Directiva 91/414/CEE relativa à colocação dos produtos fitofarmacêuticos no mercado. Parte A do Anexo II e Parte A do Anexo III: Destino e comportamento no ambiente.
- (4) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1995). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
- (5) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-1. Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Boden - Abbau, Umwandlung und Metabolismus.

- (6) ISO/DIS 11266-1 (1994). Soil Quality -Guidance on laboratory tests for biodegradation of organic chemicals in soil - Part 1 : Aerobic conditions.
- (7) ISO 14239 (1997). Soil Quality – Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.
- (8) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.
- (9) MAFF - Japan 2000 - Draft Guidelines for transformation studies of pesticides in soil - Aerobic metabolism study in soil under paddy field conditions (flooded).
- (10) OCDE (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Itália, 18-20 de Janeiro de 1995.
- (11) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123-157.
- (12) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley – VCH (1998).
- (13) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residue in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984)
- (14) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adoptado a 12 de Maio de 1981)
- (15) ISO 10381-6 (1993). Soil Quality - Sampling - Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
- (16) Anexo V à Dir. 67/548/CEE
- (17) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85-114.
- (18) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).
- (19) Methods of Soil Analysis (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods. A. Klute, Ed.) Agronomy Series No 9, 2ª edição.
- (20) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keelney, Eds. Agronomy Series No 9, 2ª edição.
- (21) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality - General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. Primeira Edição.
- (22) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt am Main.
- (23) Scheffer, F., Schachtschabel, P. (1975). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.
- (24) Anderson, J.P.E., Domsch, K.H. (1978) A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. Soil Biol. Biochem. 10, 215-221.
- (25) ISO 14240-1 and 2 (1997). Soil Quality - Determination of soil microbial biomass - Part 1: Substrate-induced respiration method. Part 2: fumigation-extraction method.
- (26) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and storage of soils for pesticide experiments. In Pesticide Effects on Soil Microflora. L. Somerville, M.P. Greaves, Eds. Taylor & Francis, 45-60.

- (27) Kato, Yasuhiro. (1998). Mechanism of pesticide transformation in the environment: Aerobic and bio-transformation of pesticides in aqueous environment. Proceedings of the 16th Symposium on Environmental Science of Pesticide, 105-120.
- (28) Keuken O., Anderson J.P.E. (1996). Influence of storage on biochemical processes in soil. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 59-63 (SETAC-Europe).
- (29) Stenberg B., Johansson M., Pell M., Sjö Dahl-Svensson K., Stenström J., Torstensson L. (1996). Effect of freeze and cold storage of soil on microbial activities and biomass. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 68-69 (SETAC-Europe).
- (30) Gennari, M., Negre, M., Ambrosoli, R. (1987). Effects of ethylene oxide on soil microbial content and some chemical characteristics. Plant and Soil 102, 197-200.
- (31) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141-146.
- (32) Hamaker, J.W. (1976). The application of mathematical modelling to the soil persistence and accumulation of pesticides. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, 181-199.
- (33) Goring, C.A.I., Laskowski, D.A., Hamaker, J.W., Meikle, R.W. (1975). Principles of pesticide degradation in soil. In "Environmental Dynamics of Pesticides". R. Haque and V.H. Freed, Eds., 135-172.
- (34) Timme, G., Frehse, H., Laska, V. (1986). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. II. Pflanzenschutz - Nachrichten Bayer 39, 188-204.
- (35) Timme, G., Frehse, H. (1980). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. I. Pflanzenschutz - Nachrichten Bayer 33, 47-60.
- (36) Gustafson D.I., Holden L.R. (1990). Non-linear pesticide dissipation in soil; a new model based on spatial variability. Environm. Sci. Technol. 24, 1032-1041.
- (37) Hurlle K., Walker A. (1980). Persistence and its prediction. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 83-122.

ANEXO I

TENSÃO DE ÁGUA, CAPACIDADE DE CAMPO (FC) E CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE ÁGUA (WHC)(1)

Altura da Coluna de Água [cm]	pF ^(a)	bar ^(b)	Observações
10 ⁷	7	10 ⁴	Solo seco
1,6 · 10 ⁴	4,2	16	Ponto de emurchecimento
10 ⁴	4	10	
10 ³	3	1	
6 · 10 ²	2,8	0,6	
3,3 · 10 ²	2,5	0,33 ^(c)	} Gama de Capacidade de campo ^(d)
10 ²	2	0,1	
60	1,8	0,06	
33	1,5	0,033	
10	1	0,01	} WHC (aproximação) Solo saturado de água
1	0	0,001	

(a) pF = log da altura da coluna de água, em centímetros.

(b) 1 bar = 10⁵ Pa.

(c) Corresponde a um teor de água aproximado de 10% na areia, 35% no limo e 45% na argila.

(d) A capacidade de campo não é constante, variando com o tipo de solo, com valores de pF entre 1,5 e 2,5.

A *tensão de água* é medida em centímetros da coluna de água ou em bar. Devido à extensa gama de valores para a tensão de sucção, esta é simplesmente expressa como o valor de pF que é equivalente ao logaritmo da altura da coluna de água, em centímetros.

A *capacidade de campo* é definida como a quantidade de água que pode ser armazenada, contra a gravidade, por um solo natural, 2 dias após um extenso período de precipitação ou após irrigação suficiente. É determinado no solo não perturbado, *in situ*, no campo. Esta medição não é, portanto, aplicável a amostras de solo processadas laboratorialmente. Os valores de FC determinados em solos processados podem apresentar amplas variâncias sistemáticas.

A *capacidade de retenção de água* (WHC) é determinada laboratorialmente em solos não perturbados ou em solos processados, através da saturação de uma coluna de solo com água por transporte capilar. É particularmente útil para solos processados e pode atingir valores até 30% superiores à capacidade de campo (1). Para além disso, é mais fácil a sua determinação experimental do que a determinação de valores fiáveis de FC.

(1) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt am Main.

ANEXO 2

**TEORES DE HUMIDADE DO SOLO (g de água por 100 g de solo seco) DE VÁRIOS TIPOS DE SOLOS
PROVENIENTES DE DIFERENTES PAÍSES**

Tipo de solo	País	Teor de humidade do solo a		
		WHC ¹	pF = 1,8	pF = 2,5
Arenoso	Alemanha	28,7	8,8	3,9
Limo-arenoso	Alemanha	50,4	17,9	12,1
Limo-arenoso	Suiça	44,0	35,3	9,2
Franco-limoso	Suiça	72,8	56,6	28,4
Argilo-limoso	Brasil	69,7	38,4	27,3
Argilo-limoso	Japão	74,4	57,8	31,4
Areno-limoso	Japão	82,4	59,2	36,0
Franco-limoso	EUA	47,2	33,2	18,8
Areno-limoso	EUA	40,4	25,2	13,3

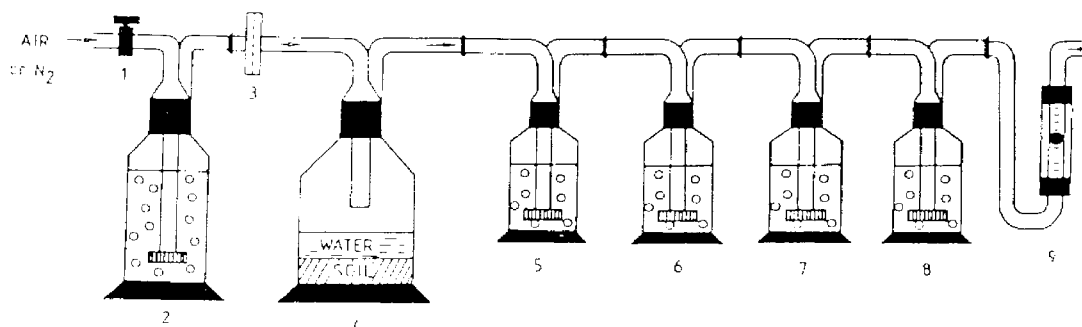
¹ Capacidade de Retenção de Água

ANEXO 3

Figura 1 :

Exemplo de um sistema de fluxo para o estudo da transformação de produtos químicos no solo (1)(2)

- | | | |
|---|--|---|
| 1: válvula de agulha | 4: balão de metabolismo do solo (coberto de água apenas para condições anaeróbias e paddy) | 7,8: frasco com hidróxido de sódio para retenção de CO ₂ e outros compostos voláteis ácidos. |
| 2: frasco de lavagem de gás, contendo água | 5: frasco com etilenoglicol para retenção de compostos orgânicos voláteis | 9: medidor de fluxo. |
| 3: membrana de ultrafiltração (apenas para condições estéreis), porosidade 0,2 µm | 6: frasco com ácido sulfúrico para retenção de compostos voláteis alcalinos | |

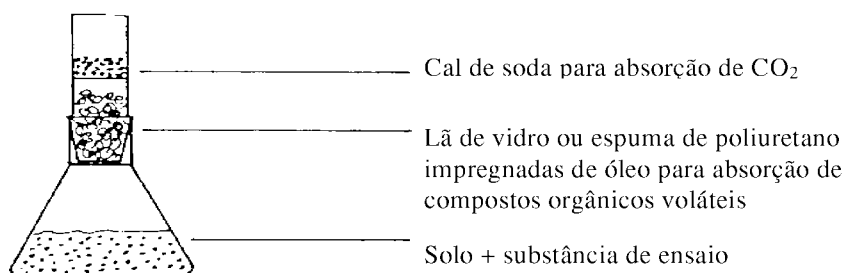
Air or N₂ - Ar ou N₂

Water - Água

Soil - Solo

Figura 2 :

Exemplo de um balão biométrico para o estudo da transformação de produtos químicos no solo (3)



- (1) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123-157.
- (2) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85-114.
- (3) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallylat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141-146.

C.24. TRANSFORMAÇÕES AERÓBIAS E ANAERÓBIAS EM SISTEMAS DE SEDIMENTOS AQUÁTICOS

1. MÉTODO

O presente método baseia-se na publicação OECD TG 308 (2002).

1.1 INTRODUÇÃO

Os produtos químicos podem penetrar em águas superficiais ou profundas por diversas vias, tais como aplicação directa, arrastamento, escoamento superficial, drenagem, eliminação de resíduos, efluentes industriais, domésticos ou agrícolas e deposição atmosférica. O presente Método de Ensaio descreve um método laboratorial para avaliar as transformações aeróbias e anaeróbias de produtos químicos orgânicos em sistemas de sedimentos aquáticos e baseia-se em normas de ensaio anteriormente definidas (1)(2)(3)(4)(5)(6). O número e tipo de sedimentos que devem ser utilizados no presente ensaio foi acordado numa reunião de trabalho da OCDE sobre selecção de solos e sedimentos, que decorreu em Belgirate, Itália, em 1995 (7). Foram ainda feitas recomendações relativas à recolha, manipulação e armazenamento das amostras de sedimentos, tendo como base a Orientação ISO (8). Os estudos aqui descritos são necessários para os compostos químicos utilizados na água ou que são susceptíveis de vir a atingir o ambiente aquático pelas vias supracitadas.

As condições nos sistemas de sedimentos aquáticos naturais são frequentemente aeróbias na fase aquática superior. Enquanto a camada superficial de sedimentos pode ser aeróbia ou anaeróbia, a camada mais profunda é usualmente anaeróbia. De modo a abranger as diferentes condições, o presente documento descreve tanto ensaios aeróbios como anaeróbios. O ensaio aeróbio simula uma coluna de água aeróbia no topo de uma camada aeróbia de sedimentos que é sustentada por um gradiente anaeróbio. O ensaio anaeróbio simula um sistema água-sedimento completamente anaeróbio. Em algumas circunstâncias poderá ser necessário utilizar condições significativamente diferentes das descritas nas presentes recomendações, por exemplo, utilizando núcleos intactos de sedimento ou sedimentos que possam ter sido expostos à substância de ensaio; nestes casos, deverão ser utilizados outros métodos disponíveis (9).

1.2 DEFINIÇÕES

Devem ser sempre utilizadas unidades do Sistema Internacional (SI).

Substância de ensaio: Qualquer substância, quer seja o composto inicial ou um produto de transformação relevante.

Produtos de transformação: Todas as substâncias resultantes de reacções de transformação bióticas ou abióticas da substância de ensaio, incluindo CO₂ e resíduos ligados.

Resíduos ligados: "resíduos ligados" representam compostos presentes no solo, planta ou animal, que, após extracção, persistem na matriz quer na forma da substância inicial quer como um dos seus metabolito(s). O método de extracção não poderá alterar substancialmente nem os próprios compostos nem a estrutura da matriz. A natureza da ligação poderá ser parcialmente determinada utilizando métodos extractivos que alterem a matriz e através de técnicas analíticas sofisticadas. Têm sido identificadas deste modo, por exemplo, ligações do tipo covalente, iónico e de absorção/adsorção, assim como encapsulação. De um modo geral, a formação de resíduos ligados reduz significativamente a bioacessibilidade e a biodisponibilidade das substâncias (10) [adaptado de IUPAC 1984 (11)].

Transformação aeróbia (oxidante): Reacções que ocorrem na presença de oxigénio molecular (12).

Transformação anaeróbia (reductora): Reacções que ocorrem na ausência de oxigénio molecular (12).

Águas naturais: São águas superficiais provenientes de charcos, rios, cursos de água, etc.

Sedimento: É uma mistura de constituintes químicos minerais e orgânicos, em que os últimos incluem compostos com elevado conteúdo de carbono e azoto e de peso molecular elevado. É depositado por águas naturais, com as quais forma uma interface.

Mineralização: Degradação completa de um composto orgânico em CO_2 e H_2O , em condições aeróbias, ou em CH_4 , CO_2 e H_2O , em condições anaeróbias. No contexto do presente método de ensaio, quando se utiliza um composto marcado radioactivamente, o termo mineralização refere-se à sua degradação extensa, envolvendo a oxidação ou redução de um átomo de carbono marcado e a libertação da quantidade correspondente de $^{14}\text{CO}_2$ ou $^{14}\text{CH}_4$, respectivamente.

Semi-vida: $t_{0,5}$, é o tempo necessário para a transformação de 50% da substância de ensaio, nos casos em que a transformação pode ser descrita por uma cinética de primeira ordem. A semi-vida da substância é independente da sua concentração inicial.

DT₅₀ (Tempo de Desaparecimento 50): Tempo necessário para reduzir a concentração inicial da substância de ensaio em 50%.

DT₇₅ (Tempo de Desaparecimento 75): Tempo necessário para reduzir a concentração inicial da substância de ensaio em 75%.

DT₉₀ (Tempo de Desaparecimento 90): Tempo necessário para reduzir a concentração inicial da substância de ensaio em 90%.

1.3 SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

A identificação e quantificação dos produtos de transformação através de métodos espectroscópicos e cromatográficos deverão envolver a utilização de substâncias de referência.

1.4 INFORMAÇÃO SOBRE A SUBSTÂNCIA DE ENSAIO

Embora possam ser utilizadas para a medição da taxa de transformação substâncias de ensaio marcadas isotopicamente ou não marcadas, é de preferir a utilização de material marcado. Para o estudo da via de transformação e para o estabelecimento do balanço de massa, é obrigatória a utilização de compostos marcados. A marcação recomendada é com ^{14}C , embora a utilização de outros isótopos, tais como ^{13}C , ^{15}N , ^3H e ^{32}P , possa igualmente revelar-se útil. A marcação deve ser feita, tanto quanto possível, na(s) zona(s) mais estável(is) da molécula¹. A pureza química e/ou radioquímica da substância de ensaio deve ser de, pelo menos, 95 %.

Antes de se efectuar um ensaio, deve estar disponível a seguinte informação sobre a substância de ensaio:

- (a) solubilidade em água (Método A.6);
- (b) solubilidade em solventes orgânicos;
- (c) pressão de vapor (Método A.4) e constante da Lei de Henry;
- (d) coeficiente de partição n-octanol/água (Método A.8);
- (e) coeficiente de adsorção (K_a , K_f ou K_{oc} , quando apropriado) (Método C.18);
- (f) hidrólise (Método C.7);
- (g) constante de dissociação (pK_a) [Norma de Ensaio OCDE 112] (13);
- (h) estrutura química da substância de ensaio e, quando aplicável, posição da(s) marcação(ões) isotópica(s).

Nota: A temperatura a que se efectuaram estas medições deverá ser indicada no relatório.

Outras informações poderão ser úteis, como, por exemplo, a existência de dados relativos à toxicidade da substância de ensaio para os microrganismos, dados sobre a biodegradabilidade "fácil" e/ou inerente e dados sobre as transformações aeróbias e anaeróbias no solo.

¹ Por exemplo, se a estrutura da substância de ensaio inclui um anel, este deverá ser marcado; no caso de a substância de ensaio possuir dois ou mais anéis, poderá ser necessário efectuar estudos independentes de modo a avaliar o destino de cada um dos anéis marcados e obter informação adequada sobre a formação dos produtos de transformação.

Deverão estar disponíveis métodos analíticos (incluindo métodos de extracção e erradicação) que permitam a identificação e quantificação da substância de ensaio e dos seus produtos de transformação em água e em sedimentos (ver secção 1.7.2).

1.5 PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

O método descrito no presente ensaio utiliza um sistema aeróbio e um sistema anaeróbio de sedimento aquático (ver Anexo I) que permite:

- (i) a medição da taxa de transformação da substância de ensaio num sistema água-sedimento;
- (ii) a medição da taxa de transformação da substância de ensaio no sedimento;
- (iii) a medição da taxa de mineralização da substância de ensaio e/ou dos seus produtos de transformação (caso se utilize a substância de ensaio marcada com ^{14}C);
- (iv) a identificação e quantificação dos produtos de transformação nas fases aquosa e de sedimento, incluindo balanço de massa (caso se utilize a substância de ensaio marcada);
- (v) a medição da distribuição da substância de ensaio e dos seus produtos de transformação entre as duas fases durante um período de incubação no escuro (a fim de evitar, por exemplo, o desenvolvimento explosivo de algas), a temperatura constante. Nos casos em que os dados o permitam, determinam-se valores para as semi-vidas, DT_{50} , DT_{75} e DT_{90} , não devendo estes valores ser extrapolados para muito além do período experimental (ver secção 1.2).

Tanto para os estudos aeróbios como para os estudos anaeróbios, são necessários pelo menos dois sedimentos e as respectivas águas associadas (7). No entanto, poderão existir situações em que deverão ser utilizados mais do que dois sedimentos aquáticos, como, por exemplo, no caso de um produto químico que possa estar presente em ambientes de água doce e/ou marítimos.

1.6 APLICABILIDADE DO ENSAIO

O método é geralmente aplicável a todas as substâncias químicas (não marcadas ou marcadas radioactivamente) para as quais se encontre disponível um método analítico suficientemente sensível e preciso. É aplicável a compostos ligeiramente voláteis, não-voláteis, solúveis ou pouco solúveis em água. O ensaio não deve ser aplicado a compostos químicos muito voláteis a partir da água (por exemplo, fumigantes, solventes orgânicos) já que estes, nas condições experimentais descritas, não podem ser mantidos na água e/ou sedimento.

O método tem sido aplicado ao estudo das transformações sofridas por produtos químicos em águas doces e sedimentos embora, em princípio, possa ser igualmente aplicado a sistemas de estuários e marítimos. Não é, no entanto, adequado para simular as condições de águas correntes (por exemplo, rios) ou de alto mar.

1.7 CRITÉRIOS DE QUALIDADE

1.7.1 Recuperação

A extracção e análise de amostras de água e de sedimento, pelo menos em duplicado, imediatamente após a adição da substância de ensaio, fornece uma primeira indicação relativa à repetitividade do método analítico e à uniformidade do procedimento de aplicação da substância de ensaio. Os valores de recuperação em fases mais adiantadas das experiências são obtidos através dos respectivos balanços de massa (caso se utilize material marcado). Os valores de recuperação devem variar entre 90% e 110% no caso de produtos químicos marcados (6) e entre 70% e 110% no caso de produtos químicos não marcados.

1.7.2 Repetitividade e sensibilidade do método analítico

A repetitividade do método analítico (com excepção da eficiência de extracção inicial) na quantificação da substância de ensaio e dos produtos de transformação pode ser verificada pela análise, em duplicado, do mesmo extracto das amostras de água ou de sedimento, após incubação durante um período de tempo suficiente para que ocorra a formação de produtos de transformação.

O limite de detecção (LD) do método analítico, tanto para a substância de ensaio como para os produtos de transformação, deve corresponder, no mínimo, ao menor dos seguintes valores: $0,01 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de água ou sedimento (como substância de ensaio) ou 1% da dose inicialmente aplicada ao sistema de ensaio. Deve ser igualmente especificado o limite de quantificação (LQ).

1.7.3 **Precisão dos dados de transformação**

A análise de regressão das concentrações da substância de ensaio em função do tempo fornece informação apropriada sobre a precisão da curva de transformação e permite o cálculo dos limites de confiança para as semividas (no caso de cinética de pseudo primeira ordem) ou os valores de DT_{50} e, se adequado, os valores de DT_{75} e de DT_{90} .

1.8 **DESCRIÇÃO DO MÉTODO**

1.8.1 **Sistema de ensaio e aparelhagem**

O estudo deve ser efectuado em recipientes de vidro (por exemplo, frascos, tubos de centrífuga), excepto se existir informação preliminar (tal como coeficientes de partição n-octanol/água, dados de absorção/adsorção, etc.) indicativa de que a substância de ensaio pode aderir ao vidro, caso em que se deve considerar a utilização de um material alternativo (como Teflon). Quando se sabe que a substância de ensaio adere ao vidro, o problema pode ser contornado através da utilização de um ou mais dos seguintes métodos:

- determinar a massa da substância de ensaio e dos produtos de transformação que se encontram absorvidos/adsorvidos ao vidro;
- efectuar uma lavagem de todo o material de vidro com solvente no final do ensaio;
- utilizar produtos formulados (ver igualmente secção 1.9.2);
- utilizar uma maior quantidade de co-solvente para a adição da substância de ensaio ao sistema. Caso se utilize um co-solvente, este não deverá provocar solvólise da substância de ensaio.

Nos Anexos 2 e 3 apresentam-se exemplos de montagens experimentais típicas de ensaio, ou seja, sistemas de fluxo e biométricos, respectivamente (14). Na referência 15 são descritos sistemas de incubação alternativos. A concepção das montagens experimentais deve permitir a troca de ar ou azoto e a retenção de produtos voláteis. As dimensões da montagem experimental devem estar de acordo com os requisitos do ensaio (ver secção 1.9.1). A ventilação pode ser obtida quer por ligeiro borbulhar, quer por passagem de ar ou azoto sobre a superfície da água. No último caso, é aconselhável agitar ligeiramente a água, a partir do topo, por forma a garantir uma melhor distribuição do oxigénio e azoto. Não deve ser utilizado ar sem CO_2 , pois tal pode provocar um aumento do pH da água. Em qualquer dos casos, a perturbação do sedimento é indesejável e deve ser, tanto quanto possível, evitada. Os produtos químicos ligeiramente voláteis devem ser ensaiados num sistema biométrico com ligeira agitação da superfície da água. Podem igualmente ser utilizados recipientes fechados com um espaço livre contendo ar atmosférico ou azoto e pequenos recipientes internos para a retenção de produtos voláteis (16). Durante o ensaio aeróbio, o gás presente na zona superior livre deve ser mudado regularmente de modo a compensar o consumo de oxigénio pela biomassa.

Para a recolha de produtos de transformação voláteis, podem ser utilizados dispositivos de retenção adequados, embora não se restringindo a uma solução de hidróxido de potássio ou de hidróxido de sódio a $1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ para a retenção de dióxido de carbono² e etilenoglicol, ou etanolamina ou uma solução de parafina a 2% em xileno para compostos orgânicos. Os produtos voláteis formados em condições anaeróbias, tais como o metano, podem ser removidos, por exemplo, através de peneiros moleculares. Estes compostos voláteis podem ser sujeitos a combustão, a CO_2 por exemplo, por passagem do gás através de um tubo de quartzo cheio com CuO a uma temperatura de 900°C e recuperando o CO_2 formado num absorvente alcalino (17).

² Uma vez que estas soluções alcalinas de absorção absorvem também o dióxido de carbono proveniente do ar de ventilação e da respiração em experiências aeróbias, devem ser trocadas a intervalos regulares, de modo a evitar a sua saturação e consequente perda de capacidade de absorção.

É necessária aparelhagem laboratorial adequada à análise química da substância de ensaio e dos produtos de transformação (por exemplo, cromatografia gás-líquido (GLC), cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), cromatografia de camada fina (TLC), espectroscopia de massa (MS), cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa (GC-MS), cromatografia líquida acoplada a espectroscopia de massa (LC-MS), ressonância magnética nuclear (NMR), etc.), incluindo sistemas de detecção para produtos marcados radioactivamente, ou não marcados. No caso de se utilizar material marcado radioactivamente, serão ainda necessários um contador de cintilações e uma mufla de combustão oxidante (para a combustão de amostras de sedimento antes da análise de radioactividade).

Outro equipamento corrente de laboratório necessário inclui o material apropriado para determinações físico-químicas e biológicas (ver Tabela 1, secção 1.8.2.2), material de vidro, produtos químicos e reagentes.

1.8.2 **Seleccção e número de sedimentos aquáticos**

Os locais de amostragem devem ser seleccionados de acordo com os objectivos do ensaio para cada situação. Na sua selecção, deve ter-se em conta o historial de possíveis descargas de origem agrícola, industrial ou doméstica que tenham atingido a água no local de captação ou a montante. Não devem ser utilizados sedimentos que tenham sido contaminados com a substância de ensaio ou seus análogos estruturais nos últimos 4 anos.

1.8.2.1 *Seleccção de sedimento*

Para os estudos aeróbios (7), utilizam-se normalmente dois sedimentos que devem diferir em relação ao teor de carbono orgânico e à textura. Um dos sedimentos deve apresentar um elevado teor de carbono orgânico (2,5-7,5%) e uma textura fina, enquanto o outro deve apresentar um baixo teor de carbono orgânico (0,5-2,5%) e uma textura grossa. A diferença mínima entre os teores de carbono orgânico deverá ser de 2%. Define-se "textura fina" como um conteúdo em [argila + silte]³ >50% e "textura grossa" como um conteúdo em [argila + silte] <50%. A diferença entre os conteúdos em [argila + silte] nos dois sedimentos deve ser de, pelo menos, 20%. Nos casos em que o produto químico possa atingir águas marinhas, pelo menos um dos sistemas água-sedimento deve ser de origem marinha.

Para o estudo em condições estritamente anaeróbias, devem ser recolhidas amostras de dois sedimentos (incluindo as respectivas águas) a partir de zonas anaeróbias de massas de água superficiais (7). Tanto a fase sedimentar como a aquosa devem ser cuidadosamente manuseadas e transportadas na ausência de oxigénio.

Para a selecção dos sedimentos a incluir no ensaio podem ser importantes outros parâmetros, que devem ser considerados caso a caso. Por exemplo, a gama de pH dos sedimentos será importante para a análise de produtos químicos cuja transformação e/ou absorção/adsorção possa depender do pH. A dependência da absorção/adsorção relativamente aos valores de pH pode ser indicada pelo pK_a da substância de ensaio.

1.8.2.2 *Caracterização das amostras água-sedimento*

Os parâmetros mais relevantes que deverão ser medidos tanto para a água como para o sedimento e incluídos no relatório (fazendo referência ao método utilizado), assim como a fase do ensaio em que devem ser determinados, encontram-se resumidos na tabela abaixo. As referências (18)(19)(20)(21) descrevem os métodos para determinação desses parâmetros.

Em casos específicos, poderá ser necessário medir, e incluir no relatório, outros parâmetros [por exemplo, para água doce: partículas, alcalinidade, dureza, condutividade, NO_3/PO_4 (razão e valores individuais); para sedimentos: capacidade de troca catiónica, capacidade de retenção de água, carbonato, azoto e fósforo totais; para sistemas marítimos: salinidade]. Para a avaliação das condições redox, especialmente no que diz respeito à transformação anaeróbia, poderá ainda ser útil a análise dos sedimentos e da água relativamente à presença de nitrato, sulfato, ferro biodisponível e outros aceitadores electrónicos possíveis.

³ [Argila + silte] é a fracção mineral do sedimento com dimensão de partícula < 50 μm

Medição de parâmetros para a caracterização das amostras água-sedimento (7)(22)(23)

Parâmetro	Fase do procedimento de ensaio					
	Amostragem de campo	Manuseamento posterior	Início da aclimação	Início do ensaio	Durante o ensaio	Final do ensaio
Água						
Origem	x					
Temperatura	x					
pH	x		x	x	x	x
TOC			x	x		x
Concentração de O ₂ *	x		x	x	x	x
Potencial redox *			x	x	x	x
Sedimento						
Origem	x					
Profundidade da camada	x					
pH		x	x	x	x	x
Distribuição do tamanho das partículas		x				
TOC		x	x	x		x
Biomassa microbiana**		x		x		x
Potencial redox *	Observação (cor/cheiro)		x	x	x	x

* Investigações recentes revelaram que as medições das concentrações de oxigénio e de potenciais redox na água não possuem valor mecanístico nem preditivo relativamente ao crescimento e desenvolvimento de populações microbianas em águas superficiais (24)(25). A determinação da carência bioquímica de oxigénio (BOD, durante a amostragem de campo, no início e no final do ensaio) e das concentrações dos micro/macronutrientes Ca, Mg e Mn (no início e no final do ensaio), para o caso da água, e a medição do N e P totais no caso de sedimentos (durante a amostragem de campo e no final do ensaio) podem constituir instrumentos mais úteis para a interpretação e avaliação das taxas e vias de biotransformação aeróbia.

** Métodos utilizados: Para estudos aeróbios, o método da taxa de respiração microbiana (26); método de fumigação (27) ou contagem de colónias (por exemplo, bactérias, actinomicetes, fungos e colónias totais). Para estudos anaeróbios, taxa de metanogénese.

1.8.2 Recolha, manuseamento e armazenamento

1.8.3.1 Recolha

Para a amostragem de sedimento, deve ser utilizada a versão preliminar da Orientação ISO para a amostragem de sedimentos (8). As amostras de sedimento recolhidas devem incluir toda a camada superior (5 cm a 10 cm) do sedimento. A água associada deve ser recolhida da mesma zona ou local e ao mesmo tempo que o sedimento. Para o estudo anaeróbio, o sedimento e a água associada devem ser recolhidos e transportados na ausência de oxigénio (28) (ver secção 1.8.2.1). Encontram-se descritos na literatura alguns dispositivos de amostragem (8)(23).

1.8.3.2 *Manuseamento*

A separação do sedimento da água é feita por filtração e o sedimento húmido é crivado com um peneiro de 2 mm, utilizando um excesso de água recolhida no mesmo local que é posteriormente rejeitada. Em seguida, misturam-se quantidades conhecidas de sedimento e água, na razão desejada (ver secção 1.9.1), em balões de incubação e preparam-se para o período de aclimação (ver secção 1.8.4). Para o estudo anaeróbio, todos os passos devem ser realizados na ausência de oxigénio (29)(30)(31)(32)(33).

1.8.3.3 *Armazenamento*

A utilização de amostras de sedimento e água recentemente recolhidas é vivamente recomendada. No entanto, caso o seu armazenamento seja necessário, o sedimento e a água devem ser crivados, tal como descrito anteriormente, e armazenados conjuntamente, com o sedimento coberto de água (camada de água de 6 cm a 10 cm), no escuro, a $4 \pm 2^{\circ}\text{C}^4$ por um período máximo de 4 semanas (7)(8)(23). As amostras que se destinam a estudos aeróbios devem ser armazenadas em condições de boa ventilação (por exemplo, em recipientes abertos), enquanto as amostras destinadas a estudos anaeróbios devem ser armazenadas na ausência de oxigénio. Durante o transporte e o armazenamento não poderá verificar-se o congelamento do sedimento e da água ou a secagem do sedimento.

1.8.4 **Preparação das amostras de sedimento/água para o ensaio**

Cada amostra de sedimento/água deverá ser sujeita a um período de aclimação, antes da adição da substância de ensaio. Para tal, cada amostra é colocada no recipiente de incubação que será utilizado no ensaio principal, exactamente nas mesmas condições de incubação do ensaio (ver secção 1.9.1). O período de aclimação decorrerá durante o tempo necessário para atingir uma estabilidade razoável do sistema, reflectido pelos valores de pH, concentração de oxigénio na água, potencial redox do sedimento e da água e separação macroscópica das fases. O período de aclimação deverá ser, geralmente, de uma a duas semanas, não devendo exceder quatro semanas. Os resultados das determinações efectuadas durante este período devem ser incluídos no relatório.

1.9 PROCEDIMENTO DO ENSAIO

1.9.1 **Condições do ensaio:**

O ensaio deve ser efectuado num aparelho de incubação (ver secção 1.8.1), com uma razão volume de água/sedimento entre 3:1 e 4:1 e uma espessura da camada de sedimento de 2,5 cm ($\pm 0,5$ cm).² Recomenda-se ter um mínimo de 50 gr. de sedimento (peso seco) por recipiente de incubação.

O ensaio deve ser efectuado no escuro, a uma temperatura constante compreendida entre 10 e 30 °C. Considera-se adequada uma temperatura de (20 ± 2) °C. Nos casos em que tal for apropriado, dependendo da informação pretendida com o ensaio, poderá considerar-se a utilização de uma temperatura mais baixa (por exemplo, 10 °C). A temperatura de incubação deverá ser sempre monitorizada e indicada no relatório.

² Estudos recentes demonstraram que o armazenamento a 4°C pode conduzir a uma diminuição do teor de carbono orgânico do sedimento que, por sua vez, poderá resultar numa diminuição da actividade microbiana (34).

1.9.2 Tratamento e aplicação da substância de ensaio

O ensaio é realizado com uma única concentração do produto químico⁵. No caso de produtos químicos de protecção de colheitas aplicados directamente em massas de água, a dosagem máxima indicada no rótulo deve ser considerada como a taxa máxima de aplicação calculada com base na área superficial de água do recipiente de ensaio. Em todos os restantes casos, a concentração a utilizar deverá basear-se em previsões de emissões ambientais. Devem adoptar-se precauções que garantam a aplicação de uma concentração adequada da substância de ensaio, de modo a permitir a caracterização da via de transformação e da formação e desaparecimento dos produtos de transformação. Nos casos em que, no início do estudo, as concentrações da substância de ensaio se encontram próximas dos limites de detecção e/ou nos casos em que os principais produtos de transformação não podem ser facilmente detectados quando a sua concentração é de 10% da taxa de aplicação da substância de ensaio, poderá ser necessária a aplicação de doses mais elevadas (por exemplo, 10 vezes superiores). No entanto, caso se utilizem no ensaio concentrações superiores, estas não deverão ter efeitos adversos significativos na actividade microbiana do sistema água-sedimento. A fim de obter uma concentração constante da substância de ensaio em recipientes de diferentes dimensões, poderá considerar-se apropriado ajustar a quantidade da substância de ensaio ao volume em ensaio; neste caso, os cálculos deverão basear-se na relação entre a profundidade da coluna de água no recipiente e a profundidade da água no campo (que se assume como sendo de 100 cm, apesar de poderem ser utilizados outros valores). Ver um exemplo de cálculo no Anexo 4.

Idealmente, a substância de ensaio deve ser adicionada à fase aquosa do sistema de ensaio na forma de solução aquosa. No entanto, quando tal for inevitável, poderão utilizar-se pequenas quantidades de solventes miscíveis em água (tais como acetona, etanol) para a aplicação e distribuição da substância de ensaio, desde que a sua concentração não exceda 1% v/v nem provoque efeitos adversos na actividade microbiana do sistema de ensaio. Durante a preparação da solução aquosa da substância de ensaio, devem tomar-se as precauções necessárias e de modo a assegurar a sua completa homogeneidade— poderá ser necessário utilizar colunas e pré-mistura. Após a adição da solução aquosa ao sistema de ensaio, a fase aquosa deverá ser suavemente misturada, evitando, tanto quanto possível, perturbar o sedimento.

Embora a utilização rotineira de produtos formulados não seja recomendada, já que os ingredientes da formulação podem afectar a distribuição da substância de ensaio e/ou dos produtos de transformação entre as fases aquosa e sedimentar, no caso de substâncias de ensaio pouco solúveis em água, a sua utilização poderá constituir uma alternativa apropriada.

O número de recipientes de incubação depende do número de pontos de amostragem (ver secção 1.9.3), devendo ser incluídos sistemas de ensaio suficientes para permitir a utilização de dois sistemas em cada ponto de amostragem. Nos casos em que se utilizem unidades de controlo para cada sistema de sedimento aquático, estas não deverão ser tratadas com a substância de ensaio. As unidades de controlo poderão ser utilizadas para a determinação da biomassa microbiana do sedimento e do carbono orgânico total da água e do sedimento no final do estudo. Duas das unidades de controlo (ou seja, uma unidade de controlo de cada sedimento aquático) poderão ser utilizadas para monitorizar os parâmetros requeridos, relativamente ao sedimento e à água, durante o período de aclimação (ver Tabela na secção 1.8.2.2). No caso de a aplicação da substância de ensaio envolver a utilização de um solvente, deverão ser incluídas duas unidades de controlo adicionais para a medição dos potenciais efeitos adversos do solvente na actividade microbiana do sistema de ensaio.

1.9.3

Normalmente, a duração da experiência não deve exceder 100 dias (6), e deve prosseguir até que se encontrem estabelecidas as vias de degradação e os perfis de distribuição água/sedimento ou até que 90 % da substância de ensaio se tenha dissipado por transformação e/ou volatilização. Deverão ser incluídos, pelo menos, seis pontos de amostragem (incluindo a amostragem no tempo zero). A duração e o regime de amostragem apropriados para o ensaio poderão ser estabelecidos através da realização de um estudo preliminar opcional (ver secção 1.9.4) ou, no caso de existirem, a partir de dados disponíveis sobre a substância de ensaio provenientes de estudos anteriores. No caso de substâncias de ensaio hidrófobas, poderá ser necessária a inclusão de pontos de amostragem adicionais durante o período inicial do estudo, de modo a permitir a determinação da taxa de distribuição entre as fases aquosa e sedimentar.

⁵ O ensaio com uma segunda concentração poderá ser útil no caso de produtos químicos que atingem águas superficiais por diferentes vias de entrada, resultando em concentrações significativamente diferentes; nestes casos, é necessário garantir que a concentração mais baixa pode ser analisada com precisão suficiente.

No tempo correspondente a cada ponto de amostragem, obtêm-se, para análise, recipientes de incubação em duplicado. O sedimento e a fase aquosa sobrenadante são analisados separadamente⁶. A água superficial deve ser removida cuidadosamente, tendo o cuidado de causar a mínima perturbação possível na fase sedimentar. A extracção e caracterização da substância de ensaio e dos seus produtos de transformação devem ser feitas recorrendo a procedimentos analíticos apropriados. O material que possa ter ficado adsorvido, quer no recipiente de incubação quer nos tubos de ligação aos dispositivos de retenção de substâncias voláteis, deve ser removido.

1.9.4 **Ensaio preliminar opcional**

Nos casos em que a duração e o regime de amostragem não possam ser estimados a partir de outros estudos relevantes sobre a substância de ensaio, pode ser considerado apropriado recorrer a um ensaio preliminar, opcional, que deverá ser efectuado utilizando as mesmas condições experimentais propostas para o estudo definitivo. Caso seja efectuado o ensaio preliminar, as condições experimentais mais relevantes e os resultados devem ser incluídos, de uma forma resumida, no relatório.

1.9.5 **Medições e análise**

A concentração da substância de ensaio e dos seus produtos de transformação na água e no sedimento, em cada ponto de amostragem, deve ser medida e incluída no relatório (expressa em concentração e em percentagem de substância aplicada). De uma forma geral, e a menos que seja apresentada uma justificação razoável para o contrário, devem ser identificados todos os produtos de transformação que sejam detectados em quantidade $\geq 10\%$ da radioactividade aplicada no sistema água-sedimento total, em qualquer ponto de amostragem. Os produtos de transformação cujas concentrações aumentarem continuamente durante o ensaio também devem ser identificados, mesmo nos casos em que a sua concentração não exceda os limites apresentados acima, já que este comportamento poderá ser indicativo de persistência. Esta área deve ser considerada caso a caso e o procedimento adoptado deve ser justificado no relatório.

Os resultados obtidos a partir dos sistemas de retenção de gases/compostos voláteis (CO_2 e outros compostos químicos, ou seja, compostos orgânicos voláteis) devem ser incluídos no relatório para cada um dos tempos de amostragem. As taxas de mineralização deverão igualmente ser incluídas no relatório, assim como os dados sobre os resíduos não-extractáveis (ligados) para cada ponto de amostragem.

2 **DADOS**

2.1 **TRATAMENTO DOS RESULTADOS**

Para cada ponto de amostragem, deverá ser calculado o balanço de massa total ou a recuperação da radioactividade adicionada (ver secção 1.7.1). Os resultados devem ser expressos, no relatório, como percentagem da radioactividade adicionada. A distribuição da radioactividade entre a água e o sedimento deve ser apresentada no relatório, para cada tempo de amostragem, na forma de concentrações e de percentagens.

Devem calcular-se os valores de semi-vida, DT_{50} e, se apropriado, DT_{75} e DT_{90} da substância de ensaio, e respectivos limites de confiança (ver secção 1.7.3). A informação relativa à taxa de dissipação da substância de ensaio em água e no sedimento poderá ser obtida através da utilização de métodos de avaliação adequados, que podem ir desde a aplicação de um modelo de cinética de pseudo-primeira ordem a técnicas empíricas de ajuste de curvas, que aplicam soluções gráficas ou numéricas, e avaliações mais complexas que utilizem, por exemplo, modelos de compartimento único ou compartimentos múltiplos. Para informação mais pormenorizada poderá consultar-se a literatura relevante (35)(36)(37).

⁶ Nos casos em que os produtos de transformação anaeróbia possam ser fácil e rapidamente reoxidados, as condições anaeróbias devem ser mantidas durante a amostragem e a análise.

Todos os métodos disponíveis apresentam vantagens e desvantagens e grande variabilidade em termos de complexidade. Se, por um lado, o pressuposto de uma cinética de primeira-ordem pode ser uma simplificação excessiva dos processos de degradação e de distribuição, a sua aplicação, quando possível, fornece um termo (constante de velocidade ou semi-vida) que é facilmente compreendido e bastante útil em modelação por simulação e no cálculo de concentrações ambientais previstas. A aplicação de métodos empíricos ou de modelos de transformação linear pode resultar num melhor ajuste da curva aos dados experimentais e, portanto, permitir uma melhor estimativa dos valores de semi-vida, DT_{50} e, quando apropriado, DT_{75} e DT_{90} . No entanto, a utilização das constantes assim derivadas é limitada. Por seu lado, a aplicação de modelos de compartimentos permite o cálculo de várias constantes úteis na avaliação de risco, que caracterizam a taxa de degradação nos diferentes compartimentos, bem como a distribuição do produto químico. Estes modelos devem igualmente ser utilizados para estimar as constantes de velocidade para a formação e degradação dos produtos de transformação principais. Em qualquer dos casos, a selecção do método adoptado deve ser justificada no relatório e o experimentador deve demonstrar graficamente e/ou estatisticamente a adequação do ajuste.

3 RELATÓRIO

3.1 RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório deve incluir a seguinte informação:

Substância de ensaio:

- nome vulgar, nome químico, número CAS, fórmula estrutural (com indicação da posição de marcação no caso da utilização de material marcado radioactivamente) e propriedades físico-químicas relevantes;
- pureza (impurezas) da substância de ensaio;
- pureza radioquímica do produto químico marcado e actividade molar (quando apropriado).

Substância de referência :

- nome químico e estrutura das substâncias de referência utilizadas para a caracterização e/ou identificação dos produtos de transformação;

Sedimentos e águas utilizados no ensaio:

- localização e descrição do local de recolha das amostras de sedimento aquático, incluindo, se possível, o historial de contaminação;
- toda a informação relacionada com a recolha, armazenamento (caso tenha sido efectuado) e aclimatação dos sistemas água-sedimento;
- características das amostras de água-sedimento, tal como apresentadas na Tabela da secção 1.8.2.2.

Condições do ensaio:

- sistema de ensaio utilizado (por exemplo, sistema de fluxo, sistema biométrico, modo de ventilação, método de agitação, volume de água, massa de sedimento, espessura da camada de água e da camada de sedimento, dimensão dos recipientes de ensaio, etc.)
- aplicação da substância de ensaio ao sistema de ensaio: concentração de ensaio utilizada, número de repetições (duplicados) e controlos e modo de aplicação da substância de ensaio (por exemplo, utilização de solvente, caso necessário), etc.
- temperatura de incubação;
- tempos de amostragem;
- métodos de extracção e respectivas eficiências, assim como métodos analíticos e limites de detecção;
- métodos para caracterização/identificação dos produtos de transformação;

- alterações ao protocolo do ensaio ou às condições de ensaio durante o estudo.

Resultados:

- dados experimentais de análises representativas (todos os dados experimentais devem ser armazenados no arquivo -BPL);
- repetitividade e sensibilidade dos métodos analíticos utilizados;
- taxas de recuperação (na secção 1.7.1 indicam-se os valores percentuais que deverão verificar-se para um estudo válido);
- tabelas de resultados expressos como percentagens da dose aplicada e em $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de água, sedimento e sistema total (apenas valor percentual) para a substância de ensaio e, caso seja apropriado, para os produtos de transformação e radioactividade não-extractável;
- balanço de massa durante e no final dos estudos;
- representação gráfica da transformação nas fracções de água e de sedimento e no sistema total (incluindo mineralização);
- taxas de mineralização;
- valores de semi-vida, DT_{50} e, caso seja apropriado, DT_{75} e DT_{90} para a substância de ensaio e, quando apropriado, para os produtos de transformação principais, incluindo os limites de confiança em água, sedimento e no sistema total;
- uma avaliação da cinética de transformação da substância de ensaio e, quando apropriado, dos produtos de transformação principais;
- via de transformação proposta, quando apropriado;
- discussão dos resultados.

4

REFERÊNCIAS

- (1) BBA-Guidelines for the examination of plant protectors in the registration process. (1990). Part IV, Section 5-1: Degradability and fate of plant protectors in the water/sediment system. Germany.
- (2) Commission for registration of pesticides: Application for registration of a pesticide. (1991). Part G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air, Section G.2.1 (a). The Netherlands.
- (3) MAFF Pesticides Safety Directorate. (1992). Preliminary guideline for the conduct of biodegradability tests on pesticides in natural sediment/water systems. Ref No SC 9046. United-Kingdom.
- (4) Agriculture Canada: Environmental chemistry and fate. (1987). Guidelines for registration of pesticides in Canada. Aquatic (Laboratory) - Anaerobic and aerobic. Canada. pp 35-37.
- (5) US-EPA: Pesticide assessment guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental fate (1982). Section 162-3, Anaerobic aquatic metabolism.
- (6) SETAC-Europe publication. (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides. Ed. Dr Mark R. Lynch. SETAC-Europe, Brussels.
- (7) OECD Test Guidelines Programme. (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.
- (8) ISO/DIS 5667-12. (1994). Water quality - Sampling - Part 12: Guidance on sampling of bottom sediments.
- (9) US-EPA (1998a). Sediment/water microcosm biodegradation test. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3180). EPA 712-C-98-080.
- (10) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley-VCH (1998).
- (11) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residues in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984).

- (12) OECD Test Guideline 304A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).
- (13) OECD (1993): Guidelines for Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994-2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.
- (14) Scholz, K., Fritz R., Anderson C. and Spiteller M. (1988) Degradation of pesticides in an aquatic model ecosystem. BCPC - Pests and Diseases, 3B-4, 149-158.
- (15) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry (D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds.), Vol. 1, 85-114. J. Wiley & Sons.
- (16) Madsen, T., Kristensen, P. (1997). Effects of bacterial inoculation and non-ionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Environ. Toxicol. Chem. 16, 631-637.
- (17) Steber, J., Wierich, P. (1987). The anaerobic degradation of detergent range fatty alcohol ethoxylates. Studies with ^{14}C -labelled model surfactants. Water Research 21, 661-667.
- (18) Black, C.A. (1965). Methods of Soil Analysis. Agronomy Monograph No. 9. American Society of Agronomy, Madison.
- (19) APHA (1989). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (17th edition). American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington D.C.
- (20) Rowell, D.L. (1994). Soil Science Methods and Applications. Longman.
- (21) Light, T.S. (1972). Standard solution for redox potential measurements. Anal. Chemistry 44, 1038-1039.
- (22) SETAC-Europe publication (1991). Guidance document on testing procedures for pesticides in freshwater mesocosms. From the Workshop "A Meeting of Experts on Guidelines for Static Field Mesocosms Tests", 3-4 July 1991.
- (23) SETAC-Europe publication. (1993). Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. From the Workshop On Sediment Toxicity Assessment (WOSTA), 8-10 November 1993. Eds.: I.R. Hill, P. Matthiessen and F. Heimbach.
- (24) Vink, J.P.M., van der Zee, S.E.A.T.M. (1997). Pesticide biotransformation in surface waters: multivariate analyses of environmental factors at field sites. Water Research 31, 2858-2868.
- (25) Vink, J.P.M., Schraa, G., van der Zee, S.E.A.T.M. (1999). Nutrient effects on microbial transformation of pesticides in nitrifying waters. Environ. Toxicol. 329-338.
- (26) Anderson, T.H., Domsch, K.H. (1985). Maintenance carbon requirements of actively-metabolising microbial populations under *in-situ* conditions. Soil Biol. Biochem. 17, 197-203.
- (27) ISO-14240-2. (1997). Soil quality - Determination of soil microbial biomass - Part 2: Fumigation-extraction method.
- (28) Beelen, P. Van and F. Van Keulen. (1990), The Kinetics of the Degradation of Chloroform and Benzene in Anaerobic Sediment from the River Rhine. Hydrobiol. Bull. 24 (1), 13-21.
- (29) Shelton, D.R. and Tiedje, J.M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. App. Environ. Microbiol. 47, 850-857.
- (30) Birch, R.R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19, 1527-1550.
- (31) Pagga, U. and Beimborn, D.B. (1993). Anaerobic biodegradation tests for organic compounds. Chemosphere 27, 1499-1509.
- (32) Nuck, B.A. and Federle, T.W. (1986). A batch test for assessing the mineralisation of ^{14}C -radiolabelled compounds under realistic anaerobic conditions. Environ. Sci. Technol. 30, 3597-3603.
- (33) US-EPA (1998b). Anaerobic biodegradability of organic chemicals. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3400). EPA 712-C-98-090.

- (34) Sijm, Haller and Schrap (1997). Influence of storage on sediment characteristics and drying sediment on sorption coefficients of organic contaminants. *Bulletin Environ. Contam. Toxicol.* 58, 961-968.
- (35) Timme, G., Frehse H. and Laska V. (1986) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues II. *Pflanzenschutz - Nachrichten Bayer*, 39, 187 - 203.
- (36) Timme, G., Frehse, H. (1980) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues I. *Pflanzenschutz - Nachrichten Bayer*, 33, 47 - 60.
- (37) Carlton, R.R. and Allen, R. (1994). The use of a compartment model for evaluating the fate of pesticides in sediment/water systems. *Brighton Crop Protection Conference - Pest and Diseases*, pp 1349-1354.

ANEXO I

ORIENTAÇÃO RELATIVA AOS SISTEMAS DE ENSAIO AERÓBIOS E ANAERÓBIOS

Sistema de ensaio aeróbio

O sistema de ensaio aeróbio descrito no presente método de ensaio é constituído por uma camada aeróbia de água (com concentrações típicas de oxigénio compreendidas entre 7 e 10 mg·l⁻¹) e uma camada de sedimento, aeróbio à superfície e anaeróbia abaixo da superfície [os potenciais redox médios típicos (E_H) na zona anaeróbia do sedimento têm valores entre -80 e -190 mV]. A manutenção de uma quantidade suficiente de oxigénio na camada de ar é conseguida pela passagem de uma corrente de ar humedecido sobre a superfície da água em cada unidade de incubação.

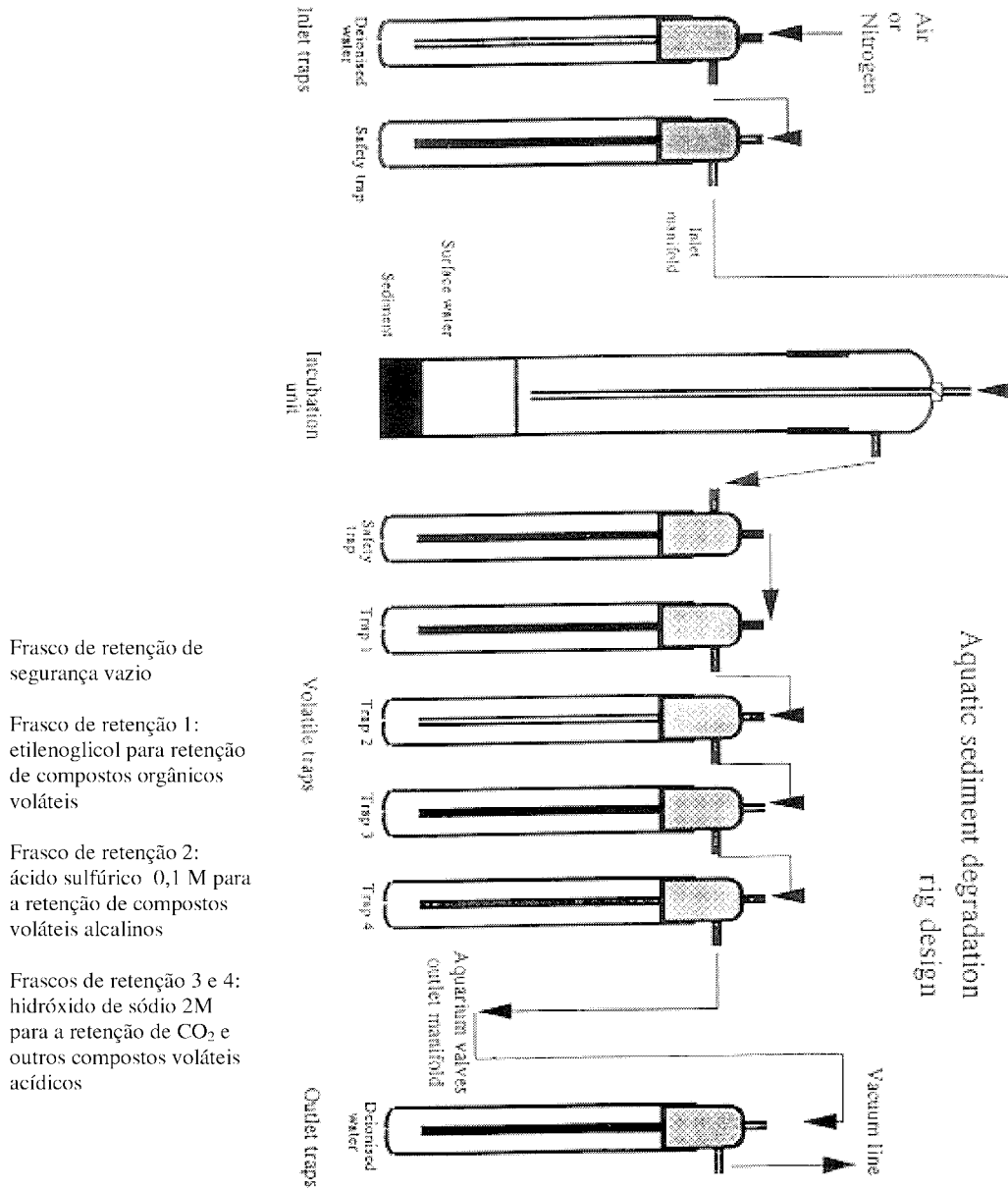
Sistema de ensaio anaeróbio

No caso do sistema de ensaio anaeróbio, o procedimento de ensaio é essencialmente semelhante ao descrito para o sistema aeróbio, excepto no que respeita à camada de ar presente nos recipientes de ensaio. No sistema anaeróbio, a manutenção de azoto no espaço livre deverá ser conseguida à custa da passagem de uma corrente de azoto humedecido sobre a superfície da água em cada unidade de incubação. O sedimento e a água são considerados anaeróbios se o seu potencial redox (E_H) for inferior a -100 mV.

No ensaio anaeróbio, a avaliação da mineralização inclui a medição do dióxido de carbono e metano libertados.

ANEXO 2

EXEMPLO DE UM APARELHO DE FLUXO



Aquatic sediment degradation rig design – Esquema do equipamento para estudo da degradação em sedimentos aquáticos

Air or Nitrogen – Ar ou Azoto

Inlet traps – Frascos de retenção de entrada

Inlet manifold – Distribuidor de entrada

Sediment – Sedimento

Safety trap – Frasco de retenção de segurança

Trap 2 – Frasco de retenção 2

Trap 4 – Frasco de retenção 4

Aquarium valves outlet manifold – Distribuidor de saída com válvulas de aquário

Vacuum line – Linha de vácuo

Outlet traps – Frascos de retenção de saída

Deionised water – Água desionizada

Safety trap – Frasco de retenção de segurança

Surface water – Água superficial

Incubation unit – Unidade de incubação

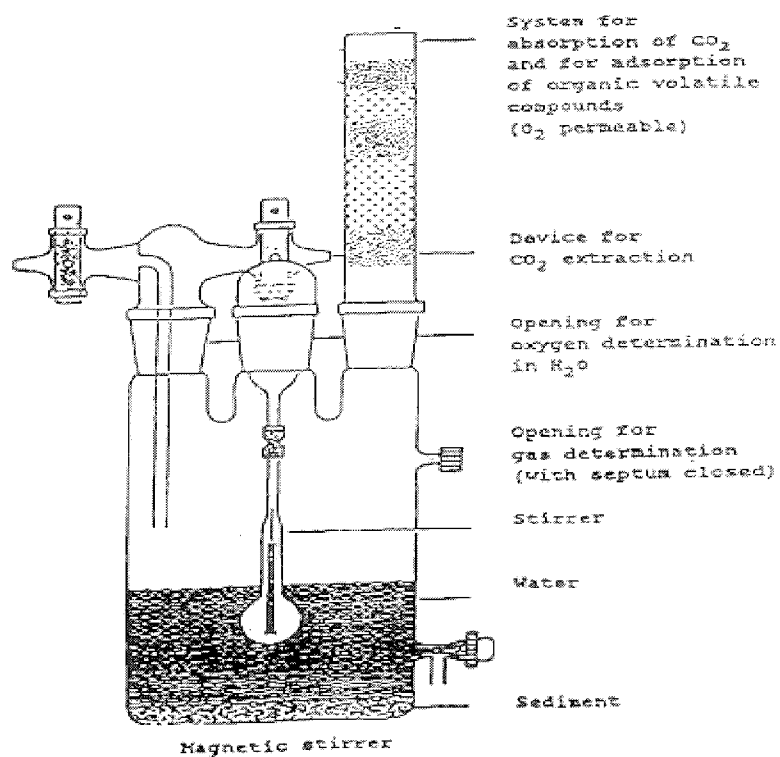
Trap 1 – Frasco de retenção 1

Trap 3 – Frasco de retenção 3

Deionised water – Água desionizada

ANEXO 3

EXEMPLO DE UM APARELHO BIOMÉTRICO



System for absorption of CO₂ and for adsorption of organic volatile compounds (O₂ permeable) – Sistema para a absorção de CO₂ e adsorção de compostos orgânicos voláteis (permeável a O₂)

Device for CO₂ extraction – Dispositivo para a extracção de CO₂

Opening for oxygen determination in H₂O – Abertura para determinação de oxigénio na água

Opening for gas determination (with septum closed) – Abertura para determinação de gases (fechada com septo)

Stirrer – Agitador

Water – Água

Sediment – Sedimento

Magnetic stirrer – Agitador magnético

ANEXO 4

EXEMPLO DE CÁLCULO PARA A DOSE DE SUBSTÂNCIA DE ENSAIO A APLICAR AOS RECIPIENTES DE ENSAIO

Diâmetro interno do cilindro:	= 8 cm
Profundidade da coluna de água, excluindo o sedimento:	= 12 cm
Área superficial: $3,142 \times 4^2$	= $50,3 \text{ cm}^2$
Taxa de aplicação: 500 g de substância de ensaio/ha	correspondem a $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$
Total em μg : $5 \times 50,3$	= $251,5 \mu\text{g}$
Ajuste da quantidade relativamente a uma profundidade de 100 cm:	
$12 \times 251,5 \div 100$	= $30,18 \mu\text{g}$
Volume da coluna de água: $50,3 \times 12$	= 603 ml
Concentração na água: $30,18 \div 603$	= $0,050 \mu\text{g}/\text{ml}$ ou $50 \mu\text{g}/\text{l}$