

Edição em língua
portuguesa

Legislação

Índice

I Actos cuja publicação é uma condição da sua aplicabilidade

- ★ **Directiva 2000/32/CE da Comissão, de 19 de Maio de 2000, que adapta ao progresso técnico pela vigésima sexta 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⁽¹⁾** 1
- ★ **Directiva 2000/33/CE da Comissão, de 25 de Abril de 2000, que adapta ao progresso técnico pela vigésima sétima vez a Directiva 67/548/CEE do Conselho, relativa à aproximação das disposições legislativas, regulamentares e administrativas respeitantes à classificação, embalagem e rotulagem das substâncias perigosas⁽¹⁾** 90

II Actos cuja publicação não é uma condição da sua aplicabilidade

Comissão

2000/368/CE:

- ★ **Decisão da Comissão, de 19 de Maio de 2000, que corrige a Directiva 98/98/CE que adapta ao progresso técnico pela vigésima quinta 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⁽¹⁾ [notificada com o número C(2000) 1333]** 108

Preço: 24,50 EUR

⁽¹⁾ Texto relevante para efeitos do EEE.

PT

Os actos cujos títulos são impressos em tipo fino são actos de gestão corrente adoptados no âmbito da política agrícola e que têm, em geral, um período de validade limitado.

Os actos cujos títulos são impressos em tipo negro e precedidos de um asterisco são todos os restantes.

I

(Actos cuja publicação é uma condição da sua aplicabilidade)

DIRECTIVA 2000/32/CE DA COMISSÃO**de 19 de Maio de 2000**

que adapta ao progresso técnico pela vigésima sexta 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 perigosas⁽¹⁾, com a última redacção que lhe foi dada pela Directiva 1999/33/CE do Parlamento Europeu e do Conselho⁽²⁾ e, nomeadamente, o seu artigo 28.º,

Considerando o seguinte:

- (1) O anexo I da Directiva 67/548/CEE contém uma lista de substâncias perigosas, com elementos da classificação e da rotulagem de cada uma. Os conhecimentos científicos e técnicos actuais indicam dever ser adaptada a lista de substâncias perigosas constante do referido anexo. Algumas versões linguísticas da directiva requerem correcções em secções específicas do preâmbulo e do quadro A do anexo I.
- (2) O anexo III da Directiva 67/548/CEE contém uma lista de frases indicando a natureza dos riscos especiais atribuídos a substâncias e preparações perigosas. O anexo IV da Directiva 67/548/CEE contém uma lista de frases indicando as instruções de segurança relativamente a substâncias e preparações perigosas. O anexo VI da Directiva 67/548/CEE contém um guia para a classificação e a rotulagem de substâncias e preparações perigosas. Algumas versões linguísticas da directiva requerem correcções em secções específicas dos anexos III, IV e VI.
- (3) 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 necessário adaptar o referido anexo ao progresso técnico.

- (4) O anexo IX da Directiva 67/548/CEE contém as disposições relativas a fechos de segurança para crianças. Tais disposições devem ser adaptadas e actualizadas. É necessário alargar o âmbito da utilização de fechos de segurança para crianças.
- (5) O disposto na presente directiva está em conformidade com o parecer do Comité para a adaptação ao progresso técnico das directivas que visam a eliminação dos entraves técnicos ao comércio no sector das substâncias e preparações perigosas,

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 Q no anexo 1A da presente directiva substitui a nota correspondente no preâmbulo;
 - b) As linhas no anexo 1B da presente directiva substituem as linhas correspondentes na tabela A;
 - c) As entradas no anexo 1C da presente directiva substituem as entradas correspondentes;
 - d) As entradas que figuram no anexo 1D da presente directiva são aditadas.
2. A frase de risco no anexo 2 da presente directiva substitui a frase correspondente no anexo III.
3. O anexo IV é alterado do seguinte modo:
 - a) As frases de segurança no anexo 3A da presente directiva substituem as frases correspondentes no anexo IV;

(*) Adoptada depois da vigésima sétima adaptação.

⁽¹⁾ JO 196 de 16.8.1967, p. 1.

⁽²⁾ JO L 199 de 30.7.1999, p. 57.

- b) As frases combinadas de segurança no anexo 3B da presente directiva substituem as frases correspondentes no anexo IV.
4. A parte B do anexo V é modificada da seguinte forma:
- a) O texto do anexo 4A da presente directiva substitui o capítulo B.10;
- b) O texto do anexo 4B da presente directiva substitui o capítulo B.11;
- c) O texto do anexo 4C da presente directiva substitui o capítulo B.12;
- d) O texto do anexo 4D da presente directiva substitui os capítulos B.13 e B.14;
- e) O texto do anexo 4E da presente directiva substitui o capítulo B.17;
- f) O texto do anexo 4F da presente directiva substitui o capítulo B.23. O título do capítulo B.23 na nota explicativa é concomitantemente alterado;
- g) O texto do anexo 4G da presente directiva é aditado.
5. O quarto travessão na introdução geral à parte C do anexo V é eliminado.
6. Os textos do anexo 5 da presente directiva substituem os textos correspondentes no anexo VI.
7. O anexo IX é alterado nos termos do anexo 6 da presente directiva.

Artigo 2.º

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

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

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

Artigo 3.º

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

Artigo 4.º

Os Estados-Membros são os destinatários da presente directiva.

Feito em Bruxelas, em 19 de Maio de 2000.

Pela Comissão
Margot WALLSTRÖM
Membro da Comissão

ANEXO 1A

PREÂMBULO DO ANEXO I

Explicação das notas relativas à identificação e rotulagem de substâncias

DA:

Note Q:

Klassificeringen som kræftfremkaldende kan udelades for fibre, som opfylder en af følgende betingelser:

- en kortvarig biopersistensprøve ved inhalation har vist, at fibre, der er længere end 20 µm, har en vægtet halveringstid på mindre end 10 dage
- en kortvarig biopersistensprøve ved intratrakeal instillation har vist, at fibre, der er længere end 20 µm, har en vægtet halveringstid på mindre end 40 dage
- en egnet intra-peritoneal prøve ikke har vist kræftfremkaldende virkning, eller
- en egnet langvarig inhalationsprøve ikke har vist relevante sygdomsfremkaldende virkninger eller neoplastiske forandringer.

SV:

Note Q:

Ämnet behöver inte klassificeras som cancerframkallande om det kan visas att det uppfyller ett av följande villkor:

- ett korttidstest för att bestämma den biologiska beständigheten vid inhalation har visat att fibrer längre än 20 µm har en viktad halveringstid på mindre än 10 dagar
- ett korttidstest för att bestämma den biologiska beständigheten vid intratrakeal instillation har visat att fibrer längre än 20 µm har en viktad halveringstid på mindre än 40 dagar
- ett lämpligt intraperitonealt test har inte givit belägg för förhöjd cancerogenitet
- frånvaro av relevant patogenitet eller neoplastiska förändringar i ett lämpligt långtids inhalationstest.

(Versão ES não afectada)

(Versão DE não afectada)

(Versão EL não afectada)

(Versão EN não afectada)

(Versão FR não afectada)

(Versão IT não afectada)

(Versão NL não afectada)

(Versão PT não afectada)

(Versão FI não afectada)

ANEXO IB

TABELA A

Z	Symb.	ES	DA	DE	EL	EN	FI	FR	IT	NL	PT	SV
«18	Ar	Argón	Argon	Argon	Αργόν	Argon	Argon	Argon	Argon	Argon	Árgon	Argon»
«64	Gd	Gadolínio	Gadolinium	Gadolinium	Γαδολίνιο	Gadolinium	Gadolinium	Gadolinium	Gadolinio	Gadolinium	Gadólínió	Gadolinium»

ANEXO IC

Número de índice	Designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	N.º CE	N.º CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
006-011-00-7	carbanilo (ISO) carbanil (DCI) metilcarbamato de 1-naftilo		200-555-0	63-25-2	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22 N; R50	Xn; N R: 22-40-50 S: (2-)22-24-36/37-46-61		
006-013-00-8	metame-sódio (ISO) N-metilditiocarbamato de sódio		205-293-0	137-42-8	Xn; R22 R31 C; R34 R43 N; R50-53	C; N R: 22-31-34-43-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61		
006-015-00-9	diuron (ISO)		206-354-4	330-54-1	Carc. Cat. 3; R40 Muta. Cat. 3; R40 Xn; R22-48/22 N; R50-53	Xn; N R: 22-40-48/22-50/53 S: (2-)13-22-23-37-46-60-61		
006-016-00-4	propoxur (ISO) metilcarbamato de 2-isopropoxifenilo		204-043-8	114-26-1	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2-)37-45-60-61		
006-017-00-X	aldicarbe (ISO) 2-metil-2-(metililo) propionaldeido-O-(metilcarbamoil) oxima		204-123-2	116-06-3	T+; R26/28 T; R24 N; R50-53	T+; N R: 24-26/28-50/53 S: (1/2-)22-36/37-45-60-61		
006-018-00-5	aminocarbe (ISO) metilcarbamato de 4-dimetilamino-m-tolilo		217-990-7	2032-59-9	T; R24/25 N; R50-53	T; N R: 24/25-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61		
006-019-00-0	di-alato (ISO) diisopropiltiocarbamato de S-2,3-dicloroalilo		218-961-1	2303-16-4	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-40-50/53 S: (2-)25-36/37-60-61		
006-020-00-6	barbane (ISO) 3-clorofenilcarbamato de 4-cloro-2-butimilo		202-930-4	101-27-9	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)24-36/37-60-61		
006-023-00-2	mercaptopdimetur (ISO) metiocarbe metilcarbamato de 4-metililo-3,5-xililo		217-991-2	2032-65-7	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2-)22-37-45-60-61		
006-024-00-8	proxana-sódio (ISO) ditiocarbonato de O-isopropilo e de sódio		205-443-5	140-93-2	Xn; R22 Xi; R38 N; R51-53	Xn; N R: 22-38-51/53 S: (2-)13-61		

Número de índice	Designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	N.º CE	N.º CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
006-026-00-9	carbofuran (ISO) metilcarbamato de 2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofurane-7-ilo		216-353-0	1563-66-2	T+; R26/28 N; R50-53	T+; N R: 26/28-50/53 S: (1/2)36/37-45-60-61		
006-028-00-X	dinobutona (ISO) carbonato de 2-sec-butil-4,6-dinitrofenilo e isopropilo		213-546-1	973-21-7	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2)37-45-60-61		
006-029-00-5	dioxacarbe (ISO) metilcarbamato de 2-(1,3-dioxolano-2-il)fenilo		230-253-4	6988-21-2	T; R25 N; R51-53	T; N R: 25-51/53 S: (1/2)37-45-61		
006-033-00-7	metoxurone (ISO) N-(3-cloro-4-metoxifenil)-N,N-dimetilureia		243-433-2	19937-59-8	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
006-034-00-2	pebulato (ISO) butil (etil) tiocarbamato de S-propilo		214-215-4	1114-71-2	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2)23-61		
006-035-00-8	pirimicarbe (ISO) N,N-dimetilcarbamato de 2-dimetilamino-5,6-dimetil-4-pirimidinilo		245-430-1	23103-98-2	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2)22-37-45-60-61		
006-037-00-9	promecarbe (ISO) metilcarbamato de 5-isopropil-m-tolilo metilcarbamato de 5-metil-m-cumenilo		220-113-0	2631-37-0	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2)24-37-45-60-61		
006-038-00-4	sulfalato (ISO) dietiltiocarbamato de 2-cloroalilo	E	202-388-9	95-06-7	Carc. Cat. 2; R45 Xn; R22 N; R50-53	T; N R: 45-22-50/53 S: 53-45-60-61		
006-039-00-X	trialato (ISO) diisopropiltiocarbamato de S-2,3,3-tricloroalilo		218-962-7	2303-17-5	Xn; R22-48/22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-48/22-50/53 S: (2)24-37-60-61		
006-042-00-6	monurone (ISO) 3-(4-clorofenil)-1,1-dimetilureia		205-766-1	150-68-5	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-40-50/53 S: (2)36/37-60-61		
006-043-00-1	monuron-TCA tricloroacetato de 3-(4-clorofenil)-1,1-dimetiltiurónio		—	140-41-0	Xi; R36/38 Carc. Cat. 3; R40 N; R50-53	Xn; N R: 36/38-40-50/53 S: (2)36/37-60-61		

Número de índice	Designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	N.º CE	N.º CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
006-045-00-2	metomil (ISO) metilcarbamato de metilto-1-etilidenoamino		240-815-0	16752-77-5	T+; R28 N; R50-53	T+; N R: 28-50/53 S: (1/2-22-36/37-45-60-61		
006-046-00-8	bendiocarbe (ISO) metilcarbamato de 2,2-dimetil-1,3-benzodioxole-4-ilo		245-216-8	22781-23-3	T; R23/25 Xn; R21 N; R50-53	T; N R: 21-23/25-50/53 S: (1/2-22-36/37-45-60-61		
006-047-00-3	bufencarbe (ISO) metilcarbamato de 3-(pent-2-il)fenilo-metilcarbamato de 3-(pent-3-il)fenilo (3:1), contendo 35 % de uma mistura de isómeros 2 e 4		—	8065-36-9	T; R24/25 N; R50-53	T; N R: 24/25-50/53 S: (1/2-28-36/37-45-60-61		
006-048-00-9	etiofencarbe (ISO) metilcarbamato de 2-etiltiometilfenilo		249-981-9	29973-13-5	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-60-61		
006-050-00-X	fenurão-tricloroacetato tricloroacetato de 1,1-dimetilfenilcarbamoi-lamónio		—	4482-55-7	Xi; R38 N; R50-53	Xi; N R: 38-50/53 S: (2-60-61		
006-053-00-6	isoprocarbe (ISO) metilcarbamato de o-cumenilo		220-114-6	2631-40-5	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-60-61		
006-054-00-1	mexacarbato (ISO) metilcarbamato de 4-dimetilamino-3,5-xililo		206-249-3	315-18-4	T+; R28 Xn; R21 N; R50-53	T+; N R: 21-28-50/53 S: (1/2-36/37-45-60-61		
006-057-00-8	nitrapirina (ISO) 2-cloro-6-triclorometilpiridina		217-682-2	1929-82-4	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2-24-61		
006-060-00-4	oxicarboxina (ISO) 5,6-diidro-2-metil-1,4-oxatino-3-carboxamili de 4,4-dióxido		226-066-2	5259-88-1	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2-61		
006-069-00-3	tiofanato-metilo (ISO)		245-740-7	23564-05-8	Muta. Cat. 3; R40 N; R50-53	Xn; N R: 40-50/53 S: (2-36/37-60-61		
006-070-00-9	furmecycloox N-ciclohexil-2,5-dimetil-N-metoxi-3-furamida		262-302-0	60568-05-0	Carc. Cat. 3; R40 N; R50-53	Xn; N R: 40-50/53 S: (2-36/37-60-61		

Número de índice	Designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	N.º CE	N.º CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
006-088-00-7	Benfuracarbe (ISO) N-[2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-iloxi-carbonil(metil)amino]o]-N-isopropil-β-alaninato de etilo		—	82560-54-1	T; R23/25 N; R50-53	T; N R: 23/25-50/53 S: (1/2-3)6/37-45-60-61		
007-012-00-5	N,N-dimetilhidrazina	E	200-316-0	57-14-7	F; R11 Carc. Cat. 2; R45 T; R23/25 C; R34 N; R51-53	F; T; N R: 45-11-23/25-34-51/53 S: 53-45-61		
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; R45-23/24/25 3% ≤ C < 25%: T; R45-20/21/22 0,01% ≤ C < 3%: T; R45	
009-003-00-1	ácido fluorídrico em solução ... %	B	231-634-8	7664-39-3	T+; R26/27/28 C; R35	T+; C R: 26/27/28-35 S: (1/2-7)9-26-36/37-45	C ≥ 7%: T+; C; R26/27/28-35 1% ≤ C < 7%: T; R23/24/25-34 0,1% ≤ C < 1%: Xn; R20/21/22-36/37/38	
015-039-00-9	azinfos metilo (ISO) fosforoditoato de O,O-dimetilo e 4-oxobenzotriazina-3-ilmetilo		201-676-1	86-50-0	T+; R26/28 T; R24 R43 N; R50-53	T+; N R: 24-26/28-43-50/53 S: (1/2-28-36/37-45-60-61		
015-048-00-8	fentone (ISO) fosforotioato de O,O-dimetilo e O-(4-metilto- <i>m</i> -tolido)		200-231-9	55-38-9	Muta. Cat. 3; R40 T; R23-48/25 Xn; R21/22 N; R50-53	T; N R: 21/22-23-40-48/25-50/53 S: (1/2-3)6/37-45-60-61		
015-056-00-1	azinfos-etilo (ISO) ditiófosfato de O,O-dietilo e 4-oxobenzotriazina-3-ilmetilo		220-147-6	2642-71-9	T+; R28 T; R24 N; R50-53	T+; N R: 24-28-50/53 S: (1/2-28-36/37-45-60-61		
015-140-00-8	triazofos (ISO) tíofosfato de O,O-dietilo e de O-1-fenil-1,2,4-triazol-3-ilo		245-986-5	24017-47-8	T; R23/25 Xn; R21 N; R50-53	T; N R: 21-23/25-50/53 S: (1/2-3)6/37-45-60-61		
016-013-00-X	dicloreto de enxofre		234-129-0	10545-99-0	R14 C; R34 N; R50	C; N R: 14-34-50 S: (1/2-2)6-36/37/39-45-61	C ≥ 10%: C; R34 5% ≤ C < 10%: Xi; R36/37/38	

Número de índice	Designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	N.º CE	N.º CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
016-014-00-5	tetracloreto de enxofre		—	13451-08-6	R14 C: R34 N: R50	C: N R: 14-34-50 S: (1/2)-26-36/37/39-45-61	C ≥ 10%: C: R34 5% ≤ C < 10%: Xi: R36/37/38	
016-023-00-4	sulfato de dimetilo	E	201-058-1	77-78-1	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R40 T+; R26 T; R25 C: R34 R43	T+ R: 45-25-26-34-43 S: 53-45	C ≥ 25%: T+; R45-25-26-34-43 10% ≤ C < 25%: T+; R45-22-26-34-43 7% ≤ C < 10%: T+; R45-22-26-36/37/38-43 5% ≤ C < 7%: T; R45-22-23-36/37/38-43 3% ≤ C < 5%: T; R45-22-23-43 1% ≤ C < 3%: T; R45-23-43 0.1% ≤ C < 1%: T; R45-20 0,01% ≤ C < 0,1%: T; R45	
016-024-00-X	dimexano (ISO) dissulfureto de bis(metoxitiocarbonilo)		215-993-8	1468-37-7	Xn; R22 N: R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2)-60-61		
016-071-00-6	3-amino-6,1,3-dicloro-10-((3-((4-cloro-6-(2-sulfonilamino)-1,3,5-triazina-2-il)amino)propil)amino)-4,1,1-trifenoxydioxazino dissulfonato de trissódio		410-130-3	136248-03-8	R43	Xi R: 43 S: (2)-22-24-37		
022-001-00-5	tetracloreto de titânio		231-441-9	7550-45-0	R14 C: R34	C R: 14-34 S: (1/2)-7/8-26-36/37/39-45	C ≥ 10%: C: R34 5% ≤ C < 10%: Xi: R36/37/38	
030-004-00-8	dimetilzinco [1] dimetilzinco [2]		208-884-1 [1] 209-161-3 [2]	544-97-8 [1] 557-20-0 [2]	R14 F: R17 C: R34 N: R50-53	F; C; N R: 14-17-34-50/53 S: (1/2)-16-43-45-60-61		
050-002-00-0	ciexatine (ISO) hidróxido de tri(cicloexil)estanho		236-049-1	13121-70-5	Xn; R20/21/22 N: R50-53	Xn; N R: 20/21/22-50/53 S: (2)-13-60-61		

Número de índice	Designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	N.º CE	N.º CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
050-012-00-5	tetraciclohexildestano [1] clorotriciclohexildestano [2] butiltriciclohexildestano [3]		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 ≥ 1%; Xn; R20/21/22	1
050-017-00-2	éter fenbutatina éter bis [tris(2-metil-2-fenilpropil)estanho]		236-407-7	13356-08-6	T+; R26 Xi; R36/38 N; R50/53	T+; N R: 26-36/38-50/53 S: (1/2)-28-36/37-45-60-61		
082-009-00-X	amarelo de sulfocromato de chumbo [Esta substância é identificada no Colour Index pelo Colour Index Constitution Number, C.I. 77603.]		215-693-7	1344-37-2	Carc. Cat. 3; R40 Repr. Cat. 1; R61 Repr. Cat. 3; R62 R33 N; R50-53	T; N R: 61-33-40-50/53-62 S: 53-45-60-61		1
082-010-00-5	vermelho de cromato molibdato sulfato de chumbo [Esta substância é identificada no Colour Index pelo Colour Index Constitution Number, C.I. 77605.]		235-759-9	12656-85-8	Carc. Cat. 3; R40 Repr. Cat. 1; R61 Repr. Cat. 3; R62 R33 N; R50-53	T; N R: 61-33-40-50/53-62 S: 53-45-60-61		1
601-024-00-X	cumeno [1] propilbenzeno [2]		202-704-5 [1] 203-132-9 [2]	98-82-8 [1] 103-65-1 [2]	R10 Xn; R65 Xi; R37 N; R51-53	Xn; N R: 10-37-51/53-65 S: (2)-24-37-61-62		4
601-032-00-3	benzo[<i>a</i>]pireno benzo[<i>def</i>]criseno		200-028-5	50-32-8	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 2; R46 Repr. Cat. 2; R60-61 N; R50-53	T; N R: 45-46-60-61-50/53 S: 53-45-60-61		
601-034-00-4	benze[<i>e</i>]acefenantreleno		205-911-9	205-99-2	Carc. Cat. 2; R45 N; R50-53	T; N R: 45-50/53 S: 53-45-60-61		
602-035-00-2	1,4-diclorobenzeno <i>p</i> -diclorobenzeno		203-400-5	106-46-7	Xi; R36 N; R50-53	Xi; N R: 36-50/53 S: (2)-24/25-46-60-61		
602-054-00-6	3-iodopropeno iodeto de alilo		209-130-4	556-56-9	R10 C; R34	C R: 10-34 S: (1/2)-7-26-45		

Número de índice	Designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	N.º CE	N.º CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
603-076-00-9	but-2-ino-1,4-diol 2-butino-1,4-diol		203-788-6	110-65-6	T; R23/25 Xn; R21-48/22 C; R34	T R: 21-23/25-34-48/22 S: (1/2-26-36/37/39-45	C ≥ 50%: T; R21-23/25-34-48/22 25% ≤ C < 50%: T; R21-23/25-36/38-48/22 10% ≤ C < 25%: Xn; R20/22-48/22 3% ≤ C < 10%: Xn; R20/22	
603-091-00-0	exo-1-metil-4(1-metiletil)-7-oxabicyclo [2.2.1]heptano-2-ol		402-470-6	87172-89-2	O; R8 Xn; R22 Xi; R36	O; Xn R: 8-22-36 S: (2-26		
603-093-00-1	exo-(+)-1-metil-4(1-metiletil)-2-[(2-metilfenil) metoxi]-7-oxabicyclo[2.2.1]heptano		402-410-9	87818-31-3	Xn; R20 N; R51-53	Xn; N R: 20-51/53 S: (2-23-61		
603-097-00-3	1,1',1"-nitriilotripropano-2-ol		204-528-4	122-20-3	Xi; R36 R52-53	Xi R: 36-52/53 S: (2-26-61		
603-117-00-0	propano-2-ol álcool isopropílico		200-661-7	67-63-0	F; R11 Xi; R36 R67	F; Xi R: 11-36-67 S: (2-7-16-24/25-26		6
604-020-00-6	2-bifenilol 2-hidroxibifenilo		201-993-5	90-43-7	Xi; R36/37/38 N; R50	Xi; N R: 36/37/38-50 S: (2-22-61		
604-021-00-1	2-bifemilato de sódio		205-055-6	132-27-4	Xn; R22 Xi; R37/38-41 N; R50	Xn; N R: 37/38-41-50 S: (2-22-26-61		
604-024-00-8	4,4'-isobutiletildifenodifenol		401-720-1	6807-17-6	Repr. Cat. 2; R60 Xi; R36 N; R50-53	T; N R: 60-36-50/53 S: 53-45-60-61		
604-041-00-0	ácido 5-[2-cloro-4-(trifluorometil)fenoxi]-2-ni- trobencóico [1] 5-[2-cloro-4-(trifluorometil)fenoxi]-2-nitroben- zoato de sódio[2]	256-634-5 [1] 263-560-7 [2]		50594-66-6 [1] 62476-59-9 [2]	Xn; R22 Xi; R38-41 N; R50-53	Xn; N R: 22-38-41-50/53 S: (2-24-39-60-61		

Número de índice	Designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	N.º CE	N.º CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
604-043-00-1	monobenzona		203-083-3	103-16-2	Xi; R36 R43	Xi R: 36-43 S: (2-)24/25-26-37		
604-044-00-7	mequimol		205-769-8	150-76-5	Xn; R22 Xi; R36 R43	Xn R: 22-36-43 S: (2-)24/25-26-37/39-46		
605-016-00-7	gloixal ... % etanedial ...%	B	203-474-9	107-22-2	Muta. Cat. 3; R40 Xn; R20 Xi; R36/38 R43	Xn R: 20-36/38-40-43 S: (2-)36/37	C ≥ 10%; Xn; R20-36/38-40-43 1% ≤ C < 10%; Xn; R40-43	
606-016-00-X	pindona (ISO) pivaldiona 2-pivaloil-1,3-indanodiona		201-462-8	83-26-1	T; R25-48/25 N; R50-53	T; N R: 25-48/25-50/53 S: (1/2-)37-45-60-61		
606-018-00-0	diclona (ISO) 2,3-dicloro-1,4-naftoquinona		204-210-5	117-80-6	Xn; R22 Xi; R36/38 N; R50-53	Xn; N R: 22-36/38-50/53 S: (2-)26-60-61		
606-019-00-6	clordecona (ISO) decacloropentacido[5,2,1,0 ^{2,6} ,0 ^{3,9} ,0 ^{5,8}] decano-4-ona		205-601-3	143-50-0	Carc. Cat. 3; R40 T; R24/25 N; R50-53	T; N R: 24/25-40-50/53 S: (1/2-)22-36/37-45-60-61		
606-034-00-8	metribuzina (ISO) 4-amino-6- <i>terc</i> -butil-3-metilto-1,2,4-triazin-5-ona		244-209-7	21087-64-9	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)60-61		
606-035-00-3	pirazona (ISO) 5-amino-4-cloro-2-fenilpiridazin-3-ona		216-920-2	1698-60-8	R43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
606-036-00-9	chinometionato (ISO) 6-metil-1,3-ditolo(4,5-b)quinoxalina-2-ona		219-455-3	2439-01-2	Repr. Cat. 3; R62 Xn; R20/21/22-48/22 Xi; R36 R43 N; R50-53	Xn; N R: 20/21/22-36-43-48/22-50/ 53-62 S: (2-)24-37-60-61		
606-037-00-4	triadimeão (ISO) 1-(4-clorofenoxi)-3,3-dimetil-1-(1,2,4-triazol- -1- <i>il</i>)butanona		256-103-8	43121-43-3	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2-)61		

Número de índice	Designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	N.º CE	N.º CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
606-044-00-2	2,4,6-trimetilbenzofenona		403-150-9	954-16-5	Xn; R22 Xi; R36 N; R50-53	Xn; N R: 22-36-50/53 S: (2-)26-60-61		
607-043-00-X	dicamba (ISO) ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzóico		217-635-6	1918-00-9	Xn; R22 Xi; R41 R52-53	Xn; N R: 22-41-52/53 S: (2-)26-61		
607-057-00-6	cumaclor (ISO) 3-[1-(4-clorofenil)-3-oxobutil]-4-hidroxicumarino		201-378-1	81-82-3	Xn; R48/22 R52-53	Xn R: 48/22-52/53 S: (2-)37-61		
607-058-00-1	cumafuril (ISO) 3-[1-(2-furil)-3-oxobutil]-4-hidroxicumarino		204-195-5	117-52-2	T; R25-48/25 R52-53	T R: 25-48/25-52/53 S: (1/2-)37-45-61		
607-079-00-6	celevano (ISO) 5-(1,2,3,5,6,7,8,9,10,10-decacloro-4-hidroxipentacilo(5,2,1,0 ^{2,6,3,9} ,0 ^{5,8})dec-4-il)-4-oxovalerato de etilo		—	4234-79-1	T; R24 Xn; R22 N; R51-53	T; N R: 22-24-51/53 S: (1/2-)36/37-45-61		
607-097-00-4	1,2-anidrido de ácido benzeno-1,2,4-tricarboxélico		209-008-0	552-30-7	Xi; R37-41 R42/43	Xn R: 37-41-42/43 S: (2-)22-26-36/37/39		
607-143-00-3	ácido valérico		203-677-2	109-52-4	C; R34 R52-53	C R: 34-52/53 S: (1/2-)26-36-45-61		
607-152-00-2	2,3,6-TBA (ISO) ácido 2,3,6-triclorobenzóico		200-026-4	50-31-7	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2-)61		
607-153-00-8	benazolina (ISO) ácido 4-cloro-2,3-dihidro-2-oxo-1,3-benzotiazol-3-ilacético		223-297-0	3813-05-6	Xi; R36/38 R52-53	Xi R: 36/38-52/53 S: (2-)22-61		
607-156-00-4	clorfensone (ISO) 4-clorobenzenossulfonato de 4-clorofenilo		201-270-4	80-33-1	Xn; R22 Xi; R38 N; R50-53	Xn; N R: 22-38-50/53 S: (2-)37-60-61		
607-158-00-5	sal de sódio do ácido cloroacético cloroacetato de sódio		223-498-3	3926-62-3	T; R25 Xi; R38 N; R50	T; N R: 25-38-50 S: (1/2-)22-37-45-61		

Número de índice	Designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	N.º CE	N.º CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
607-159-00-0	clorobenzilato (ISO) 4,4'-diclorobenzilato de etilo		208-110-2	510-15-6	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)60-61		
607-176-00-3	Mistura de: α -3-(3-(2H-benzotriazole-2-il)-5-terc-butil-4-hidroxifenil)propionil- ω -hidroxipoli(oxietileno); α -3-(3-(2H-benzotriazole-2-il)-5-terc-butil-4-hidroxifenil)propionil- ω -3-(3-(2H-benzotriazole-2-il)-5-terc-butil-4-hidroxifenil)propionil(oxietileno)		400-830-7	—	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)36/37-61		
607-188-00-9	N-carboxilatoetil-N-octadec-9-enilmaleamato de hidrogénio e sódio		402-970-4	—	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24/37-61		
607-209-00-1	Mistura de: O, O-di(1-metiletil)trinitio-bis-tioformato; O, O-di(1-metiletil)tetratio-bis-tioformato; O, O-di(1-metiletil)pentatio-bis-tioformato		403-030-6	—	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)36/37-60-61		
607-213-00-3	3,3-bis[(1,1-dimetilpropil)peroxi]butirato de etilo		403-320-2	67567-23-1	E; R2 O; R7 R10 N; R51-53	E; N R: 2-7-10-51/53 S: (2-)3/7-14-33-36/37/39-61		
607-217-00-5	2-[4-(7-fenil-2,6-dihidro-2,6-dioxo-1,5-dioxaindaceno-3-il)fenoxi]acetato de 2-etoxietilo		403-960-2	—	R43 R53	Xi R: 43-53 S: (2-)24-37-61		
607-243-00-7	3,6-dicloro- <i>o</i> -amisato de sódio [1] ácido 3,6-dicloro- <i>o</i> -amísico, composto com 2,2'-iminodietanol (1:1) [2] ácido 3,6-dicloro- <i>o</i> -amísico, composto com 2-aminoetanol (1:1) [3]	217-846-3 [1] 246-590-5 [2] 258-527-9 [3]	1982-69-0 [1] 25059-78-3 [2] 53404-28-7 [3]	R52-53	R: 52/53 S: 61			
607-248-00-4	naptalame-sódio		205-073-4	132-67-2	Xn; R22	Xn R: 22 S: (2)		

Número de índice	Designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	N.º CE	N.º CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
607-249-00-X	diacrilato de (1-metil-1,2-etanodiol)bis(oxi(metil-2,1-etanodiol)		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 ≥ 10%; Xi; R36/37/38-43 1% ≤ C < 10%; Xi; R43	
607-252-00-6	lamda-cialotrina (ISO) mistura 1:1 de (Z)-(1R,3R)-3-(2-cloro-3,3,3-trifluoropropenil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato de (S)-α-ciano-3-fenoxibenzilo e do (Z)-(1S,3S)-3-(2-cloro-3,3,3-trifluoropropenil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato de (R)-α-ciano-3-fenoxibenzilo		415-130-7	91465-08-6	T+; R26 T; R25 Xn; R21 N; R50-53	T+; N R: 21-25-26-50/53 S: (1/2)-28-36/37/39-38-45-60-61		
607-255-00-2	Fluoroxipir (ISO) ácido 4-amino-3,5-dicloro-6-fluoro-2-piridiloxiacético		—	69377-81-7	R52-53	R: 52/53 S: 61		
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 ≥ 20%; T; R45-23/24/25-37/38-41-43 10% ≤ C < 20%; T; R45-23/24/25-41-43 5% ≤ C < 10%; T; R45-23/24/25-36-43 1% ≤ C < 5%; T; R45-23/24/25-43 0,2% ≤ C < 1%; T; R45-20/21/22 0,1% ≤ C < 0,2%; T; R45	
608-016-00-5	1,4-diciano-2,3,5,6-tetra-cloro-benzeno		401-550-8	1897-41-2	R43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2)-24-37-60-61		
609-030-00-4	dinoterbe (ISO) 2-terc-butil-4,6-dinitrofenol	E	215-813-8	1420-07-1	Repr. Cat. 2; R61 T+; R28 T; R24 R44 N; R50-53	T+; N R: 61-24-28-44-50/53 S: 53-45-60-61		
609-040-00-9	nitrofone (ISO) éter 2,4-diclorofenilo-4-nitrofenílico	E	217-406-0	1836-75-5	Carc. Cat. 2; R45 Repr. Cat. 2; R61 Xn; R22 N; R50-53	T; N R: 45-61-22-50/53 S: 53-45-60-61		
609-044-00-0	tecnazena (ISO) 1,2,4,5-tetracloro-3-nitrobenzeno		204-178-2	117-18-0	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2)-24-37-60-61		

Número de índice	Designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	N.º CE	N.º CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
611-008-00-4	4-aminoazobenzeno		200-453-6	60-09-3	Carc. Cat. 2; R45 N; R50-53	T; N R: 45-50/53 S: 53-45-60-61		
611-013-00-1	1-hidroxi-7-(3-sulfonatoanilina)-2-[3-metil-4-[2-metoxi-4-(3-sulfonatofenilazo)fenilazo]fenilazo]naftaleno-3-sulfonato de trilito		403-650-7	117409-78-6	E; R2 N; R51-53	E; N R: 2-51/53 S: (2-)35-61		
611-031-00-X	4,4'-(4-iminociclohexa-2,5-dienilideno)metileno)dianilina, cloridrato		209-321-2	569-61-9	Carc. Cat. 2; R45	T R: 45 S: 53-45		
612-035-00-4	2-metoxianilina o-anisidina	E	201-963-1	90-04-0	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R40 T; R23/24/25	T R: 45-23/24/25 S: 53-45		
612-042-00-2	benzidina 4,4'-diaminobifenilo	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; R45-22 0,01 % ≤ C < 25 %; T; R45	
612-051-00-1	4,4'-diaminodifenilmetano	E	202-974-4	101-77-9	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R40 T; R39/23/24/25 Xn; R48/20/21/22 R43 N; R51-53	T; N R: 45-39/23/24/25-43-48/20/ /21/22-51/53 S: 53-45-61		
612-081-00-5	sais de 4,4'-bi- <i>o</i> -toluidina sais de 3,3'-dimetilbenzidina sais de <i>o</i> -tolidina	A E	210-322-5 265-294-7 277-985-0	612-82-8 64969-36-4 74753-18-7	Carc. Cat. 2; R45 Xn; R22 N; R51-53	T; N R: 45-22-51/53 S: 53-45-61		
612-099-00-3	4-metil- <i>m</i> -fenilendiamina	E	202-453-1	95-80-7	Carc. Cat. 2; R45 T; R25 Xn; R21 Xi; R36 R43 N; R51-53	T; N R: 45-21-25-36-43-51/53 S: 53-45-61		
612-105-00-4	2-(1-piperazini)etilamina		205-411-0	140-31-8	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		

Número de índice	Designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	N.º CE	N.º CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
612-111-00-7	2-metil- <i>m</i> -fenilendiamina		212-513-9	823-40-5	Muta. Cat. 3; R40 Xn; R21/22 R43 N; R51-53	Xn; N R: 21/22-40-43-51/53 S: (2)-24-36/37-61		
612-125-00-3	2-metil- <i>p</i> -fenilendiamina		202-442-1	95-70-5	T; R25 Xn; R20/21 R43 N; R51-53	T; N R: 20/21-25-43-51/53 S: (1)/2-24-37-45-61		
612-144-00-7	Flumetralina (ISO) N-(2-cloro-6-fluorobenzil)- -N-etil- α,α -trifluoro-2,6-dinitro- <i>p</i> -toluidina		—	62924-70-3	Xi; R36/38 R43 N; R50-53	Xi; N R: 36/38-43-50/53 S: (2)-36/37-60-61		
612-151-00-5	diaminotolueno	E	246-910-3	25376-45-8	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		
613-018-00-4	morfanquato (ISO) 1,1'-bis(3,5-dimetilmorfolinocarbonilmetil)- -4,4'-dipiridínio		—	7411-47-4	Xn; R22 Xi; R36/37/38 R52-53	Xn R: 22-36/37/38-52/53 S: (2)-22-36-61		
613-031-00-5	sinclóseno triclóro- <i>s</i> -triazina-2,4,6-triona ácido tricloroisocianúrico		201-782-8	87-90-1	O; R8 Xn; R22 R31 Xi; R36/37 N; R50-53	O; Xn; N R: 8-22-31-36/37-50/53 S: (2)-8-26-41-60-61		
613-038-00-3	6-fenil-1,3,5-triazina-2,4-diildiamina 6-fenil-1,3,5-triazina-2,4-diamina benzoguanamina		202-095-6	91-76-9	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2)-61		
613-042-00-5	1-[2-(aliloxi)-2-(2,4-diclorofenil)etil]-1 <i>H</i> -imidazólio		252-615-0	35354-44-0	Xn; R20/22 N; R41 N; R50-53	Xn; N R: 20/22-41-50/53 S: (2)-26-39-60-61		
613-043-00-0	hidrogenossulfato de 1-[2-(aliloxi)etil]-2-(2,4-diclorofenil)-1 <i>H</i> -imidazólio [1] hidrogenossulfato de (\pm)-1-[2-(aliloxi)etil]- -2-(2,4-diclorofenil)-1 <i>H</i> -imidazólio [2]	261-351-5 [1] 281-291-3 [2]	58594-72-2 [1] 83918-57-4 [2]	Xn; R20/22 Xi; R41 N; R50-53	Xn; N R: 20/22-41-50/53 S: (2)-26-39-60-61			

Número de índice	Designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	N.º CE	N.º CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
613-066-00-6	terbuteton (ISO) 2- <i>tert</i> -butilamino-4-etilamino-6-methoxi-1,3,5-triazina		251-637-8	33693-04-8	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2)-60-61		
613-091-00-2	dicloreto de morfanquato [1] sulfato de morfanquato [2]		225-062-8 [1]	4636-83-3 [1] 29873-36-7 [2]	Xn; R22 Xi; R36/37/38 R52-53	Xn R: 22-36/37/38-52/53 S: (2)-22-36-61		
613-098-00-0	N-(<i>n</i> -octil)-2-pirrolidinona		403-700-8	2687-94-7	C; R34 N; R51-53	C; N R: 34-51/53 S: (1/2)-23-26-36/37/39-45-61		
613-130-00-3	hexaconazol (ISO) (<i>RS</i>)-2-(2,4-diclorofenil)-1-(1 <i>H</i> -1,2,4-triazol-1-il)hexano-2-ol		—	79983-71-4	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2)-24-37-61		
613-131-00-9	Piroquilona (ISO) 1,2,5,6-tetrahidropirrol[3,2,1- <i>ij</i>]quinolin-4-ona		—	57369-32-1	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2)-61		
613-134-00-5	miclobutanil (ISO) 2- <i>p</i> -clorofenil-2-(1 <i>H</i> -1,2,4-triazol-1-il-metil)hexanonitrilo		—	88671-89-0	Repr. Cat. 3; R63 Xn; R22 Xi; R36 N; R51-53	Xn; N R: 22-36-51/53-63 S: (2)-36/37-46-61		
613-137-00-1	metabenzetiazurone (ISO)		242-505-0	18691-97-9	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
613-139-00-2	metasulfurão-metilo 2-(4-metoxi-6-metil-1,3,5-triazina-2-ilcarbamioisulfonil)benzoato de metilo		—	74223-64-6	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
614-001-00-4	nicotina (ISO)		200-193-3	54-11-5	T+; R27 T; R25 N; R51-53	T+; N R: 25-27-51/53 S: (1/2)-36/37-45-61		
614-006-00-1	brucina		206-614-7	357-57-3	T+; R26/28 R52-53	T+ R: 26/28-52/53 S: (1/2)-13-45-61		

Número de índice	Designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	N.º CE	N.º CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
614-007-00-7	sulfato de brucina [1] nitrate de brucina [2] estricnidin-10-ona, 2,3-dimetoxi-, mono [1,2-benzenodicarboxilato de(R)-1-metilheptilo [3] estricnidin-10-ona, 2,3-dimetoxi-, composto com (S)-mono(1-metilheptil)-1,2-benzenodicarboxilato(1:1) [4]		225-432-9 [1] 227-317-9 [2] 269-439-5 [3] 269-710-8 [4]	4845-99-2 [1] 5786-97-0 [2] 68239-26-9 [3] 68310-42-9 [4]	T+; R26/28 R52-53	T+ R: 26/28-52/53 S: (1/2)13-45-61		
615-006-00-4	diisocianato de 2-metil- <i>m</i> -fenileno [1] diisocianato de 4-metil- <i>m</i> -fenileno [2] diisocianato de <i>m</i> -tolilideno [3] 2,6-diisocianato de toluileno [1] 2,4-diisocianato de toluileno [2]	C	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	T+ R: 26-36/37/38-40-42/43-52/53 S: (1/2)23-36/37-45-61	C ≥ 20%: 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	2
616-010-00-9	sódio tosilcloramida		204-854-7	127-65-1	Xn; R22 R31 C; R34 R42	C R: 22-31-34-42 S: (1/2)7-22-26-36/37/39-45		
616-034-00-X	piracarbólida (ISO)		246-419-4	24691-76-7	R52-53	R: 52/53 S: 61		
616-035-00-5	2-ciano-N-[(etilamino)carbonil]- -2-(metoxiimino)acetamida		261-043-0	57966-95-7	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2)36/37-60-61		
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	C ≥ 25%: C; R22-34 10% ≤ C < 25%: C; R34 5% ≤ C < 10%: Xi; R36/37/38	
617-006-00-X	peróxido de bis(α,α-dimetilbenzilo)		201-279-3	80-43-3	O; R7 Xi; R36/38 N; R51-53	O; Xi; N R: 7-36/38-51/53 S: (2)3/7-14-36/37/39-61		
617-008-00-0	peróxido de dibenzoilo		202-327-6	94-36-0	E; R2 Xi; R36 R43	E; Xi; R: 2-36-43 S: (2)3/7-14-36/37/39		
650-007-00-3	clordimeforme (ISO) N ² -(4-cloro- <i>o</i> -tolil)-N ¹ ,N ¹ -dimetilformamida		228-200-5	6164-98-3	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R21/22 N; R50-53	Xn; N R: 21/22-40-50/53 S: (2)22-36/37-60-61		

Número de índice	Designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	N.º CE	N.º CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
650-008-00-9	draxolon (ISO) 4-(2-clorofenilhidrazono)-3-metil-5-isoxazolona		227-197-8	5707-69-7	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2)-22-24-36/37-45-60-61		
650-009-00-4	clordimeforme, cloridrato N'-(4-cloro-o-tolil)-N,N'-dimetilformamida, monoclóridrato		243-269-1	19750-95-9	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-40-50/53 S: (2)-22-36/37-60-61		
650-033-00-5	esfenvalerato (ISO) (S)-2-(4-clorofenil)-3-metilbutirato de (S)- α -ciano-3-fenoxibenzilo		—	66230-04-4	T; R23/25 R43 N; R50-53	T; N R: 23/25-43-50/53 S: (1/2)-24-36/37/39-45-60-61		
650-041-00-9	triassulfurão (ISO) 3-(4-metoxi-6-metil-1,3,5-triazina-2-il)-1-[2-(2-cloroetoxi)fenilsulfonil]-ureia		—	82097-50-5	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		

ANEXO ID

N.º de índice	Designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	N.º CE	N.º CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
006-090-00-8	Fenilcarbamato de 2-(3-iodoprop-2-ino-1-ilo)etilo		408-010-0	88558-41-2	Xn: R20 Xi: R41 R52-53	Xn R: 20-41-52/53 S: (2)-22-26-39-61		
014-016-00-0	Mistura de: 1,3-dihex-5-eno-1-il-1,1,3,3-tetrametilsiloxano; 1,3-dihex-n-eno-1-il-1,1,3,3-tetrametilsiloxano		406-490-6	—	N: R51-53	N R: 51/53 S: 61		
015-164-00-9	Dihidrato do P,P'-(1-hidroxi-etileno)bis(hidrogeniofosfonato) de cálcio		400-480-5	36669-85-9	R52-53	R: 52/53 S: 61		
015-165-00-4	Mistura de: bishexafluorofostato de tiobis (4,1-fenileno)-S,S',S'-tetrafenildissulfonio; hexafluorofostato de difeni (4-feniltiofenil) sulfonio		404-986-7	—	Xi: R41 N: R50-53	Xi: N R: 41-50/53 S: (2)-15-26-39-60-61		
015-166-00-X	3,9-bis(2,6-di-terc-butil-4-metilfenoxi)-2,4,8,10-tetraoxi-3,9-difosfaespiro[5.5]undecano		410-290-4	80693-00-1	R53	R: 53 S: 61		
015-167-00-5	ácido 3-(hidroxifenilfosfinil)propanóico		411-200-6	14657-64-8	Xi: R41	Xi R: 41 S: (2)-26-39		
601-050-00-1	benzeno, derivados C ₁₀ -C ₁₃ -alquilo		267-051-0	67774-74-7	N: R50	N R: 50 S: 61		
601-051-00-7	4-fenilbut-1-eno		405-980-7	768-56-9	Xi: R38 N: R51-53	Xi: N R: 38-51/53 S: (2)-37-61		
602-083-00-4	éter difenílico, derivado pentabromado		251-084-2	32534-81-9	Xn: R48/21/22 R64 N: R50-53	Xn: N R: 48/21/22-50/53-64 S: (1/2-3)6/37-45-60-61		
602-084-00-X	1,1-dicloro-1-fluoretano		404-080-1	1717-00-6	N: R52-53-59	N R: 52/53-59 S: 59-61		
603-128-00-0	2-(fenilmetoxi)naftaleno		405-490-3	613-62-7	R53	R: 53 S: 61		

N.º de índice	Designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	N.º CE	N.º CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
603-129-00-6	1-terc-butoxipropano-2-ol		406-180-0	57018-52-7	R10 Xi; R41	Xi R: 10-41 S: (2)-26-39		
603-130-00-1	Mistura de isómeros de: α -(dimetilbifenil)- ω -hidroxipoli(oxietileno)		406-325-8	—	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2)-39-61		
603-131-00-7	Mistura (3:1) de: 1-deoxi-1-[metil-(1-oxododecil)amino]-D-glucitol; 1-deoxi-1-[metil-(1-oxotetradecil)amino]-D-glucitol		407-290-1	—	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2)-26-39		
603-132-00-2	2-hidroximetil-9-metil-6-(1-metil)-1,4-dioxaspiro[4.5]decano		408-200-3	63187-91-7	Xi; R38-41 R52-53	Xi R: 38-41-52/53 S: (2)-26-37/39-61		
603-133-00-8	Mistura de: 3-[(4-amino-2-cloro-5-nitrofenil)amino]propano-1,2-diol; 3,3'-(2-cloro-5-nitro-1,4-fenilendiimino)bis(propano-1,2-diol)		408-240-1	—	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2)-22-36-61		
603-134-00-3	Mistura de dodecil e/ou tetradecil difenil éteres substituídos. A substância é produzida com a reacção de Friedel Craft. O catalizador é eliminado do produto de reacção. O defeniléter é substituído com grupos alquílicos C1-C10. Os grupos alquílicos são ligados casualmente entre C1 e C6. São usadas cadeias lineares de C12 e C14 em proporção 50/50.		410-450-3	—	R53	R: 53 S: 61		
603-135-00-9	bis[[2,2',2"-nitrioltris(etanolato)]-1-N,O]-bis[2-(2-metoxietoxi)etoxi]-titânio		410-500-4	—	Xi; R41 N; R51-53	Xi; N R: 41-51/53 S: (2)-26-39-61		
603-136-00-4	3-[(4-bis(2-hidroxi)amino)-2-nitrofenil]amino)-1-propanol		410-910-3	104226-19-9	R43 R52-53	Xi R: 43-52/53 S: (2)-24-37-61		
603-137-00-X	Mistura de: 1-deoxi-1-[metil-(1-oxohexadecil)amino]-D-glucitol; 1-deoxi-1-[metil-(1-oxooctadecil)amino]-D-glucitol		411-130-6	—	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2)-26-39		
603-138-00-5	3-(2,2-dimetil-3-hidroxi)propil)tolueno		403-140-4	103694-68-4	R52-53	R: 52/53 S: 61		

N.º de índice	Designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	N.º CE	N.º CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
604-050-00-X	4-cloro- <i>o</i> -cresol		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; R23-35 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	
604-051-00-5	3,5-bis((3,5-di- <i>tert</i> -butil-4-hidroxi)benzil)-2,4,6-trimetilfenol		401-110-5	87113-78-8	R52-53	R: 52/53 S: 61		
604-052-00-0	2,2'-metilenobis(6-(2H-benzotriazole-2-il)-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenol)		403-800-1	103597-45-1	R53	R: 53 S: 61		
604-053-00-6	2-metil-4-(1,1-dimetil-6-(1-metil-pentadecil)-fenol		410-760-9	157661-93-3	Xi; R38 R43 N; R50-53	Xi; N R: 38-43-50/53 S: (2)-24-37-60-61		
604-054-00-1	Mistura de: 2-metoxi-4-(tetrahydro-4-metileno-2H-pirano-2-il)-fenol; 4-(3,6-dihidro-4-metil-2H-pirano-2-il)-2-metoxifenol		412-020-0	—	R43 R52-53	Xi R: 43-52/53 S: (2)-24-37-61		
604-055-00-7	2,2'-((3,3',5,5'-tetrametil-(1,1'-bifenil)-4,4'-diil)-bis(oximetileno))-bis-oxirano		413-900-7	85954-11-6	Muta. Cat.3; R40	Xn R: 40 S: (2)-22-36-37		
605-027-00-7	Mistura de: 3a,4,5,6,7,7a-hexahidro-4,7a-metano-1H-indeno-6-carboxaldeído; 3a,4,5,6,7,7a-hexahidro-4,7-metano-1H-indeno-5-carboxaldeído		410-480-7	—	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2)-24-37-61		
606-051-00-0	4-pentilciclohexanona		406-670-4	61203-83-6	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
606-052-00-6	4-(N,N-dibutilamino)-2-hidroxi-2'-carboxibenzofenona		410-410-5	54574-82-2	R52-53	R: 52/53 S: 61		
607-272-00-5	Fluoroxipir-meptil (ISO) [1] Fluoroxipir-butometil (ISO) [2]		279-752-9 [1] —	81406-37-3 [1] 154486-27-8 [2]	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		

N.º de índice	Designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	N.º CE	N.º CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
607-273-00-0	7-(2,6-dimetil-8-(2,2-dimetilbutiriloxi)-1,2,6,7,8,8a-hexahidro-1-naftil)-3,5-dihidroxi-heptanoato de amónio		404-520-2	—	R52-53	R: 52/53 S: 61		
607-274-00-6	3-amino-2-butenolato de 2-(N-benzil-N-metilamino)etil		405-350-1	54527-73-0	R43 N: R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2)-24-37-61		
607-275-00-1	benzoiloxibenzeno-4-sulfonato de sódio		405-450-5	66531-87-1	R43	Xi R: 43 S: (2)-24-37		
607-276-00-7	complexo de zinco de bis[(1-metilimidazole)-(2-etil-hexanoato)]		405-635-0	—	Xi; R38-41 N: R50-53	Xi; N R: 38-41-50/53 S: (2)-26-37/39-60-61		
607-277-00-2	Mistura de: 2-(hexilito)etilamina, cloridrato; propionato de sódio		405-720-2	—	Xn; R22 Xi; R41 R43 N: R51-53	Xn; N R: 22-41-43-51/53 S: (2)-24-26-37/39-61		
607-278-00-8	Mistura de isómero de: fenetilnaftalenossulfonato de sódio; naftilbenzenossulfonato de sódio		405-760-0	—	Xi; R41 R43 R52-53	Xi R: 41-43-52/53 S: (2)-24-26-37/39-61		
607-279-00-3	Mistura de: bis(hidrogeniomaleato) de n-octadecilaminodietilo; hidrogeniomaleato-hidrogenioftalato de n-octadecilaminodietilo		405-960-8	—	R43 N: R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2)-24-37-61		
607-280-00-9	4-cloro-1-hidroxibutano-1-sulfonato de sódio		406-190-5	54322-20-2	Xn; R22 Xi; R36 R43	Xn R: 22-36-43 S: (2)-22-26-36/37		
607-281-00-4	Mistura de 3-[3-(2H-benzotriazole-2-il)-5-(1,1-dimetil)etil]-4-hidroxifenil]propionatos de C7-C9 alquila ramificados e lineares		407-000-3	127519-17-9	N: R51-53	N R: 51/53 S: 61		
607-282-00-X	acetato de 2-acetoximetil-4-benziloxibut-1-ilo		407-140-5	131266-10-9	R52-53	R: 52/53 S: 61		

N.º de índice	Designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	N.º CE	N.º CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
607-283-00-5	E-etil-4-oxo-4-fenilcrotonato		408-040-4	15121-89-8	Xn; R21/22 Xi; R38-41 R43 N; R50-53	Xn; N R: 21/22-38-41-43-50/53 S: (2)-26-36/37/39-60-61		
607-284-00-0	Mistura (9:1) de: 3,3'-(1,4-fenilenobis(carbonilimino-3,1-propanodilimino))bis(10-amino-6,13-dicloro)-4,11-trifenodioxazindissulfonato) de sódio; 3,3'-(1,4-fenilenobis(carbonilimino-3,1-propanodilimino))bis(10-amino-6,13-dicloro)-4,11-trifenodioxazindissulfonato) de lítio		410-040-4	136213-76-8	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
607-285-00-6	Mistura de: ácido 7-(((3-aminofenil)sulfonil)amino)-naftaleno-1,3-dissulfónico; 7-(((3-aminofenil)sulfonil)amino)-naftaleno-1,3-dissulfonato de sódio; 7-(((3-aminofenil)sulfonil)amino)-naftaleno-1,3-dissulfonato de potássio		410-065-0	—	R43	Xi R: 43 S: (2)-22-24-37		
607-286-00-1	Mistura de: 7-[[[3-[[4-(2-hidroxi-naftil)azo]fenil]sulfonil]amino]naftaleno-1,3-dissulfonato de sódio e de potássio		410-070-8	141880-36-6	R43 R52-53	Xi R: 43-52/53 S: (2)-22-24-37-61		
607-287-00-7	O-(1-metil-2-metacrililoxi-etil)-1,2,3,6-tetrahidroftalato de O'-metilo		410-140-8	—	R52-53	R: 52/53 S: 61		
607-288-00-2	(c-(3-(1-(3-(6-dicloro-5-cianopirimidina-f-il(metil)amino)propil)-1,6-dihidro-2-hidroxi-4-metil-6-oxo-3-piridilazo)-4-sulfonato)fenilsulfamoi)ftalcianina-a,b,d-trissulfonato(6-))niquetato II de tetrassódio, em que a é 1 ou 2 ou 3 ou 4, b é 8 ou 9 ou 10 ou 11, c é 15 ou 16 ou 17 ou 18, d é 22 ou 23 ou 24 ou 25 e em que e e f juntos são 2 e 4 ou 4 e 2 respectivamente		410-160-7	148732-74-5	Xi; R36 R43 R52-53	Xi R: 36-43-52/53 S: (2)-22-26-36/37-61		
607-289-00-8	Ácido 3-(3-(4-(2,4-bis(1,1-dimetilpropil)fenoxi)butilaminocarbonil-4-hidroxi-1-naftalenil)to)propanóico		410-370-9	105488-33-3	R53	R: 53 S: 61		
607-290-00-3	Mistura (em relação desconhecida de: amónio 1-C14-C18-alkiloxycarbonil-2-(3-áliloxi-2-hidroxi)propoxycarbonil)etano-1-sulfonato; amónio 2-C14-C18-alkiloxycarbonil-1-(3-áliloxi-2-hidroxi)propoxycarbonil)etano-1-sulfonato		410-540-2	—	Xi; R38 R43 N; R50-53	Xi; N R: 38-43-50/53 S: (2)-24-37-60-61		
607-291-00-9	Carboxilato de dodecil- ω -(C5/C6-cicloalquil)alquilo		410-630-1	104051-92-5	R53	R: 53 S: 61		

N.º de índice	Designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	N.º CE	N.º CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
607-292-00-4	Mistura de: ácido [1-(metoximetil)-2-(C12-alcóxi)-etoxi]acético; ácido [1-(metoximetil)-2-(C14-alcóxi)-etoxi]acético		410-640-6	—	Xi; R38-41 N; R50-53	Xi; N R: 38-41-50/53 S: (2)-26-37/39-60-61		
607-293-00-X	Mistura de: éter mono-2,4,6-trimetilnilidifenílico de dissulfonato de N-aminoetilpiperazónio; éter di-2,4,6-trimetilnilidifenílico de dissulfonato de N-aminoetilpiperazónio		410-650-0	—	Xi; R41 R43 N; R51-53	Xi; N R: 41-43-51/53 S: (2)-26-36/37/39-61		
607-294-00-5	2-benzoiloxi-1-hidroxi-tanossulfonato de sódio		410-680-4	—	R43	Xi R: 43 S: (2)-24-37		
607-295-00-0	Mistura de: fosfonoetano-1,2-dicarboxilato de tetrassódio; fosfobutano-1,2,3,4-tetracarboxilato de hexassódio		410-800-5	—	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2)-24-37-61		
607-296-00-6	Mistura de: tetraésteres de pentaeritriol com ácido heptanóico e ácido 2-etilhexanóico		410-830-9	—	R53	R: 53 S: 61		
607-297-00-1	ácido (E-E)-3,3'-(1,4-fenilendimetilideno)bis (2-oxobornano-10-sulfónico)		410-960-6	92761-26-7	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2)-26-39		
607-298-00-7	2-(trimetilamónio)etoxicarboxibenzeno-4-sulfonato		411-010-3	—	R43	Xi R: 43 S: (2)-22-36/37		
607-299-00-2	3-(acetililo)-2-metil-propanato de metilo		411-040-7	97101-46-7	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2)-24-37-60-61		
607-300-00-6	[2-(5-cloro-2,6-difluoropirimidina-4-ilamino)-5-(β-sulfamoil-c-d-sulfonatoftalocianina-a-il-K4,N29,N30,N31,N32-sulfonilamino)benzoato(5-)]cuprato(II) de trissódio em que a = 1, 2, 3, 4b = 8, 9, 10, 11c = 15, 16, 17, 18d = 22, 23, 24, 25		411-430-7	—	R43	Xi R: 43 S: (2)-22-24-37		
607-301-00-1	Mistura de: ácido dodecanóico; ésteres de poli(1-7)lactato do ácido dodecanóico		411-860-5	—	Xi; R38-41 R43 N; R51-53	Xi; N R: 38-41-43-51/53 S: (2)-24-26-37/39-61		

N.º de índice	Designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	N.º CE	N.º CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
607-302-00-7	Mistura de: ácido tetradecanoico; ésteres de poli(1-7)lactato do ácido tetradecanoico		411-910-6	—	Xi; R38-41 R43 Ni; R51-53	Xi; N R: 38-41-43-51/53 S: (2-)24-26-37/39-61		
607-303-00-2	ácido 1-ciclopropil-6,7-difluór-1,4-dihidro-4-oxoquinolina-3-carboxílico		413-760-7	93107-30-3	Repr. Cat. 3; R62 R52-53	Xn R: 62-52/53 S: (2-)22-36/37-61		
608-023-00-3	4-(4-clorofenil)-2-fenil-2-[(1H-1,2,4-triazole-1-il)metil]butanonitrilo		406-140-2	114369-43-6	Ni; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
608-024-00-9	2-(4-(N-butil-N-fenetilamino)fenil)etileno-1,1,2-tricarbonitrilo		407-650-8	97460-76-9	R53	R: 53 S: 61		
608-025-00-4	2-nitro-4,5-bis(benziloxi)fenilacetonitrilo		410-970-0	117568-27-1	R53	R: 53 S: 61		
609-053-00-X	hidrazina-tri-nitrometano		414-850-9	—	E; R3 O; R8 Carc. Cat. 2; R45 T; R23/25 R43	E; T R: 45-3-8-23/25-43 S: 53-45		
610-010-00-2	2-bromo-1-(2-furil)-2-nitroetileno		406-110-9	35950-52-8	Xn; R22-48/22 C; R34 R43 Ni; R50-53	C; N R: 22-34-43-48/22-50/53 S: (1/2-)22-26-36/37/39-45-60-61		
611-043-00-5	Mistura (2:1:1) de: N(1')-N(2)N(1'')-N(2'')-η-6-[2-amino-4-(ou 6)-hidroxi-(ou 4-amino-2-hidroxi)fenilazo]-6''-(1-carbanilolil-2-hidroxi-prop-1-enilazo)-5',5'''-dissulfamoil-3,3'''-dissulfonato-bis(naftaleno-2,1'-azobenzeno-1,2'-diolato-O(1),O(2))-cromato de trissódio; N(1')-N(2):N(1'')-N(2'')-η-6,6''-bis(1-carbanilolil-2-hidroxi-prop-1-enilazo)-5',5'''-dissulfamoil-3,3'''-dissulfonato-bis(naftaleno-2,1'-azobenzeno-1,2'-diolato-O(1),O(2))-cromato de trissódio; N(1')-N(2):N(1'')-N(2'')-η-6,6''-bis[2-amino-4-(ou 6)-hidroxi-(ou 4-amino-2-hidroxi)fenilazo]5',5'''-dissulfamoil-3,3'''-dissulfonato-bis(naftaleno-2,1'-azobenzeno-1,2'-diolato-O(1),O(2))-cromato de trissódio		402-850-1	—	Xi; R41 52-53	Xi R: 41-52/53 S: (2-)26-39-61		

N.º de índice	Designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	N.º CE	N.º CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
611-044-00-0	Mistura de: bis[1-[(2-hidroxi-5-nitrofenil)azo]-2-naftalenolato(2-)]-cromato(1-) de terc-alquil(C12-C14)amonio; bis[1-[(2-hidroxi-4-nitrofenil)azo]-2-naftalenolato(2-)]-cromato(1-) de terc-alquil(C12-C14)amonio; bis[1-[[5-(1,1-dimetilpropil)-2-hidroxi-3-nitrofenil]azo]-2-naftalenolato(2-)]-cromato(1-) de terc-alquil(C12-C14)amonio; [[1-[(2-hidroxi-5-nitrofenil)azo]-2-naftalenolato(2-)]-1-[(2-hidroxi-5-nitrofenil)azo]-2-naftalenolato(2-)]-cromato(1-)]-1-[[5-(1,1-dimetilpropil)-2-hidroxi-3-nitrofenil]azo]-2-naftalenolato(2-)]-1-[[2-hidroxi-5-nitrofenil]azo]-2-naftalenolato(2-)]-cromato(1-) de terc-alquil(C12-C14)amonio; ((1-(4 ou 5)-nitro-2-oxidofenilazo)-2-naftolato)(1-(3-nitro-2-oxidopentilfenilazo)-2-naftolato)/cromato(1-) de C12-C14-terc-alkilamónio		403-720-7	117527-94-3	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
611-045-00-6	2-[4-[N-(4-acetoxibutil)-N-etil]amino-2-metilfenilazo]-3-acetil-5-nitrotiofeno		404-830-8	—	R53	R: 53 S: 61		
611-046-00-1	4,4'-diamino-2-metilazobenzeno		407-590-2	43151-99-1	T; R25 Xn; R48/22 R43 N; R50-53	T; N R: 25-43-48/22-50/53 S: (1/2)/22-28-36/37-45-60-61		
611-047-00-7	Mistura (1:1) de: 2-[[4-[N-etil-N-(2-acetoxietil)amino]fenil]azo]-5,6-diclorobenzotiazol; 2-[[4-[N-etil-N-(2-acetoxietil)amino]fenil]azo]-6,7-diclorobenzotiazol		407-890-3	111381-11-4	R53	R: 53 S: 61		
611-048-00-2	Mistura (1:1) de: 2-[[4-[bis(2-acetoxietil)amino]fenil]azo]-5,6-diclorobenzotiazol; 2-[[4-[bis(2-acetoxietil)amino]fenil]azo]-6,7-diclorobenzotiazol		407-900-6	111381-12-5	R53	R: 53 S: 61		

N.º de índice	Designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	N.º CE	N.º CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
611-049-00-8	7-[4-(3-dietilaminopropilamino)-6-(3-dietilamino)propilamino]-1,3,5-triazin-2-ilamino]-4-hidroxi-3-(4-fenilazofenilazo)-naftaleno-2-sulfonato, ácido acético, ácido láctico (2:1:1)		408-000-6	118658-98-3	Xn; R48/22 R43 R52-53	Xn R: 43-48/22-52/53 S: (2-22-36/37-61		
611-051-00-9	cloreto de 2-(4-(N-etil-N-(2-hidroxi)etil)amino-2-metilfenil)azo-6-metoxi-3-metil-benzotiazolio		411-110-7	136213-74-6	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
611-052-00-4	complexo de ferro de aqua-[5-[[2,4-dihidroxi-5-[(2-hidroxi-3,5-dinitrofenil)azo]fenil]azo]-2-naftalenosulfonato] de monossódio		400-720-9	—	R52-53	R: 52/53 S: 61		
612-156-00-2	Mistura de: cloreto de trihexadecilmetilamónio; cloreto de dihexadecilmetilamónio		405-620-9	—	Xi; R41 N; R50-53	Xi; N R: 41-50/53 S: (2-26-39-60-61		
612-157-00-8	(Z)-1-benzo[b]tieno-2-iletanonoxima cloridrato		410-780-8	—	Xn; R22-48/22 Xi; R41 R43 N; R51-53	Xn; N R: 22-41-43-48/22-51/53 S: (2-22-26-36/37/39-61		
612-158-00-3	Mistura de: bis(5-dodecil-2-hidroxibenzald-oximato) de cobre (II) o grupo alquilico C12 é ramificado; 4-dodecilsalicilaldoxima		410-820-4	—	R53	R: 53 S: 61		
612-159-00-9	Produtos de reacção de: trimetilhexametilene diamina (mistura de 2,2,4-trimetil-1,6-hexanodiamina e 2,4,4-trimetil-1,6-hexanodiamina, catalogada no EINECS), Epóxido 8 (derivados de mono[(C10-C16-alkiloxi)metil]oxirane) e ácido p-tolueno-sulfónico		410-880-1	—	Xn; R22 C; R34 N; R50-53	C; N R: 22-34-50/53 S: (1/2-23-26-36/37/39-45-60-61		
613-149-00-7	2-terc-butil-5-(4-terc-butilbenzilto)-4-cloropiridazina-3(2H)-ona		405-700-3	96489-71-3	T; R23/25 N; R50-53	T; N R: 23/25-50/53 S: (1/2-36/37-45-60-61		
613-150-00-2	2,2'-[3,3'-(piperazina-1,4-dii)di]propilbis(1H-benzimidazo[2,1-b]benzo[l,m,n][3,8]fenantrolina-1,3,6-triona		406-295-6	—	R53	R: 53 S: 61		

N.º de índice	Designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	N.º CE	N.º CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
613-151-00-8	1-(3-mesiloxi-5-tritiloxi-2-D-treofuril)timina		406-360-9	104218-44-2	R53	R: 53 S: 61		
613-152-00-3	N-(4,6-dimetoxipirimidina-2-il)carbarnato de fenilo		406-600-2	89392-03-0	R43 N: R51-53	Xi: N R: 43-51/53 S: (2)-24-37-61		
613-153-00-9	2,3,5-tricloropiridina		407-270-2	16063-70-0	R52-53	R: 52/53 S: 61		
613-154-00-4	2-amino-4-cloro-6-metoxipirimidina		410-050-9	5734-65-5	Xn; R22	Xn R: 22 S: (2)-22		
613-155-00-X	5-cloro-2,3-difluorpiridina		410-090-7	89402-43-7	R10 Xn; R22 R52-53	Xn R: 10-22-52/53 S: (2)-23-36-61		
613-156-00-5	2-butil-4-cloro-5-formilimidazole		410-260-0	83857-96-9	R43 N: R51-53	Xi: N R: 43-51/53 S: (2)-24-37-61		
613-157-00-0	2,4-diamino-5-metoximetilpirimidina		410-330-0	54236-98-5	Xn; R22-48/22 Xi; R36	Xn R: 22-36-48/22 S: (2)-22-26-36		
613-158-00-6	2,3-dicloro-5-trifluorometil-piridina		410-340-5	69045-84-7	Xn; R20/22 Xi; R41 R43 N: R51-53	Xn; N R: 20/22-41-43-51/53 S: (2)-24-26-37/39-61		
613-159-00-1	4-[2-[4-(1,1-dimetiletil)fenil]etoxi]quinazolina		410-580-0	120928-09-8	T; R25 Xn; R20 N: R50-53	T; N R: 20-25-50/53 S: (1/2)-37-45-60-61		
613-160-00-7	(1S)-2-metil-2,5-diazobicyclo[2.2.1]heptano dibromidrato		411-000-9	125224-62-6	R43	Xi R: 43 S: (2)-24-37		
615-022-00-1	3-isocianatosulfonil-2-tiofeno-carboxilato de metilo		410-550-7	79277-18-2	E; R2 R14 Xn; R48/22 R42/43	E; Xn R: 2-14-42/43-48/22 S: (2)-22-30-35-36/37		

N.º de índice	Designação química	Notas explicativas sobre as substâncias	N.º CE	N.º CAS	Classificação	Rotulagem	Limites de concentração	Notas explicativas sobre as preparações
615-023-00-7	metil éster do ácido 2-(isocianatossulfonilmetil)benzóico		410-900-9	83056-32-0	R10 R14 Muta. Cat. 3; R40 Xn; R20-48/22 Xi; R41 R42	Xn R: 10-14-20-40-41-42-48/22 S: (2)-23-26-36/37/39		
616-044-00-4	N-(3,5-dicloro-4-etil-2-hidroxifenil)-2-(3-pentadecilfenoxi)-butanamida		402-510-2	—	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
616-045-00-X	2'-(4-cloro-3-ciano-5-formil-2-tienilazo)-5'-dietilamino-2-metoxiacetamida		405-190-2	122371-93-1	R43 R53	Xi R: 43-53 S: (2)-22-24-37-61		
616-046-00-5	N-(2-(6-cloro-7-metilpirazol(1,5-b)-1,2,4-triazolo-4-il)propil)-2-(2,4-di-terc-pentilfenoxi)octanamida		406-390-2	—	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
616-047-00-0	Mistura de: 2,2',2'',2'''-(etilenodinitrilotetraquis-N,N-di(C16)alquilacetamida; 2,2',2'',2'''-(etilenodinitrilotetraquis-N,N-di(C18)alquilacetamida		406-640-0	—	R43	Xi R: 43 S: (2)-24-37		
616-048-00-6	3'-trifluorometilisobutiranilida		406-740-4	1939-27-1	Xn; R48/22 N; R51-53	Xn; N R: 48/22-51/53 S: (2)-22-36-61		
616-049-00-1	2-(2,4-bis(1,1-dimetil)fenoxi)-N-(3,5-dicloro-4-etil-2-hidroxifenil)-hexanamida		408-150-2	99141-89-6	R53	R: 53 S: 61		
616-050-00-7	N-[2,5-dicloro-4-(1,1,2,3,3-hexafluoro-propoxi)-fenil-aminocarbonil]-2,6-difluorbenzamida		410-690-9	103055-07-8	R43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2)-24-37-60-61		
616-051-00-2	Mistura de: 2,4-bis(N'-(4-metilfenil)-ureido)-tolueno; 2,6-bis(N'-(4-metilfenil)-ureido)-tolueno		411-070-0	—	R53	R: 53 S: 61		
617-015-00-9	bis(4-metilbenzoi)peróxido		407-950-9	895-85-2	E; R2 O; R7 N; R50-53	E; N R: 2-7-50/53 S: (2)-7-14-36/37/39-47-60-61		
650-032-00-X	ciptroconazole (ISO) (2RS,3RS,3SR)-2-(4-clorofenil)-3-ciclopropil-1-(1H-1,2,4-triazol-1-il)butano-2-ol		—	94361-06-5	Repr. Cat. 3; R63 Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53-63 S: (2)-36/37-60-61		

ANEXO 2

R 66

IT: L'esposizione ripetuta può provocare secchezza e screpolature della pelle.

(Versão ES não afectada)

(Versão DA não afectada)

(Versão DE não afectada)

(Versão EL não afectada)

(Versão EN não afectada)

(Versão FR não afectada)

(Versão NL não afectada)

(Versão PT não afectada)

(Versão FI não afectada)

(Versão SV não afectada)

ANEXO 3A

S 23

FR: Ne pas respirer les gaz/fumées/vapeurs/aérosols [terme(s) approprié(s) à indiquer par le fabricant].

(Versão ES não afectada)

(Versão DA não afectada)

(Versão DE não afectada)

(Versão EL não afectada)

(Versão EN não afectada)

(Versão IT não afectada)

(Versão NL não afectada)

(Versão PT não afectada)

(Versão FI não afectada)

(Versão SV não afectada)

S 26

DE: Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren.

(Versão ES não afectada)

(Versão DA não afectada)

(Versão EL não afectada)

(Versão EN não afectada)

(Versão FR não afectada)

(Versão IT não afectada)

(Versão NL não afectada)

(Versão PT não afectada)

(Versão FI não afectada)

(Versão SV não afectada)

S 56

DE: Diesen Stoff und seinen Behälter der Problemabfallentsorgung zuführen.

EN: Dispose of this material and its container to hazardous or special waste collection point.

IT: Smaltire questo materiale e i relativi contenitori in un punto di raccolta di rifiuti pericolosi o speciali.

(Versão ES não afectada)

(Versão DA não afectada)

(Versão EL não afectada)

(Versão FR não afectada)

(Versão NL não afectada)

(Versão PT não afectada)

(Versão FI não afectada)

(Versão SV não afectada)

—

ANEXO 3B

S 27/28

DE: Bei Berührung mit der Haut beschmutzte, getränkte Kleidung sofort ausziehen und Haut sofort mit viel ... abwaschen (vom Hersteller anzugeben).

(Versão ES não afectada)

(Versão DA não afectada)

(Versão EL não afectada)

(Versão EN não afectada)

(Versão FR não afectada)

(Versão IT não afectada)

(Versão NL não afectada)

(Versão PT não afectada)

(Versão FI não afectada)

(Versão SV não afectada)

S 29/56

ES: No tirar los residuos por el desagüe; elimínese esta sustancia y su recipiente en un punto de recogida pública de residuos especiales o peligrosos.

DE: Nicht in die Kanalisation gelangen lassen; diesen Stoff und seinen Behälter der Problemabfallentsorgung zuführen.

EN: Do not empty into drains, dispose of this material and its container to hazardous or special waste collection point.

IT: Non gettare i residui nelle fognature; smaltire questo materiale e i relativi contenitori in un punto di raccolta di rifiuti pericolosi o speciali.

NL: Afval niet in de gootsteen werpen; deze stof en de verpakking naar een inzamelpunt voor gevaarlijk of bijzonder afval brengen.

SV: Töm ej i avloppet, lämna detta material och dess behållare till insamlingsställe för farligt avfall.

(Versão DA não afectada)

(Versão EL não afectada)

(Versão FR não afectada)

(Versão PT não afectada)

(Versão FI não afectada)

ANEXO 4A

«B.10. MUTAGENICIDADE — ENSAIO *IN VITRO* DE ABERRAÇÕES CROMOSSÓMICAS EM MAMÍFEROS

1. MÉTODO

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

1.1. INTRODUÇÃO

O objectivo do ensaio *in vitro* de aberrações cromossómicas é identificar os agentes que causam aberrações estruturais dos cromossomas em culturas de células de mamíferos (1) (2) (3). As aberrações estruturais podem ser de dois tipos, afectando os cromossomas ou os cromátídeos. A maior parte dos mutagénicos químicos induzem aberrações cromatídicas, mas também podem ocorrer aberrações cromossómicas. Um aumento da taxa de poliploidia pode indicar que um determinado produto químico tem potencial para induzir aberrações numéricas. Contudo, este método não foi concebido para medir as aberrações numéricas nem é normalmente utilizado com esse objectivo. As mutações nos cromossomas e eventos relacionados causam diversas doenças genéticas humanas, existindo provas substanciais de que as alterações que causam nos oncogenes e nos genes supressores de tumores das células somáticas estão envolvidas na indução de cancro nos seres humanos e em animais utilizados em experiências.

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

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

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

Ver também a parte B da introdução geral.

1.2. DEFINIÇÕES

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

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

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

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

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

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

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

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

1.3. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

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

1.4. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.4.1. Preparação

1.4.1.1. Células

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

1.4.1.2. Meios e condições de cultura

As culturas devem ser mantidas em meios de cultura e condições de incubação adequados (tipo de recipiente, concentração de CO_2 , temperatura e humidade). As linhas celulares e estirpes devem ser periodicamente controladas no que respeita à estabilidade do número modal de cromossomas e à ausência de contaminação por micoplasma, não devendo ser utilizadas se se verificar que foram contaminadas. Deve ser conhecida a duração do ciclo celular normal para as células e condições de cultura utilizadas.

1.4.1.3. Preparação das culturas

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

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

1.4.1.4. Activação metabólica

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

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

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

1.4.1.5. *Substância em estudo/preparação*

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

1.4.2. **Condições de ensaio**

1.4.2.1. *Solvente/veículo*

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

1.4.2.2. *Concentrações de exposição*

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

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

Devem utilizar-se pelo menos três concentrações analisáveis. No caso de substâncias que sejam citotóxicas, as concentrações utilizadas devem abranger uma gama compreendida entre a toxicidade máxima e uma toxicidade reduzida ou nula; o que significa geralmente que as concentrações devem variar num factor de 2 a $\sqrt{10}$. No momento da colheita, a concentração máxima deve determinar uma redução significativa (superior a 50%) do grau de confluência, da contagem de células viáveis e do índice mitótico. O índice mitótico constitui uma medida indirecta dos efeitos citotóxicos/citostáticos, dependendo do tempo decorrido após a exposição. Todavia, a sua utilização é aceitável no caso de culturas em suspensão, em que os restantes métodos de determinação da toxicidade podem revelar-se fastidiosos ou impraticáveis. Os dados relativos à cinética do ciclo celular, nomeadamente o tempo médio de geração (TMG), podem ser utilizados como informação suplementar. O TMG constitui, no entanto, uma média global, que nem sempre permite identificar a existência de subpopulações com um crescimento menos rápido, podendo acontecer em alguns casos que ligeiros aumentos do TMG possam resultar em atrasos muito substanciais no que respeita ao surgimento de aberrações.

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

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

1.4.2.3. *Controlos negativos e positivos*

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

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

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

Condição de activação metabólica	Substância	N.º CAS	N.º Einesc
Ausência de activação metabólica exógena	metanossulfonato de metilo	66-27-3	200-625-0
	metanossulfonato de etilo	62-50-0	200-536-7
	etil nitrosureia	759-73-9	212-072-2
	mitomicina C	50-07-7	200-008-6
	N-óxido de 4-nitroquinolina	56-57-5	200-281-1
Presença de activação metabólica exógena	benzo[a]pireno	50-32-8	200-028-5
	ciclofosfamida	50-18-0	200-015-4
	ciclofosfamida monohidrato	6055-19-2	

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

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

1.4.3. Procedimento

1.4.3.1. Exposição à substância em estudo

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

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

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

1.4.3.3. Intervalo de amostragem das culturas

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

1.4.3.4. *Preparação dos cromossomas*

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

1.4.3.5. *Análise*

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

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

2. **DADOS**

2.1. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

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

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

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

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

2.2. AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

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

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

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

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

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

3. APRESENTAÇÃO DE RELATÓRIOS

RELATÓRIO DE ENSAIO

O relatório de ensaio deve incluir a seguinte informação:

Solvente/veículo:

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

Células:

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

Condições de ensaio:

- identificação e concentração da substância que pára a metafase, duração da exposição da célula,
- justificação para a selecção das concentrações e do número de culturas, incluindo, por exemplo, dados sobre a citotoxicidade e sobre as limitações de solubilidade, quando disponíveis,
- concentração da substância em estudo,
- volumes adicionados do veículo e da substância em estudo,
- temperatura de incubação,
- tempo de incubação,
- duração da exposição,
- densidade celular da cultura de arranque, quando aplicável,
- tipo e composição do sistema de activação metabólica, incluindo critérios de aceitabilidade,
- controlos positivos e negativos,
- métodos de preparação das lâminas,
- critérios de contabilização das aberrações,

- número de células em metafase analisadas,
- métodos de determinação da toxicidade,
- critérios definidos para que o estudo seja considerado positivo, negativo ou não conclusivo.

Resultados:

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

Discussão dos resultados.

Conclusões.

4. BIBLIOGRAFIA

- (1) Evans, H. J. (1976), Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens, in: *Chemical mutagens, Principles and Methods for their Detection*, Vol. 4, Hollaender, A. (ed) Plenum Press, New York and London, pp. 1-29.
- (2) Ishidate, M. Jr. and Sofuni, T. (1985), The *In Vitro* Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture, in: *Progress in Mutation Research*, Vol. 5. Ashby, J. et al., (eds) Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York-Oxford. pp. 427-432.
- (3) Galloway, S. M., Armstrong, M. J., Reuben, C., Colman, S., Brown, B., Cannon, C., Bloom, A. D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., Rimpou, J., Margolin, G. H., Resnick, M. A., Andersen, G. and Zeiger, E. (1978), Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environ. Molec. Mutagen* 10 (suppl. 10), pp. 1-175.
- (4) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B. C. (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res.*, 257, pp. 147-204.
- (5) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992), Clastogenicity of low pH to Various Cultured Mammalian Cells, *Mutation Res.*, 268, pp. 297-305.
- (6) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 31, pp. 347-364.
- (7) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 113, pp. 173-215.

- (8) Natarajan, A. T., Tates, A. D., van Buul, P. P. W., Meijers, M. and de Vogel, N. (1976), Cytogenetic Effects of Mutagen/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, J. Induction of Chromosome Aberrations and Sister Chromatid Exchange by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes, *Mutation Res.*, 37, pp. 83-90.
 - (9) Matsuoka, A., Hayashi, M. and Ishidate, M. Jr. (1979), Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*, *Mutation Res.*, 66, pp. 277-290.
 - (10) Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Report of UK environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclar 1254-induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 175-177.
 - (11) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, in: de Serres, F. J., Fouts, J. R., Berid, J. R. and Philpot, R. M. (eds), *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
 - (12) Galloway, S. M., Aardema, M. J., Ishidate, M. Jr., Iven, J. L., Kirkland, D. J., Morita, T., Mosesso, P., Sofuni, T. (1994), Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations, *Mutation Res.*, 312, pp. 241-261.
 - (13) Richardson, C., Williams, D. A., Allen, J. A., Amphlett, G., Chanter, D. O. and Phillips, B. (1989), Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays, in: *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D. J., (ed) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.
 - (14) Soper, K. A. and Galloway, S. M. (1994), Replicate Flasks are not Necessary for *In Vitro* Chromosome Aberration Assays in CHO Cells, *Mutation Res.*, 312, pp. 139-149.
 - (15) Krahn, D. F., Barsky, F. C. and McCooley, K. T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, in: Tice, R. R., Costa, D. L., Schaich, K. M. (eds), *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, New York, Plenum, pp. 91-103.
 - (16) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P. and Brooks, A. L. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental Mutagenesis*, 5, pp. 795-801.
 - (17) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest, *Mutation Res.*, 119, pp. 403-413.
 - (18) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J. E. (1983), Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Res.*, 43, pp. 1362-1364.»
-

ANEXO 4B

«B.11. MUTAGENICIDADE — ENSAIO *IN VIVO* DE ABERRAÇÕES CROMOSSÓMICAS EM CÉLULAS DA MEDULA DE MAMÍFEROS

1. MÉTODO

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

1.1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

Ver também a parte B da introdução geral.

1.2. DEFINIÇÕES

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

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

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

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

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

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

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

1.3. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

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

1.4. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.4.1. **Preparação**

1.4.1.1. *Seleção das espécies animais*

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

1.4.1.2. *Condições de acomodação e alimentação*

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

1.4.1.3. *Preparação dos animais*

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

1.4.1.4. *Preparação das doses*

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

1.4.2. **Condições do Ensaio**

1.4.2.1. *Solvente/veículo*

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

1.4.2.2. *Controlos*

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

Os controlos positivos devem produzir aberrações estruturais *in vivo* aos níveis a que se espera o surgimento de um aumento detectável em relação à linha de base. A dose a administrar para o controlo positivo deve ser escolhida de modo a que os seus efeitos sejam claros mas também a que as lâminas codificadas não sejam imediatamente identificadas pela pessoa que procede às leituras. É aceitável que o controlo positivo seja admi-

nistrado por uma via diferente da substância em estudo e que só seja realizada uma amostra. A possibilidade de utilização de produtos químicos de uma classe relacionada para o controlo positivo deve ser considerada, quando existam. As substâncias de controlo positivo podem incluir, por exemplo:

Substância	Número CAS	Número EINECS
metanossulfonato de etilo	62-50-0	200-536-7
etilnitrosureia	759-73-9	212-072-2
mitomicina C	50-07-7	200-008-6
ciclofosfamida	50-18-0	200-015-4
ciclofosfamida monohidrato	6055-19-2	
trietilenomelamina	51-18-3	200-083-5

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

1.5. PROCEDIMENTO

1.5.1. Número e sexo dos animais

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

1.5.2. Programação do tratamento

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

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

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

1.5.3. Doses

Se for realizado um estudo para avaliação da gama de doses a administrar, por não estarem disponíveis dados apropriados, esse estudo deve ser executado no mesmo laboratório, utilizando as mesmas espécies, linha celular, sexo e regime de exposição a utilizar no estudo principal (5). Se a substância for tóxica, deverão ser utilizadas três doses diferentes para a primeira amostragem, abrangendo uma gama compreendida entre a toxicidade máxima e uma toxicidade reduzida ou quase nula. Na segunda amostragem só será necessário avaliar a dose máxima, que é definida como a dose que produz sinais de toxicidade tais que indiquem que a utilização de doses superiores, com o mesmo regime de administração, produzirá mortalidade. As substâncias com actividade biológica específica em doses baixas e não tóxicas (como acontece com as hormonas e agentes mitogénicos) poderão constituir uma excepção aos critérios de fixação da dose, devendo ser avaliadas caso a caso. A dose máxima pode igualmente ser definida como a dose que produz algumas indicações de toxicidade na medula (por exemplo: uma redução superior a 50% do índice mitótico).

1.5.4. Ensaio limite

Se um ensaio com uma dose de pelo menos 2 000 mg/kg de peso corporal numa única exposição ou em duas exposições no mesmo dia não produzir nenhum efeito tóxico perceptível e se, com base nos dados respeitantes a substâncias estruturalmente relacionadas, não for previsível a existência de toxicidade genética, poderá não ser considerado necessário um estudo completo com utilização de três doses diferentes. Para os estudos de maior duração, a dose limite é de 2 000 mg/kg de peso corporal/dia para as exposições até 14 dias e de 1 000 mg/kg de peso corporal/dia para as exposições de duração superior a 14 dias. A exposição prevista para o ser humano pode indicar a necessidade de se utilizarem doses mais elevadas nos ensaios limite.

1.5.5. Administração das doses

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

1.5.6. Preparação dos cromossomas

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

1.5.7. Análise

O índice mitótico deve ser determinado como medição da citotoxicidade em pelos menos 1 000 células por animal para todos os animais expostos à substância em estudo (incluindo os controlos positivos) e para os animais não expostos do controlo negativo.

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

2. DADOS

2.1. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

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

2.2. AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

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

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

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

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

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

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

3. APRESENTAÇÃO DE RELATÓRIOS

RELATÓRIO DE ENSAIO

O relatório de ensaio deve incluir a seguinte informação:

Solvente/veículo:

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

Animais de ensaio:

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

Condições de ensaio:

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

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

Resultados:

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

Discussão dos resultados.

Conclusões.

4. BIBLIOGRAFIA

- (1) Adler, I. D. (1984), Cytogenetic Tests in Mammals, in: *Mutagenicity Testing: a Practical Approach*, S. Venitt and J. M. Parry (eds.). IRL Press, Oxford, Washington D. C., 275-306.
- (2) Preston, R. J., Dean, B. J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A. F. and Shelby, M. (1987), Mammalian *In Vivo* Cytogenetic Assays: Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells, *Mutation Res.*, 189, 157-165.

- (3) Richold, M., Chandly, A., Ashby, J., Gatehouse D. G., Bootman, J. and Henderson, L. (1990), *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland, (ed.), *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing Report. Part I revised*, Cambridge University Press, Cambridge, New Cork, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.
 - (4) Tice, R. R. Hayashi, M., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blakey, D. H., Holden, H. E., Kirch-Volders, M., Oleson Jr., F. B., Paccierotti, F., Preston R. J., Romagna F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994), Report from the Working Group on the *In Vivo* Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test, *Mutation Res.*, 312, pp. 305-312.
 - (5) Fielder, R. J., Alleen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK, Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 313-319.
 - (6) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: *UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report Part III. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, D. J. Kirkland, (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184-232.
 - (7) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation-induced G2 arrest, *Mutation Res.*, 119, pp. 403-413.
 - (8) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J. E. (1983), Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Res.*, 43, pp. 1362-1364.»
-

ANEXO 4C

«B.12. MUTAGENICIDADE — ENSAIO *IN VIVO* DOS MICRONÚCLEOS EM ERITRÓCITOS DE MAMÍFEROS

1. MÉTODO

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

1.1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

Ver também a parte B da introdução geral.

1.2. DEFINIÇÕES

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

Micronúcleos: Pequenos núcleos separados e adicionais dos núcleos das células principais, produzidos durante a telófase da mitose (meiose) por fragmentos do cromossoma ou cromossomas inteiros que “ficam para trás” (*lagging*).

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

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

1.3. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

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

1.4. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.4.1. **Preparação**

1.4.1.1. *Seleção das espécies animais*

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

1.4.1.2. *Condições de acomodação e alimentação*

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

1.4.1.3. *Preparação dos animais*

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

1.4.1.4. *Preparação das doses*

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

1.4.2. **Condições do Ensaio**

1.4.2.1. *Solvente/veículo*

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

1.4.2.2. *Controlos*

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

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

Substância	Número CAS	Número EINECS
metanossulfonato de etilo	62-50-0	200-536-7
etilnitrosureia	759-73-9	212-072-2
mitomicina C	50-07-7	200-008-6
ciclofosfamida	50-18-0	200-015-4
ciclofosfamida monohidrato	6055-19-2	
trietilenomelamina	51-18-3	200-083-5

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

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

1.5. PROCEDIMENTO

1.5.1. Número e sexo dos animais

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

1.5.2. Programação do tratamento

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

O ensaio pode ser executado de duas formas:

- a) Os animais são expostos à substância em estudo uma única vez. As amostras de medula são colhidas pelo menos duas vezes, a primeira das quais pelo menos 24 horas após a exposição, com intervalos apropriados entre as colheitas mas não ultrapassando as 48 horas após a exposição. Uma eventual colheita antes de 24 horas após a exposição terá de ser justificada. As amostras de sangue periférico são colhidas pelo

menos duas vezes, a primeira das quais pelo menos 36 horas após a exposição, com intervalos apropriados entre as colheitas mas não ultrapassando as 72 horas após a exposição. Quando for identificada uma resposta positiva numa determinada colheita, não será necessário continuar o estudo;

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

Quando necessário, poderão ser recolhidas amostras adicionais.

1.5.3. Doses

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

1.5.4. Ensaio limite

Se um ensaio com uma dose de pelo menos 2 000 mg/kg de peso corporal numa única exposição ou em duas exposições no mesmo dia não produzir nenhum efeito tóxico perceptível e se, com base nos dados respeitantes a substâncias estruturalmente relacionadas, não for previsível a existência de toxicidade genética, poderá não ser considerado necessário um estudo completo com utilização de três doses diferentes. Para os estudos de maior duração, a dose limite é de 2 000 mg/kg de peso corporal/dia para as exposições até 14 dias e de 1 000 mg/kg de peso corporal/dia para as exposições de duração superior a 14 dias. A exposição prevista para o ser humano pode indicar a necessidade de se utilizarem doses mais elevadas nos ensaios limite.

1.5.5. Administração das doses

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

1.5.6. Preparação da medula/sangue

As células da medula são retiradas do fémur ou da tibia imediatamente após o sacrifício. Geralmente, as células são retiradas do fémur ou da tibia, preparadas e coradas de acordo com métodos já definidos. O sangue periférico é retirado da veia caudal ou de outro vaso sanguíneo apropriado. As células de sangue são imediatamente sujeitas a uma coloração supravital (8) (9) (10) ou então são preparados esfregaços que depois são corados. A utilização de uma coloração específica para o ADN [por exemplo: laranja de acridina (14) ou pironina-y de milho 33 258 plus da Hoechst (15)] pode eliminar alguns dos erros associados à utilização de uma coloração não específica para o ADN. Esta vantagem não impossibilita a utilização de colorações convencionais (por exemplo: Giemsa). Outros sistemas [por exemplo: colunas de celulose para remoção das células nucleadas (16)] podem igualmente ser utilizados, desde que se demonstre que esses sistemas funcionam de forma adequada para a preparação de micronúcleos em laboratório.

1.5.7. Análise

A proporção de eritrócitos imaturos em relação aos eritrócitos totais (imaturos + maduros) é determinada para cada animal, através da contagem de pelo menos 200 eritrócitos no caso da medula e de 1 000 eritrócitos no caso do sangue periférico (17). Todas as lâminas, incluindo as dos controlos positivos e negativos,

devem ser codificadas independentemente antes da análise microscópica. A eventual ocorrência de eritrócitos imaturos micronucleados deve ser analisada em pelo menos 2 000 eritrócitos imaturos por animal. A contagem de eritrócitos maduros micronucleados poderá ser utilizada como informação adicional. Ao analisar as lâminas, a proporção de eritrócitos imaturos em relação aos eritrócitos totais não deve ser inferior a 20 % do valor de controlo. Quando os animais forem sujeitos a uma exposição contínua durante quatro semanas ou mais, poderão ser também analisados 2 000 eritrócitos maduros por animal, para determinação da ocorrência de micronúcleos. Os sistemas automatizados de análise (tratamento de imagens e citometria de fluxo e suspensões celulares) são alternativas aceitáveis à avaliação manual, se apropriadamente justificadas e validadas.

2. DADOS

2.1. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

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

2.2. AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

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

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

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

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

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

3. APRESENTAÇÃO DE RELATÓRIOS

RELATÓRIO DE ENSAIO

O relatório de ensaio deve incluir a seguinte informação:

Solvente/veículo:

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

Animais de ensaio:

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

Condições de ensaio:

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

Resultados:

- sinais de toxicidade,
- proporção de eritrócitos imaturos em relação aos eritrócitos totais,
- número de eritrócitos imaturos micronucleados em cada animal,
- médias e desvios-padrão dos eritrócitos imaturos micronucleados por grupo,
- relação dose-resposta, quando seja possível de determinar,
- análise estatística e respectivo método,
- dados relativos ao controlo negativo realizado em paralelo com o ensaio e dados históricos sobre o controlo negativo,
- dados relativos ao controlo positivo realizado em paralelo com o ensaio.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

4. BIBLIOGRAFIA

- (1) Heddle, J. A. (1973), A Rapid *In Vivo* Test for Chromosomal Damage, *Mutation Res.*, 18, pp. 187-190.
- (2) Schmid, W. (1975), The Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 31, pp. 9-15.
- (3) Heddle, J. A., Salamone, M. F., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J. G. and Newell, G. W. (1983), The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity, *Mutation Res.* 123, pp. 61-118.
- (4) Mavournin, K. H., Blakey, D. H., Cimino, M. C., Salamone, M. F. and Heddle, J. A. (1990), The *In Vivo* Micronucleus Assay in Mammalian Bone Marrow and Peripheral Blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 239, pp. 29-80.
- (5) MacGregor, J. T., Schlegel, R., Choy, W. N., and Wehr, C. M. (1983), Micronuclei in Circulating Erythrocytes: A Rapid Screen for Chromosomal Damage During Routine Toxicity Testing in Mice, in: *Developments in Science and Practice of Toxicology*, ed. A. W. Hayes, R. C. Schnell and T. S. Miya, Elsevier, Amsterdam, pp., 555-558.
- (6) MacGregor, J. T., Heddle, J. A., Hite, M., Margolin, G. H., Ramel, C., Salamone, M. F., Tice, R. R. and Wild, D. (1987), Guidelines for the Conduct of Micronucleus Assays in Mammalian Bone Marrow Erythrocytes, *Mutation Res.*, 189, pp. 103-112.
- (7) MacGregor, J. T., Wehr, C. M., Henika, P. R., and Shelby, M. E. (1990), The *in vivo* Erythrocyte Micronucleus Test: Measurement at Steady State Increases Assay Efficiency and Permits Integration with Toxicity Studies, *Fund. Appl. Toxicol.* 14, pp. 513-522.
- (8) Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1990), The Micronucleus Assay with Mouse Peripheral Blood Reticulocytes Using Acridine Orange-Coated Slides, *Mutation Res.*, 245, pp. 245-249.
- (9) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992). Micronucleus Test with Mouse Peripheral Blood Erythrocytes by Acridine Orange Supravital Staining: The Summary Report of the 5th Collaborative Study by CSGMT/JEMMS, MMS, *Mutation Res.*, 278, pp. 83-98.
- (10) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT/JEMMS, MMS: The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan) (1995). Protocol recommended for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test, *Mutagenesis*, 10, pp. 153-159.
- (11) Hayashi, M., Tice, R. R., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blackey, D. H., Kirsch-Volders, M., Oleson, Jr. F. B., Pacchierotti, F., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994), *In Vivo*, Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay, *Mutation Res.*, 312, pp. 293-304.
- (12) Higashikuni, N. and Sutou, S. (1995), An optimal, generalised sampling time of 30 ± 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test, *Mutagenesis*, 10, pp. 313-319.
- (13) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Rochold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 313-319.
- (14) Hayashi, M., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 120, pp. 241-247.
- (15) MacGregor, J. T., Wehr, C. M. and Langlois, R. G. (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y, *Mutation Res.*, 120, pp. 269-275.
- (16) Romagna, F. and Staniforth, C. D. (1989), The automated bone marrow micronucleus test, *Mutation Res.*, 213, pp. 91-104.
- (17) Gollapudi, B. and McFadden, L. G. (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to non-chromatocytic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, *Mutation Res.*, 347, pp. 97-99.
- (18) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G. and Henderson, L. (1990), *In Vivo* Cytogenetics Assay, in: D. J. Kirkland (ed.), *Basic Mutagenicity tests. UKEMS Recommended Procedures, UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part I, revised*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.
- (19) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part III*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.»

ANEXO 4D

«B.13/14. MUTAGENICIDADE — ENSAIO DE MUTAÇÃO REVERSA EM BACTÉRIAS

1. MÉTODO

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

1.1. INTRODUÇÃO

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

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

Ver também a parte B da introdução geral.

1.2. DEFINIÇÕES

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

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

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

1.3. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

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

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

diferenças na activação metabólica ou ainda a diferenças na biodisponibilidade. Por outro lado, elementos que aumentem a sensibilidade do ensaio de mutação reversa bacteriana podem conduzir à sobrestimação da actividade mutagénica.

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

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

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

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

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

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

1.5. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.5.1. Preparação

1.5.1.1. Bactérias

Devem ser utilizadas culturas frescas de bactérias na fase final do crescimento exponencial ou no início da fase estacionária (aproximadamente 10^9 células/ml). Não devem ser utilizadas culturas em fase estacionária adiantada. É essencial que as culturas utilizadas na experiência contenham um título elevado de células viáveis, que pode ser demonstrado por dados históricos de controlo sobre as curvas de crescimento ou durante o próprio ensaio, através da determinação das células viáveis em placas.

A temperatura de incubação recomendada é 37 °C.

Devem ser utilizadas pelo menos cinco estirpes das bactérias, entre as quais quatro estirpes de *S. typhimurium* (TA1535; TA1537 ou TA97 ou TA 97a; TA98; e TA100) para as quais foi demonstrado que são fiáveis e dão resultados reprodutíveis entre laboratórios. Essas quatro estirpes de *S. typhimurium* têm um par com as bases GC no local da inversão primária e sabe-se que não permitem detectar certos agentes mutagénicos oxidantes, de ligação cruzada nem hidrazinas. Essas substâncias podem ser detectadas utilizando as estirpes *E. coli* WP2 ou *S. typhimurium* TA102 (19) que têm um par com as bases AT no local da inversão primária. Por conseguinte, a combinação de estirpes recomendada é:

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

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

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

1.5.1.2. Meio

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

1.5.1.3. Activação metabólica

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

1.5.1.4. Substância em estudo/preparação

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

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

1.5.2. Condições do ensaio

1.5.2.1. Estirpes (ver 1.5.1.1)

1.5.2.2. Concentração de exposição

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

Poderá ser útil determinar a toxicidade e insolubilidade através de uma experiência preliminar. A citotoxicidade pode ser detectada pela redução do número de colónias com mutação reversa, pela presença de colónias mais claras ou de menores dimensões ou pelo grau de sobrevivência das culturas expostas. A citotoxicidade de uma substância pode variar na presença de sistemas de activação metabólicos. A insolubilidade deve ser avaliada em função da precipitação verificável a olho nu na mistura final nas condições reais do ensaio.

A concentração máxima de ensaio recomendada para substâncias solúveis não citotóxicas é de 5 mg/placa ou de 5 µl/placa. Para as substâncias não citotóxicas insolúveis a 5 mg/placa ou a 5 µl/placa, uma ou mais das concentrações ensaiadas devem ser insolúveis na mistura final. As substâncias de ensaio citotóxicas abaixo dos 5 mg/placa ou 5 µl/placa devem ser ensaiadas até uma concentração citotóxica. O precipitado não deve interferir com a contagem.

Numa experiência inicial, devem ser utilizadas pelo menos cinco concentrações analisáveis diferentes da substância em estudo, com intervalos aproximadamente semi-logarítmicos (ou seja, $\sqrt{10}$) entre as concentrações. Para a investigação da relação concentração-resposta poderão ser indicados intervalos menores. Poderá ser contemplada a possibilidade de ensaiar concentrações superiores a 5 mg/placa ou 5 µl/placa, quando se pretender avaliar substâncias que contenham quantidades substanciais de impurezas potencialmente mutagénicas.

1.5.2.3. Controlos negativos e positivos

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

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

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

Substância	Número CAS	Número EINECS
9,10-dimetilantraceno	781-43-1	212-308-4
7,12-dimetilbenzo[a]antraceno	57-97-6	200-359-5
benzo[a]pireno	50-32-8	200-028-5
2-aminoantraceno	613-13-8	210-330-9
ciclofosfamida	50-18-0	200-015-4
ciclofosfamida monohidrato	6055-19-2	

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

Substância	Número CAS	Número EINECS
Vermelho do Congo	573-58-0	209-358-4

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

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

Substância	Número CAS	Número EINECS	Estirpe
nitrito de sódio	26628-22-8	247-852-1	TA 1535 e TA 100
2-nitrofluoreno	607-57-8	210-138-5	TA 98
9-aminoacridina	90-45-9	201-995-6	TA 1537, TA 97 e TA 97A
ICR 191	17070-45-0	241-129-4	TA 1537, TA 97 e TA 97A
hidroperóxido de isopropilbenzeno	80-15-9	201-254-7	TA 102
mitomicina C	50-07-7	200-008-6	WP2 uvrA e TA 102
N-etil-N-nitro-N-nitrosoguanidina	70-25-7	200-730-1	WP2, WP2 uvrA e WP2 uvrA (pKM101)
4-nitroquinolina-1-óxido	56-57-5	200-281-1	WP2, WP2 uvrA e WP2 uvrA (pKM101)
furilfuramida (AF2)	3688-53-7		estirpes com plasmídeos

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

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

1.5.3. Procedimento

Para o método de incorporação em placas (1) (2) (3) (4) sem activação metabólica, utilizam-se geralmente 0,05 ml ou 0,1 ml da solução de ensaio, 0,1 ml de cultura bacteriana fresca (aproximadamente 10^8 células viáveis) e 0,5 ml de tampão estéril, que são misturados com 2,0 ml de gelose de cobertura. Para o ensaio com activação metabólica, utilizam-se geralmente 0,5 ml de mistura de activação metabólica, que contém uma quantidade adequada de fracção pós-mitocondrial (entre 5 a 30% v/v na mistura de activação metabólica), misturada com a gelose de cobertura (2,0 ml), as bactérias e a substância em estudo/solução de ensaio. O conteúdo de cada tubo é misturado e deitado sobre uma placa de meio mínimo de gelose. A gelose de cobertura deve solidificar antes da incubação.

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

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

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

1.5.4. Incubação

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

2. DADOS

2.1. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

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

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

2.2. AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

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

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

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

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

3. APRESENTAÇÃO DE RELATÓRIOS

RELATÓRIO DE ENSAIO

O relatório de ensaio deve incluir a seguinte informação:

Solvente/veículo:

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

Estirpes:

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

Condições de ensaio:

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

Resultados:

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

Discussão dos resultados.

Conclusões.

4. BIBLIOGRAFIA

- (1) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 31, pp. 347-364.
- (2) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 113, pp. 173-215.
- (3) Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C., Nohmi, T., Venitt, S. and Zeiger, E. (1994), Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays, *Mutation Res.*, 312, pp. 217-233.
- (4) Kier, L. D., Brusick, D. J., Auletta, A. E., Von Halle, E. S., Brown, M. M., Simmon, V. F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T. K. and Ray V. (1986), The *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsomal Assay: A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 168, pp. 69-240.
- (5) Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y.Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y. (1975), Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, *Cancer Letters*, 1, pp. 91-96.
- (6) Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. (1980), Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests, in: *Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens*, ed. Norpoth K. H. and Garner, R. C., Springer, Berlin-Heidelberg-New York, pp. 273-285.
- (7) Gatehouse, D. G., Rowland, I. R., Wilcox, P., Callender, R. D. and Foster R. (1980), Bacterial Mutation Assays, in: *Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Part 1 Revised*, ed. D. J. Kirkland, Cambridge University Press, pp. 13-61.
- (8) Aeschacher, H. U., Wolleb, U. and Porchet, L. (1987), Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods, *J. Food Safety*, 8, pp. 167-177.

- (9) Green, M. H. L., Muriel, W. J. and Bridges, B. A. (1976), Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens, *Mutations Res.*, 38, pp. 33-42.
- (10) Hubbard, S. A., Green, M. H. L., Gatehouse, D. and Bridges, J. W. (1984), The Fluctuation Test in Bacteria, in: *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, 2nd Edition, ed. Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 141-161.
- (11) Thompson, E. D. and Melampy, P. J. (1981), An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of *Salmonella typhimurium*, *Environmental Mutagenesis*, 3, pp. 453-465.
- (12) Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and Matsushima, T. (1994), Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag, *Mutation Res.*, 307, pp. 335-344.
- (13) Prival, M. J., Bell, S. J., Mitchell, V. D., Reipert, M. D. and Vaughan, V. L. (1984), Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified *Salmonella* Assay, *Mutation Res.*, 136, pp. 33-47.
- (14) Zeiger, E., Anderson B. E., Haworth, S., Lawlor, T. and Mortelmans, K. (1992), *Salmonella* Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals, *Environ. Mol. Mutagen.*, 19, pp. 2-141.
- (15) Simmon, V., Kauhanen K. and Tardiff, R. G. (1977), Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water, in *Progress in Genetic Toxicology*, D. Scott, B. Bridges and F. Sobels (eds.) Elsevier, Amsterdam, pp. 249-258.
- (16) Hughes, T. J., Simmons, D. M., Monteith, I. G. and Claxton, L. D. (1987), Vaporisation Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/*Salmonella* Assay, *Environmental Mutagenesis*, 9, pp. 421-441.
- (17) Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M. and Sugimura T. (1979), Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in *Salmonella typhimurium*, *Cancer Res.*, 39, pp. 3780-3782.
- (18) Tamura, G., Gold, C., Ferro-Luzzi, A. and Ames, B. N. (1980), Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, pp. 4961-4965.
- (19) Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D. J. and Gatehouse, D. G. (1990), Comparison of *Salmonella typhimurium* TA 102 with *Escherichia coli* WP2 Tester strains, *Mutagenesis*, 5, pp. 285-291.
- (20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems, in: *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, eds. F. J. de Serres et al. Elsevier, North Holland, pp. 85-88.
- (21) Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Tatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 175-177.
- (22) Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Ames, B. N. (1981), Compatibility of Organic Solvents with the *Salmonella*/Microsome Test, *Mutation Res.*, 88, pp. 343-350.
- (23) Claxton, L. D., Allen J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E. and Zeiger, E. (1987), Guide for the *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity, *Mutation Res.*, 189, pp. 83-91.
- (24) Mahon, G. A. T., Green, M. H. L., Middleton, B., Mitchell, I., Robinson, W. D. and Tweats, D. J. (1989), Analysis of Data from Microbial Colony Assays, in: *UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Part II. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, ed. Kirkland, D. J., Cambridge University Press, pp. 28-65.»

ANEXO 4E

«B.17. MUTAGENICIDADE — ENSAIO DE MUTAÇÃO GÉNICA EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS “IN VITRO”

1. MÉTODO

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

1.1. INTRODUÇÃO

O ensaio de mutação génica em células de mamíferos “*in vitro*” pode ser utilizado para detectar mutações génicas induzidas por substâncias químicas. As linhas celulares que podem ser utilizadas incluem as células L5178Y do linfoma do rato, as linhas celulares CHO, CHO-AS52 e V79 do “hamster” chinês e as células linfoblásticas humanas TK6 (1). Nessas linhas celulares, os pontos finais genéticos mais utilizados são as mutações da timidina quinase (TK), da hipoxantina-guanina fosforibosil transferase (HPRT) e do transgene de xantina-guanina fosforibosil transferase (XPRT). Os ensaios de mutação TK, HPRT e XPRT detectam diferentes gamas de ocorrências genéticas. A localização autossómica das mutações TK e XPRT pode permitir a detecção de ocorrências genéticas (por exemplo: supressão de grandes sequências) que não são detectadas no “locus” HPRT nos cromossomas X (2) (3) (4) (6).

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

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

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

Ver também a parte B da introdução geral.

1.2. DEFINIÇÕES

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.3. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

As células deficientes em timidina quinase (TK) devido à mutação $TK^{+/-} \rightarrow TK^{-/-}$ são resistentes aos efeitos citotóxicos do análogo de pirimidina da trifluorotimidina (TFT). As células que dispõem de timidina quinase são sensíveis ao TFT, que causa inibição do metabolismo celular e impede a divisão da célula. Logo, as células mutantes podem proliferar na presença de TFT, o que não acontece com as células normais, com timidina quinase. Da mesma forma, as células carentes em HPRT ou XPRT são seleccionadas pela resistência à 6-tioguanina (TG) ou à 8-azaguanina (AG). As propriedades da substância em estudo devem ser cuidadosamente tomadas em consideração se o ensaio de mutação génica em células de mamíferos for utilizado para ensaiar uma substância análoga das bases ou um composto relacionado com o agente selectivo. Assim, por exemplo, deve ser investigada qualquer suspeita de toxicidade selectiva da substância em estudo para as células mutantes e não mutantes. Logo, o desempenho do sistema/agente selectivo deve ser confirmado quando se ensaiarem produtos químicos estruturalmente relacionados com o agente selectivo (8).

As células em suspensão ou em cultura em monocamada são expostas à substância em estudo tanto na presença como na ausência de um sistema de activação metabólica durante um período de tempo apropriado, sendo depois cultivadas para determinar a citotoxicidade e para permitir a expressão fenotípica antes de seleccionar o mutante (9) (10) (11) (12) (13). A citotoxicidade é geralmente determinada através da medição da eficiência relativa de clonagem (sobrevivência) ou do crescimento total relativo das culturas após o período de exposição. As culturas expostas são mantidas em meio de crescimento durante um período de tempo suficiente, que varia em função do "locus" seleccionado e do tipo de célula, por forma a permitir uma expressão fenotípica tão boa quanto possível das mutações induzidas. A frequência de mutação é determinada inoculando um número conhecido de células num meio com agente selectivo para as células mutantes e num meio sem agente selectivo, para determinação das respectivas eficiências de clonagem (viabilidade). Após um período de incubação apropriado, as colónias são contadas. A frequência de mutação é calculada a partir do número de colónias mutantes no meio selectivo e do número de colónias no meio não selectivo.

1.4. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.4.1. Preparação

1.4.1.1. Células

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

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

1.4.1.2. Meios e condições de cultura

Devem ser utilizados meios de cultura e condições de incubação (recipientes, temperatura, CO_2 , concentração e humidade) apropriados. Os meios devem ser escolhidos de acordo com o sistema selectivo e com o tipo de células utilizados no ensaio. É particularmente importante que sejam escolhidas condições de cultura que garantam o crescimento óptimo das células durante o período de expressão e a capacidade de formação de colónia por parte das células mutantes e não mutantes.

1.4.1.3. *Preparação das culturas*

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

1.4.1.4. *Activação metabólica*

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

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

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

1.4.1.5. *Substância em estudo/preparação*

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

1.4.2. **Condições de ensaio**

1.4.2.1. *Solvente/veículo*

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

1.4.2.2. *Concentrações de exposição*

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

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

Devem ser utilizadas pelo menos quatro concentrações analisáveis. Quando existir citotoxicidade, essas concentrações devem abranger uma gama de toxicidade que varie da toxicidade máxima a quase nula; o que significa geralmente que as concentrações devem variar num factor de 2 a $\sqrt{10}$. Se a concentração máxima for definida por razões de citotoxicidade, a sobrevivência relativa (eficiência relativa de clonagem) ou o crescimento relativo total devem ser da ordem dos 10-20% (mas não inferiores a 10%). Para as substâncias com citotoxicidade relativamente baixa, a concentração máxima do ensaio deve ser a mais baixa de 5 mg/ml, 5 μ l/ml ou 0,01 M.

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

1.4.2.3. *Controlos negativos e positivos*

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

As substâncias de controlo positivo podem ser, por exemplo:

Condição de activação metabólica	Locus	Substância	Número CAS	Número EINECS
Ausência de activação metabólica exógena	HPRT	Metanossulfonato de etilo	62-50-0	200-536-7
		Etil nitrosureia	759-73-9	212-072-2
	TK (colónias pequenas e grandes)	Metanossulfonato de metilo	66-27-3	200-625-0
		XPRT	Metanossulfonato de etilo	62-50-0
	XPRT	Etil nitrosureia	759-73-9	212-072-2
		HPRT	3-3-Metilcolantreno	56-49-5
N-Nitrosodimetilamina	62-75-9		200-549-8	
7,12-Dimetilbenzantraceno	57-97-6		200-359-5	
Presença de activação metabólica exógena	TK (colónias pequenas e grandes)	Ciclofosfamida	50-18-0	200-015-4
		Ciclofosfamida monohidrato	6055-19-2	
		Benzo[a]pireno	50-32-8	200-028-5
		3-3-Metilcolantreno	56-49-5	200-276-5
	XPRT	N-n-Nitrosodimetilamina (níveis elevados de S 9)	62-75-9	200-549-8
		Benzo[a]pireno	50-32-8	200-028-5

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

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

1.4.3. **Procedimento**1.4.3.1. *Exposição à substância em estudo*

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

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

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

1.4.3.2. *Medição da sobrevivência, viabilidade e frequência de mutação*

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

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

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

2. DADOS

2.1. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

Os dados devem incluir a determinação de citotoxicidade e da viabilidade, para além da contagem das colónias e das frequências de mutação nas culturas expostas e nas culturas de controlo. No caso de um resultado positivo no ensaio L5178Y TK⁺/-, as colónias devem ser contabilizadas utilizando o critério das colónias pequenas e grandes em pelo menos uma das concentrações da substância em estudo (a concentração máxima com resultado positivo) e nos controlos negativos e positivos. A natureza molecular e citogénica das células mutantes que formam colónias grandes e pequenas já foi investigada em pormenor (23) (24). No ensaio TK⁺/-, as colónias devem ser contabilizadas utilizando os critérios do crescimento normal (colónias grandes) e do crescimento lento (colónias pequenas) (25). As células mutantes que tenham sofrido danos genéticos mais extensos apresentam tempos de duplicação maiores, pelo que formam colónias mais pequenas. Esses danos variam tipicamente da perda da totalidade dos genes a aberrações cromossómicas só visíveis por análise do cariótipo. A indução de mutações que resultam no aparecimento de colónias pequenas foi associada com produtos químicos que induzem aberrações cromossómicas graves (26). As células menos seriamente afectadas por mutações apresentam taxas de crescimento semelhantes às células parentais e formam colónias grandes.

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

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

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

2.2. AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

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

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

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

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

3. APRESENTAÇÃO DE RELATÓRIOS

RELATÓRIO DE ENSAIO

O relatório de ensaio deve incluir a seguinte informação:

Solvente/veículo:

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

Células:

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

Condições de ensaio:

- justificação para a selecção das concentrações e do número de culturas, incluindo, por exemplo, dados sobre a citotoxicidade e sobre as limitações de solubilidade, quando disponíveis,
- composição dos meios, concentração de CO₂
- concentração da substância em estudo,
- volumes adicionados do veículo e da substância em estudo,
- temperatura de incubação,
- tempo de incubação,
- duração de tratamento,
- densidade celular durante a exposição,
- tipo e composição do sistema de activação metabólica, incluindo critérios de aceitabilidade,
- controlos positivos e negativos,
- duração do período de expressão (incluindo o número de células inoculadas e os calendários de sub cultura e de alimentação, quando aplicável),
- agentes selectivos,
- critérios definidos para que o estudo seja considerado positivo, negativo ou não conclusivo,

- métodos utilizados para a enumeração dos números de células mutantes e viáveis,
- definição das colónias cuja dimensão e tipo são caracterizados (incluindo os critérios para a definição de colónias “pequenas” e “grandes”, conforme apropriado).

Resultados:

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

Discussão dos resultados.

Conclusões.

4. BIBLIOGRAFIA

- (1) Moore, M. M., DeMarini, D. M., DeSerres, F. J. and Tindall, K. R. (eds.) (1987), *Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- (2) Chu, E. H. Y. and Malling, H. V. (1968), Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 61, pp. 1306-1312.
- (3) Liber, H. L. and Thilly, W. G. (1982), Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploid Human Lymphoblasts, *Mutation Res.*, 94, pp. 467-485.
- (4) Moore, M. M., Harington-Brock, K., Doerr, C. L. and Dearfield, K. L. (1989), Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci, *Mutagenesis*, 4, pp. 394-403.
- (5) Aaron, C. S. and Stankowski, Jr. L. F. (1989), Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates, *Mutation Res.*, 223, pp. 121-128.
- (6) Aaron, C. S., Bolcsfoldi, G., Glatt, H. R., Moore, M., Nishi, Y., Stankowski, Jr. L. F., Theiss, J. and Thompson, E. (1994), Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. *Mutation Res.*, 312, pp. 235-239.
- (7) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B. C. (1991), Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res.*, 257, pp. 147-204.
- (8) Clive, D., McCuen, R., Spector, J. F. S., Piper, C. and Mavournin, K. H. (1983), Specific Gene Mutations in L5178Y Cells in Culture. A Report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 115, pp. 225-251.
- (9) Li, A. P., Gupta, R. S., Heflich, R. H. and Wasson, J. S. (1988), A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 196, pp. 17-36.

- (10) Li, A. P., Carver, J. H., Choy, W. N., Hsie, A. W., Gupta, R. S., Loveday, K. S., O'Neill, J. P., Riddle, J. C., Stankowski, L. F. Jr. and Yang, L. L. (1987), A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay, *Mutation Res.*, 189, pp. 135-141.
- (11) Liber, H. L., Yandell, D. W. and Little, J. B. (1989), A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells: Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus, *Mutation Res.*, 216, pp. 9-17.
- (12) Stankowski, L. F. Jr., Tindall, K. R. and Hsie, A. W. (1986), Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulphonate — and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulphonate — and ICR 191-Induced Mutation in AS52 Cells, *Mutation Res.*, 160, pp. 133-147.
- (13) Turner, N. T., Batson, A. G. and Clive, D. (1984), Procedures for the L5178Y/TK⁺ — TK⁻ Mouse Lymphoma Cell Mutagenicity Assay, in: Kilbey, B. J. et al (eds.) *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, Elsevier Science Publishers, New York, pp. 239-268.
- (14) Arlett, C. F., Smith, D. M., Clarke, G. M., Green, M. H. L., Cole, J., McGregor, D. B. and Asquith, J. C. (1989), Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation, in: *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland D. J., ed., Cambridge University Press, pp. 66-101.
- (15) Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corti, G., Fiorio, R., Loprieno, N. and Mazzaccaro, A. (1977), Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine, *Mutation Res.*, 46, pp. 365-373.
- (16) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 31, pp. 347-364.
- (17) Clive, D., Johnson, K. O., Spector, J. F. S., Batson, A. G. and Brown M. M. M. (1979), Validation and Characterisation of the L5178Y/TK⁺ Mouse Lymphoma Mutagen Assay System, *Mutat Res.*, 59, pp. 61-108.
- (18) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 113, pp. 173-215.
- (19) Elliott, B. M., Combes, R. D., Elcome, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 175-177.
- (20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, in *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F. J., Fouts, J. R., Bend, J. R. and Philpot. R. M. (eds.) Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
- (21) Krahn, D. F., Barsky, F. C. and McCooey, K. T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, In: Tice, R. R., Costa, D. L., Schaich, K. M. (eds.), *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, New York, Plenum, pp. 91-103.
- (22) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P. and Brooks, A. L. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental Mutagenesis*, 5, pp. 795-801.
- (23) Applegate, M. L., Moore, M. M., Broder, C. B., Burrell, A. and Hozier, J. C. (1990), Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, pp. 51-55.
- (24) Moore, M. M., Clive, D., Hozier, J. C. Howard, B. E., Batson, A. G., Turner, N. T. and Sawyer, J. (1985), Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFT^r) and Mutants of L5178Y/TK⁺ Mouse Lymphoma Cells, *Mutation Res*, 151, pp. 161-174.
- (25) Yandell, D. W., Dryja, T. P. and Little, J. B. (1990), Molecular Genetic Analysis of Recessive Mutations at a Heterozygous Autosomal Locus in Human Cells, *Mutation Res.*, 229, pp. 89-102.
- (26) Moore, M. M. and Doerr, C. L. (1990), Comparison of Chromosome Aberration Frequency and Small-Colony TK-Deficient Mutant Frequency in L5178Y/TK⁺ — 3.7.2C Mouse Lymphoma Cells, *Mutagenesis* 5, pp. 609-614.»

ANEXO 4F

«B.23. ENSAIO DE ABERRAÇÕES CROMOSSÓMICAS EM ESPERMATOGÓNIAS DE MAMÍFERO

1. MÉTODO

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

1.1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

Ver também a parte B da introdução geral.

1.2. DEFINIÇÕES

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

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

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

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

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

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

1.3. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

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

1.4. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.4.1. Preparação

1.4.1.1. *Seleção das espécies animais*

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

1.4.1.2. *Condições de acomodação e alimentação*

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

1.4.1.3. *Preparação dos animais*

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

1.4.1.4. *Preparação das doses*

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

1.4.2. Condições do ensaio

1.4.2.1. *Solvente/veículo*

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

1.4.2.2. *Controlos*

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

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

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

Substância	Número CAS	Número EINECS
Ciclofosfamida	50-18-0	200-015-4
Ciclofosfamida monohidrato	6055-19-2	
Ciclohexilamina	108-91-8	203-629-0
Mitomicina C	50-07-7	200-008-6
Acrilamida monomérica	79-06-1	201-173-7
Trietilenomelamina	51-18-3	200-083-5

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

1.5. PROCEDIMENTO

1.5.1. Número de animais

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

1.5.2. Programação do tratamento

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

No grupo exposto à dose mais elevada, serão realizadas duas amostras após a exposição. Uma vez que a cinética celular poderá ser afectada pela substância em estudo, serão colhidas duas amostras, uma cerca de 24 horas após a exposição e outra cerca de 48 horas após a exposição. Para os restantes animais, deve ser colhida uma amostra 1,5 ciclos celulares normais ou 24 horas após a exposição, a não ser nos casos em que se saiba que a utilização de outros tempos de amostragem é mais apropriada para a detecção dos efeitos (6).

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

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

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

1.5.3. Doses

Se for realizado um estudo para avaliação da gama de doses a administrar, por não estarem disponíveis dados apropriados, esse estudo deve ser executado no mesmo laboratório, utilizando as mesmas espécies, linha celular e regime de exposição a utilizar no estudo principal (7). Se existir toxicidade, serão utilizadas três doses diferentes para a primeira amostragem. Essas doses devem abranger uma gama de toxicidade máxima a quase nula. Na segunda amostragem só será necessário avaliar a dose mais elevada. A dose mais elevada é definida como a dose que produz sinais de toxicidade tais que indiquem que a utilização de doses superiores, com o mesmo regime de administração, produzirá mortalidade.

As substâncias com actividade biológica específica em doses baixas e não tóxicas (como acontece com as hormonas e agentes mitogénicos) poderão constituir uma excepção aos critérios de fixação da dose, devendo ser avaliadas numa base casuística. A dose mais elevada pode igualmente ser definida como uma dose que produz algumas indicações de toxicidade nas espermatogónias (por exemplo: redução da taxa de mitose das espermatogónias na primeira e segunda metafase meióticas; esse redução não deve ser superior a 50%).

1.5.4. Ensaio limite

Se um ensaio com uma dose de pelo menos 2 000 mg/kg de peso corporal numa única exposição ou em duas exposições no mesmo dia não produzir nenhum efeito tóxico perceptível e se não for previsível a existência de toxicidade genética com base nos dados respeitantes a substâncias estruturalmente relacionadas, poderá não ser considerado necessário um estudo completo com utilização de três doses diferentes. A exposição prevista para o ser humano pode indicar a necessidade de se utilizarem doses mais elevadas nos ensaios limite.

1.5.5. Administração das doses

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

1.5.6. Preparação dos cromossomas

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

1.5.7. Análise

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

2. DADOS

2.1. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

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

Se para além das mitoses também se observarem meioses, a relação entre o número de mitoses e de metafases I ou II das espermatogónias deve ser determinada num total de 100 células em divisão por animal, para medição da citotoxicidade em todos os animais expostos à substância em estudo e do controlo negativo, de forma a poder estabelecer se existem efeitos citotóxicos. Se só se observarem mitoses, o índice mitótico deve ser calculado utilizando pelo menos 1 000 células de cada animal.

2.2. AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

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

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

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

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

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

3. APRESENTAÇÃO DE RELATÓRIOS

RELATÓRIO DE ENSAIO

O relatório de ensaio deve incluir a seguinte informação:

Solvente/veículo:

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

Animais de ensaio:

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

Condições de ensaio:

- resultados do estudo para definição da gama de doses, quando tenha sido realizado,
- justificação para a selecção das doses,
- justificação da via de administração escolhida,
- preparação da substância em estudo,
- modo de administração da substância em estudo,
- justificação do momento do sacrifício,

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

Resultados:

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

Discussão dos resultados.

Conclusões.

4. BIBLIOGRAFIA

- (1) Adler, I. D. (1986), Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications, in: *Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis*, Ramel, C., Lambert B., and Magnusson, J. (eds.) Liss, New York, pp. 477-484.
- (2) Adler, I. D. (1984), Cytogenic tests in Mammals, in: *Mutagenicity Testing: a Practical Approach*, ed. S. Venitt and J. M. Parry, IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 275-306.
- (3) Evans, E. P., Breckon, G. and Ford, C. E. (1964), An Air-drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes, *Cytogenetics and Cell Genetics*, 3, pp. 289-294.

- (4) Richold, M., Ashby, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G. and Henderson L. (1990), *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.
 - (5) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978), A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes, *Mutation Res.*, 52, pp. 207-209.
 - (6) Adler, I. D., Shelby, M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka, N. (1994), International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests, *Mutation Res.*, 312, pp. 313-318.
 - (7) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland D. J. and Richold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 313-319.
 - (8) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, report, Part III*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.»
-

ANEXO 4G

«B.39. ENSAIO *IN VIVO* DA SÍNTESE NÃO PROGRAMADA (UDS) DE ADN EM CÉLULAS DO FÍGADO DE MAMÍFEROS**1. MÉTODO**

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

1.1. INTRODUÇÃO

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

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

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

O ponto final da síntese não programada (UDS) de ADN é medido através da determinação da incorporação de nucleótidos marcados por células que não se encontram numa fase de síntese programada de ADN (fase S). A técnica mais utilizada é a determinação da incorporação de timidina marcada com trítio (³H-TdR) por autoradiografia. Nos ensaios UDS *in vivo* são geralmente utilizados fígados de rato. Podem também ser utilizados outros tecidos, mas não é esse o objectivo do presente método.

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

Ver também a parte B da introdução geral.

1.2. DEFINIÇÕES

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

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

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

1.3. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

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

1.4. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

1.4.1. **Preparação**1.4.1.1. *Seleção das espécies animais*

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

1.4.1.2. *Condições de acomodação e alimentação*

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

1.4.1.3. *Preparação dos animais*

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

1.4.1.4. *Preparação das doses*

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

1.4.2. **Condições do Ensaio**1.4.2.1. *Solvente/veículo*

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

1.4.2.2. *Controlos*

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

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

Tempo de amostragem	Substância	Número CAS	Número EINECS
Amostragens iniciais (2-4 horas)	N-nitrosodimetilamina	62-75-9	200-249-8
Amostragens finais (12-16 horas)	N-2-fluorenilacetamida (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

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

1.5. PROCEDIMENTO

1.5.1. Número e sexo de animais

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

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

1.5.2. Programação do tratamento

As substâncias de ensaio são preferivelmente administradas numa única exposição.

1.5.3. Doses

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

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

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

1.5.4. Ensaio limite

Se um ensaio com uma dose de pelo menos 2 000 mg/kg de peso corporal numa única exposição ou em duas exposições no mesmo dia não produzir nenhum efeito tóxico perceptível e se não for previsível a existência de toxicidade genética com base nos dados respeitantes a substâncias estruturalmente relacionadas, poderá não ser considerado necessário um estudo completo. A exposição prevista para o ser humano pode indicar a necessidade de se utilizarem doses mais elevadas nos ensaios limite.

1.5.5. Administração das doses

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

1.5.6. Preparação das células de fígado

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

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

1.5.7. Determinação da UDS

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

1.5.8. Análise

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

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

O grau de incorporação da $^3\text{H-TdR}$ nos núcleos e citoplasma das células morfológicamente normais, evidenciado pelo depósito de grânulos de prata, deve ser determinado por métodos apropriados.

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

2. DADOS

2.1. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

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

2.2. AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os exemplos de critérios para a definição de uma resposta como positiva/negativa incluem:

positiva i) Valores de NNG positivos, acima de um limiar pré-definido justificado com base nos dados históricos do laboratório;

ou ii) Valores de NNG significativamente superiores aos do controlo em paralelo;

negativa i) Valores de NNG iguais/inferiores ao limiar de controlo histórico;

ou ii) Valores de NNG não significativamente superiores aos do controlo em paralelo.

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

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

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

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

3. APRESENTAÇÃO DE RELATÓRIOS

RELATÓRIO DE ENSAIO

O relatório de ensaio deve incluir a seguinte informação:

Solvente/veículo:

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

Animais de ensaio:

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

Condições de ensaio:

- controlos positivos e negativos veículo/solvente,
- resultados do estudo para definição da gama de doses, quando tenha sido realizado,
- justificação para a selecção das doses,
- preparação da substância em estudo,
- modo de administração da substância em estudo,
- justificação da via de administração escolhida,
- métodos usados para verificar se o agente em estudo atingiu o sistema circulatório geral, caso tenham sido utilizados,
- conversão da concentração da substância em estudo na alimentação/abeberação (ppm) para a dose real (mg/kg peso corporal/dia), quando aplicável,
- qualidade dos alimentos e da água,
- descrição pormenorizada dos calendários de tratamento e amostragem,
- métodos de medição da toxicidade,
- método de preparação e cultura das células do fígado,
- técnica de autoradiografia utilizada,

- número de lâminas preparadas e número de células contabilizadas,
- critérios de avaliação,
- critérios definidos para que o estudo seja considerado positivo, negativo ou não conclusivo.

Resultados:

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

Discussão dos resultados.

Conclusões.

4. BIBLIOGRAFIA

- (1) Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlinson, B. and Penman, M. G. (1985), An Assessment of the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA Repair Assay, *Mutation Res.*, 156, pp. 1-18.
- (2) Butterworth, B. E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst G. and Williams, G. (1987), A Protocol and Guide for the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA-Repair Assay, *Mutation Res.*, 189, pp. 123-133.
- (3) Kennelly, J. C., Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlinson B., Benford, D. J., Dean, S. W. and Mitchell I. de G. (1993), *In Vivo* Rat Liver UDS Assay, in: Kirkland D. J. and Fox M., (eds.), *Supplementary Mutagenicity Tests: UKEM Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing Report. Part II revised*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 52-77.
- (4) Madle, S., Dean, S. W., Andrae, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D. J., Furihata, C., Hertner, T., McQueen, C. A. and Mori, H. (1993), Recommendations for the Performance of UDS Tests *In Vitro* and *In Vivo*, *Mutations Res.*, 312, pp. 263-285.
- (5) Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl, C. (1993), Assessment of the Relation Between the Initial Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the *In Vivo/In Vitro* DNA Repair Assay (UDS), *Mutation Res.*, 291, pp. 21-27.
- (6) Mirsalis, J. C., Tyson, C. K. and Butterworth, B. E. (1982), Detection of Genotoxic Carcinogens in the *In Vivo/In Vitro* Hepatocyte DNA Repair Assay, *Environ Mutagen*, 4, pp. 553-562.»

ANEXO 5

SV:

3.2.3. Farligt

R65 Farligt: kan ge lungskador vid förtäring.

Flytande ämnen och beredningar som på grund av sin låga viskositet utgör en fara för människa vid aspiration

a) För ämnen och beredningar som innehåller alifatiska, alicykliska och aromatiska kolväten i en total koncentration av 10 % eller mer och

- har en flödestid mindre än 30 sekunder, uppmätt med en 3 mm utloppsbägare enligt ISO 2431, eller
- har en kinematisk viskositet lägre än 7×10^{-6} m²/s vid 40 °C, uppmätt med en kalibrerad kapillärviskosimeter av glas, enligt ISO 3104 och ISO 3105, eller
- har en kinematisk viskositet lägre än 7×10^{-6} m²/s vid 40 °C, bestämd från rotationsviskosimetri enligt ISO 3219.

Ämnen och beredningar, som uppfyller dessa kriterier, behöver dock inte klassificeras om de har en genomsnittlig ytspänning högre än 33 mN/m vid 25 °C, uppmätt med en Noüy tensiometer eller enligt de testmetoder som finns beskrivna i bilaga V del A.5.

b) För ämnen och beredningar, baserat på praktiska erfarenheter från människa.

(Versão ES não afectada)

(Versão DA não afectada)

(Versão DE não afectada)

(Versão EL não afectada)

(Versão EN não afectada)

(Versão FR não afectada)

(Versão IT não afectada)

(Versão NL não afectada)

(Versão PT não afectada)

(Versão FI não afectada)

FI:

3.2.6.1 Ihon tulehtuminen

Seuraava vaaraa osoittava lauseka määräytyy alla esiteltävien perusteitten mukaan:

R38 Ärsyttää ihoa

— Aineet ja valmisteet aiheuttavat ihon merkittävän tulehtumisen enintään neljän tunnin altistuksessa määritettynä kanilla liitteessä V mainitulla ihoärsyttestillä. Tulehdus kestää vähintään 24 tuntia.

Ihon tulehdus on merkittävää, jos:

- a) punoituksen ja ruvenmuodostuksen tai turvotuksen voimakkuutta kuvaavien lukuarvojen keskiarvo laskettuna kaikista koe-eläimistä on vähintään 2;
- b) tai kun liitteessä V tarkoitettua testiä on täydennetty käyttämällä kolmea koe-eläintä, vähintään kahden koe-eläimen ihon punoituksen ja ruvenmuodostuksen tai turvotuksen voimakkuutta kuvaavien lukuarvojen keskiarvo on, jokaiselle koe-eläimelle laskettuna erikseen, vähintään 2.

Kummassakin tapauksessa keskiarvojen lasekmiseen on käytettävä kaikkia niitä lukuarvoja, jotka saadaan arvioitaessa vaikutusta 24 tunnin, 48 tunnin ja 72 tunnin välein.

Tulehdusta pidetään myös merkittävänä, jos ihon tulehtuminen jatkuu ainakin kahdella koe-elämellä havainnointiajan päättymiseen asti. Erityiset vaikutukset kuten esimerkiksi hyperplasia, hilseileminen, värin muutokset, halkeamat, ruvet ja karvojenlähtö on otettava huomioon.

Tähän liittyviä tietoja voidaan saada myös eläimillä tehtävistä ei-akuuttisista altistuskokeista (katso lauseketta R48 koskevat huomautukset jaksossa 2.d). Vaikutuksia pidetään merkittävänä, jos ne vastaavat edellä kuvattuja vaikutuksia.

- Aineet ja valmisteet, jotka aiheuttavat ihmisillä merkittävää ihotulehdusta, kun kosketus on ollut välitön, jatkuva tai toistuva.
- Orgaaniset peroksidit, paitsi jos on olemassa näyttöä siitä, että tällaista vaikutusta ei ole.

Tuntoharha ('paresthesia'):

Pyretroiditorjunta-aineen ihokosketuksen aiheuttamaa tuntoharhaa ihmisessä ei pidetä ärsytysvaikutuksena, joka oikeuttaisi luokituksen Xi; R38. S-lauseketta S24 on kuitenkin sovellettava aineisiin, joilla on tällainen vaikutus.

(Versão ES não afectada)

(Versão DA não afectada)

(Versão DE não afectada)

(Versão EL não afectada)

(Versão EN não afectada)

(Versão FR não afectada)

(Versão IT não afectada)

(Versão NL não afectada)

(Versão PT não afectada)

(Versão SV não afectada)

No ponto 6.2 (Recomendações de prudência relativas a substâncias e preparações):

DE:

S 28 Bei Berührung mit der Haut sofort mit viel ... abwaschen (vom Hersteller anzugeben)

— Anwendungsbereich:

- sehr giftige, giftige oder ätzende Stoffe und Zubereitungen;

— Verwendung:

- *obligatorisch* für sehr giftige Stoffe und Zubereitungen;
- empfohlen für sonstige obengenannte Stoffe und Zubereitungen, insbesondere, wenn Wasser nicht die geeignete Spülflüssigkeit ist;
- empfohlen für ätzende Stoffe und Zubereitungen, die an die allgemeine Öffentlichkeit abgegeben werden.

(Versão ES não afectada)

(Versão DA não afectada)

(Versão EL não afectada)

(Versão EN não afectada)

(Versão FR não afectada)

(Versão IT não afectada)

(Versão NL não afectada)

(Versão PT não afectada)

(Versão FI não afectada)

(Versão SV não afectada)

FI:

S 29 Ei saa tyhjentää viemäriin

— Soveltamisala:

- erittäin helposti syttyvät tai helposti syttyvät veteen sekoittumattomat nesteet,
- erittäin myrkylliset tai myrkylliset aineet ja valmisteet,
- ympäristölle vaaralliset aineet.

— Käytön perusteet:

- *pakollinen* yleisessä kulutuksessa todennäköisesti käytettäville ympäristölle vaarallisille ja tunnuksella N luokitelluille aineille, jollei kyseessä ole aineen tarkoitettu käyttö,
- suositeltava yleisessä kulutuksessa todennäköisesti käytettäville muille edellä mainituille aineille tai valmisteille, jollei kyseessä ole kemikaalin tarkoitettu käyttö.

(Versão ES não afectada)

(Versão DA não afectada)

(Versão DE não afectada)

(Versão EL não afectada)

(Versão EN não afectada)

(Versão FR não afectada)

(Versão IT não afectada)

(Versão NL não afectada)

(Versão PT não afectada)

(Versão SV não afectada)

—

ANEXO 6

«ANEXO IX

PARTE A

Disposições relativas aos fechos de segurança para crianças

Para além do disposto no n.º 1, alínea e), do artigo 22.º da presente directiva, devem ser equipados com fechos de segurança para crianças todos os recipientes, qualquer que seja a sua capacidade, que contenham substâncias que representem um risco de aspiração (Xn; R65) e estejam classificadas e rotuladas de acordo com o ponto 3.2.3. do anexo VI da presente directiva, com excepção das substâncias colocadas no mercado sob a forma de aerossóis ou em recipientes equipados com um dispositivo de pulverização selado.

1. *Embalagens para aberturas repetidas*

Os fechos de segurança para crianças utilizados em embalagens para aberturas repetidas devem obedecer à norma ISO 8317 (edição de 1 de Julho de 1989) relativa a embalagens seguras para crianças — exigências e métodos de ensaio de embalagens para aberturas repetidas (*Child-resistant packages — Requirements and methods of testing for reclosable packages*), adoptada pela Organização Internacional de Normalização (ISO).

2. *Embalagens para uma única utilização*

Os fechos de segurança para crianças usados em embalagens para uma única utilização devem obedecer à norma CEN EN 862 (edição de Março de 1997) relativa a embalagens seguras para crianças — exigências e procedimentos de ensaio de embalagens para uma única utilização, usadas em produtos não farmacêuticos (*Packaging — Child-resistant packaging — Requirements and testing procedures for non-reclosable packages for non-pharmaceutical products*), adoptada pelo Comité Europeu de Normalização (CEN).

3. *Observações*

1. A comprovação da conformidade com a norma acima referida apenas pode ser certificada por laboratórios que tenham provado que respeitam as normas europeias da série EN 45 000.

2. *Casos particulares*

Se parecer evidente que uma embalagem é suficientemente segura para as crianças, por estas não poderem ter acesso ao seu conteúdo sem a ajuda de um utensílio, o ensaio pode não ser efectuado.

Em todos os outros casos e quando houver razões validamente justificadas para duvidar da eficácia do fecho de segurança para crianças utilizado, a autoridade nacional pode pedir ao responsável pela colocação no mercado o fornecimento de uma declaração passada por um laboratório de ensaios do tipo acima definido em 3.1, certificando que:

— o tipo de fecho utilizado é tal que não necessita de ensaios segundo as normas ISO e CEN supramencionadas,

ou

— o fecho em questão foi sujeito a ensaios, sendo considerado conforme à norma supramencionada.

PARTE B

Disposições relativas aos dispositivos que permitem detectar os perigos pelo tacto

As prescrições técnicas relativas aos dispositivos que permitem detectar os perigos pelo tacto devem ser conformes à norma EN ISO 11683 (edição de 1997) relativa a indicações de perigo detectáveis pelo tacto (*Packaging — Tactile warnings of danger — Requirements*).»

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

A COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,

ADOPTOU A PRESENTE DECISÃO:

Tendo em conta o Tratado que institui a Comunidade Europeia,

Artigo 1.º

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

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

Artigo 2.º

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

Considerando o seguinte:

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

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

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

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

Artigo 3.º

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

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

Artigo 4.º

Os Estados-Membros são os destinatários da presente directiva.

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

Feito em Bruxelas, em 25 de Abril de 2000.

Pela Comissão
Margot WALLSTRÖM
Membro da Comissão

(*) Adoptada antes da vigésima sexta adaptação.

⁽¹⁾ JO 196 de 16.8.1967, p. 1.

⁽²⁾ JO L 199 de 30.7.1999, p. 57.

⁽³⁾ JO L 358 de 18.12.1986, p. 1.

ANEXO I

«B.40. CORROSIVIDADE CUTÂNEA

1. **MÉTODO**1.1. **Introdução**

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

Ver também a introdução geral, parte B.

1.2. **Definições**

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

1.3. **Substâncias de referência**

Nenhuma especificada, mas ver pontos 1.5.3.4 e 1.7.2.3.

1.4. **Princípio do método de ensaio — ensaio TER em pele de rato**

O material a testar é aplicado durante um período de até 24 horas sobre a superfície da epiderme de discos de pele de ratos jovens sacrificados sem crueldade. Os materiais corrosivos são identificados pela sua capacidade de causarem uma perda da integridade normal do *stratum corneum* e da função de barreira, perda essa que é medida pela redução do TER intrínseco abaixo de um determinado limiar (5 k Ω) (4) (5). Os materiais simplesmente irritantes e os materiais não irritantes não reduzem o TER abaixo desse limiar. Para as substâncias tensoactivas e para os compostos orgânicos neutros, pode ainda ser incorporado no ensaio um passo de ligação a um corante [para as definições neste contexto, ver a referência (6)], a fim de reduzir o número de falsos positivos característico dos ensaios deste tipo de substâncias químicas (2) (7).

1.5. **Descrição do método de ensaio — ensaio TER em pele de rato**1.5.1. *Animais*

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

1.5.2. *Preparação dos discos de pele*

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

1.5.3. *Procedimento de ensaio*1.5.3.1. *Aplicação do material de ensaio*

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

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

1.5.3.2. Medições TER

A TER é medida utilizando um *databridge* de corrente alterna de baixa voltagem (por exemplo: AIM 401 ou 6401, ou outro modelo equivalente). Antes da medição da resistência eléctrica, a tensão superficial da pele é reduzida através da adição de um volume suficiente de etanol a 70% para cobrir toda a epiderme. Após alguns segundos, o etanol deverá ser removido invertendo o tubo e o tecido é depois hidratado através da adição de 3 ml de solução de sulfato de magnésio (154 mM). Os eléctrodos do *databridge* são colocados em duas extremidades do disco de pele de forma a medir a resistência em kΩ/disco (figura 2). As dimensões dos eléctrodos e o comprimento de eléctrodo que deverá ficar livre por baixo da mola são indicados na figura 1. A parte interior (mais grossa) do eléctrodo deverá estar apoiada à borda do tubo de PTFE durante a medição da resistência, de forma a garantir que o comprimento de eléctrodo mergulhado na solução de sulfato de magnésio seja constante. O eléctrodo exterior (mais fino) deverá ser colocado dentro da câmara receptora de forma a tocar o fundo da mesma. A distância entre a parte inferior da mola e o fundo do tubo de PTFE deverá ser mantida constante (figura 1), visto que afecta o valor de resistência medido.

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

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

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

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

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

1.5.3.3.1. Aplicação e eliminação do corante sulforhodamina B

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

1.5.3.3.2. Cálculo do teor em corante

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

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

1.5.3.4. Informação adicional

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

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

1.6. Princípio do método de ensaio — ensaio em modelo de pele humana

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

1.7. Descrição do método de ensaio — ensaio em modelo de pele humana

1.7.1. Modelo de pele humana

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

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

1.7.2. Procedimento de ensaio

1.7.2.1. Aplicação do material de ensaio

Para os materiais líquidos deverá ser aplicada uma quantidade suficiente para cobrir toda a superfície de pele (no mínimo 25 µl/cm²). Para os materiais sólidos, deverá ser também aplicada uma quantidade suficiente para cobrir toda a pele, e humidificada por forma a garantir um bom contacto com a pele; quando necessário, os sólidos poderão ser moídos antes da aplicação. Deverá ser demonstrado que o método de aplicação utilizado é adequado para diversos tipos químicos (2). Após o período de exposição, o material de ensaio deverá ser cuidadosamente lavado da superfície da pele com uma solução salina.

1.7.2.2. Medição da viabilidade celular

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

1.7.2.3. Outras informações

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

2. DADOS

2.1. Tratamento dos resultados

2.1.1. Ensaio TER em pele de rato

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

2.1.2. Ensaio em modelo de pele humana

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

2.2. Avaliação e interpretação dos resultados

2.2.1. Ensaio TER em pele de rato

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

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

2.2.2. Ensaio em modelo de pele humana

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

3. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Relatório de ensaio

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

Substância de ensaio:

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

Condições do ensaio:

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

Resultados:

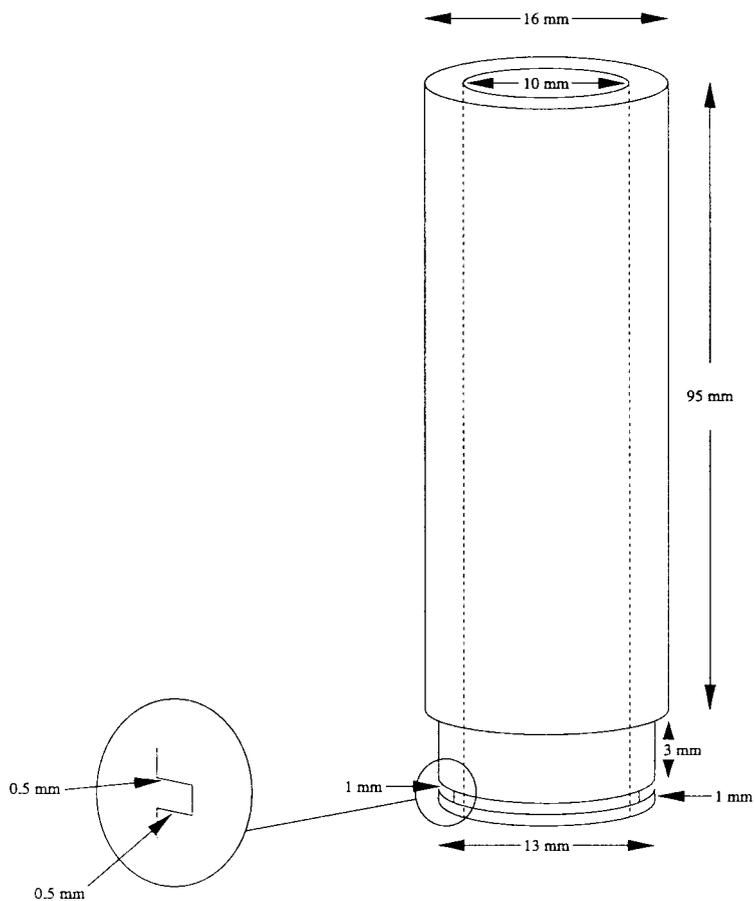
- tabelas com os valores de resistência (ensaio TER) ou com as percentagens de viabilidade celular (ensaio em modelo de pele humana) dos materiais de ensaio, dos controlos positivo e negativo e de qualquer produto químico padrão que tenha sido utilizado, incluindo todos os dados relativos aos replicados/repetição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

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

- (1) ECVAM (1998), ECVAM News & Views, *ATLA* 26, p. 275-280.
- (2) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhtuter, H-G. & Liebsch, M. (1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team, *Toxicology in Vitro* 12, pp. 483-524.
- (3) Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P. & Worth, A.P. (1998), "The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals", *Toxicology in Vitro* 12, pp. 471-482.
- (4) Oliver, G.J.A., Pemberton, M.A. & Rhodes, C. (1986), "An *in vitro* skin corrosivity test — modifications and validation", *Food & Chemical Toxicology* 24, pp. 507-512.
- (5) Botham, P.A., Hall, T.J., Dennett, R., McCall, J.C., Basketter, D.A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D.J. & Gardner, J. (1992), "The skin corrosivity test *in vitro*: results of an interlaboratory trial", *Toxicology in Vitro* 6, pp. 191-194.
- (6) Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J. & Liebsch, M. (1998), "An evaluation of the proposed OECD testing strategy for skin corrosion", *ATLA* 26, pp. 709-720.
- (7) Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponc, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P. & Balls, M. (1995), "A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report and recommendations of ECVAM workshop 6", *ATLA* 23, pp. 219-255.

Figura 1

Dimensões do tubo de PTFE



Dimensões do eléctrodo

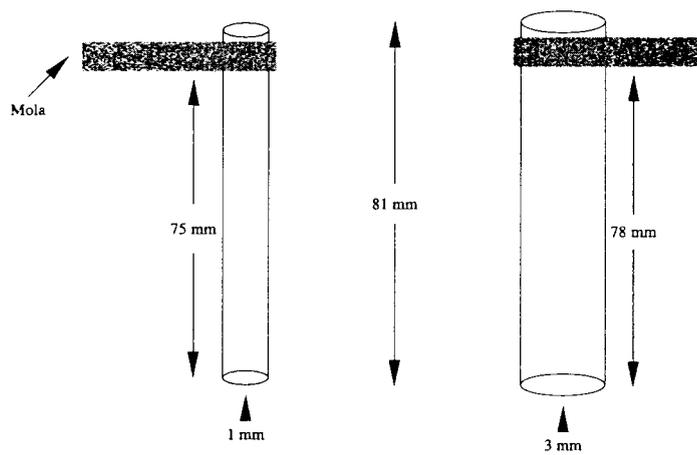
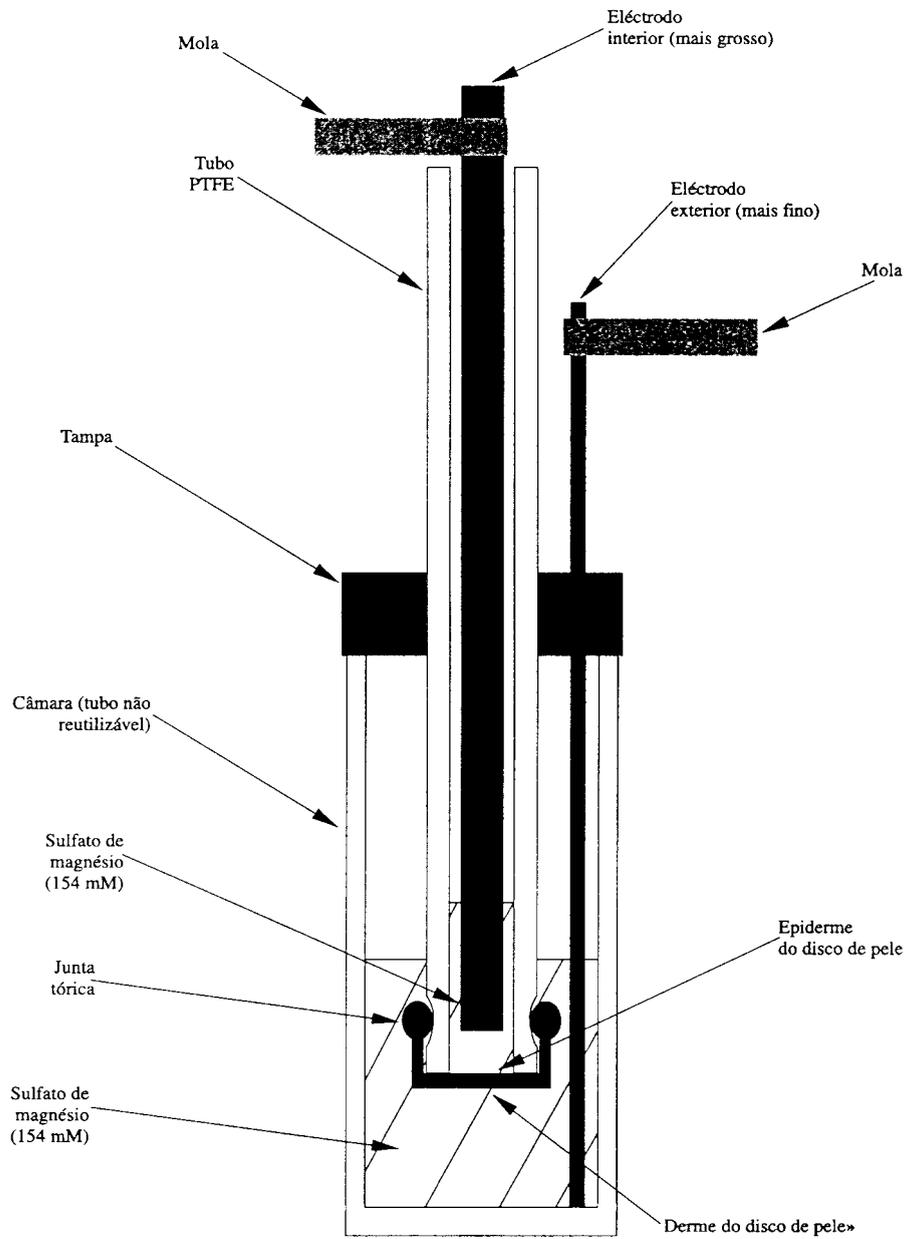


Figura 2

Montagem para o ensaio TER em pele de rato



ANEXO II

«B.41. FOTOTOXICIDADE — ENSAIO DE FOTOTOXICIDADE — *IN-VITRO* 3T3 NRU1 **MÉTODO**1.1 **Introdução**

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

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

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

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

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

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

1.2 **Definições**

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

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

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

Viabilidade celular: parâmetro que mede a actividade total de uma população celular (por exemplo, absorção do pigmento vital vermelho neutro pelos lisosomas celulares); em função da variável determinada e do tipo de ensaio realizado, é possível correlacionar a viabilidade celular com o número total e/ou a vitalidade das células.

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

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

PIF (photo irritation factor — Factor de fotoirritação): factor obtido por comparação entre duas concentrações citotóxicas igualmente eficazes (EC₅₀) da substância em estudo, respectivamente sem (-UV) e com exposição (+UV) a uma dose não citotóxica de radiação UVA/visível.

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

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

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

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

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

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

1.3 Substâncias de referência

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

1.4 Considerações preliminares

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

1.5 Princípio de método

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

Efectua-se uma cultura de células Balb/c 3T3 durante 24 h, até à formação de monocamadas. Para cada substância em estudo, procede-se à pré-incubação, durante 1 h, de duas placas de 96 alvéolos com oito concentrações diferentes da substância. Expõe-se uma das placas a uma dose não citotóxica de 5 J/cm^2 UVA (experiência +UV), mantendo-se a outra na obscuridade (experiência -UV). Seguidamente, o meio de tratamento é substituído, em ambas as placas, por um meio de cultura; após uma nova incubação de 24 h, determina-se a viabilidade celular por análise da absorção do vermelho neutro (*neutral red uptake* — NRU) durante 3 h. Calcula-se a viabilidade celular relativa, expressa em percentagem das amostras de controlo isentas da substância em estudo, para cada uma das oito concentrações de ensaio. Para a previsão do potencial fototóxico, comparam-se as reacções, em termos de concentrações, obtidas com (+UV) e sem (-UV) irradiação, em geral ao nível EC_{50} , ou seja, a concentração que inibe a viabilidade celular em 50% relativamente às amostras de controlo isentas da substância.

1.6 Critérios de qualidade

Sensibilidade das células às radiações UVA — dados de referência: deve comprovar-se periodicamente a sensibilidade das células às radiações UVA. Para tal, as células são inoculadas à densidade utilizada no ensaio de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU e irradiam-se as mesmas, no dia seguinte, com uma dose de 1 a 9 J/cm^2 de radiação UVA. Um dia depois, determina-se a viabilidade celular através do ensaio NRU. As células satisfazem os critérios de qualidade se, na sequência da irradiação com 5 J/cm^2 UVA, a sua viabilidade for superior ou igual a 80% da viabilidade das amostras mantidas na obscuridade. A viabilidade obtida utilizando a dose máxima de radiação UVA de 9 J/cm^2 não deve ser inferior a 50% da obtida com as amostras mantidas na obscuridade. O processo deve repetir-se aproximadamente em cada 10 passagens celulares.

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

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

Controlo positivo: paralelamente a cada ensaio de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU deve efectuar-se um ensaio com uma substância fototóxica conhecida. Recomenda-se a utilização de clorpromacina (CPZ), substância de controlo positivo utilizada no estudo de validação EU/COLIPA. Foram definidos os seguintes critérios de aceitação para o uso de CPZ em conformidade com o protocolo normalizado do ensaio de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU: CPZ irradiada (+UVA), $EC_{50} = 0,1$ a $2,0\ \mu\text{g/ml}$; CPZ não irradiada (-UVA), $EC_{50} = 7,0$ a $90,0\ \mu\text{g/ml}$. O factor de fotoirritação (PIF), ou seja, a variação da EC_{50} , deve ser de, pelo menos, 6.

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

1.7 Descrição do método

1.7.1 Preparação

1.7.1.1 Células

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

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

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

1.7.1.2 Meios e condições de cultura

Devem utilizar-se meios de cultura e condições de incubação adequados às passagens celulares comuns e ao procedimento de ensaio. No caso das células Balb/c 3T3, recomenda-se o uso de DMEM enriquecido com 10% de soro de bovino recém-nascido, 4 mM de glutamina, penicilina e estreptomicina, incubado a 37°C numa atmosfera húmida com 7,5% de CO_2 . É particularmente importante que as condições de cultura celular permitam manter o ciclo celular nos valores normais das células ou da linhagem celular utilizadas.

1.7.1.3 Preparação das culturas

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

Para o ensaio de fototoxicidade, inoculam-se as células num meio de cultura de densidade tal que impeça a confluência das culturas antes do termo do ensaio, ou seja, aquando da determinação da viabilidade celular 48 h após a inoculação das células. No caso das células Balb/c 3T3 cultivadas em placas de 96 alvéolos, recomenda-se uma densidade de 1×10^4 células por alvéolo.

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

1.7.1.4 Activação metabólica

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

1.7.1.5 Substância em estudo — Preparação

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

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

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

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

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

1.7.1.6 Irradiação com UV — Preparação

Fonte de radiação: a escolha de uma fonte de radiação e de uma filtração adequadas constitui o factor determinante dos ensaios de fototoxicidade. As regiões do visível e do UVA encontram-se, em geral, associadas à fotossensibilização (7) (10), enquanto que a gama do UVB possui menor importância neste domínio, apresentando em contrapartida uma elevada citotoxicidade directa que é multiplicada por 1 000 entre 313 e 280 nm (11). Os critérios de selecção da fonte de radiação adequada devem incluir o requisito essencial da emissão de comprimentos de onda que a substância em estudo absorve; por outro lado, a dose de luz (passível de ser obtida num período razoável) deve ser suficiente para detectar os fotossensibilizadores conhecidos. Além disso, os comprimentos de onda e as doses utilizadas não devem causar danos desnecessários ao sistema em estudo, nomeadamente devidos à emissão de calor (região do infravermelho).

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

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

Dosimetria: antes de cada ensaio de fototoxicidade deve comprovar-se a intensidade da radiação (irradiância) por recurso a um medidor de UV de banda larga adequado, previamente calibrado em função da fonte de radiação. Deve comprovar-se o desempenho do aparelho, recomendando-se para tal a utilização de um segundo medidor de UV de referência do mesmo tipo, calibrado do mesmo modo. A utilização, a intervalos superiores, de um espectrorradiómetro para medir a irradiância espectral da fonte de luz filtrada e comprovar a calibração do medidor de UV de banda larga constitui a solução ideal, embora a manipulação dos instrumentos em causa necessite de pessoal devidamente qualificado.

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

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

1.7.2 Condições de ensaio

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

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

1.7.3 Procedimento ⁽¹⁾

1.7.3.1 Primeiro dia

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

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

1.7.3.2 Segundo dia

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

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

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

1.7.3.3 Terceiro dia

Análise microscópica

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

Ensaio de absorção do vermelho neutro

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

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

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

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

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

⁽¹⁾ A referência bibliográfica 12 contém informações complementares.

2 RESULTADOS

2.1 Qualidade e quantidade dos resultados

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

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

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

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

2.2 Tratamento dos resultados

Se possível, deve determinar-se a concentração de substância em estudo que induz uma inibição de 50% da absorção celular de vermelho neutro (EC₅₀). Para tal, pode aplicar-se aos resultados de concentração-resposta qualquer método de regressão não linear adequado (de preferência, uma função de Hill ou uma regressão logística) ou outros métodos de ajustamento (14). Antes de utilizar um determinado valor de EC₅₀ nos cálculos posteriores, deve comprovar-se devidamente a qualidade do ajustamento. Podem também utilizar-se no cálculo do valor de EC₅₀ métodos de ajustamento gráfico. Nesse caso, recomenda-se a utilização de papel probabilístico (eixo x: log, eixo y: probit), uma vez que, frequentemente, a função concentração-resposta se torna praticamente linear na sequência da transformação.

2.3 Avaliação dos resultados (modelos de previsão)

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

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

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

A obtenção de um valor PIF < 5 traduz a ausência de potencial fototóxico, enquanto que um PIF ≥ 5 traduz a existência de potencial fototóxico.

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

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

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

Se não for possível calcular a EC₅₀ (-UV) nem a EC₅₀ (+UV) porque a substância não produz efeitos citotóxicos mesmo à concentração de ensaio máxima, tal significa que a substância não possui potencial fototóxico. Nessas condições, utiliza-se um "PIF = *1" teórico para caracterizar o resultado.

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

Caso se obtenha apenas um valor "PIF = *1", o ensaio traduz a ausência de potencial fototóxico.

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

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

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

2.4 Interpretação dos resultados

A obtenção de um resultado positivo no ensaio de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU ($PIF \geq 5$ ou $MPE \geq 0,1$) indica que a substância em estudo apresenta potencial fototóxico. Se o referido resultado foi obtido com concentrações inferiores a 10 mg/ml, é provável que a substância em estudo apresente também efeitos fototóxicos em diversas condições de exposição *in vivo*. Caso se obtenha um resultado positivo apenas com a concentração de ensaio máxima de 100 mg/ml, pode ser necessário, para avaliar o perigo ou o poder fototóxico, ter em conta outros aspectos, tais como a penetração e a absorção cutâneas e a possível acumulação da substância na pele, ou submeter a substância a outro tipo de ensaios, com o objectivo de confirmar os resultados, utilizando, por exemplo, um modelo de pele humana *in vitro*.

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

3 RELATÓRIO

Relatório do ensaio

O relatório do ensaio deve incluir as seguintes informações:

Substância em estudo:

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

Solvente:

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

Células

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

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

- tipo e composição do meio de cultura,
- condições de incubação (concentração de CO_2 , temperatura e humidade),
- duração da incubação (tratamento prévio e posterior).

Condições de ensaio b) — tratamento com a substância:

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

Condições de ensaio c) — irradiação:

- fundamentação da escolha da fonte de radiação utilizada,
- características da irradiância espectral da fonte de radiação,
- características de transmissão/absorção do filtro ou filtros utilizados,
- características do radiómetro e condições de calibração,
- distância entre a fonte de radiação e o sistema de ensaio,
- irradiância UVA à referida distância, expressa em mW/cm²,
- duração da exposição à radiação UV/visível,
- dose de radiação UVA (irradiância x tempo), expressa em J/cm²,
- temperatura utilizada para as culturas celulares irradiadas e as culturas mantidas na obscuridade.

Condições de ensaio d) — ensaio NRU:

- composição do meio NR,
- duração da incubação em NR,
- condições de incubação (concentração de CO₂, temperatura e humidade),
- condições de extracção do NR (agente de extracção, duração),
- comprimento de onda utilizado para a leitura espectrofotométrica da densidade óptica do NR,
- segundo comprimento de onda (referência), se aplicável,
- substância utilizada para o ensaio em branco do espectrofotómetro, se aplicável.

Resultados:

- viabilidade celular obtida para cada concentração da substância em estudo, expressa em percentagem da viabilidade média dos controlos,
- curvas concentração-resposta (concentração da substância em estudo — viabilidade celular relativa), obtidas nos ensaios +UVA e -UVA paralelos,
- análise dos dados provenientes das curvas concentração-resposta: se possível, cálculo automático/cálculo do valor de EC₅₀ (+UVA) e EC₅₀ (-UVA),
- comparação das duas curvas concentração-resposta obtidas com e sem irradiação UVA/visível, calculando o factor de fotoirritação (PIF) ou o fotoefeito médio (MPE),
- classificação do potencial fototóxico,
- critérios de aceitação do ensaio a) — controlo negativo paralelo:
 - viabilidade absoluta (densidade óptica do extracto de NR) das células irradiadas e as não irradiadas,
 - dados de referência do controlo negativo, média e desvio-padrão,
- critérios de aceitação do ensaio b) — controlo positivo paralelo:
 - EC₅₀ (+UVA), EC₅₀ (-UVA) e PIF da substância de controlo positivo
 - dados de referência da substância de controlo positivo: EC₅₀ (+UVA), EC₅₀ (-UVA) e PIF, média e desvio-padrão.

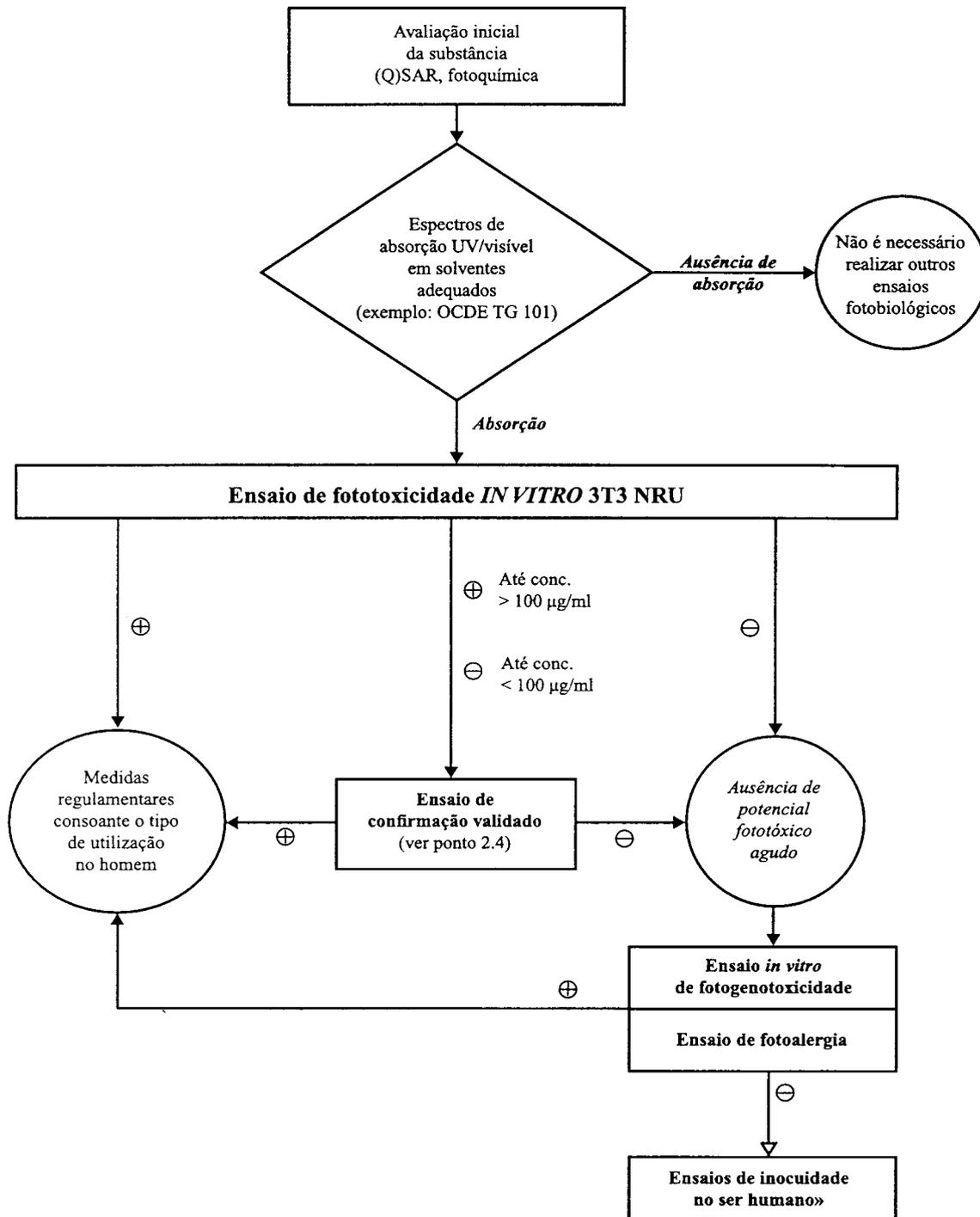
*Discussão dos resultados.**Conclusões.*

BIBLIOGRAFIA

- (1) Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer, F., Moore, L., Pape, W., Pfannenbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W. and Willshaw, A. (1994), EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay, *Toxicology in Vitro* 8, pp. 793-796.
- (2) Anon (1998), Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, *ATLA* 26, pp. 7-8.
- (3) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., Pechovitch, G., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Clotier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W. and Brantom, P. (1998), EU/COLIPA "In vitro phototoxicity" validation study, results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test, *Toxicology in Vitro* 12, pp. 305-327.
- (4) OECD Test Guidelines Programme, ENV/MC/CHEM/TG(96)9: Final Report of the OECD Workshop on Harmonisation of Validation and Acceptance Criteria of Alternative Toxicological Test Methods, OECD Publications Office, Paris, 1996.
- (5) Lovell, W.W. (1993), A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential, *Toxicology in Vitro* 7, pp. 95-102.
- (6) Santamaria, L. and Prino, G. (1972), List of the photodynamic substances, *Research progress in organic, biological and medicinal chemistry* Vol. 3 Part 1, North Holland Publishing Co, Amsterdam, pp. XI-XXXV.
- (7) Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O. and Sladowski, D. (1994), *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM workshop 2, *ATLA* 22, pp. 314-348.
- (8) Spikes, J.D. (1989), Photosensitization, *The science of photobiology*, edited by KC Smith, Plenum Press, New York, 2nd edition, pp. 79-110.
- (9) Borenfreund, E. and Puerner, J.A. (1985), Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption, *Toxicology Letters* 24, pp. 119-124.
- (10) Lambert L. A, Warner W.G. and Kornhauser A. (1996), Animal models for phototoxicity testing, *Dermatotoxicology*, edited by FN Marzulli and HI Maibach, published by Taylor & Francis, Washington DC, 5th Edition, pp. 515-530.
- (11) Tyrrell R.M. and Pidoux M (1987), Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes, *Cancer Research* 47, pp. 1825-1829.
- (12) ZEBET/ECVAM/COLIPA, Standard Operating Procedure: Balb/c 3T3 NRU Phototoxicity Test, drafted 23 December 1997 by M. Liebsch and approved 6 March 1998 by the Management Team of the EU/COLIPA project "In Vitro Photoirritation".
- (13) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W. and Pfannenbecker (1998), A Study on the Phototoxic Potential of UV Filter Chemicals from Annex VII of the EU Directive 76/768/EEC in the 3T3 NRU *In Vitro* Phototoxicity Test, *ATLA* 26, pp. 679-708.
- (14) Holzhütter, H.G. and Quedenau, J. (1995), Mathematical modelling of cellular responses to external signals, *Journal of Biological Systems* 3, pp. 127-138.
- (15) Holzhütter, H.G. (1997), A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals, *ATLA* 25, pp. 445-462.

Apêndice

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



II

(Actos cuja publicação não é uma condição da sua aplicabilidade)

COMISSÃO

DECISÃO DA COMISSÃO

de 19 de Maio de 2000

que corrige a Directiva 98/98/CE que adapta ao progresso técnico pela vigésima quinta 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

[notificada com o número C(2000) 1333]

(Texto relevante para efeitos do EEE)

(2000/368/CE)

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 perigosas⁽¹⁾, com a última redacção que lhe foi dada pela Directiva 1999/33/CE do Parlamento Europeu e do Conselho⁽²⁾, e, nomeadamente, o seu artigo 28.º,

Considerando o seguinte:

- (1) O anexo VI da Directiva 67/548/CEE contém um guia para a classificação e rotulagem das substâncias e preparações perigosas. O anexo VI foi alterado pela última vez pelo anexo 4 da Directiva 98/98/CE⁽³⁾. Os pontos 3.2.3, 3.2.8, 6.2 e 8 do anexo 4 da Directiva 98/98/CE estão incompletos. Consequentemente, é necessário corrigir o anexo 4 da Directiva 98/98/CE.
- (2) As medidas previstas na presente decisão estão de acordo com o parecer do Comité de adaptação ao progresso téc-

nico das directivas referentes à eliminação dos entraves técnicos ao comércio das substâncias e preparações perigosas,

ADOPTOU A PRESENTE DECISÃO:

Artigo 1.º

O anexo 4 da Directiva 98/98/CE é substituído pelo anexo da presente decisão.

Artigo 2.º

Os Estados-Membros são os destinatários da presente decisão.

Feito em Bruxelas, em 19 de Maio de 2000.

Pela Comissão
Margot WALLSTRÖM
Membro da Comissão

⁽¹⁾ JO 196 de 16.8.1967, p. 1.

⁽²⁾ JO L 199 de 30.7.1999, p. 57.

⁽³⁾ JO L 355 de 30.12.1998, p. 1.

ANEXO

«ANEXO 4

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

- a) No que diz respeito às substâncias relativamente às quais são exigidas as informações especificadas no anexo VII, o “dossier de base” inclui a maioria dos dados necessários para a classificação e rotulagem. Esta classificação e rotulagem poderão ser revistas, se for caso disso, quando se dispuser de novas informações (anexo VIII);
- b) No que diz respeito a outras substâncias (por exemplo, as substâncias referidas no ponto 1.5), os dados necessários para a classificação e rotulagem podem ser, se for caso disso, obtidos de várias fontes, tais como: resultados de ensaios anteriores, informações exigidas pela regulamentação internacional sobre o transporte de matérias perigosas, informações provenientes de trabalhos de referência e da bibliografia e informações baseadas na experiência prática. Podem também ser tidos em conta, sempre que adequado, resultados de relações estrutura-actividade validados, bem como pareceres de peritos.

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

- a) No que respeita aos dados físico-químicos, por aplicação dos métodos especificados no anexo V. No caso das preparações gasosas, pode ser utilizado um método de cálculo da inflamabilidade e das propriedades oxidantes (ver capítulo 9);
- b) No que respeita aos dados relativos aos efeitos na saúde:
 - por aplicação dos métodos especificados no anexo V e/ou por aplicação do método convencional referido no n.º 5, alíneas a) a i), do artigo 3.º da Directiva 88/379/CEE ou, no caso da frase R 65, pela aplicação das normas especificadas em 3.2.3,
 - no entanto, tratando-se da avaliação de propriedades cancerígenas, mutagénicas e de toxicidade para a reprodução, aplicar-se-á o método convencional referido no n.º 5, alíneas j) a q), do artigo 3.º da Directiva 88/379/CEE.

Nota relativa à realização de ensaios com animais

A realização de ensaios com animais para a obtenção de dados experimentais está sujeita às disposições da Directiva 86/609/CEE relativa à protecção dos animais utilizados para fins experimentais.

1.7.2. *Aplicação dos critérios do guia relativamente às substâncias*

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

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

Sem prejuízo do artigo 6.º, nos casos em que, na sequência da aplicação do procedimento *supra*, subsistam preocupações sobre possíveis incoerências, deve apresentar-se uma proposta de inclusão da classificação provisória no anexo I. A proposta deve ser apresentada a um Estado-Membro e ser acompanhada de dados científicos adequados (ver também o ponto 4.1).

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

2.2.2.1. *Observações relativas aos peróxidos*

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

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

Quanto às substâncias, os peróxidos orgânicos ainda não classificados como explosivos são classificados como perigosos com base na respectiva estrutura (por exemplo, R-O-O-H; R₁-O-O-R₂).

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

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

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

3.2.3. Substâncias nocivas

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

R 22 Nocivo por ingestão

Resultados de toxicidade aguda:

- LD₅₀ por via oral, no rato: 200 < LD₅₀ ≤ 2 000 mg/kg,
- dose discriminante, por via oral, no rato, 50 mg/kg: 100 % de sobrevivência, mas efeitos tóxicos evidentes,
- sobrevivência inferior a 100 % a 500 mg/kg, no rato, por via oral, através do procedimento de dosagem fixa. Ver o quadro de avaliação do método de ensaio B1 (a) do anexo V.

R 21 Nocivo em contacto com a pele

Resultados de toxicidade aguda:

- LD₅₀ por contacto com a pele, no rato ou no coelho: 400 < LD₅₀ ≤ 2 000 mg/kg.

R 20 Nocivo por inalação

Resultados de toxicidade aguda:

- LC₅₀ por inalação, no rato, para aerossóis e partículas: 1 < LC₅₀ ≤ 5 mg/litro/4h,
- LC₅₀ por inalação, no rato, para gases e vapores: 2 < LC₅₀ ≤ 20 mg/litro/4h.

R 65 Nocivo: pode causar danos nos pulmões se ingerido

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

- a) Substâncias e preparações que contenham hidrocarbonetos alifáticos, alicíclicos e aromáticos numa concentração total equivalente ou superior a 10 % e se caracterizem igualmente por:
 - um tempo de escoamento inferior a 30 segundos num cone ISO de 3 mm em conformidade com a norma ISO 2431, ou
 - uma viscosidade cinemática inferior a 7×10^{-6} m²/s a 40 °C, medida por um viscosímetro capilar calibrado em vidro em conformidade com a norma ISO 3104/3105, ou
 - uma viscosidade cinemática inferior a 7×10^{-6} m²/s a 40 °C, deduzida de medições da viscosidade rotacional em conformidade com a norma ISO 3219.

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

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

R 40 Possibilidades de efeitos irreversíveis

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

Para indicar a via de administração/exposição deve utilizar-se umas das seguintes combinações: R 40/20, R 40/21, R 40/22, R 40/20/21, R 40/20/22, R 40/21/22, R 40/20/21/22.

R 48 Risco de efeitos graves para a saúde em caso de exposição prolongada

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

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

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

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

Para indicar a via de administração/exposição deve utilizar-se uma das seguintes combinações: R 48/20, R 48/21, R 48/22, R 48/20/21, R 48/20/22, R 48/21/22, R 48/20/21/22.

3.2.3.1. Observações respeitantes a substâncias voláteis

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

3.2.6.1. Inflamação da pele

A frase indicadora de risco que se segue será atribuída de acordo com os critérios subsequentes:

R 38 Irritante para a pele

- Substâncias e preparações que provoquem inflamação significativa da pele, persistente durante pelo menos 24 horas após um período de exposição não superior a quatro horas, no coelho, de acordo com o método de ensaio de irritação cutânea referido no anexo V.

A inflamação da pele será significativa se:

- a) O valor médio, quer no caso da formação de escaras e eritema quer no caso da formação de edema, calculado para o conjunto dos animais submetidos aos testes, for 2 ou mais, ou
- b) Tiver sido observado um valor médio, calculado para cada animal separadamente, em dois ou mais animais, quer no caso da formação de escaras e eritema quer no caso da formação de edema, equivalente a 2 ou mais, no caso de o ensaio do anexo V ter sido conduzido com três animais.

Em ambos os casos, para o cálculo dos respectivos valores médios, deverão ser utilizados todos os valores relativos a cada um dos efeitos, que tenham sido observados em cada momento de leitura (24, 48 e 72 horas).

A inflamação da pele também será significativa se persistir em pelo menos dois animais no final do período de observação. Devem ser tomados em conta efeitos particulares, por exemplo, hiperplasia, descamação, alterações da cor, fissuras, cicatrizes e alopecia.

Podem também obter-se dados importantes com base em ensaios não-agudos com animais (ver comentários à frase R 48, na secção 2.d). Os referidos dados são considerados significativos se os efeitos observados forem idênticos aos descritos *supra*.

- Substâncias e preparações que provoquem inflamação significativa da pele, com base em observações efectuadas em seres humanos, por contacto imediato, prolongado ou repetido.
- Peróxidos orgânicos, excepto quando existam dados que indiquem o contrário.

Parestesia: A parestesia causada no homem pelo contacto cutâneo com pesticidas piretróides não é considerada um efeito irritante que justifique a classificação como Xi; R 38. Deve, todavia, aplicar-se a frase S 24 a substâncias que causem o referido efeito.

3.2.8. Outras propriedades toxicológicas

Às substâncias e preparações classificadas em conformidade com os pontos 2.2.1 a 3.2.7 precedentes e/ou os capítulos 4 e 5 serão atribuídas outras frases indicadoras de risco, de acordo com os seguintes critérios, baseados na experiência obtida durante a compilação do anexo I:

R 29 Em contacto com a água liberta vapores tóxicos

Para substâncias e preparações que, em contacto com a água ou a humidade do ar, libertam gases tóxicos ou muito tóxicos (por exemplo, fosforeto de alumínio, pentassulfureto de fósforo) em quantidades potencialmente perigosas.

R 31 Em contacto com ácidos liberta gases tóxicos

Para substâncias e preparações que reagem com ácidos, libertando gases tóxicos (por exemplo, hipoclorito de sódio, polissulfureto de bário) em quantidades potencialmente perigosas. Para substâncias utilizadas pelo público em geral, é mais adequada a frase S 50 [não misturar com ... (a especificar pelo fabricante)].

R 32 Em contacto com ácidos liberta gases muito tóxicos

Para substâncias e preparações que reagem com ácidos, libertando gases muito tóxicos (por exemplo, sais de cianeto de hidrogénio, azida de sódio) em quantidades potencialmente perigosas. Para substâncias utilizadas pelo público em geral, é mais adequada a frase S 50 [não misturar com ... (a especificar pelo fabricante)].

R 33 Perigo de efeitos cumulativos

Para substâncias e preparações cuja acumulação no organismo humano seja provável e possa causar preocupações mas não seja suficiente para justificar o uso da frase R 48.

R 64 Pode causar danos nas crianças alimentadas com leite materno

Para substâncias e preparações absorvidas pelas mulheres que possam interferir com a lactação ou possam encontrar-se presentes (nomeadamente na forma de metabolitos) no leite materno em quantidades que suscitem preocupações sobre a saúde dos lactentes.

Para comentários sobre a frase R 64 e o respectivo uso (bem como, em alguns casos, a frase R 33), ver o ponto 4.2.3.3.

R 66 A exposição repetida pode causar secura ou fissuração cutâneas

Para substâncias e preparações que possam causar problemas em virtude dos seus efeitos de secura, descamação ou fissuração cutâneas, mas que não satisfazem os critérios da frase R 38:

com base em:

- observações práticas na sequência do manuseamento ou utilização normais, ou
- dados importantes relativos aos efeitos cutâneos previsíveis.

Ver também os pontos 1.6 e 1.7.

R 67 Os vapores podem causar sonolência e tonturas

Para substâncias e preparações voláteis que contenham componentes que causem sintomas inequívocos de depressão do sistema nervoso central por inalação, ainda não classificadas em matéria de toxicidade aguda por inalação (R 20, R 23, R 26, R 40/20, R 39/23 ou R 39/26).

Podem utilizar-se as seguintes fontes de informação:

- a) Dados provenientes de estudos com animais que mostrem sintomas inequívocos de depressão do sistema nervoso central por inalação, tais como letargia, descoordenação (incluindo perda do reflexo de endireitamento) e ataxia:
 - quer com concentrações/tempos de exposição não superiores a 20 mg/l/4 h,
 - quer no caso de o rácio entre a concentração que causa os referidos efeitos, num período igual ou inferior a 4 h, e a concentração do vapor saturado (SVC), a 20 °C, seja inferior ou igual a 1/10;
- b) Dados provenientes de fontes bem documentadas relativos aos seus efeitos no homem (por exemplo, narcole, sonolência, diminuição da vigilância, perda de reflexos, descoordenação, vertigens), em condições de exposição comparáveis às que causam os efeitos supramencionados em animais.

Ver também os pontos 1.6 e 1.7.

Para outras frases de risco suplementares, ver o ponto 2.2.6.

4.1.2. Se um produtor, distribuidor ou importador dispuser de informações que indiquem que uma substância deve ser classificada e rotulada em conformidade com os critérios enunciados nos pontos 4.2.1, 4.2.2 ou 4.2.3, deve proceder à rotulagem provisória da substância de acordo com os referidos critérios, com base numa avaliação das evidências efectuada por uma entidade competente.

4.1.3. O fabricante, distribuidor ou importador deve apresentar aos Estados-Membros em cujo mercado a substância seja colocada, tão breve quanto possível, um documento síntese com todas as informações relevantes sobre a mesma. O referido documento deve incluir uma bibliografia com todas as referências importantes, nomeadamente dados de relevo não publicados.

4.1.4. Além disso, um fabricante, distribuidor ou importador que disponha de novos dados de relevo para a classificação e rotulagem de uma substância, em conformidade com os critérios estabelecidos nos pontos 4.2.1, 4.2.2 e 4.2.3, deve apresentar os referidos dados, tão breve quanto possível, aos Estados-Membros em cujo mercado a substância seja colocada.

5.2.2. Ambiente não-aquático

5.2.2.1. As substâncias serão classificadas como perigosas para o ambiente e caracterizadas pelo símbolo "N", pela indicação de perigo adequada e por frases indicadoras de risco de acordo com os critérios a seguir definidos:

R 54: Tóxico para a flora

R 55: Tóxico para a fauna

R 56: Tóxico para os organismos do solo

R 57: Tóxico para as abelhas

R 58: Pode causar efeitos nefastos a longo prazo no ambiente

Substâncias que, com base nos elementos disponíveis relativos à sua toxicidade, persistência, acumulação potencial, bem como comportamento e destino previsíveis ou observados no ambiente, possam constituir um perigo imediato ou a longo prazo e/ou retardado para a estrutura e/ou para o funcionamento dos ecossistemas naturais, diferente dos abrangidos pelo ponto 5.2.1 *supra*. Posteriormente, serão elaborados critérios mais pormenorizados.

5.2.2.2. As substâncias serão classificadas como perigosas para o ambiente e caracterizadas pelo símbolo "N", pela indicação de perigo adequada e por frases indicadoras de risco de acordo com os critérios a seguir definidos:

R 59: Perigoso para a camada de ozono.

Substâncias que, com base nos elementos disponíveis relativos às suas propriedades, bem como ao seu comportamento e destino previsíveis ou observados no ambiente, possam constituir um perigo para a estrutura e/ou para o funcionamento da camada de ozono da estratosfera. Incluem-se as substâncias enumeradas no anexo I do Regulamento (CE) n.º 3093/94 do Conselho relativo a substâncias que empobrecem a camada de ozono (JO L 333 de 22.12.1994, p. 1) e suas alterações subsequentes.

6.2. Frases de segurança aplicáveis às substâncias e preparações perigosas

S 1 Guardar fechado à chave

- Âmbito de aplicação:
 - substâncias e preparações muito tóxicas, tóxicas ou corrosivas.
- Critérios de utilização:
 - obrigatória para as substâncias e preparações atrás referidas, vendidas ao público em geral.

S 2 Manter fora do alcance das crianças

- Âmbito de aplicação:
 - todas as substâncias e preparações perigosas.
- Critérios de utilização:
 - obrigatória para todas as substâncias e preparações perigosas vendidas ao público em geral que não tenham sido apenas classificadas de perigosas para o ambiente.

S 3 Guardar em lugar fresco

- Âmbito de aplicação:
 - peróxidos orgânicos,
 - outras substâncias e preparações perigosas com ponto de ebulição $\leq 40^{\circ}\text{C}$.
- Critérios de utilização:
 - obrigatória para os peróxidos orgânicos, excepto no caso da utilização da frase S 47,
 - recomendada para outras substâncias e preparações perigosas com ponto de ebulição $\leq 40^{\circ}\text{C}$.

S 4 Manter fora de qualquer zona de habitação

- Âmbito de aplicação:
 - substâncias e preparações muito tóxicas e tóxicas.
- Critérios de utilização:
 - geralmente limitada a substâncias e preparações muito tóxicas e tóxicas, como complemento da frase S 13 em casos adequados, nomeadamente quando existam riscos de inalação e a substância ou preparação deva ser armazenada em locais distantes das zonas habitacionais. Esta indicação não tem por objectivo excluir a utilização adequada dessas substâncias ou preparações em zonas habitacionais.

S 5 Manter sob ... (líquido apropriado a especificar pelo produtor)

- Âmbito de aplicação:
 - substâncias e preparações sólidas que se inflamem espontaneamente.
- Critérios de utilização:
 - limitada, normalmente, a casos especiais, por exemplo, sódio, potássio ou fósforo branco.

S 6 Manter sob ... (gás inerte a especificar pelo produtor)

- Âmbito de aplicação:
 - substâncias e preparações perigosas que devam ser mantidas numa atmosfera inerte.
- Critérios de utilização:
 - limitada, normalmente, a casos especiais, por exemplo, determinados compostos organometálicos.

S 7 Manter o recipiente bem fechado

- Âmbito de aplicação:
 - peróxidos orgânicos,
 - substâncias e preparações que possam libertar gases muito tóxicos, tóxicos, nocivos ou extremamente inflamáveis,
 - substâncias e preparações que, por absorção de humidade, libertem gases extremamente inflamáveis,
 - sólidos facilmente inflamáveis.
- Critérios de utilização:
 - obrigatória para os peróxidos orgânicos,
 - recomendada para os restantes âmbitos de aplicação referidos.

S 8 Manter o recipiente ao abrigo da humidade

- Âmbito de aplicação:
 - substâncias e preparações que possam reagir violentamente com a água,
 - substâncias e preparações que, em contacto com a água, libertem gases extremamente inflamáveis,
 - substâncias e preparações que, em contacto com a água, libertem gases muito tóxicos.
- Critérios de utilização:
 - limitada, normalmente, aos âmbitos de aplicação supra-referidos, quando é necessário reforçar as indicações de risco das frases R 14 e R 15 em particular, mas também da R 29.

S 9 Manter o recipiente num local bem ventilado

- Âmbito de aplicação:
 - substâncias e preparações voláteis que possam libertar vapores muito tóxicos, tóxicos ou nocivos,
 - líquidos extremamente inflamáveis ou muito inflamáveis e gases extremamente inflamáveis.
- Critérios de utilização:
 - recomendada para as substâncias e preparações voláteis que possam libertar vapores muito tóxicos, tóxicos ou nocivos,
 - recomendada para líquidos extremamente inflamáveis ou muito inflamáveis ou gases extremamente inflamáveis.

S 12 Não fechar o recipiente hermeticamente

- Âmbito de aplicação:
 - substâncias e preparações que possam provocar a explosão do recipiente, por libertação de gases ou vapores.
- Critérios de utilização:
 - limitada normalmente, aos casos especiais acima referidos.

S 13 Manter afastado de alimentos e bebidas, incluindo os dos animais

- Âmbito de aplicação:
 - substâncias e preparações muito tóxicas, tóxicas e nocivas.
- Critérios de utilização:
 - recomendada para substâncias e preparações que possam ser utilizadas pelo público em geral.

S 14 Manter ao abrigo de ... (matérias incompatíveis a indicar pelo produtor)

- Âmbito de aplicação:
 - peróxidos orgânicos.
- Critérios de utilização:
 - obrigatória para os peróxidos orgânicos e normalmente limitada aos mesmos. Contudo, pode ser útil em casos excepcionais, se a incompatibilidade produzir riscos específicos.

S 15 Manter afastado do calor

- Âmbito de aplicação:
 - substâncias e preparações que possam decompor-se ou reagir espontaneamente sob a acção do calor.
- Critérios de utilização:
 - limitada normalmente, a casos especiais, como os monómeros, não sendo atribuída se as frases indicadoras de risco R 2, R 3 e/ou R 5 já tiverem sido aplicadas.

S 16 Manter afastado de qualquer chama ou fonte de ignição — Não fumar

- Âmbito de aplicação:
 - líquidos extremamente inflamáveis ou muito inflamáveis e gases extremamente inflamáveis.
- Critérios de utilização:
 - recomendada para as substâncias e preparações referidas, não sendo atribuída se as frases indicadoras de risco R 2, R 3 e/ou R 5 já tiverem sido aplicadas.

S 17 Manter afastado de matérias combustíveis

- Âmbito de aplicação:
 - substâncias e preparações que possam constituir misturas explosivas ou espontaneamente inflamáveis com matérias combustíveis.
- Critérios de utilização:
 - a utilizar em casos especiais, por exemplo, para reforçar as frases R 8 e R 9.

S 18 Manipular e abrir o recipiente com prudência

- Âmbito de aplicação:
 - substâncias e preparações que possam produzir uma sobrepressão no recipiente,
 - substâncias e preparações que possam dar origem a peróxidos explosivos.
- Critérios de utilização:
 - normalmente limitada aos casos atrás referidos, sempre que existam riscos de danos para os olhos e/ou as substâncias e preparações possam ser utilizadas pelo público em geral.

S 20 Não comer nem beber durante a utilização

- Âmbito de aplicação:
 - substâncias e preparações muito tóxicas, tóxicas ou corrosivas.
- Critérios de utilização:
 - normalmente limitada a casos especiais (por exemplo, arsénio e compostos de arsénio; fluoroacetatos), em particular substâncias e preparações que possam ser utilizadas pelo público em geral.

S 21 Não fumar durante a utilização

- Âmbito de aplicação:
 - substâncias e preparações cuja combustão origine produtos tóxicos.
- Critérios de utilização:
 - limitada normalmente, a casos especiais (por exemplo, compostos halogenados).

S 22 Não respirar as poeiras

- Âmbito de aplicação:
 - todas as substâncias e preparações sólidas perigosas para a saúde.
- Critérios de utilização:
 - obrigatória para as substâncias e preparações atrás referidas a que tenha sido atribuída a frase R 42,
 - recomendada para as substâncias e preparações atrás referidas fornecidas numa forma pulverulenta inalável e cujos riscos para saúde na sequência da inalação se desconhecem.

S 23 Não respirar os gases/vapores/fumos/aerossóis [termos(s) apropriado(s) a indicar pelo produtor]

- Âmbito de aplicação:
 - todas as substâncias e preparações líquidas e gasosas perigosas para a saúde,
- Critérios de utilização:
 - obrigatória para substâncias e preparações atrás referidas a que tenha sido atribuída a frase R 42,
 - obrigatória para substâncias e preparações destinadas a utilização por pulverização. Como complemento, devem prescrever-se as frases S 38 ou S 51,
 - recomendada quando seja necessário chamar a atenção do utilizador para riscos decorrentes da inalação não referidos nas frases indicadoras de risco atribuídas.

S 24 Evitar o contacto com a pele

- Âmbito de aplicação:
 - todas as substâncias e preparações perigosas para a saúde.
- Critérios de utilização:
 - obrigatória para todas as substâncias e preparações a que tenha sido atribuída a frase R 43, salvo se tiver sido também atribuída a frase S 36,
 - recomendada quando seja necessário chamar a atenção do utilizador para riscos decorrentes do contacto com a pele (por exemplo, parestesia) não referidos nas frases indicadoras de risco atribuídas. No entanto, poderá ser utilizada para reforçar tais frases.

S 25 Evitar o contacto com os olhos

- Âmbito de aplicação:
 - todas as substâncias e preparações perigosas para a saúde.
- Critérios de utilização:
 - recomendada quando seja necessário chamar a atenção do utilizador para riscos decorrentes do contacto com os olhos, não referidos nas frases indicadoras de risco obrigatórias. No entanto, poderá ser utilizada para reforçar tais frases,
 - recomendada para substâncias e preparações corrosivas às quais tenham sido atribuídas as frases R 34, R 35, R 36 ou R 41 que possam ser utilizadas pelo público em geral.

S 26 Em caso de contacto com os olhos, lavar imediata e abundantemente com água e consultar um especialista

- Âmbito de aplicação:
 - substâncias e preparações corrosivas ou irritantes.
- Critérios de utilização:
 - obrigatória para substâncias e preparações corrosivas a que tenha sido atribuída a frase R 41,
 - recomendado para substâncias e preparações irritantes a que tenha já sido atribuída a frase R 36.

S 27 Retirar imediatamente todo o vestuário contaminado

- Âmbito de aplicação:
 - substâncias e preparações muito tóxicas, tóxicas ou corrosivas.
- Critérios de utilização:
 - obrigatória para substâncias e preparações muito tóxicas a que tenha sido atribuída a frase R 27 e que possam ser utilizadas pelo público em geral,
 - recomendada para substâncias e preparações muito tóxicas, utilizadas na indústria, a que tenha sido atribuída a frase R 27. Contudo, esta frase de segurança não deve ser utilizada se tiver sido atribuída a frase S 36,
 - recomendada para substâncias e preparações tóxicas a que tenha sido atribuída a frase R 24, bem como para substâncias e preparações corrosivas que possam ser utilizadas pelo público em geral.

S 28 Após contacto com a pele, lavar imediata e abundantemente com ... (produtos adequados a especificar pelo produtor)

- Âmbito de aplicação:
 - substâncias e preparações muito tóxicas, tóxicas ou corrosivas.
- Critérios de utilização:
 - obrigatória para substâncias e preparações muito tóxicas,
 - recomendada para as restantes substâncias e preparações supra-referidas, em especial quando a água não for o fluido de lavagem mais indicado,
 - recomendada para substâncias e preparações corrosivas que possam ser utilizadas pelo público em geral.

S 29 Não deitar os resíduos no esgoto

- Âmbito de aplicação:
 - líquidos extremamente inflamáveis ou muito inflamáveis imiscíveis com a água,
 - substâncias e preparações muito tóxicas e tóxicas,
 - substâncias perigosas para o ambiente.
- Critérios de utilização:
 - obrigatória para substâncias perigosas para o ambiente e caracterizadas pelo símbolo "N", que possam ser utilizadas pelo público em geral, excepto se for essa a sua previsível utilização,
 - recomendada para as outras substâncias e preparações supra-referidas que possam ser utilizadas pelo público em geral, excepto se for essa a sua previsível utilização.

S 30 Nunca adicionar água a este produto

- Âmbito de aplicação:
 - substâncias e preparações que reajam violentamente com a água.
- Critérios de utilização:
 - normalmente limitada a casos especiais (por exemplo, ácido sulfúrico); pode ser utilizada, se adequado, para fornecer informações tão claras quanto possível, tanto para reforçar a frase R 14 ou como alternativa à frase R 14.

S 33 Evitar acumulação de cargas electrostáticas

- Âmbito de aplicação:
 - substâncias e preparações extremamente inflamáveis ou muito inflamáveis.
- Critérios de utilização:
 - recomendada para substâncias e preparações utilizadas na indústria que não absorvam humidade. Praticamente nunca utilizada para substâncias e preparações colocadas no mercado para utilização pelo público em geral.

S 35 Este produto e o seu recipiente devem ser eliminados de modo seguro

- Âmbito de aplicação:
 - todas as substâncias e preparações perigosas.
- Critérios de utilização:
 - recomendada para substâncias e preparações cuja eliminação adequada necessite de directrizes específicas.

S 36 Usar vestuário de protecção adequado

- Âmbito de aplicação:
 - peróxidos orgânicos,
 - substâncias e preparações muito tóxicas, tóxicas ou nocivas,
 - substâncias e preparações corrosivas.
- Critérios de utilização:
 - obrigatória para substâncias e preparações muito tóxicas e corrosivas,
 - obrigatória para substâncias e preparações a que tenham sido atribuídas as frases R 21 ou R 24,
 - obrigatória para substâncias cancerígenas, mutagénicas ou tóxicas para a reprodução da categoria 3, excepto se os referidos efeitos ocorrerem apenas por inalação das mesmas,
 - obrigatória para os peróxidos orgânicos,
 - recomendada para substâncias e preparações tóxicas se o valor de LD₅₀ dérmico for desconhecido, mas a substância ou preparação puder ser nociva por contacto com a pele,
 - recomendada para as substâncias e preparações utilizadas na indústria que sejam potencialmente nocivas para a saúde em caso de exposição prolongada.

S 37 Usar luvas adequadas

- Âmbito de aplicação:
 - substâncias e preparações muito tóxicas, tóxicas, nocivas ou corrosivas,
 - peróxidos orgânicos,
 - substâncias e preparações irritantes da pele ou que causem sensibilização por contacto com a pele.

- Critérios de utilização:
 - obrigatória para substâncias e preparações muito tóxicas e corrosivas,
 - obrigatória para substâncias e preparações a que tenham sido atribuídas as frases R 21, R 24 ou R 43,
 - obrigatória para substâncias cancerígenas, mutagénicas ou tóxicas para a reprodução da categoria 3, excepto se os referidos efeitos ocorrerem apenas por inalação das mesmas,
 - obrigatória para os peróxidos orgânicos,
 - recomendada para substâncias e preparações tóxicas se o valor de LD₅₀ dérmico for desconhecido mas a substância ou preparação puder ser nociva por contacto com a pele,
 - recomendada para substâncias e preparações irritantes para a pele.

S 38 Em caso de ventilação insuficiente, usar equipamento respiratório adequado

- Âmbito de aplicação:
 - substâncias e preparações muito tóxicas e tóxicas.
- Critérios de utilização:
 - limitada normalmente, a casos especiais de utilização de substâncias e preparações muito tóxicas ou tóxicas, na indústria ou na agricultura.

S 39 Usar um equipamento protector para a vista/face

- Âmbito de aplicação:
 - peróxidos orgânicos,
 - substâncias e preparações corrosivas, incluindo substâncias e preparações irritantes, que apresentem riscos de danos graves para os olhos,
 - substâncias e preparações muito tóxicas e tóxicas.
- Critérios de utilização:
 - obrigatória para substâncias e preparações a que tenham sido atribuídas as frases R 34, R 35 ou R 41,
 - obrigatória para os peróxidos orgânicos,
 - recomendada quando seja necessário chamar a atenção do utilizador, para riscos decorrentes do contacto com os olhos, não referidos nas frases indicadoras de risco atribuídas,
 - limitada normalmente, a casos excepcionais de substâncias e preparações muito tóxicas e tóxicas, quando existir o risco de salpicos e quando estas substâncias e preparações forem facilmente absorvidas através da pele.

S 40 Para limpeza do chão e objectos contaminados por este produto, utilizar ... (a especificar pelo produtor)

- Âmbito de aplicação:
 - todas as substâncias e preparações perigosas.
- Critérios de utilização:
 - limitada normalmente, às substâncias e preparações perigosas para as quais a água não seja considerada um agente de limpeza adequado (por exemplo, quando for necessário recorrer à absorção por uma matéria pulverulenta, a dissolução num solvente, etc.) e aos casos em que, por razões de saúde e/ou segurança, for importante fazer uma advertência no rótulo.

S 41 Em caso de incêndio e/ou explosão não respirar os fumos

- Âmbito de aplicação:
 - substâncias e preparações perigosas que libertem gases muito tóxicos ou tóxicos durante a combustão.
- Critérios de utilização:
 - geralmente limitada a casos especiais.

S 42 Durante as fumigações/pulverizações usar equipamento respiratório adequado [termo(s) adequado(s) a indicar pelo produtor]

- Âmbito de aplicação:
 - substâncias e preparações destinadas a estas utilizações mas que possam prejudicar a saúde e a segurança do utilizador se não forem tomadas medidas de precaução apropriadas.
- Critérios de utilização:
 - limitada, normalmente, a casos especiais.

S 43 Em caso de incêndio, utilizar ... (meios de extinção a especificar pelo produtor. Se a água aumentar os riscos, acrescentar: "Nunca utilizar água")

- Âmbito de aplicação:
 - substâncias e preparações extremamente inflamáveis, facilmente inflamáveis e inflâmáveis.
- Critérios de utilização:
 - obrigatória para substâncias e preparações que, em contacto com a água ou a humidade do ar, libertem gases extremamente inflamáveis,
 - recomendada para as substâncias e preparações extremamente inflamáveis, facilmente inflamáveis e inflâmáveis, especialmente quando imiscíveis com a água.

S 45 Em caso de acidente ou de indisposição, consultar imediatamente o médico (se possível, mostrar-lhe o rótulo)

- Âmbito de aplicação:
 - substâncias e preparações muito tóxicas,
 - substâncias e preparações tóxicas e corrosivas,
 - substâncias e preparações que causem sensibilização por inalação.
- Critérios de utilização:
 - obrigatória para as substâncias e preparações acima referidas.

S 46 Em caso de ingestão, consultar imediatamente o médico e mostrar-lhe a embalagem ou o rótulo

- Âmbito de aplicação:
 - todas as substâncias e preparações perigosas, excepto as muito tóxicas, tóxicas, corrosivas ou perigosas para o ambiente.
- Critérios de utilização:
 - obrigatória para todas as substâncias e preparações acima referidas que possam ser utilizadas pelo público em geral, excepto se não existirem motivos para recear perigos decorrentes da respectiva ingestão, nomeadamente por crianças.

S 47 Conservar a uma temperatura que não exceda ...°C (a especificar pelo produtor)

- Âmbito de aplicação:
 - substâncias e preparações que se tornem instáveis a uma determinada temperatura.
- Critérios de utilização:
 - limitada normalmente, a casos especiais (por exemplo, determinados peróxidos orgânicos).

S 48 Manter húmido com ... (material adequado a especificar pelo produtor)

- Âmbito de aplicação:
 - substâncias e preparações que possam tornar-se muito sensíveis a faíscas, fricção ou choque, no caso de secarem.
- Critérios de utilização:
 - limitada normalmente, a casos especiais, por exemplo, nitroceluloses.

S 49 Conservar unicamente no recipiente de origem

- Âmbito de aplicação:
 - substâncias e preparações sensíveis a decomposição catalítica.
- Critérios de utilização:
 - substâncias e preparações sensíveis a decomposição catalítica, por exemplo, determinados peróxidos orgânicos.

S 50 Não misturar com ... (a especificar pelo produtor)

- Âmbito de aplicação:
 - substâncias e preparações que possam reagir com o produto especificado e libertar gases muito tóxicos ou tóxicos,
 - peróxidos orgânicos,
- Critérios de utilização:
 - recomendada para as substâncias e preparações acima referidas que possam ser utilizadas pelo público em geral, nos casos em que for uma melhor alternativa às frases R 31 ou R 32,
 - obrigatória para determinados peróxidos que possam reagir violentamente com aceleradores ou promotores de processos.

S 51 Utilizar somente em locais bem ventilados

- Âmbito de aplicação:
 - substâncias e preparações que possam ou se destinem a libertar vapores, poeiras, aerossóis, fumos, névoas, etc. com riscos por inalação ou com riscos de incêndio ou explosão.
- Critérios de utilização:
 - recomendada quando a frase S 38 não for adequada. Importante para substâncias e preparações que possam ser utilizadas pelo público em geral.

S 52 Não utilizar em grandes superfícies nos locais habitados

- Âmbito de aplicação:
 - substâncias voláteis, muito tóxicas, tóxicas e nocivas e a preparações que as contenham.
- Critérios de utilização:
 - recomendada quando a saúde puder ser prejudicada por uma exposição prolongada a estas substâncias, devido à sua volatilização a partir de grandes superfícies tratadas, em habitações ou noutros locais fechados onde possam estar pessoas.

S 53 Evitar a exposição — Obter instruções específicas antes da utilização

- Âmbito de aplicação:
 - substâncias e preparações carcinogénicas, mutagénicas e/ou com efeitos tóxicos na reprodução
- Critérios de utilização:
 - obrigatória para as substâncias e preparações acima referidas a que tenha sido atribuída, pelo menos, uma das frases R seguintes: R 45, R 46, R 49, R 60 ou R 61.

S 56 Eliminar este produto e o seu recipiente enviando-os para um local de recolha de resíduos perigosos ou especiais

- Âmbito de aplicação:
 - todas as substâncias e preparações perigosas.
- Critérios de utilização:
 - recomendada para todas as substâncias e preparações perigosas que possam ser utilizadas pelo público em geral e que necessitem de uma eliminação especial.

S 57 Utilizar um recipiente adequado para evitar a contaminação do ambiente

- Âmbito de aplicação:
 - substâncias a que tenha sido atribuído o símbolo "N".
- Critérios de utilização:
 - geralmente limitada a substâncias e preparações que não possam ser utilizadas pelo público em geral.

S 59 Solicitar ao produtor/fornecedor informações relativas à recuperação/reciclagem

- Âmbito de aplicação:
 - todas as substâncias e preparações perigosas.
- Critérios de utilização:
 - obrigatória para substâncias perigosas para a camada de ozono,
 - recomendada para outras substâncias e preparações cuja recuperação/reciclagem seja aconselhável.

S 60 Este produto e o seu recipiente devem ser eliminados como resíduos perigosos

- Âmbito de aplicação:
 - todas as substâncias e preparações perigosas.
- Critérios de utilização:
 - recomendada para substâncias e preparações que não sejam utilizadas pelo público em geral às quais não tenha sido atribuída a frase S 35.

S 61 Evitar a libertação para o ambiente. Obter instruções específicas/fichas de segurança

- Âmbito de aplicação:
 - substâncias e preparações para o ambiente.
- Critérios de utilização:
 - geralmente utilizada para substâncias a que tenha sido atribuído o símbolo "N",
 - recomendada para todas as substâncias classificadas como perigosas para o ambiente ainda não abrangidas.

S 62 Em caso de ingestão, não provocar o vômito. Consultar imediatamente um médico e mostrar-lhe a embalagem ou o rótulo

- Âmbito de aplicação:
 - substâncias e preparações classificadas como nocivas com a frase indicadora de risco R 65 de acordo com os critérios definidos no ponto 3.2.3,
 - não se aplica às substâncias e preparações colocadas no mercado em recipientes para aerossóis ou em recipientes dotados de um dispositivo de pulverização selado, ver secções 8 e 9.
- Critérios de utilização:
 - obrigatória para as substâncias e preparações supramencionadas se forem vendidas ou susceptíveis de serem utilizadas pelo público em geral, excepto se forem obrigatórias as frases S 45 ou S 46,
 - recomendada para as substâncias e preparações supramencionadas quando foram utilizadas na indústria, excepto se forem obrigatórias as frases S 45 ou S 46.

S 63 Em caso de acidente por inalação, transferir o acidentado para um local bem ventilado e mantê-lo em repouso

- Âmbito de aplicação:
 - substâncias e preparações muito tóxicas e tóxicas (gases, vapores, partículas, líquidos voláteis),
 - substâncias e preparações que causem sensibilização respiratória.

- Critérios de utilização:
 - obrigatória para substâncias e preparações a que tenham sido atribuídas as frases R 26, R 23 ou R 42 e que possam ser utilizadas pelo público em geral de um modo que possa resultar na sua inalação

S 64 Se engolido, lavar a boca com água (apenas se a pessoa se encontrar consciente)

- Âmbito de aplicação:
 - substâncias e preparações corrosivas ou irritantes.
- Critérios de utilização:
 - recomendada para as substâncias e preparações *supra* que possam ser utilizadas pelo público em geral e relativamente às quais seja adequado o tratamento referido.

7.5.2. Escolha das frases de segurança

Na selecção das frases de segurança deverá atender-se às frases indicadoras de risco incluídas no rótulo e também à utilização prevista para a substância ou preparação:

- como regra geral, será suficiente um máximo de quatro frases S para a recomendação de prudência mais adequada; para este efeito, as frases combinadas do anexo IV serão consideradas frases simples,
- no caso das frases S relativas à eliminação, deve utilizar-se uma única frase, excepto se for claro que a eliminação do produto e do seu recipiente não apresenta perigos para a saúde humana e para o ambiente. O fornecimento de recomendações relativas à eliminação segura é importante, nomeadamente, no caso das substâncias e preparações vendidas ao público em geral,
- algumas frases R tornam-se supérfluas se for feita uma selecção cuidadosa das frases S e vice-versa; as frases S que correspondam claramente a frases R só figurarão no rótulo no caso de se pretender reforçar uma determinada advertência,
- na selecção das frases de segurança correspondentes a determinadas substâncias e preparações, será necessário ter em especial atenção as condições perversíveis de utilização, por exemplo, por pulverização e outros efeitos de aerossol. A escolha das frases deverá atender à utilização prevista,
- as frases S 1, S 2 e S 45 são obrigatórias para todas as substâncias e preparações muito tóxicas, tóxicas e corrosivas vendidas ao público em geral,
- as frases S 2 e S 46 são obrigatórias para todas as outras substâncias e preparações perigosas (à excepção das substâncias e preparações apenas classificadas de perigosas para o ambiente) vendidas ao público em geral.

Sempre que as frases seleccionadas de acordo com os critérios restritos referidos no ponto 6.2 resultarem em redundâncias ou ambiguidades ou se revelarem manifestamente desnecessárias em virtude do carácter específico do produto ou da embalagem, podem suprimir-se algumas frases.

8. CASOS ESPECIAIS: Substâncias

8.1. Garrafas de gás

No caso das garrafas de gás, considera-se que as exigências em matéria de rotulagem são satisfeitas se forem conformes ao artigo 23.º ou ao n.º 6, alínea b), do artigo 24.º

Todavia, por derrogação aos n.ºs 1 e 2 do artigo 24.º, pode utilizar-se uma das seguintes alternativas para garrafas de gás de capacidade inferior ou igual a 150 litros de água:

- o formato e as dimensões do rótulo podem ser conformes ao disposto na norma ISO/DP 7225,
- as informações referidas no n.º 2 do artigo 23.º podem ser inscritas num dístico ou rótulo não destacável da garrafa.

8.2. Garrafas de gás destinadas ao propano, butano ou gás de petróleo liquefeito (GPL)

Estas substâncias estão classificadas no anexo I. Embora sejam classificadas em conformidade com o artigo 2.º, não apresentam riscos para a saúde humana quando colocadas no mercado em garrafas recarregáveis ou em cartuchos não recarregáveis, na acepção da norma EN 417, como gases combustíveis apenas utilizados para fins de combustão.

Estas garrafas ou cartuchos devem ser rotulados com o símbolo adequado e igualmente com as frases R e S que indicam a inflamabilidade. Não é necessário inscrever no rótulo informações relativas aos efeitos sobre a saúde humana. Todavia, as informações relativas aos efeitos sobre a saúde humana que deveriam figurar no rótulo terão de ser comunicadas ao utilizador profissional pelo responsável pela colocação da substância no mercado, recorrendo ao modelo previsto no artigo 27.º da directiva. Devem fornecer-se ao consumidor informações que lhe permitam adoptar todas as medidas necessárias em matéria de saúde e segurança previstas no n.º 3 do artigo 1.º da Directiva 91/155/CEE, alterada pela Directiva 93/112/CEE.

8.3. Metais maciços

Estas substâncias, ou estão classificadas no anexo I ou deverão sê-lo nos termos do artigo 6.º No entanto, embora algumas das substâncias em causa tenham sido classificadas nos termos do artigo 2.º, não apresentam perigos para a saúde humana por inalação, ingestão ou contacto com a pele, bem como para o ambiente aquático, na forma em que são colocadas no mercado. Tais substâncias não necessitam de ser rotuladas em conformidade com o artigo 23.º Todavia, todas as informações que deveriam figurar no rótulo devem ser comunicadas ao utilizador pelo responsável pela colocação do metal no mercado, num formato previsto no artigo 27.º

8.4. Substâncias caracterizadas com a frase R 65

As substâncias classificadas como nocivas em virtude do risco de aspiração não necessitam de ser classificadas como nocivas e caracterizadas pela frase R 65 nos rótulos, se forem colocadas no mercado em recipientes para aerossóis ou em recipientes dotados de um dispositivo de pulverização selado.».
