



Agência Nacional de Vigilância Sanitária

www.anvisa.gov.br

Consulta Pública nº 60, de 3 de setembro de 2009.

D.O.U de 04/09/09

A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, no uso das atribuições que lhe confere o inciso IV do art. 11 e o art. 35 do Regulamento da ANVISA aprovado pelo Decreto nº 3.029, de 16 de abril de 1999, e tendo em vista o disposto no inciso V e nos §§ 1º e 3º do art. 54 do Regimento Interno aprovado nos termos do Anexo I da Portaria nº 354 da ANVISA, de 11 de agosto de 2006, republicada no DOU de 21 de agosto de 2006, em reunião realizada em 1 de setembro de 2009,

adota a seguinte Consulta Pública e eu, Diretor Presidente, determino a sua publicação:

Art. 1º Fica aberto, a contar da data de publicação desta Consulta Pública, o prazo de 60 (sessenta) dias para que sejam apresentadas críticas e sugestões relativas à proposta de Regulamento Técnico, para o ingrediente ativo Acefato, contido na Relação de Monografias dos Ingredientes Ativos de Agrotóxicos, Domissanitários e Preservantes de Madeira.

Art. 2º Informar que a proposta Regulamento Técnico, bem como a Nota Técnica do Ingrediente Ativo Acefato estará disponível, na íntegra, durante o período de consulta no endereço eletrônico www.anvisa.gov.br e que as sugestões deverão ser encaminhadas por escrito para o seguinte endereço: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, SIA, Trecho 5, Área Especial 57, Lote 200, Brasília, DF, CEP 71.205.050 ou Fax: (061)3462-5726 ou E-mail: toxicologia@anvisa.gov.br.

Art. 3º Findo o prazo estipulado no art. 1º a Agência Nacional de Vigilância Sanitária articular-se-á com os Órgãos e Entidades envolvidos na reavaliação toxicológica de acordo com a RDC 48, de 07 de julho de 2008, visando à consolidação do texto final.

DIRCEU RAPOSO DE MELLO

ANEXO

Proposta de Regulamento Técnico

A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, no uso da atribuição que lhe confere o inciso IV do art. 11 do Regulamento aprovado pelo Decreto nº 3.029, de 16 de abril de 1999, e tendo em vista o disposto no inciso II e nos §§ 1º e 3º do art. 54 do Regimento Interno aprovado nos termos do Anexo I da Portaria nº 354 da ANVISA, de 11 de agosto de 2006, republicada no DOU de 21 de agosto de 2006, em reunião realizada em.....de de 2009, e

considerando o disposto na Constituição Federal, de 05 de outubro de 1988, em seu artigo 5º, XXXIII e LX, relativos ao direito à informação e publicidade dos atos da administração pública;

considerando o disposto na Constituição Federal, de 05 de outubro de 1988, em seu artigo 200, incisos I, II e VII;

considerando o disposto na Lei nº. 8.080, de 19 de setembro de 1990, em seu art. 6º, incisos I e alíneas, VII, IX e § 1º e incisos;

considerando o disposto na Lei nº. 9.782, de 26 de janeiro de 1999, em seu artigo 8º e parágrafos, que determina a regulamentação, o controle e a fiscalização dos produtos que envolvam risco à saúde pública;

considerando o disposto na Lei nº 9.784, de 29 de janeiro de 1999; que regula o processo administrativo no âmbito da Administração Pública Federal;

considerando a Lei nº 10.603, de 17 de dezembro de 2002, que dispõe sobre a informação não divulgada submetida para aprovação da comercialização de produtos;

considerando o disposto na Lei nº. 7.802, de 11 de julho de 1989, art. 3º, § 6º, alíneas c e d, combinado com disposto no Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002, artigos 2º, inciso VI; art. 6º, inciso I; art. 19, parágrafo e incisos e art. 31, incisos e parágrafos;

considerando o disposto na Instrução Normativa Conjunta nº. 02, de 27 de setembro de 2006, que estabelece procedimentos para fins de reavaliação agrônômica ou toxicológica ou ambiental dos agrotóxicos, seus componentes e afins;

considerando a RDC nº10, de 22 de fevereiro de 2008, estabelecendo a reavaliação toxicológica de produtos técnicos e formulados à base do ingrediente ativo Acefato;

considerando a RDC 48, de 7 de julho de 2008, estabelecendo os procedimentos administrativos para a reavaliação toxicológica;

considerando o impacto dos agrotóxicos de forma difusa e coletiva e a importância da ampla participação da sociedade através do instrumento de consulta pública;

considerando que o ingrediente ativo Acefato apresenta potencial mutagênico pela presença de eventuais contaminantes, evidências de carcinogenicidade em camundongos e leva a distúrbios cognitivos e neuropsiquiátricos em exposições contínuas;

considerando que o ingrediente ativo Acefato em doses diárias muito baixas deste é capaz de inibir a colinesterase, incluindo a Acetilcolinesterase cerebral;

considerando que o Acefato no cenário internacional, tem sido alvo de restrições devido aos riscos para a saúde humana;

adota a seguinte Resolução e eu, Diretor-Presidente, determino a sua publicação:

Art. 1º Estabelecer a ingestão diária aceitável do acefato em 0,0008 mg/kg de peso corpóreo/dia.

Art. 2º Excluir as culturas amendoim, batata, brócolis, citros, couve, couve-flor, cravo, crisântemo, feijão, fumo, melão, pimentão, repolho, rosa e tomate da monografia do ingrediente ativo Acefato.

Art. 3º Excluir a aplicação costal e manual da monografia do ingrediente ativo Acefato.

Art. 4º Excluir da monografia o uso domissanitário e em jardinagem do ingrediente ativo Acefato.

Art. 5º Manter na monografia as culturas algodão e soja, até a data de 31 de outubro de 2013.

Art. 6º Estabelecer o seguinte cronograma para descontinuação do uso, da produção, da comercialização, da importação, da exportação e da manipulação do ingrediente ativo acefato no Brasil.

Parágrafo único. Redução de no mínimo 25%, tomando por base a quantidade utilizada no ano de 2008, até 31 de outubro de 2010. Redução de no mínimo 50%, tomando por a quantidade utilizada no ano de 2008, até 31 de outubro de 2011. Redução de no mínimo 75%, tomando por a quantidade utilizada no ano de 2008, até 31 de outubro de 2012. Redução de 100%, tomando por a quantidade utilizada no ano de 2008, até 31 de outubro de 2013.

Art. 7º Esta Resolução entra em vigor na data da sua publicação.

DIRCEU RAPOSO DE MELLO



**NOTA TÉCNICA
REAVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DO INGREDIENTE ATIVO ACEFATO**

1.	Apresentação e Motivações para Reavaliação	2
2.	Introdução	4
3.	Caracterização Química	5
4.	Avaliação Toxicológica	5
	4.1 Toxicocinética	5
	4.2 Toxicidade Aguda	7
	4.3 Toxicidade de doses repetidas de curta e média duração e neurotoxicidade	8
	4.4 Toxicidade Reprodutiva	14
	4.5 Toxicidade Genética	19
	4.6 Carcinogenicidade	27
5.	Situação do Acefato no Contexto Regulatório Internacional	34
6.	Recomendações	35
	6.1 Fixação da Ingestão Diária Máxima Aceitável (IDA) para o acefato	35
	6.2 Outras Recomendações	36
7.	Conclusões	38
8.	Referências bibliográficas	39
9.	Glossário de termos, siglas e abreviaturas	43

1. Apresentação e Motivações para Reavaliação

A Nota Técnica visa cumprir uma das etapas da reavaliação toxicológica, prevista na RDC nº 10/2008 e detalhada na RDC nº 48/2008. Esta nota foi elaborada com o apoio técnico de especialistas da equipe de pesquisadores da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ.

A partir da data de sua publicação, a mesma ficará em Consulta Pública por 60 (sessenta) dias, conforme disposto pela RDC nº 48/2008 e decisão da Diretoria colegiada da ANVISA e as contribuições, após consolidação, serão analisadas conjuntamente pela comissão de reavaliação integrada pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) e MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento).

O controle da produção, da comercialização e do emprego de técnicas, métodos e substâncias que comportem risco para a vida, a qualidade de vida e o meio ambiente, é uma incumbência do Poder Público, atribuída pelo artigo 225 da Constituição Federal, regulamentado no caso específico dos agrotóxicos, pela Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989.

De acordo com a Lei nº 7.802/89, os agrotóxicos, como o nome aduz, são substâncias que comportam risco à vida e à saúde, tanto dos trabalhadores expostos a essas substâncias, quanto à dos consumidores de culturas tratadas e população em geral. Estes produtos necessitam de uma detalhada avaliação para obtenção de registro, a qual é procedida pelos Ministérios da Agricultura, da Saúde e do Meio Ambiente, cada um em suas respectivas áreas de atuação.

O legislador reconheceu a possibilidade de efeitos danosos dos agrotóxicos ao estabelecer, no § 6º, do art. 3º, da Lei nº 7.802/89, as proibições de registro¹. Dessa forma os agrotóxicos, para

¹ Redação dada pela Lei 7.802/89 - Art. 3º - § 6º - “Fica proibido o registro de agrotóxicos, seus componentes e afins:

- a) para os quais o Brasil não disponha de métodos para desativação de seus componentes, de modo a impedir que os seus resíduos remanescentes provoquem riscos ao meio ambiente e à saúde pública;
- b) para os quais não haja antídoto ou tratamento eficaz no Brasil;
- c) que revelem características teratogênicas, carcinogênicas ou mutagênicas, de acordo com os resultados atualizados de experiências da comunidade científica;
- d) que provoquem distúrbios hormonais, danos ao aparelho reprodutor, de acordo com procedimentos e experiências atualizadas na comunidade científica;

a obtenção do registro, são avaliados quanto aos aspectos de impactos à saúde humana e ao meio ambiente e de eficácia agrônômica.

A ANVISA é o órgão responsável no âmbito do Ministério da Saúde por avaliar a toxicidade dos agrotóxicos e seus impactos à saúde humana, emitindo um parecer toxicológico favorável ou desfavorável à concessão do registro pelo Ministério da Agricultura. Os estudos exigidos para efetuar a avaliação toxicológica dos agrotóxicos seguem parâmetros e metodologias adotadas internacionalmente, em particular pela ONU/OMS – Organização Mundial de Saúde, OECD – Organization for Economic Co-operation and Development, USA/EPA – Environmental Protection Agency e ONU/FAO – Food and Agriculture Organization. A avaliação toxicológica leva também em conta as condições brasileiras de uso e consumo de culturas tratadas com agrotóxicos e o impacto desses produtos na saúde humana de trabalhadores e consumidores.

Uma vez concedido o registro de determinado agrotóxico este possui validade *ad eternum*, sem previsão de qualquer prazo para renovação ou revalidação do mesmo. Entretanto, como o conhecimento técnico científico, sobre os ingredientes ativos e especialmente sobre o surgimento de perigos e riscos associados ao uso, tende a ser desenvolvido a partir da colocação dos agrotóxicos no mercado, a Lei nº 7.802, de 1989 e o Decreto nº 4.074, de 2002 prevêm a reavaliação toxicológica².

e) que se revelem mais perigosos para o homem do que os testes de laboratório, com animais, tenham podido demonstrar, segundo critérios técnicos e científicos atualizados;

f) cujas características causem danos ao meio ambiente”.

² Redação dada pelo Decreto nº 4.074/02 - Art 2º, inciso VI .

“Art. 2o Cabe aos Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Saúde e do Meio Ambiente, no âmbito de suas respectivas áreas de competências:

VI - promover a reavaliação de registro de agrotóxicos, seus componentes e afins quando surgirem indícios da ocorrência de riscos que desaconselhem o uso de produtos registrados ou quando o País for alertado nesse sentido, por organizações internacionais responsáveis pela saúde, alimentação ou meio ambiente, das quais o Brasil seja membro integrante ou signatário de acordos.”

10) Na Instrução Normativa Conjunta nº 2, de 27 de setembro de 2006 (Art. 1º, incisos de I a III), essa previsão é reforçada, conforme segue:

“Art. 1º As reavaliações dos agrotóxicos, seus componentes e afins serão efetuadas nas seguintes situações:

Cabe ainda aos três Ministérios, no âmbito de suas respectivas áreas de competência, promover a reavaliação de registro de agrotóxicos, seus componentes e afins quando surgirem indícios da ocorrência de riscos que desaconselhem o uso de produtos registrados ou quando o País for alertado nesse sentido, por organizações internacionais responsáveis pela saúde, alimentação ou meio ambiente, das quais o Brasil seja membro integrante ou signatário de acordos (Decreto 4.074, de 2002, Art. 2º, inciso VI).

Em relação aos aspectos toxicológicos, de competência da ANVISA, a reavaliação de agrotóxicos ocorre quando há alguma alteração de perigo ou risco à saúde humana, em comparação aos avaliados durante a concessão de registro. Essas alterações podem ser detectadas através do avanço dos conhecimentos científicos, alertas em função de observações epidemiológicas que apontem a situações não evidenciadas nos estudos experimentais conduzidos em animais de laboratório, entre outras possibilidades.

O órgão federal responsável pelo aspecto a ser reavaliado, neste caso em específico suspeita de efeitos à saúde, diante de alertas ou suspeitas de efeitos adversos, que se configuram dentre os proibitivos de registro, inserindo o ingrediente ativo acefato na reavaliação e cuja análise técnica é o objeto da presente nota.

2. Introdução:

O acefato (*O,S-dimetil acetilfosforamidato*) pertence ao grupo dos agrotóxicos (pesticidas) organofosforados (OPs) e é ingrediente ativo (IA) de vários produtos inseticidas e acaricidas.

Os OPs agem fosforilando a enzima acetilcolinesterase (AChase) e bloqueando - de forma irreversível, ou apenas muito lentamente reversível - a sua atividade catalítica. Diferentemente do que ocorre com outros neurotransmissores (e.g. noradrenalina,

I - quando ocorrer alerta de organização internacional responsável pela saúde, alimentação ou meio ambiente, da qual o Brasil seja membro integrante ou signatário de acordo ou convênio, sobre riscos ou que desaconselhem o uso de agrotóxico, componente ou afim;

II - por iniciativa de um ou mais dos órgãos federais envolvidos no processo de avaliação e registro, quando houver indícios de redução de eficiência agrônômica, alteração dos riscos à saúde humana ou ao meio ambiente, e

III - a pedido do titular do registro ou de outro interessado, desde que fundamentado tecnicamente.“ (grifado)

dopamina, serotonina), a acetil-colina liberada na fenda sináptica não é transportada de volta para o interior do terminal pré-sináptico. Nas sinapses colinérgicas é a colina, um dos produtos da hidrólise enzimática da acetil-colina, que é transportada o interior do terminal pré-sináptico. A hidrólise da acetilcolina mediada pela AChase é, portanto, evento fundamental para interromper a transmissão do impulso nervoso nas sinapses colinérgicas dos Sistemas Nervosos Central (SNC) e Autônomo (SNA), e da junção neuromuscular. Em virtude deste fato, o bloqueio irreversível da acetil-colinesterase pelos OPs desencadeia um quadro neurotóxico agudo, caracterizado por uma ampla gama de sinais e sintomas (síndrome colinérgica) que resultam da exacerbação da função colinérgica aos níveis do SNA (pré- e pós-ganglionar), junção neuromuscular e SNC.

O modo de ação dos OPs é semelhante em invertebrados (insetos) e em vertebrados. Os OPs inibem, de forma similar, tanto a AChase dos organismos alvo (insetos / ácaros) como a de espécies não alvo (incluindo o homem), e por isso exibem, de um modo geral, (com a possível exceção do malation) uma baixa seletividade quanto à ação tóxica. Esta característica tóxico-dinâmica, aliada a certas propriedades tóxico-cinéticas (pronta absorção dérmica), confere aos agrotóxicos OPs elevada periculosidade, em termos de exposições ocupacionais, acidentais e intencionais (tentativas de suicídio). Nos países em desenvolvimento, os OPs se destacam por serem os principais responsáveis pela significativa morbidade e mortalidade associada ao uso de agrotóxicos.

Além do quadro neurotóxico (síndrome colinérgica) que aparece nas intoxicações agudas, a toxicidade resultante da exposição aos OPs se manifesta também de outras formas.

Alguns OPs causam um quadro neurológico (axonopatia sensitivo-motora distal), conhecido como polineuropatia retardada induzida por organofosforados (OPIDP, “*organophosphate-induced delayed polyneuropathy*”), e caracterizado por formigamento de pés e mãos, seguido de perda da sensibilidade, fraqueza muscular progressiva, flacidez dos músculos das extremidades dos membros superiores e inferiores, e perda da coordenação motora. Esse quadro tem início alguns dias, em geral duas a três semanas, após uma exposição pontual ao OP, quando os sintomas clássicos da síndrome colinérgica já diminuíram ou desapareceram. Na OPIDP, a lesão primária é uma degeneração da parte distal de axônios e seus terminais, que afeta principalmente as fibras mielinizadas mais longas e de maior diâmetro. A OPIDP não está relacionada diretamente à inibição da

AChase, mas parece estar associada à inibição de uma outra esterase, a NTE (“*neuropathy target esterase*”), ou esterase neuropática alvo.

Outro quadro neurológico grave, desencadeado por exposições aos OPs, foi identificado mais recentemente, e passou a ser conhecido como “síndrome intermediária”. A Síndrome Intermediária (SI) caracteriza-se pela acentuada fraqueza dos músculos respiratórios, e diminuição da força dos músculos do pescoço e das extremidades proximais dos membros. Esses sintomas aparecem algumas horas após o início dos sintomas de hiperestimulação colinérgica (intoxicação aguda). O comprometimento respiratório na SI, se não houver pronto atendimento em hospitais equipados com aparelhos de respiração assistida, pode levar à morte. Acredita-se que a SI resulte da dessensibilização dos receptores colinérgicos, em virtude da prolongada estimulação.

Alguns aspectos da neurotoxicidade dos OPs ainda são motivo de debate entre os especialistas. Uma dessas questões ainda em aberto, é a suspeita que a exposição crônica a níveis baixos de OPs, que não causam o aparecimento dos típicos sintomas colinérgicos (*i.e.*, intoxicações sub-clínicas), possa resultar em efeitos adversos a longo-prazo, principalmente neuropsicológicos ou neuropsiquiátricos. Nesse sentido, há evidências originárias de estudos neurocomportamentais em animais, mas a comprovação dessa possibilidade através de estudos epidemiológicos em seres humanos é difícil (Costa, 2006). Outra questão preocupante, é o fato de estudos experimentais sugerirem que crianças (organismos ainda em desenvolvimento) possam ser mais vulneráveis aos efeitos de OPs. Há indícios claros de que a exposição contínua de animais em fase de desenvolvimento à baixas doses de OPs pode afetar adversamente o crescimento e a maturação neurocomportamental (Eskenazi et al, 1999, Costa, 2006).

Em virtude da elevada periculosidade e do impacto sanitário, os OPs estão sendo alvo de reavaliações periódicas em todo o mundo, com vistas à atualização do perfil toxicológico e a substituição dos ingredientes ativos – sempre que possível – por outros mais seguros. A presente reavaliação toxicológica do ingrediente ativo acefato se situa neste contexto.

3. Caracterização Química:

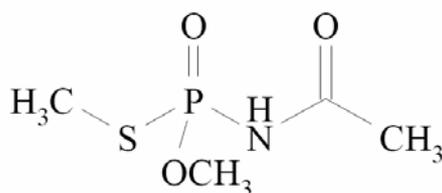
Nome comum: Acefato

Nome químico: *O*, *S*-dimetil acetilfosforamidotoato

Número de registro no CAS (*Chemical Abstracts Service*): 30560-19-1

Fórmula empírica: C₄H₁₀NO₃PS

Estrutura química:



Peso molecular: 183,16 g/mol

Pressão de vapor: 1,7 x 10⁻⁶ mm Hg (24 °C)

O acefato técnico é sólido (incolor / branco), tem ponto de fusão situado entre 81 e 91°C, e é altamente solúvel em água, acetona e etanol. No ambiente, o acefato degrada-se em metamidofós, composto organofosforado que também é usado como IA de produtos inseticidas / acaricidas.

4. Avaliação Toxicológica:

4.1 Toxicocinética:

A cinética do acefato (25 e 100 mg/kg) foi estudada em grupos de ratos *Sprague-Dawley* (grupos de 03 ratos machos e 03 fêmeas por dose) que receberam o produto radiomarcado ([¹⁴C-S-metil]acefato, pureza radioquímica >95%), dissolvido em água deionizada, por entubação gástrica. A radioatividade foi determinada no plasma sanguíneo, coletado entre 30 minutos e 168 horas após a administração oral.

Em ratos dos dois sexos, duas fases de eliminação do acefato do plasma foram identificadas, uma fase rápida durante as duas horas iniciais após a administração, com uma meia-vida (t_{1/2}) estimada em 1,4 horas, e outra posterior (terminal), muito mais lenta, com

uma meia vida estimada em aproximadamente 50 horas. Os demais parâmetros cinéticos determinados nesse estudo são apresentados no quadro que se segue.

Tabela 1. Parâmetros cinéticos do acefato determinados em ratos *Sprague-Dawley* (machos e fêmeas) após administração de uma única dose por via oral.

Dose (mg/kg)	C _{máx} (µg/g)	T _{máx} (h)	AUC _{0-168h} (µg.h. g ⁻¹)	t _{1/2} (h)	t _{1/2} terminal (h)
25	22-25	0,5	150	1,4	50
100	83-98	0,5	560	1,4	50

O metabolismo e a distribuição do acefato foram investigados em outro segmento do estudo, em grupos de ratos (4 machos e 4 fêmeas / dose) tratados uma única vez, por via oral, com as mesmas doses do pesticida radiomarcado (25 e 100 mg/kg). Os ratos foram mortos 0,5, 1, 2, 8 e 24 horas após o tratamento. Neste estudo constatou-se que o acefato se distribuiu amplamente por todos os tecidos dos ratos, e que os níveis mais elevados foram alcançados entre 30 min e 1 hora após o tratamento, tanto no caso dos machos como no das fêmeas. As concentrações mais elevadas do radionuclídeo foram encontradas nos órgãos com mais alta perfusão, tais como fígado, rins e coração, que continham níveis semelhantes aos do plasma. Vinte e quatro horas após a administração, as concentrações de acefato nos tecidos caíram a níveis dez ou mais vezes menores do que os níveis máximos alcançados. A excreção urinária correspondeu a 83-89% da dose, a eliminação pelas fezes a 2%, e a eliminação pelo ar expirado (como CO₂) a 5-9% da dose administrada. O metabolismo do acefato foi mínimo e, nesse estudo, nos ratos dos dois sexos e nas duas doses, quase 90% da radioatividade encontrada na urina, coletada durante 24 horas após o tratamento, correspondeu ao acefato que não foi biotransformado. O metamidofós correspondeu a cerca de 5% da radioatividade recuperada na urina dos ratos, mas, como o material administrado continha aproximadamente a mesma percentagem de metamidofós, não foi possível concluir que ele tenha resultado da biotransformação do acefato. Pequenas quantidades de outros potenciais metabólitos do acefato (e.g. *O,S-dimetil fosforotioato*, *O-desmetil acefato*, e outros) também foram encontradas na urina, mas nesses casos, como no do metamidofós, há a possibilidade deles serem originários de impurezas presentes no material que foi administrado aos animais (Johnson, 2004, *apud* JMPR 2005).

Em outro estudo realizado com ratos, a cinética do acefato rádiomarcado (*S*-metil ¹⁴C-acefato) foi investigada após a administração repetida, por entubação gástrica, durante 7 dias consecutivos (25 mg/kg/dia). Neste estudo, as maiores concentrações de resíduos marcados foram encontradas no fígado e na pele. A eliminação ocorreu principalmente através da urina (82-95% da dose administrada) e, secundariamente, pelo ar exalado (1-4%) e pelas fezes (1%). Na urina, foram identificados o acefato inalterado (73-77%), o *O,S*-dimetil fosforotioato (3-6%) e o *S*-metil acetil fosforoamidotioato (3-4%), não tendo sido detectado o metamidofós. Setenta e duas horas após a última dose, menos do que 1% foi detectado como resíduo em órgãos e tecidos (Lee 1972, *apud* JMPR, 2005).

4.2 Toxicidade aguda:

A toxicidade aguda do acefato foi investigada em roedores (ratos e camundongos), lagomorfos (coelhos), cães e em outras espécies não alvo. Os sinais e sintomas apresentados por roedores, coelhos e cães após a administração de uma única dose de acefato foram, de um modo geral, aqueles típicos da síndrome colinérgica e incluíram hipoatividade, tremores, fraqueza muscular, letargia, ataxia, salivação excessiva, lacrimejamento, cromodacriorréia, diarreia, exoftalmia, incontinência urinária, e diminuição da ingestão de alimentos (ratos). Nos ratos e camundongos que sobreviveram ao tratamento com acefato, via de regra, os sintomas haviam desaparecido por volta dos dias 8 e 9 pós-tratamento, respectivamente. As doses letais 50% (DL₅₀) agudas para exposição oral situaram-se entre 360 (camundongos) e 1400 mg/kg de peso corporal (ratos). Nos cães da raça *Beagle*, a dose oral mínima que produziu vômitos foi 220 mg/kg peso corporal, e a dose oral mínima que causou mortes foi 680 mg/kg de peso corporal (JMPR, 2005).

Não foram evidenciadas irritação dérmica ou irritação ocular significativa com o acefato técnico (JMPR, 2005). O acefato foi não sensibilizante em aplicação dérmica (teste de sensibilização dérmica de Magnusson & Kligman) (JMPR, 2005)

Tabela 2. Estudos da toxicidade aguda do acefato						
Animal	Linhagem	Sexo	Via de administração	Pureza (%)	DL ₅₀ (mg/kg de peso corporal)	CL ₅₀ (mg/L de ar)
rato	<i>Sprague-Dawley</i>	Machos e fêmeas	oral	97	1400 1000	-
rato	<i>Sprague-Dawley</i>	Machos e fêmeas	Inalação (4h, nariz apenas)	97,8	-	> 15
camundongo	NE	Machos e fêmeas	oral	88,9	360	-
cão	<i>Beagle</i>	Machos e fêmeas	oral	89,6	210 ^a 680 ^b	-
coelho	<i>New Zealand</i>	Machos	percutânea	98,3	>10.000	-
coelho	<i>New Zealand</i>	Machos e fêmeas	percutânea	97,8	>2.000	-

NE: não especificada; ^a mínima dose emética; ^b mínima dose letal
Adaptado de JMPR 2002

4.3 Toxicidade de doses repetidas de curta e média duração e neurotoxicidade

4.3.1 Estudo especial da neurotoxicidade aguda em ratos

Ratos *Sprague-Dawley* Crl:CD® BR, dois machos e duas fêmeas por grupo, receberam acefato (99,0% de pureza) diluído em água deionizada, por via oral (entubação gástrica), nas doses de 5, 25, 125 ou 500 mg/kg/dia, enquanto o grupo controle (dose 0) recebeu apenas água deionizada. Em uma segunda parte do estudo, grupos de cinco fêmeas receberam 0; 0,5; 2,5 ou 5 mg de acefato por kg de peso corporal.

Na primeira parte do estudo, todos os animais sobreviveram até o momento do sacrifício, *i.e.*, 2 hs e 30 min após o tratamento. Os principais achados relacionados ao tratamento foram tremores da boca, das patas dianteiras e traseiras e/ou do corpo inteiro, e alteração da locomoção dos animais que receberam as doses de 125 e 500 mg/kg de peso corporal. Esses sinais clínicos começaram a ser observados 1–2 h após a exposição e persistiram até o sacrifício. Apenas um rato macho tratado com 25 mg/kg apresentou tremores. Além desses sinais clínicos, foi registrado salivação excessiva em ratos que

receberam 125 e 500 mg/kg; e contração das orelhas em ratos expostos a 25, 125 e 500 mg/kg. Esses sinais clínicos foram observados em um número limitado de animais 1, 2 e 2 h e 30 min após a exposição. Outros sinais clínicos relacionados ao tratamento, tais como hipotermia e hipoatividade foram vistos na dose de 500mg/kg. Nenhum sinal clínico foi registrado na dose de 5 mg/kg/dia.

A atividade da colinesterase plasmática, eritrocitária e cerebral foi inibida de modo dose relacionado, nos machos e nas fêmeas tratados com as doses de 5, 25, 125 e 500 mg/kg. O valor médio da colinesterase plasmática sofreu redução de 30%, 55–56%, 75–77% e 84% em machos, e 25–26%, 41–44%, 69–70% e 91% em fêmeas, nas quatro doses respectivamente. A atividade colinesterásica eritrocitária dos animais tratados foi menor do que a registrada no grupo controle, sendo a diminuição de 15–25%, 29–32%, 45–50% e 49–55%, em machos, e de 13–14%, 31–41%, 46–52% e 50–58% em fêmeas, nas doses de 5, 25, 125 e 500 mg/kg, respectivamente. A diminuição da atividade colinesterásica foi semelhante nas diferentes regiões do cérebro examinadas. Entre os tratados, a atividade colinesterásica cerebral foi menor do que as dos grupos controles em 18–32%, 50–59%, 66–77% e 75–81%, nos machos, e 25–31%, 55–66%, 71–79% e 79–85% nas fêmeas, nas doses de 5, 25, 125 e 500 mg/kg/kg, respectivamente.

Na segunda parte do estudo, todos os animais sobreviveram até o momento do sacrifício, 2 hs e 30 min após o tratamento, e nenhum sinal clínico foi observado. A atividade da colinesterase plasmática foi reduzida em 14% na dose de 2,5 mg/kg e em 10% na dose de 5 mg/kg. Na dose de 5 mg/kg, a atividade da colinesterase eritrocitária foi 19% menor do que a registrada nos controles. A atividade colinesterásica do cérebro nos tratados foi menor do que nos controles, em 13–22% na dose de 2,5 mg/kg, e em 30–34% na dose de 5 mg/kg. Não foram observadas alterações da atividade colinesterásica plasmática, eritrocitária e cerebral nas fêmeas tratadas com uma única dose de 0,5 mg/kg. O NOAEL (“nível máximo de dose em que não foram observados efeitos adversos”) neste estudo agudo (dose única) foi fixado em 2,5 mg/kg levando em conta a inibição da atividade colinesterásica (Nemec, 1995).

4.3.2 Estudo da neurotoxicidade em ratos: Exposição de curta duração.

Ratos *Sprague-Dawley* (CrI:CD(SD) IGS BR), divididos em grupos de 12 machos e 12 fêmeas, foram alimentados com dieta contendo acefato técnico (99.1%), nas concentrações de 0, 50, 100, 250, 500, 700 ou 1000 ppm (equivalentes a 0, 3,4, 6,7, 17,6, 36,5, 50,8 e 74,2 mg/kg por dia para machos, e 0, 3,8, 7,5, 19,3, 40,9, 57,2 e 89,7 mg/kg por dia para fêmeas), por 49 dias consecutivos. Todos os animais sobreviveram ao tratamento, e nenhum sinal clínico, comportamental, ou achado por ocasião da necropsia, foi registrado nos animais expostos ao acefato. O ganho de peso corporal dos machos durante os 8 primeiros dias de tratamento foi menor nos grupos expostos aos níveis ≥ 250 ppm. Nos machos expostos a 1000 ppm, a redução consistente do peso corporal se prolongou além dos 8 dias iniciais de tratamento. Ao final do período de tratamento, o peso do grupo exposto a 1000 ppm apresentou redução de 11%, em comparação aos controles. O consumo de alimentos dos animais expostos a 1000 ppm também diminuiu. O ganho e o peso corporal das fêmeas não foram alterados. Não foram observadas alterações clínicas, comportamentais, motoras, do peso dos cérebros, e em uma bateria de observações funcionais entre os expostos ao acefato.

O efeito da exposição sobre a atividade das colinesterases plasmática, eritrocitária e cerebral é mostrado na tabela 3. Entre os ratos expostos às menores concentrações (50 e 100 ppm), a atividade da colinesterase cerebral foi proporcionalmente mais inibida do que a eritrocitária e a plasmática. Nos ratos expostos às concentrações maiores, a inibição das colinesterases eritrocitária e cerebral foi similar. Em todos os grupos, foi observada redução (>20%) dose-dependente das atividades de todas as colinesterases, em ambos os sexos, com exceção da atividade eritrocitária em machos expostos a 50 ppm, e da plasmática em fêmeas expostas a 50 e 100 ppm. Em que pese a acentuada redução da atividade colinesterásica cerebral (40-80%), não foram observadas alterações neurocomportamentais. O NOAEL não pode ser fixado, e o LOAEL (“menor nível de dose em que foram notados efeitos adversos”) foi 3,4 mg/kg por dia (50 ppm) com base na inibição da colinesterase cerebral (Foss, 2004 *apud* JMPR, 2005).

Tabela 3: Inibição da atividade colinesterásica (% de redução em relação ao controle, controle = 100%) em ratos expostos ao acefato por 49 dias						
	Concentração de acefato na dieta (ppm)					
Tecido:	50	100	250	500	700	1000
<i>Machos</i>						
Cérebro	-46,8	-50,9	-68,2	-68,2	-75,6	-79,3
Plasma	-21,6	-27,7	-37,4	-44,1	-53,1	-60,7
Eritrócitos	-2,7	-39,2	-63,5	-52,0	-86,1	-60,3
<i>Fêmeas</i>						
Cérebro	-39,6	-51,3	-61,7	-71,1	-69,7	-76,5
Plasma	-13,5	-17,6	-42,2	-52,0	-46,8	-71,9
Eritrócitos	-29,8	-38,3	-67,0	-81,3	-73,0	-81,3
Adaptado de Foss, 2004 <i>apud</i> JMPR, 2005.						

4.3.3 Estudo da toxicidade oral em ratos: Exposição por 13 semanas.

Ratos *Sprague-Dawley* (30 machos e 30 fêmeas por nível de dose) foram expostos ao acefato, adicionado à ração (concentrações nominais do acefato: 0, 2, 5, 10, e 150 ppm), por 13 semanas consecutivas. Quando a exposição teve início, os ratos tinham 45 dias de vida. Levando em conta a ingestão média de alimento, as doses diárias de acefato foram: machos: 0; 0,12; 0,28; 0,58, 8,90 mg/kg/dia; fêmeas: 0; 0,15; 0,36; 0,76; 11,48 mg/kg/dia.

Ao final das 13 semanas de exposição, foi constatada uma inibição da atividade colinesterásica cerebral em todos os grupos expostos ao acefato. Embora no grupo tratado com a dose mais baixa a atividade colinesterásica no tecido cerebral tivesse sido estatisticamente menor do que a atividade da enzima nos respectivos controles, a agência de proteção ambiental americana (US-EPA) considerou este nível de dose como o NOAEL do estudo (*i.e.*, 2 ppm ou 0,12 mg/kg/dia nos machos e 0,15 mg/kg/dia nas fêmeas). A agência americana considerou que, apesar da análise estatística ter detectado uma inibição da colinesterase cerebral na menor dose testada (*i.e.* o NOEL para inibição de colinesterase cerebral seria < 0,12 mg/kg/dia), este nível de dose representaria, de fato, o limiar para o

aparecimento deste efeito e fixou-o como NOAEL do estudo. Pesou nesta avaliação da US-EPA, a constatação de que a curva dose-efeito era muito achatada nesta região, tornando-se praticamente paralela ao eixo dos 'x'. No grupo dos ratos expostos a 150 ppm de acefato (doses: machos, 8,9 mg/kg/dia, e fêmeas, 11,48 mg/kg/dia), houve uma inibição estatisticamente significativa, tanto da colinesterase cerebral, quanto da eritrocitária. As medidas da colinesterase plasmática variaram amplamente, e apenas um subgrupo exibiu uma diminuição estatisticamente significativa da atividade (Fêmeas após 13 semanas de exposição à 150 ppm). O NOEL para a inibição das colinesterases eritrocitária e plasmática foi fixado em 10 ppm (0,58 mg/kg/dia para machos e 0,76 mg/kg/dia para fêmeas). (Nemec, 1997 *apud* IPCS, 2002).

4.3.4 Estudo da toxicidade oral em ratos: Exposição por 13 semanas. (submetido à ANVISA para avaliação toxicológica do IA pela CHEMINOVA). Estudo realizado em condições de observância das Boas Práticas de Laboratório (*Good Laboratory Practices*, GLP).

Ratos Wistar (HsdBrl Han) machos e fêmeas foram expostos, por via oral, ao acefato, incorporado à ração, nas concentrações de 0 (controle), 1, 25 e 150 ppm. Dez ratos machos e dez fêmeas foram alocados em cada grupo (nível de dose) e expostos à ração contendo acefato, ou à ração controle por 13 semanas consecutivas. Com ratos de uma segunda remessa recebida pelo laboratório contratado, foram constituídos grupos análogos de 10 ratos de cada sexo, que foram mortos após 6 semanas de exposição ao acefato (estudo satélite). Nos dois estudos (principal e satélite):

→ Não ocorreram mortes e não foram observados sinais clínicos relacionados ao tratamento com acefato.

→ Não foram registradas alterações de peso corporal, consumo de ração e eficiência alimentar.

→ Não foram evidenciadas alterações oftalmológicas.

→ Não foram encontradas alterações hematológicas e de parâmetros bioquímicos do sangue (exceto pela inibição da colinesterase) atribuíveis ao tratamento.

→ A necrópsia não revelou alterações de peso de órgãos. Não foram achados nos exames macroscópico e histopatológico das vísceras alterações atribuíveis ao tratamento.

→ Diminuição da atividade motora (alteração funcional) foi constatada na semana 12, em machos e fêmeas expostos à 150 e 25 ppm de acefato, respectivamente. As fêmeas expostas a 150 ppm de acefato também exibiram diminuição da atividade motora em diferentes épocas do estudo. Essas alterações foram interpretadas como sendo resultantes da inibição da atividade colinesterásica.

→ Inibições da atividade colinesterásica do plasma, eritrócitos e tecido cerebral foram registradas nos ratos (machos e fêmeas) expostos à 25 e 150 ppm de acefato. Uma discreta inibição foi notada também entre os ratos expostos à 1 ppm de acefato, mas essa inibição não foi associada às alterações funcionais, e foi considerada pelos responsáveis pelo estudo como sendo desprovida de significado biológico.

→ **Com base na inibição da atividade colinesterásica e nas alterações motoras em ratos machos e fêmeas, o NOAEL (nível máximo de dose em que não se observam efeitos adversos) para o acefato foi fixado pelos responsáveis pelo estudo em 1 ppm, ou seja, considerando o consumo diário de ração: 0,08 mg/kg/dia para machos e 0,09 mg/kg/dia para fêmeas (Rees, 2001).**

4.3.5 Estudo da neurotoxicidade em primatas não-humanos: Exposição de curta duração.

Macacos *cynomolgus* (*Macaca fascicularis*) (2 machos e 2 fêmeas) receberam apenas o veículo (0), ou o acefato técnico (pureza: 98.7%) na dose 2,5 mg/kg/dia, por via oral (entubação gástrica), durante 34 dias consecutivos. Não foram observadas diferenças entre tratados e controles, com relação a sinais clínicos, ao peso corporal, ao consumo de alimentos ou água, aos exames físicos, hematológicos e de urina, ao peso de órgãos e às alterações patológicas macroscópicas na autópsia final. As atividades colinesterásicas eritrocitária e plasmática foram avaliadas a cada 2 dias, e a atividade da colinesterase cerebral, apenas no momento do sacrifício. As atividades das colinesterases eritrocitária e plasmática foram reduzidas pelo tratamento. A inibição máxima foi atingida após 6 dias para a enzima plasmática, e 14 dias para a eritrocitária. A inibição entre os dias 6 e 34 de tratamento foi em média de 42% em machos e 43% em fêmeas, no caso da colinesterase plasmática, e de 37 e 40%, nos machos e nas fêmeas, respectivamente, no caso da butirilcolinesterase. A colinesterase eritrocitária apresentou redução de 53% nos machos, e 47% nas fêmeas, entre os dias 14-34 de tratamento, enquanto a atividade colinesterásica

cerebral, após 4 semanas de exposição, diminuiu em todos os animais tratados, 16 e 32% no caso da butirilcolinesterase, e 50 e 43% no caso da acetilcolinesterase, em machos e fêmeas, respectivamente. Apesar da acentuada inibição, não foram observados os sinais e sintomas característicos da síndrome colinérgica (Cummins, 1983 apud JMPR, 2005).

4.3.6 Estudo da neurotoxicidade em humanos: Exposição de curta duração.

Neste estudo, voluntários receberam doses orais diárias de acefato (0,1; 0,2; 0,3 e 0,4 mg/kg/dia; misturas Monitor: Acefato, 1:4, 1:9) durante 37 a 73 dias. Não foram observados efeitos do tratamento sobre a colinesterase eritrocitária, parâmetros hematológicos, bioquímica clínica, pressão arterial, frequência cardíaca, diâmetro pupilar, reflexo fotomotor, acomodação ocular, ausculta torácica, tônus muscular, reflexo patelar, tremor da língua, e tremor dos dedos. As atividades da colinesterase plasmática foram significativamente inibidas nos grupos 1:4 e 1:9. A inibição no grupo 1:4 foi inicialmente observada após 16 dias de administração, na dose de 0,2 mg/kg/dia, em todos os sujeitos estudados. A magnitude da depressão em relação à atividade média pré-teste (basal) foi maior do que dois desvios padrão (DP). A primeira inibição significativa no grupo 1:9 foi registrada apenas em indivíduos do sexo masculino, 21 dias após o início do tratamento com a dose de 0,3 mg/kg/dia. Na dose de 0,4 mg/kg/dia, 2 de 3 mulheres tratadas exibiram uma redução significativa da colinesterase, com 10 dias de tratamento. Todas as atividades colinesterásicas inibidas retornaram aos níveis pré-tratamento durante o período de recuperação de 7 dias (Chevron Chemical Co., 1973 MRID No. 00015160 *apud* US-EPA).

4.4 Toxicidade reprodutiva:

A toxicidade reprodutiva e a toxicidade para o desenvolvimento do acefato foram avaliadas em seis estudos, dentre os quais quatro são relativamente antigos (realizados na década de 1980) e constam de relatórios do IPCS (2002), e dois, mais recentes (Farag et al, 2000_{a, b}), que foram publicados no periódico especializado *Reproductive Toxicology*.

Os estudos da toxicidade reprodutiva incluíram uma avaliação dos efeitos do acefato sobre camundongos machos, expostos durante quatro semanas antes do acasalamento (Farag et al 2000_a), e dois estudos, realizados em ratos, sobre os efeitos da exposição

multigeração (2 ou 3 gerações consecutivas) (IPCS, 2002). A investigação da toxicidade para o desenvolvimento pré-natal (potencial embriotóxico ou teratogênico) foi conduzida em ratos e coelhos (estudos não publicados relatados no IPCS, 2002) e, também, em camundongos (Farag et al 2000_b).

Detalhes desses seis estudos de toxicidade reprodutiva realizados com o acefato são comentados a seguir.

3.4.1 Toxicidade Reprodutiva. Estudo dos efeitos sobre parâmetros reprodutivos de camundongos machos.

A toxicidade reprodutiva do acefato foi estudada em camundongos ICR machos. Camundongos adultos foram tratados por via oral (entubação gástrica) com as seguintes doses diárias de acefato: 0; 7; 14 e 28 mg/kg de peso corporal/dia. O tratamento foi realizado durante 4 semanas consecutivas antes do acasalamento com fêmeas não tratadas.

Sinais de efeitos colinérgicos (salivação, tremores, e diminuição da atividade da colinesterase cerebral e muscular) foram observados na maior dose (28mg/kg). Neste estudo, o tratamento com acefato foi associado à diminuição do número de implantações e de fetos vivos, e aumento do número de reabsorções precoces na maior dose testada (28 mg/kg). Nos ratos tratados com a maior dose, e naqueles que receberam a dose intermediária (28 e 14 mg/kg), houve uma diminuição do peso dos testículos.

O percentual de espermatozoides morfologicamente normais não estava alterado em nenhum dos grupos tratados com acefato, mas a contagem de espermatozoides e espermátides, bem como a mobilidade espermática estavam diminuídas nas doses de 14 e 28 mg/kg, quando comparadas ao controle. O exame histológico do cérebro não revelou qualquer anormalidade. Os achados histológicos em animais tratados incluíram degeneração da fibra muscular e alterações dos testículos. O índice de acasalamento (machos que cruzaram / machos postos para cruzar) diminuiu na maior dose (28 mg/kg), enquanto o índice de fertilidade (número de machos que engravidaram as fêmeas / número de machos que acasalaram) diminuiu nas duas maiores doses (14 e 28 mg/kg).

Este estudo sugeriu que, nas duas maiores doses, o acefato afetou a produção espermática e reduziu a fertilidade de camundongos machos. Não foram observados efeitos na dose de 7 mg/kg/dia, que poderia ser considerado o NOAEL deste estudo. A dose em

que o acefato causou toxicidade testicular neste estudo (14 e 28 mg/kg) correspondeu a 1/64 e 1/32 da DL₅₀ para camundongos. Segundo os autores do estudo, uma exposição dessa magnitude pode ocorrer ocupacionalmente, principalmente se medidas de proteção individual não forem seguidas (Frag et al, 2000_a).

4.4.2 Toxicidade Reprodutiva. Estudo da exposição de ratos machos e fêmeas por duas gerações consecutivas.

Grupos de 12 ratos machos e 24 fêmeas Crl: COBS CD(SD) BR foram expostos ao acefato (pureza não indicada), incorporado na dieta nas concentrações de 0, 50, 150 e 500 ppm durante duas gerações. A exposição começou 100 dias antes do acasalamento da geração F₀ e 120 dias antes do acasalamento da geração F₁. Cada geração correspondeu a somente uma ninhada gerada pelos pais. Entre os animais expostos a 500ppm, foi observada uma redução do ganho de peso corporal nos machos (gerações F₀ e F₁) e nas fêmeas durante a gestação e lactação. Nos ratos expostos a 150 ppm (ambos os sexos e gerações) e entre os expostos a 500 ppm (ambos os sexos da geração F₀ e fêmeas da geração F₁) foi constatado um aumento do consumo de ração. Não ocorreram mortes relacionadas ao tratamento.

Foram registradas reduções do desempenho sexual, do número e tamanho de ninhadas ao nascimento e ao desmame nos grupos expostos a 150 e 500 ppm. Com base nesses efeitos reprodutivos e na geração parental constatados no grupo exposto a 150 ppm, o NOAEL do estudo foi fixado em 50 ppm, o equivalente a 3,3 mg/kg/dia (Palmer et al., 1983 *apud* IPCS, 2002).

4.4.3 Toxicidade Reprodutiva. Estudo da exposição de ratos machos e fêmeas por três gerações.

Grupos de 30 ratos machos e 30 fêmeas (*Charles River*) receberam alimento contendo acefato (98,7% de pureza) nas concentrações de 0, 25, 50 ou 500 ppm, equivalente a 1,7, 3,3 e 33 mg/kg, 75 dias antes dos acasalamentos que deram origem às ninhadas F_{1a} e F_{1b}, e F_{2a} e F_{2b}. Devido à baixa fertilidade de todos os grupos, incluindo o controle, a terceira geração (F_{3a}) foi produzida a partir das ninhadas F_{2b}. Efeitos

relacionados ao tratamento foram observados somente na dose de 500 ppm, e incluíram diminuição do peso corporal e/ou diminuição do ganho de peso dos adultos (machos em cada geração, e fêmeas em algumas gerações) e dos filhotes das gerações F_{2a} e F_{3a}, aumento do consumo de alimentos (machos e fêmeas) durante o período pré-acasalamento e diminuição do consumo de alimentos durante a gestação e a lactação das fêmeas. Os sinais clínicos observados nos animais expostos envolveram um aumento da incidência de alopecia (perda de pêlos) na primeira geração, e da ocorrência de fezes amolecidas ou líquidas na segunda e terceira gerações (machos). Foram observados ainda um comprometimento do desempenho sexual, a diminuição do tamanho médio da ninhada (25–30%), e a redução significativa da sobrevivência dos filhotes entre os animais expostos ao acefato. Baseado nos efeitos registrados no grupo exposto a 500 ppm, o NOAEL do estudo foi fixado em 50 ppm, equivalente a 3,3 mg/kg (Hoberman, 1987 *apud* IPCS, 2002).

4.4.4 Toxicidade para o desenvolvimento. Estudo do potencial embriotóxico em coelhos.

Fêmeas de coelhos foram inseminadas artificialmente e receberam injeção de gonadotrofina coriônica para induzir a ovulação. Os animais (16 por grupo) foram tratados com acefato (92,8% pureza) nas doses de 0, 1, 3 ou 10 mg/kg/dia por via oral (entubação gástrica, volume: 1 ml/kg) do dia 6 ao dia 27 de gestação.

Duas fêmeas que receberam a maior dose (10 mg/kg) abortaram e foram sacrificadas e descartadas (sem terem sido avaliadas) nos dias 25 e 27 de gestação. Um discreto aumento de corrimento nasal atribuído ao tratamento foi observado em fêmeas grávidas tratadas com as doses de 3 e 10 mg/kg. A razão sexual fetal (machos:fêmeas) foi alterada na maior dose (controles: 49,5: 50,5; 10 mg/kg: 63,6: 36,4). Não foram registradas diferenças significativas entre controles e tratados com relação às frequências de reabsorções precoces ou tardias, e de perdas pós-implantação, e quanto ao número médio de corpos lúteos, ou peso médio fetal. Foram detectados anasarca em 3/66 fetos (todos da mesma ninhada), e malformação do crânio (“*dome-shaped head*”) em um feto de outra ninhada, no grupo exposto à dose de 10 mg/kg. Essas anomalias não foram observadas nos grupos controles, no grupo tratado com a dose mais baixa, ou nos 741 fetos das 118 ninhadas do controle histórico do laboratório. Não houve aumento significativo da

freqüência de outras malformações, embora um aumento não dose relacionado da incidência total de malformações (esqueléticas + viscerais) tenha sido encontrado em todos os grupos tratados quando comparados aos controles do experimento. Não houve aumento da ocorrência de malformações, quando as freqüências observadas nos grupos expostos ao acefato foram comparadas com as registradas nos controles históricos. O NOAEL foi fixado em 3 mg/kg, com base na toxicidade materna e em 10 mg/kg com base na toxicidade para o desenvolvimento (Rodwell, 1980 *apud* IPCS, 2002).

4.4.5 Toxicidade para o desenvolvimento. Estudo da embriotoxicidade em ratos

Fêmeas de ratos Cr1: CD® (SD) BR receberam acefato (99,7% de pureza) em água deionizada, nas doses de 0, 5, 20 ou 75 mg/kg/dia, por via oral (entubação gástrica) do dia 6 ao dia 15 de gestação. A cesárea foi realizada no dia 20 de gravidez. Foram observadas diminuições do peso corporal e do ganho de peso materno nas duas maiores doses (20 e 75 g/kg). No grupo tratado com a maior dose (75 mg/kg), as ratas apresentaram sinais de neurotoxicidade, tais como, aumento de tremores e diminuição da atividade motora. Toxicidade para o desenvolvimento foi observada no grupo exposto à maior dose. As alterações fetais incluíram uma diminuição discreta do número médio de centros de ossificação das vértebras caudais, das esternébras, e dos metacarpos e falanges dianteiras e traseiras. O NOAEL foi fixado em 5 mg/kg para toxicidade materna e 20 mg /kg para toxicidade para o desenvolvimento (Lochry, 1989 *apud* IPCS, 2002)

4.4.6 Toxicidade para o desenvolvimento. Estudo da embriotoxicidade em camundongos

Neste estudo, a embriotoxicidade do acefato, administrado por via oral, foi avaliada em camundongos. Fêmeas grávidas de camundongos ICR (CD-1) receberam doses de 0 (água destilada), 7, 14 e 28 mg/kg de acefato, por entubação gástrica, do dia 6 ao dia 15 de gestação. A toxicidade materna foi evidente na dose de 28 mg/kg e manifestou-se por sinais colinérgicos, diminuição do peso corporal nos dias 15 e 18 de gestação, e diminuição dos pesos absoluto e relativo do cérebro (duas maiores doses). Na maior dose, o peso da placenta diminuiu e o peso do fígado materno aumentou. Nenhum efeito adverso materno

foi observado na dose de 7 mg/kg. A exposição materna ao acefato (28 mg/kg) durante a organogênese reduziu o número de implantações e o número de fetos vivos, aumentou o número de reabsorções precoces, diminuiu o peso médio fetal, e aumentou a incidência de malformações esqueléticas e externas (polidactilia). Não foram observadas malformações viscerais. O acefato causou toxicidade materna e foi tóxico para o desenvolvimento na dose de 28 mg/kg. O NOAEL fixado neste estudo foi de 7mg/kg (Farang et al, 2000_b)

4.5 Toxicidade genética:

O potencial genotóxico do acefato foi avaliado por uma série de ensaios *in vitro* e *in vivo* que estão relacionados nos Quadros 1A e 1B, respectivamente.

4.5.1 Ensaios *in vitro*

Como pode ser visto no Quadro 1A, em vários ensaios *in vitro* para mutagenicidade, realizados com as linhagens TA100 e JK947 de *Salmonella typhimurium* e WP2 de *Escherichia coli*, amostras de acefato técnico apresentaram resultados positivos. Essas respostas positivas, obtidas com e sem adição de sistema extrínseco de ativação metabólica (mistura S9), foram, na maioria dos casos, descritas como fracas (Moriya et al.,1983; [Simon 1979, Bullock et al, 1982_{a,b}] *apud* WHO – IPCS, 1984 e Carver et al, 1985 *apud* IPCS,1990 e US-EPA Index, Tox Review 003756). Alguns testes realizados com *S. typhimurium* TA100 e *E. coli* WP2 produziram resultados negativos. Os resultados foram consistentemente negativos para outras linhagens de *S. typhimurium* (TA98, TA1535, TA1537, TA1538, JK3).

Em um dos ensaios de mutação reversa em *Salmonella typhimurium* TA100 foram testadas amostras de acefato com diferentes graus de pureza (variando de 85 a 100%), sendo o resultado negativo para a amostra de maior pureza (100%), e positivo para as de menor pureza (Bullock et al 1982_a *apud* WHO-IPCS 1984 e US-EPA Index. ToxReview 003756). Esses resultados sugerem que a atividade mutagênica não se deve ao acefato, mas sim a contaminantes do acefato técnico.

Além da positividade em ensaios com procariotos, o acefato também foi positivo em testes realizados com células eucarióticas, induzindo mutações em células L5178Y de

linfomas de camundongos, aumentando as freqüências de troca de cromátides irmãs (em células CHO) e de recombinação mitótica/conversão gênica na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, e aumentando a síntese não programada de DNA em fibroblastos humanos ([Jotz and Mitchell, 1980, Evans and Mitchell, 1980, Kirby et al, 1982_{a,b}, Mortelmans et al., 1980, Simmon, 1979] *apud* WHO-IPCS, 1984 e US-EPA *Index Tox Reviews* 003756; Wang et al, 2003).

4.5.2 Ensaio *in vivo*

A maioria dos ensaios *in vivo* para avaliação do potencial genotóxico do acefato apresentou resultados negativos. Entretanto, um efeito clastogênico do acefato foi evidenciado por Behera e Bhunya (1989) em dois testes (freqüência de aberrações cromossômicas e indução de micronúcleos) realizados com camundongos *Swiss Webster* machos. Um estudo empregando o ensaio cometa em leucócitos de camundongo também forneceu resultado positivo (Rahman et al, 2002).

4.5.3 Conclusões:

A análise desse conjunto abrangente de estudos *in vitro* e *in vivo* indica que o acefato puro, ou com elevado grau de pureza, não é genotóxico. A positividade encontrada ocasionalmente em alguns estudos, e uma investigação que comparou amostras de acefato com diferentes graus de pureza, sugerem que os produtos técnicos podem, eventualmente, apresentar contaminação com substâncias mutagênicas.

Quadro 1A: Estudos *in vitro* realizados para avaliação da genotoxicidade do acefato.

Desfecho:	Microorganismo / linhagem de células	Dose / Concentração	Pureza (%)	Resultado	Referência
Mutação reversa	<i>S. typhimurium</i> : cepas TA100, TA98, TA1535, TA1537 e TA1538; <i>E. coli</i> , cepa WP2 Ensaio realizado na presença e na ausência de mistura de ativação metabólica (S9).	0,01 – 10 mg/placa, para cepas TA100 e WP2	93,5	Fracamente positivo, para <i>S. typhimurium</i> TA100 e <i>E. coli</i> WP2: até 10 mg/placa, com e sem S9. Negativo para demais cepas	Simmon (1979), <i>apud</i> IPCS, 1984 e US-EPA Index, Tox Review 003756
Mutação reversa	<i>S. typhimurium</i> : cepas TA100, TA98 e TA1537. Ensaio realizado na presença e na ausência de mistura de ativação metabólica (S9).	Cepa TA100: amostras de 1 a 7 testadas nas doses de 2-50 mg/placa; amostra 8 testada nas doses de 0,01-50 mg/placa; Cepas TA98 e TA1537: 10 e 50 mg/placa	(8 amostras) 1- 85 2- 86 3- 90 4- 93 5- 95 6- 98 7- 99,6 8- 100	TA100: 7 amostras fracamente positivas, nas doses de 2 a 50 mg/placa, sem S9; 1 amostra negativa (pureza de 100%). TA98 e TA1537: negativo (sem S9)	Bullock, Carver & Wong (1982a), <i>apud</i> IPCS, 1984 e US-EPA Index, Tox Review 003756
Mutação reversa	<i>S. typhimurium</i> , cepa TA100	Amostras 1, 2, 3, 4 e 6 testadas nas doses de 2–50 mg/placa; amostra 5 testada nas doses de 0,01–1 mg/placa.	(6 amostras) 1- 92,6 2- 93,0 3- 96,1 4- 98,0 5- 99,0 6- 99,6	Amostras fracamente positivas, nas doses de 2 a 50 mg/placa, sem S9; amostra 5 foi inconclusiva.	Bullock, Carver & Wong (1982b), <i>apud</i> IPCS, 1984 e US-EPA Index, Tox Review 003756
Mutação reversa	<i>S. typhimurium</i> TA1535, TA1537, TA98 e TA100; <i>E. coli</i> WP2 <i>hcr</i> Ensaio realizado na presença e na ausência de mistura de ativação metabólica (S9).	0 – 5000 µg/placa	i.n.d.	Positivo para <i>S. typhimurium</i> TA100 (-S9) e <i>E. coli</i> WP2. Negativo para as demais cepas.	Moriya, et al. (1983)

Continuação do Quadro 1A Estudos <i>in vitro</i> realizados para avaliação da genotoxicidade do acefato.					
Desfecho	Microorganismo / linhagem de células	Dose / Concentração	Pureza (%)	Resultado	Referência
Mutação reversa	<i>S. typhimurium</i> TA100	10 – 94 mg/placa	i.n.d.	Positivo em todas as doses testadas, com e sem S9.	Machado et al., (1984), <i>apud</i> IPCS, 2002
Mutação reversa	<i>S. typhimurium</i> TA100	0 – 93,5 mg/placa, sem S9	i.n.d.	Positivo	Carver et al., (1985), <i>apud</i> IPCS, 1990
	<i>S. typhimurium</i> TA98 e TA 1537	sem S9	i.n.d.	Negativo	
Mutação reversa	<i>S. typhimurium</i> TA100 e TA98	0,1, 0,5, 1, 2,5 e 5 mg/placa, com e sem S9	98,5	Negativo	Vargas & Bonetti (1993), <i>apud</i> IPCS, 2002
Mutação reversa	<i>S. typhimurium</i> TA100, TA1535, JK947 e JK3	0,1, 1, 10 e 100 µg/placa, sem S9	i.n.d.	JK947: positivo (dose-dependente). TA98, TA100 e JK3: negativo.	Hour, et al. (1988)
Recombinação	<i>S. cerevisiae</i> D3 Ensaio realizado na presença e na ausência de mistura de ativação metabólica (S9).	1-5 % (p/v), com S9; 0,1-5 % (p/v), sem S9.	93,5	Aumentou recombinação mitótica, nas concent. de 1-5% (+S9) e 0,5% e 5% (-S9).	Simmon (1979), <i>apud</i> IPCS, 1984 e US-EPA Index, Tox Review 003756
Recombinação/ Conversão gênica/ Mutação reversa	<i>S. cerevisiae</i> D7 Ensaio realizado na presença e na ausência de mistura de ativação metabólica (S9).	1 – 5 %	93,5	Aumentou recombinação mitótica e conversão gênica nas concent. de 3-5%, com e sem S9; induziu mutação reversa na presença de S9.	Mortelans, Riccio & Shepherd (1980), <i>apud</i> IPCS, 1984.

Continuação do Quadro 1A Estudos <i>in vitro</i> realizados para avaliação da genotoxicidade do acefato.					
Desfecho	Microorganismo / linhagem de células	Dose / Concentração	Pureza (%)	Resultado	Referência
Mutação	Linhagem de células de linfoma de camundongos - L5178Y (TK+ / TK-). Ensaio realizado na presença e na ausência de mistura de ativação metabólica (S9).	1000-5000 µg/placa, com S9; 2000-5000 µg/placa, sem S9.	i.n.d.	Aumento dose-relacionado da frequências de mutações no locus TK+/TK-, na faixa de 1000-5000 µg/ml, com e sem S9.	Jotz & Mitchell (1980), <i>apud</i> IPCS, 1984 e US-EPA Index, Tox Review 003756
Mutação	Linhagem de células de linfoma de camundongos - L5178Y (TK+ / TK-). Ensaio realizado na presença e na ausência de mistura de ativação metabólica (S9).	0 a 5000µg/placa	98,7	Aumento dose-relacionado da frequências de mutações no locus TK+/TK-, na faixa de 500-5000 µg/ml, com e sem S9.	Kirby et al., (1982a e b), <i>apud</i> IPCS, 1984
Mutação	Linhagem de células de linfoma de camundongos - L5178Y (TK+ / TK -). Ensaio realizado na presença e na ausência de mistura de ativação metabólica (S9).	0 a 5000 µg/placa	i.n.d.	Positivo	Carver et al., (1985), <i>apud</i> IPCS, 1990
Mutação	Células de ovário de hamster chinês (CHO-W8) Ensaio realizado na ausência de mistura de ativação metabólica (S9).	0 a 5,0 mg/ml	97,0	Negativo	Wang et al (2003)
Toxicidade diferencial	<i>S. typhimurium</i> : cepas SL4700, TA1538 (deficientes em reparar o DNA), SL4525 e TA1988 (capazes de reparar o DNA)	1 e 5 mg, em discos de filtro	93,5	Negativo	Mortelmans & Riccio (1981), <i>apud</i> IPCS, 1984
Toxicidade diferencial	<i>E. coli</i> : cepas W3110 e p3478 <i>B. subtilis</i> : cepas H17 e M45 Ensaio realizado na presença e na ausência de mistura de ativação metabólica (S9).	1 e 5 mg, em discos de filtro	93,5	Inconclusivo	Simmon (1979), <i>apud</i> US-EPA Index, Tox. Review 003756

Continuação do Quadro 1A Estudos <i>in vitro</i> realizados para avaliação da genotoxicidade do acefato.					
Desfecho	Microorganismo / linhagem de células	Dose / Concentração	Pureza (%)	Resultado	Referência
Síntese não programada do DNA (UDS)	Fibroblastos humanos – WI-38 Ensaio realizado na presença e na ausência de mistura de ativação metabólica (S9).	0,1 – 4000 µg/ml	93,5	Fracamente Positivo, sem S9	Simmon (1979), <i>apud</i> US-EPA Index, Tox. Review 003756
Aberrações Cromossômicas	Células de ovário de hamster chinês (CHO-W8) Ensaio realizado na ausência de mistura de ativação metabólica (S9).	0 a 5,0 mg/ml	97,0	Negativo	Wang et al (2003)
Ensaio Citogenético-Troca de cromátides irmãs	Linhagem de células de ovário de hamster chinês (CHO) Ensaio realizado na presença e na ausência de mistura de ativação metabólica (S9).	125-2000 µg/ml, sem S9; 312,5-5000 µg/ml, com S9	i.n.d.	Positivo Aumento dose-relacionado da freqüências de troca de cromátides irmãs, com e sem S9.	Evans & Mitchell (1980), <i>apud</i> IPCS, 1984
Ensaio Citogenético-Troca de cromátides irmãs	Células de ovário de hamster chinês (CHO-W8) Ensaio realizado na ausência de mistura de ativação metabólica (S9).	0 a 5,0 mg/ml	97,0%	Positivo (Aumento dose-relacionado da freqüências de troca de cromátides irmãs)	Wang et al (2003)

Quadro 1B: Estudos *in vivo* realizados para avaliação do potencial genotóxico do acefato

Desfecho	Animais / tecido	Dose	Pureza (%)	Resultado	Referência
Ensaio citogenético – Indução de MN	Camundongos, células da medula óssea	75, 150 e 300 mg/kg, via oral	i.n.d.	Negativo	Kirkhart (1980), <i>apud</i> IPCS, 1984
Ensaio citogenético – Indução de MN	Camundongos machos <i>Swiss Webster</i> , células de medula óssea	2x75, 2x150 e 2x300 mg/kg	i.n.d.	Negativo	Carver et al., (1985), <i>apud</i> IPCS, 1990
Ensaio citogenético – Indução de MN	Camundongos <i>Swiss Webster</i> , células de medula óssea	2x150, 2x200 e 2x250 mg/kg, i.p.	i.n.d.	Positivo na maior dose testada	Behera & Bhunya (1989)
Ensaio citogenético – Indução de MN	Camundongos <i>Swiss Webster</i> , machos e fêmeas	160, 320, e 480 mg/kg	95,3	Negativo	Vargas & Rodrigues (1993), <i>apud</i> IPCS, 2002
Aberrações Cromossômicas	Camundongos, células da medula óssea	11,2 – 112 mg/kg	98,7	Negativo em doses de 11,2-112 mg/kg	Esber (1982), <i>apud</i> IPCS, 1984
Aberrações Cromossômicas	Camundongos <i>Swiss Webster</i> , células da medula óssea	150, 200, 250 e 2x50 mg/kg, i.p.	i.n.d.	Positivo em 3 doses, 3 rotas, e 3 horas após o tratamento	Behera & Bhunya (1989)
Aberrações Cromossômicas e indução de SCEs	Macacos fêmeas, linfócitos	2,5 mg/kg	98,7	Negativo	Cummins (1983), <i>apud</i> IPCS, 1984
Ensaio citogenético – Indução de SCEs	Camundongos, células da medula óssea	29-96 mg/kg	98,7	Não houve aumento das freqüências de troca de cromátides irmãs, nas doses de 29-96 mg/kg	Cimino & Brusick (1983), <i>apud</i> IPCS, 1984

Continuação do Quadro 1B Estudos <i>in vivo</i> realizados para avaliação do potencial genotóxico do acefato					
Desfecho	Animais / tecido	Dose	Pureza (%)	Resultado	Referência
Mutação Dominante Letal	Camundongos	0-500 mg/kg	99,0	Negativo, nas doses de 0-500, na dieta	Eisenlord (1982), <i>apud</i> IPCS, 1984
Mutação Dominante Letal	Camundongos <i>Swiss Webster</i>	5x40 e 5x50 mg/kg, i.p.	i.n.d.	Negativo	Behera & Bhunya (1989)
Mutações em células somáticas	Camundongos machos da linhagem T; fêmeas da linhagem C57BL/6	50, 200, 600 e 800 ppm	98,0	Negativo	Moore, (1986), <i>apud</i> IPCS, 2002
Mutação recessiva letal ligada ao sexo	Machos de <i>D. melanogaster</i>	10 ppm	i.n.d.	Negativo	Valencia (1981), <i>apud</i> IPCS, 2002
Dano e reparo do DNA – UDS	Ratos Fischer 344 machos	150, 300 e 500 mg/kg	i.n.d.	Negativo	Golzio (1999), <i>apud</i> IPCS, 2002
Dano e reparo do DNA – Ensaio Cometa	Camundongos <i>Swiss Webster</i> , leucócitos	Administração oral de doses de 12,25 – 392 mg/kg	97,0	Positivo Aumento significativo e dose relacionado da cauda do cometa, principalmente 24 h após o tratamento	Rahman et al., (2002)

i.n.d. = Informação não disponível.

4.6 Toxicidade crônica / carcinogenicidade:

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (*Environmental Protection Agency* – EPA) classificou o acefato como **Possível Carcinógeno Humano**, ou **classe C**. A agência americana EPA inclui nessa classe as substâncias para as quais há evidências de carcinogenicidade obtidas em estudos experimentais, mas que não foram adequadamente avaliadas em estudos com seres humanos. A classificação C para o acefato foi baseada nos estudos experimentais em que se observou aumento da incidência de carcinomas e adenomas hepatocelulares em camundongos fêmeas. Não existem, até o momento, estudos epidemiológicos que tenham investigado a associação entre exposição ao acefato e a ocorrência de câncer em seres humanos. (US-EPA). Os estudos que investigaram o potencial carcinogênico do acefato em animais serão comentados a seguir.

4.6.1-Estudo de carcinogenicidade a longo-prazo em camundongos. Estudo realizado em condições de observância das Boas Práticas de Laboratório (*Good Laboratory Practices*, GLP):

Neste estudo, camundongos CD-1 (75 machos e 75 fêmeas por grupo) foram alimentados durante 104 semanas com dieta contendo acefato (92,6% de pureza), nos níveis de 0, 50, 250 e 1000 ppm, que corresponderam às doses diárias de 0, 7, 36 e 150 mg/kg/dia para os machos, e a 0, 8, 42 e 170 mg/kg/dia para as fêmeas (Chevron Chemical, 1982a *apud* US-EPA: IRIS 0354). Dez animais de cada sexo foram mortos e necropsiados no meio do estudo (semana 52) para avaliação da toxicidade crônica, enquanto os animais restantes foram acompanhados até o final do experimento.

No final do experimento, a dose mais elevada (1000 ppm ou 170 mg/kg/dia) provocou um aumento significativo do peso relativo do fígado, ovários e cérebro (nas fêmeas), e dos testículos e cérebro (nos machos). Além disso, houve, em relação ao grupo controle, um aumento significativo da frequência de adenomas e carcinomas hepatocelulares, bem como de nódulos hiperplásicos, em fêmeas tratadas com a maior dose. Dos 15 tumores observados no grupo de fêmeas expostos à maior dose, 12 eram carcinomas. Nos machos, as incidências de massas ou nódulos hepáticos foram

comparáveis em todos os grupos. A sobrevivência não foi afetada pela ocorrência de tumores. Baseado no aumento da incidência de carcinomas hepatocelulares na dose mais alta (1000 ppm), o acefato foi carcinogênico para fêmeas de camundongos (US-EPA: IRIS 0354; WHO-IPCS, 1984).

Tabela 4. Incidência de tumores hepáticos em camundongos fêmeas expostas ao acefato durante 104 semanas.

Acefato Níveis na dieta (ppm)	Incidência de tumores (adenomas +carcinomas)
0	1/62
50	3/61
250	0/62
1000	15/61

4.6.2 - Estudo de carcinogenicidade a longo-prazo em ratos. Estudo realizado em condições de observância das Boas Práticas de Laboratório (*Good Laboratory Practices*, GLP):

Ratos *Sprague-Dawley* (75 / sexo / grupo de dose) foram alimentados durante 28 meses com dieta contendo acefato (92,4% de pureza), nas concentrações de 0, 5, 50 e 700 ppm, que corresponderam às doses de 0, 0,25, 2,5 e 35 mg/kg/dia ([Chevron Chemical, 1981] *apud* US-EPA: IRIS 0354).

Foi observada uma inibição dose-relacionada da atividade da colinesterase cerebral dos animais tratados, à partir da concentração de 5 ppm (0,25 mg/kg/dia). As atividades das colinesterases eritrocitária e plasmática foram inibidas apenas na maior dose.

Nos ratos machos houve uma incidência espontânea relativamente alta de tumores das adrenais (feocromocitomas), frequência esta que aumentou nos tratados em relação aos controles (os níveis de 0, 5, 50 e 700 ppm causaram aumento de 2,7%, 9,7%, 16% e 12%, respectivamente). Todos os tumores das adrenais, exceto dois, foram considerados benignos. Apesar do aumento em relação ao controle do estudo, a incidência desses tumores encontrava-se dentro da faixa observada nos controles históricos do laboratório que realizou o ensaio (0,9–15%). Nas fêmeas, a incidência de feocromocitomas foi igual ou

inferior à observada nos controles. Analisando este estudo, a Agência de Proteção Ambiental dos EUA (US-EPA) concluiu que o aumento da incidência de feocromocitomas não poderia ser considerado como indicativo de um efeito carcinogênico da substância em ratos. Esta conclusão foi posteriormente confirmada por outro veterinário patologista que reavaliou histopatologicamente as amostras dos tecidos.

Os valores de NOAEL e LOAEL estabelecidos neste estudo foram de 5 ppm (0,25 mg/kg) e de 50 ppm (2,5 mg/kg), para machos e fêmeas, sendo fixados com base nos dados de inibição das atividades das colinesterases eritrocitária, plasmática e cerebral (US-EPA: IRIS 0354; WHO-IPCS, 1982).

4.6.3- Estudo de carcinogenicidade a longo-prazo em cães.

Neste estudo, grupos de cães da raça *Beagle* (4 animais/sexo/dose) foram alimentados com dieta contendo 10, 30 ou 100 ppm de acefato (87–94% de pureza), durante 2 anos. Não foram observados efeitos sobre a mortalidade, peso corporal, peso de órgãos, consumo de alimento, comportamento, parâmetros hematológicos e bioquímicos, patologia grosseira e histopatologia. No grupo alimentado com 100 ppm de acefato houve inibição da atividade colinesterásica eritrocitária em cães de ambos os sexos, e da atividade da colinesterase cerebral nas fêmeas. O NOAEL estabelecido neste estudo foi 0,75 mg/kg/dia (30 ppm) e o LOAEL 2,5 mg/kg (100 ppm), tendo sido fixado com base nos efeitos inibitórios do acefato sobre as colinesterases. A dose de 2,5 mg/kg/dia (100 ppm) correspondeu também ao NOAEL para toxicidade sistêmica (outros efeitos), em cães de ambos os sexos (<http://www.epa.gov/opp00001/foia/reviews/103301/103301-002.pdf>).

4.6.4 - Estudo de carcinogenicidade a longo-prazo em camundongos.

Camundongos (*Swiss Webster*) – 50 fêmeas e 50 machos por grupo – receberam acefato através da dieta (0, 300 e 600 ppm), durante 18 meses. Neste experimento, foi incluído um controle positivo para carcinogênese química (10 ppm de N-nitrosodimetilamina), administrado aos animais de forma semelhante. Foram realizados exames patológicos macroscópicos e histopatológicos em todos os animais (que morreram durante o tratamento ou mortos ao final do estudo). Esses exames não forneceram

evidências de carcinogenicidade decorrentes do tratamento com o acefato. ([Reyna et al., 1973] *apud* WHO-IPCS, 1976).

4.6.5 Estudo de carcinogenicidade a longo-prazo em ratos (submetido à ANVISA para avaliação toxicológica do IA pela SINON)

Neste estudo, ratos *Sprague-Dawley* foram alimentados durante 104 semanas com dieta contendo acefato (0, 10, 500 e 1500 ppm) e, levando em conta o consumo de ração, as doses de acefato técnico (96,9 e 97,8 % de pureza) foram as seguintes: machos: 0, 0,47, 24,69 e 77,03 mg/kg/dia; fêmeas: 0, 0,57, 29,51 e 93,70 mg/kg/dia. O tratamento com o acefato causou uma série de alterações na cavidade nasal que estão listadas na tabela a seguir. Os achados histopatológicos, notados nos ratos expostos a 500 e 1500 ppm, incluíram danos difusos do epitélio olfatório e cavidade nasal, alterações proliferativas (hiperplasia) e tumores (adenomas, papilomas e carcinomas). Não foram evidenciadas toxicidade sistêmica e oncogenicidade relacionadas ao tratamento em outros órgãos ou tecidos.

Tabela 5. Alterações histopatológicas encontradas na cavidade nasal de ratos *Sprague-Dawley* expostos durante 104 semanas ao acefato (96% puro) através da dieta. Estudo principal.

Grupos/sexo	Machos				Fêmeas			
	0	10	500	1500	0	10	500	1500
Nível na dieta (ppm)	0	0,47	24,69	77,03	0	0,57	29,51	93,70
Dose (mg/kg/dia)	0	0,47	24,69	77,03	0	0,57	29,51	93,70
Nº inicial de animais	50	50	50	50	50	50	50	50
Degeneração/regeneração do epitélio olfatório	0	1	49 ^{a,b}	49 ^{a,b}	2	0	50 ^{a,b}	50 ^{a,b}
Adesão das conchas nasais	0	1	40 ^{a,b}	43 ^{a,b}	0	0	36 ^{a,b}	39 ^{a,b}
<i>Luminal debris</i>	1	4	11 ^a	9 ^a	3	1	8 ^b	18 ^{a,b,c}
Rinite	8	6	8	18 ^{a,b,c}	4	3	6	14 ^{a,b}
Hiperplasia adenoescamosa	0	0	3	3	0	0	2	6 ^a
Hiperplasia cística queratinizante	0	0	0	2	0	0	0	2
Papiloma de células escamosas	0	0	0	1	0	0	0	0
Adenoma	1	0	1	0	0	0	0	1
Carcinoma neuroepitelial	0	0	1	1	0	0	2	0
Carcinoma de células escamosas	0	0	0	0	0	0	0	1
Rabdomiosarcoma	0	0	0	0	0	0	0	1

O teste da probabilidade exata de Fisher foi empregado para detectar diferenças de frequência entre dois grupos. Os efeitos considerados relevantes foram os que diferiram significativamente dos controles, em uma ou mais das doses testadas ($p < 0,05$). ^a: diferente do observado no controle; ^b: diferente da grupo exposto a 10 ppm; ^c: diferente do grupo exposto a 500 ppm.

De acordo com os dados acima apresentados, o acefato produziu, em animais dos dois sexos, aumento dose-relacionado da degeneração/regeneração do epitélio olfatório, e da frequência de um tipo de deformidade, a adesão das conchas nasais. Nas fêmeas tratadas com a maior dose, houve um aumento da incidência de hiperplasia adenoescamosa nasal em relação ao observado no grupo controle. Este efeito não foi encontrado nos machos. Para as lesões da cavidade nasal, o NOAEL estabelecido neste estudo foi a dose de 0,47 (machos) / 0,57 (fêmeas) mg /kg peso corporal /dia, que correspondeu ao nível de 10 ppm de acefato na dieta.

Os resultados deste estudo sugerem que o acefato não é carcinogênico para ratos.

4.6.6-Estudo de carcinogenicidade a longo-prazo em camundongos (submetido à ANVISA para avaliação toxicológica do IA pela SINON)

Neste estudo, camundongos Crl:CD-1(ICR) BR foram alimentados com dieta contendo 0, 50, 160 e 500 ppm (machos: 0, 7,85, 25,05 e 81,38 mg/kg/dia; fêmeas: 0, 9,67, 30,55 e 90,13 mg/kg/dia) de acefato (96,9% e 97,8% de pureza).

Ao final do estudo, os achados macroscópicos grosseiros (necropsia) relacionados ao tratamento incluíram:

- aumento de focos descorados no pulmão de machos tratados com 500 ppm, e de fêmeas tratadas com 160 e 500 ppm;
- aumento da incidência de manchas no fígado dos animais tratados com a maior dose;
- aumento da quantidade de focos descorados e de massas hepáticas, em fêmeas tratadas com 500 ppm.

A avaliação histopatológica registrou a ocorrência de várias alterações no trato respiratório e no fígado de animais tratados com o acefato. A principal lesão observada, “degeneração/regeneração”, ocorreu na cavidade nasal de animais de ambos os sexos, a partir de 50 ppm, acompanhada de inflamação aguda. Além disso, foram registrados um adenoma microscópico e um carcinoma anaplástico em um macho e uma fêmea, tratados com a maior dose. Esses tumores, por serem incomuns em camundongos, foram associados ao tratamento com o acefato, embora as suas frequências não tenham diferido estatisticamente das observadas nos grupos controles. Outras lesões no trato respiratório incluíram aumento de histiócitos pigmentados no pulmão de machos e fêmeas de todos os grupos tratados. Os efeitos neoplásicos e não neoplásicos dose-relacionados, observados na cavidade nasal, foram interpretados como sendo resultado direto da exposição contínua das mucosas nasal e oral à dieta contendo concentrações crescentes de acefato, devido à inalação de suas micropartículas. Esses efeitos não foram atribuídos a um efeito sistêmico seletivo do acefato sobre os tecidos da cavidade nasal.

No fígado, foram observados citomegalia/cariomegalia hepatocelular e aumento do número de histiócitos pigmentados em machos e em fêmeas expostos a 160 e 500 ppm,

bem como um aumento significativo de tumores hepatocelulares nas fêmeas tratadas com a maior dose.

Os efeitos mais relevantes e suas respectivas frequências estão resumidos na tabela a seguir.

Tabela 6. Principais alterações observadas no exame histopatológico dos camundongos tratados durante 80 semanas com acefato (96% puro) incorporado à dieta.

Camundongos:	Machos				Fêmeas			
Nível na dieta (ppm)	0	50	160	500	0	50	160	500
Dose (mg/kg/dia)	0	7,85	25,05	81,38	0	9,67	30,55	90,13
Nº inicial de animais	50	50	50	50	50	50	50	50
Achados								
Cavidade Nasal:								
Degeneração/regeneração do epitélio nasal	3/50	22/50 ^a	49/50 ^{a,b}	50/50 ^{a,b}	2/50	24/50 ^a	45/49 ^{a,b}	49/50 ^{a,b}
Inflamação Aguda nasal	4/50	21/50 ^a	46/50 ^{a,b}	43/50 ^{a,b}	4/50	17/50 ^a	44/49 ^{a,b}	44/50 ^{a,b}
Atrofia respiratória	0/50	1/50	3/50	8/50 ^{a,b}	1/50	0/50	1/49	13/50 ^{a,b,c}
Adenoma	0/50	0/50	0/50	1/50	0/50	0/50	0/49	0/50
Carcinoma anaplástico	0/50	0/50	0/50	0/50	0/50	0/50	0/49	1/50
Fígado:								
Células Necrosadas	3/50	4/50	5/50	14/50 ^{a,b,c}	6/50	0/50	3/49	5/50
Histiócitos pigmentados	2/50	4/50	7/50	37/50 ^{a,b,c}	12/50	8/50	17/49	45/50 ^{a,b,c}
Citomegalia/cariomegalia	1/50	3/50	7/50	27/50 ^{a,b,c}	1/50	0/50	17/49 ^{a,b}	28/50 ^{a,b,c}
Focos de basofilia	5/50	3/50	3/50	2/50	0/50	1/50	1/49	10/50 ^{a,b,c}
Adenoma hepatocelular	2/50	5/50	4/50	5/50	1/50	1/50	1/49	11/50 ^{a,b,c}
Carcinoma hepatocelular	2/50	0/50	4/50	1/50	0/50	0/50	0/49	6/50
Pulmão;								
Histiócitos pigmentados	1/50	13/50 ^a	29/50 ^{a,b}	44/50 ^{a,b,c}	2/50	7/50	37/49 ^{a,b}	45/50 ^{a,b}
Bronquiolite	0/50	0/50	4/50	13/50 ^{a,b,c}	1/50	1/50	2/49	5/50

O teste da probabilidade exata de Fisher foi empregado para avaliar diferenças de frequência entre dois grupos. Os efeitos considerados relevantes foram os que diferiram significativamente dos controles, em uma ou mais doses testadas ($p < 0,05$). ^a: diferente do observado no controle; ^b: diferente do grupo exposto à 50 ppm; ^c: diferente do grupo exposto à 160 ppm.

Os outros efeitos registrados, relacionados ao tratamento com o acefato foram:

- dificuldade respiratória e perda de peso corporal (500 ppm);
- diminuição do consumo de alimento acompanhada de retardo do crescimento (160 e 500 ppm);
- diminuição das atividades das colinesterases eritrocitária, plasmática e cerebral, em todos os grupos tratados.

Os valores de NOAEL estabelecidos neste estudo foram 7,85 mg/kg/dia (machos) e 9,67 mg/kg de peso corporal/dia (fêmeas) (50 ppm), excluindo os efeitos sobre as colinesterases, e <7,85 mg/kg de peso corporal/dia (ambos os sexos) (<50 ppm), incluindo os efeitos inibitórios sobre essas enzimas. O NOAEL para lesões neoplásicas foi 25,05 mg/kg de peso corporal/dia, para machos, e 30,55 mg/kg de peso corporal/dia, para fêmeas (*i.e.* 160 ppm na dieta).

Os resultados deste estudo indicaram que o acefato foi carcinogênico para camundongos CD-1, tendo causado lesões neoplásicas hepáticas e na cavidade nasal.

5. Situação do Acefato no Contexto Regulatório Internacional.

Em virtude da acentuada neurotoxicidade e das suspeitas de carcinogenicidade, o uso do acefato tem sido alvo de restrições em vários países. Em março de 2003, a União Européia determinou a **não inclusão** do acefato no Anexo I da Diretiva 91/414/CEE, que trata das substâncias que podem ser usadas no controle de pragas na agricultura. A Diretiva 2003/219/EC (*“Concerning the non-inclusion of acephate in Annex I to Council Directive 91/414/EEC and the withdrawal of authorisations for plant protection products containing this active substance”*) sugere aos países membros, a adoção das seguintes medidas: 1) não renovar os registros dos produtos que contenham acefato, 2) não conceder novas autorizações de uso, e, 3) proibir o armazenamento, a comercialização e a utilização de substâncias que contenham acefato até março de 2004. Além dessas restrições ao uso do acefato na União Européia, as importações de produtos agrícolas de outros países que utilizam acefato também estão sendo restringidas. O LMR (limite máximo de resíduos) foi estabelecido como o limite de detecção do método analítico, ou seja, resíduos de acefato não podem ser detectados em produtos agrícolas por nenhuma metodologia aplicada. Em fevereiro de 2008 a União Européia publicou um documento mantendo essas determinações (COMMISSION DIRECTIVE 2008/17/EC)

A Agência Ambiental Americana (US-EPA) fixou a dose limite de 0,0012 mg/kg/dia para a ingestão crônica aceitável, com base em um estudo de neurotoxicidade (NOEL de 0,12 mg/kg/dia), cujo desfecho foi a inibição da acetilcolinesterase neste caso, o fator de segurança adotado foi 100.

6. Recomendações

6.1 Fixação da Ingestão Diária Máxima Aceitável (IDA) para o acefato

A análise do conjunto dos estudos toxicológicos disponíveis, reunindo os encontrados na literatura científica e os submetidos à ANVISA pelas empresas registrantes, demonstra claramente que o acefato é ingrediente ativo (IA) de elevada periculosidade, tanto em termos de exposições agudas, como crônicas.

As doses letais 50% (DL₅₀) após administração oral única a roedores situaram-se entre 360 (camundongos) e 1400 mg/kg peso corporal (ratos), mas efeitos não letais, incluindo sinais de neurotoxicidade e manifestações da síndrome colinérgica, apareceram em doses bem inferiores às letais. Nos estudos de exposição repetida, os níveis máximos de dose em que não foram observados efeitos adversos (NOAEL) foram, via de regra, menores do que 5 mg/kg peso corporal/dia e, frequentemente, inferiores a 1 mg/kg peso corporal/dia. Entre os efeitos adversos causados pelo acefato destacam-se, pela severidade e frequência, os efeitos sistêmicos e neurotóxicos secundários à inibição da atividade colinesterásica. Nesse cenário, e seguindo a conduta internacionalmente aceita de escolher, para fins de fixação da IDA, o menor NOAEL entre aqueles estabelecidos por estudos metodologicamente válidos, selecionamos o NOAEL de 0,08 mg acefato/kg peso corporal/dia. Este NOAEL foi fixado em um estudo em que ratos foram expostos por 90 dias ao acefato incorporado à ração, nas concentrações de 0, 1, 25 e 150 ppm (submetido à ANVISA para avaliação toxicológica pela CHEMINOVA). O efeito considerado para fixação do NOAEL neste estudo foi a inibição da atividade da colinesterase no plasma, eritrócitos e cérebro. Dividindo-se o NOAEL fixado no estudo pelo fator de segurança padrão de 100 (*i.e.*, 10 para incertezas de extrapolação entre espécies vezes 10 para diferenças de susceptibilidade entre indivíduos) obtém-se a **IDA recomendada nesta reavaliação que é de 0-0,0008 mg/kg de peso corporal** para o IA acefato.

Esta IDA é próxima, embora um pouco mais restritiva, que a IDA fixada anteriormente pela agência norte-americana US-EPA para o acefato (0-0,0012 mg/kg peso corporal), a partir de um outro estudo em ratos que alcançou resultados semelhantes. No estudo selecionado pela agência americana (US-EPA), os ratos foram expostos durante 90 dias ao acefato incorporado à dieta, tendo sido fixado o NOAEL de 0,12 mg/kg de peso

corporal / dia e o LOAEL (menor dose que apresentou efeito adverso) de 0,15 mg/kg de peso corporal/dia. No caso do estudo escolhido pela agência US-EPA (MRID 40504819), o desfecho considerado para estabelecer a IDA foi a inibição da atividade colinesterásica cerebral e, como de praxe, também foi usado o fator de segurança de 100.

O efeito (inibição da colinesterase) considerado pela Agência Americana US-EPA e pela ANVISA, no âmbito desta reavaliação, é o evento primário que leva ao aparecimento da toxicidade sistêmica (síndrome colinérgica) e da neurotoxicidade, embora algumas manifestações específicas desta última (e.g. neurotoxicidade tardia) sejam mediadas pela inibição de outras esterases (NTE, esterase neuropática alvo). A inibição da colinesterase mostrou ser, nos estudos analisados nessa reavaliação e em outros trabalhos científicos, um indicador sensível do efeito tóxico do acefato e outros OPs, que é detectável em doses em que outros sinais e sintomas clínicos ainda não são evidentes. O fato da inibição da colinesterase ser detectada, numa escala crescente de doses, antes de outros sinais clínicos mais dramáticos de intoxicação, não a torna um efeito “não-adverso”. É bem conhecido que, em virtude de mecanismos compensatórios e do desenvolvimento de tolerância ao nível dos receptores (dessensibilização dos receptores) da acetil-colina, o aparecimento da sintomatologia da síndrome colinérgica depende da velocidade de progressão da inibição das colinesterases. A neurotransmissão colinérgica desempenha importante papel em várias funções do Sistema Nervoso Central, nas esferas motora e cognitiva (e.g. memória), e há fortes suspeitas de que a intoxicação subclínica (inibição de colinesterase) duradoura possa estar associada às alterações cognitivas e neuropsiquiátricas. Embora esta questão ainda permaneça em aberto, ela é plausível, e não se pode hoje afirmar que a inibição subclínica da colinesterase pelo acefato e outros OPs seja segura a longo prazo. Faltam estudos experimentais e epidemiológicos que comprovem que esta inibição subclínica da atividade colinesterásica pelo acefato e outros OPs não traz conseqüências adversas a longo-prazo nas esferas da cognição e da emocionalidade.

6.2 Outras recomendações

Em conjunto, as evidências oriundas tanto de ensaios *in vitro*, quanto dos testes *in vivo*, sugerem que o acefato técnico com elevado grau de pureza (próximo a 100%) não é genotóxico. Entretanto, como anteriormente comentado, vários estudos de mutagenicidade

relataram resultados positivos para o acefato técnico com variados graus de pureza. Esta positividade ocasional aparentemente se deveu, em parte, às deficiências metodológicas ou de interpretação dos resultados e, em parte, às impurezas presentes na amostra de acefato técnico utilizada no teste. Esta última possibilidade foi claramente demonstrada no estudo de Bullock, Carver & Wong (1982_a *apud* WHO-IPCS, 1984) que consta do quadro 1A. Empregando o ensaio com *S.typhimurium*, Bullock et al (*US-EPA Index Cleared Sciences Reviews Acephate - Tox Review 003756*) investigaram a mutagenicidade de 8 amostras de acefato técnico, com variados graus de pureza, e verificaram que, exceto pela amostra de maior pureza (aproximadamente 100%), todas as demais foram positivas no teste realizado com a linhagem TA100. Este resultado, e a positividade ocasional em vários outros estudos com acefato técnico, sugerem que impurezas mutagênicas podem aparecer com frequência em amostras de acefato técnico. Os possíveis mutágenos que eventualmente contaminam o acefato técnico não foram identificados nesses estudos. A presença desses contaminantes pode depender da origem, da rota de síntese e do controle de qualidade do IA técnico. Recomenda-se, portanto, controle rigoroso da pureza, identificação de contaminantes e ensaios de mutagenicidade (teste de mutação reversa em *S.typhimurium*) do acefato técnico usado em diferentes produtos.

Ainda, a exclusão da monografia da aplicação costal e/ou manual e exclusão das culturas amendoim, batata, brócolis, couve, couve-flor, cravo, crisântemo, fumo, melão, pimentão, repolho, rosa e do uso em jardins, com vistas ao controle de pragas de plantas ornamentais em vasos e jardins residenciais não comerciais.

7. Conclusões

As principais conclusões alcançadas nesta reavaliação toxicológica do acefato são destacadas a seguir.

→ O potencial mutagênico do acefato foi investigado por uma ampla série de ensaios *in vitro* e *in vivo* realizados por laboratórios contratados pelas empresas registrantes, ou por pesquisadores independentes. Embora os resultados desses ensaios de genotoxicidade tenham sido predominantemente negativos, há também alguns resultados claramente positivos. A análise do conjunto dos resultados disponíveis sugere que o acefato com elevado grau de pureza ($\approx 100\%$) não é genotóxico, e que a positividade ocasionalmente encontrada pode dever-se a presença de eventuais contaminantes mutagênicos.

→ O potencial carcinogênico do acefato (estudo a longo-prazo) foi avaliado em vários estudos em roedores (ratos e camundongos) e em um estudo em cães. Os resultados de pelo menos dois estudos em camundongos CD-1 encontraram evidências de carcinogenicidade, o que fundamenta a classificação do acefato pela agência ambiental americana (US-EPA) como “**Possível Carcinógeno Humano (classe C)**”.

→ Estudos de exposição ao acefato através da dieta, realizados com roedores, mostraram que, a longo-prazo, doses diárias muito baixas deste IA são capazes de inibir a colinesterase, incluindo a Acetilcolinesterase cerebral. Baseado no NOAEL para esses efeitos adversos, e na aplicação de fatores de segurança, as IDAs fixadas pela EPA e a que será fixada pela ANVISA são, 0,0012 mg/kg e 0,0008 mg/kg, respectivamente. Em pelo menos um desses estudos, alterações clínicas (diminuição da atividade motora) foram observadas nestes níveis baixos de exposição. É importante destacar que há uma preocupação em relação à exposição crônica à doses baixas (exposições sub-clínicas) de agrotóxicos OPs e aos possíveis efeitos sobre a saúde humana. Suspeita-se que essas exposições contínuas a OPs possam levar a distúrbios cognitivos e neuropsiquiátricos. Há também indícios, originários de estudos em animais, indicativos de que crianças são mais vulneráveis que adultos aos efeitos adversos de OPs, e de que a exposição durante o desenvolvimento neurocomportamental pode levar a alterações permanentes. A IDA sugerida nesta Nota Técnica para o acefato leva em conta os resultados de estudos experimentais adequadamente conduzidos, e as incertezas e suspeitas apontadas acima, e

visa proteger indivíduos expostos cronicamente e sub-populações humanas mais vulneráveis.

→ Em função disso, é necessária a exclusão da monografia da aplicação costal e/ou manual e exclusão das culturas amendoim, batata, brócolis, couve, couve-flor, cravo, crisântemo, fumo, melão, pimentão, repolho, rosa; bem como excluir o uso domissanitário em jardins, com vistas ao controle de pragas de plantas ornamentais em vasos e jardins residenciais não comerciais.

8. Referências bibliográficas

BEHERA, B.C. and BHUNYA, S.P. (1989). Studies on the genotoxicity of asataf (acephate), an organophosphate insecticide, in a mammalian *in vivo* system. *Mutation Research*, **223**(3): 287-293.

COSTA, L.G. (2006). Current issues in organophosphate toxicology. *Clinica Chemica Acta* **366**: 1-13.

CUMMINS, H.A. (1983) Orthene technical: cholinesterase inhibition and cytogenetics in the monkey. Relatório não publicado No. 82/CHE 001/313 por Life Science Research, England. Submetido à WHO por Chevron Co, USA.

ESKENAZI B., BRADMAN A., CASTORINA C. (1999). Exposures of children to organophosphate pesticides and their potential adverse health effects. *Environmental Health Perspectives*, **107** (supl3): 409-419.

FARAG, A.T., EWEIDAH, M. H., EL-OKAZYC, A.M. (2000_a). Reproductive toxicology of acephate in male mice. *Reproductive Toxicology* **14**, 457–462.

FARAG, A.T., EWEIDAH, M. H., TAYEL, S. M, EL-SEBAE, A. H. (2000_b). Developmental toxicity of acephate by gavage in mice. *Reproductive Toxicology* **14**, 241–245

FOSS, J.A. (2004). Oral (diet) 49-day neurotoxicity study of acephate technical in rats (Study No. 6801-001). Relatório não publicado por CR-DDS Argus Division. Submetido à WHO por Arvesta Corporation, San Francisco, CA, USA.

HOBERTMAN, A.M. (1987) Two-generation (two litters) reproduction study in rats with Chevron acephate technical. Relatório não publicado No. 303005 por Argus Research Laboratories, Inc., Horsham, Pennsylvania, USA. Submetido à WHO por Tomen Agro, Inc., San Francisco, California, USA.

Hour, T.C., Chen, L., Lin, J.K. (1998). Comparative investigation on the mutagenicities of organophosphate, phthalimide, pyrethroid and carbamate insecticides by the Ames and lactam tests. *Mutagenesis*, **13** (2), 157-166.

JOHNSON, T.L. (2004) An oral (gavage) metabolism and toxicokinetic study with [¹⁴C]-acephate in rats. Relatório não publicado No. WIL-476002 por WIL Research Laboratories, Inc., Ashland, Ohio, USA. Submetido à WHO por Arvesta Corporation, San Francisco, CA, USA.

JOINT MEETING ON PESTICIDES RESIDUES (2005). Toxicological monographs and monograph addenda: Acephate, 3-16.

LEE, H. (1972) Metabolism of Orthene in rats. Relatório não publicado No. 721-14 da Chevron Chemical Co., Richmond, California, USA. Submetido à WHO por Tomen Agro, Inc., San Francisco, California, USA.

LOCHRY, E.A. (1989). Oral teratogenicity and developmental toxicity study in rats with Chevron acephate technical. Relatório não publicado No. 303-008 do Argus Research Laboratories, Inc., Horsham, Pennsylvania, USA. Submetido à WHO por Tomen Agro, Inc., San Francisco, California, USA.

MORIYA, M.; OHTA, T.; WATANABE, K.; MIYAZAWA, T.; KATO, K.; SHIRASUY, Y. (1983). Further mutagenicity studies on pesticides in bacterial reversion assay systems. *Mutation Research*, **116** (3-4): 185-216.

NEMEC, M.D. (1995) A range-finding acute study of Orthene technical in rats. Project No. WIL-194015: 9700023. Relatório não publicado do WIL Research Labs., Inc., Ashland, Ohio, USA, Submetido à WHO por Tomen Agro, Inc., San Francisco, California, USA.

NEMEC, M.D. (1997) A subchronic (13-week) neurotoxicity study of Orthene technical in rats. Relatório não publicado No. WIL-194014 do WIL Research Laboratories, Inc., Ashland, Ohio, USA. Submetido à WHO por Tomen Agro, Inc., San Francisco, California, USA; Valent USA Corp., Walnut Creek, California, USA.

PALMER, A.K., OFFER, J.M., BARTON, S.J., GREGSON, R.L., GIBSON, W.A. & ALMOND, R.H.. (1983). Effect of technical RE-12420 on reproductive function of multiple generations in the rat. Relatório não publicado No. CHR 11/81957 do Huntingdon Research Centre, Huntingdon, Cambridgeshire, England. Submetido à WHO por Tomen Agro, Inc., San Francisco, California, USA.

RAHMAN, M.F., MAHBOOD, M., DANADEVI, K., SALEHA BANU, B., GROVER, P. (2002). Assesment of genotoxic effects of chloropyriphos and acephate by the comet assay in mice leucocytes. *Mutation Reaserch*, **516**: 139-147.

Rees, P.B. (Study Director) (2001) Acephate Toxicity Study by Oral (dietary) Administration to Wistar Rats for 13 Weeks. Study report from Huntingdon Life Sciences Ltd, England. Sponsor: Cheminova A/S Denmark. (CHV077/013142.). Submetido à ANVISA pela CHEMINOVA.

RODWELL, D.E. (1980). Teratology study in rabbits. Relatório não publicado No. 415-024 do International Research & Development Corp., Mattawan, Michigan, USA. Submetido à WHO por Tomen Agro, Inc., San Francisco, California, USA.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Integrated Risk Information System, 0354: Acepahte (CASRN 30560-19-1). <<http://www.epa.gov/IRIS/subst/0354.htm>>. Acesso em: 10/08/2009.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Index to Cleared Science Reviews Acephate (Pc Code 103301). *Tox Review* 003122. Disponível em: <<http://www.epa.gov/opp00001/foia/reviews/103301/103301-002.pdf>>. Acesso em: 10/08/2009.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Index to Cleared Science Reviews Acephate (Pc Code 103301). *Tox Review* 003756. Disponível em: <<http://www.epa.gov/opp00001/foia/reviews/103301/103301-020.pdf>>. Acesso em: 10/08/2009

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Chevron Chemical Company, 1973. MRID No. 00015160. Escrito para FOI, EPA, Washington D.C. 20460. Disponível em: <http://www.epa.gov/iris/subst/0354.htm>>. Acesso em: 10/08/2009.

Wang, T.C.; Lin, C.-M.; Lo, L.W. (2003). Genotoxicity of methoxyphosphinyl insecticide in mammalian cells. *Zoological Studies* **42** (3): 462-469.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – IPCS. Acephate. Pesticides residues in food – 1976. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v076pr02.htm>>. Acesso em: 10/08/2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – IPCS. Acephate. Pesticides residues in food – 1982. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v82pr02.htm>>. Acesso em: 10/08/2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – IPCS. Acephate. Pesticides residues in food – 1984. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v84pr43.htm>>. Acesso em: 10/08/2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – IPCS. Acephate. Pesticides Residues in food, 1990. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v90pr02.htm>>. Acesso em: 10/08/2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - IPCS. Pesticides Residues in food – 2002 – Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues: Acephate. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2002pr02.htm>>. Acesso em: 10/08/2009.

9. Glossário de termos, siglas e abreviaturas.

AChase: Enzima acetil-colinesterase

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AUC: Área sob a curva (“*area under the curve*”)

BPL (GPL): Boas práticas de laboratório (“*good laboratory practices*”)

CL₅₀: Concentração letal 50%

C_{max}: Concentração máxima

DL₅₀: dose letal 50%

DP: Desvio padrão da média

GLP (BPL): “*Good laboratory practices*” (Boas práticas de laboratório)

IA: Ingrediente ativo de agrotóxicos (pesticidas)

IDA (ADI): Ingestão diária (máxima) aceitável (“*acceptable daily intake*”)

i.n.d.: Informação não disponível

LOAEL: menor nível em que se observou efeito adverso (“*lowest observed adverse effect level*”)

LMR: Limite máximo de resíduos

NOAEL: maior nível em que não se observou efeito adverso (“*no observed adverse effect level*”)

NOEL: maior nível em que não se observou efeito (“*lowest observed effect level*”)

NTE: esterase neuropática alvo (“*neuropathic target esterase*”)

OP: Pesticida organofosforado

OPIDP: Polineuropatia tardia induzida por organofosforados (“*organophosphate-induced delayed polyneuropathy*”).

ppm: parte por milhão (concentração)

SI: Síndrome intermediária

SNA: Sistema Nervoso Autônomo

SNC: Sistema Nervoso Central

T_{max}: tempo (latência) para alcançar concentração máxima

t_{1/2}: meia-vida de eliminação (tempo para concentração cair à metade durante a eliminação)

US-EPA: Agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (“*US Environmental Protection Agency*”)