

## AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE



Profa. Lucia Regina R. Martins

Toda substância pode ser um agente tóxico...

✓ depende das **condições de exposição**:

- dose/concentração administrada/absorvida
- duração: tempo e frequência
- via de administração (respiratória, oral, dérmica, parenteral)



➤ porém muitas substâncias podem ser usadas de forma segura...

✓ se as condições de exposição forem mantidas abaixo dos níveis de tolerância

➤ quando não é possível definir limite de tolerância: a exposição deve ser evitada

**Toxicidade**: capacidade de uma substância causar dano ou morte

- ✓ Avaliação da toxicidade envolve:
  - intensidade do efeito adverso;
  - concentração/dose;
  - duração da exposição.
- ✓ Alta toxicidade → efeito tóxico em baixa dose/conc.
- ✓ Baixa toxicidade → necessário altas concentrações/doses para o efeito
  - ✓ baixa toxicidade aguda: ainda pode ser carcinogênico ou teratogênico

## Classificação da intoxicação:

### ☐ Duração da Exposição

- **Aguda:** curta duração; dose única/múltipla (24h); manifestação rápida
- **Subaguda:** médio prazo (dias/semanas); exposições repetidas/frequentes
- **Crônica:** longo prazo; exposições repetidas\*.

### ☐ Intensidade dos efeitos:

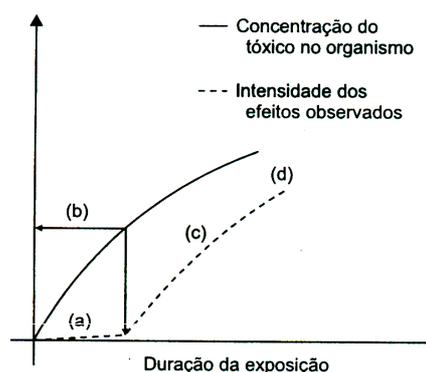
- letal (grave)
- moderada
- leve

- ✓ Efeitos podem ser: agudos (com regeneração) e crônicos (exposição aguda ou crônica)
- ✓ Diagnóstico: fases subclínica (biomarcadores) e clínica

## Mecanismos manifestação da toxicidade crônica:

### 1. Acúmulo do agente tóxico no organismo:

- quantidade eliminada < absorvida
- concentração no organismo aumenta progressivamente
- ex.: Pb, DDT.



### 2. Efeitos aditivos de exposições repetidas

- sem acúmulo da substância no organismo
- manifestação da toxicidade ocorre pela soma dos efeitos das exposições sucessivas



## ❖ Fatores que interferem na Toxicidade:

- ✓ propriedades físico-químicas da substância
- ✓ condições de exposição
- ✓ susceptibilidade do organismo: idade, estado de saúde, genética (variações entre espécies e entre populações)



### ❖ Como estabelecer o nível de exposição tolerável a uma substâncias?

- depende do que é considerado como efeito tóxico/adverso:
  - morte,
  - variação de peso corporal/órgãos, crescimento,
  - alterações anatômicas/patológicas,
  - alterações bioquímicas: níveis enzimáticos, hemoglobina, etc...
- ✓ manifestação do efeito tóxico → exposição se sobrepõe à capacidade de adaptação do organismo (manutenção da homeostasia)
- ✓ capacidade funcional: modificações bioquímicas, morfo e fisiológicas sem manifestação de efeitos tóxicos
- ✓ difícil diferenciar o limiar entre adaptação e efeito tóxico

## Tipos de Efeito Tóxico:

1. **Local** ou **sistêmico** (órgãos-alvo após absorção, distribuição, bioativação)
2. **Imediato** (logo após exposição) ou **retardado** (ex.: carcinogênico)
3. **Reversível** (desaparece após cessar exposição) ou **irreversível**
4. **Morfológico** (ex.: necrose), **Funcional** (alteração reversível) e **Bioquímico** (sem alteração morfológica aparente)
5. **Somático** (funções vegetativas) ou **germinal** (reprodução, descendentes, tumores)
6. **Alérgico** (hipersensibilidade mediante sensibilização anterior) ou **idiossincrásico** (reatividade anormal e geneticamente determinada)

## Dose-resposta e Concentração-resposta



✓ relação entre a exposição e o espectro de efeitos tóxicos observados.

**Dose**: quantidade de substância administrada ao organismo em relação ao seu peso corporal (ex.: 10 mg/Kg)

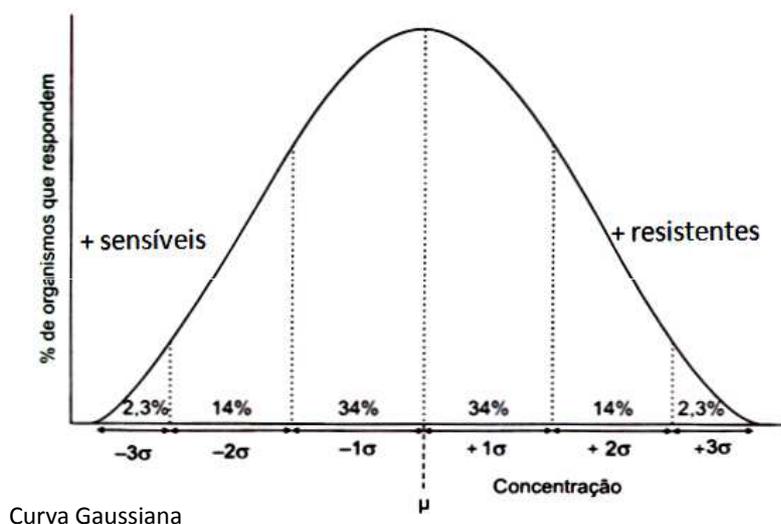
- via de administração: dose administrada pode ser  $\neq$  dose efetiva (absorvida)

**Concentração**: quantidade a qual os organismos vivos estão *expostos*.

### ➤ Critérios para estabelecer curva dose/resposta:

- resposta analisada é devida à administração da substância
- resposta está relacionada com a dose
- avaliação da resposta deve ser **quantificável** (seleção de end point representativo de toxicidade)
- grande número de animais-teste (representatividade estatística)

### ➤ Resultados gráficos: distribuição da frequência de resposta X dose/concentração:



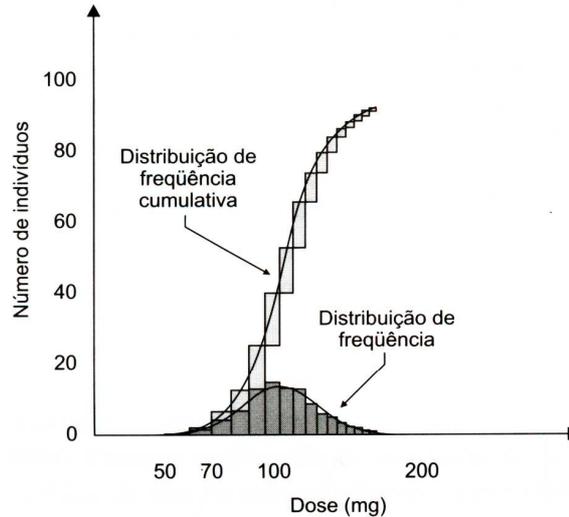
- ✓ maior % de indivíduos respondem em conc. média +/- 1DP
- ✓ em testes agudos: determina DL50 ou CL50 (mais significativo)



## ❖ Resultados Gráficos: Curva Dose/Concentração X resposta



distribuição de frequência cumulativa



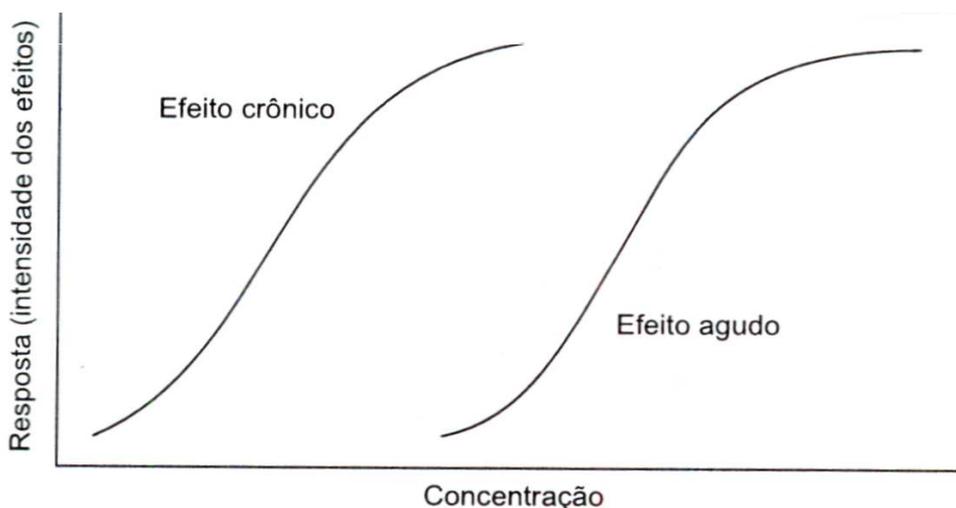
- aplicada para determinar dose letal 50% (DL50) ou concentração letal 50% (CL50)
  - se o efeito observado não for morte: **DE50** ou **CE50**
  - Determinação de **valores limite**:
    - menor dose/concentração que produz resposta detectável (**LOEL**)\*
    - maior dose/concentração em que não se observa efeito (**NOEL**)\*
- \*LOEL: *Low Observed Effect Level* } aplicados para determinar padrões  
NOEL: *No Observed Effect Level* } de regulamentação

## ❖ Resultados Gráficos: Curva Dose/Concentração X resposta

distribuição de frequência cumulativa

### ➤ Efeito Agudo X Efeito Crônico:

- ✓ em geral respostas mais severas são observadas em concentrações/doses mais altas;
- ✓ parâmetros obtidos em testes agudos são usados em ensaios de exposição de médio e longo prazos.



➤ Classificação de Toxicidade a partir de DL50 ou CL50:

- faz referência à duração e via de exposição, excipiente, espécie animal testada\*

**Comunidade Européia:**

<b>Categoria</b>	<b>DL<sub>50</sub> <u>oral para ratos</u> (mg/kg peso corpóreo)</b>
Muito tóxico	menor que 25
Tóxico	de 25 a 200
Nocivo	de 200 a 2.000

➤ Limitações dos valores DL50/CL50:

- não informa o tipo (forma) da curva obtida
- valores de **dose/concentração limite** em geral são diferentes mesmo para substâncias com mesmo DL50/CL50: mecanismos diferentes (não adequado para comparação de toxicidade)

**Tabela 5.3** DL<sub>50</sub> aproximada de alguns agentes tóxicos.

<b>Agente</b>	<b>Animal</b>	<b>Via</b>	<b>DL<sub>50</sub> (mg/kg)</b>
Álcool etílico	camundongo	oral	10.000
Cloreto de sódio	camundongo	IP	4.000
Sulfato ferroso	rato	oral	1.500
Sulfato de morfina	rato	oral	900
Fenobarbital sódico	rato	oral	150
<i>p, p'</i> -DDT	rato	oral	100
Picrotoxina	rato	SC	5
Sulfato de estricnina	rato	IP	2
Nicotina	rato	IV	1
d-Tubocurarina	rato	IV	0,5
3-Hemicolínio	rato	IV	0,2
Tetrodotoxina	rato	IV	0,1
Dioxina (TCDBD)*	cobaia	IV	0,001
Toxina botulínica	rato	IV	0,00001

IP = intraperitoneal; IV = intravenosa; SC = subcutânea.

\* 2,3,6,7-tetracloridibenzodioxina.

Fonte: Loomis, 1996.

## Classificação de substâncias químicas conforme toxicidade

Administração por via oral		
Categoria	DL <sub>50</sub> – ratos (dose oral única)	Exemplos
Extremamente tóxica	≤ 1mg/kg	Fluoracetato de sódio, tetraetilpirofosfato (TEPP)
Altamente tóxica	1-50 mg/kg	Fluoreto de sódio, cianeto de potássio, paration
Moderadamente tóxica	50-500 mg/kg	DDT
Ligeiramente tóxica	0,5-5 g/kg	Acetanilida
Praticamente não tóxica	5-15 g/kg	Acetona, PABA
Relativamente atóxica	≥ 15 g/kg	Glicerol
Exposição por inalação		
Categoria	CL <sub>50</sub> (4 h) – ratos	Exemplos
Extremamente tóxica	≤ 50 ppm	Acroleína, ozônio, fosfina, pentaborano, arsenamina, etilenoimina
Altamente tóxica	50-100 ppm	Fosgênio, dióxido de nitrogênio
Moderadamente tóxica	10-1.000 ppm	Formaldeído, ácido cianídrico, anidrido sulfuroso, brometo de metila
Ligeiramente tóxica	1.000-10.000 ppm	Amônia, dicloreto de etileno
Praticamente não tóxica	10.000-100.000 ppm	Acetona, tolueno
Relativamente atóxica	≥ 100.000 ppm	Freon

Fonte: Hodge & Sterner, 1944a.

Tabela 10-IV - DL 50 aproximada em ratos para alguns compostos químicos

Agente Químico	DL50 (mg/Kg de peso corporal)
Açúcar	29.700
Cloreto de sódio	3.000
Aspirina	1.000
Sulfato de cobre	960
Clorofórmio	908
Cafeína	192
DDT	113
Nicotina	53
Estricnina	16
Aflatoxina B1	5

Fonte: Environ, 1986; Klaassen & Eaton, 1991.

- extrapolação de dados para homem/animais maiores: dose pode ser expressa em relação à área de superfície corporal (ex.: 0,5 mg/cm<sup>2</sup>)

➤ Alternativa à curva dose-resposta clássica:

**Teste de Dose Fixa**

□ **objetivo:** redução do número de animais e do sofrimento (mortes desnecessárias)

- administração de uma dose específica da substância à espécie animal:
  - padronização por instituições regulamentadoras (ex.:OECD)
  - n = 10 (5 machos e 5 fêmeas)
- após administração: 14 dias de observação



1ª Dose = 500 mg/Kg → sem toxicidade = não classificada  
(testar com 2.000 mg/Kg)

toxicidade sem morte: substância nociva  
com morte: novo teste

2ª Dose = 50 mg/Kg → toxicidade sem morte: substância tóxica  
com morte: novo teste

3ª Dose = 5 mg/Kg → toxicidade e/ou mortalidade: muito tóxica

✓ **Critério de toxicidade da Comunidade Européia (via oral):**

estimativa de DL50 (válida para 80-90% das substâncias)

Dose que produz sinais/sintomas sem morte (mg/Kg)	DL50 (mg/Kg)	Classificação
5	> 25	muito tóxica
50	25 - 200	tóxica
500	200 - 2.000	nociva

➤ **TIPOS DE TESTES TOXICOLÓGICOS**

- ✓ aplicados em animais de laboratório sob condições padronizadas
- ✓ **objetivo:** estabelecer/caracterizar possíveis efeitos tóxicos em humanos

Regulamentação brasileira: Conselho Nacional de Saúde - Resolução 1/78:

- para substâncias novas produzidas em larga escala (> 1 ton/ano):
  - ✓ toxicidade aguda
  - ✓ toxicidade subaguda
  - ✓ toxicidade crônica
  - ✓ teratogenia e embriotoxicidade
  - ✓ estudos especiais

## ➤ TIPOS DE TESTES TOXICOLÓGICOS

### Tópicos avaliados em estudos de toxicidade:

- Informações preliminares
- Toxicidade aguda
- Toxicidade subcrônica (curta duração)
- Toxicidade crônica (longo prazo)
- Mutagênese/carcinogênese
- Reprodução e embriofetotoxicidade
- Toxicocinética
- Efeitos locais (pele e olhos)
- Sensibilização cutânea
- Ecotoxicidade

### Princípios para testes em animais:

1. Efeito observado no animal deve refletir o que ocorre no organismo humano
2. Exposição de animais a altas doses é válido e necessário para investigação de efeitos danosos ao homem.



## ➤ TESTES TOXICOLÓGICOS

### 1. Informações preliminares:

- propriedades físico-químicas da substância teste
- caracterização da substância e suas possíveis impurezas
- Aspectos: odor, cor, PF, PE, densidade, viscosidade, solubilidade, volatilidade
  - ✓ influencia a escolha de solventes usados na dissolução e via de administração
  - ✓ relação com a distribuição/mobilidade ambiental: água, ar e solo
  - ✓ Kow → absorção/distribuição/armazenamento na biota
- quando disponíveis: níveis de exposição da população



## ➤ TESTES TOXICOLÓGICOS



### 2. Toxicidade aguda:

- avalia efeitos adversos após dose única ou doses múltiplas em 24h
- vias de administração: oral ou conforme exposição humana
- toxicidade relativa: **DL50** ou **CL50** (inalação ou exposição no meio aquático)
- mortes durante a exposição ou após: período de observação
- curva dose-resposta → logaritmo da dose lineariza para obter ponto médio

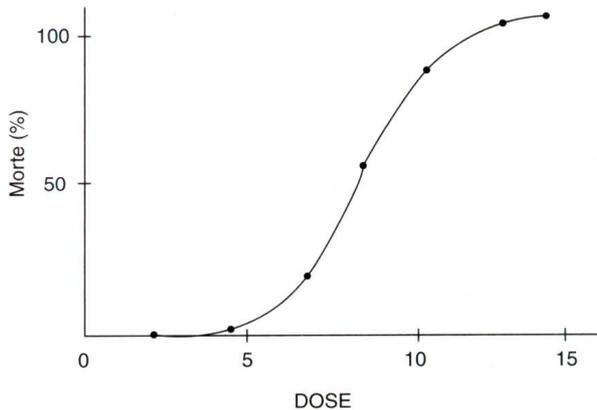


Figura 1. Dose resposta em teste de toxicidade.

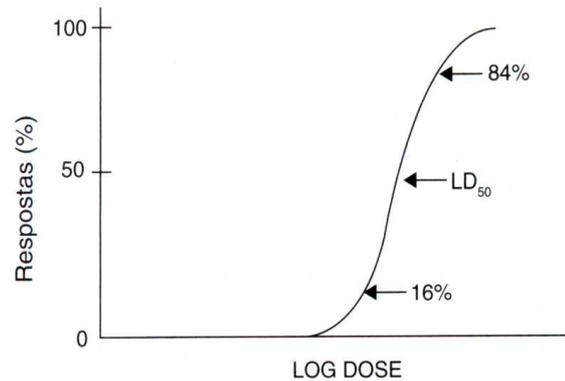


Figura 2. Log dose/resposta em teste de toxicidade.

### ❖ Linearização da curva Dose/Concentração-Resposta:

#### • vantagens:

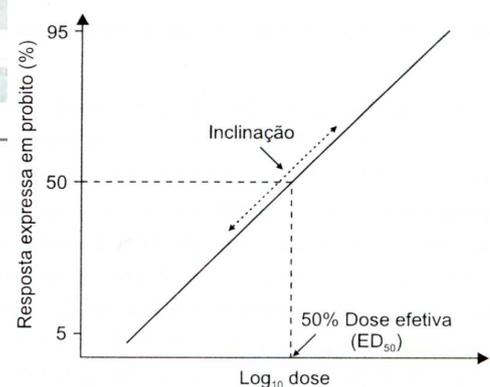
- ✓ menor número de pontos;
- ✓ interpretação e regressão mais simples;
- ✓ extrapolação para baixas doses

#### • Método mais comum: **Probitos**

- ✓ considera distribuição normal da resposta na população teste (Gaussiana)
- ✓ converte % de mortalidade em números inteiros (probitos)

Mortalidade	Dose ( $\delta$ )	Unidade probito (somar cinco ao desvio-padrão)
2,3	-2	3
16	-1	4
50	0	5
84	1	6
97,5	2	7

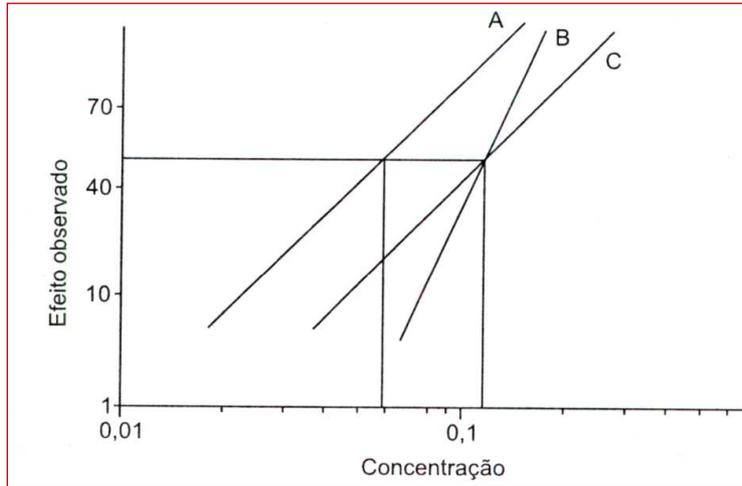
Fonte : Lauwerys & Lauenne, 1972.



## ❖ Linearização da curva Dose/Concentração-Resposta:

### Inclinação da Reta:

✓ associada a aspectos toxicocinéticos e mecanismo de ação



- menor inclinação: efeitos aparecem algum tempo após a exposição
  - menor biodisponibilidade
  - rápida excreção/detoxificação
- maior inclinação:
  - rápida absorção/manifestação do efeito tóxico

## ➤ TESTES TOXICOLÓGICOS

### 2. Toxicidade aguda (cont.):

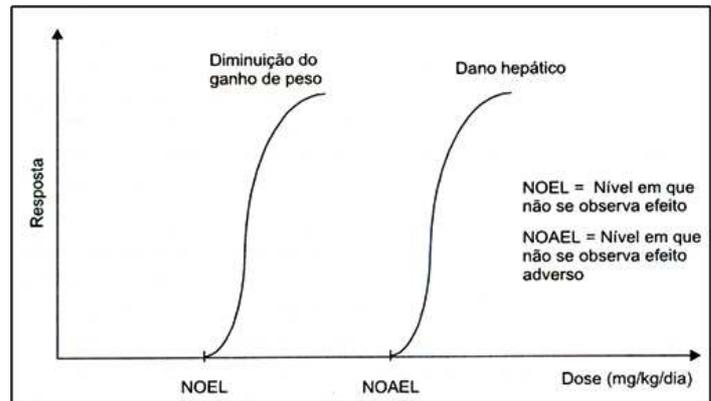


- ✓ além do número de animais mortos:
  - observações clínicas:
    - ✓ início (aparecimento de sinais/sintomas)
    - ✓ natureza/duração da intoxicação associadas à morte
  - exames anátomo-patológicos:
    - ✓ caracterização da lesão, determinação de órgãos-alvo
- testes com diferentes espécies/linhagens de animais; ambos os sexos
  - diferenças no efeito tóxico → considerar na extrapolação para o homem
- resultados determinam as condições do teste subcrônico (dose)

## ➤ TESTES TOXICOLÓGICOS

### 3. Toxicidade subcrônica:

- exposições repetidas; duração: 21 – 90 dias
- objetivos e importância:
  - estabelece NOEL (NOAEL) e LOEL (LOAEL) → extrapolação e parâmetros regulatórios
  - identifica órgãos afetados (tipo e gravidade das lesões)
  - avaliar se ocorre pelo acúmulo da substância
  - verifica reversibilidade dos efeitos tóxicos (pós-tratamento)
  - estabelece condições dos testes crônicos
- vias de administração: oral ou conforme exposição humana
- mínimo 2 espécies (1 não-roedora)
- mínimo 3 doses
- grupo controle negativo



## ➤ TESTES TOXICOLÓGICOS

### 3. Toxicidade subcrônica:

#### ➤ Durante os testes:

- ✓ acompanhamento diário
- ✓ sinais de toxicidade, alimentação, peso, cor/textura de pêlos, alterações circulatórias, motoras e respiratórias, comportamento, aumento no volume de tecidos e órgãos
- ✓ exames: hematológicos, bioquímicos, urina (início, meio e término do experimento)

#### ➤ Após os testes:

- ✓ exames anátomo-patológicos de órgãos
- ✓ em geral não avalia carcinogenicidade

## ➤ TESTES TOXICOLÓGICOS

### 4. Toxicidade crônica:

- avalia efeito tóxico de longo prazo e potencial carcinogênico
- exposição prolongada: mínimo 3 meses (roedores: 6 meses a 2 anos)
  - critério: tempo de uso/exposição previsto
- ideal: tempo de vida média da espécie  
(camundongos 18 m – 2 anos; ratos 2 – 2,5 anos)
- ponto crítico = escolha das doses: evitar morte prematura
- mínimo **50** animais/dose/sexo; 2 espécies diferentes.
- acompanhamento: exames clínicos diários
  - peso, consumo de ração
  - exames hematológicos, bioquímicos e urina (cada 6 meses)
  - ao término: análise histo-patológica

## ➤ TESTES TOXICOLÓGICOS

### 6. Toxicologia do Desenvolvimento:

Avalia efeitos da exposição:

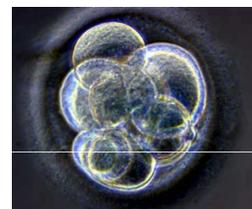
anterior à concepção (Toxicologia da Reprodução)  
desenvolvimento perinatal (Embriofetotoxicidade)  
pós-natal até a puberdade

✓ Testes:

- avaliação da fertilidade
- potencial teratogênico (exposição durante a organogênese)
- efeitos no sistema reprodutivo e desempenho para reprodução

✓ Diferentes protocolos experimentais:

- espécies mais comuns: camundongos, ratos e coelhos
- exposição de machos e/ou fêmeas (simultaneamente ou não)
- machos: ciclo da espermatogênese
- acompanhamento do acasalamento, desenvolvimento e crescimento do embrião



## ➤ TESTES TOXICOLÓGICOS

### 7. Efeitos locais sobre pele e olhos:

- testes normalmente com coelhos e cobaias (mais sensíveis)
- comum para cosméticos, fármacos, etc.
- parâmetros de irritação de Draize (1944):
  - pele: eritema, escara (necrose), edema e corrosão
  - olhos: alterações na conjuntiva, córnea, íris e cristalino



#### • **Tipos de testes:**

1. Irritação aguda local (exposição/aplicação única; resposta local e reversível)
  2. Irritação cumulativa (exposição repetitiva da derme)
  3. Irritação induzida fotoquimicamente (pele exposta à radiação)
- ✓ se o efeito perdurar por mais de 14 dias: não reversível

## ➤ TESTES TOXICOLÓGICOS

### 8. Testes de sensibilidade cutânea:

- aplicado para substâncias com possibilidade de contatos repetidos com a pele
- animais: coelhos e cobaias
- **Teste:**
  - período de exposição: 1-2 semanas (doses repetidas, com ou sem adjuvante)  
via intradérmica ou tópica oclusiva
  - intervalo de 2-3 semanas
  - nova exposição com dose não-irritante
  - monitoramento de eritema



<b>Toxicologia Clássica</b>	<b>Ecotoxicologia</b>
Objetivo: proteger a espécie humana.	Objetivo: proteger populações e comunidades de diferentes espécies.
Animais usados nos testes: rato, coelho, cobaia...	Usam-se as próprias espécies que se deseja proteger.
Menor grau de incerteza na extrapolação dos dados para o organismo humano.	O grau de incerteza na extrapolação é maior (muitas espécies diferentes).
Organismo-teste homeotérmico: toxicidade mais previsível.	Organismos em geral poiquilotérmicos, sob condições ambientais muito variáveis (toxicidade pouco previsível).
Dose do agente químico é calculada e administrada no indivíduo com precisão.	Concentração do agente no ambiente (ar, água, solo ou alimento) e assimilação apresentam maior variabilidade.
Muito conhecimento/pesquisa na área; compreensão do mecanismo de ação e efeitos adversos.	Menor informação; ênfase maior na relação concentração-efeito com finalidade de cumprimento de legislações.
Metodologias bem estabelecidas, as limitações e aplicações são bem conhecidas.	Métodos novos, em desenvolvimento (alguns padronizados).