



Minicursos CRQ-IV - 2008
toxicologia aplicada a saneantes

TOXICOLOGIA

DE

SANEANTES

Marco Antonio Abla

marcoabla@hotmail.com



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

CONTEÚDO PROGRAMÁTICO

- 1. Toxicologia: Do agudo ao crônico - Uma visão histórica.**
- 2. Fundamentos em Toxicologia.**
- 3. Toxicologia na legislação de saneantes.**
- 4. Alguns testes toxicológicos "in vivo" e "in vitro".**
- 5. Tendências futuras em toxicologia.**



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

Do Agudo ao Crônico – Uma Visão Histórica



Shen Nung – 2696 AC

O Pai da Medicina Chinesa.

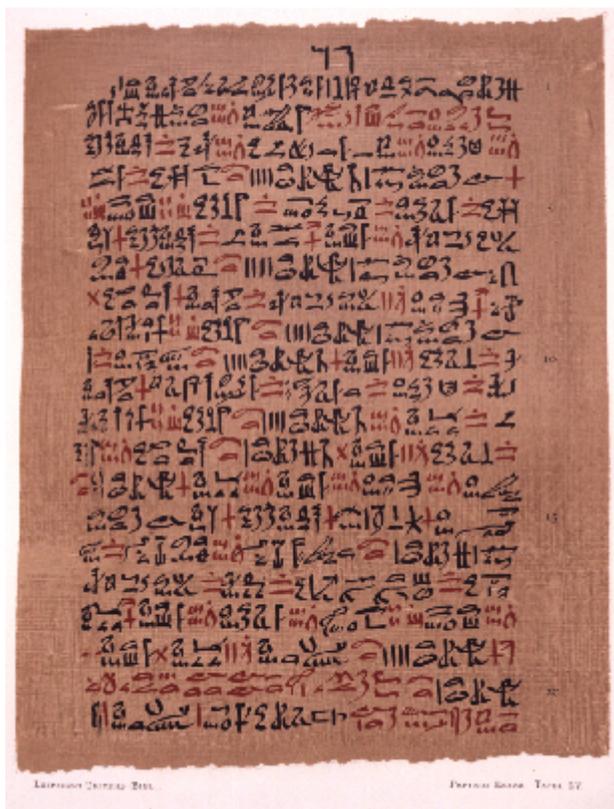
Destacou-se por ter provado 356 ervas, vindo a falecer em função de uma dose tóxica de uma delas.

Escreveu a obra “*On Herbal Medical Experiment Poisons*”.



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

Do Agudo ao Crônico – Uma Visão Histórica



Papiro de Ebers – 1500 AC

O mais bem preservado documento médico do Egito antigo. Contém cerca de 110 páginas sobre anatomia, toxicologia, magias e tratamentos.



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

Do Agudo ao Crônico – Uma Visão Histórica

Gula – 1400 AC

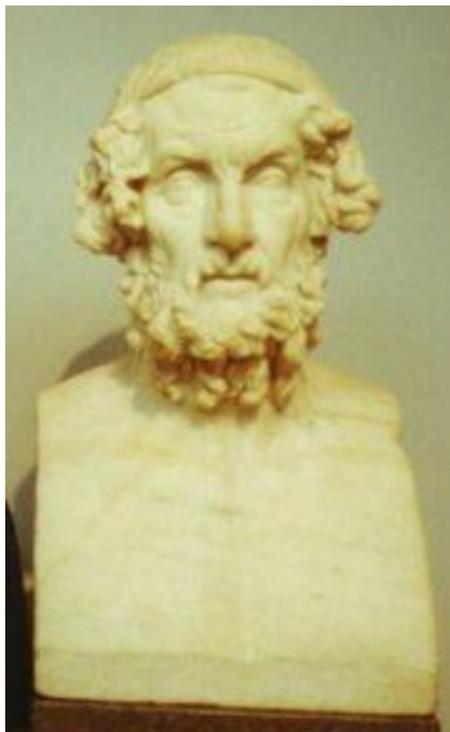


Textos sumérios referem-se a uma deidade feminina, Gula. Esta figura mitológica, que já foi associada com magias e venenos, foi também chamada de Deusa da Saúde ou a Grande Física.



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

Do Agudo ao Crônico – Uma Visão Histórica



Homero – 850 AC

Escreveu sobre o uso de flechas envenenadas nos épicos *Ilíada* e *Odisséia*.

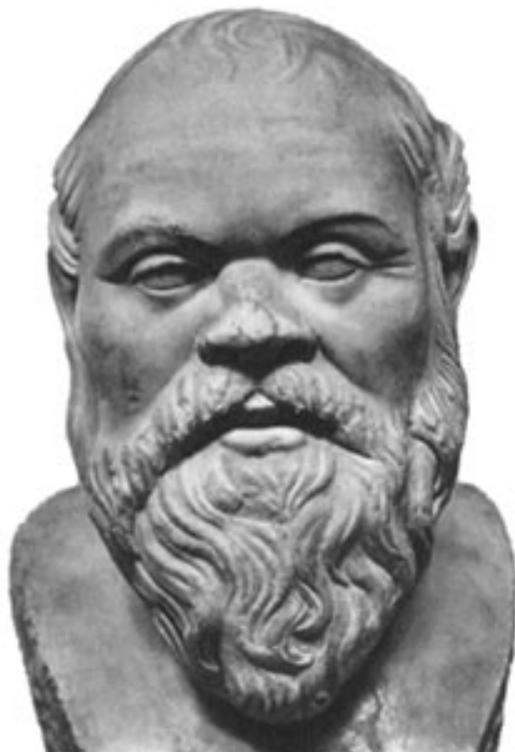
O *Toxikon* grego é uma flecha envenenada.



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

Do Agudo ao Crônico – Uma Visão Histórica

Sócrates – 470 a 399 AC



Morte de Sócrates por Hemlock, acusado de heresia religiosa e corrupção moral de jovens.

O princípio ativo era o alcalóide conina, que quando ingerido causa paralisia, convulsões e, potencialmente, morte.



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

Do Agudo ao Crônico – Uma Visão Histórica



Cleópatra – 69 a 30 AC

**Rainha do Egito – experimentou
estrcnina em pobres e prisioneiros.**

**Cometeu suicídio com a *Egyptian
asp*, cobra normalmente utilizada em
execuções.**





Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

Do Agudo ao Crônico – Uma Visão Histórica



Fogo Grego - 671

O fogo grego (napalm) foi muito utilizado pelos bizantinos na Idade Média, tanto em batalhas no mar quanto na terra.



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

Do Agudo ao Crônico – Uma Visão Histórica



Eclosão do Ergot - 994

O fungo do Ergot, quando consumido, causou gangrena em mais de 40.000 pessoas que consumiram trigo e arroz contaminados.



Minicursos CRQ-IV - 2008

toxicologia aplicada a saneantes

Do Agudo ao Crônico – Uma Visão Histórica



Peste Negra- 1347 a 1351

A peste negra se espalhou de forma devastadora pela Europa e Ásia, vitimando um número inacreditável de pessoas.



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

Do Agudo ao Crônico – Uma Visão Histórica



Rodrigo e Cesar Borgia – 1400 a 1500

Assassinos italianos durante os séculos 15 e 16, os Borgia utilizavam arsênico para obterem ganhos políticos e monetários.



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

Do Agudo ao Crônico – Uma Visão Histórica



Paracelsus – 1493 a 1541

“Todas as substâncias são venenos e não existe nenhuma que não seja. O que diferencia o medicamento de um veneno é a dose.”



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

Do Agudo ao Crônico – Uma Visão Histórica



John Jones – 1701

John Jones pesquisou extensivamente os efeitos médicos do ópio e escreveu “The Mysteries of Opium Revealed”.



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

Do Agudo ao Crônico – Uma Visão Histórica

Pierre Ordinaire – 1797 a 1915

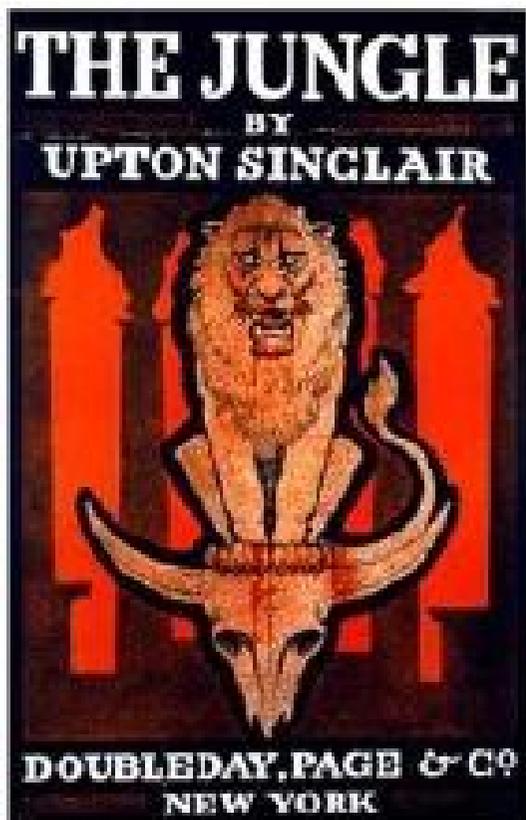


Criou um elixir utilizando absinto popularizado e vendido por Henry Pernod. Foi banido em 1915 e teve usuários famosos, como por exemplo, Degas e Van Gogh, dentre outros.



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

Do Agudo ao Crônico – Uma Visão Histórica



Upton Sinclair - 1878 a 1968

Educado na Universidade de Columbia, este novelista político publicou a obra *The Jungle*, na qual criticava as condições da indústria de empacotamento de carne. Sua posição levou ao Ato de Inspeção da Carne em 1906.



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

Do Agudo ao Crônico – Uma Visão Histórica



Ato de Drogas e Alimentos - 1906
Suportado pelo químico-chefe do Departamento de Agricultura, Harvey W. Wiley, o Food and Drugs Act foi criado para proteger a população de drogas e alimentos potencialmente perigosos.



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

Do Agudo ao Crônico – Uma Visão Histórica



Guerra Química - 1915

Desenvolvimento de produtos químicos para serem utilizados como armas militares. Cloro, Cloropicrina, Fosgênio e Gás Mostarda foram utilizados extensivamente.



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

Do Agudo ao Crônico – Uma Visão Histórica



Proibição Americana - 1915

Instituída através da 18ª Emenda, a proibição a fabricação clandestina de álcool, em função dos inúmeros agravos a saúde, incluindo casos de cegueira e danos cerebrais, por seu consumo recreativo pela população.



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

Do Agudo ao Crônico – Uma Visão Histórica



Protocolo de Geneva - 1925

Proibição do uso de armas químicas e biológicas.



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

Do Agudo ao Crônico – Uma Visão Histórica

Food and Drug Administration - 1930



Criado para regulamentar o conteúdo e segurança das drogas e alimentos, o FDA foi estabelecido como agência governamental. Algumas de suas funções específicas eram a regulamentação dos dizeres de rotulagem de alimentos, supervisão dos testes clínicos para novos medicamentos e investigação das queixas dos consumidores sobre drogas e alimentos.



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

Do Agudo ao Crônico – Uma Visão Histórica



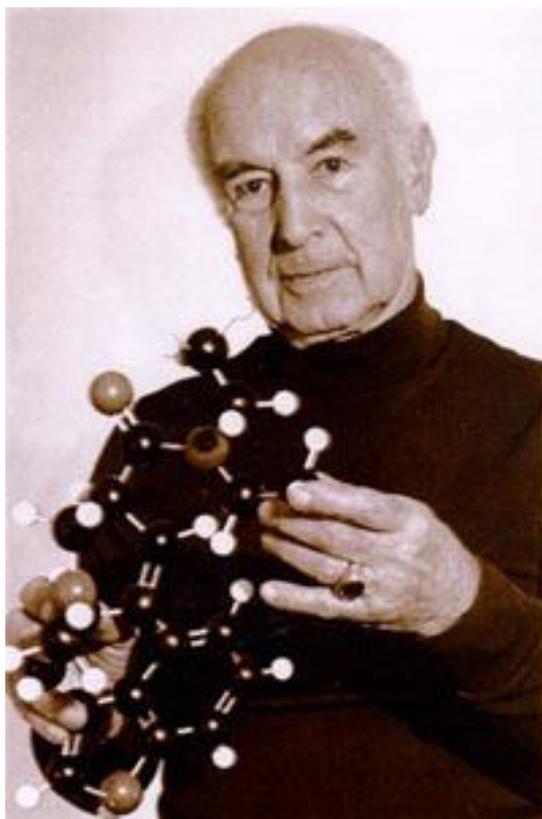
Desastre do Elixir Sulfanilamida - 1937

Mais que 100 pessoas, em sua maioria crianças, morreram quando o Elixir Sulfanilamida foi distribuído sem ser testado e continha Dietilenoglicol como veículo.



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

Do Agudo ao Crônico – Uma Visão Histórica



Albert Hofmann - 1938

O ácido lisérgico (LSD) foi sintetizado no Laboratório Sandoz e, em 1943, Hofmann o testou em si próprio.



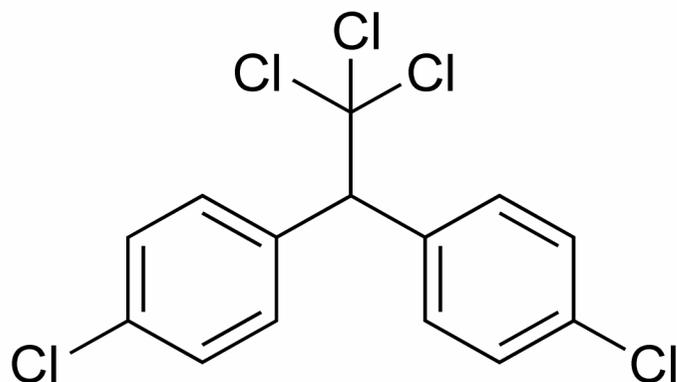
Minicursos CRQ-IV - 2008

toxicologia aplicada a saneantes

Do Agudo ao Crônico – Uma Visão Histórica

DDT – 1939

Paul Hermann Müller - 1948



Reconhecido como inseticida pelo cientista suíço Paul Hermann Müller, que ganhou o prêmio Nobel em Fisiologia e Medicina.

O DDT foi banido em 1972.



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

Do Agudo ao Crônico – Uma Visão Histórica

Baía de Minamata – anos 50



Dejeitos de metais pesados de uma planta de acetaldeído provocaram a contaminação da vida aquática local, que depois afetou também a população local (perda de coordenação motora).



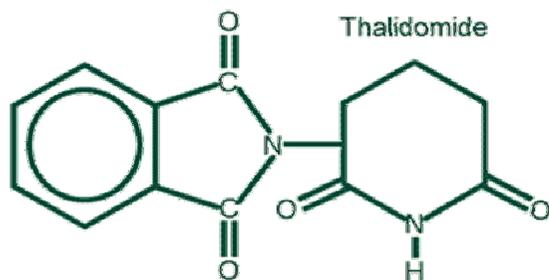
Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

Do Agudo ao Crônico – Uma Visão Histórica

Desastre da Talidomida – 1959 e anos 60



Desenvolvida por uma companhia alemã, a Gruenthal, com a finalidade de auxiliar o enjôo matinal de mulheres grávidas. Entretanto provocou inúmeros casos de fetotoxicidade, com defeitos de nascença nos filhos de mulheres que a consumiram no estágio de gravidez.





Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

Do Agudo ao Crônico – Uma Visão Histórica

Fundação da EPA – 1970

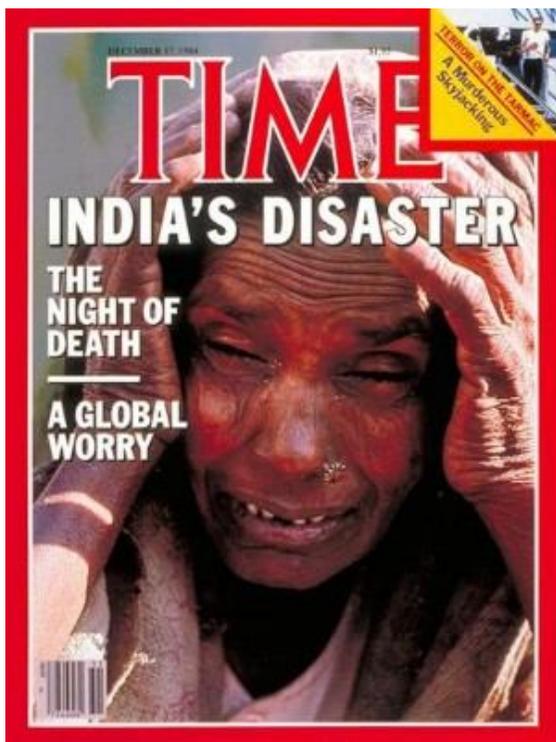


A Environmental Protection Agency (EPA) foi fundada, em 1970, como resultado de uma lei promulgada pela administração Nixon.



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

Do Agudo ao Crônico – Uma Visão Histórica



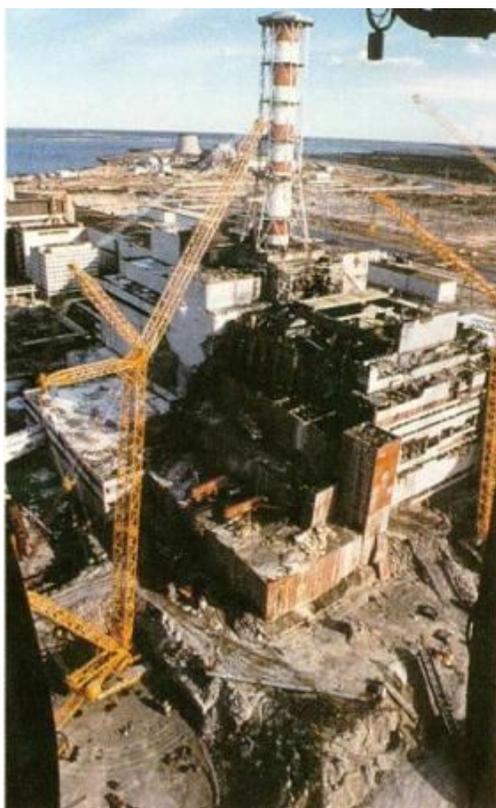
Desastre de Bhopal – 1984

Liberação acidental de 40 toneladas métricas de isocianato de metila de um planta de pesticidas da Union Carbide no coração da cidade provocou a milhares de mortes e centenas de milhares de agravos à saúde.



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

Do Agudo ao Crônico – Uma Visão Histórica



Acidente de Chernobyl – 1986

Em abril, planta nuclear de Chernobyl produziu uma coluna de fumaça radioativa sobre a Ucrânia, Escandinávia, Reino Unido e leste dos EUA.



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

Do Agudo ao Crônico – Uma Visão Histórica

Ataque ao Metrô de Tóquio - 1995



Membros de grupo religioso lançaram gás Sarin em cinco locais do metrô de Tóquio, matando 12 e afetando mais de 5.000 pessoas.



Minicursos CRQ-IV - 2008

toxicologia aplicada a saneantes

FUNDAMENTOS EM TOXICOLOGIA

Toxicologia:

- “A Ciência dos venenos”.
- “Estudo dos efeitos adversos de agentes químicos e físicos em organismos vivos”.
- “Estudo dos efeitos de xenobióticos sobre organismos vivos”.

Perigo:

- “Capacidade inerente a uma substância de causar um efeito adverso”.



Minicursos CRQ-IV - 2008

toxicologia aplicada a saneantes

FUNDAMENTOS EM TOXICOLOGIA

Risco:

- “Probabilidade que um perigo ocorra sob condições específicas de exposição ou uso”.

Identificação do risco:

- Dados epidemiológicos.
- Dados de literatura.
- Testes em animais de experimentação.
- Métodos alternativos (SAR).



Minicursos CRQ-IV - 2008

toxicologia aplicada a saneantes

FUNDAMENTOS EM TOXICOLOGIA

Toxicocinética:

- **Percurso de uma substância tóxica no organismo. Envolve as seguintes etapas:**
 - **Absorção: *oral, dérmica ou inalatória.***
 - **Biotransformação.**
 - **Distribuição.**
 - **Eliminação.**

Toxicodinâmica:

- **Processo de interação de substâncias potencialmente tóxicas com órgãos-alvo.**



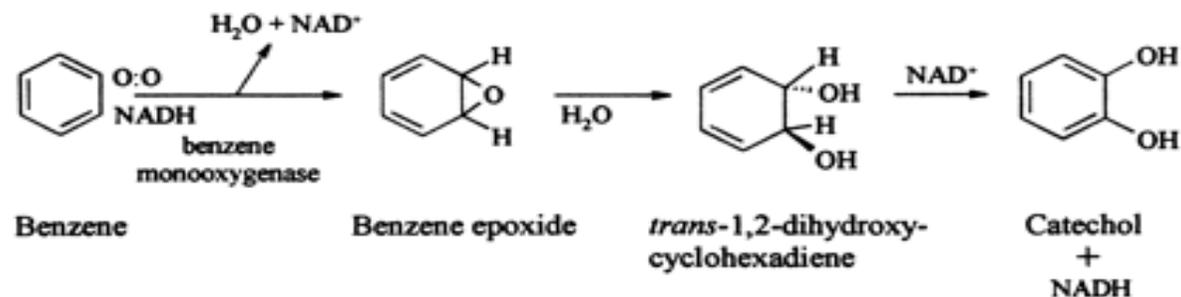
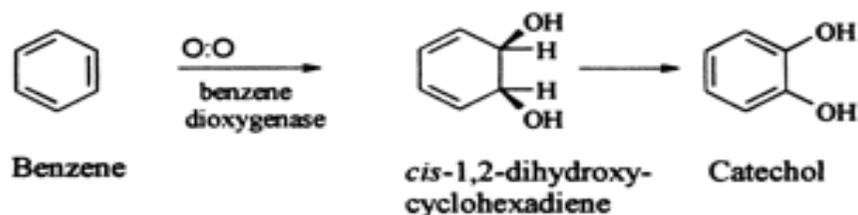
Minicursos CRQ-IV - 2008

toxicologia aplicada a saneantes

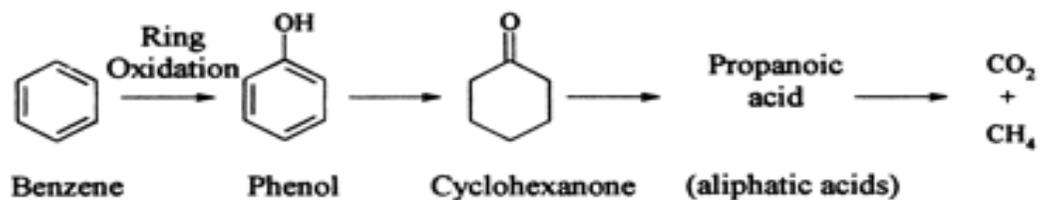
FUNDAMENTOS EM TOXICOLOGIA

Biotransformação:

A)



B)





Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

FUNDAMENTOS EM TOXICOLOGIA

Efeito Agudos: aqueles que ocorrem após a administração por via oral ou dérmica de uma dose única de uma dada substância ou mistura, ou múltiplas doses, durante 24h, ou por via inalatória por exposição de 4h, e observação dos sinais tóxicos desenvolvidos durante 1 ou 2 semanas e necrópsia ao final deste período.



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

FUNDAMENTOS EM TOXICOLOGIA

Efeitos Subcrônicos: aqueles que são observados após exposição repetida a uma substância ou produto químico por um período de dias até 6 meses.

Efeitos Crônicos: aqueles que são observados após exposição repetida por um período superior a 6 meses. Dados egressos de exposição crônica por um período superior a 2 anos podem ser considerados para estudos de carcinogênese.



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

FUNDAMENTOS EM TOXICOLOGIA

DL₅₀ (dose letal 50): é aquela capaz de levar a óbito 50% da população a qual a dose foi administrada.

CL₅₀ (concentração letal 50): : é aquela capaz de levar a óbito 50% da população exposta a tal concentração.

NOEL ou NOAEL: quantidade de substância que não causa efeito ou efeito adverso na população exposta.

LOEL ou LOAEL: menor quantidade de substância que causa efeito ou efeito adverso na população exposta.



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

Resolução – RDC nº 14, de 28 de fevereiro de 2007

Aprova o Regulamento Técnico para Produtos Saneantes com Ação Antimicrobiana harmonizado no âmbito do Mercosul através da Resolução GMC nº 50/06, que consta em anexo à presente Resolução.

5.9 Os produtos com ação antimicrobiana deverão apresentar Dose Letal 50, por via oral, para ratos brancos machos, superior a 2000 mg/Kg de peso corpóreo para produtos sob a forma líquida ou superior a 500 mg/Kg de peso corpóreo para produtos sob a forma sólida. Será permitido o cálculo teórico de DL 50 oral.



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

ANEXO II: DADOS NECESSÁRIOS PARA AVALIAÇÃO DE NOVOS PRINCÍPIOS ATIVOS

- 1. Toxicidade aguda por via oral para ratos, com valores de DL50 e descrição dos sintomas observados;**
- 2. Toxicidade aguda por via dérmica para ratos, com valores de DL50 e descrição dos sintomas observados;**
- 3. Toxicidade aguda por via inalatória para ratos, com valores de CL50 e descrição dos sintomas observados;**
- 4. Teste de irritação dérmica e ocular considerando os critérios estabelecidos nas respectivas metodologias internacionais para realização dos ensaios;**
- 5. Teste de sensibilidade dérmica em cobaias;**
- 6. Teste para verificação de mutagenicidade in vitro e in vivo;**



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

ANEXO II: CONTINUAÇÃO

- 7. Teste para avaliação do metabolismo e excreção, em ratos;**
- 8. Teste para verificação de efeitos teratogênicos em ratos e coelhos;**
- 9. Teste para verificação de efeitos carcinogênicos em duas espécies sendo uma de preferência não roedora;**
- 10. Teste para verificação de efeitos nocivos ao processo reprodutivo, em ratos, pelo mínimo, em 2 gerações. Dependendo do caso, o órgão competente poderá solicitar alguns dos dados abaixo relacionados:**
- 11. Teste de toxicidade com doses repetidas diárias por via oral, dérmica e inalatória, (14/21/28 dias), em camundongos, coelhos e ratos;**
- 12. Teste de toxicidade subcrônica (noventa dias) por via oral, dérmica e inalatória em camundongos, coelhos e ratos.**



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

ANEXO IV

FRASES OBRIGATÓRIAS PARA OS PRODUTOS COM AÇÃO ANTIMICROBIANA

A) Em todos os rótulos dos produtos com ação antimicrobiana deverão constar as seguintes frases:

1 “CUIDADO! Irritante para os olhos, pele e mucosas.” - esta frase poderá ser omitida se for comprovado que o produto enquadra-se na classificação dérmica e ocular primária como “não irritante” ou “levemente irritante”, de acordo com o teste de Draize em coelhos albinos ou através de ensaios in vitro devidamente validados e aceitos pela Autoridade Sanitária competente. Esta frase deverá constar no painel principal.



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

ANEXO IV

FRASES OBRIGATÓRIAS PARA OS PRODUTOS COM AÇÃO ANTIMICROBIANA (continuação)

2 “Não misturar com outros produtos” , exceto se tal procedimento estiver indicado pelo fabricante no rótulo.

3 “Usar luvas para sua aplicação.” - esta frase poderá ser omitida se for comprovado que o produto enquadra-se na **classificação dérmica primária como “não irritante” ou “levemente irritante”, de acordo com o teste de Draize em coelhos albinos ou através de ensaios in vitro devidamente validados e aceitos pela Autoridade Sanitária competente.**



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

Portaria nº 15, de 23 de agosto de 1988

Determina que o registro de produtos saneantes domissanitários com finalidade antimicrobiana seja procedido de acordo com as normas regulamentares.

VIII - AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA

1. A avaliação toxicológica dos princípios ativos não listados no SUBANEXO 1 será efetuada com base nos testes constantes do SUBANEXO 4, de acordo com suas características físicas e toxicológicas, considerando as finalidades e instruções de uso.

1.1. O mesmo procedimento sucederá com as substâncias adjuvantes não listadas na legislação de Vigilância Sanitária em vigor.



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

VIII - AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA (continuação)

2. A classificação de risco dos produtos saneantes domissanitários com ação antimicrobiana será efetuada tomando-se por base os testes toxicológicos agudos do SUBANEXO 4 de acordo com a forma de apresentação, as finalidades e instruções de uso.

2.1. Para a classificação de risco dos produtos em cujas composições figurem exclusivamente os princípios ativos constantes do SUBANEXO 1 deverão ser apresentados os dados toxicológicos agudos conforme a tabela do SUBANEXO 3.



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

VIII - AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA (continuação)

2.2. Para a classificação de risco dos produtos em cujas composições figurem princípios ativos Não listados no SUBANEXO 1 deverão ser apresentados os dados toxicológicos agudos completos, itens a, b, c (este quando for o caso), d e e do SUBANEXO 4

2.3. A classificação de risco dos produtos não dependerá de todas as informações toxicológicas se enquadrarem na mesma classe de risco. O dado mais agravante será tomado como base para classificar a formulação.

3. A avaliação toxicológica e a classificação de risco de que tratam os itens 1 e 2 será efetuada mediante a apresentação dos ensaios realizados em laboratórios idôneos nacionais ou estrangeiros, desde que a metodologia empregada seja a estabelecida pelo INCQS/FIOCRUZ ou aceita pela Organização Mundial de Saúde.



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

VIII - AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA (continuação)

4. Os testes toxicológicos para o estabelecimento da classificação de risco dos produtos deverão ser realizados com as formulações não diluídas, excetuando-se os produtos para desinfecção de piscinas e utensílios de lactário, para os quais os testes considerarão a diluição de uso recomendada.

4.1. Estes produtos somente serão autorizados quando as suas diluições, além de serem eficientes sob o ponto de vista microbiológico, se enquadrarem na classe de risco IV, constante do SUBANEXO 5, no que tange a efeitos adversos sobre a pele e olhos.



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

VIII - AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA (continuação)

5. Os produtos abrangidos pelos itens 1 e 2, título IV, quando apresentados sob a forma de líquido premido (aerossol) ou líquido para pulverização, se capazes de promover a emissão de partículas com diâmetro aerodinâmico igual ou inferior a 15 micrômetros somente serão autorizados se enquadrados nas classes de risco III e IV, no que tange à irritabilidade ocular, conforme a classificação do SUBANEXO 5.

5.1. Para os produtos classificados nos itens 3 e 6, título, IV, será tolerada, também, a classe de risco II, pertinente à irritabilidade ocular.



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

SUBANEXO 3: TABELA DOS DADOS TOXICOLÓGICOS AGUDOS PARA PRODUTOS COM PRINCÍPIOS ATIVOS AUTORIZADOS

Forma Física	DHSP	DHASC	EST
Líquidos (simples)	ID, IO	ID, IO	ID, IO
Líquidos pulverizáveis	ID, IO	N	N
Líquidos premidos	ID, IO	N	N
Pós	-	-	-
Granulados	-	-	-
Tabletes	N	N	N
Bastões	N	N	N
Blocos	N	N	N
Pastilhas	-	-	-

Legendas: ID - irritabilidade térmica, IO - irritabilidade ocular, N - não autorizado, DHSP – Desinfetante Hospitalar para Superfícies Fixas, DHASC – Desinfetante Hospitalar para Artigos Semi-Críticos, EST-Esterilizante



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

SUBANEXO 4: TESTES PARA AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA

- 1.Toxicidade aguda por via oral para ratos, com valores de DL50 e descrição dos sintomas observados.**
- 2.Toxicidade aguda por via dérmica para ratos, com valores de DL50 e descrição dos sintomas observados.**
- 3.Toxicidade aguda por via inalatória para ratos, com valores de CL50 e descrição da sintomatologia observada.**



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

SUBANEXO 4: TESTES PARA AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA (continuação)

- 4. Testes de irritabilidade da pele e olhos em coelhos, sendo dispensável no caso de produtos com pH igual ou inferior a 2 ou igual ou superior a 11,5, enquadrados automaticamente na classe de risco I (corrosivos).**
- 5. Teste de sensibilização dérmica em coabaias.**
- 6. Testes para verificação de mutagenicidade "in vitro" e "in vivo".**



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

SUBANEXO 4: TESTES PARA AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA (continuação)

- 7. Teste de toxicidade sub-crônica (noventa dias) via oral, em ratos.**
- 8. Teste para avaliação do metabolismo e excreção, em ratos.**
- 9. Teste para verificação de efeitos teratogênicos em ratos e coelhos.**
- 10. Teste para verificação de efeitos carcinogênicos em camundongos e ratos, via oral, com duração não inferior a 18 e 24 meses, respectivamente**



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

SUBANEXO 4: TESTES PARA AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA (continuação)

11. Teste para avaliação de toxicidade crônica, via oral, com espécie roedora e outra não roedora.

12. Teste para verificação de efeitos nocivos ao processo reprodutivo, em ratos, por, no mínimo, 2 gerações.

13. Teste para verificação de toxicidade dérmica sub-aguda (vinte e um dias), em ratos ou coelhos.

14. Teste para verificação de toxicidade inalatória sub-aguda (quatorze a vinte e um dias), em ratos.



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

SUBANEXO 4: TESTES PARA AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA (continuação)

- 14. Teste para verificação de neurotoxicidade retardada.**
- 15. Testes complementares para enzimas específicas.**
- 16. Dados sobre o emprego de antídotos, antagonistas e primeiros socorros para os casos de intoxicação.**



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

Portaria nº 152, de 26 de fevereiro de 1999

Aprova o Regulamento Técnico para produtos destinados à desinfecção de água para o consumo humano e de produtos algicidas e fungicidas para piscinas.

D - CARACTERÍSTICAS GERAIS:

D.6. Para os produtos algicidas e fungicidas para piscinas, somente serão permitidos produtos cuja classificação quanto à irritabilidade dérmica e ocular, na concentração de uso, enquadrem-se na classe IV do Anexo V.

ANEXO I:

B. RELATÓRIO TÉCNICO CONTENDO:

Dados toxicológicos: irritabilidade dérmica e ocular na concentração final de uso para os produtos algicidas e fungicidas para piscinas;.



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

ANEXO III: DADOS PARA AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE PRINCÍPIOS ATIVOS NÃO CONSTANTES DO ANEXO II:

- 1. Toxicidade aguda por via oral para ratos, com valores de DL50 e descrição dos sintomas observados.**
- 2. Toxicidade aguda por via dérmica para ratos, com valores de DL50 e descrição dos sintomas observados.**
- 3. Toxicidade aguda por via inalatória para ratos, com valores de CL50 e descrição da sintomatologia observada.**



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

ANEXO III: DADOS PARA AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE PRINCÍPIOS ATIVOS NÃO CONSTANTES DO ANEXO II (continuação)

- 4. Testes de irritabilidade da pele e olhos em coelhos, sendo dispensável no caso de produtos com pH igual ou inferior a 2 ou igual ou superior a 11,5, enquadrados automaticamente na classe de risco I (corrosivos).**
- 5. Teste de sensibilização dérmica em coabaias.**
- 6. Testes para verificação de mutagenicidade "in vitro" e "in vivo".**



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

ANEXO III: DADOS PARA AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE PRINCÍPIOS ATIVOS NÃO CONSTANTES DO ANEXO II (continuação)

- 7. Teste para avaliação do metabolismo e excreção, em ratos.**
- 8. Teste para verificação de efeitos teratogênicos em ratos e coelhos.**
- 9. Teste para verificação de efeitos carcinogênicos em duas espécies sendo uma de preferência não roedora.**
- 10. Teste para avaliação de toxicidade crônica, via oral, com espécie roedora e outra não roedora.**



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

ANEXO III: DADOS PARA AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE PRINCÍPIOS ATIVOS NÃO CONSTANTES DO ANEXO II (continuação)

- 11. Teste para verificação de efeitos nocivos ao processo reprodutivo, em ratos, por, no mínimo, 2 gerações.**
- 12. Teste de toxicidade com doses repetidas diárias por via oral, dérmica e inalatória (14/21/28 dias), em camundongos, coelhos e ratos.**
- 13. Teste de toxicidade subcrônica por via oral, dérmica e inalatória em camundongos, coelhos e ratos.**



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

Resolução - RDC nº 326, de 09 de novembro de 2005

Aprova o Regulamento técnico para produtos Desinfestantes Domissanitários harmonizado no âmbito do Mercosul através da Resolução GMC nº 49/99.

15. Determinação da DL50 oral para ratos brancos machos para produtos de venda livre ao consumidor;

16. Dados toxicológicos, para produtos inseticidas de venda restrita à entidades especializadas, envolvendo aspectos de toxicidade aguda: DL50 dérmica, DL50 oral, irritabilidade dérmica primária, irritabilidade ocular e sensibilização cutânea.



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

ANEXO 4: ESTUDOS TOXICOLÓGICOS ENVOLVENDO ASPECTOS BIOQUÍMICOS E PROVAS TOXICOLÓGICAS PARA AVALIAÇÃO DE INGREDIENTES ATIVOS NÃO AUTORIZADOS PELA AUTORIDADE SANITÁRIA COMPETENTE

- 1. Dose letal 50 aguda - DL 50 - por via oral e dérmica, para animais de laboratórios;**
- 2. Toxicidade a curto prazo, compreendendo a alimentação de animais de laboratório diariamente, com rações adicionais de várias doses de ingredientes ativos testados, por período de tempo nunca inferior a um décimo da vida média (90 dias para ratos e camundongos, 1 ano para cães), incluindo dados sobre curvas ponderais, consumo de alimentos, exame clínico, provas hematológicas, testes bioquímicos de sangue e urina, inclusive para detecção de possíveis efeitos hormonais, exames anatomopatológicos e histopatológicos abrangendo pelo menos duas espécies de animais, uma das quais não roedora;**



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

- 3. Toxicidade a longo prazo, compreendendo a alimentação de animais de laboratório, diariamente, com rações adicionais de várias doses de ingredientes ativos testados, por período de tempo no mínimo equivalente a metade da vida média das espécies dos animais empregados (18 meses para camundongos e 24 para ratos), incluindo observações semelhantes as dos ensaios de toxicidade de curto prazo e além disso, de estudos sobre ocorrência de possíveis efeitos carcinogênicos.**
- 4. Efeito sobre a reprodução e a prole, em três gerações sucessivas;**
- 5. Metabolismo e via de excreção incluindo a média de vida biológica do ingrediente ativo, com animais de laboratório. Toxicidade dos metabólitos se forem diferentes em plantas e animais;**
- 6. Possíveis efeitos teratogênicos;**
- 7. Possíveis efeitos mutagênicos;**
- 8. Possíveis efeitos neurotóxicos retardados, quando aplicável,;**



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

Portaria nº 322, de 28 de julho de 1997

Aprova as Normas Gerais para Produtos para Jardinagem Amadora.

ANEXO 1: INFORMAÇÕES NECESSÁRIAS PARA A AUTORIZAÇÃO DO REGISTRO DE PRODUTOS PARA USO EM JARDINAGEM AMADORA

15. Determinação da DL50 oral para produtos de venda direta ao consumidor.

CLASSE	DL₅₀ ORAL	DL₅₀ DÉRMICA	CL₅₀ INALATÓRIA	LESÕES OCULARES	LESÕES DÉRMICAS
I	≤ 50	≤ 200	≤ 0,2	capacidade de córnea e/ou irite irreversível em 7 dias, corrosão, ulceração	eritema severo persistente por 72 horas, edema moderado a severo por 72 h.
II	> 50 ≤ 500	> 200 e ≤ 2000	> 0,2 e ≤ 2	capacidade da córnea e irite reversíveis em 7 dias, moderada hiperemia da conjuntiva	eritema moderado persistente por 72 horas, edema regredindo em 72 horas.
III	> 400 e ≤ 5000	> 2000 e ≤ 4000	> 2 e ≤ 20	sem capacidade de córnea, irite reversível em 48 horas, leve hiperemia de conjuntiva reversível em 7 dias	eritema leve reversível em 72 horas, sem edema.
IV	> 50000	> 4000	> 20	sem irritação ou leve hiperemia da conjuntiva reversível em 24 h.	sem irritação ou leve eritema reversível em 24 h.

DL₅₀ expressa em mg do produto por kg de peso do animal em teste.

CL₅₀ expressa em mg do produto por volume em litros do ambiente de teste.



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VIVO*





Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VIVO*

Toxicidade aguda:

- Toxicidade oral aguda (DL_{50} oral);
- Toxicidade dérmica aguda (DL_{50} dérmica);
- Toxicidade inalatória aguda (CL_{50}).

Toxicidade subcrônica e crônica:

- Todos com exceção da Mutagenicidade.



Minicursos CRQ-IV - 2008

toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VIVO*

OECD:

Organization for Economic Cooperation and development.

EPA:

Environmental Protection Agency.



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VIVO*

TOXICIDADE ORAL AGUDA (DL₅₀ oral)

Finalidade: Estabelecer, para fins de avaliação e classificação do perigo, a dose capaz de matar, **POR VIA ORAL**, 50 % da população submetida ao teste.

- **OECD 420: Acute Oral toxicity – Fixed dose method (Dezembro, 2001):**
 - 5 ratos machos e 5 fêmeas não nulíparas por dose.
 - Doses de 5, 50, 500 e 2.000 mg/kg.
 - **Necrópsia de todos animais submetidos ao teste.**



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VIVO*

- **OECD 423: Acute Oral toxicity – Acute Toxic Class Method (Dezembro, 2001):**
 - 3 ratos de mesmo sexo por dose.
 - Doses de 5, 200 e 2000 mg/kg inicialmente.
 - Necrópsia de todos animais submetidos ao teste.

- **OECD 425: Acute Oral toxicity – Up and Down Procedure (Dezembro, 2001).**



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VIVO*

TOXICIDADE DÉRMICA AGUDA (DL₅₀ dérmica)

Finalidade: Estabelecer, para fins de avaliação e classificação de perigo, a dose capaz de matar, **POR VIA DÉRMICA**, 50 % da população submetida ao teste.

- **OECD 402: Acute Dermal Toxicity (Fev., 1987)**
 - 5 ratos machos e 5 fêmeas não nulíparas por dose.
 - Doses de 5, 50, 500 e 2000 mg/kg.
 - Necrópsia de todos animais submetidos ao teste.



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VIVO*

TOXICIDADE INALATÓRIA AGUDA (LC_{50})

Finalidade: Estabelecer, para fins de avaliação e classificação de perigo, a concentração capaz de matar, **POR VIA INALATÓRIA**, 50 % da população submetida ao teste.

▪ **OECD 403: Acute Inhalation Toxicity (Maio, 1981)**

- **Substâncias-teste voláteis, premidas ou particuladas.**
- **5 ratos machos e 5 fêmeas não nulíparas por dose.**
- **4 horas de exposição – Conc. Limítrofe: 5mg/L da substância teste.**



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VIVO*

Devem ser registradas ao final do estudo:

- ***Espécie / cepa utilizada.***
- ***Concentrações da substância teste.***
- ***Tempo de morte individual e concentração correspondente.***
- ***Nº de animais que demonstraram outros sinais de toxicidade.***
- ***Patologia dos indivíduos testados.***



Minicursos CRQ-IV - 2008

toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VIVO*

Irritabilidade Dérmica

- **Primária => aplicação única com duração de 5 dias.**
- **Repetida => aplicação por 10 dias consecutivos e avaliação durante 14 dias.**



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VIVO*

- **OECD 404: Acute Dermal Irritation / Corrosion (Abril, 2002)**
 - 3 coelhos albinos Nova Zelândia, no máximo;
 - Tricotomia de 2 áreas no dorso do animal (controle e tratamento);
 - Aplicação de 0,5 mL do produto;
 - “Patch” oclusivo por 4 horas;
 - Leitura 24 e 72 horas após aplicação;
 - Parâmetros: Eritema e edema.
 - Deve ser obedecida a árvore decisória antes da realização do teste.



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VIVO*

1. **Dados em humanos ou animais relativos a corrosividade, irritabilidade ou ausência de efeitos dérmicos;**
2. **QSAR (Rel. Estrutura – atividade) previsível quanto a corrosividade ou irritabilidade dérmica;**
3. **Avaliação do pH e da capacidade tamponante;**
4. **Dados sobre a toxicidade dermal sistêmica;**
5. **Testes validados *in vitro* ou *ex vivo* referentes a corrosividade / irritabilidade dérmica;**
6. **Teste para corrosão / irritação dérmica *in vivo* com 1 animal;**
7. **Teste para corrosão / irritação dérmica *in vivo* com 2 animais adicionais.**



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VIVO*





Minicursos CRQ-IV - 2008

toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VIVO*





Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

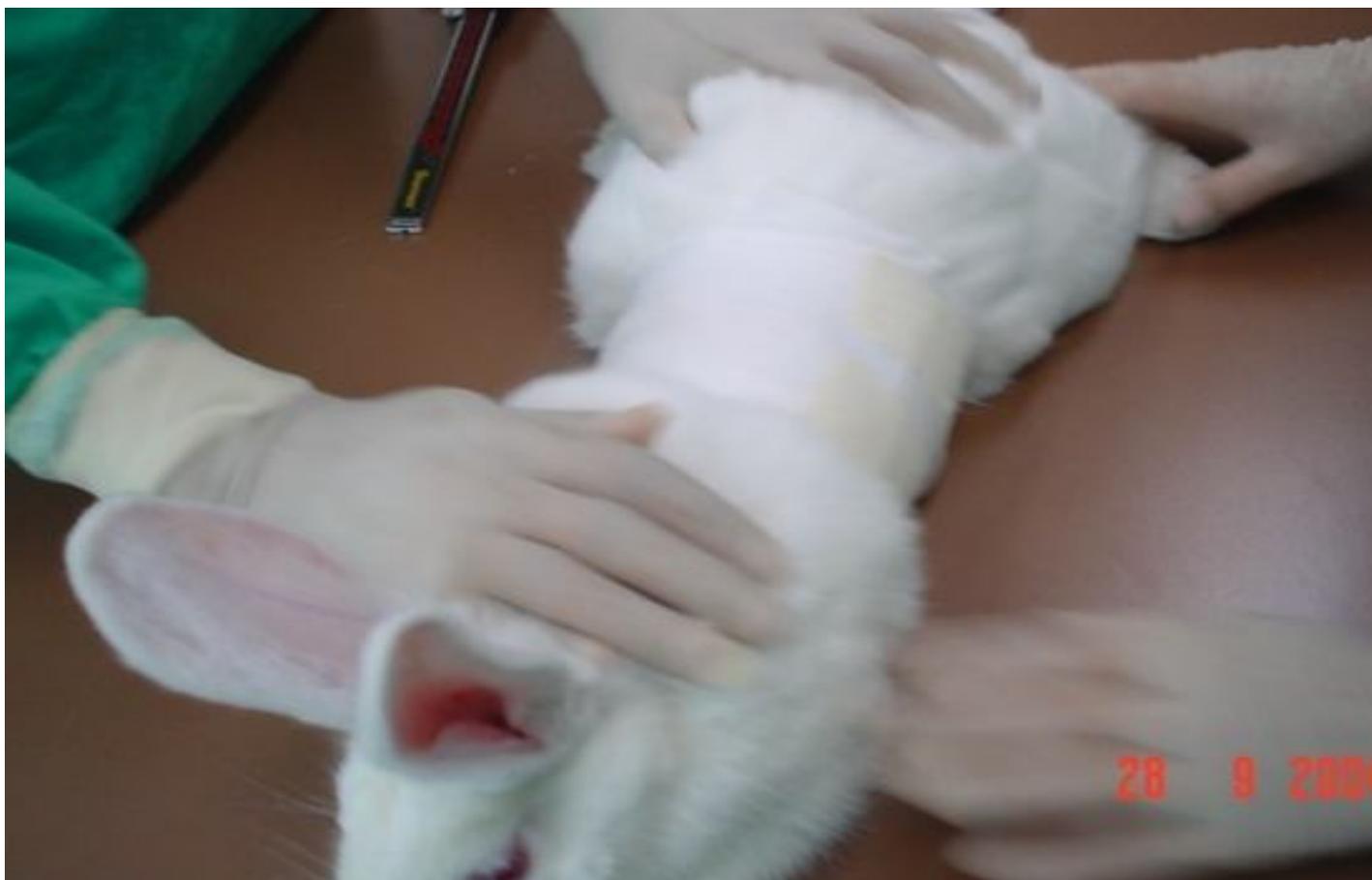
TESTES *IN VIVO*





Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VIVO*





Minicursos CRQ-IV - 2008

toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VIVO*





Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VIVO*





Minicursos CRQ-IV - 2008

toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VIVO*





Minicursos CRQ-IV - 2008

toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VIVO*

Graduações

Eritema :

0 - pele normal

1- eritema leve – levemente avermelhada

2 - eritema bem definido - vermelhidão

3 – eritema moderado – vermelhidão intensa

4 – eritema severo – c/ escaras



Minicursos CRQ-IV - 2008

toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VIVO*

Graduações

Edema :

0 – s/edema – 0 a 0,24 mm

1- edema muito leve – 0,25 a 0,49 mm

2 - edema leve - 0,5 a 0,74 mm

3 – edema moderado – 0,75 a 1 mm

4 – edema severo – > 1 mm



Minicursos CRQ-IV - 2008

toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VIVO*

Cálculos e Classificação

0 – 0,9	Não irritante
1 – 1,9	Irritante leve
2 – 4,9	Irritante moderado
5 - 8	Irritante severo



Minicursos CRQ-IV - 2008

toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VIVO*

Irritabilidade Ocular

- ✓ Draize – 1944/1959
- ✓ Kay & Calandra – 1964 – classificação
- ✓ Várias modificações
 - **redução de 9 para 5 animais.**
 - **lavagem ou não 24 horas após aplicação.**
 - **baixo volume (10uL).**
 - **FDA, CFR, OECD, etc.**



Minicursos CRQ-IV - 2008

toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VIVO*

KAY & CALANDRA – 1964

- 1. Não irritante**
- 2. Praticamente não irritante**
- 3. Minimamente irritante**
- 4. Levemente irritante**
- 5. Moderadamente irritante**
- 6. Severamente irritante**
- 7. Extremamente irritante**
- 8. Maximamente irritante**



Minicursos CRQ-IV - 2008

toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VIVO*

Modificações no Teste de Draize

Guideline	Nº de animais	Leituras (horas)	Classificação
FDA	6	24, 48, 72	Não irritante/ irritante
OECD	1 + 2	1, 24, 48 e 72	Não irritante/ irritante
INCQS	5	24,48,72,148	Não irritante, Leve, Moderado, Severo, Máximo



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VIVO*

Método *in vivo*:

- **OECD 405: Acute Eye Irritation / Corrosion (Abril, 2002)**

- 3 coelhos albinos da Nova Zelândia
- 100uL (0,1 mL) no saco conjuntival.
- massagem por 30 segundos.
- lavagem ou não 24 horas após aplicação.
- leituras com 24h, 48h, 72 hs e 7 dias.
- Obedecer árvore decisória antes do início do teste.



Minicursos CRQ-IV - 2008

toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VIVO*

1. **Dados em humanos ou animais relativos a corrosividade, irritabilidade e/ou ausência de efeitos oculares;**
2. **Dados em humanos ou animais relativos a corrosividade, irritabilidade e/ou ausência de efeitos dérmicos;**
3. **QSAR (Rel. Estrutura – atividade) previsível quanto a corrosividade ou irritabilidade ocular;**
4. **QSAR (Rel. Estrutura – atividade) previsível quanto a corrosividade ou irritabilidade dérmica;**
5. **Avaliação do pH e da capacidade tamponante;**
6. **Dados sobre a toxicidade dérmica sistêmica;**



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VIVO*

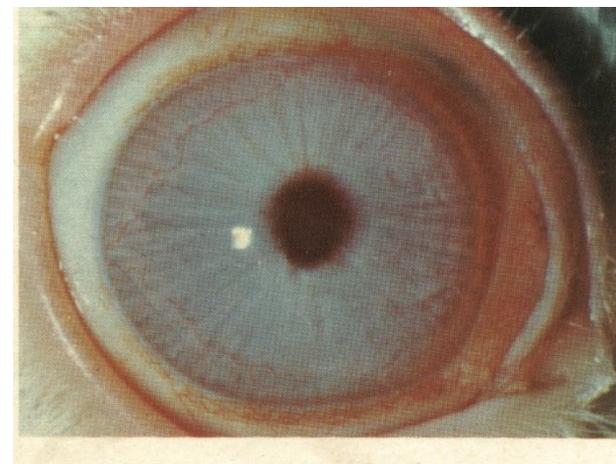
7. Testes validados *in vitro* ou *ex vivo* referentes a corrosividade / irritabilidade ocular;
8. Testes validados *in vitro* ou *ex vivo* referentes a corrosividade / irritabilidade dérmica;
9. Testar corrosão / irritação dérmica *in vivo*;
10. Teste para corrosão / irritação ocular *in vivo* com 1 animal;
11. Teste para corrosão / irritação ocular *in vivo* com 2 animais adicionais.



Minicursos CRQ-IV - 2008

toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VIVO*



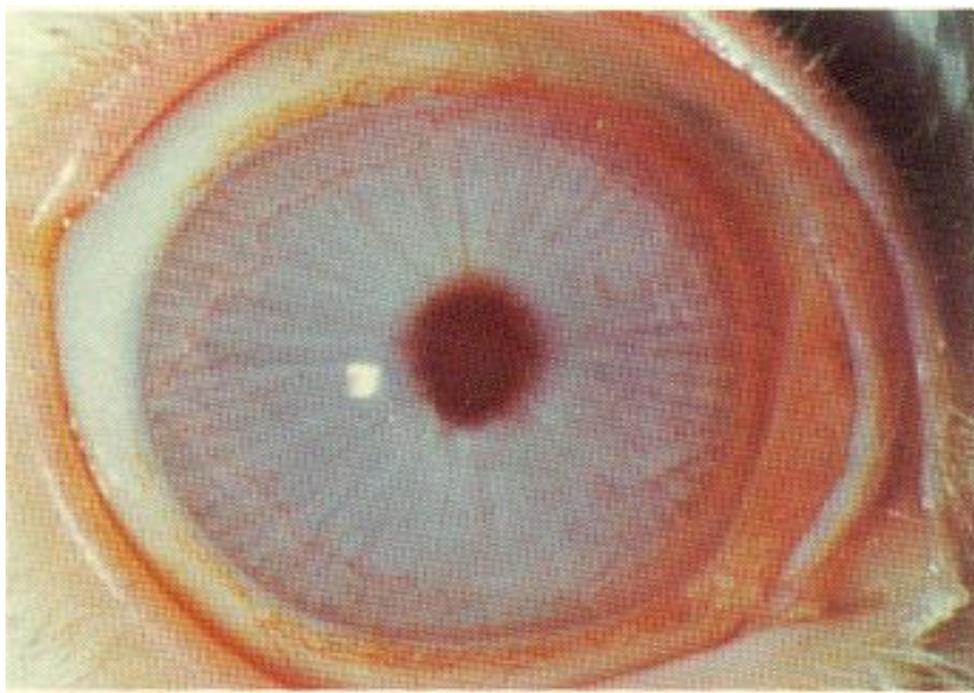


Minicursos CRQ-IV - 2008

toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VIVO*

Observação e graduação das alterações

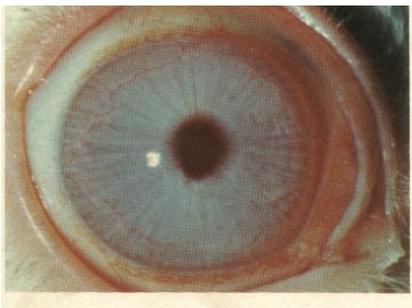


Córnea → opacidade (0 – 4)
 → área (0 – 4)

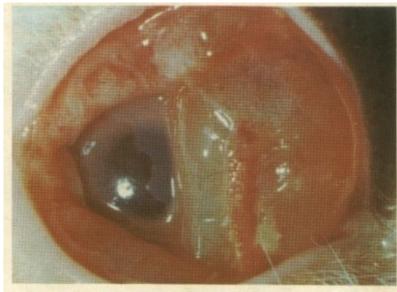
Íris → irite (0 – 2)

Conjuntiva → secreção (0 – 3)
 → quimose (0 – 4)
 → hiperemia (0 – 3)

TESTES *IN VIVO*



Olho Normal



1 hora

Hiperemia 3

Quimose 4

Irite 1

Opacidade 2



24 horas

Hiperemia 3

Quimose 3

Irite 2

Opacidade 1



48 horas

Hiperemia 3

Quimose 3

Irite 2

Opacidade 1



72 horas

Hiperemia 3

Quimose 2

Irite 2

Opacidade 2



7 dias

Hiperemia 3

Quimose 2

Irite 2

Opacidade 4



Minicursos CRQ-IV - 2008

toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VIVO*

Métodos

Mais difundidos:

- ✓ **Buehler – Skin Sensization: OECD 406 (Julho, 2002).**
- ✓ **Local Lymph Node Assay – OECD 429 (Abril, 2002).**



Minicursos CRQ-IV - 2008

toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VIVO*

Princípio da sensibilização

- ✓ **Fase de Indução – aprox. 3 semanas**
- ✓ **Fase de repouso – aprox. 2 semanas**
- ✓ **Fase de desafio – em geral 3 dias**



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VIVO*

- **Animais de experimentação convencionais:**
Rato, Camundongo, Cobaia, Coelho, Hamster.
- **Não convencionais:**
Cavalo, Carneiro, Porco, Peixe, Gerbil, Furão, Macaco.



Minicursos CRQ-IV - 2008

toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VIVO*

Gerbil



Furão



Minicursos CRQ-IV - 2008

toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VIVO*

Tipos de Animais de experimentação

- **Convencionais.**
- **SPF - Specific Pathogen Free.**
- **Germ Free.**



Minicursos CRQ-IV - 2008

toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VIVO*

Tipos de Biotérios

- **Criação**
- **Experimentação**



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VIVO*

- **Cantos curvos.**
- **Corredores limpo e sujo.**
- **Manutenção de luzes e equipamentos pelo teto.**
- **Sem ralos nas salas.**
- **Pintura e superfícies de fácil limpeza.**
- **Sem janelas.**
- **Área de lavagem e esterilização.**
- **Salas de recepção.**
- **Quarentena.**



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VIVO*

- Salas separadas por espécies.
- Diferencial de pressão.
biotério de criação => - fora/ + dentro.
biotério de exper. => + fora/ - dentro.
- Controle de temperatura.
- Controle de umidade.
- Ciclo claro/escuro de 12/12 hs - (nível de luz).
- Número de animais por caixa.
- Tipos de caixas apropriados.
- Baixos níveis de ruído.



Minicursos CRQ-IV - 2008

toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VIVO*

- **Treinamento (UE - diferentes categorias).**
- **Uso de EPI's:**
 - **Luvas;**
 - **Gorro;**
 - **Máscara;**
 - **Sapatilha;**
 - **Vental cirúrgico/jaleco.**
- **Uso de EPC's:**
 - **Fluxo laminar.**



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VIVO*

- **Identificação de caixas.**
- **Complementação alimentar (Vitamina C ou capim para cobaias).**
- **Feno para cobaias (distração).**
- **Calibração de balanças, autoclaves, etc.**
- **Controle ambiental.**
- **Cuidados com a cama.**
- **Freqüência de trocas.**
- **Barreiras físicas.**
- **Sala de sacrifício.**



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VIVO*

ÉTICA NO MANUSEIO DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO

- Conjunto de procedimentos que visam o tratamento humano dos animais de laboratório, de forma a manter o bem-estar e reduzir o *stress*.



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VIVO*

- **Existem grupos colegiados que examinam os procedimentos a serem executados, de modo a garantir que os animais serão manuseados com rigor ético, bem como avaliar a relevância científica do projeto, evitando assim que ocorram: repetições desnecessárias, uso excessivo de animais, utilização de modelos experimentais inadequados, imposição de sofrimento, dentre outros.**



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VIVO*

- **Sacrifício “humano”:**
 - **anestésico, CO₂.**
- **Uso de anestésicos e analgésicos, sempre que possível.**
- **Considerar a existência de métodos alternativos validados.**
- **Respeito com os animais.**



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VIVO*

GUIAS SOBRE MANEJO DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO

- São compêndios que determinam as regras básicas a serem seguidas para um manuseio adequado e manutenção do bem - estar das espécies animais utilizadas em experimentação:
 - **Canadian Council for Animal Care.**
 - **NIH (National Institute of Health).**
 - **COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal).**



Minicursos CRQ-IV - 2008

toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VITRO*

Métodos Alternativos

- ✓ **1760 - Fergusson - preocupação com métodos bárbaros em testes com animais**
- ✓ **Séc. XIX - Bentham - preocupação com o bem estar dos animais (“a questão não é ‘Eles podem raciocinar?’ nem ‘Eles podem falar?’ , mas, ‘Eles sofrem?’”**
- ✓ **Séc. XIX - Marshal Hall - proposta de código na prática de pesquisa => diminuição da dor, substituição de grandes animais por organismos inferiores e prevenção de repetições desnecessárias.**



Minicursos CRQ-IV - 2008

toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VITRO*

Métodos Alternativos

- ✓ 1842 - fundação da British Society for the Prevention of Cruelty to Animals (mais tarde RSPCA) - primeira sociedade protetora dos animais, no mundo
- ✓ 1959 - Russel & Burch - publicação do livro "Principals of Humane Experimental Technique" - surgimento do conceito dos 3R's (Replacement, Reduction and Refinement)
- ✓ 1978 - campanha para a retirada do método de Draize dos testes em cosméticos, por defensores dos direitos animais



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VITRO*

O que são métodos alternativos?

São procedimentos que podem substituir completamente o uso de animais em experimentos (Replacement), reduzir o número de animais necessários (Reduction) ou diminuir a dor ou desconforto sofrido pelos animais (Refinement).

(adaptado de FRAME - Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments)



Minicursos CRQ-IV - 2008

toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VITRO*

Progressos na redução

- ✓ **Procedimentos de *screening*.**
- ✓ **Hierarquização de testes (já descrito na literatura para irritação, fotossensibilização e sensibilização).**
- ✓ **Integração de métodos (p. ex.: QSAR + *in vitro*).**



Minicursos CRQ-IV - 2008

toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VITRO*

A busca dos métodos alternativos

Experimentais

cultivo celular

HET-CAM

LAL

Corrositex®

Skintex®

Eyetex®

QSAR

PBPK

Educacionais

vídeos

simuladores

modelos plásticos



Minicursos CRQ-IV - 2008

toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VITRO*

Métodos válidos x validados

- ✓ **Válidos – métodos passíveis de serem utilizados (BCOP, ICE, NRU, etc.)**
- ✓ **Validados – aceitos oficialmente; reconhecidos (TER, SkinEthics®, UV-NRU, etc.)**



Minicursos CRQ-IV - 2008

toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VITRO*

HET- CAM TEST (HEN'S EGG TEST – CHORIOALLANTOIC MEMBRANE TEST)



Minicursos CRQ-IV - 2008

toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VITRO*

VISÃO GERAL DO TESTE

- **História do teste**
 - A base foi o modelo de embriões de galinhas usados por embriologistas e virologistas.
 - O método HET-CAM foi inicialmente proposto por Luepke (1985) e Luepke e Kemper (1986)
 - Em 1988 iniciou-se um projeto de validação (financiado pelo Governo Federal da Alemanha)
 - Fase preliminar com o estabelecimento do teste e desenvolvimento do protocolo.
 - Estudos interlaboratoriais com 35 substâncias em 12 laboratórios.
 - Uma base dados desenvolvida com 200 substâncias em 7 laboratórios.



Minicursos CRQ-IV - 2008

toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VITRO*

PRINCÍPIOS DO TESTE

- Uma dose definida de substância-teste é aplicada a uma membrana clorioalantônica de em ovos fertilizados e incubados de galinha (CAM).
- O CAM é avaliado por 300s para o desenvolvimento de pontos finais definidos:
 - O tempo decorrido até o aparecimento do primeiro ponto final individual é registrado.
 - A substância-teste é rinsada em tempos definidos (por exemplo, 30, 120, 300s) para avaliar e registrar as alterações, se as características físico-químicas da substância-teste permitirem a visualização de forma clara.



Minicursos CRQ-IV - 2008

toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VITRO*

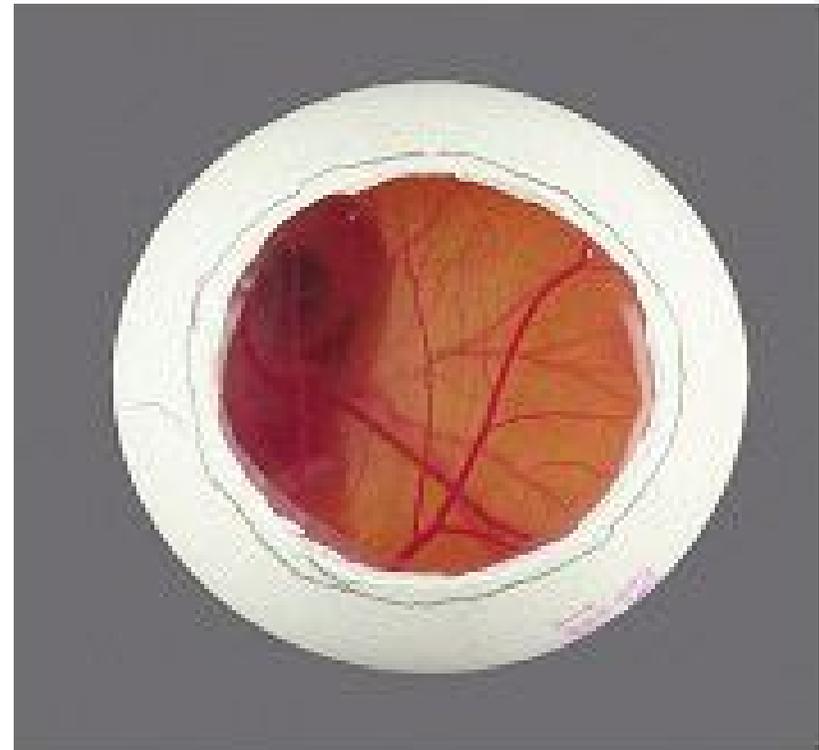
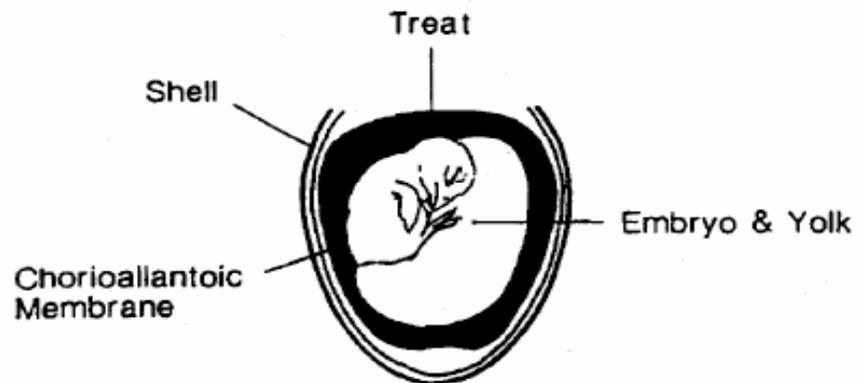
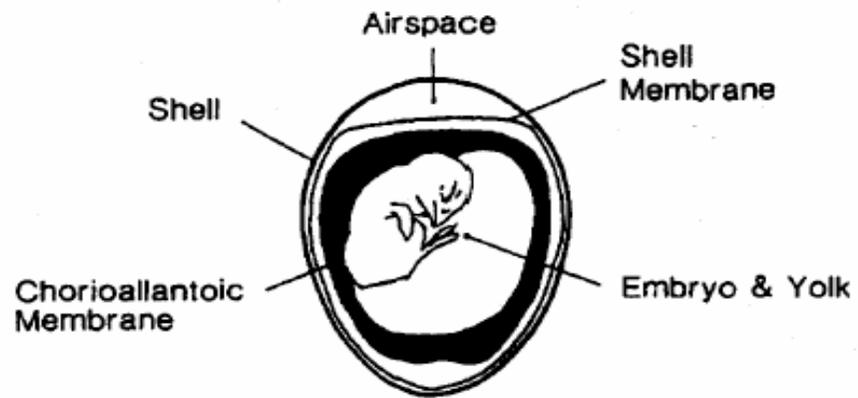
A MEMBRANA CHORIOALONTÔNICA

- A membrana respiratória vascularizada que circunda o embrião é composta por:
 - Uma camada ectodérmica (epitélio – 2 a 3 células de espessura).
 - Uma camada mesodérmica (tecido conectivo, substância base e vasos sanguíneos).
 - Uma camada endodérmica.
- Os vasos sanguíneos que estão presentes na camada mesodérmica do CAM são ramificações das artérias e veias embriolantônicas que formam uma camada capilar.

TESTES *IN VITRO*

LUEPKE METHOD

10 Days Old





Minicursos CRQ-IV - 2008

toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VITRO*

MATERIAIS

- Ovos brancos de Galinha Leghorn.
- Ovos frescos,, claros, ferteis (não mais que 7 dias) entre 50 e 60 g.
- Incubadora com dispositivo de rotação automática.
- Substância controle negativa: Solução de NaCl a 0.9% (p/v) NaCl solution, ou óleo de oliva ou outro veículo com solução a de NaCl a 0.9% (p/v).
- Substancia controle positiva: NaOH a 10%, NaOH em pellets, 1% dodecilsulfato de sódio.



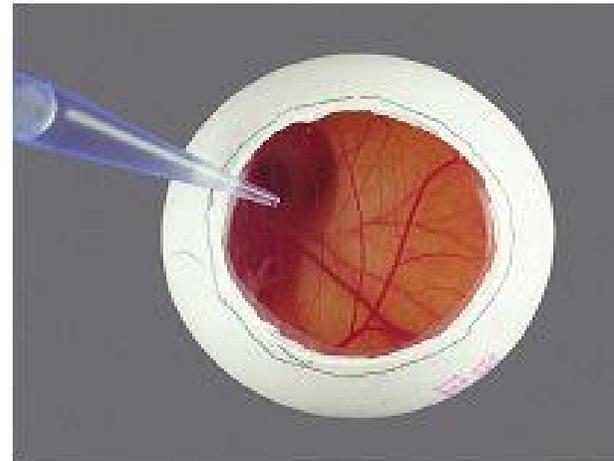
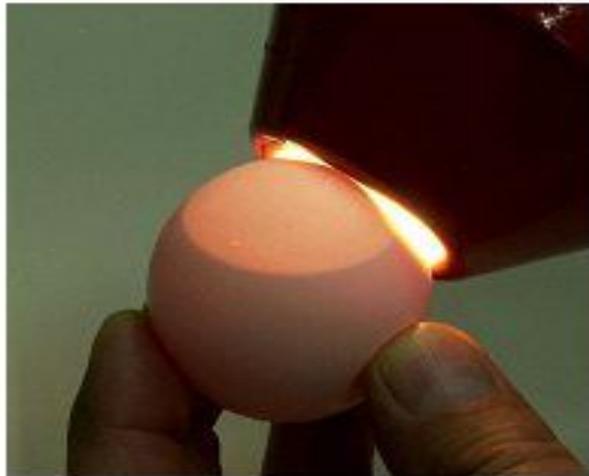
Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VITRO*

PREPARAÇÃO DO SISTEMA - TESTE

- Incubação dos ovos por 9 dias.
- Iluminação dos ovos após 8 dias de incubação para assegurar a viabilidade.
- Incubação por mais 24h sem rotação.
- Antes do uso remover a casca do ovo com auxílio de uma serra.
- Umedecer a membrana branca interna do ovo com a solução de NaCl a 0,9% (p/v). Manter os ovos aquecidos até seu uso.
- Remover cuidadosamente a membrana interna antes do uso (não mais do que 20min após a remoção da casca externa).

TESTES *IN VITRO*





Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VITRO*

TRATAMENTO COM A SUBSTÂNCIA - TESTE

- **Aplicação da substância – teste não diluída diretamente na CAM**
 - **Líquidos: 0,3 mL**
 - **Sólidos, pastas ou material particulado: 0.3 mL, não mais que 0,3g Os sólidos devem ser reduzidos a um pó fino.**
 - **Cobrir ao menos 50% da superfície do CAM com a substância-teste.**
- **Exposição por, no mínimo, 300s.**



Minicursos CRQ-IV - 2008

toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VITRO*

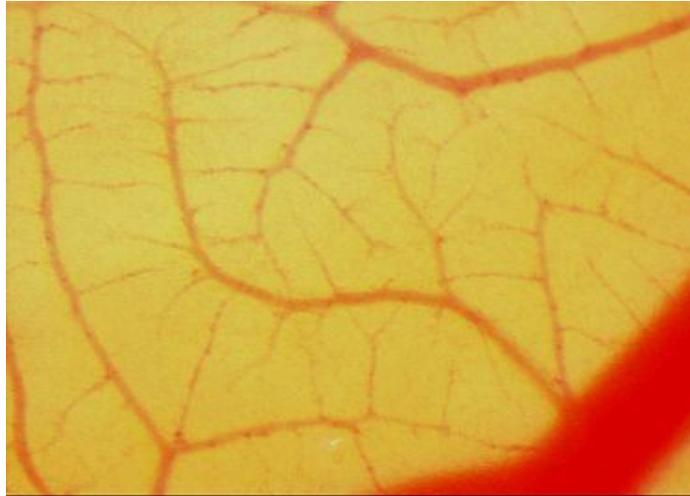
PONTOS FINAIS ATRAVÉS DA INSPEÇÃO VISUAL

– Hemorragia

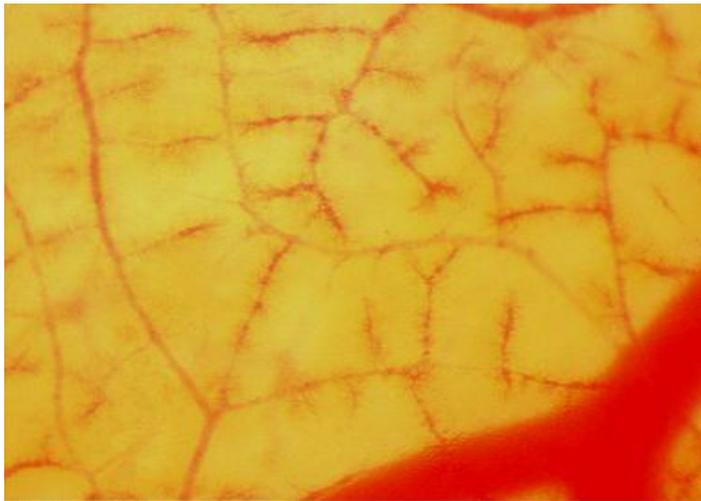
– Lysis

Desaparecimento de vasos sanguíneos na CAM.

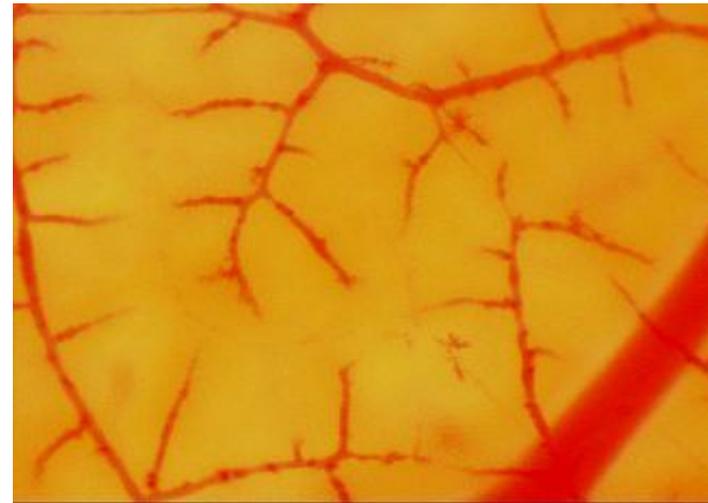
– Coagulação



Antes da aplicação do teste



Hemorragia



Coagulação

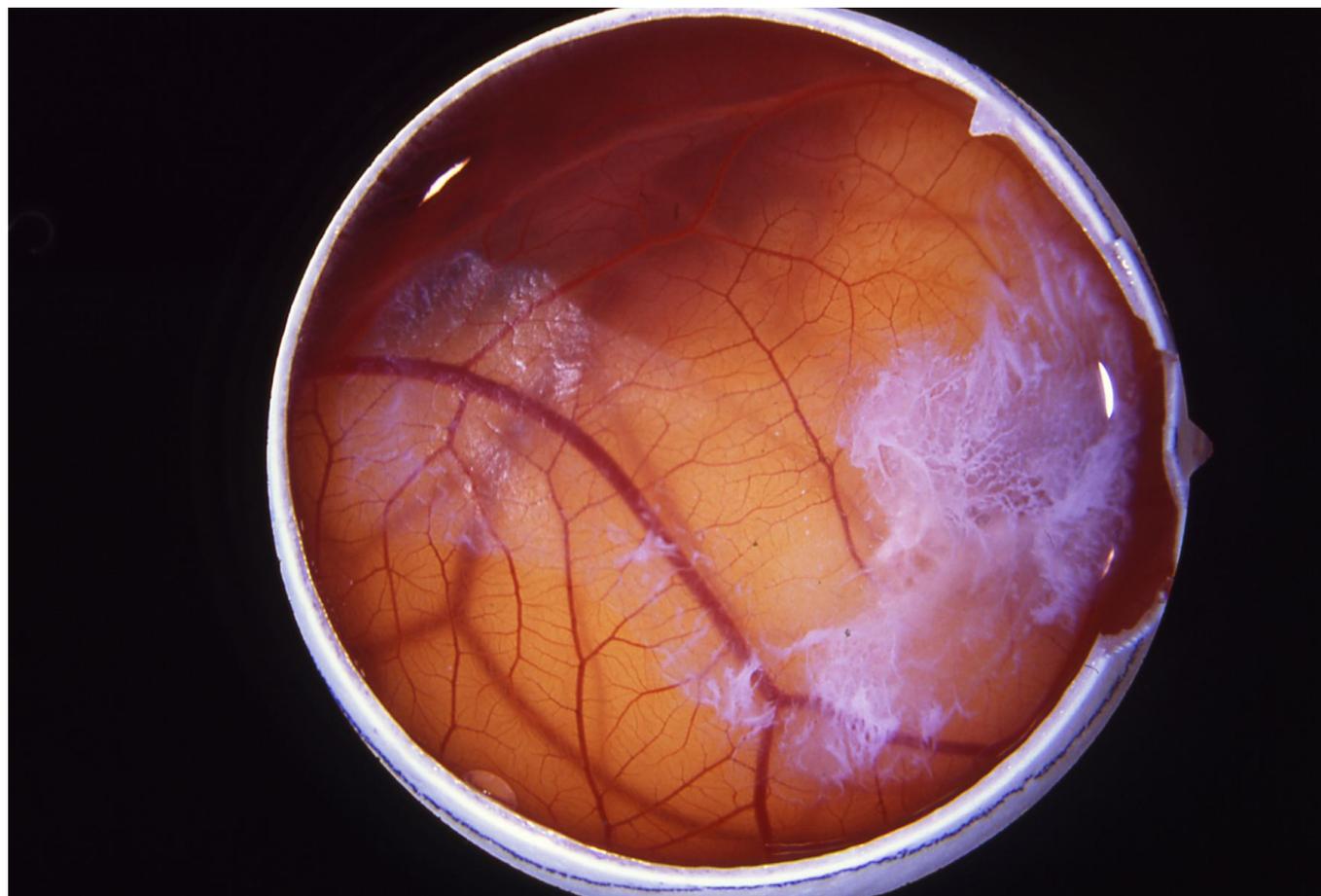


Minicursos CRQ-IV - 2008

toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VITRO*

**Coagulação
do albúmen**





Minicursos CRQ-IV - 2008

toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VITRO*

- **Medição e registro dos dados:**
 - **Tempo decorrido entre a aplicação da substância-teste e o aparecimento dos pontos finais.**
 - **Severidade das reações principais após 300 s.**
- **Número de replicatas:**
 - **Um mínimo de 3 ovos por substância-teste (por concentração no caso de diversas diluições)**
- **Número de replicatas:**
 - **Não necessário a não ser que respostas inequívocas sejam observadas em 3 ovos testados.**



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VITRO*

- **Determinação da concentração limite de irritação (ITC) como a maior concentração na qual uma leve reação seja observada.**

- **Cálculo do score de irritação (IS):**

$$\frac{(301 - \text{Hemorrhage time})}{300} \times 5 + \frac{(301 - \text{Lysis time})}{300} \times 7 + \frac{(301 - \text{Coagulation time})}{300} \times 9$$

300

300

300

Score mínimo: 0

Score máximo: 21



Minicursos CRQ-IV - 2008 toxicologia aplicada a saneantes

TESTES *IN VITRO*

- **Critérios de Decisão (exemplos de decisão IRRITANTE SEVERO / CORROSIVO)**
 - **ITC < 1%**
ou
 - **1.0% < ITC < 2.5% e IS (10%) > 16** **ou**
 - **2.5% < ITC < 10.0% e IS (10%) < 16** **ou**
 - **IS (substância-teste não diluída ou dissolvida) ≥ 9.0**
ou
 - **Tempo de detecção médio para o aparecimento de coagulação (substância-teste não diluída ou dissolvida) é < 60 sec**



Minicursos CRQ-IV - 2008
toxicologia aplicada a saneantes

FUTURO DOS TESTES TOXICOLÓGICOS

**O QUE OS
SENHORES
ACHAM????????**



Minicursos CRQ-IV - 2008
toxicologia aplicada a saneantes

Muito Obrigado

Marco Antonio Abla

marcoabla@hotmail.com