AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA (DL₅₀) : PROPOSTA PARA
HARMONIZAÇÃO DOS PROTOCOLOS ADOTADOS NO BRASIL*

EDUARDO LUIZ TRINDADE MOREIRA**

LIANA ANDRADE SALES***

ANA RITA PEDREIRA LAPA BAUTISTA****

Nos testes para avaliação da toxicidade aguda (curto prazo) devem ser considerados os efeitos tóxicos e os achados da necrópsia. A DL₅₀ é apenas um dos parâmetros que pode ser obtido. Levando-se em conta que os diversos protocolos adotados no Brasil apresentam diferentes níveis de exigência com relação às observações dos referidos efeitos, foram relatados alguns resultados obtidos visando contribuir para a harmonização destes protocolos. Ratos adultos machos e fêmeas foram expostos pelas vias oral e cutânea a onze praguicidas e afins. Observou-se, na maior dose onde não se verificou óbito, que dez produtos promoveram alterações comportamentais e quatro, na evolução ponderal. Esses resultados demonstram a necessidade de uma interpretação toxicológica cuidadosa pois evidenciam que, para avaliar o risco da exposição do homem a um agente químico, o conhecimento dessa dose pode ser mais importante que os valores da DL₅₀.

1 INTRODUÇÃO

A investigação da toxicidade aguda (curto prazo) é uma parte essencial da caracterização de um agente químico, uma vez que oferece as informações exigidas pelas autoridades envolvidas na regulamentação, contribui para o conhecimento científico da toxicidade do referido agente e, o que é mais importante, fornece dados úteis para a proteção da saúde do

* Trabalho apresentado no VIII Congresso Brasileiro de Toxicologia.

** Fundação José Silveira - LET; Escola de Medicina Veterinária da UFBA.

*** Fundação José Silveira - Laboratório de Ensaios Toxicológicos (LET).

**** Fundação José Silveira - LET; Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola S.A. (EBDA).

m e do meio ambiente. Estão apresentados no Quadro 1 ns aspectos importantes dos protocolos adotados pelo itudo Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais váveis (IBAMA), Instituto Nacional de Controle de idade em Saúde (INCQS) e Organization for Economic eration and Development (OECD).

O 1 - RESUMO DE ALGUNS PROCEDIMENTOS RELEVANTES DOS PROTOCOLOS DE AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE A CURTO PRAZO POR VIA ORAL E CUTÂNEA

Protocolos	IBAMA(6)	INCQS(4)	OECD(5)
io de	- até 14 dias	- em média 14 dias	- em geral 14 dias
vação	- observação clínica	- observação clínica	- observação clínica
	- tempo de morte	- comportamento	- comportamento
	- necrópsia: todos	- tempo de morte	- tempo de morte
os animais	- necropsia: todos	- necropsia: todos	- necropsia: todos
submetidos ao teste	os animais submeti-	os animais submeti-	os animais submeti-
- histopatologia:	dos ao teste	dos ao teste	dos ao teste
microscopia de todos	- histopatologia:	- histopatologia:	- histopatologia:
os órgãos exceto da-	órgãos que apresen-	órgãos que apresen-	órgãos que apresen-
queles animais que	tarem alterações no	tarem alterações no	tarem alterações no
tiveram morte logo	estudo macroscópico	estudo macroscópico	estudo macroscópico
após a exposição	de animais sobrevi-	de animais sobrevi-	de animais sobrevi-
(oral)	ventes a 24 h da	ventes a 24 h da	ventes a 24 h da
somente dos órgãos	exposição	exposição	exposição
que mostraram alte-			
rações macroscópicas			
(cutâneo)			
ações	teste cutâneo:	peso dos animais:	peso dos animais:
mais	peso dos animais:	antes da exposição e	antes da exposição e
	antes da exposição e	semanalmente até o	semanalmente até o
	semanalmente até o	óbito	óbito
	óbito		

É importante enfatizar que a DL₅₀ e os testes de cidade aguda não são sinônimos. O objetivo dos testes é minar todas as conseqüências toxicológicas de uma

exposição de curta duração. A DL₅₀ é apenas um dos parâmetros que pode ser obtido de um teste bem planejado.

Considerando que o conhecimento dos efeitos tóxicos, observados nos níveis de dose abaixo da letal, é necessário para determinar o risco de um agente químico para o homem e que existe interesse na harmonização dos protocolos adotados por diversos países, (3,7) decidiu-se apresentar alguns resultados, obtidos com agrotóxicos e afins, relacionados aos referidos efeitos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

De 36 agrotóxicos e afins avaliados pelo Laboratório de Ensaio Toxicológicos (LET) nos últimos seis meses, foram selecionados onze produtos, dentre os diversos grupos químicos. A avaliação dos efeitos gerais e os registros de peso foram realizados naqueles grupos de ratos adultos (Wistar), machos e fêmeas, nos quais a exposição a uma determinada dose do produto, pelas vias oral e cutânea, não produziu óbito.

Na avaliação comportamental foi utilizada a metodologia adotada por CARLINI (2) e ALMEIDA et al (1), na qual o investigador considera alguns parâmetros específicos contidos em cinco abordagens genéricas quais sejam: estado consciente e disposição, atividade e descoordenação do sistema motor, tono muscular, sistema nervoso central e autônomo. Geralmente os efeitos manifestam-se nas primeiras 4 horas após a exposição, porém, quando os testes preliminares fornecem outras indicações, o período de observação é modificado. Alguns aspectos importantes encontram-se resumidos na Tabela 1.

Os animais dos grupos testes de machos e fêmeas e os respectivos controles foram pesados individualmente antes (d0) e após a exposição, ou seja, no 7º (d7) E 14º (d14) dias do período de observação.

TABELA 1 - RESUMO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS UTILIZADAS PARA A OBSERVAÇÃO DOS EFEITOS GERAIS (AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL) EM RATOS REALIZADA DURANTE O TESTE PARA AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE A CURTO PRAZO (DL₅₀), PELAS VIAS ORAL (O) E CUTÂNEA (C)

PARÂMETROS	CONDIÇÕES DO TESTE
Animais observados:	Dose onde não se observa óbito Grupo controle
Acondicionamento dos animais:	Gaiolas forradas com papel branco
Período de observação dos sinais aparentes, após a exposição:	30', 1 h, 2 h, 3 h, 4 h e 24 h (o) 24, 48, 72 e 96 h, em função do "patch" oclusivo (c)
Efeitos estimulantes do sistema nervoso:	Estimados subjetivamente pelo investigador numa escala de 0 a 4
Efeitos depressores do sistema nervoso:	Estimados subjetivamente pelo investigador numa escala de 4 a 0

2.2 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA

Foram avaliados o peso corpóreo absoluto e a variação em peso (vp=d14-d0), empregando-se ANOVA apenas para os dados com distribuição normal, sendo o valor de p equivalente àquele empregado para o teste "t" de student, uma vez que apenas dois grupos foram comparados (controle x dose onde não se observou óbito). Quando as variâncias entre os grupos diferiram (teste de Bartlett), considerou-se o valor de p calculado pelo teste não paramétrico de Kruskal - Wallis (8).

3 RESULTADOS

Na Tabela 2 estão apresentadas a DL₅₀ dos onze produtos considerados e as respectivas doses onde não se observou óbito.

TABELA 2 - GRUPO QUÍMICO, DL₅₀ (mg/Kg) E A MAIOR DOSE ONDE NÃO HOUE ÓBITO (mg/Kg) DE ALGUNS PRAGUICIDAS CUJA TOXICIDADE AGUDA POR VIA ORAL OU CUTÂNEA FOI AVALIADA PELO LET

GRUPO QUÍMICO	CÓDIGO	DL ₅₀ (mg/Kg) MAIOR DOSE ONDE NÃO HOUE ÓBITO					
		Via Oral		Via Cutânea		(mg/Kg)	
		M	F	M	F	M	F
Triallacina	LT-05	1586	1231	-	-	1000	840
	LT-06	661	778	-	-	486	550
Difenil-éter	LT-07	2483	1975	-	-	1292	1025
Oxima	LT-08	3803	3575	-	-	1995	1995
Fosforotioato	LT-09	-	-	488	251	178	119
Fosforoditioato	LT-10	1040	1260	-	-	630	793
Quinolínico	LT-11	-	-	>2000	>2000	2000	2000
Oxima	LT-12	>4000	>4000	-	-	4000	3175
Dicloroanilida	LT-13	>4000	>4000	-	-	4000	4000
Fosfato	LT-14	-	-	>3000	2000-3000	1330	1330
Glicina	LT-15	>4000	>4000	-	-	4000	4000

M = Machos

F = Fêmeas

No Quadro 2 encontram-se relacionadas algumas alterações comportamentais promovidas por dez dos onze produtos. Tais alterações foram observadas nas primeiras quatro horas após a exposição oral, apresentando reversibilidade dentro de 24 horas, à exceção do produto LT-7 cujo período de observação foi modificado para 1, 2, 6, 8 e 24 h em função do tempo de aparecimento dos efeitos, reversíveis em 48 horas. Por via cutânea, as alterações observadas 24 horas após a exposição foram reversíveis em 48 horas.

QUADRO 2 - RESULTADOS DA AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DE RATOS MACHOS E FÊMEAS EXPOSTOS A PRAGUICIDAS, NAS MAIORES DOSES ONDE NÃO SE OBSERVOU ÓBITO

PARÂMETROS		PRODUTOS									
GERAIS	ESPECÍFICOS	LT-05	LT-06	LT-07	LT-08	LT-09	LT-10	LT-12	LT-13	LT-14	LT-15
TADO CONSCIENTE DISPOSIÇÃO	VIVACIDADE			↓	↓	↓		↓			↓
	APARÊNCIA GERAL			↓		↓					
VIVACIDADE E DES- JORDENAÇÃO DO ISTEMA MOTOR	ATIVIDADE GERAL	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓		↓	↓
	RESPOSTA AO TOQUE			↓		↓					
	RESP. AO APERTO DA CAUDA			↓		↓	↓	↓			
	MARCHA ANORMAL			↓	↓		↓	↓	↓		
TONO MUSCULAR	TONO DE PATAS			↓							
	TONO DE CORPO	↓		↓	↓						
	FORÇA P/ AGARRAR			↓	↓	↓	↓	↓		↓	↓
VIVACIDADE DO SNC	TREMORES					↓	↓	↓			↓
	CONVULSÃO					↓	↓	↓			↓
	SEDACÃO			↓	↓						
ATIVIDADE AUTÔNOMA	PIOSIS			↓							
	LACRIMAÇÃO					↓	↓				
	RESPIRAÇÃO			↓							

FÊMEAS= ↓ MACHOS= → FÊMEAS & MACHOS= ↓→
 * 01 ANIMAL.
 # 02 ANIMAIS.

Como pode ser observado na Tabela 3, a exposição a quatro produtos promoveu alterações na evolução ponderal. Em alguns casos essa alteração já foi detectada na primeira semana de observação.

TABELA 3 - PESO (g) DE RATOS MACHOS E FÊMEAS EXPOSTOS À MAIOR DOSE ONDE NÃO SE OBSERVOU ÓBITO (A), PELAS VIAS ORAL (O) E CUTÂNEA (C), NOS DIAS 0, 7 E 14 E RESPECTIVAS VARIAÇÕES EM PESO (vp=d14-d0)

CÓDIGO	A(mg/kg)	VIA	SEXO	GRUPO TESTE				GRUPO CONTROLE			
				d0	d7	d14	Vp	d0	d7	d14	Vp
LT-11	2000	C	F	192,33	187,33	190,00	3,67	192,33	190,17	206,83	14,50
				±3,27	±4,18	±5,37	±4,46	±3,33	±4,92	±4,92	±3,06
LT-12	4000	O	H	238,67	246,33	274,33	35,67	238,83	264,50	286,50	47,67
				±10,37	±8,43	±12,53	±11,41	±9,95	±10,09	±12,42	±4,17
LT-13	4000	O	H	225,33	249,83	246,50	21,17	226,33	254,50	265,83	43,50
				±7,97	±11,27	±11,95	±5,31	±5,99	±17,17	±15,43	±17,46
LT-14	1330	C	M	262,33	292,00	278,00	15,67	262,83	272,83	293,67	30,84
				±7,31	±17,65	±11,92	±11,53	±6,85	±8,11	±5,28	±6,18
	1330	C	F	194,67	190,00	204,83	10,17	194,67	200,17	217,17	22,50
				±3,08	±2,83	±5,91	±5,95	±3,01	±7,30	±7,30	±7,76

* p < 0,05
 ** p < 0,01

4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A exposição de ratos a dez produtos, por via oral ou cutânea, produziu, na maior dose onde não se observou óbito, efeitos tóxicos, os quais se expressaram por alterações comportamentais. Parâmetros como diminuição na resposta ao toque, ao aperto da cauda, no tono de patas e na força para agarrar, dificilmente seriam percebidos se não fosse aplicado um "screening" comportamental. Além das alterações comportamentais, a exposição de ratos a quatro desses dez produtos produziu, ainda, alterações estatisticamente significativas nos parâmetros relacionados ao peso dos animais.

O tratamento estatístico das variáveis analisadas para o acompanhamento da evolução ponderal é imprescindível pois possibilita a detecção de efeitos tóxicos que se manifestam, muitas vezes de modo discreto, após longo período de exposição. O produto LT-11, por exemplo, não promoveu alterações comportamentais, entretanto, o grupo teste de fêmeas, quando comparado ao seu respectivo controle, apresentou diminuição no ganho em peso, ao final de 14 dias, estatisticamente significativa, além de alterações no peso absoluto desde a primeira semana de observação.

A análise estatística permitiu ainda, em alguns casos, além da detecção de efeito tóxico mais tardio, o conhecimento da persistência ou da reversibilidade deste efeito dentro do período de observação. O produto LT-12, por exemplo, quando administrado oralmente a machos, produziu, na 1ª semana, uma diminuição estatisticamente significativa no peso absoluto, que não mais se manifestou ao final de 14 dias.

Na maioria dos onze produtos estudados, o valor da DL_{50} foi relativamente alto. Outras considerações, portanto, na classificação toxicológica do produto para efeito de registro, além da avaliação da irritação/corrosão ocular e cutânea e dos resultados dos efeitos sistêmicos, parecem importantes, a exemplo das alterações no comportamento e/ou

evolução ponderal. Essas são muitas vezes detectadas em doses limites, (4000 mg/Kg, por via oral, por exemplo) que poderiam sugerir um grau de segurança para o homem acima do real já que, com certa frequência, a interpretação toxicológica é baseada apenas em dados de mortalidade.

ABSTRACT

Acute toxicity evaluations (short-term) must regard the toxic effects in addition to all gross pathological changes. The LD_{50} is just one of the parameters which may be derived from an acute toxicity test. There are various protocols adopted in Brazil (IBAMA, INCQS, OECD, etc) which disagree about some aspects related to toxic effects measures; therefore in order to contribute to the harmonisation of this guidelines this paper reports some outcomes. Adult male and female rats were exposed, by oral and dermal routes, to 11 pesticides. The animals showed, on 10 products, at the higher dose which didn't cause death, behavior changes and, on 4 products, decreasing gain or loss in body weight. These results demonstrate the need of a careful toxicological judgment since they show up that, to the assesment of the hazard to man, an awareness of this dose may be far more important than the knowlege of a LD_{50} .

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ALMEIDA, R. N., ALMEIDA, J. A., LACET, M. A. A., THOMAS, G. Triagem farmacológica de plantas do nordeste brasileiro. In : SIMPÓSIO DE PRODUTOS NATURAIS, 2., 1983, João Pessoa. Anais... João Pessoa : UFPB, 1983. p. 3.
- 2 CARLINI, E. A. Screening farmacológico de plantas brasileiras. Revista Brasileira de Biologia, São Paulo, v. 32, p. 265-274, jul./dez. 1972.
- 3 EUROPEAN CHEMICAL INDUSTRY ECOLOGY AND TOXICOLOGY CENTRE. Acute toxicity tests, LD_{50} (LC_{50}) determinations and alternatives. Brusseis 1985. 38 p. (ECETOC. monograph. 6).
- 4 FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Técnicas para Controle de Qualidade. Avaliação toxicológica de saneantes domissanitários. Rio de Janeiro, 1985. n.p. (INCQS. Manual Técnico. 5).
- 5 OECD (England). Guidelines for testing of chemicals. England, 1987. Seet. 4, Guidelines 401/402.
- 6 SECRETARIA ESPECIAL DO MEIO AMBIENTE (Brasília, DF). Manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos. Brasília : MNU, 1988.

4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A exposição de ratos a dez produtos, por via oral ou cutânea, produziu, na maior dose onde não se observou óbito, efeitos tóxicos, os quais se expressaram por alterações comportamentais. Parâmetros como diminuição na resposta ao toque, ao aperto da cauda, no tono de patas e na força para agarrar, dificilmente seriam percebidos se não fosse aplicado um "screening" comportamental. Além das alterações comportamentais, a exposição de ratos a quatro desses dez produtos produziu, ainda, alterações estatisticamente significativas nos parâmetros relacionados ao peso dos animais.

O tratamento estatístico das variáveis analisadas para o acompanhamento da evolução ponderal é imprescindível pois possibilita a detecção de efeitos tóxicos que se manifestam, muitas vezes de modo discreto, após longo período de exposição. O produto LT-11, por exemplo, não promoveu alterações comportamentais, entretanto, o grupo teste de fêmeas, quando comparado ao seu respectivo controle, apresentou diminuição no ganho em peso, ao final de 14 dias, estatisticamente significativa, além de alterações no peso absoluto desde a primeira semana de observação.

A análise estatística permitiu ainda, em alguns casos, além da detecção de efeito tóxico mais tardio, o conhecimento da persistência ou da reversibilidade deste efeito dentro do período de observação. O produto LT-12, por exemplo, quando administrado oralmente a machos, produziu, na 1ª semana, uma diminuição estatisticamente significativa no peso absoluto, que não mais se manifestou ao final de 14 dias.

Na maioria dos onze produtos estudados, o valor da DL_{50} foi relativamente alto. Outras considerações, portanto, na classificação toxicológica do produto para efeito de registro, além da avaliação da irritação/corrosão ocular e cutânea e dos resultados dos efeitos sistêmicos, parecem importantes, a exemplo das alterações no comportamento e/ou

evolução ponderal. Essas são muitas vezes detectadas em doses limites, (4000 mg/Kg, por via oral, por exemplo) que poderiam sugerir um grau de segurança para o homem acima do real já que, com certa frequência, a interpretação toxicológica é baseada apenas em dados de mortalidade.

ABSTRACT

Acute toxicity evaluations (short-term) must regard the toxic effects in addition to all gross pathological changes. The LD_{50} is just one of the parameters which may be derived from an acute toxicity test. There are various protocols adopted in Brazil (IBAMA, INCQS, OECD, etc) which disagree about some aspects related to toxic effects measures; therefore in order to contribute to the harmonisation of this guidelines this paper reports some outcomes. Adult male and female rats were exposed, by oral and dermal routes, to 11 pesticides. The animals showed, on 10 products, at the higher dose which didn't cause death, behavior changes and, on 4 products, decreasing gain or loss in body weight. These results demonstrate the need of a careful toxicological judgment since they show up that, to the assesment of the hazard to man, an awareness of this dose may be far more important than the knowledge of a LD_{50} .

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ALMEIDA, R. N., ALMEIDA, J. A., LACET, M. A. A., THOMAS, G. Triagem farmacológica de plantas do nordeste brasileiro. In : SIMPÓSIO DE PRODUTOS NATURAIS, 2., 1983, João Pessoa. Anais... João Pessoa : UFPB, 1983. p. 3.
- 2 CARLINI, E. A. Screening farmacológico de plantas brasileiras. Revista Brasileira de Biologia, São Paulo, v. 32, p. 265-274, jul./dez. 1972.
- 3 EUROPEAN CHEMICAL INDUSTRY ECOLOGY AND TOXICOLOGY CENTRE. Acute toxicity tests, LD_{50} (LC_{50}) determinations and alternatives. Brusseis 1985. 38 p. (ECETOC. monograph. 6).
- 4 FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Técnicas para Controle de Qualidade. Avaliação toxicológica de saneantes domissanitários. Rio de Janeiro, 1985. n.p. (INCQS. Manual Técnico. 5).
- 5 OECD (England). Guidelines for testing of chemicals. England, 1987. Seet. 4, Guidelines 401/402.
- 6 SECRETARIA ESPECIAL DO MEIO AMBIENTE (Brasília, DF). Manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos. Brasília : MNU, 1988.

- 7 SPEID, L. H., LUMLEY, C. E., WALKER, S. R. Harmonization of guidelines for toxicity testing of pharmaceuticals by 1992. Regulatory Toxicology and Pharmacology, United States, v. 12, p. 179-211, dec. 1990.
- 8 WHO (Switzerland). Public domain software for epidemiology and surveillance. 5.01a ver. Atlanta : Centers for Disease Control, 1991.