



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ELKIANE MACEDO RAMA

**AVALIAÇÃO DO RISCO À SAÚDE DECORRENTE DA
EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL E DIETÉTICA AO
AGROTÓXICO CARBENDAZIM NO BRASIL**

Londrina
2013

ELKIANE MACEDO RAMA

**AVALIAÇÃO DO RISCO À SAÚDE DECORRENTE DA
EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL E DIETÉTICA AO
AGROTÓXICO CARBENDAZIM NO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Toxicologia Aplicada à Vigilância Sanitária da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Estefânia Gastaldello
Moreira

Londrina
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

R165a Rama, Elkiane Macedo.

Avaliação do risco à saúde decorrente da exposição ocupacional e dietética ao agrotóxico carbendazim no Brasil / Elkiane Macedo Rama. – Londrina, 2013.
142 f. : il.

Orientador: Estefânia Gastaldello Moreira.

Dissertação (Mestrado Profissional em Toxicologia Aplicada à Vigilância Sanitária)
– Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-
Graduação em Toxicologia Aplicada à Vigilância Sanitária, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Produtos químicos agrícolas – Toxicologia – Teses. 2. Fungicidas – Avaliação de riscos de saúde – Teses. 3. Toxicidade – Testes – Teses. 4. Fungicidas – Resíduos em alimentos – Teses. 5. Saúde e Trabalho – Teses. I. Moreira, Estefânia Gastaldello. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Toxicologia Aplicada à Vigilância Sanitária. III. Título.

CDU 615.9:632.95

ELKIANE MACEDO RAMA

**AVALIAÇÃO DO RISCO À SAÚDE DECORRENTE DA EXPOSIÇÃO
OCUPACIONAL E DIETÉTICA AO AGROTÓXICO CARBENDAZIM NO
BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Toxicologia Aplicada à Vigilância Sanitária da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Estefânia Gastaldello
Moreira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Mônica Maria Bastos Paoliello
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Daniela Cristina Ceccatto Gerardin
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 18 de fevereiro de 2013.

*A Deus, ao meu querido esposo
Rodrigo e aos meus pais,
Gilmar e Maria José, pois sem
eles, nada seria possível.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Estefânia Gastaldello Moreira pela confiança depositada em mim, pela paciência, pela seriedade e dedicação, assim como pelas valiosas contribuições. Além de orientadora, sem dúvida, uma amiga que sempre admirarei.

À Profa. Dra. Daniela Cristina Ceccatto Gerardin por colaborar para o desenvolvimento deste trabalho com importantes contribuições como membro da Banca Examinadora.

À Profa. Dra. Mônica Maria Bastos Paoliello por viabilizar este Programa de Mestrado, bem como pelos subsídios fornecidos como membro da Banca Examinadora.

A todos os professores que participaram deste Programa de Mestrado, e, em especial, à Profa. Dra. Elaine Faustmann por todos os valiosos ensinamentos sobre avaliação de risco.

Ao Dr. Luiz Cláudio Meirelles e aos diretores da Anvisa pela viabilização do curso de Mestrado Profissional em Toxicologia Aplicada à Vigilância Sanitária e pela concessão da Licença para Capacitação para elaboração dessa dissertação.

Aos meus amigos da Gerência-Geral de Toxicologia e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

E especialmente ao meu querido esposo Rodrigo, pela paciência, pelo constante apoio e incentivo na realização deste trabalho, aos meus pais, Gilmar e Maria José e ao meu irmão, Glauber, pelo apoio incondicional em mais essa conquista.

*"It is a capital mistake to theorise before one has data. Insensibly one begins to twist facts to suit theories instead of theories to suit facts."
(Arthur Conan Doyle, de Sherlock Holmes)*

RAMA, Elkiene Macedo. **Avaliação do risco à saúde decorrente da exposição ocupacional e dietética ao agrotóxico carbendazim no Brasil.** 2013. 142f. Dissertação (Mestrado Profissional em Toxicologia Aplicada à Vigilância Sanitária) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2013.

RESUMO

O carbendazim é um agrotóxico fungicida do grupo químico benzimidazol e está entre os dez agrotóxicos mais comercializados no Brasil. O modo de ação desse fungicida consiste na inibição da polimerização dos microtúbulos, por interagir com as unidades de β -tubulina. As tubulinas são estruturas muito conservadas nas mais diferentes espécies de eucariotos e têm um papel fundamental na divisão celular, sendo responsáveis pela segregação cromossômica, bem como pela organização, transporte e posicionamento de organelas, como o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi. Pela sua alta conservação, é esperado que os inibidores de polimerização de microtúbulos atuem negativamente nas mais diferentes espécies. Os resultados mais recentes do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) revelaram que o carbendazim foi o principal agrotóxico com o uso irregular, tanto por estar presente em culturas não autorizadas, como em quantidades de resíduos muito acima daquelas permitidas. Diversas são as evidências de que o carbendazim causa toxicidade reprodutiva e, recentemente, que poderia atuar como um desregulador endócrino. O objetivo deste estudo foi avaliar o risco à saúde humana decorrente da exposição ocupacional agrícola e dietética ao carbendazim. Para a identificação de perigo e avaliação dose-resposta, foi feita uma revisão bibliográfica da literatura, sem restrição temporal, na base de dados PubMed e no relatório do IPCS/OMS, para avaliação da exposição ocupacional foram utilizados o PHED e o SeedTropex e, por fim, para avaliação dietética foram utilizados os valores de limites máximos de resíduos (LMRs) para cada cultura autorizada e os dados de consumo alimentar do IBGE. Os resultados da avaliação ocupacional da exposição ao carbendazim mostraram por meio das margens de exposição (MOE) calculadas, que a grande maioria dos cenários de exposição apresentaram riscos inaceitáveis. Apenas três cenários apresentaram riscos aceitáveis: a atividade combinada (Misturador/Abastecedor) sendo que a segurança se dá apenas com a utilização de sistema fechado e equipamento de proteção individual (EPI) completo, uma realidade pouco usual no Brasil e, quando o trabalhador exerce apenas uma função, de aplicação com trator com barra de pulverização em cabine fechada (EPI intermediário ou completo), o que também não é realidade comum do Brasil. O risco decorrente da exposição ocupacional durante o tratamento de sementes e pela ingestão alimentar excederam os valores seguros. Ademais, a avaliação da toxicidade frente aos estudos levantados revelou que o carbendazim foi carcinogênico para duas linhagens de camundongos, apresentou efeitos tóxicos reprodutivos, efeitos sobre o desenvolvimento embrionário, desregulação endócrina, neurotoxicidade aguda e imunotoxicidade. Assim, a presente avaliação de risco mostra que esse agrotóxico apresenta riscos inaceitáveis para as condições de uso brasileiras. Ainda, considerando a Lei nº 7802/1989 e os efeitos tóxicos descritos, a manutenção do registro deste fungicida contraria o arcabouço legal brasileiro ora vigente.

Palavras-chave: Carbendazim. Toxicidade reprodutiva. Desregulação endócrina. Avaliação do risco. Exposição ocupacional. Exposição dietética.

RAMA, Elkiene Macedo. **Human Health Risk Assessment of Carbendazim due to Occupational and Dietary Exposures in Brazil**. 2013. 142f. Dissertação (Mestrado Profissional em Toxicologia Aplicada à Vigilância Sanitária) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2013.

ABSTRACT

Carbendazim is a fungicide from the chemical group of benzimidazole and is one of the top ten largest selling pesticides in Brazil. Its mode of action consists in binding to the β -tubuline molecules, disrupting the normal formation of microtubules. The tubulin structures are highly conserved in different eukaryotic species and play an essential role in cell division, being responsible for chromosome segregation, during mitosis and meiosis, and the organization, transport and placement of organelles, such as endoplasmic reticulum and Golgi complex. Since the high conservation of these structures, it is expected that the microtubule polymerization inhibitors may act negatively in different species. The latest results of PARA (Brazilian Pesticide Monitoring Program) revealed that carbendazim was the most irregularly used pesticide, being detected not only in unauthorized crops but also well above the allowed residues quantities. There are many evidences that carbendazim causes reproductive toxicity and recently, that it could act as an endocrine disrupter. The aim of this study was to evaluate the human health risk resulting from occupational and dietary exposures to carbendazim. For the hazard identification and dose-response evaluation, a literature review was conducted, without time restriction, in the PubMed database and the report of IPCS/WHO; for occupational exposure assessment PHED and SeedTropex were used and finally, to evaluate dietary exposure the values were taken from MRLs (Maximum Residue Levels) for each authorized crop and food consumption data from the IBGE (The Brazilian Institute of Geography and Statistics). The results of occupational exposure show that most of the exposure scenarios exhibited unacceptable risks. Only three scenarios resulted in acceptable risk: the combined activity (Mixing/Loading) using all the recommended PPE (Personal Protection Equipment) and closed system, a very unusual scenario in Brazil, and when the worker has only the activity of application with ground boom tractor and closed cabin (intermediate or complete PPE), which is also very uncommon in Brazil. The risk resulting from occupational exposure during treatment of seeds and food intake are unacceptable. Moreover, the evaluation of the hazard revealed that carbendazim was carcinogenic to two strains of mice, induced reproductive and developmental toxicity, endocrine disruption, acute neurotoxicity as well as immunotoxicity. The present risk assessment shows that this pesticide presents unacceptable risks to the Brazilian conditions of use. Moreover, taking into account the Federal Law of pesticides nº 7802/1989, the maintenance of its registration contradicts the Brazilian legal framework.

Key words: Carbendazim. Reproductive toxicity. Endocrine disruption. Risk assessment. Occupational exposure. Dietary exposure.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do carbendazim.....	18
Figura 2 – Principais ingredientes ativos com uso irregular detectados em amostras insatisfatórias.....	21
Figura 3 – Representação esquemática dos artigos gerados pela revisão no PubMed.....	62
Figura 4 – Representação esquemática do modo de ação do carbendazim em cada etapa da espermatogênese, decorrente de sua interação com os microtúbulos	114
Figura 5 – Representação esquemática do modo de ação do carbendazim, decorrente de sua ação endócrina	117

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Cálculo das estimativas de exposição não definidas pelo PHED	51
Quadro 2 – Culturas autorizadas para o carbendazim e respectivos LMRs	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Estudos de toxicidade aguda em animais de laboratório	69
Tabela 2	– Estudos de genotoxicidade conduzidos com o carbendazim	71
Tabela 3	– Toxicidade geral após administração repetida subcrônica de carbendazim	77
Tabela 4	– Toxicidade crônica e carcinogenicidade do carbendazim	80
Tabela 5	– Toxicidade reprodutiva decorrente da exposição ao carbendazim	85
Tabela 6	– Toxicidade sobre o desenvolvimento embriofetal decorrente da exposição ao carbendazim	92
Tabela 7	– Estudos para avaliar a atividade desreguladora endócrina do carbendazim	97
Tabela 8	– Exposição diária pela via dérmica (EDD) e inalatória (EDI) nos diferentes cenários de exposição	106
Tabela 9	– Exposição total pelas vias dérmica e inalatória gerada pelo SeedTropex®	107
Tabela 10	– Determinação da Margem de Exposição (MOE) total nos diferentes cenários de exposição	120
Tabela 11	– Cálculo da ingestão diária máxima de carbendazim para culturas autorizadas no Brasil e seu impacto na IDA (em porcentagem)	124

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ab	Atividade de Abastecedor
ACGIH	<i>American Conference of Governmental Industrial Hygienists</i>
AHP	<i>Amynohydroxyphenazine</i> (aminohidroxifenazina)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOEL	<i>Acceptable Operator Exposure Level</i> (nível de exposição aceitável ao operador)
Ap	Atividade de Aplicador
BPL	Boas Práticas de Laboratório
BMD	<i>Benchmark Dose</i> (dose de Benchmark)
BMR	<i>Benchmark Response</i> (resposta de Benchmark)
CHO	<i>Chinese hamster ovary cell</i> (células de ovário de hamster chinês)
CL ₅₀	Concentração Letal para 50% dos animais
CRfD	<i>Chronic Reference Dose</i> (Dose de Referência Crônica)
DAP	<i>Diaminophenazine</i> (diaminofenzaina)
DL ₅₀	Dose Letal para 50% dos animais
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDD	Estimativa da Exposição Diária pela Via Dérmica
EDI	Estimativa da Exposição Diária pela Via Inalatória
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i> (Agência de Proteção Ambiental Norte Americana)
EPI	Equipamento de Proteção Individual
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Agência Reguladora de Medicamentos e Alimentos Norte Americana)
FI	Fatores de Incerteza
FIFRA	<i>Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act</i>
FQPA	<i>Food Quality Protection Act</i>
FSH	Hormônio Folículo-Estimulante
g	grama
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofina

IBAMA	Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDA	Ingestão Diária Aceitável
IPCS	<i>International Programme of Chemical Safety</i>
LH	Hormônio Luteinizante
LMR	Limite Máximo de Resíduos
LOAEL	<i>Lowest observed adverse effect level</i> (menor dose com efeitos adversos)
LOEL	<i>Lowest observed effect level</i> (menor dose com efeitos)
M	Atividade de Misturador
mg/kg p.c./dia	Miligramas de ingrediente ativo por quilograma de peso corpóreo por dia
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MDT	Máxima Dose Tolerada
MOA	<i>Mode of Action</i> (Modo de Ação)
MOE	<i>Margin of Exposure</i> (Margem de Exposição)
NOAEL	<i>No observed adverse effect level</i> (maior dose sem efeitos adversos)
NOEL	<i>No observed effect level</i> (maior dose sem efeitos)
OECD	<i>Organization for Economic Cooperation and Development</i>
p.c	Peso Corpóreo
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PRL	Prolactina
POF	Plano de Orçamento Familiar
ppm	Partes por milhão
PHED	<i>Pesticides Handlers Exposure Database</i>
REA	Relação Estrutura-Atividade
RfD	<i>Reference Dose</i> (Dose de Referência)
RNA	Ácido Ribonucleico
TD	Toxicodinâmica
TK	Toxicocinética

TQ	Timidina Quinase
TSH	Hormônio Estimulador da Tireóide
UED	Unidade de Exposição Dérmica
UEI	Unidade de Exposição Inalatória
WHO/OMS	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial da Saúde)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	16
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA DA AVALIAÇÃO DO RISCO	22
2.1	IDENTIFICAÇÃO DO PERIGO	23
2.2	AVALIAÇÃO DOSE-RESPOSTA	42
2.3	AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO	47
2.4	CARACTERIZAÇÃO DO RISCO.....	54
3	OBJETIVO GERAL	58
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	58
4	MÉTODOS	59
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.1	LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO.....	62
5.2	IDENTIFICAÇÃO DO PERIGO E AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO DOSE-RESPOSTA DO CARBENDAZIM	63
5.2.1	Identidade Química e Propriedades Físico-Químicas	63
5.2.2	Impurezas de Síntese.....	64
5.2.3	Toxicocinética	64
5.2.3.1	Absorção	64
5.2.3.2	Distribuição.....	65
5.2.3.3	Biotransformação	66
5.2.3.4	Eliminação e excreção.....	68
5.2.4	Toxicidade Aguda.....	68
5.2.5	Genotoxicidade.....	69
5.2.6	Toxicidade Subcrônica	76
5.2.7	Toxicidade Crônica e Carcinogenicidade	79
5.2.8	Toxicidade Reprodutiva.....	84
5.2.9	Toxicidade sobre o desenvolvimento embrionário.....	91
5.2.10	Desregulação Endócrina	96
5.2.11	Neurotoxicidade.....	100

5.2.12	Imunotoxicidade	100
5.3	AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO AO CARBENDAZIM.....	100
5.3.1	Exposição Ocupacional	101
5.3.2	Exposição Dietética	107
5.4	CARACTERIZAÇÃO DO RISCO AO CARBENDAZIM.....	109
5.4.1	Principais Aspectos da Toxicidade	109
5.4.2	MOE nos Diferentes Cenários de Exposição Ocupacional e o Risco durante o Tratamento de Sementes	119
5.4.3	Ingestão Diária Aceitável (IDA) e Estimativa de Risco para o Cenário de Exposição Dietética	123
5.4.4	Discussão sobre a Caracterização do Risco	124
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	129
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Durante décadas, a *American Conference of Governmental Industrial Hygienists* (ACGIH) e a *Food and Drug Administration* (FDA) têm estabelecido valores limites para a exposição ocupacional a agentes químicos e ingestão diária de resíduos de agrotóxicos e aditivos químicos alimentares. Em 1947, foi publicado o *Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act* (FIFRA) por meio do qual se tornou obrigatório o registro, junto ao Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, de produtos contendo agrotóxicos anteriormente à sua comercialização para uso doméstico (ROSS et al., 2001). Em 1958, o Congresso Americano apresentou à FDA a emenda Delaney (elaborada pelo congressista James Delaney, de Nova York), segundo a qual se proibia a adição de aditivos químicos em alimentos quando esses causassem câncer em animais ou humanos. De forma pragmática, essa nova política possibilitou que fontes alimentares que possuíssem níveis não detectáveis desses aditivos fossem consideradas “seguras”. Como os avanços da química analítica revelaram que os níveis “não detectáveis” não eram equivalentes a “ausentes”, as agências regulatórias foram forçadas a estabelecerem “níveis de tolerância” bem como “níveis que produzissem riscos aceitáveis”. As metodologias para análise de risco foram desenvolvidas sob este contexto, na década de 70 (ALBERT, 1994). Neste mesmo ano foi criada a *United States Environmental Protection Agency* (EPA). Em 1972, o Congresso Americano publicou uma emenda ao FIFRA que estabeleceu que os produtores de agrotóxicos deveriam demonstrar que o uso do produto não causaria efeitos adversos à saúde humana nem ao ambiente (ROSS et al., 2001).

Juntamente com as agências regulatórias federais, o Escritório de Ciências e Tecnologia da Casa Branca desenvolveu um arcabouço para apoiar as decisões regulatórias (CALKINS et al., 1980). O Conselho de Pesquisa Nacional dos Estados Unidos detalhou quatro passos para a avaliação do risco: identificação do perigo, avaliação dose-resposta, análise da exposição e caracterização do risco, no documento *Risk Assessment in the Federal Government: Managing the Process*,

conhecido como “livro vermelho”. Inicialmente, tal arcabouço objetivou avaliar o risco de desenvolvimento de câncer mas, posteriormente, outros *endpoints* têm sido avaliados por meio da mesma metodologia (NRC, 1983).

No Brasil, a legislação vigente que define o termo agrotóxico foi publicada em 1989. Os agrotóxicos e afins foram definidos como sendo produtos e agentes obtidos por processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas, e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais. Apresentam como finalidade alterar a composição da flora ou da fauna a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos. Além disso, também podem ser substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (BRASIL, 1989).

Os agrotóxicos podem ser divididos, de acordo com sua finalidade agrônômica (classe de uso), em: herbicidas, inseticidas, fungicidas, acaricidas, bactericidas, nematicidas, reguladores de crescimento, espalhantes adesivos, dentre outros. Por sua vez, para cada classe de uso, os agrotóxicos são subdivididos de acordo com o grupo químico a que eles pertençam (BRASIL, 2002).

Assim como nos EUA, no Brasil os agrotóxicos só são autorizados quando seu uso não cause riscos inaceitáveis à saúde humana. Cabe aos órgãos federais estabelecerem diretrizes e exigências para minimizar os riscos decorrentes do uso de agrotóxicos e ainda, especificamente ao Ministério da Saúde, realizar a avaliação toxicológica e determinar níveis seguros de exposição à saúde humana. Além disso, no Brasil, a legislação veta o registro de agrotóxicos com características teratogênicas, carcinogênicas, mutagênicas, que provoquem distúrbios hormonais ou danos ao aparelho reprodutor, independentemente dos níveis de exposição (BRASIL, 1989, 1992, 2002).

A autorização de uso de um agrotóxico pela Anvisa para uma determinada cultura depende basicamente de dois fatores: 1) a empresa detentora de registro do agrotóxico em questão ter interesse em desenvolver os estudos de resíduos necessários para a autorização daquela cultura e, 2) a partir desses estudos, seja verificado que o resíduo presente no alimento não gera riscos inaceitáveis à saúde humana.

O agrotóxico carbendazim pertence ao grupo químico benzimidazol e é um fungicida sistêmico autorizado no Brasil para as culturas de algodão, arroz, citros, feijão, maçã, milho, soja e trigo. Sua estrutura química está apresentada na Figura 1 (ANVISA, 2012).

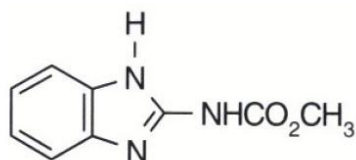


Figura 1: Estrutura química do carbendazim

A primeira monografia publicada pela então Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) do Ministério da Saúde autorizando o uso do carbendazim no Brasil data de 1985 (BRASIL, 1985).

Segundo o relatório de comercialização de produtos agrotóxicos publicado pelo Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), o carbendazim foi o 10º ingrediente ativo de agrotóxico mais comercializado no Brasil no ano de 2009 (IBAMA, 2010).

O carbendazim, bem como outros agrotóxicos do grupo benzimidazol, são inibidores específicos da polimerização dos microtúbulos e agem ligando-se à subunidade heterodimérica da molécula de tubulina. Esse mecanismo de ação foi comprovado pela administração de um estabilizador de microtúbulos (D_2O), que reverteu os efeitos sobre a polimerização dos microtúbulos causados pelo carbendazim. É por esse mecanismo que o carbendazim age inibindo a divisão celular nos fungos (ação fungicida), bem como em diversos outros organismos eucariotos (DAVIDSE, 1986; HOWARD; AIST, 1980). Em *Saccharomyces cerevisiae* também foi demonstrado que o carbendazim inibe a polimerização de microtúbulos, levando à ausência desses componentes no citoplasma, bem como nas fibras do fuso mitótico (QUINLAN et al., 1980)

Posteriormente, esse mecanismo de ação do carbendazim foi melhor detalhado. A inibição da polimerização dos microtúbulos foi atribuída à interação do carbendazim à β -tubulina, no resíduo de tirosina 167, o Tyr-167, em *Saccharomyces cerevisiae* (LI; KATIYAR; EDLIND, 1996). Ainda, um outro estudo feito em ratos detalhou que o carbendazim inibe a ligação da guanosina trifosfato

(GTP) à β -tubulina, sugerindo que o carbendazim interfira nos eventos iniciais da polimerização dos microtúbulos (WINDER; STRANDGAARD; MILLER, 2001).

Os microtúbulos exercem papéis cruciais para as células. São cilindros protéicos, formados por heterodímeros, que consistem de subunidades de tubulinas denominadas de α -tubulina e β -tubulina, que se interagem por ligações não-covalentes. Cada monômero α e β possui um único sítio de ligação a uma molécula de GTP. No monômero de α -tubulina a ligação com GTP nunca é hidrolisada ou alterada, enquanto que no monômero de β -tubulina, o nucleotídeo pode estar tanto na forma de GTP como de GDP (guanosina difosfato), e essa hidrólise do GTP a GDP é essencial na dinâmica de polimerização e despolimerização dos microtúbulos (ALBERTS et al., 2002).

Os microtúbulos têm um papel fundamental para divisão celular, sendo responsáveis pela segregação cromossômica, tanto nos eventos de mitose, como de meiose. Além disso, são responsáveis pela organização, transporte e posicionamento de organelas, como o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi (ALBERTS et al., 2002).

As tubulinas são estruturas bastante conservadas durante a evolução dos eucariotos. Estão presentes em todos os eucariotos e 75% da sequência de aminoácidos de fungos e humanos é idêntica. A maior parte da variação da sequência está na porção C-terminal, o que afeta predominantemente a associação dos microtúbulos a proteínas acessórias e não à polimerização dos microtúbulos (ALBERTS, et al., 2002). Assim, é esperado que substâncias que interfiram na polimerização do microtúbulos tenham esse efeito nos mais diferentes organismos eucarióticos, devido à alta conservação dessas estruturas nas diferentes espécies.

Há trabalhos que mostram que o carbendazim é um inibidor da polimerização de microtúbulos parecido com a colchicina (*colchicina-like*) e que esse mecanismo molecular é responsável por efeitos reprodutivos durante a espermatogênese de ratos (MARKELEWICZ; HALL; BOEKELHEIDE, 2004).

Ainda, há trabalhos mais recentes que indicam efeitos reprodutivos adversos à saúde, bem como um potencial efeito endócrino do carbendazim. Ele induz a enzima aromatase, uma enzima microsomal responsável pela aromatização de andrógenos a estrógenos (MORINAGA et al., 2004). No caso desses tipos de

efeitos, se confirmados, tal ingrediente ativo seria impedido de registro de acordo com o Art. 3º, parágrafo 6º, inciso “d” da Lei nº 7.802/1989 (BRASIL, 1989). Considerando os efeitos reprodutivos e endócrinos, há ainda demanda do Ministério Público Federal para incluir o carbendazim na próxima reavaliação toxicológica da Anvisa, com o intuito de revisão dos estudos toxicológicos e banimento da molécula no país caso o risco à saúde seja inaceitável.

Em 2002, já houve uma reavaliação toxicológica do carbendazim, feita pela Anvisa. Nessa ocasião, esse agrotóxico não foi objeto de proibição, mas sim de medidas de restrição de uso, como por exemplo, a proibição da aplicação por equipamento manual ou costal, restrição de culturas autorizadas e de doses de aplicação (ANVISA, 2002).

Além disso, o relatório mais recente do Programa de Monitoramento de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) da Anvisa aponta o carbendazim como o principal agrotóxico com o uso irregular, tanto por estar presente em culturas não autorizadas, como em quantidades de resíduos muito acima daquelas permitidas (Figura 2). Foram 176 amostras insatisfatórias, sendo destas 90 amostras de pimentão (cultura não autorizada) e as demais das culturas de abacaxi, alface, beterraba, couve, mamão, morango e repolho (ANVISA, 2011). Além dos resíduos nesses alimentos serem irregulares, esse resultado também indica que as medidas adotadas pela Anvisa, durante a reavaliação toxicológica de 2002, não estão sendo cumpridas, pois muitas dessas culturas têm como principal tipo de aplicação a costal ou manual.

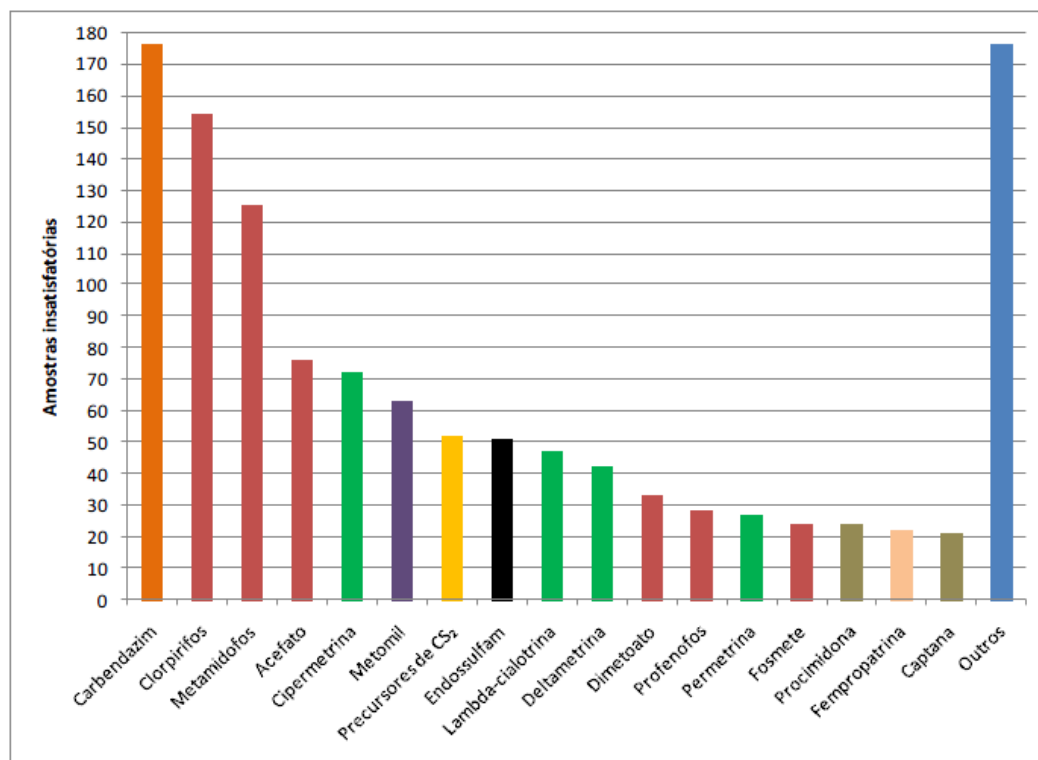


Figura 2 – Principais ingredientes ativos com uso irregular detectados em amostras insatisfatórias

Fonte: PARA, 2010

Nesse contexto, considerando a importância de seu uso como fungicida, o amplo uso irregular em culturas não autorizadas ou em quantidades acima das permitidas, e as suspeitas de riscos adversos à saúde, nessa dissertação foi conduzida uma avaliação do risco à saúde humana do carbendazim, decorrente da exposição ocupacional agrícola e dietética nos cenários brasileiros, principalmente no que se refere aos efeitos reprodutivos e à desregulação endócrina.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA DA AVALIAÇÃO DO RISCO

A avaliação do risco é um dos três componentes da análise do risco, sendo os outros dois o gerenciamento do risco e a comunicação do risco. A avaliação do risco é o componente científico da análise; o gerenciamento do risco, diferentemente da avaliação, tem um componente sócio-econômico, responsável por verificar as alternativas para a tomada de decisão baseadas na avaliação do risco; já a comunicação do risco consiste na troca de informações e opiniões sobre o risco, suas percepções entre os avaliadores, consumidores e todas as partes interessadas, incluindo a explicação dos resultados da avaliação do risco e das considerações feitas para o gerenciamento do risco e a tomada de decisão (WHO, 2009).

A avaliação do risco é uma caracterização científica sistematizada de potenciais efeitos adversos à saúde resultantes da exposição humana a agentes ou situações perigosas (NRC, 1983). Risco é definido como probabilidade de ocorrência de um evento adverso. O termo perigo, por sua vez, refere-se às propriedades tóxicas intrínsecas do agente. A avaliação do risco requer informações qualitativas acerca do peso das evidências levantadas e sua natureza, avaliação quantitativa da exposição, fatores de susceptibilidade do exposto e magnitude potencial do risco, bem como descrição das incertezas nas estimativas e conclusões (NRC, 1993).

O principal desafio para a avaliação do risco é trabalhar segundo sua multidisciplinaridade, indispensável para demonstrar a plausibilidade biológica e a significância clínica das conclusões provenientes de estudos epidemiológicos, estudos de longa e curta duração em animais, estudos *in vitro* ou estudos acerca da relação estrutura-atividade (FAUSTMANN; OMMEN, 2001). Biomarcadores de exposição, de efeito ou de susceptibilidade individual podem correlacionar a presença de um agente químico em um ambiente com a resposta do sujeito exposto. Estudos mecanísticos acerca da ação de agentes químicos podem ajudar a entender a ocorrência de um determinado efeito (*endpoint*) durante um bioensaio. Por meio de um melhor entendimento dos mecanismos de toxicidade dos agentes

químicos bem como da susceptibilidade individual, consegue-se ampliar a proteção aos subgrupos mais susceptíveis (FAUSTMANN; OMMEN, 2001).

No que diz respeito à avaliação qualitativa do risco, deve-se levar em consideração a concordância (entre diferentes estudos toxicológicos) e consistência (entre espécies e órgãos alvos) dos dados encontrados, bem como a adequabilidade do experimento para a detecção do efeito (*endpoint*) de interesse (FAUSTMANN; OMMEN, 2001).

Conforme proposto pelo Conselho de Pesquisa Nacional dos Estados Unidos, em 1983, a avaliação quantitativa do risco tem quatro elementos: a identificação do perigo, a avaliação dose-resposta, a avaliação da exposição e a caracterização do risco (NRC, 1983).

2.1 IDENTIFICAÇÃO DO PERIGO

O primeiro passo na avaliação do risco é a identificação do potencial efeito danoso à saúde humana em decorrência da exposição a um agente químico (EPA, 2007).

Para a identificação do perigo, deve-se proceder a uma revisão de todos os dados de toxicidade disponíveis. As evidências devem ser avaliadas com o uso de critérios de causalidade da associação, ou procedimentos similares que permitam avaliar o peso das mesmas. Tais dados são provenientes de estudos de relação estrutura-atividade, estudos *in vitro*, estudos com animais ou epidemiológicos. Se o agente sob estudo não apresentar perigo, então não se deve proceder a avaliação de risco (SAMET, 2004).

Dois princípios fundamentais permeiam todos os testes de toxicidade animal. Primeiro, o efeito induzido por um determinado toxicante em animais de laboratórios, quando apropriadamente qualificado, também deve ocorrer em seres humanos. Com relação à dose por superfície de área corpórea, os efeitos tóxicos em humanos são, frequentemente, de mesma magnitude que aqueles apresentados por animais experimentais. Entretanto, quando se utiliza dose por peso corpóreo, assume-se que os seres humanos são mais vulneráveis que os animais experimentais, e convencionalmente, adota-se um fator de vulnerabilidade de aproximadamente 10. O segundo princípio é que exposição de animais em estudos

experimentais a altas doses do toxicante é um método necessário e válido para identificação do perigo para humanos. Esse princípio é baseado no conceito de dose-resposta quantal, pelo qual a incidência de um efeito em uma população é maior quando a dose ou exposição ao toxicante aumenta. Considerações práticas no desenho experimental dos estudos toxicológicos requerem o uso de uma amostra pequena de animais quando comparado ao tamanho da população humana sob risco. Assim, para a obtenção de resultados estatisticamente válidos faz-se necessário o uso de doses relativamente altas para que o evento esperado seja detectado. Entretanto, o uso de altas doses gera problemas de interpretação, principalmente quando a resposta obtida não ocorre em exposição a baixas doses. Assim, é de extrema importância considerar os mecanismos moleculares, bioquímicos e celulares responsáveis pela resposta toxicológica quando da extrapolação para baixas doses e interespecies (EATON; KLAASSEN, 2001).

É importante frisar que os testes de toxicidade não são desenhados para demonstrar que um agente químico é seguro, mas para caracterizar seus efeitos tóxicos. Não há um conjunto pré-estabelecido de testes toxicológicos para se testar cada nova molécula a ser introduzida no mercado. Dependendo do seu uso, dos efeitos tóxicos produzidos por estruturas análogas assim como dos efeitos tóxicos específicos do toxicante sob estudo, um conjunto de testes toxicológicos pode ser selecionado (EATON; KLAASSEN, 2001).

Entretanto, a FDA, EPA e a *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD) desenvolveram padrões de boas práticas laboratoriais (BPL). Tais guias devem ser seguidos quando testes de toxicidade são conduzidos para embasar o registro de um novo produto (AULETTA, 1995; HAYES, 2001).

Os principais estudos para a identificação do perigo serão discutidos a seguir.

a. *Estudos de relação estrutura-atividade (REA)*

A estrutura do agente químico, sua solubilidade, estabilidade, sensibilidade a mudanças de pH, eletrofilicidade, volatilidade e reatividade química são informações importantes antes mesmo da condução de testes toxicológicos e podem fornecer alertas para o delineamento apropriado dos estudos para a

identificação do perigo. Os estudos de REA podem determinar a necessidade de condução de algum estudo especial relacionado àquela preocupação toxicológica de interesse (WHO, 2009).

Historicamente, certas estruturas moleculares chave fornecem ao regulador indícios sobre qual o tipo de perigo potencial. Por exemplo, oito de quatorze carcinógenos ocupacionais possuem em sua estrutura um grupamento amina aromática. Algumas estruturas químicas como N-nitroso ou aminas aromáticas, estruturas amino azo e núcleos fenantrenos apresentam potencial efeito carcinogênico. A limitação dos bancos de dados restringe a análise de REA a apenas algumas classes químicas (FAUSTMANN; OMMEN, 2001).

b. Estudos de Toxicocinética

O termo toxicocinética descreve o movimento da substância no corpo e relaciona a absorção a partir do sítio de administração, sua distribuição pela circulação geral para e dos tecidos e, sua eliminação, que ocorre tanto pela biotransformação como pela excreção da substância inalterada (WHO, 2009).

Os estudos de toxicocinética ou ADME (absorção, distribuição, metabolização ou biotransformação e excreção) fazem parte da identificação do perigo e são fundamentais para o desenho de estudos de toxicodinâmica apropriados, bem como para a interpretação dos resultados em relação ao mecanismo ou modo de ação da substância. Historicamente, esses estudos são feitos com a substância radiomarcada e usam técnicas não-específicas de mensuração da radioatividade total, combinada a métodos de separação, como cromatografia, para identificar os constituintes radiomarcados nas diferentes amostras biológicas. Além disso, fornecem uma descrição matemática de concentração plasmática ao longo do tempo, a partir da exposição (WHO, 2009).

A absorção é o processo pelo qual a substância é transferida do sítio de administração para a circulação. As principais vias pelas quais os humanos estão expostos às substâncias químicas são os alimentos ou água de beber, a inalação e através da pele, sendo que essas duas últimas são as de maior relevância para exposição ocupacional aos agrotóxicos (WHO, 2009). Para absorção oral de um xenobiótico são necessárias duas etapas: atravessar a membrana do epitélio

gastrointestinal, geralmente por via transcelular ou paracelular, acessando a circulação sistêmica e passar pelo sistema porta hepático intacto, alcançando a circulação sistêmica. Caso haja a biotransformação antes de alcançar a circulação sistêmica, diz-se que houve eliminação pré-sistêmica ou efeito de primeira passagem. Ainda, a absorção depende da permeabilidade da substância pelas membranas, da sua solubilidade, da área de superfície, da circulação local, do pH do local da absorção, do pKa e concentração do xenobiótico e das suas propriedades físico-químicas, como por exemplo, o tamanho das partículas (STORPIRTIS, 2011).

A distribuição é o processo pelo qual a substância ou seus metabólitos presentes na circulação são transferidos para os diversos tecidos e órgãos e, vice-versa, dos tecidos e órgãos para a circulação (WHO, 2009). A distribuição depende dos fluxos sanguíneo e linfático nos diferentes órgãos, da ligação a proteínas plasmáticas, das diferenças de pH nos vários tecidos e da lipossolubilidade, e, o equilíbrio da distribuição é atingido mais rapidamente em tecidos de alta perfusão (coração, fígado e pulmões, por exemplo) e lentamente naqueles pouco irrigados (OGA, 2003).

A biotransformação ou metabolização é o processo pelo qual a substância é alterada estruturalmente, originando moléculas que serão eliminadas do corpo (WHO, 2009). Essas reações enzimáticas são didaticamente divididas em duas fases: a) Fase I, que corresponde a reações não sintéticas catalíticas por enzimas microsossomais que envolvem oxidação, redução e hidrólise e, b) Fase II, com reações sintéticas intermediadas por enzimas citossólicas envolvendo conjugação ou síntese (STORPIRTIS, 2011). Ambas as fases I e II geralmente geram produtos de menor toxicidade e mais fáceis de eliminar, no entanto, podem gerar espécies químicas mais reativas, de toxicidade maior que a molécula original, chamados de metabólitos ativos (WHO, 2009).

A excreção descreve os processos envolvidos na eliminação da substância, pela urina, fezes ou ar exalado, por exemplo (WHO, 2009).

c. *Estudos de genotoxicidade*

Uma ampla variedade de testes, entre os quais estão os ensaios diretos ou indiretos de mutagenicidade, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, têm sido

desenvolvidos e utilizados na identificação de potenciais carcinógenos. Entretanto, virtualmente todos esses métodos são de uso limitado no estabelecimento de estimativas diretas do risco que determinados toxicantes apresentam à população, haja vista que as células neoplásicas apresentam ubíquas variedades de mutações. Em função da maioria dos agentes carcinogênicos serem biotransformados em mutágenos, estabelece-se a importância das mutações no desenvolvimento de processos neoplásicos. Por isso, ensaios, *in vitro* e *in vivo*, para a detecção de mutagenicidade foram desenvolvidos para a identificação de potenciais agentes carcinogênicos capazes de induzir mutações no DNA das células (PITOT; DRAGAN, 2001).

c.1 Teste de Ames

Trata-se de ensaio de mutagenicidade, desenvolvido por Bruce Ames e colaboradores (1975) em que células bacterianas, originalmente cepas de *Salmonella typhimurium*, deficientes no processo de reparo de DNA e desprovidas da habilidade de crescimento na ausência do aminoácido histidina são tratadas com diferentes doses do composto sob teste em um meio de cultura desprovido de histidina. Somente ocorrerá crescimento bacteriano no caso de ocorrência de mutação capaz de reverter a dependência total da célula por histidina (fenótipo histidina positivo) (AMES et al., 1975).

Considerando que as bactérias diferem dos mamíferos na capacidade de biotransformação de toxicantes, adiciona-se um sistema de biotransformação de toxicantes no meio de cultura. Frequentemente utiliza-se o sobrenadante 9000 G (S9), resultante da centrifugação de homogenatos de fígado de rato tratados com indutores de citocromo P-450, como Aroclor 1254 em combinação com sistemas regeneradores de NADPH (AMES et al., 1975).

Diferentes linhagens de *Salmonella* foram geradas para permitir a detecção de mutações pontuais (TA100, TA1535) e mutações capazes de alterar o códon e conseqüentemente a transcrição da fita de RNA mensageiro (TA98, TA1537, TA1538). Normalmente, cinco doses do composto teste são utilizadas, juntamente com um controle negativo (solvente) e um controle positivo (dependentes de ativação e independentes de ativação) (PITOT; DRAGAN, 2001).

Certos tipos de carcinógenos não são detectados por esses ensaios de mutagenicidade bacteriana, incluindo carcinógenos hormonais, metais, agentes com múltiplos mecanismos de ação órgão específico e agentes não-genotóxicos (PITOT; DRAGAN, 2001).

c.2 Teste de mutagenicidade em células de mamíferos

Diversos ensaios de mutagenicidade *in vitro* utilizando células de mamíferos foram desenvolvidos, incluindo ensaio com linfoma de camundongo L5178Y (MOLY) e o ensaio com células do ovário de hamster chinês (CHO) (PITOT; DRAGAN, 2001).

Tais ensaios de mutagenicidade utilizam como alvos os genes hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HGPRT) ou timidina quinase (TQ). O ensaio é similar ao teste de Ames, segundo o qual a expressão de fenótipo específico é comparada entre células tratadas e não tratadas com o composto teste. Frequentemente utiliza-se fontes exógenas de biotransformação, como uma camada celular epitelial irradiada (PITOT; DRAGAN, 2001).

Tais ensaios utilizam a detecção de dano no material genético capaz de resultar em perda de fenótipo, por exemplo, crescimento na presença do toxicante (PITOT; DRAGAN, 2001).

Em células CHO, o *locus* HPGRT é utilizado como gene alvo para análise. Essa enzima é importante no armazenamento da purina e permite a incorporação de análogos tóxicos da purina, como 6-tioguanina e 8-azaguanina no DNA, resultando na inibição do crescimento e morte celular. Alternativamente, uma mutação nesse gene resulta em fenótipo de não armazenamento, permitindo a formação da colônia na presença de análogos tóxicos da purina (PITOT; DRAGAN, 2001).

Ensaio baseado na mutação do gene TQ produzem fenótipos de perda similares ao descrito acima, possibilitando a formação da colônia na presença de agentes capazes de danificar o DNA e de análogos tóxicos da pirimidina (PITOT; DRAGAN, 2001).

Dado que esses testes de curta duração baseiam-se na premissa de que carcinógenos danificam o DNA sua concordância com os testes crônicos em

animais estão, apenas, entre 30% a 80%. Entretanto, os resultados desses testes são concordantes entre si (PITOT; DRAGAN, 2001).

c.3 Alterações cromossômicas – ensaio de micronúcleos e troca de cromátides irmãs

Alterações cromossômicas são extremamente comuns e até mesmo ubíquas em neoplasmas malignos. A indução de anormalidades cromossômicas por toxicantes em um ensaio relativamente curto, *in vitro* ou *in vivo*, é considerada como um excelente teste para avaliar o potencial carcinogênico (PITOT; DRAGAN, 2001).

O ensaio de curta duração mais utilizado para avaliação de clastogênese é o ensaio de micronúcleos. Tal teste mensura a indução de clastogênese na medula óssea de roedores por meio da avaliação dos micronúcleos contidos nos fragmentos de cromossomos da preparação celular da medula óssea (HEDDLE et al., 1983). Toxicantes que requerem ativação metabólica, especialmente no fígado, induzem uma menor quantidade de alterações cromossômicas nas células de medula óssea quando comparado às células somáticas (ITO et al., 1994).

Outro teste de curta duração para avaliação da estrutura cromossômica é a técnica de troca de cromátides irmãs. Durante a metáfase, as cromátides irmãs (cada qual sendo uma cópia completa do cromossomo), estão ligadas por mecanismos envolvendo proteínas específicas (NASMYTH, 1999). A troca de cromátides irmãs reflete o intercâmbio entre moléculas de DNA dentro de cromátides diferentes de um *loci* homólogo de um cromossomo replicante (LATT, 1981). A detecção da troca de cromátides irmãs requer metodologias para a marcação diferencial de cada cromátide irmã. A técnica mais utilizada é a incorporação, em um ciclo de replicação, de derivados halogenados da pirimidina, como a bromodeoxiuridina (BrdU). Tal procedimento é utilizado tanto *in vivo* quanto *in vitro* (DUFRAIN et al., 1984).

d. Estudos toxicológicos com animais

Dados provenientes de estudos em animais são elementos chave para o processo de identificação do perigo. A premissa básica para a avaliação de

risco de agentes químicos é que se eles são capazes de causar efeitos tóxicos em animais poderão causar efeitos tóxicos em humanos (FAUSTMMAN; OMMEN 2001).

Em geral, os estudos mais apropriados são aqueles conduzidos por vias de exposição de maior relevância para predizer a exposição humana. Tais estudos devem incluir no mínimo duas espécies de ambos os sexos, com número adequado de animais por grupo. Escolhas importantes envolvem a seleção da linhagem de ratos ou camundongos utilizados, o número e o nível das doses utilizadas (tipicamente 90%, 50%, 25% e 10% da dose máxima tolerada) bem como a necessidade de estudo histopatológico (FAUSTMMAN; OMMEN, 2001).

Entretanto, alguns problemas sérios podem ocorrer em estudos com animais, tidos como padrão ouro para predição de risco toxicológico em humanos. Primeiramente, a toxicidade pode ocorrer apenas quando do emprego da maior dose testada, a qual usualmente encontra-se próxima a dose causadora de toxicidade sistêmica (AMES; GOLD, 1990). Ademais, mesmo quando não é observada toxicidade sistêmica quando do emprego da maior dose testada, esta poderá desencadear ações diferentes daquelas produzidas pela exposição a baixas doses. Outras considerações quantitativas importantes na determinação da relevância para humanos de dados produzidos por estudos com animais são: doses do agente químico tão elevadas que excedem a solubilidade do mesmo no trato urinário, com consequente ocorrência de precipitação de cristais na bexiga e desenvolvimento de hiperplasia por irritação local dos cristais (exemplos: sacarina e ácido nitroacético); doses elevadas de material particulado por via inalatória, resultando em desenvolvimento de tumores pela ação irritante local (NTP, 2000).

Ratos e camundongos apresentam concordância de resultados positivos em apenas 70% dos estudos com animais. Desta forma, espera-se que a concordância de resultados roedores/humanos seja menor (LAVE et al., 1988).

Em estudos de carcinogenicidade, Haseman e Lockhart (1993) concluíram que a maioria dos sítios alvos apresentaram uma forte correlação (65%) entre machos e fêmeas, especialmente para tumores de estômago, fígado e tireóide. Entretanto, mesmo quando concordâncias de resultados são obtidas, ainda se pode observar diferenças na dose desencadeadora da resposta, por exemplo, aflatoxina B1 induz tumores de fígado em ratos e camundongos. Entretanto, os camundongos são mais resistentes, suportando doses até 10^5 vezes maiores. Diferenças genéticas

na expressão do citocromo P450 e glutathiona-S-transferase podem explicar tal divergência, sugerindo que humanos são tão sensíveis à indução de tumores de fígado por aflatoxina B1 quanto os ratos (EATON; GALLAGHER, 1994).

d.1 Testes de toxicidade aguda

O primeiro teste de toxicidade conduzido com uma nova substância química é o teste de toxicidade aguda. A dose letal para 50% dos animais (DL_{50}) e outros efeitos tóxicos agudos são determinados depois da administração do toxicante por uma ou mais vias e em uma ou mais espécies animais. As espécies mais comumente utilizadas são ratos e camundongos, mas algumas vezes cachorros e coelhos são utilizados. O número de animais que morrem durante um período de 14 dias após administração de dose única é registrado. Outros *endpoints* são avaliados diariamente como sinais de intoxicação, letargia, modificações comportamentais, morbidade, consumo alimentar (EATON; KLAASSEN, 2001).

Os objetivos do teste de toxicidade aguda são calcular a DL_{50} ; identificar órgãos alvo e outras manifestações de toxicidade aguda; estabelecer a reversibilidade do efeito tóxico e orientar a escolha do intervalo de doses para outros estudos.

A determinação da DL_{50} tornou-se uma questão preocupante, principalmente perante organismos de proteção dos animais, pois o efeito esperado é o mais drástico de todos: a morte. Ainda mais, a DL_{50} não é uma constante biológica, assim, muitos fatores (linhagem, idade e peso dos animais, alimentação, método de administração do toxicante, volume e tipo de suspensão do veículo de administração e duração das observações) podem afetar a determinação da DL_{50} em um estudo particular (DOULL, 1980).

Em função dessas características, reconhece-se que para a maioria dos propósitos faz-se necessário apenas a caracterização da DL_{50} dentro do seguinte intervalo de magnitude: 5 a 50 mg/kg, 50 a 500 mg/kg (EATON; KLAASSEN, 2001).

Se existe a exposição dérmica ou inalatória ao toxicante em humanos, faz-se necessário o desenvolvimento de testes dérmicos e inalatórios agudos. Quando os animais são expostos ao toxicante por inalação do ar respirado,

a dose de exposição não é conhecida. Para essas situações deve-se determinar a concentração letal 50 (CL₅₀), que é a concentração do toxicante no ar que causa a morte de 50% dos animais. Em estudos de CL₅₀ é imperativo descrever o tempo de exposição (EATON; KLAASSEN, 2001).

O teste de toxicidade aguda dérmica geralmente é conduzido em coelhos. Deve-se tricotomizar a região corpórea a ser testada. O toxicante deve ser mantido em contato com a pele por um período de 24 horas utilizando material plástico para oclusão. Ao final do período de 24 horas, a pele deve ser limpa e todo resíduo do toxicante deve ser removido. Os animais devem ser avaliados por um período de 14 dias, ao fim dos quais a DL₅₀ é calculada. Se não existe toxicidade evidente para doses de 2g/kg, não se conduz mais nenhum teste de toxicidade dérmica (EATON; KLAASSEN, 2001).

O teste de toxicidade aguda inalatória é similar aos demais, exceto pela rota de exposição. O período de exposição dos animais ao toxicante é de 4 horas (EATON; KLAASSEN, 2001).

Apesar da DL₅₀ e CL₅₀ apresentarem significância limitada, estudos de letalidade aguda são essenciais para a caracterização dos efeitos tóxicos do agente químico sob estudo bem como seu perigo potencial para humanos. Assim, as principais informações científicas derivadas dos testes de letalidade aguda provem das observações clínicas e análises *postmortem*, em detrimento da DL₅₀ (EATON; KLAASSEN, 2001).

d.2 Testes de toxicidade subaguda (estudo de dose repetida)

Estudos de toxicidade subaguda são conduzidos para a obtenção de informações sobre a toxicidade de um toxicante após administração repetida, bem como para o estabelecimento das doses a serem utilizadas no estudo subcrônico. Um protocolo típico prevê a administração de três ou quatro diferentes doses de um toxicante misturado à alimentação ou por gavagem a um grupo de 10 animais (10 de cada sexo/dose). Estudos de toxicocinética e histopatológicos são conduzidos após 14 dias de exposição (EATON; KLAASSEN, 2001).

d.3 Testes de toxicidade subcrônica

Frequentemente utiliza-se um período de exposição de 90 dias. O principal objetivo do teste subcrônico é o estabelecimento do NOAEL e LOAEL e a caracterização dos órgãos específicos ou órgãos afetados pelo toxicante (EATON; KLAASSEN, 2001).

Um estudo subcrônico é frequentemente conduzido com duas espécies animais (ratos e cachorros) pela rota de exposição pretendida (frequentemente a oral). No mínimo três doses devem ser empregadas (a maior dose deve ser aquela que produza o efeito tóxico mas não apresente mais que 10% de letalidade, uma dose intermediária, e uma dose baixa, que não cause efeitos tóxicos) em no mínimo 10 a 20 ratos e 4 a 6 cachorros, de cada sexo/dose. Os animais devem ser observados uma ou duas vezes ao dia em busca de sinais de toxicidade, incluindo alterações no peso corpóreo, alteração na cor ou textura do pelo, estresse respiratório ou cardiovascular e mudanças comportamentais. Todas as mortes prematuras devem ser encaminhadas para a necropsia. Animais que apresentem morbidades severas devem ser mortos imediatamente para a preservação dos tecidos e redução de sofrimento. Ao final de 90 dias todos os animais devem ser mortos, com coleta de sangue e tecidos para análise. As condições dos principais órgãos bem como seus pesos devem ser registrados. Exames hematológicos (hematócrito, contagem eritrocitária, leucócitos totais e diferenciais, contagem de plaquetas e tempo de pro-trombina) e bioquímicos (glicose, cálcio, potássio, uréia, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gama-glutamiltanspeptidase (GGT), sorbitol desidrogenase, lactato desidrogenase, fosfatase alcalina, creatinina, bilirrubina, triglicerídeos, colesterol, albumina, globulina e proteína total) devem ser conduzidos. Urinalise deve ser conduzida durante o período do estudo (meio e fim), incluindo as seguintes análises: densidade, osmolaridade, pH, proteínas, glicose, cetonas, bilirrubina e exames microscópicos (EATON; KLAASSEN, 2001).

Se existe a exposição humana pela via dérmica ou inalatória, estudos subcrônicos dérmicos e inalatórios devem ser conduzidos. Além de caracterizar a relação dose-resposta do toxicante, os estudos subcrônicos fornecem

dados para a seleção das doses a serem utilizadas nos estudos de exposição crônica (EATON; KLAASSEN, 2001).

d.4 Testes de toxicidade crônica e de carcinogenicidade

Estudos de exposição de longa duração ou crônicos são conduzidos similarmente aos estudos subcrônicos, exceto pelo período de exposição que deve ser de 6 meses a 2 anos. Estudos crônicos em espécies de não roedores são conduzidos usualmente durante um ano. Se é esperada uma exposição humana por curto período de tempo, como no caso de um agente antimicrobiano, uma exposição crônica de 6 meses é suficiente, por outro lado, se o agente é um aditivo alimentar com potencial de exposição humana durante toda a vida, um estudo de exposição crônica de 2 anos deve ser conduzido (EATON; KLAASSEN, 2001).

Os estudos crônicos são conduzidos para a avaliação da toxicidade cumulativa do toxicante, mas o desenho e avaliação do estudo incluem considerações sobre o potencial carcinogênico do toxicante (EATON; KLAASSEN, 2001).

Não apenas as substâncias com potencial mutagênico devem ser avaliadas em estudos de carcinogenicidade. Existe um dogma de que o câncer é causado primariamente por um efeito genético, já que todos os neoplasmas contêm mutações de algum tipo ou algum outro dano genético. No entanto, substâncias que não atuam diretamente no DNA, como por exemplo, aquelas que causam alterações nas funções do fuso mitótico, induzindo aneuploidias, também podem levar a efeitos carcinogênicos. Os eventos genéticos, epigenéticos, as alterações na regulação de hormônios, induções/inibições enzimáticas, entre outros devem ser considerados como mecanismos possíveis que podem levar à carcinogênese (WHO, 2009).

Os estudos crônicos e de carcinogenicidade são conduzidos em ratos e camundongos por um período de tempo que representa a média de vida dessas espécies (em geral, 18 meses para camundongos e 2 anos para ratos). Para garantir um tamanho amostral mínimo de 30 animais ao final do estudo, deve-se iniciá-lo com 60 animais, por grupo/sexo/dose. Exames patológicos devem ser executados em todos os animais que morrem prematuramente durante o estudo (EATON; KLAASSEN, 2001).

A seleção da dose é crítica em estudos crônicos, uma vez que não deve ocasionar morte prematura para a maioria dos animais. A maior parte dos guias regulatórios requer que a maior dose administrada seja a dose máxima tolerada estimada (MDT). Essa é geralmente derivada dos estudos subcrônicos. MDT é definida por algumas agências regulatórias como a dose capaz de suprimir levemente o ganho de peso (por exemplo, 10%) em um estudo subcrônico de 90 dias. Entretanto, outros parâmetros podem ser considerados como indicadores da MDT como por exemplo, considerações toxicocinéticas e fisiológicas e perfis metabólicos urinários. Geralmente, uma ou duas doses adicionais, frequentemente frações da MDT ($\frac{1}{2}$ ou $\frac{1}{4}$ da MDT) e um grupo controle são testados. O uso de MDT em carcinogenicidade tem sido controverso. A premissa pelas quais altas doses são necessárias para testar o potencial carcinogênico dos toxicantes é derivada de limitações experimentais e estatísticas dos estudos crônicos. Um aumento de 0,05% na incidência de câncer nos Estados Unidos resultaria em 1 milhão de mortes adicionais por câncer ao ano, considerando, obviamente, um risco claramente inaceitável. Entretanto, para a detecção de um aumento de incidência desta magnitude em um estudo crônico, no mínimo, dever-se-ia utilizar 2000 animais, assumindo que nenhum tumor ocorra no grupo não exposto. Em função da impossibilidade prática de se utilizar um número tão grande de animais para se testar o potencial carcinogênico de toxicantes em doses às quais a população está usualmente exposta, a alternativa encontrada pelos toxicologistas foi assumir que há uma relação entre a dose administrada e a resposta tumorigênica. Assim, a dose do toxicante administrada aos animais deve ser alta o suficiente para produzir resposta tumorigênica mensurável em um grupo experimental razoável, de 40 a 50 animais/dose (EATON; KLAASSEN, 2001).

A incidência de tumores, tanto benignos quanto malignos, deve ser relatada em um estudo crônico. Deve-se avaliar a significância estatística da incidência de tumores entre o grupo controle e o grupo que recebeu o toxicante. Para alguns tipos de tumores os dados históricos de incidência são surpreendentemente elevados. Algumas considerações acerca dos dados históricos de tumorigênese merecem destaque:

- A ocorrência natural de tumores, malignos e benignos, em animais não é incomum;

- Há numerosos tipos diferentes de tumores que se desenvolvem espontaneamente em ratos e camundongos de ambos os sexos, mas em diferentes frequências;
- Tumores comuns em uma espécie podem não o ser em outras (por exemplo, ratos machos comumente apresentam adenomas intersticiais testiculares, entretante tal tumor é raro em camundongos);
- Mesmo dentro de uma mesma espécie e linhagem, grandes diferenças entre os gêneros podem ocorrer;
- Mesmo quando o protocolo geral, dieta, ambiente, linhagem e fonte dos animais permanecem constantes, a incidência de tumores naturais pode variar.

Tais dados demonstram a importância de se avaliar concomitantemente dados provenientes de um grupo de animais controle, em detrimento de se utilizar dados provenientes de séries históricas (EATON; KLAASSEN, 2001).

d.5 Testes de toxicidade reprodutiva e sobre o desenvolvimento embriofetal

Os efeitos dos toxicantes sobre a reprodução e o desenvolvimento embriofetal também devem ser determinados. A toxicologia do desenvolvimento estuda os efeitos adversos sobre o desenvolvimento dos organismos, resultante da exposição ao toxicante durante o período pré-concepção (ambos os pais), período pré-natal e pós-natal até a puberdade. Teratologia é o estudo das malformações causadas durante o período de desenvolvimento compreendido entre a concepção e o nascimento. A toxicologia reprodutiva estuda a ocorrência de efeitos adversos sobre o sistema reprodutor de machos e fêmeas resultante da exposição a toxicantes (EATON; KLAASSEN, 2001).

Diversos tipos de testes com animais são utilizados para examinar o potencial de um toxicante em alterar o desenvolvimento e a reprodução. Geralmente testes de fertilidade e reprodução são conduzidos (segmento I) em ratos com duas ou três doses (10 ratos/sexo/dose) do toxicante. Os machos são expostos durante 60 dias e as fêmeas durante 14 dias antes do acasalamento. As fêmeas continuam expostas ao toxicante durante os períodos de gestação e lactação. Típicas

observações incluem: porcentagem de fêmeas prenhas, número de natimortos, peso, sobrevivência e condições gerais da prole durante as três primeiras semanas de vida. O potencial do toxicante em bloquear o desenvolvimento embrionário e/ou fetal (efeitos teratogênicos) também é determinado em animais de laboratório (segmento II). Tal estudo deve avaliar no mínimo duas espécies, sendo uma de não roedores (normalmente coelhos). Substâncias teratogênicas são mais efetivas quando administradas durante o primeiro trimestre da gestação, correspondente ao período da organogênese. Assim, 24 ratos ou camundongos e 12 coelhos por grupo/dose são expostos a três diferentes dosagens durante a organogênese (dias 7 a 17 para roedores e 7 a 19 para coelhos), e os fetos removidos por cesariana um dia antes do tempo estimado do nascimento (período gestacional de 29 dias para coelhos, 20 para ratos e 18 para camundongos). O útero é excisado e pesado, e então examinado quanto ao número de filhotes vivos, mortos e reabsorções (abortos). Os fetos vivos são pesados e metade avaliada quanto a anormalidades esqueléticas e a outra metade, quanto a anomalias teciduais (EATON; KLAASSEN, 2001).

A toxicidade perinatal e pós-natal dos toxicantes são examinadas nos estudos de segmento III. Esse teste é conduzido administrando-se o toxicante do décimo quinto dia da gestação até o período de lactação. Avalia-se o efeito do toxicante sobre o peso do recém nascido, sobrevivência e crescimento da prole durante as três primeiras semanas de vida.

Em alguns casos, em vez de conduzir estudos do segmento III podem ser usados estudos de multigeração. São administrados, no mínimo, três níveis de doses a grupos de 25 fêmeas e 25 machos (cada um com 30 – 40 dias de idade). Esses ratos são denominados como geração F_0 . A exposição estende-se até 140 dias de idade. A prole gerada por esta geração F_0 será denominada F_1 . A geração F_1 foi exposta ao toxicante durante sua vida uterina, lactação e alimentação. Quando a geração F_1 atinge 140 dias de idade, 25 machos e 25 fêmeas são selecionados para originar a geração F_2 . A geração F_2 é exposta durante a vida uterina e período de lactação. A prole F_1 e F_2 são examinadas imediatamente após o nascimento. A porcentagem de fêmeas F_0 e F_1 que se tornaram prenhas é avaliada, assim como o tamanho de cada prole, o número de natimortos, o número de nascidos vivos e contagem de viabilidade e peso dos recém nascidos não

registrados durante os dias 4, 7, 14 e 21 após o nascimento. O índice de fertilidade (porcentagem de coitos resultantes em fêmeas prenhas), índice gestacional (porcentagem de fêmeas prenhas resultando em prole nascida viva) e o índice de lactação (porcentagem de animais vivos durante os dias 4 – 21 pós-nascimento) são calculados. Estudos histopatológicos são conduzidos nas gerações parentais (F₀ e F₁) com grande atenção sobre os órgãos reprodutores (CHRISTIAN, 1997).

e. *Estudos de desregulação endócrina*

Os testes de toxicidade reprodutiva e sobre o desenvolvimento embriofetal descritos não necessariamente contemplam todos os efeitos que podem ser induzidos por substâncias que interferem no sistema endócrino (WHO, 2009).

Atualmente, ainda não há um consenso internacional sobre quais estudos conduzir e como avaliar a desregulação endócrina.

Nessa área o único consenso entre os países é quanto à definição científica de desregulador endócrino, proposta pela IPCS/OMS: “um desregulador endócrino é uma substância ou mistura de substâncias que altera a(s) função(ões) do sistema endócrino e conseqüentemente causa efeitos adversos em um organismo intacto ou sua progene ou (sub)populações” (WHO, 2002).

A EPA possui um Programa de *screening* para a avaliação de desreguladores endócrinos (*Endocrine Disruptor Screening Program - EDSP*) que tem como atribuição validar métodos de *screening* para avaliar o potencial de substâncias químicas causarem esse tipo de efeito. A EPA selecionou uma lista de substâncias que devem passar por uma bateria de testes, em uma abordagem passo a passo. No entanto, apesar de o sistema endócrino ser bastante complexo e ter importância em inúmeros processos fisiológicos do organismo, o programa tem por objetivo focar apenas sobre os efeitos endócrinos envolvendo andrógenos, estrógenos e hormônios tireoidianos (EPA, 2011).

Assim como no Brasil, o atual regulamento europeu define que agrotóxicos que causem quaisquer efeitos hormonais devem ser objeto de proibição de registro (BRASIL, 1989; UNIÃO EUROPEIA, 2009). Dessa forma, a bateria de testes proposta pela EPA, que restringe apenas a três categorias de hormônios não é suficiente para avaliar esse efeito de acordo com o arcabouço legal.

Na Europa, atualmente não há ainda um documento único de requerimentos para avaliação de desreguladores endócrinos. Existem duas propostas, uma elaborada pela Alemanha e Reino Unido e a outra, pela Dinamarca.

A primeira ressalta a importância de se avaliar todos os estudos toxicológicos clássicos e, a partir dos resultados encontrados, solicitar estudos específicos que confirmem que tal efeito é decorrente de uma ação hormonal. Com isso, as evidências iniciais partem de estudos *in vivo*, em consonância com a definição de desreguladores endócrinos da OMS que afirma que os efeitos endócrinos têm que ocorrer em organismos intactos (ou seja, evidências apenas em estudos *in vitro* não seriam suficientes) e ainda, não se restringem a uma bateria de testes que avaliam apenas três classes de hormônios. Tais estudos podem ser requeridos como acessórios para a investigação, caso o efeito de interesse envolva esses hormônios, mas no caso de outros efeitos, estudos específicos de mecanismo de ação poderão ser requeridos. Ainda, o documento propõe que haja uma avaliação da potência dessas substâncias em serem desreguladores endócrinos (BfR, 2011).

O documento dinamarquês já propõe uma avaliação totalmente diferente, que se baseia em um sistema de classificação das substâncias em serem desreguladores endócrinos. Esse sistema é parecido com a classificação já existente para outros efeitos, como os efeitos carcinogênicos e mutagênicos (DANISH MINISTRY OF THE ENVIRONMENT, 2011).

A Comissão Europeia tem um prazo até 14 de dezembro de 2013 para definir uma proposta única a ser utilizada no continente todo (DANISH MINISTRY OF THE ENVIRONMENT, 2011).

No Brasil, atualmente, ainda não foram definidos critérios nem estudos para avaliação desse tipo de efeito, apesar de haver a previsão de que agrotóxicos que causem esse efeito sejam proibidos de registro (BRASIL, 1989).

f. Estudos de neurotoxicidade

A neurotoxicidade é definida por um efeito adverso que altera a estrutura ou função do sistema nervoso central e/ou periférico, decorrente da

exposição a uma substância química. Os efeitos neurotóxicos incluem anormalidades bioquímicas, morfológicas, comportamentais e fisiológicas consequentes de uma exposição imediata ou reatardada e cuja duração pode ser transitória ou persistente (WHO, 2009).

Estudos toxicológicos gerais podem avaliar a neurotoxicidade, no entanto, fornecem pouca informação quando o efeito é pouco severo, por isso a necessidade de condução de testes toxicológicos específicos de neurotoxicidade. A literatura científica tem relatado várias anormalidades funcionais associadas a alterações químicas moleculares e celulares que podem ocorrer na ausência de alterações estruturais evidentes (WHO, 2009).

g. Estudos de imunotoxicidade

A imunotoxicologia foca na modulação não intencional do sistema imune. Os efeitos que podem ocorrer são a imunossupressão, imunoestimulação, hipersensibilidade e autoimunidade. A imunotoxicologia foca na modulação não intencional do sistema imune. Os efeitos que podem ocorrer são a imunossupressão, imunoestimulação, hipersensibilidade e autoimunidade. As avaliações de imunotoxicidade priorizam: 1) o potencial das substâncias em suprimir o sistema imune, já que é bem aceita a alta relevância da imunossupressão em experimentos animais para a determinação do risco em humanos; 2) a identificação de alérgenos que causam sensibilização de contato (WHO, 2009).

h. Estudos epidemiológicos

As principais evidências de risco à saúde humana pela ação de um agente químico provêm de estudos epidemiológicos bem conduzidos, nos quais uma associação positiva entre a exposição e o desenvolvimento da doença foi observada (NRC, 1993). Estudos epidemiológicos são essencialmente oportunistas. Tais estudos começam com uma exposição conhecida ou previsível, comparando-se indivíduos expostos e não expostos, ou casos com pessoas que não possuam a doença (não casos). Este tipo de estudo apresenta algumas limitações importantes. Quando o estudo é do tipo exploratório, as hipóteses são fracas. As estimativas de

exposição são frequentemente retrospectivas, especialmente para condições que apresentam elevado período de latência antes da manifestação clínica surgir. Geralmente existem múltiplas exposições, especialmente quando um longo período de vida dos indivíduos é considerado. Há sempre variações no grau de detalhamento das informações provenientes dos indivíduos participantes do estudo. Fatores de confundimento, como tabagismo e hábitos alimentares atípicos podem estar presentes (FAUSTMMAN; OMMEN, 2001).

Dentre os estudos epidemiológicos, três variantes destacam-se: estudo transversal, estudo de coorte e estudo de caso-controle.

Os estudos transversais utilizam-se do inquérito investigativo para identificar fatores de risco (exposição) e doenças, mas não são úteis para o estabelecimento de causa e efeito. Trata-se na maioria das vezes de estudo de caso único (CHECKOWAY, 1994).

Os estudos de coorte selecionam indivíduos de acordo com sua exposição ao agente químico em estudo. Baseado no status da exposição, esses indivíduos são monitorados no que se refere ao desenvolvimento da doença estudada. Trata-se de estudo prospectivo, que monitora, durante um determinado período de tempo, os indivíduos inicialmente saudáveis e estabelece a taxa de incidência da doença (CHECKOWAY, 1994).

Nos estudos de caso-controle, os indivíduos são selecionados de acordo com a manifestação ou não do efeito estudado. Os casos são os indivíduos acometidos pela doença em estudo, já os controles são os indivíduos que não apresentam tal doença. A partir da divisão dos grupos, traça-se um perfil histórico de exposição às variáveis em estudo objetivando o estabelecimento de correlações. Trata-se de estudos retrospectivos (CHECKOWAY, 1994).

Os estudos epidemiológicos devem ser avaliados quanto a: força da associação, consistência da observação (reprodutibilidade dos dados no tempo e espaço), especificidade, relação temporal apropriada (a exposição precede a resposta observada?), relação dose resposta, plausibilidade biológica e analogia (extrapolação biológica) (HILL, 1965). Adicionalmente, o desenho do estudo epidemiológico deve ser avaliado quanto ao seu poder de detecção (calculado usando o tamanho amostral, a variabilidade dos dados e o nível de significância especificado), eliminação dos fatores de confundimento, definição inequívoca da

resposta em estudo (diagnóstico preciso da doença) e aplicabilidade da resposta observada em outras populações sob risco (DEAN et al., 1995).

O valor potencial dos estudos conduzidos em humanos foi reconhecido desde os primeiros encontros da JECFA (*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*) e JMPR (*Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues*). Desde 1987, a JECFA reconhece o valor dos dados em humanos e que sempre são usados quando disponíveis para a avaliação toxicológica geral de agrotóxicos e de seus resíduos presentes nos alimentos (WHO, 2009). No último EHC (*Environmental Health Criteria – IPCS, 2009*), também foi ressaltado o valor dos dados em humanos, que sempre que disponíveis, devem ser utilizados prioritariamente, e que os dados em animais e os *in vitro* devem ser usados para fornecer evidências faltantes nos estudos em humanos. Ainda ressaltam que é fundamental e mandatório que os estudos em humanos sejam conduzidos observando todos os princípios éticos, em consonância com a Declaração de Helsinki (IPCS, 2009).

2.2 AVALIAÇÃO DOSE-RESPOSTA

As características da exposição e o espectro dos efeitos apresentam-se sob uma relação de correlação denominada relação dose-resposta. Sob uma perspectiva prática, existem dois tipos de relação dose-resposta:

- Relação dose-resposta individual ou quantitativa, que descreve a resposta de um organismo individual em relação à dose de um toxicante, tal relação é frequentemente denominada como resposta graduada por causa da mensuração contínua do efeito sobre um intervalo de dose;
- Relação dose-resposta quantal, que descreve a distribuição da resposta de uma população de organismos individuais em relação à dose de um toxicante.

a. *Relação dose-resposta individual*

Relações dose-resposta individuais são caracterizadas por um aumento dose dependente na gravidade da resposta. Tal relação frequentemente resulta de uma alteração de um processo bioquímico específico. Entretanto, para muitos toxicantes, a resposta pode ser derivada de ação em múltiplos órgãos/tecidos. Quando essa relação dose-resposta é plotada utilizando-se na abscissa o *log* da dose consegue-se um melhor ajuste dos dados, atingindo-se uma equação de reta linear (EATON; KLAASSEN, 2001).

b. *Relação dose-resposta quantal*

Em contraste com a escala gradual ou contínua da relação dose-resposta individual, a relação dose-resposta em uma população é definida como do tipo tudo ou nada. Ou seja, sob a exposição a uma dose de um toxicante, um indivíduo em uma população é classificado como responsivo ou não responsivo. Apesar dessa distinção de “população quantal” e “gradação individual” ser útil, os dois tipos de respostas são conceitualmente idênticas. A ordenada em ambos os casos é simplesmente registrada como resposta, que pode ser o grau de uma resposta individual ou a fração da população responsiva, ficando na abscissa o intervalo de dose testado (EATON; KLAASSEN, 2001).

Em toxicologia, a relação dose-resposta quantal é extensivamente utilizada. A determinação da mediana da DL_{50} é usualmente o primeiro experimento conduzido para um novo agente químico (EATON; KLAASSEN, 2001).

Respostas quantais ou do tipo tudo ou nada não são limitadas a letalidade e também podem ser obtidas para incidência de câncer, dano hepático e outros tipos de respostas tóxicas (EATON; KLAASSEN, 2001).

O formato da curva dose-resposta tem implicações importantes na avaliação da toxicidade. Por exemplo, substâncias que são requeridas para o funcionamento normal de funções vitais (vitaminas, cromo, cobalto e selênio) apresentam curva dose-resposta em formato de U. Ou seja, a exposição a doses muito baixas desencadeia efeitos adversos pela falta da substância, os quais

diminuem com o aumento da dose. Essa região da curva dose-resposta para nutrientes essenciais é comumente referida como deficiência. Com o aumento da dose atinge-se um ponto onde não mais existe a deficiência e nenhuma resposta adversa é detectada no organismo. Trata-se do estado de homeostase (parte mais baixa da curva). Entretanto, com o contínuo aumento da dose a níveis anormalmente altos, uma resposta adversa (usualmente qualitativamente diferente daquela observada na região de deficiência) aparece e aumenta proporcionalmente com a dose, assim como ocorrido para outras substâncias tóxicas (EATON; KLAASSEN, 2001).

Para efeitos decorrentes da desregulação endócrina, já foi descrito na literatura que muitas substâncias que têm esse modo de ação não apresentam curva dose-reposta monotônica, pois esses efeitos ocorrem em doses muito baixas e têm um comportamento de hormese (ASHBY, 2003; WELSHONS et al., 2003). O documento da agência reguladora dinamarquesa sobre estabelecimento de critérios para avaliação de desreguladores endócrinos afirma que é fato que os desreguladores endócrinos podem exibir curvas dose-resposta em U, apresentando efeitos em baixas doses e não apresentando curvas dose-respostas monotônicas (DANISH MINISTRY OF THE ENVIRONMENT, 2011). O documento de definição regulatória para avaliação de desreguladores endócrinos publicado pela Alemanha e Reino Unido também reitera que os desreguladores endócrinos podem não exibir curvas monotônicas e por isso causam efeitos em doses muito baixas, muitas vezes não avaliadas em estudos toxicológicos clássicos, mas que esse conceito de não-linearidade ainda não está incorporado às práticas regulatórias de avaliação (BfR, 2011).

É geralmente reconhecido que, para a maioria das respostas tóxicas, existe uma dose limiar (NOAEL, *non observed adverse effect level*) de tal sorte que abaixo deste limiar não há toxicidade evidente. A identificação do limiar depende da resposta particular mensurada, da sensibilidade da medida, do tamanho amostral e das doses selecionadas para o estudo. As bases biológicas para o estabelecimento de limiares para respostas agudas são bem estabelecidas e podem ser frequentemente demonstradas por meio de informações mecanísticas (ALDRIDGE, 1986).

A abordagem tradicional para o estabelecimento de níveis aceitáveis de exposição a toxicantes é diferente para respostas que apresentam limiares e aquelas que não possuam limiares de segurança (toxicantes genotóxicos). Para a avaliação completa da curva dose-resposta, além do limiar e formato da curva faz-se necessário a avaliação da inflexão da mesma (inclinação), haja vista que a inclinação da curva dose-resposta a altas doses poder ser diferente da inclinação a baixas doses. Tal resultado pode ser explicado pela saturação de rotas de biotransformação, sítios de ligação a proteínas ou receptores, depleção intracelular de co-fatores, etc (EATON; KLAASSEN, 2001).

Algumas respostas tóxicas, mais notadamente aquelas desenvolvidas após a exposição a carcinógenos genotóxicos, são frequentemente lineares em baixas doses e não exibem limiares, ou seja, não há dose associada com risco zero, entretanto, o risco diminui proporcionalmente à diminuição da dose. A existência ou inexistência de limiar de dose para carcinógenos tem implicações regulatórias e é um considerável ponto de controvérsia quando da avaliação de risco para carcinógenos.

c. Premissas envolvendo a dose resposta

Várias premissas devem ser assumidas antes da relação dose-resposta ser utilizada de maneira apropriada (EATON; KLAASSEN, 2001):

- A resposta observada deve-se à exposição ao toxicante – relação causal. Para alguns conjuntos de dados essa relação causal não é aparente. Por exemplo, estudos epidemiológicos podem resultar em descobertas de associação da resposta (doença) a uma ou mais variáveis. O uso da relação dose-resposta neste contexto não é correto, a menos que evidências convincentes embasem a conexão causal.
- A magnitude da resposta é de fato relacionada à dose. Essa premissa possui pelo menos três subdivisões.
 - Existe um sítio alvo molecular com o qual o toxicante interage para iniciar a resposta.

- O desencadeamento e o grau da resposta correlacionam-se à concentração do toxicante no sítio alvo.
- A concentração no sítio alvo correlaciona-se com a dose de exposição.
- Existência de métodos de quantificação e seleção precisa do efeito (*endpoint*) de interesse. O *endpoint* ideal é aquele associado aos eventos moleculares resultantes da exposição ao toxicante.

Em suma, a base fundamental para o estabelecimento da relação quantitativa entre a exposição a um agente químico e a incidência de eventos adversos é a análise dose-resposta. A análise da dose-resposta deve iniciar com a determinação do efeito (*endpoint*) a ser quantitativamente avaliado. Comumente escolhe-se o conjunto de dados representativos do efeito desejado provenientes da exposição às menores doses. Abordagens para a caracterização desta relação dose-resposta incluem a identificação do NOAEL (maior dose testada sem resposta com significância biológica e/ou estatística), LOAEL (menor dose testada com significância biológica e/ou estatística), DL₅₀ ou CL₅₀ (BARNES; DOURSON, 1988).

A relação dose-resposta descreve como a probabilidade de ocorrência de um evento adverso varia em relação à exposição ao toxicante. O formato da curva dose-resposta reflete o processo de dano causado pelo toxicante (quanto maior o coeficiente angular, mais sensível é a resposta frente às alterações de exposição). A presença ou ausência de limites, o padrão de aumento da resposta diante da exposição (linear ou não linear) são pontos-chaves da avaliação da relação dose-resposta (SAMET, 2004).

Para a maioria dos toxicantes os dados provenientes de estudos epidemiológicos são limitados, sendo os experimentos conduzidos com animais a principal fonte de informação toxicológica. Assim, deve-se destacar as incertezas envolvidas no processo de extrapolação dos dados provenientes de animais para humanos (FAUSTMANN et al., 1994).

Geralmente, estudos com animais são conduzidos empregando-se um número suficiente de animais para a detecção do menor nível de resposta biológica. A significância biológica e estatística é dependente do número de doses testadas, do número de animais utilizados para cada dose e da incidência do efeito selecionado no grupo controle (FAUSTMANN et al., 1994).

2.3 AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO

O objetivo primário da avaliação da exposição é determinar a fonte, tipo, magnitude e duração do contato com o agente de interesse. Obviamente este é um elemento chave na avaliação do risco químico, uma vez que o perigo intrínseco de um toxicante não é relevante na ausência de exposição. Entretanto, é também identificado frequentemente como um ponto de incerteza na determinação do risco, uma vez que não existe um padrão único de exposição (FAUSTMMAN; OMMEN, 2001).

Deve-se destacar que o objetivo da avaliação da exposição não é apenas calcular a quantidade de exposição total, mas também conhecer especificamente a quantidade que pode atingir o tecido alvo (dose interna). O passo chave para a avaliação da exposição é determinar a(s) via(s) de exposição relevante(s) para o cenário de risco sob análise. Os passos subsequentes versam sobre quantificar a exposição potencial relevante para cada via selecionada, para finalmente calcular-se a exposição total. Tal cálculo poderá estimar a exposição total para uma população específica assim como para indivíduos altamente expostos (EPA, 1992).

Conceitualmente, o cálculo de exposição representa uma estimativa plausível para indivíduos expostos até o limite superior do nonagésimo percentil da distribuição de exposição. Basicamente existem dois processos de estimativa de exposição: estimativa pontual (como por exemplo, o parâmetro *lifetime average daily dose* – LADD) e distribuição probabilística da exposição (como, por exemplo, o modelo de Monte Carlo) (EPA, 1989).

Considerações adicionais para avaliação da exposição incluem a periodicidade e a duração da exposição. Geralmente estimativas acerca do risco de câncer utilizam-se da exposição média durante a vida. No caso de toxicidade do desenvolvimento, um evento único pode ser suficiente para produzir o evento adverso, assim deve-se usar a dose diária (EPA, 1991).

O FQPA de 1996 destacou a necessidade de avaliar a exposição total por meio da determinação de mensurações de exposições agregadas para cada toxicante. Avaliação de exposição cruzada, como no caso do chumbo e

mercúrio, é um exemplo de avaliação da exposição total. Exposições cumulativas e risco cumulativo refere-se a exposição total a um grupo de agentes com mecanismos de toxicidade similares. Os organofosforados exemplificam uma classe de toxicantes para os quais deve-se empregar a abordagem da exposição cumulativa e risco cumulativo (EPA, 1998a).

a. *Exposição agregada*

A avaliação de risco agregado deve considerar a exposição de três fontes principais: alimentos, água para beber e residencial (não ocupacional/não dietético). Em uma avaliação agregada, a exposição a partir dessas três fontes devem ser somadas e comparadas para a estimativa quantitativa do perigo (NOAEL, RfD, etc). Diversos fatores devem ser considerados quando os riscos são agregados. Primeiro, a via de exposição (basicamente oral, dérmica e inalatória). A exposição oral resulta da ingestão de água e alimentos, e da ingestão acidental no caso de crianças (por exemplo, crianças lambem os dedos após brincarem em um jardim tratado com agrotóxicos). Exposição dérmica e inalatória resultam da aplicação residencial de inseticidas, fungicidas ou rodenticidas. Para alguns agrotóxicos, outras exposições não-ocupacionais são possíveis, como aquelas resultantes da aplicação de agrotóxicos em escolas, parques ou áreas recreacionais (EPA, 1997).

Ademais, exposições provenientes de diferentes vias e rotas somente devem ser agregadas se resultarem em um mesmo efeito adverso (EPA, 1997).

Os *endpoints* de toxicidade e NOAEL selecionados para uso na avaliação de risco podem ser provenientes de estudos orais, dérmicos ou inalatórios, sendo que a via utilizada determinará o método para a avaliação de risco agregada. Três metodologias são possíveis (EPA, 1997):

- *Método 1*

Quando os dados de toxicidade estão disponíveis para cada via de exposição e o mesmo *endpoint* ocorre em todas as exposições, a agregação de risco deverá ser feita utilizando-se a seguinte equação:

$$\text{Margem de exposição (MOE) total} = 1/[(1/\text{MOE}_{\text{oral}}) + (1/\text{MOE}_{\text{dérmico}}) + (1/\text{MOE}_{\text{inalatório}})]$$

$$\text{Onde, } \text{MOE}_x = \text{NOAEL}_x / \text{Exposição}_x$$

Podem ocorrer casos nos quais o menor NOAEL para o efeito adverso (*endpoint*) em um determinado estudo não seja o *endpoint* comum entre os três estudos, e para o qual a agregação está sendo feita. Nesse caso, o NOAEL para o *endpoint* comum deverá ser utilizado (EPA, 1997).

Destaca-se que enquanto é aceitável a conversão de exposições dérmicas e inalatórias em uma exposição oral equivalente, a conversão de exposição inalatória em uma exposição dérmica equivalente para a comparação de um *endpoint* dérmico não é aceitável (EPA, 1997).

- *Método 2*

Quando um *endpoint* oral é escolhido para a avaliação de risco agregado pelas três vias de exposição. Isso ocorre em função do evento adverso selecionado ter sido avaliado apenas em estudos de exposição oral, ou no caso de resultados inconclusivos para estudos com exposição dérmica ou inalatória. Nesses casos, a exposição dérmica e/ou inalatória deve ser ajustada para uma exposição oral equivalente, utilizando-se a taxa de absorção dérmica e/ou inalatória. A agregação de risco deverá ser feita utilizando-se a seguinte equação:

$$\text{MOE}_{\text{total}} = 1/[(1/\text{MOE}_{\text{oral}}) + (1/\text{MOE}_{\text{dérmico}}) + (1/\text{MOE}_{\text{inalatório}})]$$

$$\text{Onde, } \text{MOE}_x = \text{NOAEL}_x / (\text{Exposição}_x \times \text{taxa absorção}_x)$$

- *Método 3*

Quando estão disponíveis dados de toxicidade por duas das três vias agregadas. Nesse caso, tem-se uma combinação dos métodos 1 e 2. A agregação de risco deverá ser feita utilizando-se a seguinte equação:

$$MOE_{total} = 1/[(1/MOE_{oral+derm\ ou\ inal}) + (1/MOE_{dérmico\ ou\ inal})]$$

b. Modelos Preditivos de Exposição Ocupacional

No caso de cenários de risco para exposição ocupacional de aplicadores/manipuladores de agrotóxicos existem modelos preditivos de exposição, como, por exemplo, o PHED (*Pesticides Handlers Exposure Database*), o Modelo Alemão e o UK-POEM. A premissa desses modelos é que o nível de exposição se correlaciona com o tipo de equipamento utilizado durante a aplicação/manipulação do agrotóxico (como aplicador costal, trator com cabine fechada, etc), com a forma física do produto (líquido, pó, grânulos, etc) e com o tipo de vestimenta utilizada pelo trabalhador exposto (EPA, 1998b).

b1. PHED (Pesticides Handlers Exposure Database)

O PHED teve seu desenvolvimento iniciado durante a década de 80, e congrega inúmeros dados de quantificações de exposição: face, mãos, ar inalado, entre outros (EPA, 1998b).

No início, o PHED resultou de um trabalho colaborativo entre EPA, *Canadian Pest Management Regulatory Agency*, *Californian Department of Pesticides Regulation* e as indústrias de agrotóxicos (EPA, 1998b).

O PHED possui tabelas contendo dados de exposição de trabalhadores de quatro categorias: misturadores, aplicadores, banderinha e misturador/aplicador. As vias de exposição consideradas por este banco de dados são: dérmica e inalatória. As estimativas de exposição dérmica são baseadas em três cenários de vestimentas (EPA, 1998b):

- Sem EPI (*No clothes*) – o qual produz estimativa de exposição para trabalhadores que não fazem uso de material de proteção. Trata-se do cenário mais conservador. A coleta de dados é feita por meio de doseadores/adesivos colados sobre a roupa. Apresenta-se como boa opção para estimar a exposição de trabalhadores de países em desenvolvimento.
- Macacão;
- Macacão e luvas.

Avalia também três seções do corpo, facilitando a identificação das regiões corpóreas mais vulneráveis em cada cenário:

- Cabeça e pescoço;
- Braços, peito, costas e pernas;
- Mãos.

Todos os estudos utilizados na criação do PHED foram avaliados de acordo com o peso das evidências. De acordo com o número de replicatas analisadas por parte corpórea, bem como coeficiente de variação obtido em cada estudo, os mesmos foram agrupados em cinco categorias, de A (estudos de melhor qualidade) a E (estudos de pior qualidade) (EPA, 1998b).

Nem todos os cenários de exposição apresentados pelo PHED (combinação de trabalhadores, vias de exposição, vestimentas e seções do corpo) possuem dados confiáveis. Assim, algumas vezes far-se-á necessário a utilização de procedimentos matemáticos para a elaboração de estimativas de exposição, como por exemplo, o apresentado no Quadro 1.

Se a estimativa da unidade de exposição é:	E se deseja:	A estimativa de exposição é:
“sem luvas” a exposição da mão é 0,130 mg/lb ingrediente ativo (ia)	Com luvas	$0,130 \times 0,1 = 0,013$ mg/lb ia
Exposição inalatória = 0,023 mg/lb ia	Usando máscara	$0,023 \times 0,2 = 0,0046$ mg/lb ia
Adição de uma segunda camada de roupa sobre partes relevantes do corpo reduz a exposição em 50% - multiplicar o valor da estimativa de exposição por 0,5.		

Quadro 1 - Cálculo das estimativas de exposição não definidas pelo PHED

Fonte: EPA (1998)

Caso o objetivo seja estimar um cenário oposto, por exemplo, deseja-se calcular a exposição sem uso de luva, e o dado presente no PHED indica uso de luva, basta dividi-lo pelo fator supra (EPA, 1998b).

A exposição dérmica é calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Exposição dérmica} = \frac{[(\text{unidade de exposição do PHED}) \times (\text{taxa de aplicação}) \times (\text{área de aplicação}) \times (\text{taxa de absorção dérmica})]}{\text{peso corpóreo}}$$

A exposição inalatória é calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Exposição inalatória} = \frac{[(\text{unidade de exposição do PHED}) \times (\text{taxa de aplicação}) \times (\text{área de aplicação}) \times (\text{taxa de absorção inalatória})]}{\text{peso corpóreo}}$$

A dose pode então ser calculada a partir da exposição. Quando da caracterização do risco, caso o NOAEL utilizado tenha sido obtido de estudos dérmicos, não se deve multiplicar a exposição dérmica pela taxa de absorção do toxicante através da pele (EPA, 1998b).

b2. SeedTropex®

O SeedTropex® (ZENECA, 2008) é um modelo que foi criado para estimar a exposição ocupacional dos trabalhadores durante o tratamento de sementes. Ele apenas pode ser utilizado no caso de preparações na forma líquida. Os valores de exposição calculados pelo modelo são comparados ao AOEL (*Acceptable Operator Exposure Level*, calculado dividindo o NOAEL pelos Fatores de Incerteza). O modelo foi construído a partir de estudo de medições feito na França e Reino Unido, em 1993, nas seguintes condições de exposição: calibração, preparo e abastecimento, ensacamento das sementes tratadas e limpeza dos equipamentos e do local onde foi feito o tratamento. Todos os estudos foram feitos sob condições de Boas Práticas de Laboratório (FERA, 2011).

As exposições dérmica e inalatória foram feitas a partir de dosimetrias realizadas no corpo total do indivíduo. O programa também dispõe de valores padrão (*default*) para a duração de cada operação que gera o cenário de exposição. Além disso, para as taxas de absorção dérmica e inalatória o programa

tem como valores padrão de 10 e 100%, respectivamente, mas estes valores podem ser alterados pelo usuário (FERA, 2011).

c. *Exposição dietética*

A exposição dietética combina os dados de consumo de alimentos com a concentração de substância química nos alimentos. A exposição dietética estimada é então comparada com valores de referência para a caracterização do risco (WHO, 2009).

A equação geral para a avaliação da exposição dietética está expressa a seguir (WHO, 2009):

$$\text{Exposição dietética} = \frac{\sum(\text{Concentração da substância química no alimento} \times \text{Consumo do alimento})}{\text{Peso corpóreo (kg)}}$$

Os dados de consumo devem ser estimados a partir de pesquisas de consumo de alimentos no nível individual ou domiciliar, ou ainda de estimativas estatísticas aproximadas a partir de dados de produção de alimentos. As pesquisas de consumo alimentar podem incluir registros diários, questionários de frequência de alimentação, recordação do que foi ingerido, entre outros. A qualidade dos dados da pesquisa alimentar depende do seu desenho, do método e ferramentas utilizadas, da motivação e memória dos entrevistados, do tratamento estatístico e da representatividade dos dados (alimentos adquiridos *versus* alimentos consumidos). As limitações de utilizar os dados a partir de estimativas estatísticas de produção de alimentos são que, por definição, eles representam os alimentos que estão disponíveis para o consumo pela população em geral, e tipicamente fornecidos na forma bruta, como são produzidas (WHO, 2009).

A concentração da substância nos alimentos a ser utilizada nos cálculos dependerá se a avaliação é durante o pré-registro ou o pós-registro da substância em questão. No primeiro caso, ela se baseia nos limites máximos de resíduos definidos, já no segundo, os valores podem ser provenientes dos dados de monitoramento de resíduos dos alimentos (WHO, 2009).

2.4 CARACTERIZAÇÃO DO RISCO

O NOAEL é tradicionalmente utilizado para cálculos de avaliação de risco, como a dose de referência (RfD) ou ingestão diária aceitável (IDA) ou nível de exposição aceitável do operador (AOEL). RfDs, IDAs, AOELs são estimativas da exposição diária a um agente químico que não causam impacto adverso na saúde da população. Tais parâmetros são calculados dividindo-se o valor de NOAEL pelos fatores de incerteza (FI) e/ou de modificação (FM) (EPA, 1991; WHO, 2009; EC, 2006):

$$\text{IDA, RfD ou AOEL} = \text{NOAEL} / (\text{FI} \times \text{FM})$$

a. *Fatores de incerteza*

No início utilizavam-se apenas os fatores de incerteza interespecies (animal→humano) e intraespecie (humano→humano mais susceptível) com valor padrão de 10 cada. Um fator de incerteza adicional é utilizado para corrigir inadequabilidades experimentais, por exemplo, para se extrapolar um valor de NOAEL proveniente de um estudo de curta duração (agudo ou subcrônico) para uma situação de longa duração (crônica), para corrigir um provável tamanho amostral inadequado ou outras limitações experimentais. Se apenas o valor de LOAEL está disponível deve-se acrescentar mais um fator de incerteza (correção de LOAEL para NOAEL) (FAUSTMMAN; OMMEN, 2001).

Fatores de modificação podem ser usados para ajustar fatores de incerteza se dados sobre o mecanismo de ação do toxicante, toxicocinética ou relevância da resposta animal para o estabelecimento do risco para humanos justificar tal modificação. Por exemplo, se a informação sobre a cinética do toxicante sugere que a biotransformação em ratos e humanos é similar, produzindo o mesmo metabólito ativo, então, ao invés de dividir-se o NOAEL por um fator de incerteza de 10 (interespecie) pode-se usar um fator de 3 (FAUSTMMAN; OMMEN, 2001).

Outro fator de incerteza foi criado por meio do FQPA para garantir a proteção de recém-nascidos e crianças. Tal fator de incerteza foi elaborado em função de potencial toxicidade de agentes químicos durante as fases pré e pós-natal (FAUSTMMAN; OMMEN, 2001).

Alguns autores propõem a substituição do fator de incerteza de base 10 tradicionalmente utilizado para o cálculo da RfD e IDA. Renwick (1991) separou o fator de incerteza inter e intra-espécie em dois componentes: toxicocinético (TK – referente à variabilidade nos processos de absorção, distribuição, eliminação e/ou biotransformação de um toxicante) e toxicodinâmico (TD – referente a variabilidade na ação do toxicante, na sua interação com sítios alvo). Inicialmente foi proposto um fator de incerteza de 4 para a TK e um fator de 2,5 para a TD (RENEWICK; WALKER, 1993). Entretanto revisões subsequentes mantiveram os fatores supra apenas para a componte de variabilidade interespécies, alterando os fatores de incerteza intra-espécies para 3,2 (TK e TD, cada) (WHO, 1994).

b. NOAEL x BMD para o cálculo da RfD e MOE

Os valores de NOAEL têm sido utilizados para o cálculo da MOE. O NOAEL determinado em estudos com animais e expresso como mg/kg p.c./dia é comparado com o nível de exposição de seres humanos. Baixos valores de MOE indicam que o nível de exposição a que os seres humanos estão submetidos está muito próximo do NOAEL. Valores de MOE menores que 100 têm sido utilizados pelas agências regulatórias como um sinal de alerta (FAUSTMMAN; OMMEN, 2001).

A utilização do NOAEL na caracterização do risco recebe as seguintes críticas:

- O NOAEL deve, por definição, ser uma das doses escolhidas para serem testadas em estudos com animais;
- Uma vez determinado o NOAEL o restante da curva dose-resposta é ignorado, inclusive seu coeficiente angular;
- Estudos com animais que empregam um pequeno tamanho amostral geram elevados valores de NOAEL e, conseqüentemente, elevados valores de MOE e RfD;
- A abordagem do NOAEL não identifica a resposta verdadeira;

- Os valores de NOAEL variam de acordo com o desenho experimental.

Em função das limitações expostas, uma alternativa ao uso do NOAEL é o método da dose de *Benchmark* (BMD) (CRUMP, 1984; KIMMEL; GAYLOR, 1988).

Leisering e Ryan (1992) demonstraram que os níveis de risco estabelecidos com o uso do NOAEL estariam subestimados. O risco de exposição verdadeiro, calculado utilizando-se o NOAEL, poderia variar de zero a mais de 20%, dependendo do efeito adverso escolhido, espaçamento das doses e número de animais utilizados.

Por meio da abordagem de BMD a curva dose-resposta é modelada matematicamente (modelo quantal ou contínuo, dependendo do conjunto de dados) e o limite inferior do intervalo de confiança 95% para uma determinada dose sob uma resposta específica (resposta de *Benchmark* – BMR) é calculado. A BMR é frequentemente especificada como 1, 5 ou 10%. A BMD_x (x representa o percentual da resposta de *Benchmark*) é usado como alternativa ao NOAEL para o cálculo do MOE e RfD. Assim, o cálculo da RfD seria (EPA, 2000):

$$\text{RfD} = \text{BMD}_x / \text{FlxFM}$$

Pela abordagem da BMD a curva dose-resposta é utilizada em sua totalidade, ou seja, sob toda a faixa de exposição. Para tal, é necessária a utilização dos dados brutos de incidências do efeitos.

Em 2000, a EPA publicou um guia sobre a aplicação da abordagem de BMD na determinação do ponto de partida para todos os tipos de dados acerca de eventos adversos (EPA, 2000; CASTORINA; WOODRUFF, 2003).

Apesar da resposta de *Benchmark* 10% ser a mais utilizada, BMR de 1 ou 5% seriam mais apropriados para determinados efeitos (EPA, 2000; CASTORINA; WOODRUFF, 2003).

Ademais, o guia detalha que a substituição do NOAEL no cálculo da RfD ou MOE seria o limite inferior do intervalo de confiança 95% da BMD (BMDL). Com isso, garante-se, com 95% de confiança, que o BMR não seria ultrapassado (EPA, 2000; CASTORINA; WOODRUFF, 2003).

A abordagem da BMD tem sido aplicada em diversos estudos que se utilizam de efeitos adversos não carcinogênicos, incluindo toxicidade do desenvolvimento e reprodutiva (AUTON, 1994).

As vantagens da abordagem da BMD incluem:

- Utilização de toda a curva dose-resposta;
- Inclusão de uma medida de variabilidade (intervalo de confiança);
- Extrapolação da resposta para doses mais baixas, não testadas experimentalmente;

Obviamente, limitações dos estudos animais com relação ao pequeno tamanho amostral testado e grande espaçamento entre as doses poderão limitar a utilidade desta abordagem numa avaliação quantitativa de risco (FAUSTMMAN; OMMEN, 2001).

A EPA utiliza vários modelos para calcular a BMD, por exemplo, gamma dicotômico, probit, logit, K *power*, linear, quantal linear, exponencial polinomial e Weibull. O melhor ajuste de dados é aquele que gera um elevado coeficiente de correlação ($r^2 > 0,95$) e valor de qui-quadrado de p significativo, utilizando 0,05 como critério de rejeição (CASTORINA & WOODRUFF, 2003).

c. Abordagem para efeitos que não possuam limite de segurança – carcinógenos genotóxicos

Diversas curvas dose-resposta podem ser propostas na região de baixa dosagem da curva dose-resposta caso um limite de segurança não possa ser estabelecido. Para essas respostas, metodologias de avaliação dose-resposta utilizam-se de modelos para extrapolação até o mínimo nível de risco ($10^{-4} - 10^{-6}$) a baixas dosagens, muito abaixo da resposta biológica observada. Dois tipos de modelos de curva dose-resposta existem: estatístico (modelo de distribuição de probabilidades) e modelo mecanístico (KREWSKI; VAN RYZIN, 1981).

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar o risco da exposição ocupacional agrícola e alimentar ao agrotóxico carbendazim.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.1.1 caracterizar a toxicidade do carbendazim para diferentes espécies animais;

3.1.2 estimar a dose de referência para exposição oral crônica;

3.1.3 estimar a margem de exposição para diferentes cenários de exposição ocupacional agrícola;

3.1.4 estimar o risco dietético decorrente da exposição aos alimentos consumidos por toda a população;

3.1.5 estimar o risco decorrente da exposição ocupacional agrícola dos trabalhadores que usam o agrotóxico carbendazim.

4 MÉTODOS

O processo de avaliação do risco envolve quatro etapas: identificação do perigo, avaliação da relação dose-resposta, avaliação da exposição e caracterização do risco (NRC, 1983).

Para as primeiras duas etapas, a identificação do perigo e avaliação da relação dose-resposta, foi feita uma revisão bibliográfica, sem restrição temporal, na base de dados PubMed utilizando as seguintes combinações de palavras chave: “carbendazim and toxicity”, “carbendazim and endocrine”, “carbendazim and mutagenic”, “carbendazim and reproduction” e “carbendazim and neurotoxic”.

Nesta revisão, as seguintes exclusões foram feitas: a) artigos que se referiam à eficácia ou sobre resistência a pragas; b) artigos sobre os efeitos ecotoxicológicos; c) artigos sobre desenvolvimento de metodologias analíticas; d) artigos que relatam a exposição concomitante ao carbendazim e a outras substâncias, e) artigos sobre possíveis tratamento dos efeitos causados pelo carbendazim e f) artigos que não estavam nos idiomas Português, Inglês ou Espanhol.

Além desses estudos para a identificação do perigo e avaliação da relação dose-resposta, foram levantados também aqueles constantes do relatório do *International Programme of Chemical Safety* (IPCS, 1993), que relatam, além dos estudos de domínio público, estudos toxicológicos aportados em dossiês de registros de agrotóxicos a base de carbendazim. Nesse segundo levantamento, também foram excluídos os estudos ecotoxicológicos e aqueles sobre eficácia desse agrotóxico.

Nessa etapa, foram descritos os estudos de toxicocinética e tabelados os principais parâmetros dos estudos de toxicidade aguda, genotoxicidade, toxicidade subcrônica, toxicidade reprodutiva, toxicidade sobre o desenvolvimento embrionário, estudos de desregulação endócrina, neurotoxicidade e imunotoxicidade. Nos estudos em que os autores não definiram os valores de NOAEL, os mesmos foram determinados, sempre que possível, de acordo com os dados disponibilizados.

A determinação de um nível máximo de dose sem efeito adverso, a ser utilizado na caracterização do risco foi feita a partir do valor mais crítico encontrado de nível de efeito adverso não observado (NOAEL - *no observed adverse effect level*) no grupo de estudos toxicológicos subcrônicos ou crônicos.

A exposição teórica alimentar foi estimada por meio dos dados de consumo alimentar fornecidos pela Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) de 1995 (IBGE, 1995) e dos valores de limites máximos de resíduos (LMR) de carbendazim estabelecidos pela monografia da ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2012).

A avaliação teórica da exposição ocupacional para diferentes cenários foi feita com base nos dados constantes no banco PHED – *Pesticide Handlers Exposure Database* (EPA, 1998b), nas doses máximas de aplicação (DMA) desse agrotóxico constantes na base de dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Agrofit (MAPA, 2012) e nos valores de área máxima tratada (AMT) no Brasil, quando disponíveis.

O cálculo da dose de exposição diária ocupacional correspondeu à multiplicação da unidade de exposição dérmica (UED) ou da unidade de exposição inalatória (UEI), ambas obtidas pelo banco PHED, pela DMA e pela AMT por dia, divididas pelo valor padrão da massa corporal de um trabalhador, definido como 70 kg.

Para a caracterização do risco ocupacional, foi calculada a margem de exposição (MOE) para cada cenário do PHED.

Para avaliação da exposição ocupacional durante o tratamento de sementes, que também é um uso autorizado do carbendazim, por não existir esse cenário no PHED, foi utilizado o programa SeedTropex®. O valor de dose máxima recomendada para essa atividade foi retirada na base de dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Agrofit (MAPA, 2012) e para o tempo de tratamento foram utilizados os valores padrões recomendados pelo programa. A massa corporal do trabalhador para essa atividade também foi definida como sendo 70 kg. O programa gera valores de exposição pelas vias dérmica e inalatória, e para cálculo do risco esses valores foram comparados ao nível aceitável de exposição do trabalhador (*AOEL – Acceptable Operator Exposure Level*), calculado pela divisão do NOAEL pelos fatores de incerteza.

Para a caracterização do risco dietético, foi comparada a ingestão diária aceitável, IDA (NOAEL dividido pelos fatores de incerteza), com a ingestão diária máxima tolerada (IDMT) do carbendazim em culturas autorizadas no Brasil. A IDMT foi calculada pela multiplicação da ingestão/consumo *per capita* de tais culturas pelo LMR de cada uma, e considerou-se a massa corpórea média da população em geral como sendo 60 kg.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

O levantamento gerado pela revisão bibliográfica na base de dados PubMed, considerando os critérios de exclusões citados na seção anterior, totalizou 50 artigos completos. Destes, 44 artigos foram resultantes da busca com os indexadores “carbendazim and toxicity”, 5 artigos dos indexadores “carbendazim and endocrine” e 1 artigo resultante da busca “carbendazim and mutagenic” (excluindo os artigos que a primeira busca já havia encontrado). Os indexadores “carbendazim and reproduction” resultaram em 13 artigos, sendo que todos já haviam sido encontrados com os outros indexadores. Já a combinação “carbendazim and neurotoxic” não resultou em nenhum artigo disponível nessa base de dados. Nessa busca, 12 artigos foram perdidos por não estarem disponíveis em nenhuma biblioteca pública brasileira (Figura 3).

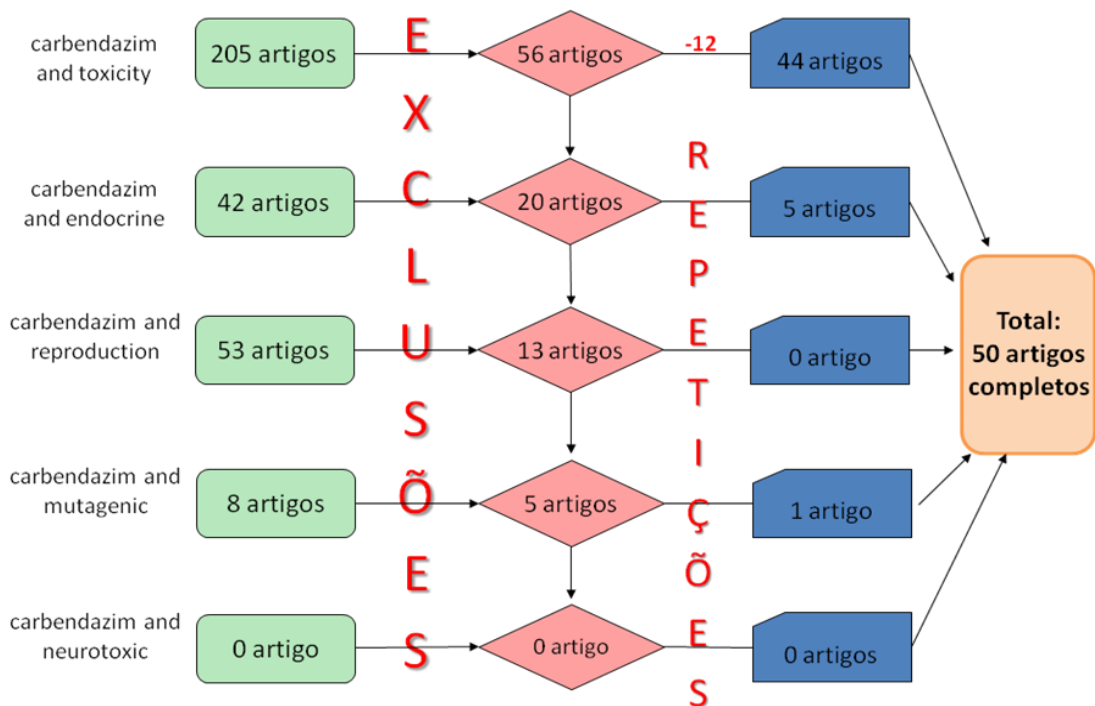


Figura 3 - Representação esquemática dos artigos gerados pela revisão no PubMed

Os artigos encontrados nessa busca foram tabulados sendo classificados de acordo com o tipo de estudo toxicológico (genotoxicidade, toxicidade subcrônica, toxicidade crônica, toxicidade reprodutiva, toxicidade sobre o desenvolvimento embriofetal, desregulação endócrina, imunotoxicidade, neurotoxicidade ou estudo epidemiológico).

Ainda, para a identificação do perigo e avaliação da relação dose-resposta, foram levantados os estudos constantes no relatório do IPCS (IPCS, 1993). Esse levantamento, excluindo os artigos já encontrados no PubMed, resultou em 92 estudos toxicológicos (sendo 18 estudos de toxicocinética, 11 de toxicidade aguda, 6 estudos subcrônicos, 8 estudos crônicos/carcinogenicidade, 2 de toxicidade reprodutiva, 10 de toxicidade sobre o desenvolvimento embriofetal, 1 de neurotoxicidade e 36 de genotoxicidade).

5.2 IDENTIFICAÇÃO DO PERIGO E AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO DOSE-RESPOSTA DO CARBENDAZIM

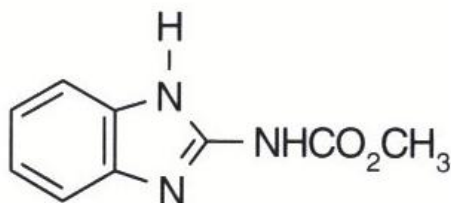
5.2.1 Identidade Química e Propriedades Físico-Químicas

Nome: Carbendazim (ANVISA, 2012)

Nomenclatura IUPAC: methyl benzimidazol-2-ylcarbamate (ANVISA, 2012)

Número CAS: 10605-21-7 (ANVISA, 2012)

Fórmula Estrutural: (ANVISA, 2012)



Fórmula Molecular: C₉H₉N₃O₂ (ANVISA, 2012)

Grupo Químico: Benzimidazol (ANVISA, 2012)

Classe Agronômica: Fungicida (ANVISA, 2012)

Aparência e coloração: sólido cristalino branco (IPCS, 1993)

Odor: negligenciável (IPCS, 1993)

Ponto de ebulição: fusão a -250°C (IPCS, 1993)

Peso Molecular: 191,2g/mol (IPCS, 1993)

Pressão de Vapor: $<1.10^{-7}$ Pa ($< 1 \times 10^{-9}$ mbar), a 20°C (IPCS, 1993)

Solubilidade: 28, 8 e 7mg/L (pH 4, 7 e 8, respectivamente) em água, 0,5mg/L em hexano, 36mg/L em benzeno, 68mg/L em dicloroetano, 300mg/L em etanol, 300mg/L em acetona e 100mg/L em clorofórmio (IPCS, 1993)

Coeficiente de partição (log octanol-água): 1,49 (IPCS, 1993)

5.2.2 Impurezas de Síntese

Durante o processo de síntese e sob certas condições, o carbendazim pode gerar impurezas da classe das fenazinas. Essas impurezas são mutagênicas mesmo em concentrações muito baixas no teste de Ames em *Salmonella typhimurium* e também no ensaio de mutação gênica em linfoma de camundongos Y5178Y TK^{+/−}. Concentrações maiores que 4ppm de DAP (diaminofenazina) ou de 10ppm de AHP (aminohidroxifenazina) levam a resultados positivos nesses estudos (IPCS, 1993).

De acordo com a monografia do carbendazim, as impurezas DAP e AHP não podem ultrapassar 3,5 ppm no total (ANVISA, 2012).

5.2.3 Toxicocinética

5.2.3.1 Absorção

Ratos machos albinos foram expostos ao carbendazim-C¹⁴ a dose única oral de 12mg/kg, em uma solução de dietil-glicoetanol. Baseado na eliminação urinária do carbendazim-C¹⁴ e seus metabólitos, o 5-HBC (*methyl (5-hydroxy-1H-benzimidazol-2-yl)-carbamate*) e 2-AB (*2-aminobenzimidazole*), a absorção foi estimada como sendo ao redor de 85% (IPCS, 1993).

Em outro estudo, ratos Sprague-Dawley jovens, fêmeas e machos, foram expostos a uma dose única por gavagem com a radiomarcagem ¹⁴C de [fenil(U)-¹⁴C]-carbendazim (94% de pureza, suspenso em óleo de milho) a dose baixa de 50mg/kg e alta de 1000mg/kg e a eliminação da radiomarcagem foi monitorada a cada 12 horas, por 72 horas. As porcentagens da radioatividade originalmente administrada foram: a) na urina - 61,7% (machos) e 53,8% (fêmeas)

para baixa dose, 41,4% (machos) e 40,7% (fêmeas) para dose alta e b) nas fezes – 24,4% (machos) e 33,2% (fêmeas) para baixa dose e 61,9% (machos) e 69,5% (fêmeas) para a dose alta. Mais de 98% da dose administrada foi recuperada nas fezes e urina em todos os grupos testados e a absorção do carbendazim foi de aproximadamente 80% da dose administrada, para todos os níveis de dose, baseado nos níveis de radioatividade encontrados na urina e na soma de metabólitos na fezes, resultantes do metabolismo hepático (IPCS, 1993).

5.2.3.2 Distribuição

Em um estudo com ratos Sprague-Dawley, expostos pela via oral (gavagem) a [fenil(U)-¹⁴C]-carbendazim (5 ratos/sexo/grupo), usando 3 regimes de doses: dose única oral de 50mg/kg; doses múltiplas pela via oral de 50mg/kg por 14 dias; e uma dose única oral de 1000mg/kg. A análise da distribuição pelos tecidos mostrou pouca bioconcentração do composto radiomarcado. As maiores concentrações de resíduos radiomarcados nos tecidos (menor que 1% da dose) foram detectados na carcaça e fígado (IPCS, 1993).

Ratos machos albinos foram expostos por gavagem a uma dose única de 12mg/kg de carbendazim e seus metabólitos e a distribuição nas frações hepáticas subcelulares foi analisada 1,5h após a exposição. A maior concentração relativa do composto parental foi encontrada na mitocôndria. A distribuição não foi uniforme e não dependeu do conteúdo lipídico das frações. A maior concentração do metabólito 5-HBC estava no citosol e do metabólito 2-AB nos microsomos (IPCS, 1993).

Dez aves foram expostas por 6 dias consecutivos, a 5mg/kg de [2-¹⁴C]-carbendazim pela dieta. Foram adicionadas mais 10 aves expostas diariamente a 120mg/kg. O carbendazim foi altamente biotransformado a 5-HBC e a metil-(4,5-dihidro-4,5-dihidroxi-1H-benzimidazol-2-il)-carbamato. A concentração de radioatividade, na maior dose, mensurada em mg/kg de carbendazim foi de 2,63 (fígado), 1,74 (rins), 0,06 (músculo da coxa), 0,05 (músculo do peito), 0,03 (gordura) e 0,63 (ovos produzidos no 6º dia). Aproximadamente 73% da radioatividade total nos ovos foi proveniente do metabólito 5-HBC (0,26mg/kg) e do composto parental (0,15mg/kg) (IPCS, 1993).

Em um outro estudo, grupos de 20 aves foram expostos a doses diárias de carbendazim pela dieta, nos níveis de 0, 5, 15 e 100mg/kg, por 28 dias. Após as administrações, 15 aves de cada grupo foram mortas e analisadas. A maior parte de carbendazim foi rapidamente eliminada como composto parental ou como 5-HBC. Os únicos resíduos encontrados em sangue, gordura, fígado, rins, tecidos ou ovos foram nos animais expostos a 100mg/kg. No entanto, os resíduos diminuíram a menos de 0,05mg/kg em até 4 dias após a retirada do tratamento (IPCS, 1993).

Uma vaca em período de lactação foi exposta a 50mg/kg de carbendazim radiomarcado veiculado em cápsulas por 2 vezes ao dia, por 5 dias consecutivos. Pouca radioatividade de carbendazim ou seus metabólitos foi encontrada no fígado (2,62mg/kg) e rins (0,45mg/kg) e quantidades não significantes (<0,09mg/kg) foram detectados em outros tecidos ou na gordura. Apenas 2,7% da radioatividade no fígado foi atribuída ao metabólito 5-HBC, enquanto que 41% e 3% da radioatividade correspondeu a 5-HBC e 4-HBC, respectivamente. Resíduos radioativos no leite corresponderam a 0,25mg/kg de carbendazim, sendo na verdade, 0,11mg/kg de 5-HBC e 0,05mg/kg de 4-HBC. Não foi encontrado o carbendazim inalterado no leite (IPCS, 1993).

Doze cabras não-lactantes foram expostas a pelo menos 50mg/kg de carbendazim radiomarcado, uma vez ao dia, por até 30 dias. Um platô de resíduos radiomarcados (9,48mg/kg) no fígado foi alcançado em 2 semanas. Os resíduos radiomarcados diminuíram para 5,17; 3,55 e 1,67mg/kg em 1, 2 e 3 semanas, respectivamente, após a exposição ter sido cessada. A meia-vida de eliminação do fígado foi de aproximadamente 9 dias. A meia-vida de remoção do carbendazim da circulação geral foi de aproximadamente 10h. Os resultados sugerem que os resíduos derivados de carbendazim não acumulam após 2 semanas, mesmo em exposição constante de 50mg/kg. Além disso, a descontinuidade da exposição leva ao desaparecimento dos resíduos no fígado (IPCS, 1993).

5.2.3.3 Biotransformação

O estudo com ratos expostos ao carbendazim por gavagem demonstrou que o mesmo é altamente biotransformado (IPCS, 1993).

Camundongos (NMRI) e ratos (Wistar) de ambos os sexos foram expostos ao carbendazim, via gavagem, em dose única de 3 e 300mg/kg, respectivamente. Quase todos os metabólitos na urina estavam conjugados com ácido sulfúrico. A clivagem desses conjugados pelas β -glucuronidase e arilsulfatase liberam o 5-HBC como o único metabólito extraído em água. As amostras de urina de camundongos continham maior quantidade de compostos que permaneceram polares após o tratamento enzimático que as amostras de urina de ratos. As análises não revelaram diferenças entre os sexos (IPCS, 1993).

Em outro estudo, ratos machos albinos foram expostos a dose única intravenosa de 12mg/kg de carbendazim em uma solução de dietilenoglicol. A análise da urina após 12h revelou 94% da radioatividade como 5-HBC, 3% como 2-AB e 3% como carbendazim (IPCS, 1993).

Em aves expostas diariamente a 5 e 120mg/kg de carbendazim radiomarcado, o mesmo foi biotransformado a 5-HBC, 4-HBC (*methyl-(4-hydroxy-1H-benzimidazol-2-yl)-carbamate*), 4,5-dihidrodiol-carbendazim e seu conjugado de ácido sulfúrico, bem como a 2-AB (IPCS, 1993).

A biotransformação do carbendazim no fígado foi avaliada em fêmeas de cabras não lactantes expostas a 50mg/kg da substância radiomarcada, uma vez ao dia, por 30 dias. A extração de homogenato do fígado dos animais sacrificados após 4 semanas de exposição, indicou que o resíduo mais representativo foi o 5-HBC (2 a 3 mg/kg) e o próprio carbendazim (aproximadamente 0,2mg/kg) (IPCS, 1993).

Outro estudo permitiu avaliar a liberação de resíduos radiomarcados ligados em fígado de vacas (76% de ligação antes da dessulfurização e 36% ligados após a dessulfurização) e de aves (58% de ligação antes da dessulfurização e 19% ligados após a dessulfurização). A maior parte dos resíduos reduzidos foi identificada como 5-HBC, 5-6-HOBC (*methyl-(6-hydroxy-5-oxo-5H-benzimidazol-2-yl)-carbamate*) ou carbendazim, sugerindo que os resíduos ligados ao fígado consistiam de conjugados de produtos benzimidazólicos e não de produtos naturais resultantes da quebra e incorporação (IPCS, 1993).

5.2.3.4 Eliminação e excreção

Foi conduzido um estudo com ratos Sprague-Dawley, expostos pela via oral (gavagem) a [fenil(U)-¹⁴C]-carbendazim (5 ratos/sexo/grupo), usando 3 regimes de doses: dose única oral de 50mg/kg; doses múltiplas pela via oral de 50mg/kg por 14 dias; e uma dose única oral de 1000mg/kg. No estudo preliminar com a dose única de 50mg/kg, 95% da radioatividade foi eliminada na urina e fezes em 72h e menos que 1% da dose foi eliminada como metabólitos voláteis. No estudo completo, mais que 98% da radioatividade foi eliminada no sacrifício, ou em 72h, por exemplo. A eliminação urinária foi de 62-66% da dose em machos e 54-62% da dose no grupo exposto à menor dose de carbendazim radiomarcado seguido de não radiomarcado. No grupo exposto à maior dose, a eliminação por essa via foi de 41% da dose. A eliminação pelas fezes foi virtualmente o restante da fração radiomarcada (IPCS, 1993).

Uma vaca foi exposta duas vezes ao dia, por 5 dias, a cápsulas contendo 50mg/kg de carbendazim radiomarcado e amostras de urina, fezes e leite foram coletadas a cada administração. Após 5 dias da administração inicial, 65% da radioatividade foi eliminada na urina, 21% nas fezes e 0,4% no leite (um total de 86,4%). Os resíduos encontrados na urina foram atribuídos 48% ao 5-HBC e 3% a metabólitos polares hidrossolúveis (IPCS, 1993).

Em outro estudo, vacas em período de lactação foram expostas diariamente pela dieta a 0, 2, 10 e 50mg/kg de carbendazim. No grupo exposto à maior dose houve os maiores níveis de metabólitos na urina e fezes, sendo na urina 12,56 mg/L de 5-HBC e 1,29mg/L de 4-HBC. Nas fezes 3,81mg/kg de 5-HBC e 0,99mg/kg de carbendazim foram detectados. Não houve resíduos de carbendazim na urina (IPCS, 1993).

Grupos de aves expostas diariamente pela dieta a 5 e 120mg/kg de carbendazim radiomarcado, por 6 dias consecutivos foram eutanasiadas após 24h da última administração e, em média 95% e 92% da radioatividade foi eliminada na baixa e alta doses, respectivamente (IPCS, 1993).

Não há dados de toxicocinética em humanos.

5.2.4 Toxicidade Aguda

Vários estudos de toxicidade aguda estão descritos na tabela a seguir (Tabela 1). Os valores de dose letal 50% (DL₅₀) foram de 2.000 a 15.000mg/kg, dependendo da espécie e da via utilizadas. Na via inalatória, a concentração letal 50% (CL₅₀) foi maior que 5,9mg/L em ratos.

O carbendazim não causou irritação ocular em coelhos, nem sensibilização dérmica em cobaias (IPCS, 1993).

De acordo com a monografia da Anvisa, do ponto de vista de toxicidade aguda, o carbendazim está classificado como Classe III – Medianamente Tóxico (ANVISA, 2012).

Tabela 1 - Estudos de toxicidade aguda em animais de laboratório

Espécie	Gênero	Número de animais/ grupo	Via	Resultado (mg/kg p.c. ou mg/L)
Ratos	♂ e ♀	10	Oral	DL50 > 15000
Camundongos	♂	10	Oral	DL50 > 15000
Cães	♂ e ♀	2	Oral	DL50 > 5000
Cobaias	♂	10	Oral	DL50 > 5000
Ratos	♀	5	Dérmica	DL50 > 2000
Coelhos	♂	10	Dérmica	DL50 > 10000
Ratos	♂	10	Intraperitoneal	DL50 > 2000
Camundongos	♂ e ♀	10	Intraperitoneal	DL50 > 15000
Ratos	♂	6	Inalatória (1h)	CL50 > 5,9

♂: machos

♀: fêmeas

Fonte: IPCS (1993)

5.2.5 Genotoxicidade

Muitos estudos foram conduzidos para avaliar o potencial mutagênico do carbendazim (Tabela 2). A maioria dos estudos tiveram resultado negativo para mutação gênica, mas houve alguns estudos cujos resultados foram positivos. Conforme já pontuado no item 5.2.2, no processo de síntese do carbendazim podem ser geradas impurezas da classe das fenazinas que têm atividade mutagênica mesmo em concentrações muito baixas. No entanto, em vários desses estudos cujos resultados foram positivos, não foi informada ou analisada a presença dessas impurezas, que podem ter sido as responsáveis pelo resultado positivo do teste.

O estudo de Sarrif et al. (1994a), para detectar mutações gênicas em *Salmonella*, demonstrou que a atividade mutagênica não foi devido à presença de metabólitos de carbendazim. No entanto, nas amostras contendo carbendazim com as impurezas DAP e AHP, em concentrações iguais ou maiores que 5 e 10ppm, respectivamente, sem ativação metabólica, houve atividade mutagênica (SARRIF et al., 1994a).

Assim, o conjunto de evidências não possibilita demonstrar que o carbendazim provoque mutações gênicas herdáveis, exceto quando há as impurezas de síntese da classe das fenazinas.

Na Tabela 2, também são relatados os estudos encontrados para a avaliação dos efeitos do carbendazim sobre os cromossomos. O conjunto de dados demonstra que o carbendazim causou aberrações cromossômicas numéricas, mas não causou aberrações cromossômicas estruturais. Aneuploidias, poliploidias, e micronúcleos resultantes dessas aberrações cromossômicas numéricas foram relatadas em diferentes modelos experimentais, *in vitro* e *in vivo*, sendo consistentes com o modo de ação desse agrotóxico.

Tabela 2 - Estudos de genotoxicidade conduzidos com o carbendazim

Teste	Espécie ou Linhagem	Concentração	Ativação	Resultado	Referências
Dano ou reparo ao DNA	<i>Bacillus subtilis</i>	20-1.000µg/disco	Sem	Negativo	IPCS, 1993
	<i>Salmonella typhimurium</i> (TA1535, TA1938)	125-2.000µg/placa	NI	Negativo	IPCS, 1993
	<i>Escherichia coli</i> , K-12	125-2.000µg/placa	NI	Negativo	
	<i>E. coli</i> , WP2	125-2.000µg/placa	NI	Negativo	
Troca de cromátides irmãs	Células CHO	0,13-40,0 µg/mL	Sem	Negativo	IPCS, 1993
		1,25-40,0µg/mL	Com	Negativo	
	Linfócitos humanos	0,03-30,0µg/mL	Sem e Com	Negativo	IPCS, 1993
	Linfócitos humanos	1-60µg/mL (grau técnico)	Sem e Com	Positivo (em 30 µg/mL e acima)	IPCS, 1993
Síntese não programada de DNA	Hepatócitos de ratos	1,04-104,0µg/mL	NI	Negativo	IPCS, 1993
Mutação gênica (<i>in vitro</i>)	<i>S. typhimurium</i> (TA1535, TA1537, TA98, TA100)	4-2.500µg/placa	Sem e Com	Negativo	IPCS, 1993
	<i>S. typhimurium</i> (his G46, TA1530, TA1950)	50-100µg/sítio	NI	Fraca atividade mutagênica em 100µg/sítio	IPCS, 1993
	<i>S. typhimurium</i> (TA100)	50-200µg/placa	NI	Negativo	IPCS, 1993
	<i>S. typhimurium</i> (his G46, TA1530, TA1535, TA1950)	0,25-10.000µg/mL	NI	Negativo	IPCS, 1993
	<i>S. typhimurium</i> (TA1535, TA1537, TA1538, TA100)	5-1.000µg/placa	Sem e Com	Negativo	IPCS, 1993

Continua

Continuação da Tabela 2

Teste	Espécie ou Linhagem	Concentração	Ativação	Resultado	Referências
Mutação gênica (<i>in vitro</i>)	<i>E. coli</i> (WP2 hcr)	5-1.000µg/placa	Sem e Com	Negativo	IPCS, 1993
	<i>S. typhimurium</i> (TA98, TA100)	1-300µg/placa	Sem e Com	Negativo	IPCS, 1993
	<i>S. typhimurium</i> (TA1537, TA1538, TA97, TA98)	5.000µg/placa	Sem e Com	Positivo em TA1537 e TA97 (teste com pré-incubação) Positivo em TA1538 e TA98 com ativação	IPCS, 1993
	<i>S. typhimurium</i> (TA1535, TA1537, TA98, TA100)	100-10.000 ^a µg/placa	Sem e Com	Positivo em 5000µg/placa com ativação	IPCS, 1993
	<i>S. typhimurium</i> (TA1535, TA1537, TA98, TA100)	Até 10.000 ^b µg/placa	Sem e Com	Negativo	IPCS, 1993
	<i>S. typhimurium</i>	NI	NI	Positivo se carbendazim com as impurezas: 4ppm de DAP ou 10ppm de AHP	IPCS, 1993
	Camundongos machos ICR	1.000 ou 4.000mg/kg	NI	Negativo	IPCS, 1993
	<i>S. typhimurium</i> (TA1535, TA1537, TA98, TA100)	100-10.000µg/placa	Sem e Com	Negativo	IPCS, 1993
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10-40µg/mL	NI	Negativo	IPCS, 1993
	Células CHO	3-628µM 3-654µM	Com Sem	Negativo	IPCS, 1993
	Células de linfoma de camundongo L5178Y	50-250µM	Sem e Com	Positivo com ativação em 100µM, negativo sem ativação	IPCS, 1993
	Célula germinativa de <i>Drosophila melanogaster</i>	0,5mg/mL	NI	Negativo	LAMB; LILLY, 1980
	<i>Drosophila melanogaster</i>	400-50.000ppm	NI	Negativo	IPCS, 1993

Continuação da Tabela 2

Teste	Espécie ou Linhagem	Concentração	Ativação	Resultado	Referências
Mutação gênica (<i>in vivo</i>)	Embriões de camundongos tratados <i>in utero</i> pela exposição materna	100-300mg/kg (oral)	NI	Positivo em 200mg/kg	IPCS, 1993
Efeitos sobre os cromossomos (<i>in vitro</i>)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,001-0,100mg/mL	NI	Máxima resposta para ganho cromossomal mitótico e meiótico em 0,05 e 0,025mg/mL	IPCS, 1993
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5µg/mL	NI	Positivo: aneuploidia	IPCS, 1993
	Linfócitos humanos	0,1-10,0µM	Sem e Com	Micronúcleos em ≥10,0µM	IPCS, 1993
	Linfócitos humanos	0,5mg/mL	Sem	Não aumentou a frequência de aberração	IPCS, 1993
	Linfócitos humanos	0, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000 1.100, 1.200, 1.400 ou 1.500 ng/mL	Sem	Indução de aneuploidia, (dose-resposta), não-disjunção, perda e ganho cromossômico e poliploidia. O <i>endpoint</i> mais sensível foi a não-disjunção. Foi possível determinar um nível sem efeito de 200 ng/mL	BENTLEY et al., 2000
	Linfócitos humanos	0; 0,157; 0,262; 0,523; 1,046; 1,569; 2,615; 3,923; 5,231; 7,846 ou 10,461µM	Sem	A não-disjunção é o principal mecanismo de aneuploidia induzida pelos inibidores do fuso como o carbendazim, e como a não-disjunção ocorre em concentrações menores que a perda de cromossomo, os níveis sem efeito devem ser determinados com base na não-disjunção em vez da frequência de micronúcleos (perda de cromossomo)	ELHAJOUJI; TIBALDI; KIRSCH-VOLDERS, 1997
	Linfócitos humanos	0; 0,03; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5 ou 2,0 µg/mL	Sem	Aneugenia que levou à indução de micronúcleos em células mononucleadas e binucleadas	ELHAJOUJI; CUNHA; KIRSCH-VOLDERS, 1998

Continuação da Tabela 2

Teste	Espécie ou Linhagem	Concentração	Ativação	Resultado	Referências
Efeitos sobre os cromossomos (<i>in vitro</i>)	Linfócitos humanos	0, 5, 10, 15, 20 e 25µM	Sem	Indução de micronúcleos em todas as doses, com dose-dependência	VAN HUMMELEN; ELHAJOUJI; KIRSCH-VOLDERS, 1995
	Linfócitos humanos	0; 0,5; 1; 5; 10; 50; 100 ou 500µM	Com e sem	A partir da dose de 10µM: indução de mitose, poliploidias e micronúcleos (sem aberração cromossômica)	BANDUHN; OBE, 1985
	Células granulosas de ovário de humanos	0 e 30µM	Sem	Alterou a organização dos centrossomos durante a mitose (fusos mitóticos tri a multipolares, alteração no formato do fuso e na composição dos microtúbulos), levando à organização anormal dos cromossomos	CAN; ALBERTINI, 1997
	Células CHO	0, 25, 50 e 100 µM	Sem	Aberração numérica em todas as doses, mas sem quebras cromossômicas	VIGREUX et al., 1998
Efeitos sobre os cromossomos (<i>in vivo</i>)	Ratos machos e fêmeas (<i>Sprague-Dawley</i>) – células medula óssea	300mg/kg (dose oral única)	NA	Não aumentou a frequência de aberração	IPCS, 1993
	Ratos - espermátides	100mg/kg	NA	Indução de micronúcleos e aneuploidia	MATSUO; NAKAI; NASU, 1999
	Ratos – espermatozóides e eritrócitos periféricos	0, 50, 150, 450 ou 800mg/kg (dose oral única)	NA	Diploidia dose-dependente dos espermatozóides, sem indução de micronúcleos nos eritrócitos periféricos (menos sensível)	DE STOPPELAAR et al., 1999
	Camundongos ICR – células nucleadas em anáfase	1.000mg/kg (2 doses - oral)	NA	Atraso cromossômico, formação de pontes, formação de fuso tripolar, etc	IPCS, 1993
	Camundongos – medula óssea	500mg/kg	NA	Não detectou micronúcleos	IPCS, 1993

Conclusão da Tabela 2

Teste	Espécie ou Linhagem	Concentração	Ativação	Resultado	Referências
Efeitos sobre os cromossomos (<i>in vivo</i>)	Camundongos – medula óssea	0, 66, 1.646 e 3.293mg/kg (dose oral única)	NA	Indução de micronúcleo por aneuploidia (todas as doses)	SARRIF et al., 1994b
	Camundongos – medula óssea	Intraperitoneal: 0,5mg/kg; Oral: 0,5g/kg	NA	Indução de micronúcleos (sem aberração cromossômica), aneugenia, hiper e diploidia	BARALE et al., 1993
	Camundongos – células intestinais	0, 500 ou 1.000mg/kg (dose oral única)	NA	Indução de micronúcleo em células intestinais (todas as doses)	VANHAUWAERT ; VANPARYS, KIRSSCH-VOLDERS; 2001
	Camundongos suíços albinos	0, 200, 1.000, 2.000, 4.000 ou 6.000mg/kg (intraperitoneal)	NA	Aumento dose-dependente de micronúcleos	IPCS, 1993
	Camundongos NMRI (teste dominante letal)	500mg/kg (intraperitoneal, por 5 dias)	NA	Sem efeito dominante letal	IPCS, 1993
	Camundongos NMRI (teste dominante letal)	3000mg/kg (gavagem, por 5 dias)	NA	Sem efeito dominante letal	IPCS, 1993
	Camundongos machos – espermatozóides (espermatoócitos)	500 ou 1.000mg/kg (durante a meiose I e II, peritoneal)	NA	Apenas na dose de 500: diploidia dos espermatozóides	ADLER; SCHMID; BAUMGARTNER, 2002
	Hamster chinês - células medula óssea	1.000mg/kg (dose oral única)	NA	Não induziu quebra cromossômica	IPCS, 1993
	Hamster chinês machos-medula óssea	0, 100, 500 ou 1.000mg/kg (intraperitoneal)	NA	Sem efeito sobre a hiperploídia	IPCS, 1993

NI: Não informado

NA: Não se aplica

CHO: células de ovário de hamster chinês

DAP: diaminofenazina

AHP: aminohidroxifenazina

^a Concentração de fenazina no carbendazim : 9ppm de DAP, 5ppm AHP

^b Concentração de fenazina no carbendazim : <0,6ppm de DAP, <4ppm AHP

5.2.6 Toxicidade Subcrônica

A Tabela 3 apresenta os resultados dos estudos de toxicidade geral após administração repetida subcrônica do agrotóxico carbendazim. Os efeitos tóxicos observados foram alterações hematológicas, bioquímicas, danos hepáticos e renais, alteração de peso do timo, redução de ingestão alimentar e diminuição de peso corpóreo. A administração pela via dérmica resultou em danos na derme, mas não foram relatados efeitos sistêmicos por essa via. A dose diária de carbendazim que não causou nenhum efeito tóxico (NOAEL) foi de 100mg/kg p.c./dia.

Tabela 3 – Toxicidade geral após administração repetida subcrônica de carbendazim

Espécie	Via	Tempo de Exposição	Número de animais	Pureza do ingrediente ativo	Doses (mg/kg p.c./dia)	Resultados	NOAEL (mg/kg p.c./dia)	Referências
Ratos (ChR-CD)	Oral (gavagem)	14 dias (5 vezes/semana)	6 machos/grupo	NI	0, 200, 3.400 ou 5.000	- Todos os grupos: Efeitos adversos na histologia dos testículos e ↓ ou ausência de espermatozóide nos epidídimos	<200*	IPCS, 1993
Ratos (<i>Wistar</i>)	Oral (gavagem)	90 dias	10/sexo/grupo	NI	0, 16, 32 ou 64	- Várias alterações hematológicas, mas sem relação dose-resposta - Os relatores afirmam que houve dificuldade em analisar os dados, pela ausência de dados brutos a alta variação dos resultados	ND	IPCS, 1993
Ratos (ChR-CD)	Oral (dieta)	90 dias	16/sexo/grupo	72%	0, 100, 500 ou 2.500**	- A dose média de exposição do grupo de maior dose foi de 360 mg/kg no início e de 123-152mg/kg no final. - Não houve alteração no peso dos testículos em nenhum grupo testado - Maior dose: ↑ da razão de peso do fígado/peso corpóreo em fêmeas	ND	IPCS, 1993
Ratos	Oral	15 semanas	10/grupo	98%	0, 150, 300 ou 600	- Dose intermediária: danos renais e hepáticos - Maior dose: ↑ albumina, glicose, creatinina, colesterol, hemoglobina e células de Kupffer, ↓ leucócitos e linfócitos, degeneração no fígado e danos renais	150	SELMANOGLU et al., 2001

Continua

Conclusão da Tabela 3

Espécie	Via	Tempo de Exposição	Número de animais	Pureza do ingrediente ativo	Doses (mg/kg p.c./dia)	Resultados	NOAEL (mg/kg p.c./dia)	Referências
Cães (<i>Beagle</i>)	Oral (dieta)	3 meses	4/sexo/grupo	53%	0; 100, 500 ou 1.500-2.500	- Maior dose: foi reduzida para 1500mg/kg, em função da diminuição da ingestão alimentar e do peso corpóreo e houve interrupção da exposição por alguns dias - Fêmeas: tendência de ↑ de colesterol (dose intermediária) e ↑ de colesterol (maior dose) - Em machos, ↑ do peso relativo e absoluto do timo (doses menor e intermediária) e próstata (dose intermediária)	100*	IPCS, 1993
Cães (<i>Beagle</i>)	Oral (dieta)	13 semanas	4/sexo/grupo	NI	0; 100, 300 ou 1.000-2.000	- Maior dose: após 6 semanas esse grupo passou a receber 2000mg/kg - Dose intermediária e maior dose: ↓ nos níveis de albumina - Maior dose: ↑ contagem bacteriana na urina, ↑ do peso relativo do fígado e tireóide e ↓ do peso relativo do coração	300	IPCS, 1993
Coelhos (<i>New Zealand, albinos</i>)	Dérmica	10 dias (6h/dia)	6/machos/grupo	50% da pasta aquosa	0 ou 2.000	- Grupo teste: Em 5/6 coelhos tratados, houve necrose focal da epiderme e infiltração celular polimorfonuclear da derme	ND	IPCS, 1993

O grupo exposto a dose 0 foi denominado de grupo controle; quando havia até 3 grupos expostos à substância teste, estes foram denominados como grupos de maior dose, dose intermediária e menor dose; quando havia dois grupos expostos à substância teste, foram denominados de grupos de maior dose e menor dose e; quando houver somente um grupo exposto à substância teste será denominado de grupo teste.

↓: diminuição e ↑: aumento

ND: não determinado; NI: não informado

*: NOAEL não informado pelos autores do estudo; **: dose foi expressa em mg/kg de ração

5.2.7 Toxicidade Crônica e Carcinogenicidade

Os resultados dos estudos crônicos e de carcinogenicidade estão descritos na Tabela 4. O carbendazim foi carcinogênico para duas linhagens diferentes de camundongos e as incidências dos adenomas e carcinomas tiveram uma relação dose-resposta. Em ratos e cães, houve alterações bioquímicas e hematológicas, perdas de peso corpóreo, alterações hepáticas, entre outras. Apesar de não ser um estudo de toxicidade reprodutiva, já houve evidência em ratos de atrofia testicular. Para camundongos, não foi possível estabelecer a dose diária que não causou nenhum efeito tóxico.

Tabela 4 – Toxicidade crônica e carcinogenicidade do carbendazim

Espécie	Via	Tempo de Exposição	Número de animais /sexo/grupo	Pureza do ingrediente ativo	Doses (mg/kg ração/dia)	Resultados	NOAEL (mg/kg p.c./dia)	Referências
Ratos (ChR-CD)	Oral (dieta)	104 semanas	36	50-70%	0, 100, 500, 2.500-10.000* ou 5.000 * após 20 semanas	- A sobrevivência no 2º ano de exposição foi de 50% em fêmeas e 39% em machos - A dose média de 500mg/kg apresentou variações grandes, sendo inicialmente medida como 65mg/kg p.c., 18mg/kg p.c. até o fim do primeiro ano e 15mg/kg p.c. no segundo ano de exposição - Nas duas maiores doses: ↓ ganho de peso corpóreo, sem alteração na ingestão alimentar, ↓ contagem de eritrócitos e nos valores de hemoglobina e do hematócrito, ↑ no peso relativo do fígado (devido à ↓ do peso corpóreo) - Maior dose: ↑ na incidência de atrofia testicular e prostatite em machos	ND	IPCS, 1993
Ratos (<i>Wistar</i>)	Oral (dieta)	2 anos	60	99%	0, 150, 300 ou 2000-5.000*-10.000** * após 1 semana ** após 2 semanas	- Menor dose: ↓ peso corpóreo (machos) - Maior dose: ↓ peso corpóreo, ↓ níveis de hemoglobina e do hematócrito, ↑ na atividade de TGP sérica, ↓ nos níveis de proteína total, ↑ no peso relativo do fígado e ↑ na incidência de proliferação difusa das células parafoliculares da tireóide (fêmeas) e; ↓ na atividade de TGO sérica (machos)	ND	IPCS, 1993
Cães (<i>Beagle</i>)	Oral (dieta)	1 ano	5	NI	0, 100, 200 ou 500	- Maior dose: ↑ colesterol sérico	ND	IPCS, 1993

Continua

Continuação da Tabela 4

Espécie	Via	Tempo de Exposição	Número de animais /sexo/grupo	Pureza do ingrediente ativo	Doses (mg/kg ração/dia)	Resultados	NOAEL (mg/kg p.c/dia)	Referências
Cães (<i>Beagle</i>)	Oral (dieta)	2 anos	4	53%	0, 100, 500 ou 2.500	<ul style="list-style-type: none"> - A dose média de 500mg/kg foi na verdade de 15-20mg/kg inicialmente, 14-18mg/kg após 1 ano e 10-16mg/kg após 2 anos de exposição - Menor dose: Em 2/4 animais houve atrofia testicular difusa e ausência de espermatogênese (machos) - Dose intermediária (500mg/kg): ↑ nos níveis de colesterol, de nitrogênio-uréico sanguíneo, proteína total e TGP. Um animal apresentou vacuolização das células hepáticas e proliferação marginal das triades portais com infiltração celular. - Maior dose: alterações fíricas e inflamatórias do fígado (não avaliado pela incerteza da dose testada, tempo de exposição e pequeno número de animais) 	ND	IPCS, 1993
Cães (<i>Beagle</i>)	Oral (dieta)	2 anos	4	NI	0, 150, 300 ou 2.000-5.000* * após 33 semanas	<ul style="list-style-type: none"> - Dose intermediária: ↓ peso corpóreo (machos e fêmeas) - Maior dose: ↓ peso corpóreo, ↓ tempo de coagulação sanguínea, ↑ dos níveis da fosfatase alcalina, ↑ dos pesos absoluto e relativos do fígado e dos pesos relativos da tireóide e pituitária (machos e fêmeas). Um macho teve infiltrados de células inflamatórias mononucleares intersticiais e atrofia tubular dos testículos. Uma fêmea foi sacrificada por estar moribunda 	ND	IPCS, 1993

Continuação da Tabela 4

Espécie	Via	Tempo de Exposição	Número de animais /sexo/grupo	Pureza do ingrediente ativo	Doses (mg/kg ração/dia)	Resultados	NOAEL (mg/kg p.c/dia)	Referências
Camundongos (CD-1)	Oral (dieta)	2 anos	80	99%	0, 500, 1.500 ou 7.500-3.750* *redução da dose para machos após 66 semanas (mortalidade)	<p>- Menor dose: ↓ pesos absoluto e relativo do timo (fêmeas), ↓ pesos absolutos do timo e rins (machos)</p> <p>- Dose intermediária: ↓ sobrevivência, ↓ pesos absoluto e relativo do timo (fêmeas), ↑ peso relativo do fígado (fêmeas), ↓ pesos absolutos do timo e rins (machos), alterações histológicas no timo (depleção linfóide) e acúmulo de pigmento amarelo-amarronzado nos túbulos renais (machos), ↑ incidência de estase espermática</p> <p>- Maior dose: mortalidade dose-relacionada em machos, ↑ pesos absoluto e relativo do fígado (fêmeas), ↓ pesos absoluto e relativo do timo e rins (machos), alterações histológicas no timo e acúmulo de pigmento amarelo-amarronzado nos túbulos renais (machos), ↑ estase espermática</p> <p>- Câncer: Em machos, nas doses intermediária e maior, houve hipertrofia centrilobular, necrose e dilatação hepática, ↑ significativo de carcinomas hepatocelulares na dose intermediária, ↓ sobrevivência na maior dose, impossibilitando afirmar ausência de carcinogenicidade. Em fêmeas, ↑ significativo de tumores hepáticos (carcinomas e adenomas hepatocelulares, e hepatoblastomas) em todos os grupos testados. Carbendazim foi carcinogênico para fígado.</p>	ND	IPCS, 1993

Conclusão da Tabela 4

Espécie	Via	Tempo de Exposição	Número de animais /sexo/grupo	Pureza do ingrediente ativo	Doses (mg/kg ração/dia)	Resultados	NOAEL (mg/kg p.c/dia)	Referências
Camundongos (SPF - suíços)	Oral (dieta)	80 semanas	100	NI	0, 150, 300 ou 1000-2000*-5000** * após 4 semanas ** após 8 semanas	- Maior dose: ↑ nos pesos relativos do fígado (machos e fêmeas) - Carcinogenicidade: ↑ dose-relacionado na incidência combinada de adenomas e carcinomas hepatocelulares (machos e fêmeas). Em machos, a indução de tumores hepáticos foi mais frequente.	ND	IPCS, 1993
Camundongos (SPF 71- HOE NMRKf)	Oral (dieta)	96 semanas	100-120	NI	0, 50, 150, 300 ou 1000-2000*-5000** * após 4 semanas ** após 8 semanas	- As doses reais consumidas foram 5,8 a 7,1; 17,1 a 21,2; 34,4 a 41,9 ou 548,4 a 682,3mg/kg. - Maior dose: ↑ pesos absoluto e relativo do fígado (machos e fêmeas). Todos os animais apresentaram hipertrofia centrilobular, com necrose celular, células mitóticas e células pigmentadas de Kupffer, e pronunciada hipertrofia celular hepática. - Carcinogenicidade: adenomas, carcinomas, fibrossarcomas e outros tumores no fígado foram observados em todos os grupos tratados. Não houve relação dose-resposta evidente para o hemangioma no fígado. Adenomatose pulmonar teve incidência igualmente distribuída em todos os grupos.	ND	IPCS, 1993

O grupo exposto a dose 0 foi denominado de grupo controle; quando houver até 3 grupos expostos à substância teste, estes foram denominados como grupos de maior dose, dose intermediária e menor dose; quando houve dois grupos expostos à substância teste, foram denominados de grupos de maior dose e menor dose e; quando houve somente um grupo exposto à substância teste, foi denominado de grupo teste.

↓: diminuição; ↑: aumento

TGO: transaminase glutâmica oxalacética; TGP: transaminase glutâmica pirúvica; NI: não informado; ND: não determinado

5.2.8 Toxicidade Reprodutiva

A Tabela 5 descreve os estudos de toxicidade reprodutiva. O carbendazim tem um potencial tóxico-reprodutivo bastante elevado, sendo um dos principais *endpoints* decorrentes de sua exposição. Os machos são bastante afetados, sendo os principais efeitos a infertilidade, as alterações do peso testicular, aumento do diâmetro e atrofia dos túbulos seminíferos (contendo espermatogônias e fragmentos de células de Sertoli), obstrução dos dutos eferentes, descamação das células germinativas, anomalias morfológicas das espermátides, acrossomos descontínuos ou ausentes, diminuição na contagem e motilidade dos espermatozóides, alteração morfológica dos espermatozóides e inibição da espermatogênese. É interessante notar que, quanto às alterações no peso do testículo, existem estudos que relatam ganho, perda ou ausência de efeito. Infelizmente, não temos acesso aos dados brutos dos estudos para avaliarmos de maneira mais pormenorizada o que pode ter ocorrido. Uma possibilidade é que como os resultados referem-se ao peso testicular bruto e não relativo, alterações no peso corpóreo poderiam estar influenciando os resultados. Também é digno de nota que, aparentemente, aumento no peso de testículos em ratos foi observado após exposição aguda a doses altas. Assim, o regime de exposição poderia ser outro fator que estaria influenciando o resultado.

As fêmeas expostas que acasalaram com machos expostos apresentaram perdas pós-implantação e, em estudo *in vitro*, houve inibição do crescimento do endométrio.

Tabela 5 – Toxicidade reprodutiva decorrente da exposição ao carbendazim

Espécie ou tipo celular	Via	Tempo de Exposição	Número de animais	Pureza do ingrediente ativo	Doses (mg/kg p.c/dia)	Resultados	NOAEL (mg/kg p.c/dia)	Referências
Ratos (ChR-CD)	Oral (dieta)	3 gerações	3 machos e 16-20 fêmeas/grupo	NI	0, 100, 500, 5.000 ou 10.000	- Nas duas maiores doses: ↓ no peso médio das ninhadas em desmame, de todas as gerações	100*	IPCS, 1993
Ratos (<i>Sprague-Dawley</i>)	Oral (gavagem)	10 dias consecutivos	24 machos/grupo	98,1%	0 ou 400	- 10/24 animais tiveram ↓ fertilidade durante a 1ª semana após o período de exposição, 16/24 animais estavam inférteis na 5ª semana. Dos 16 animais, apenas 4 recuperaram a fertilidade após estarem inférteis por 6 semanas consecutivas (da 5ª à 11ª semana), os demais permaneceram inférteis até a 32ª semana após o período de exposição. - Dos animais inférteis, 245 dias após a exposição, atrofia tubular dos seminíferos (>85% dos túbulos estavam atróficos) além da presença de apenas células de Sertoli (síndrome do epitélio com espessamento de membrana basal) - < 2% dos túbulos continham espermatozóides no lúmen e animais que recuperaram a fertilidade, muitos túbulos atróficos (13-85%), 245 dias após a exposição	<400	CARTER; HESS; LASKEY, 1987

Continua

Continuação da Tabela 5

Espécie ou tipo celular	Via	Tempo de Exposição	Número de animais	Pureza do ingrediente ativo	Doses (mg/kg p.c/dia)	Resultados	NOAEL (mg/kg p.c/dia)	Referências
Ratos (<i>Wistar</i>)	Oral (gavagem)	48 dias	10 machos/grupo	99%	0 ou 25	- Grupo teste: ↓ peso testicular, ↓ testosterona sérica, ↓ estradiol, ↓ atividade das enzimas esteroideogênicas e antioxidantes, ↑ peroxidação lipídica e ↑ das espécies reativas de oxigênio	<25	RAJESWARY et al., 2007
Ratos (<i>Sprague-Dawley</i>)	Oral (gavagem)	Única	6 machos/grupo	NI	0 ou 100	- Grupo teste: Os efeitos deletérios sobre os testículos ocasionados pelo carbendazim dependem da obstrução dos dutos eferentes	<100	GOTOH et al., 1999
Ratos	Oral (gavagem)	Do desmame, à puberdade, acasalamento, gestação e lactação	8-12/sexo/grupo	95%	0, 50, 100, 200 ou 400	- Duas maiores doses: ↓ potencial reprodutivo (efeitos na produção de esperma e da viabilidade fetal), alterações da morfologia, número (↓contagem) e motilidade dos espermatozoides, peso dos testículos e epidídimos, histologia testicular, níveis hormonais e da fertilidade. - Em todas as doses: ↓ contagem de espermatozoides na extremidade caudal do epidídimo - Em fêmeas: perdas pós-implantação na maior dose e filhotes com malformação em ninhadas dos grupos das doses de 100 e 200mg/kg	<50	GRAY et al., 1988; 1990

Continuação da Tabela 5

Espécie ou tipo celular	Via	Tempo de Exposição	Número de animais	Pureza do ingrediente ativo	Doses (mg/kg p.c/dia)	Resultados	NOAEL (mg/kg p.c/dia)	Referências
Ratos (<i>Sprague-Dawley</i>)	Oral	Única	8 machos/grupo	NI	0 ou 400	- Grupo teste: ↑ do peso testicular 8h após a exposição até o 4º dia. No 8º dia ↓ máxima na contagem de espermatozoides com cabeça por testículo (muitos apresentavam cabeça separada do flagelo ou ausência de cabeça) e ↓ da motilidade	<400	NAKAI et al.,1992
Ratos (<i>Sprague-Dawley</i>)	Oral	Única	20 machos/grupo	NI	0, 50, 100, 200, 400 ou 800	- Dose de 50: células germinativas imaturas no epitélio dos túbulos seminíferos (efeito mais brando) - A partir da dose de 100: ↓severa das células germinativas, ↑ dose-dependente do peso testicular e ↑ do diâmetro dos túbulos seminíferos, oclusão dos dutos eferentes (contendo granulomas espermáticos, mineralizações e tecido conectivo fibrosado no lúmen), atrofia dos túbulos seminíferos (contendo células de Sertoli primárias e espermatogônias cercadas por uma membrana basal espessa)	<50	NAKAI et al.,1992
Ratos (<i>Sprague-Dawley</i>)	Oral (gavagem)	Única	5 machos/grupo	NI	0 ou 400	- Região basal das células de Sertoli: ↓ microtúbulos e formação de agregados de mitocôndrias - Região apical das células de Sertoli: ↑ microtúbulos e fragmentação dessa porção celular com descamação das células germinativas, para o lúmen do túbulo seminífero - Efeito similar ao da colchicina	<400	NAKAI et al.,1994

Continuação da Tabela 5

Espécie ou tipo celular	Via	Tempo de Exposição	Número de animais	Pureza do ingrediente ativo	Doses (mg/kg p.c/dia)	Resultados	NOAEL (mg/kg p.c/dia)	Referências
Ratos (<i>Sprague-Dawley</i>)	Oral	Única	23 machos/grupo	NI	0 ou 100	<ul style="list-style-type: none"> - Anomalias no formato do núcleo e do acrossomo nas espermátides circulares e alongadas, invaginação nuclear - Acrossomos descontínuos, multivesiculares e ausência de acrossomos - Efeitos atribuídos às manchetas (anel de microtúbulos responsável pelo alongamento celular durante a espermiogênese) 	<100	NAKAI et al., 1997
Ratos (<i>Sprague-Dawley</i>)	Oral (gavagem)	Única	43 machos (total)	NI	0 ou 100	<ul style="list-style-type: none"> - Não oclusão dos dutos eferentes - Descamação das espermátides alongadas, lesão das células de Sertoli, necrose dos espermatócitos em divisão, megaespermátides circulares e espermátides binucleadas e, espermátides alongadas com formato anormal - Atua diretamente na meiose dos espermatócitos e os efeitos latentes nas espermátides levam a anormalidades morfológicas e impedem a espermatogênese, independentemente da ocorrência de oclusão dos dutos 	<100	NAKAI; HESS, 1997
Ratos (<i>Sprague-Dawley</i>)	Oral (gavagem)	Única	20 machos/grupo	NI	0 ou 100	<ul style="list-style-type: none"> - Desenvolvimento anormal dos acrossomos das espermátides circulares, ocorrido nas fases iniciais das espermiogênese 	<100	NAKAI et al., 1998

Continuação da Tabela 5

Espécie ou tipo celular	Via	Tempo de Exposição	Número de animais	Pureza do ingrediente ativo	Doses (mg/kg p.c/dia)	Resultados	NOAEL (mg/kg p.c/dia)	Referências
Ratos (<i>Sprague-Dawley</i>)	Oral (gavagem)	Única	25 machos/grupo	NI	0 ou 400	- Descamação das células germinativas, estágio-específico e devido à inibição na montagem dos microtúbulos das células de Sertoli	<400	NAKAI et al., 2002
Ratos (<i>Fischer</i> 344)	Oral (gavagem)	Única	NI	Grau técnico	0, 40, 67, 100 ou 200	- Nas 3 maiores doses: ↑ peso dos testículos, ↑ diâmetro do túbulo seminífero, descamação das células germinativas - Patologias testiculares iniciaram 4h após a exposição	40	MOFFIT et al., 2007
Ratos (<i>Sprague-Dawley</i>)	IP ou IT	Única	3-4 animais pré-púberes/grupo e 3-4 animais pós-púberes/grupo	>97%	IP: 164 mg/kg IT: 262µg	- IP: os pré-púberes tiveram ↓ dano testicular, mas nos adultos o efeito foi bastante pronunciado. - Não houve a diferentes padrões de ligação aos microtúbulos entre os grupos. - Animais pré-púberes, os níveis de carbendazim no testículo foram muito menores que nos adultos (menos que 1/3), enquanto que os níveis sanguíneos foram similares. - IT: nos jovens houve ↑ na vacuolização e desprendimento do epitélio seminífero, mas outros efeitos foram mais brandos que nos adultos. - As diferentes sensibilidades também se devem a outros fatores, que não apenas a cinética dessa substância em adultos e jovens (por exemplo, diferentes composições das células testiculares).	ND	LIM; MILLER, 1997

Conclusão da Tabela 5

Espécie ou tipo celular	Via	Tempo de Exposição	Número de animais	Pureza do ingrediente ativo	Doses (mg/kg p.c/dia)	Resultados	NOAEL (mg/kg p.c/dia)	Referências
Camundongos (suíços) Ratos (<i>Sprague-Dawley</i>)	Intraperitoneal	Única	NI	NI	2.000 (camundongo) 164 (rato)	- O carbendazim atinge os testículos dos camundongos nas mesmas doses ou em doses acima das medidas em ratos, mas os camundongos aparentemente são insensíveis aos agentes disruptores de microtúbulos.	ND	CORREA et al., 2002
Camundongos	Oral (gavagem)	5 dias consecutivos	12 machos/grupo	NI	0, 250, 500 ou 1.000	- Maior dose: ↓ peso dos testículos, recuperação 39 dias após a exposição, bem como alteração nas porcentagens de tipos celulares das espermatídes	500*	IPCS, 1993
Hamsters (sírios)	Oral (gavagem)	Do desmame, à puberdade, acasalamento, gestação e lactação	12/sexo/grupo	98,1%	0 ou 400	- Grupo teste: ↓ contagem de espermatozóides e pesos dos testículos, vesícula seminífera e na contagem de espermatozóides no epidídimo - Efeitos menos pronunciados do que os vistos em ratos	<400	GRAY et al., 1990
Células do endométrio humano	NA	48h de cultura	NA	NI	0, 10^{-6} , 10^{-5} ou 10^{-4} M	- Inibição do crescimento do endométrio	ND	CHANG et al., 2010

↓: diminuição; ↑: aumento

NA: não se aplica; NI: não informado; ND: não determinado

IP: intraperitoneal; IT: intratesticular

*: NOAEL não informado pelos autores do estudo

5.2.9 Toxicidade sobre o desenvolvimento embriofetal

Os resultados detalhados dos estudos de toxicidade sobre o desenvolvimento embriofetal estão descritos na Tabela 6. Mesmo quando os machos não são expostos ao carbendazim, a gestação de fêmeas expostas é bastante afetada, bem como o desenvolvimento embriofetal. Os principais efeitos foram as perdas gestacionais (diminuição do tamanho das ninhadas), diminuição no número dos sítios de implantação, aumento de reabsorções, embriofetalidade, diminuição do peso fetal, atrasos de ossificação e malformações diversas em ratos e coelhos. Em hamsters, foi evidenciado que os óocitos não fertilizados apresentavam aneuploidias. O carbendazim provocou malformações embriofetais em coelhos, ratos e camundongos. O valor mais crítico de NOAEL para o desenvolvimento embriofetal, tanto em coelhos como em ratos, foi cerca de 10mg/kg p.c./dia (nível em que não houve toxicidade materna).

Tabela 6 – Toxicidade sobre o desenvolvimento embriofetal decorrente da exposição ao carbendazim

Espécie ou tipo celular	Via	Tempo de Exposição	Número de animais	Pureza do ingrediente ativo	Doses (mg/kg p.c/dia)	Resultados	NOAEL (mg/kg p.c/dia)	Referências
Ratos (Holtzmann)	Oral (gavagem)	Durante a gestação (dias 1 a 8)	8 fêmeas/grupo	NI	0, 25, 50, 100, 200, 400 ou 1.000	- Até a dose de 400: tendência de ↑ das reabsorções - Maior dose: ↓ ganho de peso materno, ↓ sítios de implantação, ↓ níveis de LH e ↑ nos níveis séricos de estradiol	ND	IPCS, 1993
Ratos	Oral (gavagem)	Durante a gestação (dias 1 a 8)	NI	NI	0 ou 400	- Fêmeas pseudogravidas ^a tratadas: ↓ resposta celular uterina decidual	<400	IPCS, 1993
Ratos (Holtzmann)	Oral (gavagem)	Durante a gestação (dias 1 a 8)	12-13 fêmeas/grupo	95%	0, 100, 200, 400 ou 600	- Todos os grupos: ausência de toxicidade materna - A partir da dose de 200: ↓ distância cabeça-cauda, ↓ tamanho da cabeça, ↓ metâmeros e de embriões por fêmea; neuróporos posteriores com abertura e anomalias nos membros - Todas as doses: ↑ reabsorções, ↓ tamanho das ninhadas, ↓ peso fetal e ossificação retardada - Alterações sobre o desenvolvimento embriofetal ocorreram em todos os estágios, dose-dependente, e os atrasos no desenvolvimento permaneceram mesmo após o término da exposição, sugerindo que a exposição nos estágios iniciais do desenvolvimento é crítica para ocorrência dos efeitos	<100	CUMMINGS et al., 1992

Continua

Continuação da Tabela 6

Espécie ou tipo celular	Via	Tempo de Exposição	Número de animais	Pureza do ingrediente ativo	Doses (mg/kg p.c/dia)	Resultados	NOAEL (mg/kg p.c/dia)	Referências
Ratos (<i>Sprague-Dawley</i>)	Oral	Durante a pseudogestação ^a (dias 5 a 9)	5 fêmeas/grupo	98%	0, 500 ou 1.000	- Todas as doses: ↓ peso do útero decidual e do conteúdo protéico uterino, sem alterar os níveis de estradiol e progesterona	<500	SPENCER; CHI; ZU, 1996
Ratos (CrI:CDBR)	Oral (gavagem)	Durante a gestação (dias 7 a 16)	25 fêmeas/grupo	NI	0, 5, 10, 20 ou 90	- Maior dose: toxicidade materna (↓ ganho de peso), ↑ pesos absoluto e relativo do fígado, ↓ taxa de gestação, ↑ reabsorções, ↓ tamanho da ninhada, ↓ peso fetal, ↑ incidência de malformações fetais (hidrocefalia, microftalmia, anoftalmia, escápula malformada, malformações axiais esqueléticas nas vértebras e costelas, fusões do esterno, exencefalia, hemivértebras e hiperplasia de costela) - Dose de 20: ↓ peso fetal, variações esqueléticas	Materno: 20 Fetal: 10	IPCS, 1993
Ratos (<i>Sprague-Dawley</i>)	Oral (gavagem)	Durante a gestação (dias 8 a 15)	11 fêmeas/grupo	NI	0 ou 19,1	- Efeitos embriotóxicos, ↓ fetos nascidos vivos, malformações esqueléticas e externas, ↓ peso fetal	<19,1	IPCS, 1993
Ratos (Imp:Lodz)	Oral (gavagem)	Durante a gestação (dias 6 a 15)	18-20 fêmeas/grupo	98%	0, 8, 35 ou 160	- Duas maiores doses: toxicidade materna, embriofetalidade, defeitos congênitos, desenvolvimento fetal retardado, encefalocele, hérnia umbilical, cauda encurtada ou ausente, malformação do cérebro, rins, costelas e vértebras	8	SITAREK, 2001

Continuação da Tabela 6

Espécie ou tipo celular	Via	Tempo de Exposição	Número de animais	Pureza do ingrediente ativo	Doses (mg/kg p.c/dia)	Resultados	NOAEL (mg/kg p.c/dia)	Referências
Ratos	Oral (gavagem)	Durante a gestação (dias 6 a 15)	8-10 fêmeas/grupo	98%	0, 20, 40 ou 80	-Taxa de fetos nascidos mortos e reabsorções: 29%, 48%, 64%, 73% respectivamente - Mortalidade pós-parto: nas duas maiores doses foi, respectivamente, 3 e 3,5 vezes maior que no controle	ND	IPCS, 1993
Ratos (ChR-CD)	Oral (dieta)	Durante a gestação (dias 6 a 15)	27-28 fêmeas/grupo	53%	0, 8,9; 45,9; 218,4; 431,6; 625,5 ou 746,9	- Maior dose: ↓ ingestão de alimento (período da exposição)	ND	IPCS, 1993
Ratos (Wistar-SPF)	Oral (dieta)	Durante a gestação (dias 6 a 15)	18-22 fêmeas/grupo	NI	0, 600, 2.000 ou 6.000	- Potencial teratogênico ou fetotóxico não pôde ser avaliado (sem dados brutos)	ND	IPCS, 1993
Coelhos	Oral (gavagem)	Durante a gestação (dias 6 a 18)	8-10 fêmeas/grupo	98%	0, 40, 80 ou 160	-Taxa de fetos nascidos mortos e reabsorções: 0%, 15%, 21,7%, 33,3% respectivamente	ND	IPCS, 1993
Coelhos (Albinos, New Zealand)	Oral (gavagem)	Durante a gestação (dias 7 a 19)	20 fêmeas/grupo	NI	0, 10, 20 ou 125	- Dose intermediária: ↓ taxa de implantação, ↓ tamanho da ninhada - Maior dose: ↓ peso materno, ↓ taxa de implantação, ↑ reabsorções, ↓ tamanho da ninhada, ↑ fetos com malformações por ninhada (costelas, vértebra torácica proximal e cervical)	Materno: 20 Fetal: 10	IPCS, 1993
Coelhos (Albinos, New Zealand)	Oral (dieta)	Durante a gestação (dias 6 a 18)	3-11 fêmeas/grupo	NI	0, 600, 2.000 ou 6.000	- Maior dose: ↑ número de costelas supranumerárias (bilateral) e atraso ou ausência na ossificação - Potencial teratogênico ou fetotóxico não pôde ser avaliado (sem dados brutos)	ND	IPCS, 1993

Conclusão da Tabela 6

Espécie ou tipo celular	Via	Tempo de Exposição	Número de animais	Pureza do ingrediente ativo	Doses (mg/kg p.c/dia)	Resultados	NOAEL (mg/kg p.c/dia)	Referências
Camundongos (CD-1)	Oral (gavagem)	Durante a gestação (dias 6 a 15)	30 fêmeas/grupo	98%	0, 150, 300 ou 600	- Menor dose: perdas pós-implantação (dentro dos valores históricos) - Doses intermediária e maior: ↓ peso corpóreo, ganho de peso, consumo de alimento, ↑ níveis maternos de colesterol, triglicerídeo, glicose, proteína, e creatinina, e ↓ níveis de estradiol e progesterona, ↓ número de fetos nascidos vivos e ↑ reabsorções e malformações esqueléticas, viscerais e externas	150	FARAG et al., 2011
Hamsters	Oral (gavagem)	Única (período de perifertilização: meiose, ovulação e fertilização)	10 fêmeas/grupo	95%	I: 0, 250, 500, 750 ou 1.000 (durante a meiose I) II: 0 ou 1.000 (durante a meiose II)	- Exposição I: ↓ número de fêmeas grávidas, e as que tiveram sucesso ↓ número de fetos nascidos vivos (todas as doses), perdas pré e pós implantação - Exposição II: ↓ no número de fetos nascidos vivos - Exposição durante os eventos da meiose dependentes de microtúbulos afetam negativamente a gestação	<250	PERREAULT et al., 1992
Hamsters	Oral (gavagem)	Única (na fase proestro, na maturação meiótica dos oócitos)	10 fêmeas/grupo	95%	0 ou 1.000	- Oócitos não fertilizados ↑ aneuploidia - ↑ número de embriões que não atingiram o estágio esperado de desenvolvimento e ↓ número de sítios de implantação - Perda gestacional ocorre pela indução de aneuploidia nos oócitos	ND	JEFFAY et al., 1996

↓: diminuição; ↑: aumento; NA: não se aplica; NI: não informado; ND: não determinado; LH: hormônio luteinizante

^a pseudogravidez/gestação: falsa gravidez, induzida por meio da estimulação do cérvix uterino com uma pequena haste, nas fases proestro e estro

5.2.10 Desregulação Endócrina

Os estudos sobre o potencial de causar desregulação endócrina estão descritos na Tabela 7. O carbendazim foi capaz de alterar os níveis de diversos hormônios, tais como a testosterona, LH, FSH, GnRH e T3. Essas alterações são acompanhadas de mecanismos compensatórios (alças de *feedback*). Além das alterações dos níveis hormonais, que nem sempre são detectadas em função dos mecanismos compensatórios, há um estudo que descreve que os efeitos reprodutivos (diminuição de espermatozóides) e sobre o desenvolvimento embrionário do carbendazim podem ser revertidos com a administração concomitante de um antagonista androgênico (LU et al., 2004). Esse estudo demonstra que a ação do carbendazim envolve mecanismos androgênicos podendo ser, portanto, considerado um desregulador endócrino.

Há ainda um estudo *in vitro* que sugere que o carbendazim levaria à feminilização dos animais *in vivo* por induzir a aromatase, uma enzima do citocromo P450 que sintetiza estrógenos pela hidroxilação de andrógenos (MORINAGA et al., 2004). Entretanto, esse efeito (feminilização) não foi confirmado pelo conjunto de dados *in vivo* existentes. Na verdade, o estudo *in vitro* não tem muito peso pois foi realizado com uma única concentração e, além disso, o próprio autor menciona que o resultado era surpreendente já que outras substâncias químicas do grupo imidazol inibiram a atividade aromatase.

Tabela 7 - Estudos para avaliar a atividade desreguladora endócrina do carbendazim

Espécie ou tipo celular	Via	Tempo de Exposição	Número de animais	Pureza do ingrediente ativo	Doses (mg/kg p.c/dia)	Resultados	NOAEL (mg/kg p.c/dia)	Referências
Ratos	Oral (gavagem)	85 dias (a partir de 21 dias de idade)	NI	NI	0, 50, 100, 200 ou 400	- 50 a 100: sem efeito na pituitária ou sobre hormônios testiculares - 200: ↑testosterona no fluido do túbulo seminífero e túbulo da ABP, sem afetar os níveis séricos de testosterona ou de ABP - 400: ↑testosterona no fluido do túbulo seminífero e do túbulo da ABP, dos níveis séricos da ABP, sem afetar os níveis séricos de testosterona - Alterações hormonais consistentes com atrofia testicular	100	REHNBERG et al., 1989
Ratos (CrI:(LE)BR)	Oral (gavagem)	85 dias	7-12/grupo	98,1%	0, 50, 100, 200 ou 400	- ↑ dose relacionado aos níveis séricos de LH e FSH, sem alteração nos níveis de PRL e TSH - Sem alterações nos níveis de GnRH (hipotálamo medio-basal), mas houve ↑ GnRH (hipotálamo anterior) seguido de declínio, dose-relacionado, que sugere que os danos testiculares, causados pelo carbendazim, são acompanhados de alterações compensatórias na regulação do hipotálamo e pituitária sobre os testículos (células de Sertoli)	ND	GOLDMAN et al., 1989
Ratos (suíços, albinos)	Oral (gavagem)	15 semanas	10 machos/grupo	98%	0, 150, 300 ou 600	- 300: ↑ níveis séricos de T3 - 300 e 600: lesões histológicas, dose-relacionadas, na tireóide paratireóide e glândulas adrenais, levando ao hipotireoidismo e atrofia tecidual da tireóide	150	BARLAS et al., 2002

Continua

Continuação da Tabela 7

Espécie ou tipo celular	Via	Tempo de Exposição	Número de animais	Pureza do ingrediente ativo	Doses (mg/kg p.c./dia)	Resultados	NOAEL (mg/kg p.c./dia)	Referências
Ratos (<i>Sprague-Dawley</i>)	Oral (gavagem)	Única, 28 ou 56 dias	5/grupo	99%	I) ♂: 675mg/kg e 50 ou 100mg/kg de flutamida – antagonista de receptor de andrógeno (28 dias) II) Pré-acasalamento de ♀ e ♂: 200mg/kg (28 dias) III) ♂: 25, 50, 100, 200, 400 e 800mg/kg (56 dias) IV) Extrato testículo: 5, 50 e 500M	- I) ↓ peso dos testículos, co-tratamento com antagonista de receptor androgênico evitou ↓ concentração de espermatozóides e alteração da morfologia celular - II) efeitos androgênicos como o incompleto desenvolvimento das trompas uterinas, o alargamento da uretra, ausência de vagina e indução de aparecimento de vesículas seminíferas nas fêmeas da prole - III) ↑ dose-dependente nas concentrações de receptores androgênicos nos testículos e epidídimo - IV) Extrato de testículo de ratos: carbendazim substituiu a ligação da [3H]-5-dihidrotestosterona ao receptor androgênico de modo concentração dependente	ND	LU et al., 2004
Ratos (<i>Wistar</i>)	Oral	80 dias consecutivos (até o acasalamento)	16-22/sexo/grupo	98%	0, 20, 100 ou 200	- Duas maiores doses: ↑ taxa de acasalamento, mas ↓ fertilidade, ↓ peso dos testículos e ↓ contagem de espermatozóides, túbulos seminíferos atróficos, ↓ células germinativas, degeneração e descamação das células germinativas - Maior dose: ↓ LH	20	YU et al., 2009

Conclusão da Tabela 7

Espécie ou tipo celular	Via	Tempo de Exposição	Número de animais	Pureza do ingrediente ativo	Doses (mg/kg p.c/dia)	Resultados	NOAEL (mg/kg p.c/dia)	Referências
Linhagem de células tumorais de ovário "granulosa-like" (KGN)	NA	24 horas	NA	Grau técnico	0 ou 10^{-5} M	- Indução da atividade da aromatase	ND	MORINAGA et al., 2004

↓: diminuição; ↑: aumento

NI: não informado; NA: não se aplica; ND: não determinado

ABP: proteína ligadora de andrógenos; LH: hormônio luteinizante; FSH: hormônio folículo-estimulante; PRL: prolactina; TSH: hormônio estimulador da tireóide; GnRH: hormônio liberador de gonadotrofina

5.2.11 Neurotoxicidade

Um estudo de neurotoxicidade aguda em galinhas (*Leghorn*) demonstrou que o carbendazim causou sinais clínicos agudos (fraqueza de membros inferiores, ataxia) com reversibilidade e baixa severidade. Ainda mais, não houve evidência de neuropatia (degeneração axonal ou demielinização), sendo o NOAEL nesse estudo de 2.500mg/kg p.c./dia (IPCS, 1993).

5.2.12 Imunotoxicidade

Também foi encontrado um estudo de imunotoxicidade em galinhas (*Leghorn*). Nesse estudo, a dose de 200mg/kg p.c./dia provocou uma diminuição nos níveis de linfócitos B e das imunoglobulinas G, M e A, demonstrando que o carbendazim diminuiu (*downregulation*) a resposta humoral (SINGHAL et al., 2003).

5.3 AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO AO CARBENDAZIM

No Brasil, de acordo com o Agrofit (MAPA, 2012), há 33 produtos comerciais formulados registrados a base de carbendazim. Destes, 26 produtos possuem o carbendazim como o único ingrediente ativo, os demais estão associados a outros ingredientes ativos (MAPA, 2012).

Dos 26 produtos formulados contendo apenas carbendazim, 24 são formulações líquidas (suspensão concentrada) e 2 são formulações sólidas (granulado dispersível em água) que serão aplicadas após diluição em veículo, ou seja, também na forma líquida (MAPA, 2012).

Em relação às concentrações de ingrediente ativo, as apresentações comerciais variam de 34% a 75% de ingrediente ativo. Essa maior concentração refere-se à formulação sólida (MAPA, 2012).

Para coleta das doses recomendadas em bula, também foi feita consulta na base de dados do Agrofit para cada produto aprovado e, foram convertidos os valores de volume por hectare para gramas de ingrediente ativo por hectare, a depender da concentração da formulação. Assim, as recomendações de

dose preconizadas em bula são diversas, sendo que a dose máxima recomendada para aplicação foliar é de 500 gramas por hectare. A dose média recomendada é de 250 gramas por hectare (MAPA, 2012).

Ainda, analisando as recomendações nesse banco de dados, os equipamentos de aplicação preconizados são: trator com barra de pulverização (culturas baixas), trator com turbo atomizador (culturas altas, como citros) e aplicação aérea (MAPA, 2012). Desde a Reavaliação Toxicológica do Carbendazim pela Anvisa em 2002, ficou proibida a aplicação costal ou manual de produtos a base desse ingrediente ativo (ANVISA, 2002). A maioria dos produtos constantes no Agrofit têm como recomendação “Proibida a aplicação manual ou costal”, no entanto, em vários produtos não é mencionado sobre essa proibição e é recomendada a aplicação “terrestre”. Outros possuem como recomendação “esse produto não deve ser aplicado com equipamento manual ou costal”, mas não enfatizando que esse uso é proibido (MAPA, 2012).

Para o tratamento de sementes a dose máxima recomendada é de 50 gramas de ingrediente ativo por quilograma de semente (MAPA, 2012).

De acordo com a monografia da Anvisa, a aplicação foliar está autorizada nas seguintes culturas: algodão, citros, feijão, maçã, soja e trigo. No caso do tratamento de sementes estão autorizados: algodão, arroz, feijão, milho e soja (ANVISA, 2012).

A exposição pode ser caracterizada basicamente em duas situações: exposição ocupacional e exposição dietética.

5.3.1 Exposição Ocupacional

A exposição ocupacional ao carbendazim pode ocorrer por meio do contato inalatório ou dérmico, nos ambientes de trabalho. Essa avaliação da exposição ocupacional focou no ambiente agrícola e no tratamento de sementes.

Há, pelo menos, dois cenários gerais em que esse primeiro tipo de exposição pode ocorrer: (a) durante a manipulação e a aplicação (misturadores, que preparam a calda a partir do produto formulado concentrado; abastecedores, que são responsáveis por abastecer os equipamentos de aplicação com essa calda já

preparada e os aplicadores) e; (b) pessoas que entram na área tratada, após a aplicação.

Em relação ao primeiro cenário geral, deve-se considerar também trabalhadores com funções combinadas, por exemplo, o mesmo trabalhador que exerce a atividade de misturador e abastecedor, ou até mesmo de misturador-abastecedor-aplicador e, por último os diferentes tipos de aplicação terrestre (tratorizada com barra de pulverização, tratorizada com turbo atomizador ou aérea, por exemplo), que levarão a exposições diferentes.

A avaliação dos diferentes cenários de exposição foi feita com base no PHED (EPA, 1998b), que apresenta 37 cenários possíveis de exposição. Considerando as recomendações autorizadas no Brasil, coletadas no Agrofite (MAPA, 2012) e descritas no item 5.3, foram identificados os seguintes cenários de exposição do PHED que seriam possíveis no Brasil:

- a) Cenário nº 1: Misturador e abastecedor (M/Ab) de grânulos dispersíveis em sistema aberto;
- b) Cenário nº 3: Misturador e abastecedor (M/Ab) de líquidos em sistema aberto;
- c) Cenário nº 6: Misturador e abastecedor (M/Ab) de líquidos em sistema fechado;
- d) Cenário nº 7: Aplicador (Ap) utilizando aeronave de cabine fechada;
- e) Cenário nº 11: Aplicador (Ap) utilizando trator com turbo atomizador de cabine aberta;
- f) Cenário nº 12: Aplicador (Ap) utilizando trator com turbo atomizador de cabine fechada;
- g) Cenário nº 13: Aplicador (Ap) utilizando trator com barra de pulverização de cabine aberta;
- h) Cenário nº 14: Aplicador (Ap) utilizando trator com barra de pulverização de cabine fechada;
- i) Cenário nº 27: Misturador, abastecedor e aplicador (M/Ab/Ap) utilizando trator com turbo atomizador de cabine aberta;
- j) Cenário nº 28: Misturador, abastecedor e aplicador (M/Ab/Ap) utilizando trator com barra de pulverização de cabine aberta;
- k) Cenário nº 29: Misturador, abastecedor e aplicador (M/Ab/Ap) utilizando trator com barra de pulverização de cabine fechada.

Ainda, para cada cenário, deve-se considerar a utilização dos equipamento de proteção individual – EPI. Nesse caso, foram consideradas para o cálculo três situações distintas de uso de EPI: a) sem EPI; b) com macacão, sem luvas e com máscara simples para pó/névoas e c) com todos os EPIs: macacão, luvas e máscara para vapores orgânicos.

As Unidades de exposição dérmica e inalatória (UED e UEI) foram obtidas do PHED, de estudos com resultados de alta confiança e qualidade (EPA, 1998b). Nesse banco de dados há valores para a maioria dos cenários mencionados incluindo as questões dos EPIs. Aqueles cenários em que informações de determinados EPIs não estão disponíveis, foram feitos cálculos de estimativas de proteção conforme recomendação do PHED, considerando que o macacão fornece 50% de redução da exposição, luvas 90% de redução de exposição, máscara para pós/névoas fornecem 80% de redução da exposição e máscara para vapores orgânicos 90% de redução da exposição (EPA, 1998b).

Não estão disponíveis no PHED três cenários de exposição possíveis no Brasil que são a atividade combinada de M/Ab de grânulos dispersíveis em sistema fechado, M/Ab/Ap utilizando aeronaves e M/Ab/Ap utilizando trator com barra de pulverização em cabine fechada. No entanto, os cenários existentes no PHED já permitem uma avaliação crítica e fornecem subsídio para inferir que as atividades combinadas levam a exposições ainda maiores e os sistemas fechados minimizam a exposição.

Além disso, não há dados no PHED para o cenário de exposição potencial pós-aplicação.

Os valores de unidades de exposição para cada cenário exposição possível no Brasil e disponíveis no PHED estão descritos na Tabela 8.

Conforme já relatada, a dose máxima de aplicação (uso), de acordo com a autorização/registo no Brasil é de 500 gramas de ingrediente ativo por hectare.

Não existem valores padrões oficiais de áreas diárias tratadas no Brasil, uma vez que os órgãos governamentais ainda não regulamentaram a avaliação de risco ocupacional no Brasil. No Workshop “Avaliação da exposição de Misturadores, Abastecedores e Aplicadores de agrotóxicos”, organizado pela Associação Nacional de Defesa Vegetal – ANDEF, foi discutido e proposto padrões

brasileiros de áreas tratadas por dia. A proposta para a atividade combinada de M/Ab foi de 32 ha/dia e de Ap por equipamento tratorizado de 121 ha/dia (CANEZ, 2009). Nessa ocasião, não se propôs valores para área tratada por equipamento aéreo.

Diante disso, para fins de cálculo de exposição, foram adotados esses valores propostos pelo setor produtivo nessa ocasião e, para a aplicação aérea, foram adotados os valores norte-americanos utilizados nas avaliações de risco da EPA e disponíveis no documento “*Standard values for daily acres treated in agriculture*” (SACP, 2001), que para cenários de culturas como a soja e algodão é estabelecido como sendo 1200 acres/dia, equivalente a 485 ha/dia.

A estimativa da exposição diária pela via dérmica - EDD (em mg i.a./kg p.c./dia) pode ser calculada pela seguinte fórmula:

$$\begin{aligned} & \text{Exposição diária pela via dérmica (mg i.a./kg p.c./dia)} = \\ & = \frac{\text{unidade de exposição dérmica(mg/kg ia)} \times \text{uso(kg ia/ha)} \times \text{Área Diária Tratada(ha/dia)}}{\text{Peso corpóreo (kg)}} \end{aligned}$$

De modo similar, a estimativa da exposição diária pela via inalatória - EDI (em mg i.a./kg p.c./dia) pode ser calculada da seguinte fórmula:

$$\begin{aligned} & \text{Exposição diária pela via inalatória (mg i.a./kg p.c./dia)} = \\ & = \frac{\text{unidade de exposição inalatória(mg/kg ia)} \times \text{uso(kg ia/ha)} \times \text{Área Diária Tratada(ha/dia)}}{\text{Peso corpóreo (kg)}} \end{aligned}$$

Além disso, nessa fórmula de exposição dérmica, pode ainda ser multiplicado no numerador a taxa de absorção da substância em humanos. No caso do carbendazim, não foram encontrados estudos para avaliar a taxa de absorção dérmica em humanos nas bases de dados utilizadas.

Segundo o guia Sanco/222/2000 da Comissão Europeia (EC, 2004), intitulado “*Guidance Document on dermal absorption*”, deve-se ter critérios para a tomada de decisão em relação às taxas de absorção a serem utilizadas nos cálculos. Esses critérios estabelecem que se a molécula possuir um peso molecular maior que 500 e o coeficiente de partição óleo/água (log octanol-água) for menor

que -1 ou maior que 4 utiliza-se 10% como valor de taxa de absorção dérmica, caso contrário, assume-se 100% de taxa de absorção dérmica (DE HEER, 1999). No caso do carbendazim, foi considerada uma taxa de absorção dérmica de 100% em função de ter o peso molecular de 191,2 (menor que 500), coeficiente de partição de 1,49 (entre -1 e 4) e pela ausência de estudos de absorção dérmica em humanos.

A Tabela 8 mostra a estimativa da EDD e EDI. O peso corpóreo do trabalhador foi assumido como 70 kg.

Tabela 8 - Exposição diária pela via dérmica (EDD) e inalatória (EDI) nos diferentes cenários de exposição

Cenários	EPI ^a	UED (mg/kg ia)	UEI (µg/kg ia)	Dose (kg ia/ha)	Área tratada (ha/d)	EDD (mg ia/kg p.c./dia)	EDI (mg ia/kg p.c./dia)
M/Ab – Grânulos Dispersíveis - Sistema Aberto	Sem	2,425	1,698	0,5	32	0,55431	0,00039
	Intermediário	0,146	0,340			0,03326	0,00008
	Completo	0,146	0,170			0,03326	0,00004
M/Ab – Líquido - Sistema Aberto	Sem	6,834	2,646	0,5	32	1,56213	0,00060
	Intermediário	6,393	0,529			1,46135	0,00012
	Completo	0,051	0,265			0,01159	0,00006
M/Ab – Líquido - Sistema Fechado	Sem	0,379 ^b	0,183	0,5	32	0,08667	0,00004
	Intermediário	0,190 ^b	0,037			0,04334	0,00001
	Completo	0,019	0,018			0,00433	0,00000
Ap Aéreo - Cabine Fechada	Sem	0,011	0,150	0,5	485	0,03819	0,00052
	Intermediário	0,011	0,030			0,03819	0,00010
	Completo	0,005	0,015			0,01680	0,00005
Ap -Tratorizado Turbo Atomizador - Cabine Aberta	Sem	4,850	9,921	0,5	121	4,19193	0,00857
	Intermediário	0,794	1,984			0,68595	0,00171
	Completo	0,529	0,992			0,45730	0,00086
Ap -Tratorizado Turbo Atomizador - Cabine Fechada	Sem	0,838 ^b	0,992	0,5	121	0,72406	0,00086
	Intermediário	0,419 ^b	0,198			0,36203	0,00017
	Completo	0,042	0,099			0,03620	0,00009
Ap -Tratorizado Barra de Pulverização - Cabine Aberta	Sem	0,101	1,631	0,5	121	0,08765	0,00141
	Intermediário	0,031	0,326			0,02668	0,00028
	Completo	0,031	0,163			0,02668	0,00014
Ap -Tratorizado Barra de Pulverização - Cabine Fechada	Sem	0,022	0,095	0,5	121	0,01905	0,00008
	Intermediário	0,011	0,019			0,00953	0,00002
	Completo	0,011	0,009			0,00972	0,00001
M/Ab/Ap Tratorizado Turbo Atomizador - Cabine Aberta	Sem	57,320	46,297	0,5	121	49,54102	0,04001
	Intermediário	28,660 ^b	9,259			24,77051	0,00800
	Completo	2,866 ^b	4,630			2,47705	0,00400
M/Ab/Ap Tratorizado Barra de Pulverização - Cabine Aberta	Sem	1,940	2,866	0,5	121	1,67677	0,00248
	Intermediário	0,816	0,573			0,70501	0,00050
	Completo	0,126	0,287			0,10861	0,00025
M/Ab/Ap Tratorizado Barra de Pulverização - Cabine Fechada	Sem	0,485	0,772	0,5	121	0,41919	0,00067
	Intermediário	0,196	0,154			0,16958	0,00013
	Completo	0,064	0,077			0,05526	0,00007

^a “Sem”: não utilização de qualquer EPI; “Intermediário”: utilização de macacão, sem luvas e com máscara para pós/névoas, e, “Completo”: utilização de macacão, luvas e máscara para vapores orgânicos.

^b Dados extrapolados a partir de estimativas de proteção conforme recomendação do PHED

Conforme já comentado, o PHED não possui o cenário de tratamento de sementes. Para essa atividade foi utilizado o programa SeedTropex®. Para essa avaliação da exposição os seguintes cenários são combinados: calibração, M/Ab (preparo da calda e abastecimento), ensacamento das sementes tratadas e limpeza dos equipamentos e do local onde foi feito o tratamento. Para os valores de frequência da operação foram utilizados os valores padrões do programa, considerando para cada atividade o pior cenário de 1h/dia (calibração), 5h/dia (M/Ab), 8h/dia (ensacamento) e 1h/dia (limpeza). As taxas padrões de absorção dérmica e inalatória do programa são de 10% e 100%, respectivamente. O peso corpóreo do trabalhador foi mantido em 70 kg e a dose máxima tratada de 50g i.a./kg semente, conforme consta em bula.

Considerando esses cálculos, o valor total de exposição pelas vias dérmica e inalatória para o tratamento de sementes, gerado pelo SeedTropex®, foi de 0,0253mg/kg p.c./dia (Tabela 9).

Tabela 9 - Exposição total pelas vias dérmica e inalatória gerada pelo SeedTropex®

Atividade	Exposição dérmica (mg/h)	Exposição inalatória (mg/h)	Frequência da exposição (h/dia)	Exposição dérmica (mg/dia/pessoa)	Exposição Inalatória (mg/dia/pessoa)
Calibração	0,71	0,05	1	0,7114	0,05
M/Ab	0,260	0,006	5	1,2980	0,032
Ensacamento das sementes	0,698	0,054	8	5,58	0,432
Limpeza	4,17	0,08	1	4,1682	0,08
Taxa de absorção				10%	100%
Total exposição (mg/kg p.c./dia)				0,0253	

5.3.2 Exposição Dietética

A população em geral pode estar exposta ao carbendazim por meio da ingestão de alimentos e água contendo resíduos desse agrotóxico. Pela ausência de limites de resíduos em água, leite, ovos e carne para essa substância, a avaliação da exposição dietética se focou apenas na exposição de alimentos de origem vegetal (culturas agrícolas).

De acordo com a monografia da Anvisa o carbendazim está autorizado para as culturas de algodão, arroz, citros, feijão, maçã, milho, soja e trigo e para cada cultura está estabelecido o limite máximo de resíduos (LMR), conforme consta no Quadro 2 (ANVISA, 2012).

Cultura	LMR (mg/kg)
Algodão	0,1
Arroz	0,05
Citros	5,0
Feijão	2,0
Maçã	5,0
Milho	0,05
Soja	0,5
Trigo	0,1

Quadro 2: Culturas autorizadas para o carbendazim e respectivos LMRs

Fonte: ANVISA, 2012

De acordo com a POF do IBGE (IBGE, 1995), no Brasil, e considerando os LMRs de cada cultura, o consumo máximo diário de resíduos de carbendazim em culturas autorizadas é de 0,845mg de carbendazim por pessoa.

É válido ressaltar ainda que o carbendazim é um metabólito gerado após a aplicação do agrotóxico tiofanato-metílico, que possui outras culturas autorizadas além dessas de uso direto do carbendazim. Assim, o carbendazim pode ainda estar presente em outras culturas. No entanto, nesse primeiro momento e considerando o objetivo dessa avaliação, apenas serão avaliadas as culturas em que o carbendazim é aplicado diretamente, e não o uso de outros agrotóxicos que também podem gerar carbendazim. Os dados de monitoramento do PARA ainda revelam que além das culturas autorizadas para o uso do carbendazim, e das culturas autorizadas para o tiofanato-metílico, que também geram carbendazim, outras culturas também apresentavam resíduos de carbendazim, além daquelas autorizadas, mas com resíduos acima dos limites máximos permitidos. O relatório apontou o carbendazim como o principal agrotóxico com o uso irregular (ANVISA, 2010).

5.4 CARACTERIZAÇÃO DO RISCO AO CARBENDAZIM

5.4.1 Principais Aspectos da Toxicidade

Com base nos estudos avaliados, o carbendazim é altamente absorvido (mais que 80% da dose administrada), amplamente distribuído aos tecidos e com um baixo potencial de bioacumulação. É bastante biotransformado e excretado principalmente pela urina.

A toxicidade aguda do carbendazim é relativamente baixa, e, de acordo com a monografia da Anvisa está classificado como “III – Medianamente Tóxico”. Assim, a toxicidade aguda não é o principal ponto de preocupação toxicológica.

O conjunto de evidências apresentadas não possibilita demonstrar que o carbendazim causa mutações gênicas herdáveis. Os resultados positivos para mutagenicidade parecem decorrer da presença de impurezas de síntese da classe das fenazinas.

Os principais efeitos do carbendazim são consequentes da sua interação com os microtúbulos. Todos os eventos celulares dependentes de microtúbulos são afetados em função desse modo de ação (MOA).

O primeiro efeito que pode ser relatado decorrente dessa interação com os microtúbulos são as aberrações cromossômicas numéricas. O carbendazim causou aneuploidias, poliploidias e micronúcleos resultantes das aberrações cromossômicas numéricas, em estudos *in vitro* e *in vivo*, em diferentes modelos experimentais (Tabela 2). A polimerização dos microtúbulos é essencial para a correta segregação cromossômica, tanto no processo de mitose como de meiose. A polimerização incorreta desses microtúbulos, em função da ligação do carbendazim à β -tubulina, impede que a segregação cromossômica ocorra adequadamente. Esse efeito é dose-dependente, conforme relatados nos próprios estudos, pois quanto mais moléculas de carbendazim se ligarem à β -tubulina, mais prejudicada será a polimerização dos microtúbulos e a segregação cromossômica.

Ainda analisando os dados da Tabela 2, é possível verificar que o carbendazim não causou aberrações cromossômicas estruturais e que, em alguns estudos específicos para avaliação de micronúcleos, os resultados foram negativos.

É válido ressaltar o estudo de De Stoppelaar et al. (1999) que demonstrou que os modelos experimentais em ratos têm uma sensibilidade menor para detectar micronúcleos em eritrócitos periféricos do que diploidias em espermatozóides. Isso pode explicar os resultados negativos encontrados em alguns estudos, quando avaliada apenas a presença de micronúcleos em eritrócitos periféricos, já que esse efeito não seria o mais crítico para machos, por exemplo.

As aberrações cromossômicas numéricas podem levar ao aparecimentos de tumores em células somáticas. Os estudos crônicos e de carcinogenicidade demonstraram que o carbendazim tem um potencial carcinogênico para fígado de duas linhagens diferentes de camundongos, com dose-dependência. Em ratos, o carbendazim causou aumento do peso do fígado, atrofia testicular e proliferação nas células parafoliculares da tireóide, mas não foi considerado carcinogênico pelos autores. Em cães, também houve atrofia testicular e inibição da espermatogênese (Tabela 4). Assim, o carbendazim foi considerado carcinogênico para duas linhagens diferentes de camundongos.

A revisão de McCarroll et al. (2002) sobre a aneuploidia causada pelo carbendazim indicou que não há evidência de um MOA alternativo além da aberração cromossômica numérica. No entanto, segundo esses autores, a relação desse MOA e a carcinogenicidade em camundongos não está esclarecida, pela ausência de estudos dessa natureza em camundongos, de estudos *in vivo* sobre aneuploidia no fígado, gerando incertezas se a carcinogenicidade em camundongos é de fato causada por esse MOA (MCCARROLL et al., 2002).

Em relação à toxicidade reprodutiva, o carbendazim causa efeitos adversos bastante severos e também relacionados à interação com a β -tubulina, e todas as consequências da polimerização não adequada dos microtúbulos.

É válido ressaltar toda a cadeia de efeitos causados à reprodução de machos, em especial às células germinativas e todas as etapas da espermatogênese.

Durante a formação do embrião, as células germinativas migram para os túbulos seminíferos dos testículos e se tornam espermatogônias, que são células germinativas imaturas. A espermatogênese é o processo pelo qual as espermatogônias se tornam espermatozóides maduros e é estimulada por meio da liberação de hormônios gonadotróficos produzidos pela pituitária. A partir dessa

estimulação, as espermatogônias ($2n$) entram em mitose, se diferenciam em espermatócitos primários ($2n$) que por sua vez entram em meiose I produzindo os espermatócitos secundários (n). Uma segunda divisão meiótica ocorre produzindo espermatídes haplóides esféricas (n). A partir desse processo, começa a espermiogênese em que as espermatídes esféricas se diferenciam a espermatídes alongadas e, posteriormente se diferenciam em espermatozóides maduros (GUYTON; HALL, 2011).

Praticamente todos os eventos da espermatogênese são dependentes de microtúbulos, o que explica o motivo pelo qual o carbendazim causa tantos efeitos adversos à reprodução dos machos.

Primeiramente, nas etapas de mitose e meiose, conforme já discutido, a interação do carbendazim com a β -tubulina prejudica a segregação adequada dos cromossomos. A consequência desse evento são espermatozóides com aberrações cromossômicas numéricas ou mesmo células imaturas com esse efeito. A inibição da espermatogênese, já relatada em estudos crônicos de cães e ratos (Tabela 4), a diminuição da fertilidade observada em inúmeros estudos de reprodução (Tabela 5), podem ser consequência desse primeiro efeito. Ainda, as perdas gestacionais e malformações vistas nas fêmeas (GRAY et al., 1990) também podem ser resultantes de espermatozóides com poliploidias, por exemplo. Ou seja, esse efeito na segregação cromossômica já é um passo crucial para a inibição da espermatogênese causada pelo carbendazim ou para a produção de espermatozóides com aberrações cromossômicas numéricas que podem levar tanto à embriofetividade como a malformações embriofetais.

Além disso, a atuação do carbendazim durante a meiose dos espermatócitos, levando a anormalidades morfológicas das espermatídes e inibindo a espermatogênese é um evento que ocorre independentemente da oclusão dos dutos eferentes, que também é um efeito causado pelo carbendazim (NAKAI; HESS., 1997).

Outro evento na toxicidade reprodutiva do carbendazim é a descamação de células germinativas e fragmentos de células de Sertoli para o lúmen dos túbulos seminíferos, levando ao aumento do diâmetro dos túbulos e atrofia, conforme demonstrado em diversos estudos (NAKAI et al., 1992, NAKAI et al., 1994, NAKAI et al., 2002, MOFFIT et al., 2007).

As células de Sertoli têm muitas funções importantes, entre elas de sustentação e de transporte, em direção ao lúmen dos túbulos, das espermatogônias durante sua diferenciação e desenvolvimento. No estudo de Nakai et al. (1994), foi demonstrado que a porção basal das células de Sertoli tem o número de microtúbulos bastante reduzido enquanto que na apical há uma concentração dos microtúbulos que acabam por fragmentar essa porção celular levando conjuntamente para o lúmen do túbulo as células germinativas, que perdem a adesão ao túbulo. Ou seja, esse efeito de descamação também é dependente da ligação do carbendazim aos microtúbulos, similar ao efeito da colchicina (NAKAI, et al., 1994).

As consequências dessa descamação das células de Sertoli e células germinativas são vistas em diversos estudos, pelo aumento do diâmetro dos túbulos seminíferos, atrofia tubular, oclusão dos dutos eferentes e alteração no peso dos testículos (Tabela 5).

O acrossomo dos espermatozóides é formado a partir das vesículas de lisossomos do complexo de Golgi. Essa formação e transporte para a cabeça dos espermatozóides pela migração das vesículas de Golgi, bem como a redistribuição do citoplasma e alongamento celular são processos dependentes das manchetes, que são anéis de microtúbulos responsáveis pela diferenciação celular de espermátides circulares para alongadas (FAWCETT et al., 1977). Assim, outro efeito do carbendazim decorrente da interação com a β -tubulina também ocorre durante a espermiogênese na formação dos acrossomos dos espermatozóides. Nakai et al. (1997, 1998) demonstraram que o carbendazim leva a anomalias no formato do núcleo e da morfologia dos acrossomos nas espermátides, resultando em acrossomos descontínuos, multivesiculares ou ausentes, e que essa configuração anormal dos acrossomos é causada pela configuração anormal das manchetes. Esses autores ainda sugerem que é possível que esse efeito sobre as manchetes resulte na inibição da síntese e transporte de proteínas necessárias para a formação do acrossomo a partir do aparelho de Golgi (NAKAI et al., 1997).

Ainda, foi visto em vários estudos a diminuição da motilidade dos espermatozóides (Tabela 5). Esse efeito não foi elucidado a fundo pelos autores, mas pode ser decorrente das anormalidades morfológicas causadas pelas

aberrações cromossômicas numéricas dos espermatozoides, bem como pelo efeito direto sobre os microtúbulos presentes no flagelo.

A partir do conjunto de evidências dos efeitos do carbendazim sobre os microtúbulos durante a espermatogênese, foi possível gerar uma representação esquemática propondo os diversos modos de ação desse agrotóxico em cada etapa da espermatogênese (Figura 4).

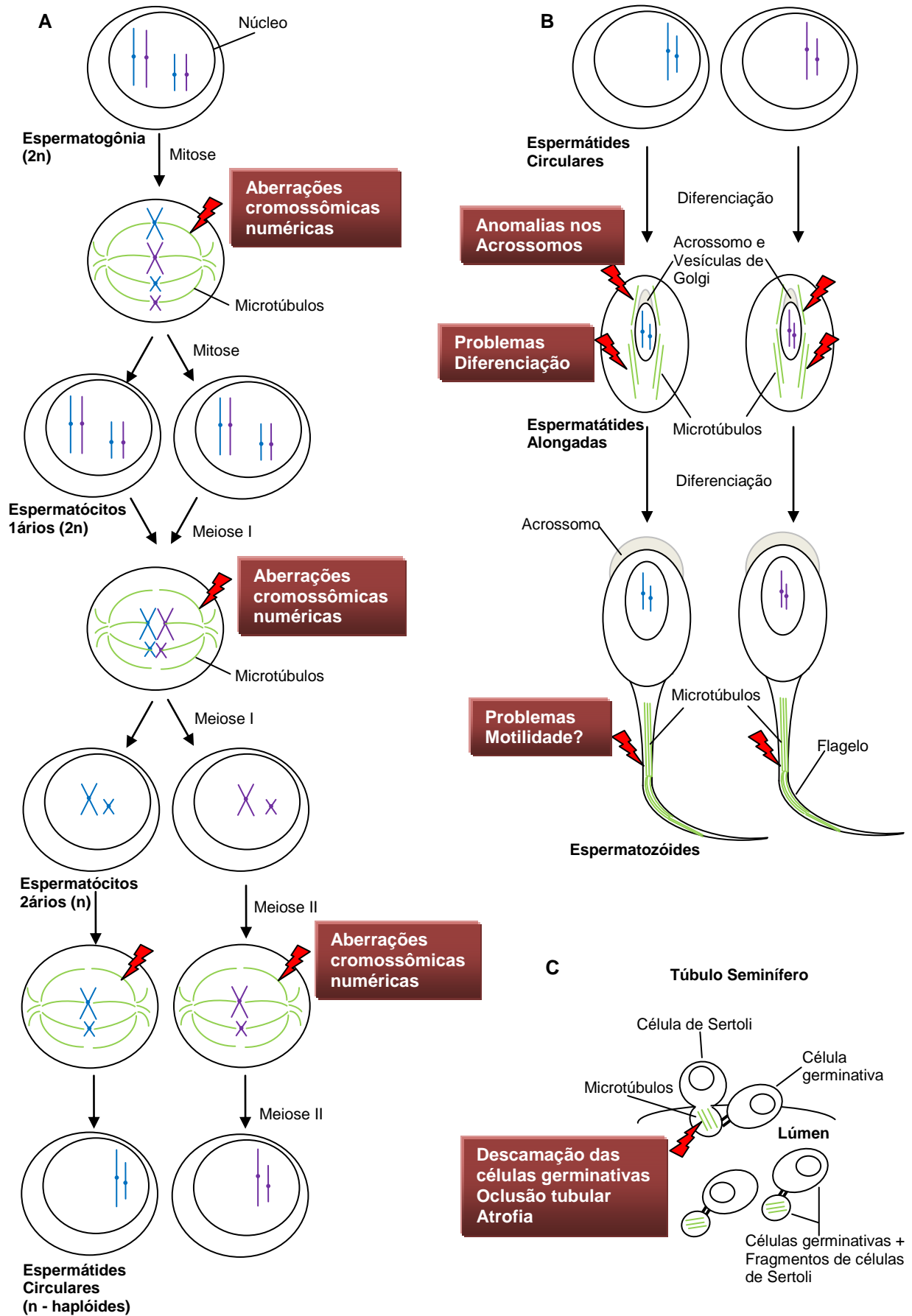


Figura 4 - Representação esquemática do modo de ação do carbendazim em cada etapa da espermatogênese, decorrente de sua interação com os microtúbulos. A) Efeitos durante a mitose das

espermatogônias e meioses I e II que geram as espermatídes circulares haplóides, B) Efeitos sobre a espermiogênese, C) Efeitos sobre as células de Sertoli e germinativas. Sinalizações em vermelho indicam os potenciais modos de ação do carbendazim e, as informações nos retângulos, as consequências possíveis dessa ação.

Quando machos e fêmeas foram expostos ao carbendazim, além dos efeitos já descritos em machos, houve perdas pós-implantação e malformações dos filhotes (GRAY et al., 1988; 1990). Esse efeito pode ser decorrente de espermatozóides com aberrações cromossômicas numéricas, bem como erros nas segregações cromossômicas durante as inúmeras mitoses do período de embriogênese.

Essa segunda hipótese é confirmada quando apenas as fêmeas são expostas ao carbendazim e ainda sim são vistos inúmeros efeitos como: diminuição no número de sítios de implantação, perdas pós-implantação, reabsorções, embriofetividade, retardos de ossificação e malformações embriofetais (Tabela 6). Mesmo quando as fêmeas são expostas no início da gestação (1ª semana), os efeitos sobre o desenvolvimento embriofetal são severos (Tabela 6). O carbendazim provocou malformações embriofetais para três espécies distintas: coelhos, ratos e camundongos.

Ainda, quando as fêmeas são expostas durante a maturação dos oócitos, também é possível observar aneuploidias desse tipo celular, justificando a sua não-fertilização. Novamente, esse efeito é consequência da ação direta do carbendazim interferindo na polimerização dos microtúbulos, impedindo a correta segregação cromossômica (PERREAULT et al., 1992, JEFFAY et al., 1996).

Além dos efeitos diretos sobre a polimerização dos microtúbulos, os efeitos tóxico-reprodutivos também parecem relacionar-se a uma ação direta do carbendazim como desregulador endócrino. Esse efeito pode ser confirmado por Lu et al. (2004) que demonstraram que o carbendazim tem uma ação direta sobre os receptores de andrógenos, e os efeitos androgênicos foram revertidos quando se administrou um antagonista de receptor de andrógeno. Além disso, muitos autores mostram a estimulação de vários hormônios como testosterona, LH, FSH, GnRH e T3, alterações que estão acompanhadas de mecanismos compensatórios, as alças de retroalimentação ou *feedback* (Tabelas 6 e 7). Para essas alterações, não se sabe ao certo como elas ocorrem, principalmente porque os mecanismos compensatórios acabam confundindo quais eventos ocorrem primeiro e quais são

causa ou consequência de outros. Por exemplo, o fato de o carbendazim inibir a espermatogênese por efeito direto na polimerização dos microtúbulos poderia estimular o aumento nos níveis de FSH, para que a espermatogênese seja induzida pelas células de Sertoli e, posteriormente a essa estimulação, poderia ocorrer algum mecanismo compensatório de controle. O estudo de Goldman et al. (1989) demonstra um aumento inicial de FSH, bem como de GnRH e LH, mas descrevem que, posteriormente, há um declínio de GnRH, como mecanismo compensatório. Esses efeitos também poderiam ser devido ao fato de o carbendazim agir diretamente sobre os receptores androgênicos, assim esses mecanismos compensatórios poderiam ser consequência dessa ação direta nos receptores, independentemente do efeito sobre os microtúbulos.

Além disso, é válido ressaltar o trabalho de Yu et al. (2009) que reforça o efeito androgênico direto do carbendazim. Nesse trabalho, houve aumento na taxa de acasalamento dos animais, enquanto que a fertilidade foi diminuída e ambos os efeitos podem ser explicados pela ação androgênica do carbendazim, tanto sendo um efeito direto sobre os receptores androgênicos ou aumentando inicialmente os níveis de testosterona, que por *feedback* negativo, levam à diminuição dos níveis de LH. Nesse segundo caso, a hipótese levantada é que o carbendazim estimule diretamente as células de Leydig a aumentar a síntese de testosterona, diminuindo os níveis de LH, explicando o efeito androgênico pelo aumento da taxa de acasalamento, mas diminuição da fertilidade. A diminuição da fertilidade, por sua vez, também pode ser decorrente da ação do carbendazim sobre a polimerização dos microtúbulos durante a espermatogênese, inibindo-a diretamente.

Os efeitos androgênicos diretos também foram observados em filhotes fêmeas, pelo desenvolvimento incompleto das trompas uterinas, alargamento da uretra, ausência de vagina e presença de vesículas seminíferas. Além disso, o carbendazim aumentou a expressão de receptores androgênicos *in vivo* e substituiu a ligação de dihidrotestosterona nos receptores de andrógeno *in vitro*, de modo concentração-dependente. Os autores concluem que o carbendazim é um desregulador endócrino e que isso se comprova por seus efeitos androgênicos e/ou dependentes de receptores de andrógenos (LU et al., 2004).

A representação esquemática da Figura 5 ilustra os principais modos de ação do carbendazim em machos, levando à desregulação endócrina, a partir dos dados avaliados.

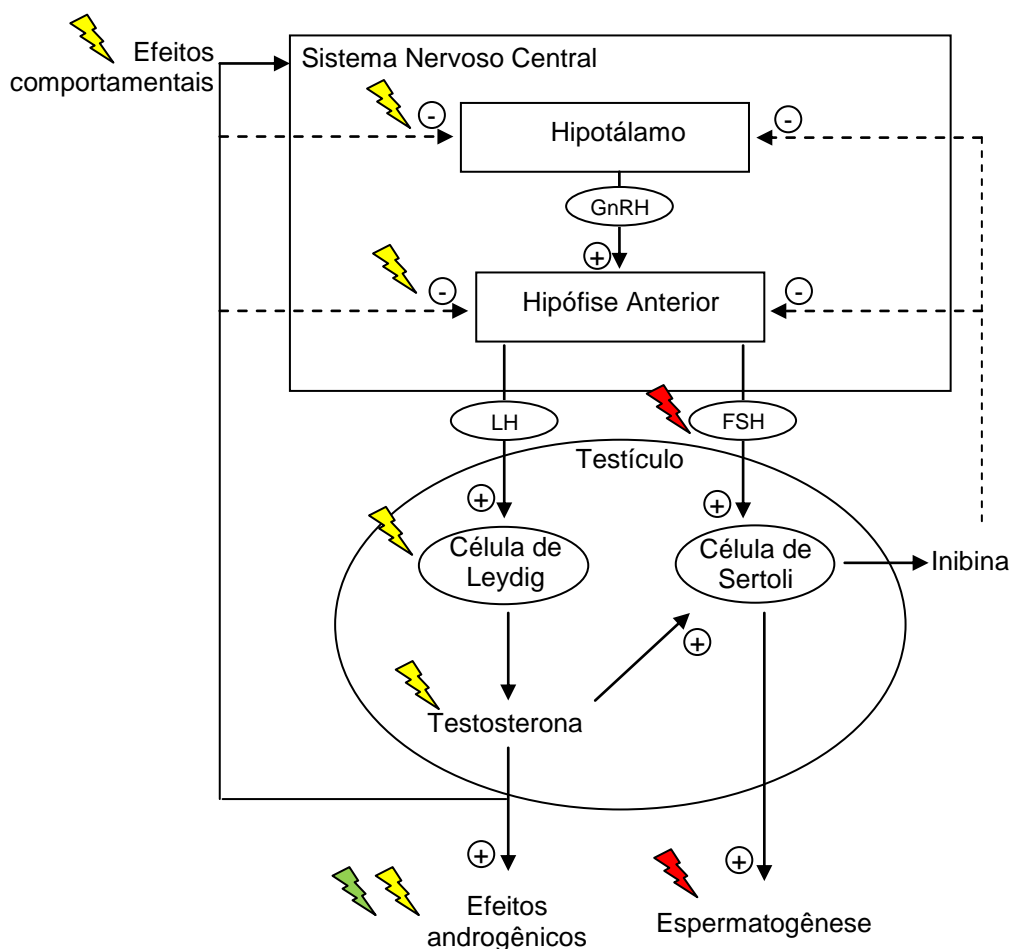


Figura 5 - Representação esquemática do modo de ação do carbendazim, decorrente de sua ação endócrina. Sinalização em vermelho: A inibição da espermatogênese leva ao aumento nos níveis de FSH, para que a espermatogênese seja estimulada pelas células de Sertoli e, em um segundo momento, por *feedback* negativo, pode haver sua diminuição. Sinalização em verde: Carbendazim compete pelos receptores de andrógenos e aumenta a expressão desses receptores, levando a efeitos androgênicos diretos, que por sua vez levam a efeitos comportamentais e por *feedback* negativo, diminui os níveis de GnRH, LH e FSH. Sinalização em amarelo: O carbendazim estimula diretamente as células de Leydig a aumentarem a síntese de testosterona, o que leva aos efeitos androgênicos, aumenta a taxa de acasalamento e por *feedback* negativo, diminui GnRH, LH e FSH e a fertilidade.

A definição científica de desregulador endócrino estabelecida pela IPCS/OMS é: “um desregulador endócrino é uma substância ou mistura que altera a função(ões) do sistema endócrino e conseqüentemente causa efeitos adversos em um organismo intacto ou sua progene ou (sub)populações” (WHO, 2002).

Considerando as evidências de efeitos androgênicos sobre os machos, fêmeas e a prole, bem como essa definição, o carbendazim pode ser considerado como um desregulador endócrino.

Além desses efeitos, o carbendazim também causou neurotoxicidade aguda e efeitos sobre o sistema imunológico.

Em dois estudos em humanos, feito com trabalhadores de fábricas expostos ao carbendazim não houve relato de efeitos adversos, no entanto, não foi feita a avaliação da espermatogênese dos trabalhadores, que é um dos principais alvos do carbendazim (IPCS, 1993). Em outro estudo, apesar do baixo tamanho da amostra e de a exposição ao carbendazim ocorrer concomitantemente com outros agrotóxicos, houve um aumento do risco para abortos espontâneos de esposas de trabalhadores em estufa expostos a carbendazim, benomil, atrazina, carbaril ou DDT, apresentando uma razão de chances - *odds ratio* - ajustada de 11,8 com intervalo de confiança de 2,3 a 59,6 (PETRELLI et al., 2003). Apesar das limitações desse estudo, o mesmo parece reforçar os resultados dos estudos conduzidos em animais experimentais de que um dos principais efeitos do carbendazim é sobre o sistema reprodutor, afetando inclusive mulheres não expostas, cujos maridos foram expostos ocupacionalmente.

A toxicidade reprodutiva e sobre o desenvolvimento embriofetal foram os efeitos mais pronunciados decorrentes da exposição ao carbendazim. O valor de NOAEL mais crítico observado foi cerca de 10mg/kg p.c./dia, de estudos de toxicidade sobre o desenvolvimento embriofetal em coelhos e ratos. Além disso, essa avaliação de risco partiu da premissa que o MOA do carbendazim possui uma relação dose-resposta, com uma dose a partir da qual os efeitos ocorrem (*threshold*), considerando as evidências apontadas por Kirsch-Volders et al. (2003), bem como dos diversos estudos desse levantamento, incluindo o referido estudo mais crítico, cujo NOAEL foi de 10mg/kg p.c./dia.

5.4.2 MOE nos Diferentes Cenários de Exposição Ocupacional e o Risco durante o Tratamento de Sementes

Baseado nos cálculos de exposição diária dérmica e inalatória para o carbendazim nos diferentes cenários (Tabela 8), é possível quantificar a Margem de Exposição para cada situação específica (Tabela 10).

O valor de NOAEL de 10mg/kg p.c./dia proveniente dos estudos de toxicidade sobre o desenvolvimento embriofetal conduzido em ratos e coelhos foi o escolhido, já que o efeito reprodutivo e sobre o desenvolvimento embriofetal são aqueles mais críticos dessa molécula.

Foi utilizado o “Método 2” do documento da EPA para calcular o MOE total, em que versa sobre a escolha de um *endpoint* oral para a avaliação de risco agregado pelas outras vias de exposição, inalatória e dérmica (EPA, 1997). Isso ocorre em função do evento adverso selecionado ter sido estudado experimentalmente apenas em estudos de exposição oral, que foi o caso do efeito sobre o desenvolvimento embriofetal ter sido conduzido apenas pela via oral de ratos e coelhos.

A agregação de risco foi feita utilizando-se a seguinte equação, adaptada ao Método 2:

$$MOE_{total} = 1/[(1/MOE_{dérmico}) + (1/MOE_{inalatório})]$$

Onde, $MOE_x = NOAEL/Exposição\ diária\ pela\ via\ x$

Tabela 10 - Determinação da Margem de Exposição (MOE) total nos diferentes cenários de exposição

Cenários	EPI	EDD (mg ia/kg p.c./dia)	EDI (mg ia/kg p.c./dia)	NOAEL (mg/kg p.c./dia)	MOE dérmico	MOE inalatório	MOE total
M/Ab – Grânulos Dispersíveis - Sistema Aberto	Sem	0,55431	0,00039	10	18,04	25772,29	18,03
	Intermediário	0,03326	0,00008		300,68	128861,47	299,98
	Completo	0,03326	0,00004		300,68	257722,94	300,33
M/Ab – Líquido - Sistema Aberto	Sem	1,56213	0,00060		6,40	16537,22	6,40
	Intermediário	1,46135	0,00012		6,84	82686,11	6,84
	Completo	0,01159	0,00006		862,81	165372,22	858,33
M/Ab – Líquido - Sistema Fechado	Sem	0,08667	0,00004		115,38	239092,36	115,32
	Intermediário	0,04334	0,00001		230,75	1195461,82	230,71
	Completo	0,00433	0,00000		2307,52	2390923,64	2305,29
Ap Aéreo - Cabine Fechada	Sem	0,03819	0,00052		261,87	19254,98	258,35
	Intermediário	0,03819	0,00010		261,87	96274,91	261,16
	Completo	0,01680	0,00005		595,15	192549,82	593,32
Ap -Tratorizado Turbo Atomizador - Cabine Aberta	Sem	4,19193	0,00857		2,39	1166,26	2,38
	Intermediário	0,68595	0,00171		14,58	5831,31	14,54
	Completo	0,45730	0,00086		21,87	11662,61	21,83
Ap -Tratorizado Turbo Atomizador - Cabine Fechada	Sem	0,72406	0,00086		13,81	11662,61	13,79
	Intermediário	0,36203	0,00017		27,62	58313,07	27,61
	Completo	0,03620	0,00009		276,22	116626,14	275,57
Ap -Tratorizado Barra de Pulverização - Cabine Aberta	Sem	0,08765	0,00141		114,09	7092,13	112,28
	Intermediário	0,02668	0,00028		374,87	35460,65	370,95
	Completo	0,02668	0,00014		374,87	70921,30	372,90
Ap -Tratorizado Barra de Pulverização - Cabine Fechada	Sem	0,01905	0,00008		524,82	122050,61	522,57
	Intermediário	0,00953	0,00002		1049,64	610253,04	1047,83
	Completo	0,00953	0,00001		1049,05	1220506,09	1048,19
M/Ab/Ap Tratorizado Turbo Atomizador - Cabine Aberta	Sem	49,54102	0,04001	0,20	249,91	0,20	
	Intermediário	24,77051	0,00800	0,40	1249,57	0,40	
	Completo	2,47705	0,00400	4,04	2499,13	4,03	
M/Ab/Ap Tratorizado Barra de Pulverização - Cabine Aberta	Sem	1,67677	0,00248	5,96	4037,06	5,96	
	Intermediário	0,70501	0,00050	14,18	20185,29	14,17	
	Completo	0,10861	0,00025	92,07	40370,59	91,86	
M/Ab/Ap Tratorizado Barra de Pulverização - Cabine Fechada	Sem	0,41919	0,00067	23,86	14994,79	23,82	
	Intermediário	0,16958	0,00013	58,97	74973,95	58,92	
	Completo	0,05526	0,00007	180,97	149947,89	180,75	

Negrito: Cenários aceitáveis (MOE>1000)

Um fator de incerteza (FI) de 100 foi considerado para avaliar as diferenças intra/interespécies em relação aos humanos e um fator adicional de 10 foi agregado em função de: a) presença de malformações embriofetais em duas espécies e os efeitos embriofetais poderem ocorrer em mulheres expostas ocupacionalmente, no início da gestação, período em que nem sabem que estão grávidas (evidência de estudos em animais expostos durante a 1ª semana gestacional - IPCS, 1993 e CUMMINGS et al., 1992); b) efeitos reprodutivos em exposições repetidas a baixas doses, em curto período de tempo, sendo que não foi possível determinar um NOAEL para esses efeitos em machos (NOAEL<25 - RAJESWARY et al., 2007); c) incerteza se a carcinogenicidade em duas linhagens de camundongos pode ser reproduzida em humanos e d) incerteza de qual a dose em que se iniciam os efeitos hormonais. Quando esses fatores de incerteza são utilizados, para ser considerada uma situação de risco aceitável, o MOE deve ser superior a 1000.

Assim, utilizando-se esse NOAEL de 10mg/kg p.c./dia foram calculadas as margens de exposição (MOE) resultantes, de acordo com cada cenário de exposição (Tabela 10).

Apenas dois cenários em que o trabalhador executa apenas uma função e um cenário com atividade combinada apresentaram riscos aceitáveis: 1) M/Ab de líquidos em sistema fechado, com EPI completo; 2) Ap - Tratorizado Barra de Pulverização - Cabine Fechada com EPI intermediário e 3) Ap - Tratorizado Barra de Pulverização - Cabine Fechada com EPI completo.

A atividade combinada M/Ab em sistema aberto não forneceu quaisquer cenários de risco aceitáveis.

A aplicação aérea também não forneceu risco aceitável em nenhum cenário de exposição. Apesar de não haver o cenário no PHED desse tipo de aplicação combinada a outras atividades (M/Ab/Ap Aérea), a partir desse resultado, pode-se inferir que esses cenários possíveis também não teriam riscos aceitáveis.

Nenhum cenário em que o trabalhador exerce atividades combinadas M/Ab/Ap, independentemente do tipo de aplicação apresentaram riscos aceitáveis (valores de MOE variaram entre 0,20 a 180,75).

O pior cenário de aplicação tratorizada se dá quando é feito com turbo atomizador, utilizado para culturas altas, como é o caso do citros. Mesmo a

atividade isolada de aplicação, em cabine fechada, não fornece cenários de risco aceitáveis.

Atividades combinadas M/Ab/Ap, pelo mesmo trabalhador são atividades muito comuns nos cenários de países em desenvolvimento. Ainda, a exposição dos trabalhadores sem EPI é uma realidade no Brasil, e por isso foi considerada nos cálculos. O próprio PHED afirma que esse cenário deve ser considerado no caso de países em desenvolvimento (EPA, 1998b). O uso de tratores de cabine fechada, bem como de preparo misturas, abertura de embalagens e abastecimento de equipamentos em sistema fechado não são a realidade na maior parte do país. Assim, considerando tais situações comuns no Brasil, o carbendazim não apresenta riscos aceitáveis para exposição ocupacional.

Uma outra avaliação alterando a dose de ingrediente ativo por hectare pela metade (250g/ha) foi feita e mesmo assim, as atividades combinadas M/Ab/Ap também não apresentaram riscos aceitáveis. Por outro lado, se o trabalhador utilizar EPI completo é possível um cenário aceitável para atividade de M/Ab tanto em sistema aberto como fechado (MOE 1716 e 4610, respectivamente). Ou seja, mesmo diminuindo a dose pela metade, muitos cenários de exposição comuns no Brasil (atividade combinada M/Ab/Ap e sem EPI) não apresentam riscos aceitáveis.

Além disso, não há dados no PHED para o cenário de exposição potencial pós-aplicação e, assim, não foi avaliada essa exposição.

Para o cenário de tratamento de sementes, utilizando o programa SeedTropex®, conforme já apresentado, o valor total de exposição pelas vias dérmica e inalatória foi de 0,0253mg/kg p.c./dia. Comparando esse valor ao AOEL (NOAEL/FI) de 0,01mg/kg p.c./dia, pode-se notar que essa atividade não oferece risco aceitável, extrapolando o AOEL em 253% aproximadamente. Se for considerada a taxa de absorção dérmica de 100% e não a do valor padrão do programa (10%), o risco fica ainda maior, extrapolando o AOEL em 1765%. Assim, a atividade ocupacional de tratamento de sementes não oferece risco aceitável, de acordo com esse programa.

5.4.3 Ingestão Diária Aceitável (IDA) e Estimativa de Risco para o Cenário de Exposição Dietética

A ingestão diária aceitável, IDA (NOAEL/FI), para o carbendazim foi determinada como 0,01mg/kg p.c./dia, utilizando-se o NOAEL proveniente dos estudos de toxicidade para o desenvolvimento embriofetal em ratos e coelhos, pela via oral. O NOAEL desses estudos são de 10 mg/kg p.c./dia. Um fator de incerteza (FI) de 1000 foi utilizado quando do cálculo da IDA do carbendazim, conforme já discutido no subitem anterior.

Não foi estabelecida a IDA do carbendazim pelo Canadá pois o uso nesse país não é alimentar (HEALTH CANADA, 2011), no entanto, para as outras exposições ela considera um FI de 1000 e NOAEL de 10mg/kg p.c./dia. A EFSA estabeleceu o valor de IDA de 0,02mg/kg p.c./dia, baseado no mesmo valor de NOAEL, mas utilizando um FI de 500 (EC, 2007). A Austrália estabeleceu no ano de 1979 o valor de IDA de 0,03 mg/kg p.c./dia (baseada em um NOEL de 2,5mg/kg de um estudo de 2 anos em cães e fator de incerteza de 100) e mesmo após revisão em 2009, manteve esse valor (APVMA, 2009). Nos EUA, não há autorização do carbendazim como agrotóxico, mas para fins de monitoramento de suco de laranja que podem conter resíduos de carbendazim como o metabólito do benomil e/ou do tiofanato-metílico, estabeleceu-se como valor de exposição crônica para população geral de 0,0025mg/kg p.c./dia (EPA, 2012).

A ingestão diária máxima do carbendazim em culturas autorizadas pode ser calculada pela multiplicação da ingestão/consumo *per capita* de tais culturas (IBGE, 1995) pelo limite máximo de resíduos (LMR) de cada uma, resultando em 0,845mg de carbendazim por dia, por pessoa.

Conforme supracitado, a IDA foi determinada utilizando-se um NOAEL de 10 mg/kg p.c./dia e FI de 1000. Considerando o peso corpóreo médio da população em geral com 60 kg, a IDA *per capita* é de 0,6mg de carbendazim. Desta forma, a ingestão diária máxima impacta em 140,87% da IDA (Tabela 11) e, portanto, o risco do consumo desses alimentos contendo resíduos máximos autorizados é inaceitável.

É importante considerar no risco dietético para a população em geral, as outras culturas que também têm resíduos de carbendazim autorizados

decorrentes do uso do tiofanato-metílico, os dados de monitoramento do PARA que revelaram a presença de resíduos em níveis maiores que os LMRs autorizados e em culturas não autorizadas e, ainda, quando da disponibilização, os dados de consumo e de limites de resíduos de água e outros derivados alimentares como carnes, ovos, aves e outras possíveis fontes de exposição ao carbendazim. No entanto, apenas considerando as culturas autorizadas, o risco já é inaceitável.

Tabela 11 - Cálculo da ingestão diária máxima de carbendazim para culturas autorizadas no Brasil e seu impacto na IDA (em porcentagem)

Culturas	Ingestão anual <i>per capita</i> (kg)	LMR (mg/kg)	Ingestão anual <i>per capita</i> x LMR	Ingestão diária máxima de carbendazim <i>per capita</i> (mg)	IDA (NOAEL/1000)	IDA <i>per capita</i> (mg)	% de Impacto na IDA
Algodão	0,634	0,1	0,063	0,845	0,01	0,6	140,87
Arroz	45,953	0,05	2,298				
Citros	33,680	5,0	168,400				
Feijão	44,882	2,0	89,764				
Maçã	6,374	5,0	31,870				
Milho	12,218	0,05	0,611				
Soja	10,861	0,5	5,431				
Trigo	100,602	0,1	10,060				

5.4.4 Discussão sobre a Caracterização do Risco

Conforme discutido nos itens anteriores, o carbendazim provoca aberrações cromossômicas numéricas, tanto em células somáticas como em germinativas. É carcinogênico para duas linhagens de camundongos, teratogênico para coelhos, ratos e camundongos, provocou toxicidade reprodutiva para cães, ratos, hamsters e camundongos, é um desregulador endócrino tendo como principal efeito hormonal ser androgênico. Ainda exibiu efeitos neurotóxicos agudos e sobre o sistema imunológico.

Com base nesse levantamento, o MOA com os eventos chaves para ocorrência dos efeitos foi possível de ser estabelecido. As avaliações de risco ocupacional e dietética foram feitas, considerando que o MOA do carbendazim (interação à β -tubulina) é um efeito dependente da dose.

A avaliação de risco ocupacional, utilizando o banco de dados PHED para avaliação dos cenários de exposição, demonstrou que apenas três cenários teriam riscos aceitáveis: a atividade combinada (M/Ab) sendo que a segurança se dá apenas com a utilização de sistema fechado e EPI completo, uma realidade pouco usual no Brasil e, quando o trabalhador exerce apenas uma função, de aplicação com trator com barra de pulverização em cabine fechada (EPI intermediário ou completo), o que também não é a realidade comum do Brasil.

A não utilização de EPI é um cenário que o próprio PHED relata ser importante para países em desenvolvimento, como é o caso do Brasil. Para as condições de uso sem EPI, utilizando a dose de 500g/ha, não houve nenhum cenário com risco aceitável. As atividades combinadas M/Ab/Ap, também bastante comuns no Brasil, também não apresentaram nenhum cenário com risco aceitável.

Mesmo quando a avaliação de risco foi feita com metade da dose de aplicação (250g/ha), as atividades combinadas M/Ab/Ap também não apresentaram riscos aceitáveis. Por outro lado, se o trabalhador utilizar EPI completo é possível um cenário aceitável para atividade de M/Ab tanto em sistema aberto como fechado. Ou seja, mesmo diminuindo a dose pela metade, muitos cenários de exposição comuns no Brasil (atividade combinada M/Ab/Ap e sem EPI) não apresentam riscos aceitáveis.

O cenário de exposição após a aplicação não foi avaliado, por não estar disponível no PHED, e deve ser revisto caso outros programas para avaliação de exposição contendo esse cenário sejam disponibilizados.

A atividade de tratamento de sementes, utilizando o programa SeedTropex®, não ofereceu risco aceitável ao trabalhador, mesmo utilizando o valor padrão do programa para a taxa de absorção dérmica de 10%. Quando se utiliza o valor de 100% de absorção dérmica, como foi feito nos cálculos do PHED, o risco é ainda maior.

A exposição dietética ao carbendazim representa uma preocupação para a população em geral, uma vez que a IDA é menor que a ingestão diária máxima deste agrotóxico. Se ainda considerarmos os dados de monitoramento do PARA, os resíduos de carbendazim decorrentes do uso de tiofanato-metílico e outras fontes de exposição alimentares como água, leite, carne e ovos, o risco fica ainda maior.

Apesar de o fator de 1000 ter sido utilizado tanto para avaliação de risco ocupacional como dietética, em função da severidade dos efeitos (ocorrência de malformações embriofetais e efeitos reprodutivos), as incertezas sobre a carcinogenicidade ocorrer em humanos e, por fim, as doses em que ocorrem os efeitos hormonais, essa abordagem de avaliação merece ser discutida, conforme segue, para avaliar se ela foi de fato suficiente.

Primeiramente, o estudo de Rajeswary et al. (2007) demonstrou que os efeitos reprodutivos em machos ocorrem mesmo em doses baixas (25mg/kg p.c./dia) em exposições de 48 dias. Foi observado ainda, toxicidade reprodutiva com diminuição do peso testicular, dos níveis de testosterona sérica e estradiol, diminuição da atividade de enzimas esteroidogênicas e antioxidantes, e aumento da peroxidação lipídica e das espécies reativas de oxigênio. Nessa dose baixa, apesar dos efeitos sobre a testosterona e estradiol, não houve alteração nos níveis de LH, o que os autores discutem que os mecanismos compensatórios de *feedback* não ocorreram nesse nível de dose (RAJESWARY et al, 2007).

Outro estudo que merece destaque por discutir a exposição ao carbendazim em baixas doses em machos pela via intradérmica, relata que mesmo em exposições a doses muito baixas há sinais de toxicidade, e que a curva dose-resposta que descreve os efeitos do carbendazim é uma curva em U, pelo efeito de hormese (MUTHUVIVEGANANDAVEL et al, 2007).

Além disso, ainda fazendo considerações sobre os efeitos em baixas doses, sabe-se que muitos desreguladores endócrinos não apresentam uma curva dose-resposta clássica, monotônica. Na literatura, há trabalhos revelando que compostos com esse potencial de desregulação endócrina exibem efeitos em doses muito baixas, ou seja um comportamento hormético (ASHBY, 2003; WELSHONS et al., 2003). O documento da agência reguladora dinamarquesa sobre estabelecimento de critérios para avaliação de desreguladores endócrinos afirma que é fato que os desreguladores endócrinos podem exibir curvas dose-resposta em U, apresentando efeitos em baixas doses e não apresentando curvas dose-respostas monotônicas (DANISH MINISTRY OF THE ENVIRONMENT, 2011). O documento de definição regulatória para avaliação de desreguladores endócrinos publicado pela Alemanha e Reino Unido também reitera que os desreguladores endócrinos podem não apresentar curvas monotônicas e por isso causam efeitos em

doses muito baixas, muitas vezes não avaliadas em estudos toxicológicos clássicos, mas que esse conceito de não-linearidade não está incorporado às práticas regulatórias de avaliação (BfR, 2011).

Assim, diante das evidências de que, mesmo em doses muito baixas, o carbendazim pode ter efeitos tóxicos, a abordagem clássica de avaliação de risco, que considerou uma avaliação dose-resposta linear monotônica, pode não ser adequada. Considerando que o carbendazim provoca efeitos hormonais (desregulador endócrino), podem ocorrer alterações em níveis hormonais em doses muito baixas, mas não suficientes para levar a mecanismos compensatórios (alças de *feedback*). Em doses baixas, a ausência de efeitos hormonais pode ser atribuída a mecanismos compensatórios e, em doses superiores, os mecanismos compensatórios podem não ser suficientes, tendo assim uma curva dose-resposta linear apenas a partir desses níveis. No entanto, a curva com esse formato em U, não linear, pode não ser observada nos estudos toxicológicos clássicos, por não contemplarem a inclusão dessa dose muito baixa.

Diante disso, mesmo os cenários de riscos aceitáveis, determinados a partir de um NOAEL de um estudo toxicológico clássico, podem ainda levar a efeitos toxicológicos em doses muito mais baixas, não avaliadas nesses estudos, uma vez que os efeitos podem não ser lineares às respostas.

No contexto internacional, EUA, Canadá, Europa e Austrália avaliaram o carbendazim se utilizando da abordagem toxicológica clássica assim como nessa dissertação. No entanto, essas ponderações que ainda residem no campo da pesquisa, devem ser incorporadas às discussões regulatórias, apesar de ainda não existirem soluções para elas (EPA, 2012; HEALTH CANADA, 2011; EC, 2007; APVMA, 2009).

No Brasil, a legislação determina que dependendo das características de toxicidade o agrotóxico deve ser proibido, independentemente dos resultados da avaliação de risco (BRASIL, 1989; BRASIL, 2002). Nesse caso, a partir dos resultados dessa dissertação, pelo fato de o carbendazim ser carcinogênico (duas linhagens de camundongos), teratogênico (coelhos, ratos e camundongos), tóxico-reprodutivo e provocar alterações hormonais, ele deveria ser reavaliado e ter o registro proibido.

O novo regulamento europeu, passou a determinar que independentemente dos resultados das avaliações de risco, critérios de toxicidade como efeitos tóxico-reprodutivos, desregulação endócrina e carcinogenicidade devem ser condições proibitivas de registro de agrotóxicos. O carbendazim está autorizado na Europa até 2014, mas à luz dessa nova legislação e considerando os resultados sobre a toxicidade do carbendazim avaliados nessa dissertação, seu registro também deveria ser proibido nesse continente (UNIÃO EUROPEIA, 2009). O documento sueco que fez uma análise preliminar sobre a aplicação desse novo regulamento nas renovações de registro, listou o carbendazim como sendo proibido de registro à luz dessa nova legislação (SWEDISH CHEMICALS AGENCY, 2008).

No Canadá, não há exposição do carbendazim pela dieta, mas foi feita a avaliação de risco clássica para exposição ocupacional do carbendazim. Nela, foram adotados os mesmos critérios dessa avaliação, se utilizando do NOAEL de 10mg/kg p.c./dia e fatores de incerteza de 1000. A exposição ocupacional foi considerada aceitável, no entanto, os cenários de exposição são bem distintos dos brasileiros, apresentando níveis de exposição muito menores (HEALTH CANADA, 2011).

Nos EUA, o carbendazim não está autorizado, portanto, não há avaliação de risco ocupacional. As avaliações de risco dietética existentes são apenas para avaliar resíduos de carbendazim de sucos de laranja vindos de outros países (principalmente do Brasil) e também considerando o carbendazim como um metabólito do tiofanato-metílico, outro agrotóxico utilizado nessa cultura, mas que está autorizado nos EUA. Os níveis de resíduos estabelecidos nos sucos de laranja são muito restritivos, assim, muito menores que os resíduos brasileiros, e a IDA estabelecida é bem mais restritiva, 0,0025mg/kg p.c/dia (EPA, 2012). A não autorização de sucos de laranja contendo carbendazim desde 2009 foi motivo de rejeição do suco de laranja brasileiro, em janeiro de 2012, com grande repercussão nas mídias nacionais e internacionais (BBC, 2012; PORTO, 2012; FREITAS, 2012; AVILA, DOLAK, GANN, 2012).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dessa avaliação de risco, a exposição dietética ao carbendazim pela população brasileira em geral apresenta risco inaceitável. Se ainda forem considerados os dados de monitoramento do PARA, os resíduos de carbendazim decorrentes do uso de tiofanato-metílico e outras fontes de exposição alimentares como água, leite, carne e ovos, o risco fica ainda maior.

A avaliação de risco ocupacional, utilizando o banco de dados PHED para avaliação dos cenários de exposição, demonstrou que apenas três cenários teriam riscos aceitáveis: a atividade combinada (M/Ab) sendo que a segurança se dá apenas com a utilização de sistema fechado e EPI completo, uma realidade pouco usual no Brasil e, quando o trabalhador exerce apenas uma função, de aplicação com trator com barra de pulverização em cabine fechada (EPI intermediário ou completo), o que também não é a realidade comum do Brasil. Assim, considerando a maioria dos cenários comuns no Brasil, o risco foi inaceitável. Além disso, o risco ocupacional para o tratamento de sementes também foi considerado inaceitável, nas condições do programa SeedTropex®.

Não foi possível avaliar o cenário de exposição pós-aplicação, que deve ser revisto quando da disponibilização de programas que analisem essa situação comum no Brasil.

Além disso, a discussão de que o carbendazim, apesar de apresentar efeitos com relação dose-resposta monotônica considerando o MOA principal ser a inibição da montagem dos microtúbulos, o fato de ele ser um desregulador endócrino direto e de evidências que, a partir disso, os efeitos endócrinos teriam uma resposta hormética (curva em U), a avaliação de risco clássica pode não ser suficiente para garantir que em determinadas doses, o risco seja aceitável. Essas ponderações que ainda residem no campo da pesquisa, devem ser incorporadas às discussões regulatórias, apesar de ainda não existirem soluções para elas.

Baseada na presente avaliação de risco, esse agrotóxico não oferece risco aceitável aos trabalhadores na maioria dos cenários de exposição

coupacional, bem como à população em geral pela dieta. Ainda, considerando a Lei nº 7.802/1989 (BRASIL, 1989) e as evidências relatadas nesse trabalho que o carbendazim apresenta potencial carcinogênico (duas linhagens de camundongos), teratogênico (coelhos, ratos e camundongos), tóxico-reprodutivo e provoca alterações hormonais, ele deveria ser objeto de reavaliação toxicológica, por se enquadrar em características proibitivas de registro de acordo com o arcabouço legal vigente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, I. D.; SCHMID, T. E.; BAUMGARTNER, A. Induction of aneuploidy in male mouse germ cells detected by the sperm-FISH assay: a review of the present data base. **Mutat Res**, v. 504, n. 1-2, p. 173-82, Jul 25 2002.

ALBERT, R.E. Carcinogen risk assessment in the US Environmental Protection Agency. **Crit Rev Toxicol**, v.24, p.75–85, 1994.

ALBERTS, B. et al. The cytoskeleton. In: _____ **Molecular Biology of the Cell**. 4th ed. New York, NY: Garland Science, 2002. p. 907-982.

ALDRIDGE, W.N. The biological basis and measurement of thresholds. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v.26, p.39–58, 1986.

AMES, B.N.; MCCANN, J.; YAMASAKI, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. **Mutat Res**, v.31, p.347–364, 1975.

AMES, B.N.; GOLD, L.S. Too many rodent carcinogens: Mitogenesis increases mutagenesis. **Science**, v.249, p.970–971, 1990.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Reavaliação Toxicológica do Ingrediente Ativo Carbendazim**. Brasília, DF: Gerência-Geral de Toxicologia; 2002. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/41a4500047458ec197bad73fbc4c6735/carbendazim.pdf?MOD=AJPERES> >. Acesso em: 12 jun. 2012.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – Relatório de Atividades de 2010**. Brasília: Gerência Geral de Toxicologia, 2011.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Carbendazim**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/b17ca88047458b58951fd53fbc4c6735/c24.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 12 jun. 2012.

APVMA. Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. **Human Health Risk Assessment of Carbendazim**. Canberra: Department of Health and Ageing; 2009.

ASHBY, J. Problems associated with the recognition and confirmation of low-dose endocrine toxicities. **Nonlinearity Biol Toxicol Med**, v. 1, n. 4, p. 439-53, Oct 2003.

AULETTA, C.S. Acute, Subchronic and chronic toxicology. In: DERELANKO, M.J.; HOLLINGER, M.A. (eds). **CRC Handbook of Toxicology**. Orlando, FL: CRC Press, 1995, p 51–104.

AUTON, T.R. Calculation of benchmark doses from teratology data. **Regul Toxicol Pharmacol**, v.19, p.152–167, 1994.

AVILA, J; DOLAK, K.; GANN, C. **Is you orange juice safe?** ABC News, 2012. Disponível em: < <http://abcnews.go.com/US/orange-juice-safe-fda-carbendazim-safety-concern/story?id=15504105#.T-Sn6Rdzu8A>>. Acesso em: 22 jun. 2012.

BANDUHN, N.; OBE, G. Mutagenicity of methyl 2-benzimidazolecarbamate, diethylstilbestrol and estradiol: structural chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges, C-mitoses, polyploidies and micronuclei. **Mutat Res**, v. 156, n. 3, p. 199-218, Jun 1985.

BARALE, R. et al. Cytogenetic effects of benzimidazoles in mouse bone marrow. **Mutat Res**, v. 300, n. 1, p. 15-28, Jun 1993.

BARLAS, N. et al. Effects of carbendazim on rat thyroid, parathyroid, pituitary and adrenal glands and their hormones. **Hum Exp Toxicol**, v. 21, n. 4, p. 217-21, Apr 2002.

BARNES, D.G.; DOURSON, M. Reference dose (RfD): Description and use in health risk assessments. **Regul Toxicol Pharmacol**, v.8, p.471–486, 1988.

BENTLEY, K. S. et al. Evaluation of thresholds for benomyl- and carbendazim-induced aneuploidy in cultured human lymphocytes using fluorescence in situ hybridization. **Mutat Res**, v. 464, n. 1, p. 41-51, Jan 3 2000.

BBC. **Uso de fungicida ameaça venda de suco de laranja brasileiro.** BBC Brasil, 2012. Disponível em: < <http://g1.globo.com/economia/noticia/2012/01/uso-de-fungicida-ameaca-venda-de-suco-de-laranja-brasileiro-nos-eua.html>>. Acesso em: 11 jan. 2012.

BfR. Bundesinstitut für Risikobewertung. **Regulatory Definition of an Endocrine Disrupter in relation to potential threat to Human Health.** Berlim; 2011.

Disponível em:

<http://www.bfr.bund.de/cm/343/regulatory_definition_of_an_endocrine_disrupter_in_relation_to_potential_threat_to_human_health.pdf>. Acesso em: 22 jun. 2012.

BLISS, C.L. Some principles of bioassay. **Am Sci**, v.45, p.449–466, 1957.

BRASIL. Portaria nº 10, de 8 de março de 1985. Atribui à DINAL a compilação da relação de substâncias com ação tóxica sobre animais ou plantas, cujo registro pode ser autorizado no Brasil, em atividades agropecuárias e em produtos domissanitários e determina outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 de março de 1985.

BRASIL. Lei nº 7802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos das embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 12 de julho de 1989.

BRASIL. Portaria nº 3, 16 de janeiro de 1992. Ratifica os termos das "diretrizes e orientações referentes à autorização de registros, renovação de registro e extensão de uso de produtos agrotóxicos e afins - nº 1, de 09/12/1991". **Diário Oficial da União**, Brasília, 04 de fevereiro de 1992.

BRASIL. Decreto nº 4074, de 4 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 8 de janeiro de 2002.

CALKINS, D.R.; DIXON, R.L.; GERBER, C.R.; et al. Identification, characterization, and control of potential human carcinogens: A framework for federal decision-making. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.61, p.169–175, 1980.

CAN, A.; ALBERTINI, D. F. M-phase specific centrosome-microtubule alterations induced by the fungicide MBC in human granulosa cells. **Mutat Res**, v. 373, n. 1, p. 139-51, Jan 3 1997.

CANEZ, V. Exposição e avaliação do Risco. In: ANDEF. **Workshop “Avaliação da exposição de Misturadores, Abastecedores e Aplicadores de agrotóxicos”**, Brasília, 28 abr. 2009.

CARTER, S. D.; HESS, R. A.; LASKEY, J. W. The fungicide methyl 2-benzimidazole carbamate causes infertility in male Sprague-Dawley rats. **Biol Reprod**, v. 37, n. 3, p. 709-17, Oct 1987.

CASTORINA, R.; WOODRUFF, T.J. Assessment of potential risk levels associated with U.S. environmental protection agency reference values. **Env. Helth Persp**, v.111, p.1318-1325, 2003.

CHANG, C. C. et al. Deleterious effects of arsenic, benomyl and carbendazim on human endometrial cell proliferation in vitro. **Taiwan J Obstet Gynecol**, v. 49, n. 4, p. 449-54, Dec 2010.

CHECKOWAY, H. Epidemiology. In ROSENSTOCK, L.; CULLEN, M. (eds): **Textbook of Clinical Occupational and Environmental Medicine**. Philadelphia: Saunders, 1994, p 150–168.

CHRISTIAN, M. Reproductive and developmental toxicity studies. In SIPES, I.G.; MCQUEEN, C.A.; GANDOLFI, A.J. (eds.): **Comprehensive Toxicology**. New York: Pergamon Press, 1997, p 145–154.

CORREA, L. M. et al. Microtubules of the mouse testis exhibit differential sensitivity to the microtubule disruptors Carbendazim and colchicine. **Toxicol Sci**, v. 69, n. 1, p. 175-82, Sep 2002.

CRUMP, K.S. A new method for determining allowable daily intakes. **Fundam Appl Toxicol**, v.4, p.854–871, 1984.

CUMMINGS, A. M. et al. Developmental effects of methyl benzimidazolecarbamate following exposure during early pregnancy. **Fundam Appl Toxicol**, v. 18, n. 2, p. 288-93, Feb 1992.

DANISH MINISTRY OF THE ENVIRONMENT. **Establishment of Criteria for Endocrine Disruptors and Options for Regulation**. Environmental Protection Agency; 2011. Disponível em: < http://www.mst.dk/NR/rdonlyres/54DB4583-B01D-45D6-AA99-28ED75A5C0E4/127098/DKEDcriteria110517_finalcorr1.pdf>. Acesso em: 22 jun. 2012.

DAVIDSE, L. C. Benzimidazole fungicides: mechanism of action and biological impact. **Ann Rev Phytopathol**, v. 24, p. 43-65, 1986.

DEAN, A.G.; DEAN, J.A.; COULOMBIER, D.; et al. **Epi Info**, Version 6: A word processing, database, and statistics program for public health on IBM-compatible microcomputers. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 1995.

DE HEER, C.; WILSCHUT, A.; STEVENSON, H.; HACKKERT, B.C. **Guidance document on the estimation of dermal absorption according to a tiered approach: an update**. TNO report V98 1237, Zeist, Holanda, 1999, 27pp.

DE STOPPELAAR, J. M. et al. Increased frequencies of diploid sperm detected by multicolour FISH after treatment of rats with carbendazim without micronucleus induction in peripheral blood erythrocytes. **Mutagenesis**, v. 14, n. 6, p. 621-32, Nov 1999.

DOULL, J. Factors influencing toxicity. In: DOULL J, KLAASSEN CD, AMDUR MO (eds): **Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons**, 2d ed. New York: Macmillan, 1980, p.70–83.

DUFRAIN, R.J.; MCFEE, A.F.; LINKOUS, S.; et al. In vivo SCE analysis using bromodeoxyuridine, iododeoxyuridine, and chlorodeoxyuridine. **Mutat Res**, v.139, p.57–60, 1984.

EATON, D.L.; GALLAGHER, E.P. Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v.34, p.134–172, 1994.

EATON, D.L.; KLAASSEN, D.C. Principles of Toxicology. In: KLAASSEN, D.C. **Toxicology – the basic science of the poisons**. 6. ed., Kansas city, 2001, p. 21-36.

EC. European Commission. **Guidance For The Setting And Application Of Acceptable Operator Exposure Levels (AOELs)**. Health & Consumer Protection Directorate-General, Directorate E – Safety of the food chain: Unit E.3 - Chemicals, contaminants and pesticides; 2006.

EC. European Commission. **Review report for the active substance carbendazim**. Health & Consumer Protection Directorate-General, Directorate D - Food Safety: Production and distribution chain: Unit D.3 - Chemicals, contaminants and pesticides; 2007.

EC. European Commission. **Guidance Document on dermal absorption**. Sanco 222/2000, rev. 7., 2004. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/guidance/wrkdoc20_rev_en.pdf>. Acesso em: 12 de jun. 2012.

ELHAJOUJI, A.; TIBALDI, F.; KIRSCH-VOLDERS, M. Indication for thresholds of chromosome non-disjunction versus chromosome lagging induced by spindle inhibitors in vitro in human lymphocytes. **Mutagenesis**, v. 12, n. 3, p. 133-40, May 1997.

ELHAJOUJI, A.; CUNHA, M.; KIRSCH-VOLDERS, M. Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay. **Mutagenesis**, v. 13, n. 2, p. 193-8, Mar 1998.

EPA. United States Environmental Protection Agency. **Risk assessment guidance for Superfund**. Human Health Evaluation Manual, Part A. Washington, DC: Office of Emergency and Remedial Response, 1989.

EPA. United States Environmental Protection Agency. Guidelines for developmental toxicity risk assessment. **Fed Reg**, v.56, p.63798–63826, 1991.

EPA. United States Environmental Protection Agency. Guidelines for Exposure Assessment. **Fed Reg**, v.57, p.22888–22938, 1992.

EPA. United States Environmental Protection Agency. **Interim guidance for conducting aggregate exposure and risk assessments – HED SOP 97.2**. Food Quality Protection Act (FQPA): Washington, DC: Office of Pesticide Programs; 1997.

EPA. United States Environmental Protection Agency. **Framework for assessing non-occupational, non-dietary (residential) exposure pesticides**. Washington, DC: EPA, 1998a.

EPA. United States Environmental Protection Agency. **Pesticides Handlers Exposure Database (PHED) Surrogate Exposure Guide**. Washington, DC: Office of Pesticides Programs; 1998b. Disponível em: <<http://www.epa.gov/pesticides/science/phedsur-expo-guide.pdf>>. Acesso em: 15 jun. 2012.

EPA. United States Environmental Protection Agency. **Health Effects Test Guidelines: 870 Series Final Guidelines**. Washington, DC: Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, 2000.

EPA. United States Environmental Protection Agency. Assessing Health Risks from Pesticides. 2007. Disponível em:

<<http://www.epa.gov/pesticides/factsheets/riskassess.htm>>. Acesso em: 20 jun. 2012.

EPA. United States Environmental Protection Agency. Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP). 2011. Disponível em: <<http://www.epa.gov/endo/pubs/edsoverview/primer.htm>>. Acesso em: 20 jun. 2012.

EPA. United States Environmental Protection Agency. **Risk Assessment for Safety of Orange Juice Containing Fungicide Carbendazim**. Washington, DC: Office of Chemical Safety and Pollution Prevention; 2012.

FARAG, A. et al. Developmental toxicity of fungicide carbendazim in female mice. **Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol**, v. 92, n. 2, p. 122-30, Apr 2011.

FAUSTMAN, E.M.; ALLEN, B.C.; KAVLOCK, R.J.; et al. Dose–response assessment for developmental toxicity: I. Characterization of database and determination of no observed adverse effect levels. **Fundam Appl Toxicol**, v.23, p.478–486, 1994.

FAUSTMMAN, E.M.; OMMEN, G.S. Risk Assessment. In: KLASSEN, D.C. **Toxicology – the basic science of the poisons**. 6. ed. Kansas city, 2001, p. 67-81.

FAWCETT, D. W.; ANDERSON, W. A.; PHILLIPS, D. M. Morphogenetic factors influencing the shape of the sperm head. **Dev Biol**, v. 26, n. 2, p. 220-51, Oct 1971.

FERA. The Food and Environment Research Agency. **Overview of currently used and emerging worker exposure models and data**, United Kingdom; Jan, 3, 2011.

FREITAS, T. EUA podem barrar suco de laranja brasileiro se nível de fungicida subir. **Folha de São Paulo**, São Paulo, 10 de janeiro de 2012. Caderno de Mercado.

GOLDMAN, J. M. et al. Effects of the benomyl metabolite, carbendazim, on the hypothalamic-pituitary reproductive axis in the male rat. **Toxicology**, v. 57, n. 2, p. 173-82, Jul 17 1989.

GOTOH, Y. et al. Testicular damage after exposure to carbendazim depends on the number of patent efferent ductules. **J Vet Med Sci**, v. 61, n. 7, p. 755-60, Jul 1999.

GRAY, L. E., JR. et al. Correlation of sperm and endocrine measures with reproductive success in rodents. **Prog Clin Biol Res**, v. 302, p. 193-206; discussion 206-9, 1989.

GRAY, L. E., JR. et al. Carbendazim-induced alterations of reproductive development and function in the rat and hamster. **Fundam Appl Toxicol**, v. 15, n. 2, p. 281-97, Aug 1990.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Reproductive and hormonal functions of the male. In: _____ **Textbook of Medical Physiology**. 12th ed. United States of America: Elsevier, 2011. p. 973-977.

HASEMAN, J.K.; LOCKHART, A.M. Correlations between chemically related site-specific carcinogenic effects in long-term studies in rats and mice. **Environ Health Perspect**, v.101, p.50–54, 1993.

HAYES, A.W. **Principles and Methods of Toxicology**. 4 ed. Taylor and Francis: New York, 2001.

HEALTH CANADA. **Carbendazim – PRD2011-04**. Ottawa, Ontario: Pest Management Regulatory Agency; 2011.

HEDDLE, J.A.; HITE, M.; KIRKHART, B.; et al. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program . **Mutat Res**, v.123, p.61–118,1983.

HILL, A.B. The environment and disease: Association or causation. **Proc R Soc Med**, v.58, p.295–300, 1965.

HOWARD, R.J.; AIST, J.R. Cytoplasmic microtubules and fungal morphogenesis: ultrastructural effects of methyl benzimidazole-2-ylcarbamate determined by freeze-substitution of hyphal tip cells. **J Cell Biol**, v. 87, p. 55-64, Oct 1980.

IARC. International Agency for Research on Cancer. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**. v 60. Lyon, France: World Health Organization, 1994.

IBAMA. Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil**. Brasília: Centro Nacional de Informação Ambiental, 2010.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamento Familiar 1995. Disponível em:
<<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/default.shtm>>. Acesso em: 12 jun. 2012.

IPCS. International Programme on Chemical Safety. **Environmental Health Criteria 239 – Principles for modeling dose-response for the risk assessment of chemicals**. World Health Organization, Geneva, 2009.

IPCS. International Programme on Chemical Safety. **Environmental Health Criteria 149 – Carbendazim**. World Health Organization, Geneva, 1993. Disponível em <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc149.htm#PartNumber:6>>. Acesso em: 12 jun. 2012.

ITO, Y.; FUJIE, K.; MATSUDA, S.; et al. Long-Evans A and C rat strains susceptible to clastogenic effects of chemicals in the bone marrow cells. **Jpn J Cancer Res**, v.85, p.26–31, 1994.

JEFFAY, S. C. et al. Acute exposure of female hamsters to carbendazim (MBC) during meiosis results in aneuploid oocytes with subsequent arrest of embryonic cleavage and implantation. **Reprod Toxicol**, v. 10, n. 3, p. 183-9, May-Jun 1996.

KIMMEL, C.A.; GAYLOR, D.W. Issues in qualitative and quantitative risk analysis for developmental toxicology. **Risk Anal**, v.8, p.15–20, 1988.

KIRSCH-VOLDERS, M. et al. Indirect mechanisms of genotoxicity. **Toxicol Lett**, v. 140-141, p. 63-74, Apr 11 2003.

KREWSKI, D.; VAN RYZIN, J. Dose response models for quantal response toxicity data. In: CSORGO, M.; DAWSON, D.; RAO, J.; SELEH, A. (eds): **Statistics and Related Topics**. North-Holland, Amsterdam, 1981, p201–229.

LAMB, M. J.; LILLY, L. J. An investigation of some genetic toxicological effects of the fungicide benomyl. **Toxicology**, v. 17, n. 1, p. 83-95, 1980.

LATT, S.A. Sister chromatid exchange formation. **Annu Rev Genet**, v.15, p11–55, 1981.

LAVE, L. B. et al. Information value of the rodent bioassay. **Nature**, v. 336, n. 6200, p. 631-3, Dec 15 1988.

LEISENRING, W.; RYAN L. Statistical properties of the NOAEL. **Regul Toxicol Pharmacol**, v.15(2 Pt 1), p.161-71, 1992.

LI, J.; KATIYAR, S. K.; EDLIND, T. D. Site-directed mutagenesis of *Saccharomyces cerevisiae* beta-tubulin: interaction between residue 167 and benzimidazole compounds. **FEBS Lett**, v. 385, n. 1-2, p. 7-10, Apr 29 1996.

LIM, J.; MILLER, M. G. Role of testis exposure levels in the insensitivity of prepubertal rats to carbendazim-induced testicular toxicity. **Fundam Appl Toxicol**, v. 37, n. 2, p. 158-67, Jun 1997.

LU, S. Y. et al. Endocrine-disrupting activity in carbendazim-induced reproductive and developmental toxicity in rats. **J Toxicol Environ Health A**, v. 67, n. 19, p. 1501-15, Oct 8 2004.

MCCARROLL, N. E. et al. A survey of EPA/OPP and open literature on selected pesticide chemicals. III. Mutagenicity and carcinogenicity of benomyl and carbendazim. **Mutat Res**, v. 512, n. 1, p. 1-35, Sep 2002.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **AGROFIT**. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em 12 jun. 2012.

MARKELEWICZ, R. J., JR.; HALL, S. J.; BOEKELHEIDE, K. 2,5-hexanedione and carbendazim coexposure synergistically disrupts rat spermatogenesis despite opposing molecular effects on microtubules. **Toxicol Sci**, v. 80, n. 1, p. 92-100, Jul 2004.

MATSUO, F.; NAKAI, M.; NASU, T. The fungicide carbendazim induces meiotic micronuclei in the spermatids of the rat testis. **J Vet Med Sci**, v. 61, n. 5, p. 573-6, May 1999.

MOFFIT, J. S. et al. Dose-dependent effects of sertoli cell toxicants 2,5-hexanedione, carbendazim, and mono-(2-ethylhexyl) phthalate in adult rat testis. **Toxicol Pathol**, v. 35, n. 5, p. 719-27, Aug 2007.

MORINAGA, H. et al. A benzimidazole fungicide, benomyl, and its metabolite, carbendazim, induce aromatase activity in a human ovarian granulosa-like tumor cell line (KGN). **Endocrinology**, v. 145, n. 4, p. 1860-9, Apr 2004.

MUTHUVIVEGANANDAVEL, V. et al. Toxic effects of carbendazim at low dose levels in male rats. **J Toxicol Sci**, v. 33, n. 1, p. 25-30, Feb 2008.

NAKAI, M. et al. Acute and long-term effects of a single dose of the fungicide carbendazim (methyl 2-benzimidazole carbamate) on the male reproductive system in the rat. **J Androl**, v. 13, n. 6, p. 507-18, Nov-Dec 1992.

NAKAI, M.; HESS, R. A. Morphological changes in the rat Sertoli cell induced by the microtubule poison carbendazim. **Tissue Cell**, v. 26, n. 6, p. 917-27, Dec 1994.

NAKAI, M.; HESS, R. A. Effects of carbendazim (methyl 2-benzimidazole carbamate; MBC) on meiotic spermatocytes and subsequent spermiogenesis in the rat testis. **Anat Rec**, v. 247, n. 3, p. 379-87, Mar 1997.

NAKAI, M. et al. Further observations on carbendazim-induced abnormalities of spermatid morphology in rats. **Tissue Cell**, v. 29, n. 4, p. 477-85, Aug 1997.

NAKAI, M. et al. Carbendazim-induced abnormal development of the acrosome during early phases of spermiogenesis in the rat testis. **Cell Tissue Res**, v. 294, n. 1, p. 145-52, Oct 1998.

NAKAI, M. et al. Stage-specific effects of the fungicide carbendazim on Sertoli cell microtubules in rat testis. **Tissue Cell**, v. 34, n. 2, p. 73-80, Apr 2002.

NASMYTH, K. Separating sister chromatids. **Trends Biochem Sci**, v.24, p.98–104, 1999.

NRC. National Research Council. **Risk Assessment in the Federal Government: Managing the Process**. Washington, DC: National Academy Press; 1983.

NRC. National Research Council. **Issues in Risk Assessment**. Washington, DC: National Academy Press, 1993.

NTP. National Toxicology Program. **9th Report on Carcinogens**. Washington, DC: U.S. Department of Human and Health Services, Public Health Service, 2000.

OGA. S. **Fundamentos de toxicologia**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2003.

- PERREAULT, S. D. et al. Use of the fungicide carbendazim as a model compound to determine the impact of acute chemical exposure during oocyte maturation and fertilization on pregnancy outcome in the hamster. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 114, n. 2, p. 225-31, Jun 1992.
- PETRELLI, G. et al. Spontaneous abortion in spouses of greenhouse workers exposed to pesticides. **Environ Health Prev Med**, v. 8, n. 3, p. 77-81, Jul 2003.
- PITOT, H.C.; DRAGAN, Y.P. Chemical Carcinogenesis. In: KLASSEN, D.C. **Toxicology – the basic science of the poisons**. 6. Ed. Kansas city, 2001, p. 164-212.
- PORTO, G. EUA podem barrar suco de laranja brasileiro. **O Estado de São Paulo**, Ribeirão Preto, 11 de janeiro de 2012. Caderno de Economia.
- QUINLAN, R.A. et al. The influence of the microtubule inhibitor, methyl benzimidazol-2-yl-carbamate (MBC) on nuclear division and the cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Cell Sci**, v. 46, p. 341-352, 1980.
- RAJESWARY, S. et al. Modulation of antioxidant defense system by the environmental fungicide carbendazim in Leydig cells of rats. **Reprod Toxicol**, v. 24, n. 3-4, p. 371-80, Nov-Dec 2007.
- REHNBERG, G. L. et al. Serum and testicular testosterone and androgen binding protein profiles following subchronic treatment with carbendazim. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 101, n. 1, p. 55-61, Oct 1989.
- RENWICK, A.G. Safety factors and the establishment of acceptable daily intakes. **Food Addit Contam**, v.8, p.135–150, 1991.
- RENWICK, A.G.; WALKER, R. An analysis of the risk of exceeding the acceptable or tolerable daily intake. **Regul Toxicol Pharmacol**, v.18, p.463–480, 1993.
- RODERICKS, J.V.; RUDENKO, L.; STARR, T.B.; TURNBULL, D. Risk Assessment. In SIPES, I.; MCQUEEN, C.; GANDOLFI, A. (eds). **Comprehensive Toxicology**. Oxford, UK: Pergamon, Elsevier Sciences, 1997, p 315–338.
- ROSS, J.H.; DRIVER, J.H. COCHRAN, R.C.; THONGSINTHUSAK, T.T.; et al. Could pesticides toxicology study be more relevant to occupational risk assessment? **Ann Occup Hyg**, v.45, n.1001, p.S5-S17, 2001.
- SACP. Science Advisory Council for Exposure. **Standard Values for daily acres treated in agriculture**. Policy number 9.1, 2001
- SAMET, J.M. Risk assessment and child health. **Pediatrics**, v.113, n.4, p.952-956, 2004.

SARRIF, A. M. et al. Evaluation of carbendazim for gene mutations in the Salmonella/Ames plate-incorporation assay: the role of aminophenazine impurities. **Mutat Res**, v. 321, n. 1-2, p. 43-56, Apr 1994a.

SARRIF, A. M. et al. Evaluation of benomyl and carbendazim in the in vivo aneuploidy/micronucleus assay in BDF1 mouse bone marrow. **Mutat Res**, v. 310, n. 1, p. 143-9, Oct 1 1994b.

SELMANOGLU, G. et al. Carbendazim-induced haematological, biochemical and histopathological changes to the liver and kidney of male rats. **Hum Exp Toxicol**, v. 20, n. 12, p. 625-30, Dec 2001.

SINGHAL, L. K. et al. Down regulation of humoral immunity in chickens due to carbendazim. **Toxicol In Vitro**, v. 17, n. 5-6, p. 687-92, Oct-Dec 2003.

SITAREK, K. Embryolethal and teratogenic effects of carbendazim in rats. **Teratog Carcinog Mutagen**, v. 21, n. 5, p. 335-40, 2001.

SPENCER, F.; CHI, L.; ZHU, M. X. Effect of benomyl and carbendazim on steroid and molecular mechanisms in uterine decidual growth in rats. **J Appl Toxicol**, v. 16, n. 3, p. 211-4, May-Jun 1996.

STORPIRTIS, S. et al. Farmacocinética: conceitos, definições e relação com a farmacodinâmica e biofarmácia (biofarmacotécnica). In: STORPIRTIS, S. et al. **Farmacocinética Básica e Aplicada**. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 7-16.

SWEDISH CHEMICALS AGENCY. **Interpretation in Sweden of the impact of the "cut-off" criteria adopted in the common position of the Council concerning the Regulation of placing plant protection products on the market**. Pesticides and Biotechnical products; 2008.

UNIÃO EUROPEIA. Regulamento (CE) nº 1107, de 21 de outubro de 2009. Relativo à colocação dos produtos fitofarmacêuticos no mercado e que revoga as Directivas 79/117/CEE e 91/414/CEE do Conselho. **Jornal Oficial da União Europeia**, 24 de novembro de 2009.

VAN HUMMELEN, P.; ELHAJOUJI, A.; KIRSCH-VOLDERS, M. Clastogenic and aneugenic effects of three benzimidazole derivatives in the in vitro micronucleus test using human lymphocytes. **Mutagenesis**, v. 10, n. 1, p. 23-9, Jan 1995.

VANHAUWAERT, A.; VANPARYS, P.; KIRSCH-VOLDERS, M. The in vivo gut micronucleus test detects clastogens and aneugens given by gavage. **Mutagenesis**, v. 16, n. 1, p. 39-50, Jan 2001.

VIGREUX, C. et al. DNA damaging effects of pesticides measured by the single cell gel electrophoresis assay (comet assay) and the chromosomal aberration test, in CHOK1 cells. **Mutat Res**, v. 419, n. 1-3, p. 79-90, Nov 9 1998.

WELSHONS, W. V. et al. Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. **Environ Health Perspect**, v. 111, n. 8, p. 994-1006, Jun 2003.

WHO. World Health Organization. **Assessing Human Health Risks of Chemicals: Derivation of Guidance Values for Health-Based Exposure Limits**. Geneva: World Health Organization, 1994.

WHO. World Health Organization. **Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors**. Geneva: World Health Organisation; 2002.

WHO. World Health Organization. **Environmental Health Criteria 240: principles and methods for the risk assessment of chemicals in food**. A joint publication of the Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization. Geneva: World Health Organisation; 2009.

WINDER, B. S.; STRANDGAARD, C. S.; MILLER, M. G. The role of GTP Binding and microtubule-associated proteins in the inhibition of microtubule assembly by carbendazim. **Toxicol Sci**, v. 59, n. 1, p. 138-46, Jan 2001.

YU, G. et al. Effects of subchronic exposure to carbendazim on spermatogenesis and fertility in male rats. **Toxicol Ind Health**, v. 25, n. 1, p. 41-7, Feb 2009.

ZENECA Agrochemicals. SeedTropex Predictive Exposure Model. 2008.