

LÍLIAN VERDOLIN MILO COLLOR

**ALTERAÇÕES NA SUPERFÍCIE OCULAR DE COELHOS TRATADOS COM
FORMULAÇÕES DO HERBICIDA ÁCIDO DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4 D),
UTILIZANDO A GRADUAÇÃO DO TESTE OCULAR DE DRAIZE.**

Brasília - DF

2007

LÍLIAN VERDOLIN MILO COLLOR

**ALTERAÇÕES NA SUPERFÍCIE OCULAR DE COELHOS TRATADOS COM
FORMULAÇÕES DO HERBICIDA ÁCIDO DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4 D),
UTILIZANDO A GRADUAÇÃO DO TESTE OCULAR DE DRAIZE.**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências da Saúde da Universidade de
Brasília, para a obtenção do título de
Mestre em Ciências da Saúde.

Área: Toxicologia

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Eloísa Dutra Caldas

Brasília - DF

2007

BANCA EXAMINADORA

ORIENTADORA:

Prof^a. Dr^a. Eloísa Dutra Caldas
Membro Interno do Programa
Universidade de Brasília

MEMBROS:

Prof. Dr. Albino Verçosa de Magalhães
Membro Interno do Programa
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Cesar Koppe Grisolia
Membro Externo do Programa
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília

SUPLENTE:

Prof. Dr. Carlos Anibal Bulnes Goicochea
Membro Externo do Programa
Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Havana, Cuba

Brasília, 08 de Novembro de 2007

DEDICO

“Aos animais, que nos ajudam a desvendar os mistérios da ciência e merecem nosso respeito e melhor cuidado possível. Um animal bem tratado irá nos proporcionar resultados científicos mais confiáveis, o que deve ser o objetivo de todo pesquisador.”

Experimentação animal: razões e emoções para uma ética.
Fundação Oswaldo Cruz.

AGRADECIMENTOS

A Deus, “porque Dele, e por meio Dele, e para Ele, são todas as coisas”.

Ao meu esposo Eduardo, companheiro incondicional e grande incentivador.

À professora Eloísa, por ter exercido impecavelmente a sua orientação, pela grande contribuição para meu crescimento profissional e por estender sua mão em momentos pessoais tão difíceis.

Aos meus pais e irmãs, sempre presentes nas minhas conquistas e vitórias.

À Bioagri Laboratórios, pelo incentivo e apoio a esta pesquisa.

Ao Dr. Nelson Izquierdo Pérez e Dr. Carlos Bulnes Goicochea, patologistas da Bioagri, pela amizade e grande contribuição nos exames histopatológicos.

Aos técnicos de laboratório da Bioagri, “meus filhos”, Carlos José Domingos da Cruz, Raquel da Silva Gomes, Sandro da Silva Santos, Thiago Gomes Ferreira, pela responsabilidade no cuidado com os animais e grande auxílio durante este trabalho.

Aos técnicos do laboratório de histologia da Bioagri, Adriana Santos Silva, Anderson da Cruz Neves, Gleisom de Sousa Brasileiro, Kenya Pires de Sousa, Lázara de Sousa Oliveira Silva e Roniel Roseno da Fonseca, pela dedicação no trabalho histológico realizado.

Aos colegas do LabTox-UnB, Andreia, Denise, Viviane, Juciê e Naira, pela companhia do dia-a-dia.

A todos aqueles que torceram pelo meu sucesso, obrigada!!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE QUADROS	XI
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XII
RESUMO.....	XIII
ABSTRACT	XIV
INTRODUÇÃO	1
1 REVISÃO DE LITERATURA	3
1.1 Agrotóxicos no Brasil.....	3
1.2 Legislação dos Agrotóxicos no Brasil.....	6
1.2.1 O processo de registro.....	6
1.3 Herbicidas	9
1.3.1 O herbicida 2,4-D.....	10
1.3.2 O herbicida Picloram.....	13
1.4 Intoxicação por Agrotóxicos	16
1.5 Testes para Avaliar a Toxicidade de Agrotóxicos	20
1.6 Teste de Irritação Ocular: um breve histórico.....	21
1.7 Teste de Draize	23
1.8 Estruturas do Olho	28
2 OBJETIVO.....	32
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1 Animal de teste	33
3.2 Aclimação.....	34
3.3 Identificação	34
3.4 Alojamento e alimentação	34
3.5 Condições ambientais	34
3.6 Bem-estar animal	35
3.7 Preparo do produto	35
3.8 Exame preliminar	35
3.9 Dose e aplicação do produto.....	36
3.10 Graduação das reações oculares	36
3.11 Eutanásia	37

3.12 Disposição final	37
3.13 Pré-teste.....	37
3.14 Teste final.....	38
3.14.1 Características dos produtos de teste.....	38
3.14.2 Uso de anestésico local	38
3.14.3 Número de animais e intervalo de observação	39
3.14.4 Inspeção clínica	40
3.14.5 Interpretação dos achados macroscópicos.....	40
3.14.6 Preparo das lâminas histológicas	42
3.14.7 Exame histopatológico	42
4 RESULTADOS	43
4.1 Descrição das alterações macroscópicas (clínicas)	43
4.1.2 Pré-teste	43
4.1.3 Teste final	44
4.2 Descrição das alterações microscópicas	56
5 DISCUSSÃO	69
6 CONCLUSÃO E RECOMENDAÇÕES	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
ANEXO I.....	87
ANEXO II.....	95

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Consumo de defensivos agrícolas (kg/ha) em 2003.....	4
Figura 2	Distribuição percentual dos produtos formulados registrados no Brasil segundo a classe de uso.....	10
Figura 3	Distribuição percentual dos produtos formulados segundo a classificação toxicológica.....	10
Figura 4	2,4-D nas formas ácida, sal (dimetilamina, trietanolamina e triisopropanolamina) e éster.....	11
Figura 5	Picloram nas formas ácida e sal de triisopropanolamina.....	14
Figura 6	Percentual dos casos de intoxicação humana registrados pelo SINITOX, por agente tóxico. Brasil: 2005	19
Figura 7	Estruturas do olho.....	29
Figura 8	Esquema da estrutura da córnea.....	29
Figura 9	Exame oftálmico preliminar, mostrando o uso do colírio de fluoresceína e a lupa com Lâmpada de Wood.....	36
Figura 10	Percentual de ocorrência das alterações na córnea (a), íris (b) e conjuntivas (hiperemia (c) e edema (d)) nos animais tratados com o Produto 1.....	46
Figura 11	Percentual de ocorrência das alterações na córnea (a), íris (b) e conjuntivas (hiperemia (c) e edema (d)) nos animais tratados com o Produto 2.....	48
Figura 12	Percentual de ocorrência das alterações na córnea (a), íris (b) e conjuntivas (hiperemia (c) e edema (d)) nos animais tratados com o Produto 3.....	50
Figura 13	Percentual de ocorrência das alterações na córnea (a), íris (b) e conjuntivas (hiperemia (c) e edema (d)) nos animais tratados com o Produto 4.....	53
Figura 14	Avaliação do grau de opacidade na córnea ao longo do estudo nos animais do grupo 7 de cada produto, de acordo com a escala de Draize.....	54
Figura 15	Alterações oculares macroscópicas causadas pelos produtos 1 (A), 2 (B), 3 (C) e 4 (D)	55
Figura 16	Alterações microscópicas observadas no olho dos animais tratados com os produtos 1 (A e B), 2 (C), 3 (D) e 4 (E e F).....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Dados de toxicidade aguda do 2,4-D técnico em animais.....	12
Tabela 2	Dados de toxicidade aguda do Picloram técnico em animais	15
Tabela 3	Teste de irritação ocular de Draize e da OECD	23
Tabela 4	Escala de graduação das reações oculares de Draize	25
Tabela 5	Distribuição dos animais conforme os grupos de tratamento, intervalo de observação e eutanásia	39
Tabela 6	Distribuição dos animais nos intervalos de observação de cada produto	40
Tabela 7	Classificação da intensidade das alterações na córnea	41
Tabela 8	Classificação da intensidade das alterações na íris	41
Tabela 9	Classificação da intensidade das alterações nas conjuntivas	41
Tabela 10	Classificação da intensidade de vascularização na córnea	41
Tabela 11	Alterações clínicas na córnea dos animais dos pré-testes, 1 a 72 horas após a aplicação dos produtos	44
Tabela 12	Outras alterações clínicas observadas nos animais tratados com o Produto 1	45
Tabela 13	Outras alterações clínicas observadas nos animais tratados com o Produto 2	47
Tabela 14	Outras alterações clínicas observadas nos animais tratados com o Produto 3	50
Tabela 15	Outras alterações clínicas observadas nos animais tratados com o Produto 4	52
Tabela 16	Reações inflamatórias observadas nos animais dos grupos 1 e 2 tratados com o Produto 1. Os infiltrados de neutrófilos foram classificados em discreto (D), moderado (M) e acentuado (A)	56
Tabela 17	Reações inflamatórias observadas nos animais dos grupos 3 e 4 tratados com o Produto 1. Os infiltrados de neutrófilos foram classificados em discreto (D), moderado (M) e acentuado (A)	57
Tabela 18	Reações inflamatórias observadas nos animais dos grupos 5, 6 e 7 tratados com o Produto 1. Os infiltrados de neutrófilos foram classificados em discreto (D), moderado (M) e acentuado (A)	58
Tabela 19	Reações inflamatórias observadas nos animais dos grupos 1 e 2 tratados com o Produto 2. Os infiltrados de neutrófilos foram classificados em discreto (D) e moderado (M)	59
Tabela 20	Reações inflamatórias observadas nos animais dos grupos 3 e 4 tratados com o Produto 2. Os infiltrados de neutrófilos foram classificados em discreto (D) e moderado (M)	60
Tabela 21	Reações inflamatórias observadas nos animais dos grupos 5, 6 e 7 tratados com o Produto 2. Os infiltrados de neutrófilos foram classificados em discreto (D) e moderado (M)	61

Tabela 22	Reações inflamatórias observadas nos animais dos grupos 1 e 2 tratados com o Produto 3. Os infiltrados de neutrófilos foram classificados em discreto (D), moderado (M) e acentuado (A).....	62
Tabela 23	Reações inflamatórias observadas nos animais dos grupos 3 e 4 tratados com o Produto 3. Os infiltrados de neutrófilos foram classificados em discreto (D), moderado (M) e acentuado (A).....	63
Tabela 24	Reações inflamatórias observadas nos animais dos grupos 5 e 7 tratados com o Produto 3. Os infiltrados de neutrófilos foram classificados como discreto (D)...	64
Tabela 25	Reações inflamatórias observadas nos animais dos grupos 1 e 2 tratados com o Produto 4. Os infiltrados de neutrófilos foram classificados em discreto (D), moderado (M) e acentuado (A)	65
Tabela 26	Reações inflamatórias observadas nos animais dos grupos 3 e 4 tratados com o Produto 4. Os infiltrados de neutrófilos foram classificados em discreto (D), moderado (M) e acentuado (A)	66
Tabela 27	Reações inflamatórias observadas nos animais dos grupos 5 e 6 tratados com o Produto 4. Os infiltrados de neutrófilos foram classificados em discreto (D), moderado (M) e acentuado (A)	67

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Classificação dos agrotóxicos, segundo os efeitos à saúde e para o meio ambiente	5
Quadro 2	Características dos produtos utilizados.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AVMA	American Veterinary Medical Association
BPL	Boas Práticas de Laboratório
CAS	Chemical Abstract Service
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPA	Environmental Protection Agency
ERMA	Environmental Risk Management Authority
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	Food and Drug Administration
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GHS	Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IARC	Agência Internacional de Pesquisas Sobre o Câncer
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
ILAR	Institute for Laboratory Animal Research
IPCS	International Programme on Chemical Safety
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MMA	Ministério do Meio Ambiente
MS	Ministério da Saúde
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-americana da Saúde
SDA	Secretaria de Defesa Agropecuária
SIA	Sistema de Informações sobre Agrotóxicos
SINDAG	Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola
SINITOX	Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas
WHO	World Health Organization

RESUMO

O teste de irritação ocular é requerido pelos órgãos governamentais brasileiros durante o processo de registro de um produto agrotóxico, e essencial para sua classificação toxicológica. O presente estudo avaliou as alterações macroscópicas e microscópicas na superfície do olho de coelhos após o tratamento com quatro formulações de herbicidas contendo o ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), utilizando a escala de graduação das reações oculares proposta por Draize. Foram utilizados 84 coelhos, 21 animais por formulação, distribuídos em 7 grupos. Uma única dose de 0,1 mL ou g foi aplicada diretamente no saco conjuntival do olho esquerdo de cada animal, e o olho direito foi utilizado como controle. As alterações na córnea, íris e conjuntivas foram graduadas nos intervalos de 1, 24, 48 e 72 horas e 7, 14 e 21 dias após a aplicação. Em cada intervalo, três animais foram eutanasiados, seus olhos removidos e os tecidos preparados para exame histológico. Os resultados macroscópicos mostraram que não houve proporcionalidade entre a concentração de 2,4-D e a intensidade das alterações na córnea. Os produtos 1 e 2, com menor concentração de 2,4-D e pH próximo da neutralidade, mostraram alterações discretas e moderadas na córnea quando comparados aos produtos 3 e 4 que apresentaram na maioria alterações moderadas e acentuadas. As lesões produzidas no epitélio córneo foram, na maioria, reparadas durante o período do experimento, com exceção daquelas em um animal tratado com o produto 3 e de três animais do produto 4 que tiveram rompimento da córnea. Infiltrados de neutrófilos polimorfonucleares foram detectados microscopicamente na maioria das inflamações na córnea, íris e conjuntivas notadas nos exames clínicos. Entretanto, não houve em todos os casos relação direta entre a intensidade das alterações macro e microscópicas. Os exames micro ainda mostraram em alguns animais alterações que normalmente não são visualizadas clinicamente, como hiperplasia, queratinização e descamação do epitélio córneo, e inflamação do corpo ciliar, que podem comprometer o processo da visão. A legislação brasileira atual é conservadora, pois considera como extremamente tóxico qualquer produto que apresente opacidade na córnea, reversível ou não em 7 dias. Os resultados deste estudo indicam a necessidade da revisão da legislação em harmonia com os procedimentos utilizados internacionalmente.

Palavras-chave: Agrotóxico, 2,4-D, Irritação ocular, Teste de Draize.

ABSTRACT

Ocular irritation test is required by the Brazilian government authorities during the registration process of pesticide products, and it is essential for its toxicological classification. The present study evaluated the clinical and microscopic changes in the eye surface of rabbits after treatment with four pesticide formulations containing the herbicide 2,4-D dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), using the Draize scale for grading the ocular irritation. Eighty four animals were used in the experiment, being 21 for each formulation, distributed in 7 groups. A single dose of 0.1 mL or g was directly applied to the conjunctive sac of the left eye of each animal, and the right eye being used as control. Changes in the cornea, iris and conjunctives were graduated after 1, 24, 48 and 72 hours and 7, 14 and 21 days after treatment. In each interval, three animals were killed, the eyes removed and the ocular tissues prepared for the histological examination. Clinical results showed no proportionality between concentration of 2,4-D in the formulation and severity of corneal damage. The products 1 and 2, with lower 2,4-D concentration and pH near the neutrality, caused discrete and moderate changes in the cornea when compared with the products 3 and 4, which caused moderate and accentuated changes. Lesions produced in the corneal epithelium were repaired during the experiment, with exception of those in one animal treated with product 3 and three animals treated with product 4 which had corneal perforation. Infiltrates of polymorphonuclear neutrophil cells were observed microscopically in the majority of the inflammatory events clinically noted on the cornea, iris and conjunctives. However, not always the intensity of the changes observed macro and microscopically were correlated. Microscopy showed corneal hyperplasia, queratinization and desquamation and inflammation of the ciliary body of many animals as a result of the treatment, changes that can affect the vision but are not normally observed during the clinical examination. The current Brazilian legislation is conservative, as it considers any product that shows corneal opacity, reversible or not after 7 days, as extremely toxic. The present work indicates the need to update this legislation according to the international procedures.

Keywords: Pesticide, 2,4-D, Ocular irritation, Draize test.

INTRODUÇÃO

A agricultura moderna tem criado meios para elevar sua produtividade e alcançar níveis que atendam as demandas do mercado nacional e internacional. A utilização dos agrotóxicos no controle de pragas, doenças e plantas invasoras tem sido instrumento importante para atingir estes objetivos.

Agregado ao uso intensivo dos agrotóxicos cresce também a exposição humana e o agravo à saúde da população, tanto dos trabalhadores que lidam diretamente com os produtos, quanto dos consumidores dos alimentos. Os herbicidas estão entre os agrotóxicos mais utilizados na agricultura e, dentro dessa classe, os produtos contendo o ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) estão entre os mais amplamente consumidos.

O 2,4-D merece atenção especial particularmente no que diz respeito ao seu potencial para causar efeitos adversos na saúde humana. A exposição a um produto contendo 2,4-D pode ocorrer durante a sua fabricação, manipulação ou aplicação, podendo ser absorvido pelas vias inalatória, oral e cutânea. Estudos com animais de laboratório mostraram que o 2,4-D pode ser considerado um irritante severo quando em contato com olhos de coelhos.

Segundo a legislação brasileira, os agrotóxicos, seus componentes e afins devem ser registrados nas instituições governamentais antes de serem produzidos, exportados, importados, comercializados e utilizados. Para isso, a toxicidade dos produtos deve ser previamente conhecida como margem de segurança para a saúde do trabalhador. Para determinar os efeitos de uma substância química na saúde humana, testes toxicológicos em animais devem ser conduzidos de acordo com as publicações internacionais, como a Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento da Comunidade Econômica Européia (OECD / CEE).

Entre os protocolos de testes toxicológicos desenvolvidos pelo OECD (*OECD Guidelines for Testing of Chemicals*, 1999) encontra-se o Teste de Irritação/Corrosão Ocular Aguda (*OECD Guideline 405*, 2002). O objetivo deste teste

é conhecer os efeitos de um produto químico na superfície ocular de coelhos e prever o que ocorreria caso o produto entre em contato com os olhos humanos.

O teste de irritação ocular padronizado pelo OECD tem como referência o Teste Ocular de Draize (Draize *et al.*, 1944), que se baseia na graduação dos efeitos do produto na córnea, mucosa conjuntival e palpebral e íris, de acordo com uma escala numérica, transformando as observações qualitativas macroscópicas das alterações oculares em valores numéricos, facilmente interpretados. Os dados obtidos desse teste têm grande importância na decisão quanto à classificação toxicológica de um produto, por serem muitas vezes os mais críticos entre aqueles obtidos dos testes toxicológicos.

Embora o método já tenha passado por adaptações e seja questionável quanto à sua reprodutibilidade e relevância, uso e interpretação dos escores, seu custo monetário e ético, o teste de Draize ainda é o único teste aceito pelas agências governamentais regulatórias para identificar os efeitos nos olhos e a classificação de uma nova substância.

Este estudo tem como objetivo principal conhecer as alterações microscópicas na superfície ocular de coelhos após a graduação das alterações macroscópicas de acordo com a tabela de escores proposta por Draize. O método de Draize permite conhecer as alterações microscópicas na superfície ocular apenas ao final do período de observação, ou seja, quando há reversibilidade (desaparecimento) das alterações. Este trabalho propõe conhecer as alterações microscópicas após a graduação das alterações macroscópicas, em cada intervalo específico do teste de Draize.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Agrotóxicos no Brasil

O uso dos agrotóxicos, ou pesticidas, seus riscos e benefícios têm sido amplamente avaliados e discutidos nos últimos anos. Até 1930, as primeiras tentativas no controle de pragas na agricultura foram feitas com minerais tóxicos, tais como o mercúrio e o enxofre, ou com extratos de plantas como o tabaco, através da ação da nicotina, e flores de crisântemos, que contêm ésteres de piretro. Os pesticidas sintéticos passaram a ser utilizados por volta de 1939, quando as propriedades inseticidas do DDT (Dicloro Difenil Tricloetano) foram descobertas (Polastro, 2005). Foi durante as duas Grandes Guerras Mundiais que os pesticidas orgânicos foram desenvolvidos e produzidos em grande escala. A finalidade principal do desenvolvimento desses produtos era bélica e não agrícola (Polastro, 2005).

No Brasil, os produtos químicos foram primeiramente utilizados em programas de saúde pública no combate a vetores e controle de parasitas, passando a ser utilizados mais intensivamente na agricultura a partir de 1960 (OPAS, 1997; Domingues *et al.*, 2004). Nas décadas de 60 e 70 a agricultura brasileira passou por um processo de modernização marcado por transformações nos processos de produção e padrões tecnológicos até então em vigor, denominado como “Revolução Verde” (Tomita, 2005). Este novo modelo, trazido pelos países industrializados, baseava-se na intensa utilização de sementes melhoradas, no emprego de insumos industriais (fertilizantes e agrotóxicos), mecanização e diminuição do custo de manejo.

A introdução destas técnicas, aliadas ao crédito farto, e ao desenvolvimento de pesquisas próprias, tanto em instituições governamentais (Embrapa) como universidades, levou ao êxito no controle de pragas e, conseqüentemente, ao aumento brutal na produção agrícola do país (Tomita, 2005; IBGE, 2004). Porém, o uso excessivo e desordenado dos insumos agrícolas também trouxe impactos à saúde humana, animal e ao meio ambiente (IBGE, 2004; Domingues *et al.*, 2004). Dentre as populações expostas destacam-se os

trabalhadores rurais, que estão entre os grupos profissionais que têm o maior contato com os agrotóxicos (Silva *et al.*, 2005).

Entre 1983 e 1997 o consumo mundial de agrotóxicos aumentou de US\$20 para US\$34 bilhões por ano (Yudelman *et al.*, 1998), sobretudo na América Latina, região onde se observou um maior aumento no consumo. Esse crescimento foi influenciado significativamente pelo Brasil, que aumentou os seus gastos na aquisição de agrotóxicos de US\$1 para US\$2,2 bilhões/ano entre 1964 e 1991, época em que o país passava pela modernização no campo. O Brasil é atualmente o 3º maior consumidor de produtos agrotóxicos no mundo em volume de uso, atrás apenas dos EUA e do Japão (Martinelli, 2003), e o 8º maior consumidor de agrotóxicos do mundo, considerando a quantidade desse insumo aplicada por área (kg/ha) (Figura 1) (SINDAG, 2003).

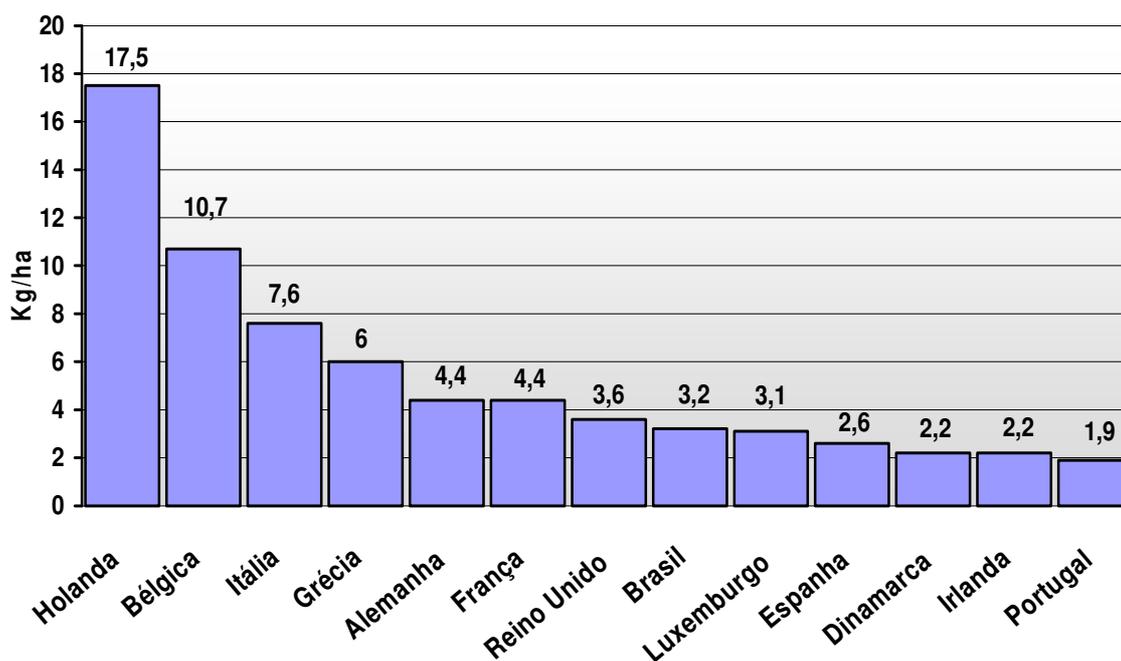


Figura 1 – Consumo de defensivos agrícolas (kg/ha) em 2003. Fonte: SINDAG, 2007.

O crescente aumento do uso dos produtos químicos na agricultura tem gerado uma intensa preocupação aos órgãos oficiais brasileiros responsáveis pela regulamentação destas substâncias. As autoridades têm trabalhado de forma

harmônica na elaboração de normas compatíveis com os padrões internacionais vigentes, disciplinando dessa forma o uso dos agrotóxicos (MS, 2005).

Os agrotóxicos podem ser classificados em herbicidas, fungicidas, inseticidas ou acaricidas, dependendo do organismo que controla. Segundo os dados do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA (2005), os agrotóxicos mais comercializados no país são os herbicidas (53,2%), seguidos dos inseticidas (18,8%) e fungicidas (10,9%). Quanto aos princípios ativos mais consumidos em 2005, destacam-se os herbicidas glifosato (34,0%) e o ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) (6,6%), o óleo mineral (7,1%) e o inseticida metamidofós (6,4%).

Os agrotóxicos também são classificados segundo seu potencial tóxico para o homem (toxicidade) e para o meio ambiente (periculosidade), conforme apresentado no Quadro 1. A classificação de produtos com mesmo ingrediente ativo pode diferir de acordo com a sua formulação. É importante ressaltar que a classificação toxicológica de uma substância ou formulação depende principalmente dos dados toxicológicos mais agravantes (ANVISA, 2007a).

Quadro 1 – Classificação dos agrotóxicos, segundo os efeitos à saúde e para o meio ambiente

Classificação	Toxicidade¹	Periculosidade²	Cor da tarja
Classe I	Extremamente tóxico	Altamente perigoso	Vermelha
Classe II	Altamente tóxico	Muito perigoso	Amarela
Classe III	Medianamente tóxico	Perigoso	Azul
Classe IV	Pouco tóxico	Pouco perigoso	Verde

Fonte: ANVISA¹, 2007a; IBAMA², 2007

1.2 Legislação dos Agrotóxicos no Brasil

As publicações legais (decretos, leis, portarias e outros) que orientam o uso dos agrotóxicos no Brasil podem ser percebidas em momentos diferentes da nossa história. A primeira legislação foi o Decreto-Lei nº 24.114, de 12 de abril de 1934, que aprovou o Regulamento de Defesa Sanitária Vegetal (Brasil, 1934). Durante a “Revolução Verde”, iniciada na década de 60, várias portarias foram publicadas mas nenhuma delas tratava do tema toxicidade especificamente, já que o objetivo central era aumentar a produção de alimentos (Tomita, 2005). A partir dos anos 80, a legislação brasileira passou a incluir aspectos toxicológicos dos agrotóxicos através da Portaria nº 7/81 (MAPA, 1981), que previa normas a serem adotadas para o enquadramento de formulações de defensivos agrícolas em produtos de uso livre, controlado e restrito, de acordo com a classificação toxicológica estabelecida pelo Ministério da Saúde, implantando assim o receituário agrônomo.

1.2.1 O processo de registro

A trajetória no desenvolvimento de uma nova substância até chegar ao produto comercial desejado é complexa e multidisciplinar, demandando tempo e altos investimentos. Três aspectos são avaliados: o aspecto químico, que avalia a via de síntese e produção do ingrediente ativo e da formulação; o aspecto biológico, pesquisa a eficácia da substância com testes em laboratório e em viveiros fechados e posteriormente em ensaios de campo, conduzidos em diferentes climas e ambientes; e finalmente os aspectos referentes à segurança, na qual envolve pesquisas de degradação e resíduos, toxicologia e ecotoxicologia do agrotóxico e de seus subprodutos (Liechoscki, 2004). Ao fim do desenvolvimento do produto, as informações são submetidas para avaliação pelas autoridades reguladoras para fins de registro.

Em 1989 foi aprovada a Lei Federal nº 7.802 (Brasil, 1989), cuja última regulamentação ocorreu em dezembro de 2006 pelo Decreto nº 5.981 (Brasil, 2006),

que dispõe especificamente sobre os agrotóxicos, seus componentes e afins. A Lei veio nortear aspectos como a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins. A legislação foi considerada um avanço, pois demonstrava claramente a evolução da conscientização dos perigos inerentes à utilização destas substâncias, bem como a preocupação com a qualidade da saúde, alimentos e meio ambiente.

No seu Artigo 2º, inciso I, os agrotóxicos e afins são considerados “*os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, além de substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento*” (Brasil, 2006). Ainda nesse mesmo artigo são considerados componentes “*os princípios ativos, os produtos técnicos, suas matérias-primas, os ingredientes inertes e aditivos usados na fabricação de agrotóxicos e afins*” (Brasil, 2006).

A Lei dispõe ainda sobre a exigência do registro dos agrotóxicos, seus componentes e afins. Os mesmos só poderão ser produzidos, exportados, importados, comercializados e utilizados se previamente registrados nas instituições governamentais, de acordo com as diretrizes e exigências dos órgãos federais responsáveis pelos setores da saúde, do meio ambiente e da agricultura (Brasil, 2006).

A Lei dos Agrotóxicos também define as competências dos Ministérios, envolvendo o Ministério da Saúde (MS), através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o Ministério do Meio Ambiente (MMA), através do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e o

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) através da Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA). Ao MS cabe analisar o grau de toxicidade dos agrotóxicos e afins, estabelecer os limites máximos de resíduos de agrotóxicos em alimentos e fiscalizá-los e estabelecer parâmetros para rotulagem dos produtos. O MMA é responsável por determinar o grau de periculosidade dos agrotóxicos e afins e realizar a avaliação e controle dos riscos ambientais referentes ao uso destes produtos. Ao MAPA compete avaliar a eficácia agrônômica, emitir o registro à partir de pareceres emitidos pelo MS e MMA e fiscalizar o fabricante e formulador dos produtos. Aos órgãos estaduais compete a fiscalização nas vendas e no uso (Brasil, 2006).

Neste cenário, a expectativa da sociedade é de que a aprovação do registro de um agrotóxico implique na garantia de que o produto, desde que utilizado corretamente, seja seguro para a saúde humana e para o meio ambiente.

As diretrizes e exigências referentes à autorização, renovação de registro e extensão de uso de agrotóxicos e afins são estabelecidas pela Portaria nº 03, de 16 de janeiro 1992 (MS, 1992). Nesta portaria são descritos os requerimentos necessários para o processo de registro de um produto, para a condução da sua avaliação e classificação toxicológica. A avaliação toxicológica é definida como “*o estudo acurado dos dados biológicos, bioquímicos e toxicológicos de uma substância, com o objetivo de conhecer a sua atuação em animais de prova e inferir os riscos para a saúde humana*”. A classificação toxicológica é “*classificação dos produtos técnicos e das formulações levando em consideração os seus aspectos toxicológicos*” (MS, 1992). A avaliação precede a classificação de um agrotóxico para permitir a detecção de possíveis efeitos graves para a saúde que possam impedir o registro e a utilização de um determinado agrotóxico.

Os parâmetros de classificação definidos nas portarias seguiram os critérios recomendados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Organização para Agricultura e Alimentação (FAO). As recomendações são feitas baseadas nos efeitos do risco agudo à saúde (isto é, o risco de exposições únicas ou múltiplas, em um período de tempo relativamente curto), caso o produto venha ser ingerido, inalado ou entre em contato com a pele ou olhos.

Na ANVISA estão relacionadas atualmente 419 monografias de ingredientes ativos registrados no Brasil, destinados ao uso agrícola e não agrícola, domissanitário e preservante de madeira (ANVISA, 2007b).

1.3 Herbicidas

Os herbicidas são substâncias utilizadas na agricultura destinadas a eliminar ou impedir o crescimento de plantas invasoras que prejudicam a produtividade de uma lavoura. Estas substâncias podem ser agrupadas segundo sua atividade (de contato ou sistêmicos), uso (aplicados no solo, pré e pós-emergentes), mecanismo de ação (primeira enzima, proteína ou etapa bioquímica afetados na planta) e ainda pelo grupo químico (bipiridilos, glicina substituída, derivados do ácido fenoxiacético, dinitrofenóis e pentaclorofenol) ou tipo de vegetação controlada (INCA, 2005; Wikipedia, 2007).

A ampla utilização dos herbicidas está associada à difusão no Brasil do plantio direto, prática que reduz o revolvimento do solo favorecendo o crescimento de ervas daninhas (IBGE, 2004). Entre os estados brasileiros com maior consumo de herbicidas estão São Paulo (19%), Rio Grande do Sul (14,5%), Mato Grosso (14,4%) e Paraná (14%). Entre as culturas responsáveis por este elevado consumo destacam-se principalmente a soja, a cana-de-açúcar, o milho e o arroz (IBAMA, 2005).

Segundo o Sistema de Informações sobre Agrotóxicos - SIA, 1001 produtos formulados foram registrados na ANVISA até setembro de 2007, sendo que desse total 31% são herbicidas (Figura 2) (SIA, 2007).

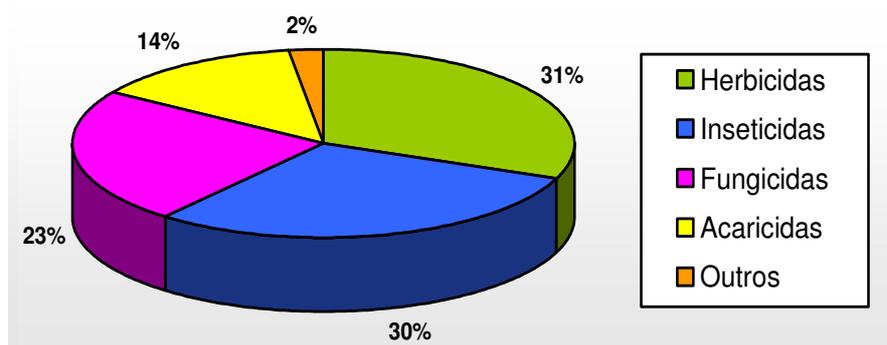


Figura 2 – Distribuição percentual dos produtos formulados registrados no Brasil segundo a classe de uso. Fonte: SIA, 2007.

Entre os herbicidas, as formulações de classes toxicológica II (altamente tóxico) e III (medianamente tóxico) estão em maior número, correspondendo a 27% e 38%, respectivamente (Figura 3) (SIA, 2007).

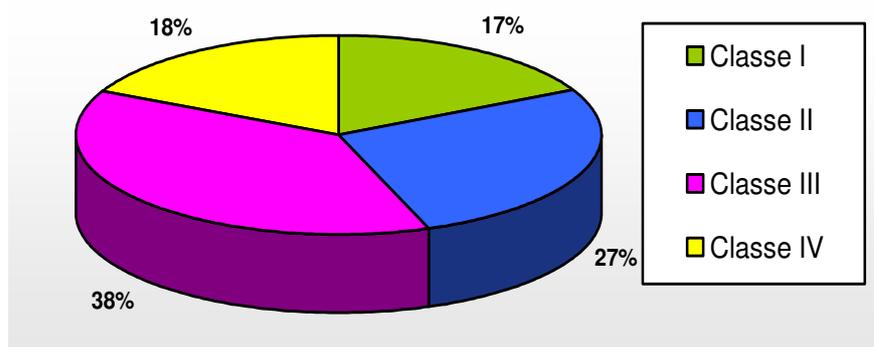


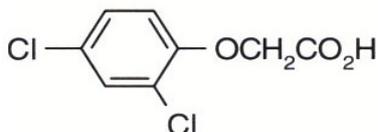
Figura 3 – Distribuição percentual dos produtos formulados segundo a classificação toxicológica. Fonte: SIA, 2007.

1.3.1 O herbicida 2,4-D

O 2,4-D tem sido usado como herbicida desde a década de 40, fazendo parte do programa da guerra química e biológica no período da segunda Guerra Mundial (1939-1945). Foi utilizado pelos Estados Unidos na guerra do Vietnã, juntamente com o herbicida 2,4,5-T, como componente do agente laranja, que era utilizado como desfolhante das florestas Vietnamitas. Desde então passou a ser amplamente utilizado no Brasil e no mundo no controle seletivo de ervas daninhas de folhas largas (Gandhi, 1998).

Pertencente ao grupo dos fenoxiacéticos, o 2,4-D é um herbicida sistêmico seletivo que atua como um hormônio regulador do crescimento das plantas (EPA, 2005). Além da forma ácida, encontra-se registrado no Brasil o 2,4-D nas formas de sais e éster butílico (Figura 4). Os sais de 2,4-D são rapidamente absorvidos pelas raízes da planta enquanto os ésteres são absorvidos pela parte foliar.

2,4-D ácido

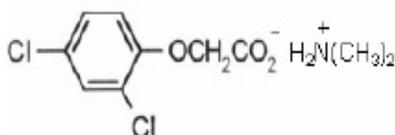


Fórmula bruta: C₈H₆Cl₂O₃

N° CAS: 94-75-7

Nome químico:
(2,4-dichlorophenoxy)acetic acid

2,4-D Sal de dimetilamina (DMA)

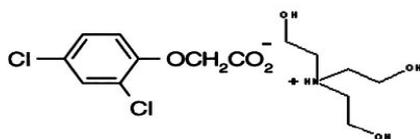


Fórmula bruta: C₁₀H₁₃Cl₂NO₃

N° CAS: 2008-39-1

Nome químico: dimethylammonium (2,4-dichlorophenoxy)acetate

2,4-D Sal de trietanolamina

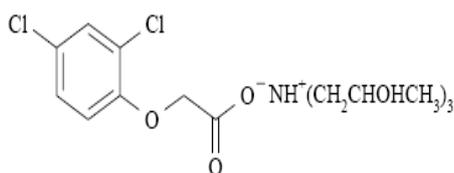


Fórmula bruta: C₁₄H₂₁Cl₂NO₆

N° CAS: 2569-01-9

Nome químico: triethanolamine (2,4-dichlorophenoxy)acetate

2,4-D Sal de triisopropanolamina (TIPA)*



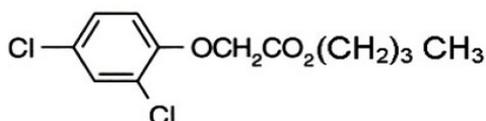
*Não registrado atualmente no Brasil

Fórmula bruta: C₁₇H₂₇Cl₂NO₆

N° CAS: 32341-80-3

Nome químico: sal de triisopropanolamina do (2,4-dichlorophenoxy)acetic acid

2,4-D Éster butílico



Fórmula bruta: C₁₂H₁₄Cl₂O₃

N° CAS: 94-80-4

Nome químico:
butyl (2,4-dichlorophenoxy)acetate

Figura 4 – 2,4-D nas formas ácida, sal (dimetilamina, trietanolamina e triisopropanolamina) e éster. Fonte: EPA, 2005; ANVISA, 2007c.

No Brasil, produtos formulados contendo o princípio ativo 2,4-D têm indicação em pré e pós-emergência das plantas infestantes nas culturas de arroz, aveia, café, cana-de-açúcar, centeio, cevada, milho, pastagens, soja, sorgo e trigo (ANVISA, 2007c). Entre os herbicidas registrados, o ingrediente ativo 2,4-D está presente em dezesseis formulações, das quais doze contêm apenas 2,4-D, três está associado ao picloram e uma ao propanil (ANVISA, 2007c). Do ponto de vista toxicológico, o 2,4-D técnico é classificado como um herbicida de toxicidade I (extremamente tóxico). Entre as formulações contendo este princípio ativo, quatorze (87,5%) pertencem a classe I e duas (12,5%) pertencem a classe II (altamente tóxico) (ANVISA, 2007c).

Os efeitos do 2,4-D têm sido extensivamente estudados em animais de experimentação. Estudos agudos realizados em animais mostraram que o 2,4-D técnico (não formulado) tem baixa toxicidade por exposição oral, dermal e inalatória, com classe toxicológica III ou IV (EPA, 2005) (Tabela 1). O 2,4-D, em suas várias formas, pode ser considerado um irritante severo para olhos de coelhos (classe toxicológica I), causando opacidade na córnea, vermelhidão, edema e secreção nas conjuntivas e inflamação na íris (EPA, 2005). O produto mostrou ser não irritante para pele de coelhos (classe toxicológica IV) (Tabela 1), bem como não causar sensibilização dérmica em cobaias.

Tabela 1 – Dados de toxicidade aguda do 2,4-D técnico em animais

Via de exposição	Forma	Resultados	Classe toxicológica
DL ₅₀ oral rato	ácida	639 mg/kg p.c.	III
	DMA	949 mg/kg p.c.	III
	TIPA	1074 mg/kg p.c.	III
DL ₅₀ dermal Coelho	ácida	> 2000 mg/kg p.c.	III
	DMA	1829 mg/kg p.c.	III
	TIPA	> 2000 mg/kg p.c.	III

Via de exposição	Forma	Resultados	Classe toxicológica
CL ₅₀ inalatório rato ¹	ácida	> 1,79 mg/L	III
	DMA	> 3,5 mg/L	IV
	TIPA	0,78 mg/L	III
Irritação cutânea coelho ¹	ácida	Irritante leve	IV
	DMA	Irritante leve	IV
	TIPA	Irritante leve	IV
Irritação ocular coelho	ácida	Irritante severo	I
	DMA	Irritante severo	I
	TIPA	Irritante severo	I

DL₅₀: dose letal a 50%; CL₅₀: concentração letal a 50%; p.c.: peso corporal; ¹durante 4 horas de exposição; DMA: sal de dimetilamina; TIPA: sal de triisopropanolamina; Classes toxicológicas: I (extremamente tóxico), III (medianamente tóxico) e IV (pouco tóxico). Fonte: EPA, 2005.

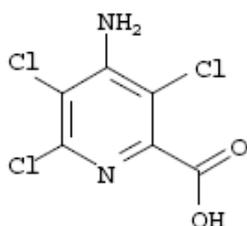
O 2,4-D merece atenção especial, particularmente no que diz respeito ao seu potencial para causar efeitos adversos na saúde humana, produzindo seqüelas muito sérias e às vezes fatais (EPA, 2005). Na exposição ocupacional, seja durante a fabricação, a manipulação ou aplicação de um produto contendo 2,4-D, o princípio ativo pode ser absorvido via inalatória, oral e dermal, mas cerca de 90% da quantidade total de 2,4-D é absorvido através da pele.

1.3.2 O herbicida Picloram

O ingrediente ativo picloram foi descoberto por volta de 1960 pela Dow Chemical Company e introduzido no mercado em 1963. Ele atua como um herbicida sistêmico, usado geralmente na associação com outros herbicidas, como o 2,4-D (EPA, 1995).

O picloram pertence ao grupo químico ácido piridinocarboxílico e atua como um hormônio regulador do crescimento das plantas. O picloram encontra-se registrado no Brasil apenas na forma ácida, mas ele também pode ser encontrado na forma de sal (Figura 5). Produtos contendo este princípio ativo têm indicação em pós-emergência das plantas infestantes nas culturas de arroz, pastagens e trigo (ANVISA, 2007d).

Picloram ácido



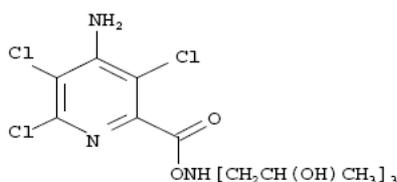
Fórmula bruta: C₆H₃Cl₃N₂O₂

N° CAS: 1918-02-1

Nome químico:

4-amino-3,5,6-trichloropyridine-2-carboxylic acid

Picloram Sal de triisopropanolamina (TIPA)*



Fórmula bruta: C₁₅H₂₄Cl₃N₃O₅

N° CAS: 6753-47-5

Nome químico: Sal triisopropanolamina de 4-amino 3,5,6-trichloropyridine-2-carboxylic acid

*Não registrado atualmente no Brasil

Figura 5 – Picloram nas formas ácida e sal de triisopropanolamina.

Fonte: EPA, 1995; ANVISA, 2007d.

Entre os herbicidas registrados na ANVISA (2007d), o ingrediente ativo picloram está presente em seis produtos formulados, sendo duas formulações contendo apenas o picloram, três formulações associado com o 2,4-D e uma formulação associado com o ingrediente ativo fluroxipir-meptílico. O picloram técnico é considerado um herbicida de classificação toxicológica III. Das seis formulações contendo esse princípio ativo registrados no Brasil, três estão classificadas como classe I (extremamente tóxico), duas como classe II (altamente tóxico) e uma como classe III (medianamente tóxico) (ANVISA, 2007d).

Os efeitos tóxicos do picloram também já foram bastante estudados nos animais de laboratório, conforme apresentado na Tabela 2. Os estudos agudos revelaram que o picloram tem baixa toxicidade por exposição oral e dermal (classes

toxicológicas III ou IV), entretanto mostrou-se tóxico (classes I ou II, dependendo se ácido ou sal) quando exposto pela via inalatória (EPA, 1995). O picloram demonstrou não causar irritação na pele de coelhos (classe IV) e causou moderada irritação ocular em coelhos (classe III). Sua forma ácida não causa sensibilização dérmica em cobaias enquanto na forma TIPA, o picloram foi considerado um sensibilizante (EPA, 1995).

Tabela 2 – Dados de toxicidade aguda do Picloram técnico em animais

Via de exposição	Forma	Resultados	Classe toxicológica
DL ₅₀ oral rato	ácida	> 5000 mg/kg p.c. (macho) 4012 mg/kg p.c. (fêmea)	IV III
	TIPA	> 5000 mg/kg p.c. (ambos sexos)	IV
DL ₅₀ dermal coelho	ácida	> 2000 mg/kg p.c.	III
	TIPA	> 2000 mg/kg p.c.	III
CL ₅₀ inalatório rato ¹	ácida	> 0,035 mg/L	I
	TIPA	> 0,07 mg/L	II
Irritação cutânea coelho ¹	ácida	Não irritante	IV
	TIPA	Não irritante	IV
Irritação ocular coelho	ácida	Irritante moderado	III
	TIPA	Irritante moderado	III
Sensibilização dérmica cobaia	ácida	Não é um sensibilizante dérmico	-
	TIPA	Sensibilizante dérmico	-

DL₅₀: dose letal a 50%; CL₅₀: concentração letal a 50%; p.c.: peso corporal; ¹durante 4 horas de exposição; Classes toxicológicas: I (extremamente tóxico), II (altamente tóxico), III (medianamente tóxico) e IV (pouco tóxico). Fonte: EPA, 1995.

1.4 Intoxicação por Agrotóxicos

Os agrotóxicos agrupam uma grande variedade de substâncias químicas ou biológicas, capazes de matar, combater, controlar os vetores de diversas doenças ou danificar um ser vivo, seja ele animal ou vegetal. Quando em contato, podem causar diversos efeitos sobre a saúde humana, sendo muitas vezes letais.

As circunstâncias envolvidas nas intoxicações humanas por agrotóxicos incluem a ocupacional, acidental, voluntária, ambiental e através da ingestão de alimentos. A intoxicação ocupacional aos agrotóxicos pode ocorrer durante as etapas da formulação, fabricação e aplicação dos produtos. Esta via é responsável por quase 26% dos casos de intoxicação por agrotóxicos de uso agrícola (SINITOX, 2005), devido à intensidade e frequência do contato com esses produtos, atingindo principalmente os profissionais dos setores da agricultura, saúde pública, transporte, comércio e indústria (Recena *et al.*, 2006).

Vários fatores podem ser determinantes na intoxicação da pessoa exposta:

- as características químicas e toxicológicas do produto;
- a concentração ambiental e/ou a dose de exposição do agente químico (principal fator de toxicidade em toda exposição profissional ou acidental);
- vias de absorção;
- grau de exposição (depende da quantidade de partículas de produto que ficam suspensas no ar e entram em contato com o trabalhador);
- tempo e frequência da exposição;
- suscetibilidade individual (condição intrínseca de o organismo reagir frente a uma agressão por um agente químico);
- exposição a um único produto ou a vários deles.

As intoxicações podem ser classificadas em agudas ou crônicas dependendo do tempo entre a exposição e a observação dos efeitos adversos. Nas intoxicações agudas os sintomas surgem rapidamente (poucas horas após a

exposição), geralmente decorrentes de exposição excessiva a produtos altamente tóxicos, durante um período curto. As características da intoxicação aguda podem ser descritas como (MS, 2006):

“INTOXICAÇÃO AGUDA: é uma alteração no estado de saúde de um indivíduo ou de um grupo de pessoas, que resulta da interação nociva de uma substância com o organismo vivo. Pode ocorrer de forma leve, moderada ou grave, a depender da quantidade de veneno absorvido, do tempo de absorção, da toxicidade do produto e do tempo decorrido entre a exposição e o atendimento médico. Manifesta-se através de um conjunto de sinais e sintomas, que se apresenta de forma súbita, alguns minutos ou algumas horas após a exposição excessiva de um indivíduo ou de um grupo de pessoas a um toxicante, entre eles os agrotóxicos. Tal exposição geralmente é única e ocorre num período de até 24 horas, acarretando efeitos rápidos sobre a saúde. Neste contexto o estabelecimento da associação causa/efeito encontra-se facilitada”.

Nas intoxicações crônicas, o aparecimento de sintomas é tardio (meses ou anos), decorrente de uma exposição baixa a produtos tóxicos por um longo período (MS, 2006). Na intoxicação crônica é relatado o aparecimento de dermatites de contato, problemas ligados à fertilidade, neurológicos, malformações congênitas e tumores (MS, 2006).

“INTOXICAÇÃO CRÔNICA: são alterações no estado de saúde de um indivíduo ou de um grupo de pessoas que também resultam da interação nociva de uma substância com o organismo vivo. Aqui, porém, os efeitos danosos sobre a saúde humana, incluindo a acumulação de danos genéticos, surgem no decorrer de repetidas exposições ao toxicante, que normalmente ocorrem durante longos períodos de tempo. Nestas condições os quadros clínicos são indefinidos, confusos e muitas vezes irreversíveis. Os diagnósticos são difíceis de serem estabelecidos e há uma maior dificuldade na associação causa/efeito, principalmente quando há exposição a múltiplos produtos”.

Um dos principais aspectos que dificultam a avaliação da exposição e dos efeitos sobre a saúde humana, diz respeito ao número de produtos agrotóxico em uso no país. Além disso, é importante destacar que chegam de outros países por fronteiras e caminhos não tradicionais, os chamados “agrotóxicos piratas”, produtos que nunca foram fiscalizados no Brasil, aumentando assim, os riscos das populações expostas (Stoppelli, 2005).

A Organização Mundial da Saúde (WHO, 1990) estimou a ocorrência de cerca de três milhões de casos de intoxicação aguda por ano causadas por agrotóxicos, com 220.000 mortes, sendo que 70% dos casos ocorrem em países em desenvolvimento. Este número pode ser ainda maior, uma vez que muitos casos de intoxicação são sub-notificados. A Organização Pan-Americana de Saúde (1997) estima que para cada caso registrado de intoxicação por agrotóxicos haveria outros 50 casos sem notificação ou com notificações errôneas (OPAS, 1997).

Bradberry *et al.* (2000) descreveram 66 casos de intoxicação por ingestão de herbicidas fenoxiácidos publicados na literatura entre 1962 e 1999, dos quais em um terço, os pacientes vieram a óbito. A maioria dos casos envolvia o 2,4-D. Os adjuvantes (surfactantes ou solventes) contidos nas formulações podem ter contribuído para alguns dos sinais clínicos observados, que incluíram vômito, dor abdominal, diarreia e hemorragia gastrointestinal. Em alguns casos foi notada a presença de hipotensão, causada pela perda de volume intravascular, além de vasodilatação e toxicidade miocárdica direta. Os efeitos neurotóxicos incluíram coma, hipertonia, alucinações, convulsões e paralisia. Os mecanismos de toxicidade deste composto não estão completamente entendidos, mas normalmente envolve danos na estrutura e função da membrana celular, desacoplamento da fosforilação oxidativa e interferência no metabolismo de acetilcoenzima A.

No Brasil, segundo os dados do Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas – SINITOX, coordenado pela Fundação Oswaldo Cruz, em 2005 foram registrados 84.456 casos de intoxicação humana em todo o território nacional (SINITOX, 2007). Os agrotóxicos de uso agrícola foram a 4ª maior causa de intoxicação (6,6%), ficando atrás apenas dos medicamentos (25,9%), dos escorpiões (9,7%) e domissanitários (7,7%). O percentual dos casos de intoxicação humana por agente tóxico no Brasil pode ser notada na Figura 6. Outro aspecto importante a ser ressaltado diz respeito aos casos de intoxicação não intencional (ocupacional) que ficaram em segundo lugar (8,1%), perdendo apenas para os casos de intoxicação intencional (tentativa de suicídio) (18,7%) (SINITOX, 2007).

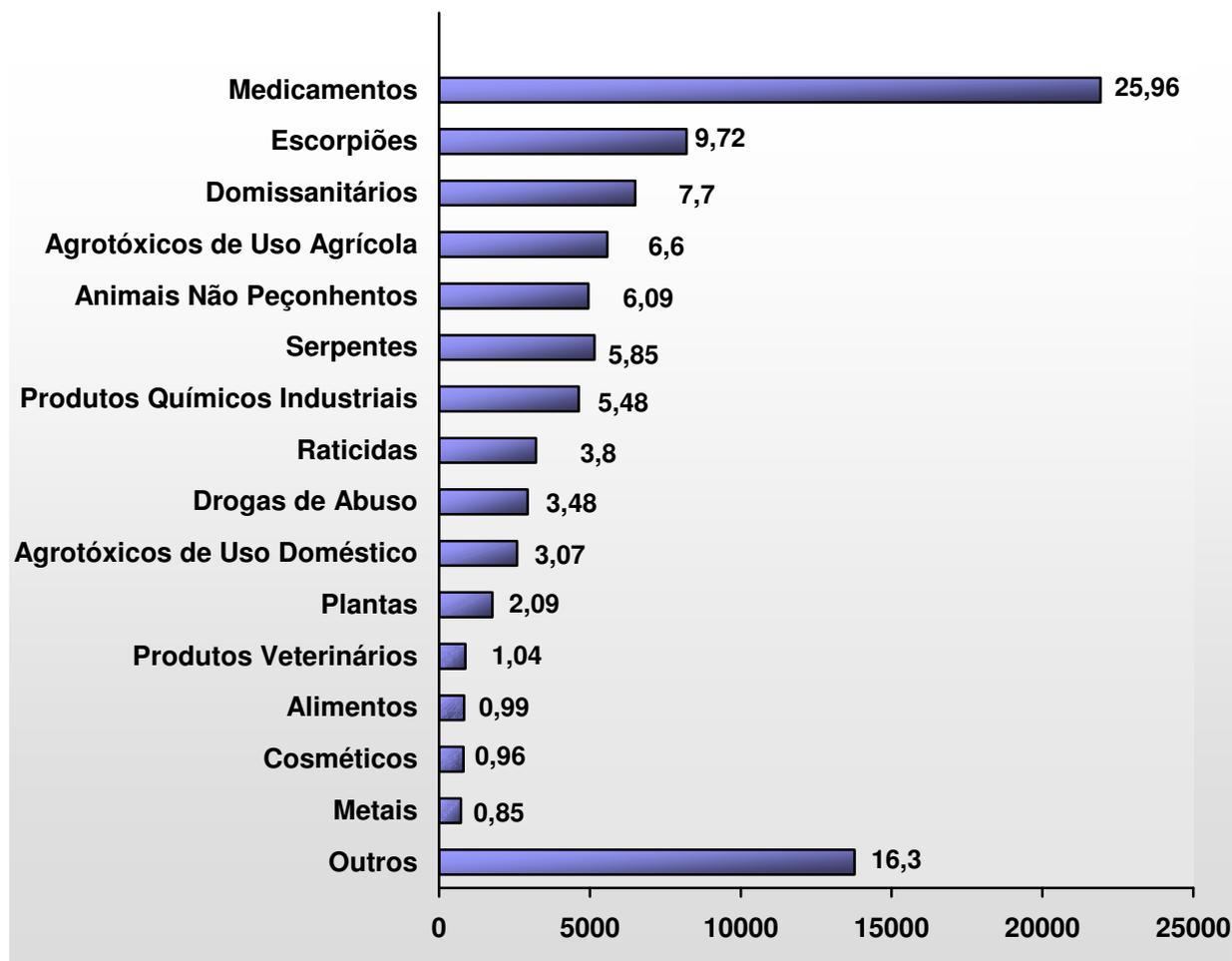


Figura 6 – Percentual dos casos de intoxicação humana registrados pelo SINITOX, por agente tóxico. Brasil: 2005. Fonte: FIOCRUZ / SINITOX, 2007.

Dos 84.456 casos de intoxicação registrados no SINITOX em 2005, 477 resultaram em óbito. Ao se analisar a ocorrência de óbitos entre a população intoxicada, podemos verificar que os agrotóxicos de uso agrícola ocuparam o 1º lugar, com 159 mortes (33,3%), seguido dos medicamentos (17,6%), raticidas (11,1%) e drogas de abuso (11,1%). É importante ressaltar que os números divulgados pelo SINITOX podem ser ainda mais expressivos e preocupantes se levarmos em consideração a sub-notificação.

Um estudo realizado no Mato Grosso do Sul (Recena *et al.*, 2006) demonstrou que entre os 880 casos de intoxicação ocupacional ocorrido durante o período de 1992 a 2002, os herbicidas foram responsáveis por 13,4% dos casos, associados ou não a outros agrotóxicos, sendo que o 2,4-D, glifosato e o picloram

foram os principais envolvidos. O 2,4-D + picloram foi relatado em 30 casos de intoxicação, ocasionando duas mortes, enquanto o picloram foi envolvido em apenas 4 casos, com uma morte.

Diferentes estudos realizados no Brasil têm demonstrado que fatores de ordem social, cultural e econômica, apresentam-se como determinantes da amplificação ou da redução da intoxicação por agrotóxicos na população rural. Estes fatores incluem o baixo índice de escolaridade dos agricultores, a falta de treinamento técnico para lidar com os produtos, a dificuldade de interpretação das orientações e figuras presentes nos rótulos e bulas e a não utilização, ou utilização inadequada, dos equipamentos de proteção (Oliveira-Silva *et al.*, 2001; Moreira *et al.*, 2002).

1.5 Testes para Avaliar a Toxicidade de Agrotóxicos

A intoxicação ocupacional com agrotóxicos pode ocorrer devido à presença de misturas complexas de substâncias químicas, impurezas, solventes e outros compostos presentes nas formulações, que podem ser tão ou mais tóxico que o próprio ingrediente ativo. Portanto, tanto a “toxicidade” (determinação do potencial que a substância tem para causar efeitos adversos a um organismo exposto a ela) como o “risco” (a probabilidade de ocorrer um efeito adverso em um organismo, sistema ou (sub)população causada pela exposição a uma substância química) de uma substância química precisam ser conhecidos previamente como margem de segurança para o trabalhador (De Raat, 1997; Domingues, 2004).

Segundo a Portaria nº 3/92, Anexo I, os testes toxicológicos que fazem parte dos requerimentos regulatórios para determinar os efeitos de uma substância química na saúde e no meio ambiente, devem ser conduzidos de acordo com as publicações internacionais, como o Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento da Comunidade Econômica Européia (OECD / CEE) (MS, 1992).

A OECD, organismo inter-governamental responsável por coordenar e padronizar políticas e discutir assuntos sociais e econômicos de interesse mútuo dos

países membros, trabalha auxiliando no manejo dos riscos provenientes das substâncias químicas (Kotaka e Zambrone, 2001). Dentre as atividades dessa Organização, estão a padronização dos dados solicitados para o registro dos agrotóxicos, através do desenvolvimento de protocolos de testes e/ou estudos (entre eles os testes físico-químicos e toxicológicos), que as indústrias devem apresentar para submeter o produto ao registro e o formato e conteúdo da revisão dos dados pelas agências governamentais (Kotaka e Zambrone, 2001).

Os protocolos dos testes toxicológicos (*OECD Guidelines for Testing of Chemicals*) (1999) fornecem detalhes suficientes para uma substância ser testada, como o modelo experimental mais indicado, o número e a idade dos animais, condições de alojamento e alimentação, concentrações e doses das substâncias a serem testadas, via de administração, além das observações a serem feitas dos efeitos causados. A importância desses métodos padronizados é que eles podem ser utilizados por laboratórios diferentes em todo o mundo, podendo dessa forma ser reproduzidos e comparados.

1.6 Teste de Irritação Ocular: um breve histórico

Por estarem expostos durante a manipulação de substâncias, os olhos representam via importante de intoxicação humana e são extremamente vulneráveis aos acidentes com substâncias químicas que podem causar conjuntivites severas, cegueira e até morte, dependendo do seu modo de ação (Wilhelmus, 2001).

Um evento ocorrido em 1933 em Ohio (USA), despertou as autoridades governamentais americanas para a necessidade de proteger a população contra os possíveis riscos dos produtos comerciais. Uma mulher ao tingir seus cílios e sobrancelhas com um produto de tintura (Lash-Lure®) contendo para-fenileno-diamina apresentou uma severa reação alérgica. Esse acontecimento foi amplamente divulgado e levou o governo americano a criar leis e regulamentos para proteger a saúde da população. O objetivo do governo, e mais tarde de outras nações como a Comunidade Européia, Canadá, Japão, era impedir ou minimizar a exposição acidental durante a fabricação, distribuição, uso e eliminação dos

produtos químicos que pudessem apresentar perigo para os olhos (Wilhelmus, 2001).

A partir deste fato, laboratórios americanos passaram a desenvolver metodologias para investigar os efeitos irritantes ou corrosivos de uma substância para os olhos antes que a mesma fosse comercializada. As alterações oculares clínicas e histopatológicas passaram a ser estudadas em animais, geralmente coelhos. Nos anos 40, Friedenwald *et al.* (1944) publicaram uma escala numérica para graduar a severidade da irritação na córnea de coelhos. Esse sistema possibilitou transformar as observações qualitativas macroscópicas das alterações oculares em valores numéricos, facilmente interpretados. Os valores individuais eram somados e totalizados em um escore final que representava a severidade da lesão ocular. Além disso, o sistema também permitiu que os pesquisadores correlacionassem a dose e resposta do agente irritante e comparar os efeitos de substâncias diferentes. O método foi adotado por outros pesquisadores e mais tarde foi refinado por John H. Draize e colaboradores (Wilhelmus, 2001; Scheiwiller, 2005).

Draize era pesquisador na Divisão de Farmacologia do Food and Drug Administration - FDA, e a sua principal função era desenvolver métodos para testar os efeitos colaterais de cosméticos. Convencido das vantagens do sistema numérico de Friedenwald para avaliar o efeito tóxico das substâncias na córnea, Draize e seus colaboradores aperfeiçoaram o sistema e passaram a utilizar o mesmo princípio para avaliar individualmente os efeitos na córnea, mucosa conjuntival e palpebral e íris. Embora Draize nunca tenha associado seu nome a alguma técnica, os procedimentos para avaliação de irritação ficaram conhecidos como “teste ocular de Draize”. O FDA passou então a utilizar a técnica para avaliar a segurança de substâncias como inseticidas, protetores solar, antissépticos e outras substâncias. Desde a sua publicação em 1944, o teste de irritação ocular utilizado nos dias de hoje passou por adaptações mas é baseado naquele teste originalmente desenvolvido por Draize (Wilhelmus, 2001; Scheiwiller, 2005). A Tabela 3 mostra a comparação entre o teste original de Draize e o Teste de Irritação/Corrosão Ocular da OECD (2002). Principalmente, observa-se a diminuição do número de animais e a preocupação com seu bem-estar.

Tabela 3 – Teste de irritação ocular de Draize e da OECD

Protocolo	Teste original de Draize ¹	Teste do OECD ²
Estratégias adotadas antes de iniciar o teste in vivo	Não adotado	Dados de experimentos em animais, pH, estudo em pele, métodos alternativos in vitro
Número de animais	9	Inicialmente 1 animal, se não corrosivo até 2 animais adicionais
Lavagem do olho	Alguns segundos após a exposição	Sem lavagem por 24 horas após a aplicação, exceto para sólidos e em caso de efeitos corrosivos ou irritantes imediatos
Uso de anestésico local	Não utilizado	Pode ser utilizado
Observações	24, 48 e 72 horas e 4 e 7 dias	1, 24, 48, e 72 horas e 7, 14 e 21 dias
Parâmetros avaliados	Córnea, íris e conjuntivas (hiperemia, edema e secreção)	Similar ao Draize, secreção não é graduada
Interpretação	Não determinada	Baseada na severidade das alterações e reversibilidade

¹Draize *et al.*, 1944; ²OECD 405, 2002

1.7 Teste de Draize

Justificado pela exigência da proteção pública, o teste de irritação/corrosão ocular transformou-se num método governamental endossado para avaliar a segurança dos produtos (OECD Guideline 405, 2002). O teste é preferencialmente realizado em até três coelhos albinos jovens. Consiste na aplicação de uma única dose de 0,1 g ou mL da substância a ser testada (sólida, líquida ou pasta) no saco conjuntival de um dos olhos dos animais e o outro olho é usado como controle. Substâncias com $\text{pH} \leq 2$ ou $\geq 11,5$ são geralmente excluídas. Um anestésico local pode ser utilizado para evitar dor ao animal e, em algumas condições, o olho tratado pode ser lavado após a aplicação da substância (Tabela 3). Ambos os olhos de cada animal são examinados em intervalos específicos e as

alterações oculares são graduadas de acordo com a escala proposta por Draize *et al.* (Tabela 4), comparando o olho tratado com o olho controle. A avaliação ocular é feita geralmente em 1, 24, 48 e 72 horas após a exposição, para avaliar a evolução das alterações na córnea, íris e conjuntivas palpebrais e bulbares. Se as alterações regredirem (desaparecerem) em até 72 horas o teste pode ser concluído, caso contrário os animais são examinados até as alterações regredirem, com exames semanais em 7, 14 e 21 dias após a exposição. Outros efeitos oculares ou reação sistêmica resultante da exposição também devem ser relatados. O método de escores envolve a avaliação de seis parâmetros observados no segmento anterior do olho, incluindo a densidade e área de opacidade na córnea, o grau de irite e a vermelhidão, edema e secreção nas conjuntivas (Wilhelmus, 2001; OECD 405, 2002).

Tabela 4 – Escala de graduação das reações oculares de Draize

Parâmetros	Descrição	Grau
Córnea		
A. Opacidade (grau de densidade: a leitura é feita na área mais densa)	Nenhuma ulceração ou opacidade	0
	Áreas espalhadas ou difusas de opacidade (diferente de leve diminuição do brilho normal); detalhes da íris claramente visíveis	1
	Áreas translúcidas, facilmente discerníveis, detalhes da íris levemente obscuros	2
	Áreas opalescentes, sem detalhes visíveis da íris, tamanho da pupila pouco discernível	3
	Córnea opaca, íris invisível	4
B. Área da córnea envolvida	Nenhuma área comprometida	0
	Um quarto (ou menos), mas não zero	1
	Maior que um quarto, mas menos da metade	2
	Maior que a metade, porém menos de três quartos	3
	Maior que três quartos até a área total	4
Íris		
	Normal	0
	Dobras acima do normal, congestão, edema, hiperemia pericorneana (alguma ou todas essas reações ou combinações delas), íris ainda reagindo à luz (reação lenta é positiva)	1
	Nenhuma reação à luz, hemorragia, grande destruição (alguma ou todas elas)	2
Conjuntivas		
A. Hiperemia (ou vermelhidão) (refere-se à conjuntiva palpebral e bulbar, excluindo a córnea e a íris)	Vasos normais	0
	Vasos injetados (hiperêmicos) acima do normal	1
	Hiperemia mais difusa, vermelho mais escuro, vasos individualmente não discerníveis	2
	Hiperemia vermelho vivo	3
B. Edema (refere-se à pálpebra e/ou membrana nictante)	Nenhum edema	0
	Edema acima do normal (incluindo membrana nictante)	1
	Edema evidente com everção parcial das pálpebras	2
	Edema com as pálpebras semifechadas	3
C. Secreção	Edema com as pálpebras completamente fechadas	4
	Nenhuma secreção	0
	Secreção em quantidade diferente da normal (não inclui quantidade normalmente observada nos cantos dos olhos)	1
	Secreção com umedecimento das pálpebras e pêlos adjacentes às pálpebras	2
	Secreção com umedecimento das pálpebras e considerável área ao redor dos olhos	3

Fonte: Draize, 1944

O artigo de Draize (1944) foi uma das publicações mais citadas em toxicologia durante o último quarto do século 20, com mais de uma citação em publicações periódicas por semana. Além disso, Draize recebeu muitas medalhas da *American Society of Cosmetic Chemists* pelo seu trabalho (Wilhelmus, 2001).

O desempenho do método de Draize, a sua reprodutibilidade e relevância, o uso e interpretação dos escores, seu custo monetário e ético são comumente questionados. O método de Draize foi desenvolvido para avaliar produtos que se espera entrar em contato com o olho, tais como preparações oftalmológicas e cosméticos. Para outras substâncias, tais como produtos usados em domicílios e produtos químicos industriais, a finalidade da avaliação é fornecer informações a respeito do risco quando o produto for exposto por via ocular e precauções de manuseio. Além disso, a dose fixa de substância a ser aplicada no olho (0,1 mL ou g) não é consistente com as exposições acidentais humanas. Quanto ao aspecto de reprodutibilidade, o grande número de variáveis envolvidas no teste de Draize (tipo de animal, a absorção do produto, o número de piscadas, lavagem dos olhos após a exposição, o local de aplicação no olho, o conhecimento dos níveis de severidade a ser graduado e classificação subjetiva do examinador) limita a sua reprodutibilidade, principalmente para substâncias moderadamente irritantes. Animais de mesma espécie e raça, por exemplo, podem responder de forma diferente quando expostos a uma mesma substância, e examinadores diferentes podem obter resultados diferentes de um mesmo teste (Wilhelmus, 2001; Scheiwiller, 2005).

Kaufman (1989) e Wilhelmus (2001) relatam que a anatomia e a bioquímica do olho do coelho é diferente do olho humano, logo o teste em olhos de coelhos pode não ser adequado para predizer os efeitos em olhos humanos. Kaufman descreve ainda que em sua experiência como oftalmologista no Centro de Trauma Ocular em Nova York (EUA), onde tem tratado as emergências de ferimentos nos olhos causados por substâncias tóxicas, nunca usou os dados de Draize no cuidado com um paciente e desconhece que algum outro oftalmologista tenha encontrado utilidade para os dados de Draize. O autor também aponta as diferenças significativas entre os olhos de coelhos e olhos humanos:

- A superfície epitelial do olho do coelho é 10 vezes mais permeável aos solutos hidrofílicos que o olho humano;
- A membrana de Bowman (a camada abaixo do epitélio) é seis vezes mais fina que a do olho humano;
- O limiar de dor do coelho é muito mais elevado do que aquele dos seres humanos, portanto as substâncias irritantes não são removidas tão rapidamente;
- Os coelhos têm um sistema lacrimogêneo menos eficiente do que os humanos;
- Os coelhos possuem membrana nictante (terceira pálpebra) que tem um papel importante na eliminação de materiais estranhos;
- Os seres humanos, diferente dos coelhos, desenvolvem vacúolos no epitélio da córnea em resposta à uma injúria tóxica;
- A espessura média da córnea do coelho é 0,37 mm, enquanto que no homem é 0,51 mm;
- Os coelhos são mais suscetíveis aos danos causados por materiais alcalinos, porque o pH de seu humor aquoso é 8,2, comparado a 7,1 a 7,3 para o homem;
- A córnea representa 25% da área de superfície do olho do coelho e somente 7% da área de superfície no homem.

O teste de Draize também apresenta limitações no que diz respeito a interpretação dos dados. Segundo Stucki G *et al.* (1996), os escores são números compostos de componentes multidimensionais, portanto escores numericamente iguais não implicam em severidade equivalente, e os escores numéricos diferentes não são comparáveis. Logo, avaliar a irritação por um único valor implica em uma medida exata artificial de uma resposta biológica.

Nas décadas de 60 e 70 os movimentos de proteção aos animais tornaram-se cada vez mais freqüentes, e a técnica de Draize passou a ser severamente criticada pelos bioeticistas e pesquisadores em termos de sua validade científica e de sua aceitabilidade ética, por causar extremo desconforto e dor aos animais envolvidos. Os protestos incentivaram as indústrias a buscar alternativas *in*

vitro ao método, e em alguns casos, a não utilizarem animais para teste (York e Steiling, 1998).

Embora seja o teste de toxicidade mais amplamente criticado e discutido pela sociedade científica, o teste de Draize ainda é o único teste de toxicidade ocular oficialmente aceito pelas agências regulatórias e utilizado como base para a classificação de produtos químicos. Os resultados de testes realizados mostraram que ainda não há nenhuma alternativa *in vitro* que poderia ser usada como uma completa substituição ao teste de Draize (Balls *et al.*, 1995; Brantom *et al.*, 1997; Huhtala, 2003; Daston, 2005). O principal fator que limita o uso dos testes *in vitro* é que geralmente eles são desenvolvidos para conhecer as alterações em uma ou poucas estruturas oculares, normalmente a córnea, enquanto através do teste de Draize podemos conhecer o potencial do produto para causar lesões praticamente no olho inteiro.

Enquanto nenhum método alternativo ainda foi validado ou aceito, a redução do número de animais e a utilização de alternativas para minimizar dor, estresse e desconforto aos animais tem sido uma estratégia adotada pelo OECD e incluída no protocolo do Teste de Irritação/Corrosão Ocular (OECD, 2002) para identificar os efeitos perigosos e a classificação de uma nova substância.

1.8 Estruturas do Olho

Os olhos são um par de órgãos complexos, altamente desenvolvidos e são os receptores da visão. São formados por três camadas: camada mais externa, a *túnica fibrosa*, constituída pela córnea e pela esclera branco-opaca (“branco” do olho); a camada média, ou *túnica vascular*, constituída pela coróide, corpo ciliar e íris e a camada mais interna, *túnica nervosa*, composta pela retina, que contém os receptores sensíveis à luz e complexas redes neuronais que codificam a informação visual e a envia ao cérebro através de impulsos transportados pelo nervo óptico (Junqueira, 2004). A Figura 7 mostra as estruturas do olho.

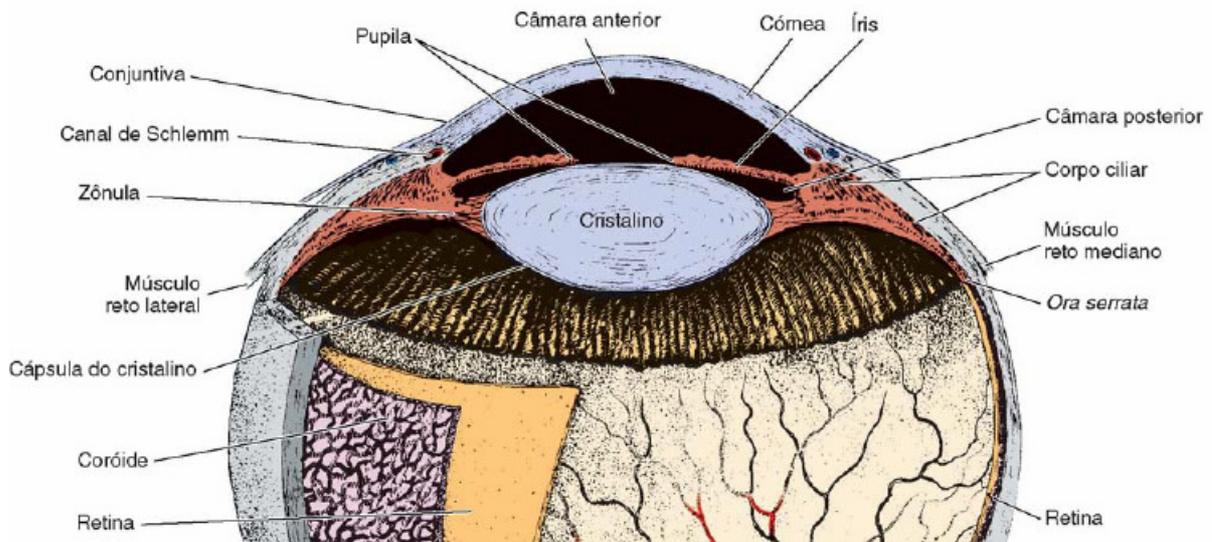


Figura 7 – Estruturas do olho. Fonte: Junqueira, 2004.

A córnea forma o pólo anterior transparente do olho e é uma estrutura extremamente importante por estar mais exposta e vulnerável aos acidentes. Seu raio de curvatura é ligeiramente menor que o do olho como um todo, o que provoca a sua projeção da superfície do bulbo. A Figura 8 mostra as camadas da córnea: epitélio, membrana de Bowman, estroma, membrana Descemet e o endotélio.

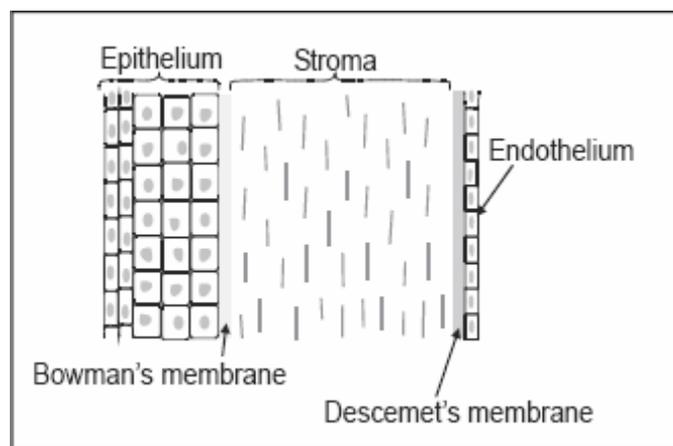


Figura 8 – Esquema da estrutura da córnea. Fonte: Huhtala *et al.*, 2003.

O epitélio da córnea é estratificado pavimentoso não queratinizado. A córnea é uma barreira mecânica e química importante, e sua função principal é

proteger os tecidos intra-oculares. Sua espessura varia com a espécie animal e é contínuo com o epitélio da conjuntiva que reveste a esclera adjacente. A superfície contém numerosas terminações nervosas, o que explica a grande sensibilidade da córnea, e são observadas habitualmente mitoses na camada basal do epitélio o que lhe confere uma capacidade de recuperação notável, com um tempo de renovação de aproximadamente 7 dias. Os microvilos presentes nas células epiteliais superficiais ajudam a reter uma película de lágrima sobre toda a superfície da córnea, evitando assim a sua ulceração. A córnea não apresenta vasos ou pigmentos. Durante uma resposta inflamatória que compromete a córnea, um número significativo de neutrófilos e linfócitos migra por entre as camadas do estroma (Junqueira, 2004).

Abaixo do epitélio e de sua membrana basal encontramos a membrana de Bowman, uma camada homogênea e relativamente espessa, constituída de delgadas fibras colágenas cruzadas em todas as direções. Sua função é oferecer resistência à infecção e outras lesões; contudo, uma vez lesada, ela não se regenera, formando uma cicatriz opaca, com prejuízo para a visão.

O estroma constitui cerca de 90% da espessura da córnea; é composto por feixes paralelos de fibras colágenas e fibroblastos e é responsável pela transparência da córnea. De uma camada para outra a direção das fibras colágenas muda, cruzando em variados ângulos, mantendo as camadas firmemente unidas.

A membrana Descemet é produzida pelas células endoteliais da córnea, que separa a substância própria do endotélio. De modo semelhante à membrana de Bowman, a membrana Descemet funciona como uma barreira contra a disseminação de infecções, mas, ao contrário da primeira, ela regenera-se facilmente após uma lesão.

O endotélio da córnea é do tipo pavimentoso simples. Esta camada é contínua com a face anterior da íris. Suas células são unidas por uma *zonula occludens* e funcionam no transporte de água para fora da córnea e na difusão de nutrientes do humor aquoso para a córnea avascular. Para que a córnea permaneça transparente é necessário que o líquido tecidual seja constantemente removido do

estroma. Uma lesão a essa camada, que geralmente não se regenera, pode produzir edema e turvamento (opacidade) local da córnea.

Uma segunda estrutura importante é a íris. A íris tem a forma de um disco delgado, com uma abertura central, a pupila. Ela situa-se entre a córnea e o cristalino e sofre mudanças no seu tamanho em resposta à intensidade de luz. A face anterior da íris é constituída de epitélio pavimentoso simples, uma continuação do endotélio da córnea pouco vascularizado, com poucas fibras e grande quantidade de fibroblastos e células pigmentares, e ainda uma camada rica em vasos sanguíneos, imerso num tecido conjuntivo frouxo. Na sua superfície posterior é recoberta por melanina, que tem como função principal impedir a entrada de raios luminosos, exceto os que vão formar a imagem na retina. Uma vez inflamada, a íris pode perder a sua habilidade de reagir à luz, prejudicando assim a capacidade de visão.

Outra estrutura importante do ponto de vista toxicológico são as conjuntivas que, juntamente com as pálpebras e glândulas lacrimais, fazem parte das estruturas acessórias do olho. A conjuntiva é uma membrana mucosa delicada e transparente que reveste a superfície lateral da córnea (conjuntiva bulbar) e a superfície interna das pálpebras (conjuntiva palpebral). É constituída por epitélio cilíndrico estratificado que contém grande número de células caliciformes e repousa sobre uma lâmina própria formada por tecido conjuntivo frouxo (Junqueira, 2004). A conjuntiva é altamente vascularizada e pode tornar-se inflamada após a exposição a um agente irritante.

2 OBJETIVO

Conhecer as alterações macroscópicas (clínicas) e microscópicas na superfície do olho de coelhos, após a aplicação de formulações de agrotóxicos contendo o ingrediente ativo ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), utilizando o teste de irritação ocular.

Para alcançar objetivo geral foi necessário:

- Realizar pré-testes para selecionar as formulações de 2,4-D a serem utilizadas no teste final;
- Graduar as alterações macroscópicas (clínicas) nos intervalos de 1, 24, 48 e 72 horas, e 7, 14 e 21 dias após o tratamento;
- Conhecer as alterações histopatológicas na superfície ocular, após a graduação das alterações macroscópicas em cada intervalo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A fase experimental deste estudo foi realizada na BIOAGRI Laboratórios, Planaltina, Distrito Federal. A BIOAGRI é um grupo privado que conduz testes toxicológicos em animais de laboratório com a finalidade de registro dos agrotóxicos junto à ANVISA, bem como em outros países. O Laboratório é credenciado pelo INMETRO em Boas Práticas de Laboratórios (BPL), habilitado pela ANVISA, além de ser reconhecido pelo Governo da Holanda através do *Endorsement of Compliance with the OECD Principles of Good Laboratory Practice*.

O biotério onde foi conduzido o experimento, bem como os equipamentos utilizados seguiram os padrões internacionais para pesquisa com animais.

Este estudo é do tipo experimental randomizado, no qual os animais foram alocados aleatoriamente para os grupos e os efeitos decorrentes do tratamento foram avaliados em condições controladas de observação.

Os procedimentos descritos a seguir foram embasados no protocolo da OECD 405 (2002), no qual utiliza o teste de Draize para conhecer os efeitos oculares decorrentes da exposição de uma substância química.

3.1 Animal de teste

Foram utilizados 84 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), albinos da linhagem Nova Zelândia, machos e fêmeas, fornecidos pela Granja Monte Sião, São Roque/SP. Uma vez recebidos do fornecedor, os animais permaneceram em quarentena durante 20 dias. O coelho albino é o modelo mais comumente utilizado em estudos de irritação ocular devido à ausência de pigmentos na mucosa ocular e por apresentar uma ampla e acessível área ocular, permitindo assim que os efeitos resultantes possam ser facilmente observados. Os animais eram jovens adultos, pesando entre 3,0 a 4,0 kg. Os animais foram selecionados dentre uma população de animais saudáveis, e então alocados aleatoriamente para os grupos de tratamento. As fêmeas eram nulíparas e não gestantes.

3.2 Aclimação

Os animais foram aclimatados nas condições do biotério por um período de 5 dias.

3.3 Identificação

Cada animal foi identificado com um brinco de plástico na orelha esquerda. Cada gaiola foi identificada com um cartão no qual informava o número do produto testado, o grupo e o número do animal.

3.4 Alojamento e alimentação

Durante o experimento, os animais foram alojados individualmente em gaiolas de aço galvanizado, com dimensões de 40 x 40 x 40 cm. A cama era de maravalha de madeira autoclavada, colocada em uma bandeja debaixo das gaiolas para coletar os excrementos, e foi substituída diariamente.

Os animais foram alimentados diariamente com ração comercial para coelhos (Linha Natural, Agribands Purina do Brasil Ltda., Inhumas/GO), peletizada e autoclavada e água filtrada à vontade fornecida em garrafas plásticas.

3.5 Condições ambientais

A temperatura e a umidade relativa nas salas do biotério foram mantidas na faixa de 17 a 22°C e 30 a 70%, respectivamente. Um equipamento de controle ambiental foi monitorado e ajustado para minimizar as flutuações das condições ambientais. Um sistema de iluminação com controle de tempo manteve um ciclo de 12 horas claro e 12 horas escuro nas salas e a ventilação foi ajustada para produzir 10 a 15 trocas de ar por sala por hora. Todo esforço foi feito para minimizar a produção de barulho durante as atividades dentro das salas.

As instalações, as condições ambientais, o manejo e os cuidados com os animais seguiram os padrões recomendados pelo *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (ILAR, 1996).

3.6 Bem-estar animal

Este experimento foi realizado em conformidade com as normas para a prática didático-científica da vivisseção de animais (Lei nº 6.638, de 08 de maio de 1979) e com os princípios éticos recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1991). O projeto foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal da Universidade de Brasília.

3.7 Preparo do produto

Antes de serem utilizados nos animais, cada produto teve o seu pH medido e todos eles encontravam-se dentro do limite recomendado: $> 2,0$ a $< 11,5$.

Os produtos foram manipulados e pesados no dia da aplicação. As formulações em estado de pó foram previamente peneiradas para que não houvesse interferência mecânica do produto no olho dos animais, enquanto os produtos líquidos foram utilizados na sua forma original.

3.8 Exame preliminar

Cerca de 24 horas antes da aplicação do produto, os olhos dos animais foram cuidadosamente examinados com o uso de uma lanterna para verificar a presença de alguma lesão. Após o exame externo, a sala foi escurecida e a superfície da córnea foi observada utilizando um colírio de fluoresceína sódica e uma lupa com Lâmpada de Wood para detectar anormalidades que não são observadas ao exame externo (Figura 9). A Lâmpada de Wood possui uma luz ultravioleta e quando lesões na córnea estão presentes as áreas afetadas aparecem como um brilho fluorescente verde-amarelado.



Figura 9 – Exame oftálmico preliminar, mostrando o uso do colírio de fluoresceína e a lupa com Lâmpada de Wood.

3.9 Dose e aplicação do produto

Uma única dose de 0,1 mL ou g do produto foi aplicada diretamente no saco conjuntival do olho esquerdo de cada animal, após as pálpebras serem suavemente afastadas do globo ocular. Seguindo a aplicação, as pálpebras foram mantidas unidas por alguns segundos, para evitar a perda do produto. O olho direito não tratado foi utilizado como controle.

3.10 Graduação das reações oculares

As alterações na córnea, íris e conjuntivas foram graduadas de acordo com a escala de Draize apresentada na Tabela 4 (página 25) e registradas em formulários apropriados. Após cada graduação, a superfície da córnea de ambos os olhos foi examinada usando o corante de fluoresceína e a lupa com luz ultravioleta. O corante de fluoresceína é uma substância inócua e bastante eficaz no diagnóstico de alterações na superfície da córnea que não podem ser vistas a olho nu (Puy *et al.*, 1998). Todos os exames foram realizados pelo mesmo observador.

3.11 Eutanásia

Após os exames oculares em cada intervalo específico, o grupo de 3 animais destinado àquele intervalo foi submetido à eutanásia por uma injeção intravenosa de 0,3 mL/kg de T-61® na orelha esquerda. O T-61® constitui a associação de três drogas – embutamida, mebezônio e tetracaína. O método de eutanásia escolhido foi baseado nas recomendações do *American Veterinary Medical Association Panel on Euthanasia* (AVMA, 2001).

Foram submetidos à eutanásia, antes do momento previsto, os coelhos que apresentaram rompimento da córnea.

3.12 Disposição final

A carcaça dos animais, bem como todo material infectante, foi devidamente acondicionada em sacos para resíduos biológicos, devidamente identificados, e recolhidos pela empresa que presta serviço de incineração à Bioagri.

3.13 Pré-teste

Inicialmente, foram realizados 8 pré-testes com o intuito de conhecer o potencial de irritação dos produtos na córnea dos animais. Cada pré-teste foi conduzido com uma formulação diferente contendo o 2,4-D, e entre elas apenas duas possuíam registro na ANVISA (Tordon® e DMA 806 BR®). As outras seis formulações estavam em teste na Bioagri para o processo de registro. Em nenhum dos casos tivemos acesso às informações da composição das formulações, outra que a concentração dos ingredientes ativos.

Em cada pré-teste foram utilizados 4 animais e a avaliação das alterações oculares foi feita nos intervalos de 1, 24, 48 e 72 horas após o tratamento. O manejo dos animais e os procedimentos adotados foram mantidos no pré-teste e no teste final.

Quatro produtos foram selecionados para o teste final. A escolha dos produtos foi baseada na produção de alterações discretas a acentuadas na córnea,

de forma que as mesmas pudessem ser avaliadas durante o tempo máximo do teste de irritação ocular (21 dias). Entre os produtos selecionados dois deles causaram alterações na córnea discretas e moderadas e os outros dois alterações na maioria moderadas e acentuadas. Os produtos Tordon® e DMA 806 BR® não foram utilizados no teste final devido à extrema severidade das alterações produzidas na córnea nas primeiras horas após o tratamento.

3.14 Teste final

3.14.1 Características dos produtos de teste

Dentre os 4 produtos formulados selecionados, dois produtos (1 e 2) continham os princípios ativos 2,4-D + picloram e dois (3 e 4) apenas o princípio ativo 2,4-D. O Quadro 2 apresenta as características dos produtos.

Quadro 2 – Características dos produtos utilizados

Produtos	Ingrediente ativo	Concentração	Aspecto físico	pH
1	2,4-D picloram	150 g/L 15 g/L	Líquido	6,9
2	2,4-D picloram	447 g/L TIPA / 240 g/L ácido ^a 114 g/L TIPA / 64 g/L ácido ^a	Líquido	6,3
3	2,4-D	min. 960 g/kg	Pó	3,1
4	2,4-D	806 g/L DMA / 670 g/L ácido ^a	Líquido	9,5

^aconcentração do produto na forma de sal expressa na forma ácida; TIPA=sal de triisopropanolamina; DMA=sal de dimetilamina

3.14.2 Uso de anestésico local

O olho de teste e o olho controle dos animais tratados com os produtos 3 e 4 (que apresentaram alterações oculares moderadas e acentuadas no pré-teste) foram anestesiados com o anestésico local Anestalcon® (Cloridrato de

Proximetacaína 0,5%) logo antes da aplicação do produto, com o intuito de evitar ou minimizar alguma reação dolorosa.

3.14.3 Número de animais e intervalo de observação

Para cada produto selecionado foram testados 21 animais, distribuídos em 7 grupos, com 3 animais por grupo, distribuídos conforme a Tabela 5.

Tabela 5 – Distribuição dos animais conforme os grupos de tratamento, intervalo de observação e eutanásia

Grupo	Nº de animais	Exames após a aplicação	Eutanásia
1	3	1 hora	Após o exame de 1 hora
2	3	1 e 24 horas	Após o exame de 24 horas
3	3	1, 24 e 48 horas	Após o exame de 48 horas
4	3	1, 24, 48 e 72 horas	Após o exame de 72 horas
5	3	1, 24, 48, 72 horas e 7 dias	Após o exame de 7 dias
6	3	1, 24, 48, 72 horas e 7 e 14 dias	Após o exame de 14 dias
7	3	1, 24, 48, 72 horas e 7, 14 e 21 dias	Após o exame de 21 dias

Os 84 animais utilizados no estudo foram numerados seqüencialmente a partir do produto 1. Os olhos dos animais foram examinados conforme a distribuição apresentada na Tabela 6.

Tabela 6 – Distribuição dos animais nos intervalos de observação de cada produto

	1h	24h	48h	72h	7d	14d	21d
Produto	Animais						
1	1 a 21	4 a 21	7 a 21	10 a 21	13 a 21	16 a 21	19 a 21
2	22 a 42	25 a 42	28 a 42	31 a 42	34 a 42	37 a 42	40 a 42
3	43 a 63	46 a 63	49 a 63	52 a 63	55 a 63	58 a 63	61 a 63
4	64 a 84	67 a 84	70 a 84	73 a 84	76 a 84	79 a 84	82 a 84

h=hora; d=dia

3.14.4 Inspeção clínica

Além da graduação das alterações oculares, os animais foram inspecionados diariamente quanto ao estado de saúde geral e mortalidade.

3.14.5 Interpretação dos achados macroscópicos

Com o intuito de facilitar a compreensão e a interpretação dos resultados macroscópicos, o grau de alteração obtido nas observações segundo a Escala de Graduação das Reações Oculares de Draize (Tabela 4) foi classificado em grau de intensidade da alteração no olho (Tabelas 7 a 9). O grau 3 de opacidade na córnea (segundo a escala de Draize) foi considerado “moderado” quando a maioria dos animais observados naquele intervalo apresentou o grau de opacidade 2, ou considerado “acentuado” quando a maioria dos animais apresentou o grau 4 de opacidade na córnea.

O exame utilizando a fluoresceína foi considerado positivo (+) quando houve alguma retenção do corante (fluorescência) na superfície da córnea, e negativo (-) quando nenhuma fluorescência foi observada.

A vascularização na superfície da córnea também foi classificada em discreta, moderada e acentuada, de acordo com a área vascularizada observada na córnea (Tabela 10).

Tabela 7 – Classificação da intensidade das alterações na córnea

Grau	Intensidade da alteração
0* a 1	discreta
2 a 3**	moderada
3*** a 4	acentuada

* leve diminuição do brilho normal; ** predominância de alterações moderadas;

*** predominância de alterações acentuadas

Tabela 8 – Classificação da intensidade das alterações na íris

Grau	Intensidade da alteração
1	discreta
2	acentuada

Tabela 9 – Classificação da intensidade das alterações nas conjuntivas

Hiperemia	Edema	Intensidade da alteração
Grau		
1	1	discreta
2	2	moderada
3	3 a 4	acentuada

Tabela 10 – Classificação da intensidade de vascularização na córnea

Área da córnea afetada	Intensidade
< 1/4	discreta
de 1/4 a 1/2	moderada
> 1/2	acentuada

3.14.6 Preparo das lâminas histológicas

Após serem submetidos à eutanásia, o globo ocular, as pálpebras (superior e inferior) e a membrana nictante (terceira pálpebra) do olho tratado e controle de cada animal foram coletados. As lâminas foram preparadas da seguinte forma:

Fixação: os tecidos foram fixados em solução de formalina tamponada 10% por um período mínimo de 24 horas;

Recorte: após a fixação, o globo ocular foi seccionado longitudinalmente e retirado o cristalino. A área mais afetada da córnea e da parte central das pálpebras e membrana nictante foram colocadas nos cassetes;

Inclusão: os cassetes foram mergulhados em banho de parafina fundida, e, após o resfriamento, eles foram mantidos congelados;

Corte: os blocos rígidos foram levados para um micrótomo e cortados por uma lâmina de aço, de modo a fornecer cortes de aproximadamente 5-6 μ m de espessura. Em seguida, os cortes foram colocados na superfície da lâmina;

Coloração: as lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) e então avaliados em microscópio óptico, com aumento de 40 e 100 vezes.

3.14.7 Exame histopatológico

O exame histopatológico foi realizado pelo patologista veterinário Dr. Nelson Izquierdo Pérez, consultor da Bioagri. As estruturas examinadas foram córnea, íris, conjuntivas (bulbar e palpebral) e membrana nictante do olho tratado e controle. Quando presente, o processo inflamatório foi classificado como discreto, moderado e acentuado de acordo com a quantidade de células neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) presentes. O processo inflamatório foi considerado discreto quando poucas células foram visualizadas; moderado, quando uma quantidade aumentada de células era facilmente visível, e acentuado, quando havia excessiva quantidade de células inflamatórias, envolvendo uma extensa área. Outros achados microscópicos também foram descritos.

4 RESULTADOS

4.1 Descrição das alterações macroscópicas (clínicas)

Conforme descrito na metodologia, foram avaliadas as seguintes estruturas dos olhos dos animais tratados: córnea (grau e área de opacidade), íris (irite) e conjuntivas (hiperemia, edema e secreção). O corante de fluoresceína não revelou qualquer alteração na superfície da córnea antes da aplicação do produto. Durante o estudo, alguns animais apresentaram nas conjuntivas secreção com aspecto muco-purulento, sugerindo um processo causado por agentes infecciosos. Devido à impossibilidade de avaliar se a secreção estava relacionada ao tratamento, este parâmetro foi desconsiderado do estudo. Embora a área de opacidade na córnea tenha sido graduada conforme o teste de Draize original, a mesma não foi reportada. A relevância da graduação da área de opacidade e presença de secreção para a classificação toxicológica de um produto será discutida posteriormente.

4.1.2 Pré-teste

A Tabela 11 mostra a intensidade das alterações na córnea dos animais dos pré-testes, realizados com as formulações que foram selecionadas para o teste final. Os dados brutos desses pré-testes, contendo a graduação segundo Draize, estão apresentados no Anexo I (Tabelas 1 a 16).

Nos pré-testes realizados com os produtos 1 e 2 foram observadas alterações discretas e moderadas na córnea dos animais, que incluíram desde uma leve diminuição do brilho normal a áreas translúcidas de opacidade, com detalhes da íris levemente obscuros.

Nos pré-testes conduzidos com os produtos 3 e 4 prevaleceram alterações moderadas e acentuadas, com áreas de opacidade mais densas que dificultavam a visualização da íris.

Tabela 11 – Alterações clínicas na córnea dos animais dos pré-testes, 1 a 72 horas após a aplicação dos produtos

Produtos	Intensidade da alteração (# animais)				
	1h, n=4	24h, n=3	48h, n=2	72h, n=1	
1	discreta (4)	discreta (3)	discreta (2)	discreta (1)	
2	discreta (4)	discreta (3)	moderada (2)	moderada (1)	
3	discreta (1)	moderada (3)	moderada (1)	acentuada (2)	moderada (1)
4	acentuada (4)	acentuada (3)	acentuada (2)	moderada (1)	

h=hora; Escores 0* a 1: discreta; 2 a 3: moderada; 3 a 4: acentuada (Tabela 7)

4.1.3 Teste final

Os resultados macroscópicos observados no olho dos animais durante o teste final estão apresentados nas Figuras 10, 11, 12 e 13. Os dados brutos gerados estão mostrados no Anexo II (Tabelas 1 a 28). A Figura 15 mostra as alterações no olho dos animais após o tratamento com os produtos 1, 2, 3 e 4.

Produto 1

A Figura 10 mostra o percentual de ocorrência das alterações produzidas pelo produto 1 (150 g/L 2,4-D + 15 g/L picloram) no olho dos animais. A aplicação do produto 1 causou em 1 hora alterações discretas na córnea (desde uma leve diminuição do brilho normal a opacidade). Nenhuma alteração foi visualizada na íris. Nas conjuntivas, predominou hiperemia e edema discretos.

Entre 24 e 72 horas foi observada na córnea a presença de alterações discretas a acentuadas, com predominância de discretas em 24 horas (94,4%) e moderadas em 48 e 72 horas (80 e 91,7%, respectivamente). A maioria dos animais não apresentaram alterações na íris. Nas conjuntivas, observou-se a predominância de hiperemia moderada durante o período.

A avaliação no 7º dia mostrou que 3 dos 9 animais examinados não apresentaram alterações na córnea, enquanto os outros apresentaram alterações discretas a acentuadas, com predominância de alterações discretas (33,4%). Não foram visualizadas alterações na íris. A maioria dos animais não apresentaram alterações nas conjuntivas.

Aos 14 dias, um animal (16) apresentou alterações acentuadas na córnea, que impediram graduar as lesões na córnea e íris. Nos demais animais, a ausência de alterações foi predominante na córnea, íris e conjuntivas (66,6, 83,3 e 83,3%, respectivamente). Nenhuma alteração na córnea, íris ou conjuntivas foram observadas nos animais aos 21 dias. Os exames com o corante de fluoresceína foram positivos (presença de áreas fluorescentes) em todas as observações que foram constatadas alterações clínicas na córnea (Tabelas 1 a 7, do Anexo II).

Além das alterações de irritação, outros efeitos relacionados ao tratamento também foram notados nos dias 7 e 14, tais como alopecia periocular (perda de pêlo ao redor do olho tratado), neovascularização na córnea (proliferação de vasos sanguíneos na superfície do olho tratado, em resposta à reparação do processo inflamatório) e ulceração (Tabela 12).

Tabela 12 – Outras alterações clínicas observadas nos animais tratados com o Produto 1

Alterações observadas	7d	14d
	Nº animal	
Alopecia periocular	15, 17	17
Discreta neovascularização	17	-
Moderada neovascularização	19	17
Acentuada neovascularização	-	16
Área esbranquiçada e elevada no centro da córnea, sugestiva de ulceração	-	16

d=dia

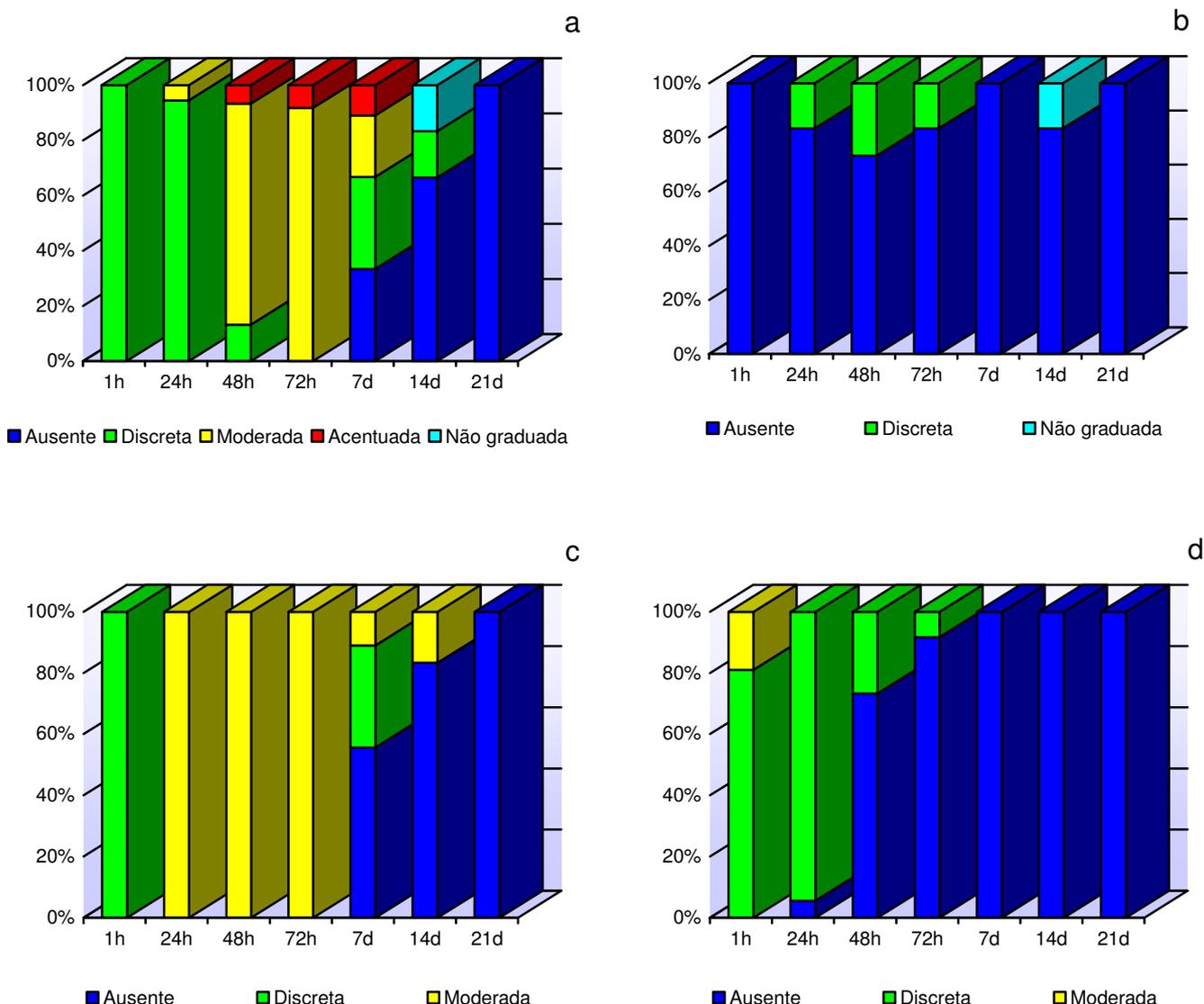


Figura 10 – Percentual de ocorrência das alterações na córnea (a), íris (b) e conjuntivas (hiperemia (c) e edema (d)) nos animais tratados com o Produto 1. Não graduada: não foi possível graduar devido à severidade das alterações na córnea.

Produto 2

Na Figura 11 estão apresentadas as percentagens de ocorrência das alterações oculares causadas pelo produto 2 (240 g/L 2,4-D + 64 g/L picloram). Após 1 hora da aplicação observou-se a presença de alterações discretas na córnea (desde uma leve diminuição do brilho normal a opacidade), discretas a moderadas nas conjuntivas, predominando as discretas, e ausência de alterações na íris.

Em 24 horas, os animais apresentaram na córnea alterações discretas e moderadas, com predominância de alterações discretas (61,1%). Nas conjuntivas, observou-se a predominância de hiperemia moderada (83,3%) e edema discreto (100%). Nas leituras de 48 e 72 horas, os animais apresentaram alterações predominantemente moderadas na córnea e conjuntivas (hiperemia). Ausência de alterações na íris foi predominante em 24, 48 e 72 horas (61,1, 66,7 e 91,7%, respectivamente).

Nas leituras em 7, 14 e 21 dias, foi notada a predominância de ausência de alterações na córnea, íris e conjuntivas. Os exames realizados com a fluoresceína foram positivos quando alterações na córnea estiveram presentes (Tabelas 8 a 14, do Anexo II).

Outros efeitos relacionados ao tratamento com o produto 2 estão apresentados na Tabela 13. Seguindo a aplicação do produto alguns animais vocalizaram (emissão de som em resposta a uma sensação dolorosa), além de apresentar alopecia periocular e neovascularização na superfície da córnea.

Tabela 13 – Outras alterações clínicas observadas nos animais tratados com o Produto 2

Alterações observadas	1h	7d
	Nº animal	
Vocalização	28, 30	-
Alopecia periocular	-	40
Discreta neovascularização	-	34,35
Moderada neovascularização	-	37

h=hora; d=dia

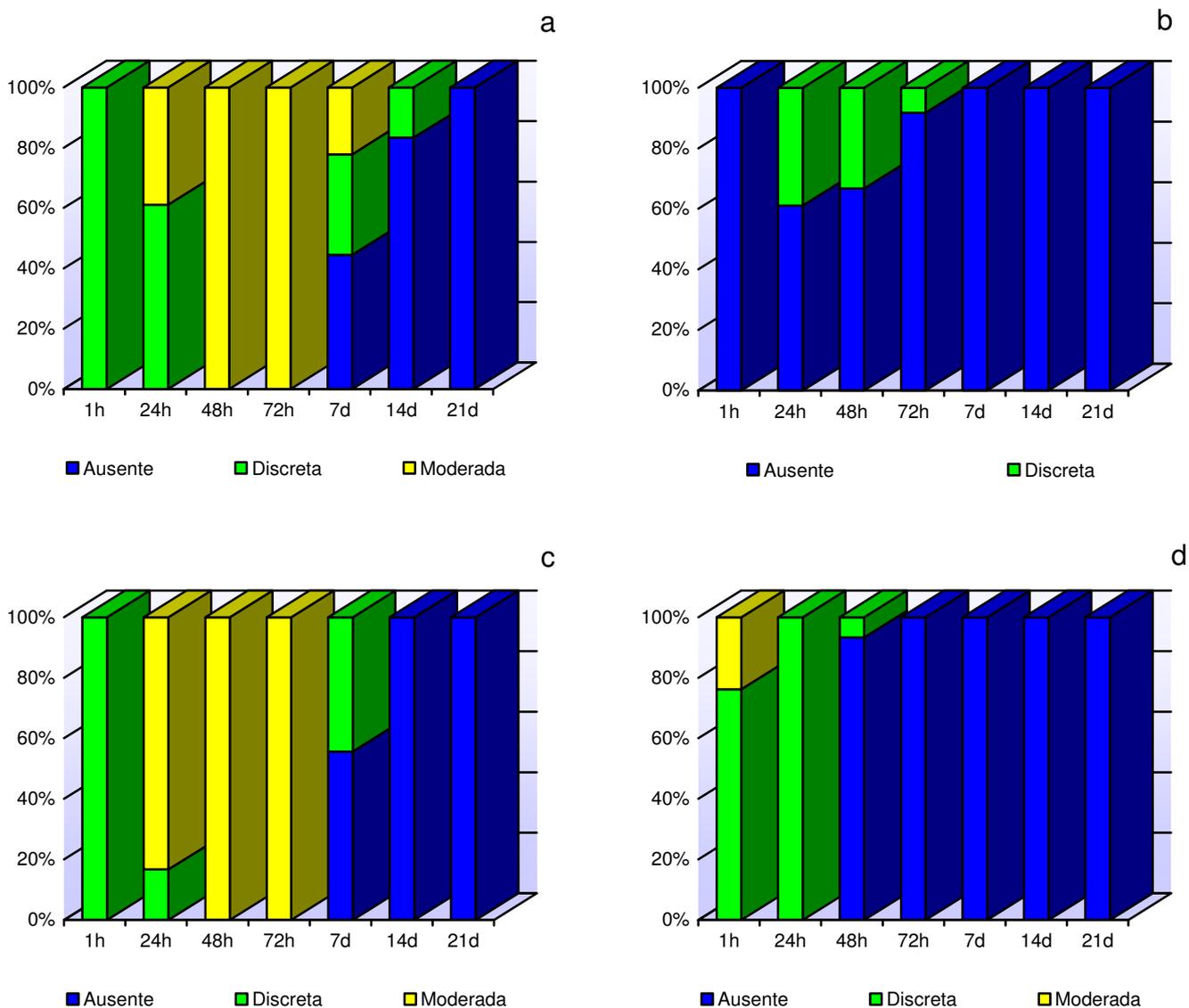


Figura 11 – Percentual de ocorrência das alterações na córnea (a), íris (b) e conjuntivas (hiperemia (c) e edema (d)) nos animais tratados com o Produto 2.

Produto 3

A Figura 12 mostra a percentagem de ocorrência das alterações oculares causadas pelo produto 3 (960 g/kg 2,4-D). Após 1 hora da aplicação, foram observadas alterações discretas a acentuadas na córnea, com predominância de alterações moderadas (42,9%), ausência de alterações na íris e predominância de alterações discretas nas conjuntivas.

Em 24 horas, a maioria dos animais apresentou alterações acentuadas na córnea e predominância de ausência de alterações na íris (ambos com 61,1%). Nas conjuntivas houve predominância de hiperemia moderada (66,7%) e edema discreto (83,3%).

Nas leituras em 48 e 72 horas observou-se na córnea a predominância de alterações moderadas (60 e 83,4%, respectivamente). Na íris, 60% dos animais tiveram alterações discretas em 48 horas e 50% em 72 horas. A maioria dos animais apresentaram alterações moderadas para hiperemia.

Ao 7º dia após o tratamento, 2 de 9 dos animais observados não apresentaram alterações na córnea, enquanto os demais apresentaram alterações discretas e acentuadas, com predominância de alterações acentuadas (66,7%). Na íris, 77,8% dos animais não apresentaram alterações. Nas conjuntivas, observou-se hiperemia discreta, moderada e acentuada (44,4, 44,4, 11,2%, respectivamente).

Na leitura ao 14º dia, a maioria dos animais (66,6%) não tiveram alterações na córnea. Nenhuma alteração foi notada na íris. A maioria dos animais não tiveram alterações nas conjuntivas.

No 21º dia, apenas 1 de 3 dos animais apresentou alterações discretas na córnea. Nenhuma alteração na córnea, íris e conjuntivas foi notada nos outros animais. Os exames realizados com o corante de fluoresceína foram positivos sempre que alterações na córnea foram notadas, entretanto o exame foi positivo em um animal (63) que apresentou grau 0 de opacidade em 7 dias (Tabelas 15 a 21, do Anexo II).

Seguindo a aplicação do produto 3 alguns animais apresentarem neovascularização na superfície da córnea. Detalhes podem ser vistos na Tabela 14.

Tabela 14 – Outras alterações clínicas observadas nos animais tratados com o Produto 3

Alterações observadas	7d	14d	21d
	Nº animal		
Discreta neovascularização	-	60	-
Moderada neovascularização	55,56, 57,58	58	-
Acentuada neovascularização	60,61	61	61

d=dia

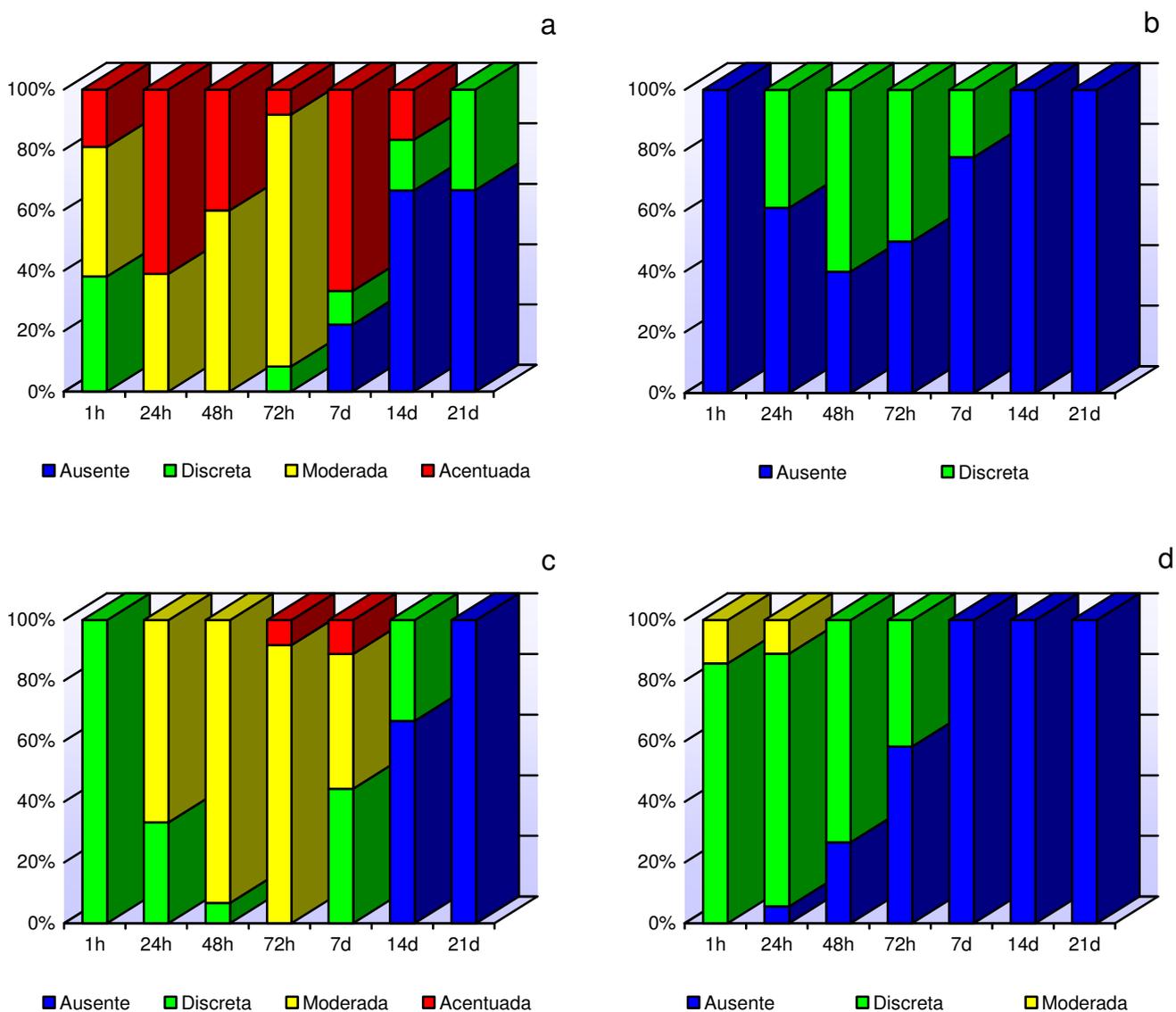


Figura 12 – Percentual de ocorrência das alterações na córnea (a), íris (b) e conjuntivas (hiperemia (c) e edema (d)) nos animais tratados com o Produto 3.

Produto 4

As percentagens de ocorrência das alterações oculares causadas pelo produto 4 (670 g/L 2,4-D) estão apresentadas na Figura 13. Após 1 hora da aplicação do produto, foram observados alterações moderadas e acentuadas na córnea, com predominância de alterações moderadas (95,2%) e discretas e moderadas nas conjuntivas, predominando as alterações discretas. Nenhuma alteração foi notada na íris.

Nas leituras entre 24 e 72 horas, observou-se a predominância de alterações moderadas na córnea (100, 93,3 e 75%, respectivamente), de alterações discretas na íris (100, 100 e 91,7%, respectivamente) e hiperemia moderada (100, 80 e 91,7%, respectivamente) e edema discreto (77,8, 53,4 e 66,7%, respectivamente).

Na avaliação ao 7^o dia a córnea apresentou alterações discretas e acentuadas, com predominância de alterações acentuadas (77,8%). Na íris, 1 de 9 dos animais não apresentou alterações, 4 de 9 dos animais apresentaram alterações discretas e em 4 de 9 dos animais a íris não pôde ser graduada devido à severidade das alterações na córnea. Nas conjuntivas houve a predominância de hiperemia moderada (66,7%).

Aos 14 dias após o tratamento, 1 de 6 dos animais não apresentou alterações na córnea e íris, em 2 de 6 dos animais a córnea e a íris não puderam ser graduadas devido às alterações acentuadas na superfície da córnea e em 3 de 6 dos animais (50%) houve rompimento da córnea, impedindo que a córnea, íris e conjuntivas fossem visualizadas e graduadas. Nos 3 animais que foi possível observar as conjuntivas, 2 deles apresentaram hiperemia moderada. Os animais que tiveram rompimento da córnea foram imediatamente submetidos à eutanásia.

Na leitura de 21 dias, apenas 1 dos 3 animais (animal 84) pode ser observado, visto que os outros dois animais apresentaram rompimento da córnea em 14 dias e foram submetidos à eutanásia. Nenhuma alteração foi notada no animal sobrevivente. Os exames realizados com o corante de fluoresceína foram

positivo quando alterações na córnea estiveram presentes (Tabelas 22 a 28, do Anexo II).

Além das alterações de irritação, os seguintes efeitos relacionados ao tratamento também foram notados: vocalização seguindo a aplicação do produto, alopecia periocular, neovascularização, e desde ulceração ao rompimento da córnea (Tabela 15).

Tabela 15 – Outras alterações clínicas observadas nos animais tratados com o Produto 4

Alterações observadas	1h	7d	14d
	Nº animal		
Vocalização	69,73,81, 82,83	-	-
Alopecia periocular	-	-	79, 80
Acentuada neovascularização	-	76,77,78 79,80,818 2,83	79, 80
Área esbranquiçada e elevada no quadrante inferior esquerdo da córnea, sugestiva de ulceração	-	-	79
Ulceração no quadrante inferior direito da córnea	-	-	80
Rompimento da córnea	-	-	81,82, 83

h=hora; d=dia

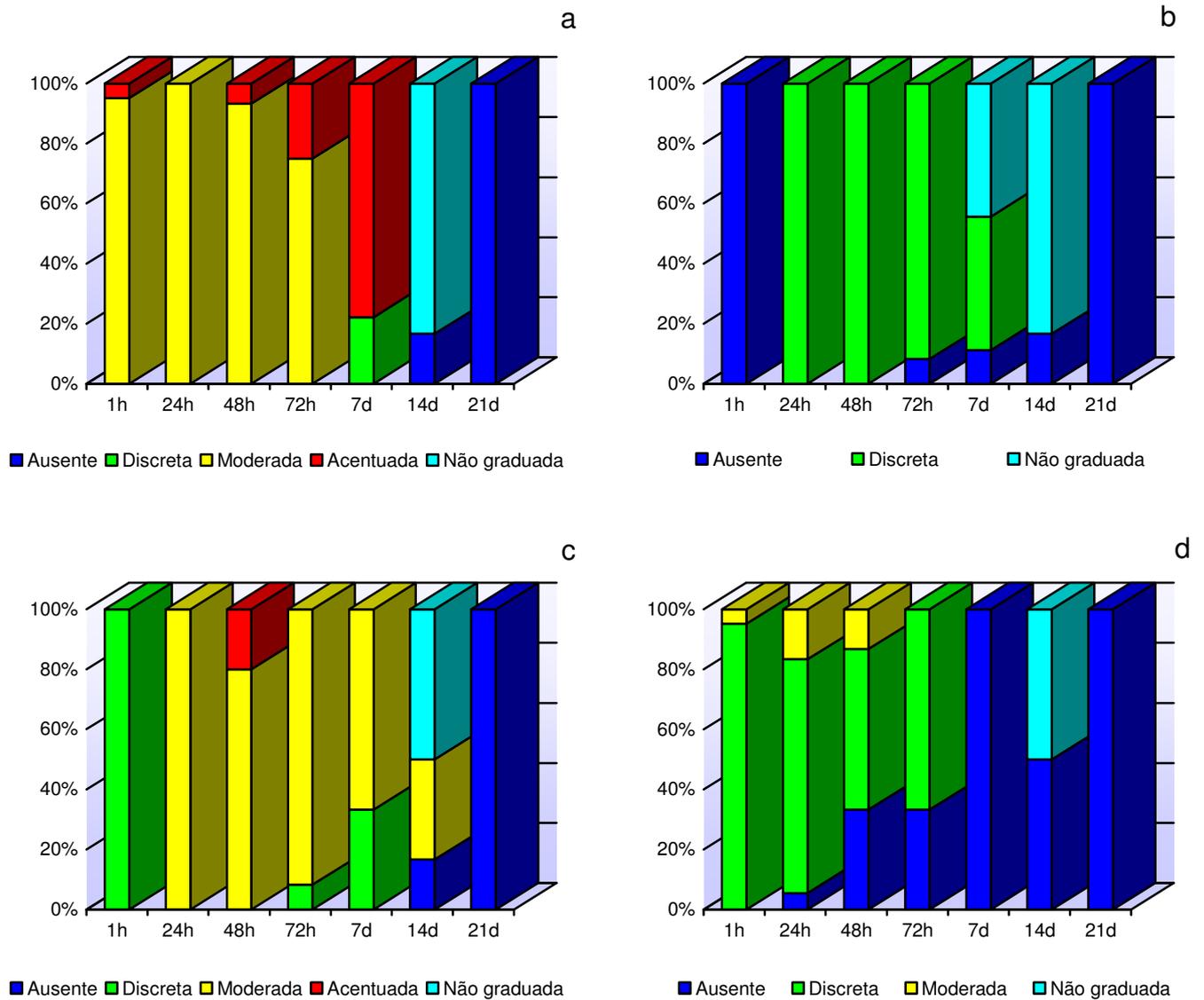


Figura 13 – Percentual de ocorrência das alterações na córnea (a), íris (b) e conjuntivas (hiperemia (c) e edema (d)) nos animais tratados com o Produto 4.

Não graduada: não foi possível graduar devido à severidade das alterações na córnea e/ou ao rompimento da córnea.

A Figura 14 mostra os graus obtidos na córnea dos animais do grupo 7 de cada produto testado, de acordo com a escala de Draize (Tabela 4). Os 3 animais deste grupo foram observados durante os 21 dias do experimento.

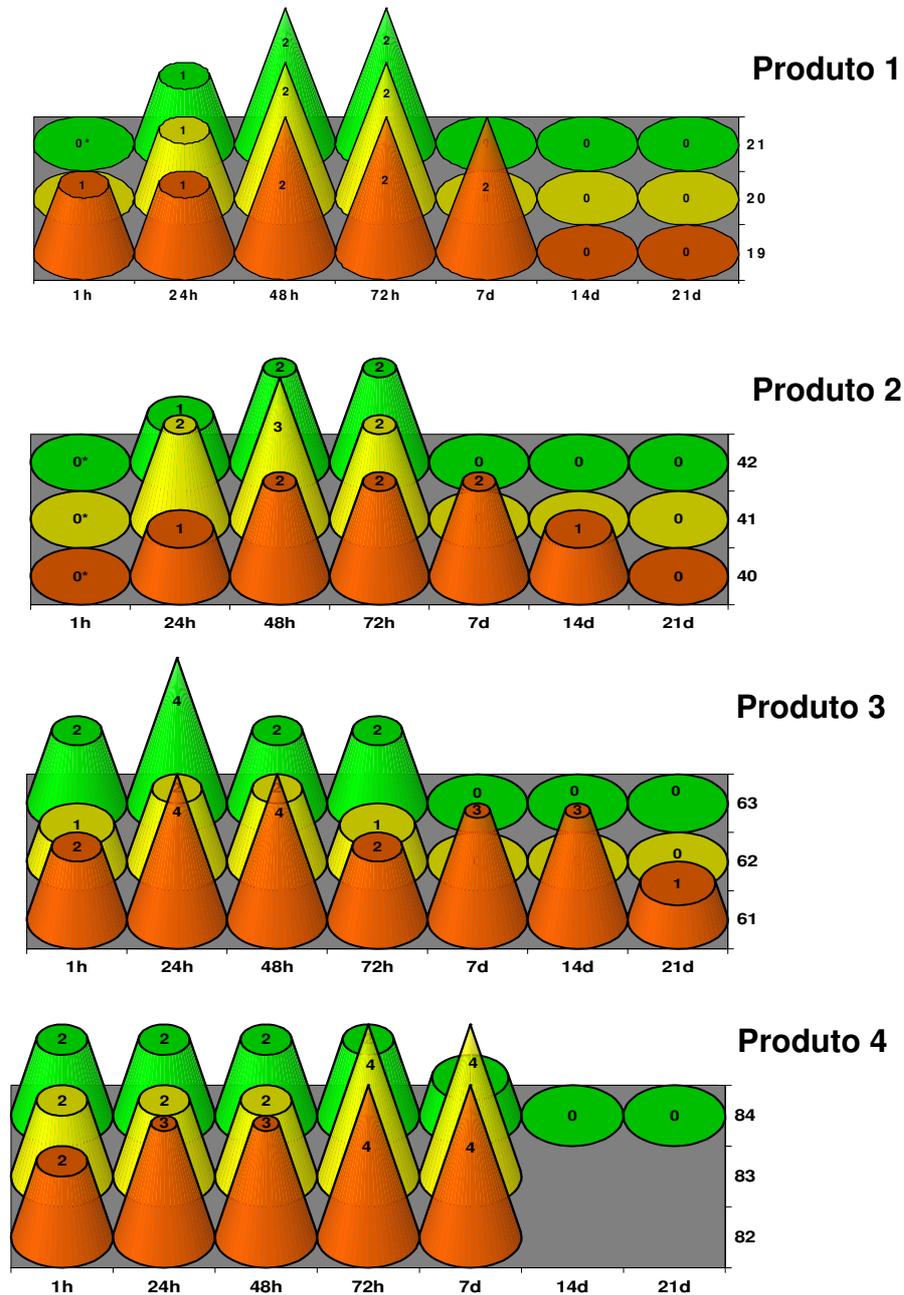


Figura 14 – Avaliação do grau de opacidade na córnea ao longo do estudo nos animais do grupo 7 de cada produto, de acordo com a escala de Draize. Dois animais tratados com o Produto 4 tiveram rompimento da córnea aos 14 dias.

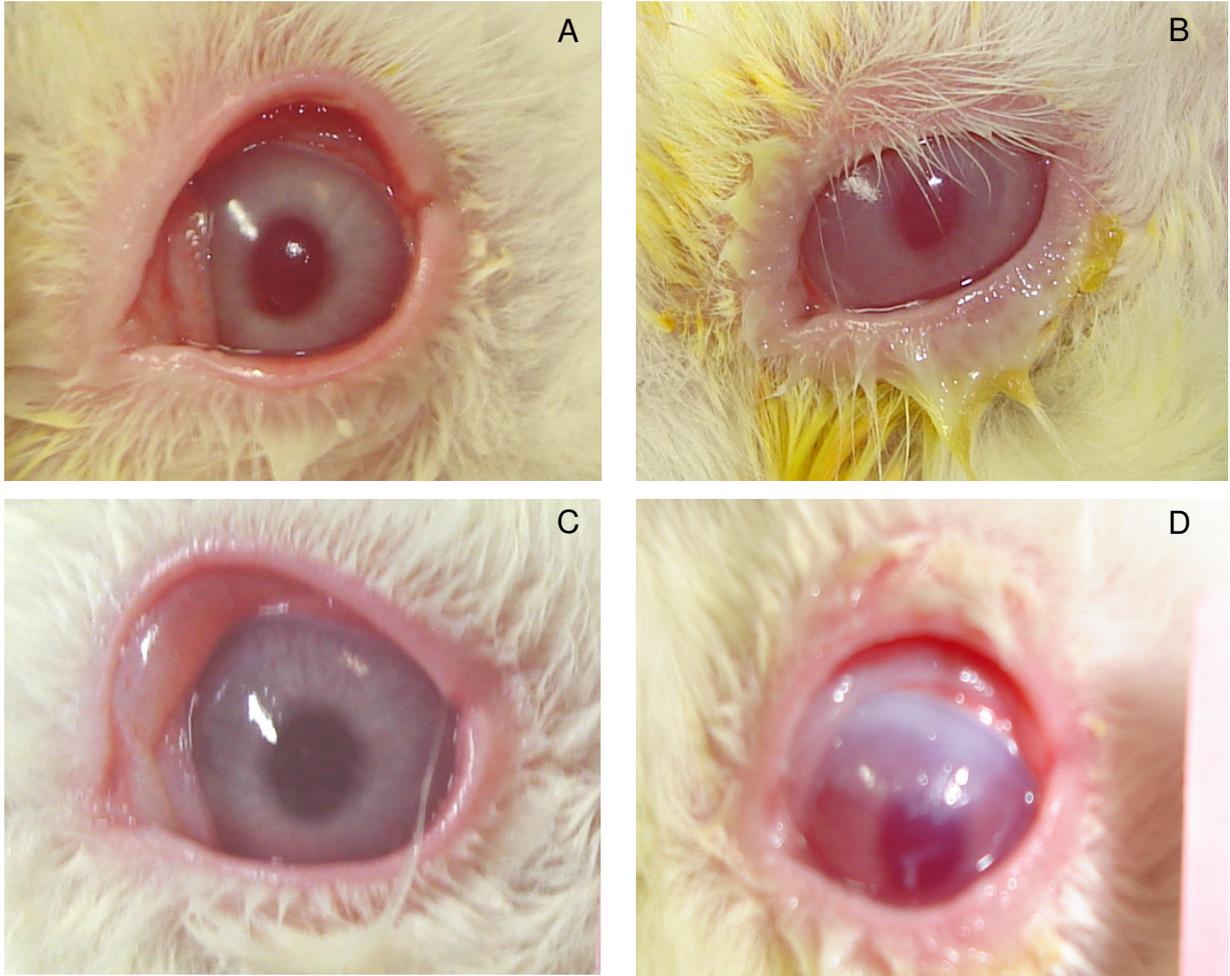


Figura 15 – Alterações oculares macroscópicas causadas pelos produtos 1 (A), 2 (B), 3 (C) e 4 (D). **A.** animal 10, 24 horas após o tratamento. Córnea: opacidade 1; Íris: 0; Conjuntivas: hiperemia 2 e edema 1. **B.** animal 35, 48 horas após o tratamento. Córnea: opacidade 2; Íris: 0; Conjuntivas: hiperemia 2 e edema 0. **C.** animal 62, 1 hora após o tratamento. Córnea: opacidade 1; Íris: 0; Conjuntivas: hiperemia 1 e edema 2. **D.** animal 70, 24 horas após o tratamento. Córnea: opacidade 3; Íris: 1; Conjuntivas: hiperemia 2 e edema 1.

4.2 Descrição das alterações microscópicas

Nos exames histopatológicos nenhuma alteração foi observada no olho controle dos animais. As alterações microscópicas observadas em cada grupo estão apresentadas nas Tabelas 16 a 27. Os processos inflamatórios evidenciados pela infiltração de neutrófilos polimorfonucleares foram classificados em discreto, moderado ou acentuado, dependendo da quantidade desse tipo celular. A Figura 16 mostra algumas alterações microscópicas observadas no olho dos animais tratados com os produtos 1, 2, 3 e 4.

Produto 1

As alterações oculares microscópicas nos animais dos grupos 1 e 2 (eutânasia 1 e 24 horas após o tratamento, respectivamente) estão mostradas na Tabela 16. Em ambos os grupos observou-se processo inflamatório na conjuntiva bulbar, palpebral e membrana nictante. No grupo 1, além do processo inflamatório, houve descamação do epitélio da conjuntiva da pálpebra superior dos animais 2 e 3 e da pálpebra inferior dos 3 animais, e no grupo 2 observou-se hemorragia, congestão e hiperplasia linfóide nas conjuntivas de alguns animais.

Tabela 16 – Reações inflamatórias observadas nos animais^a dos grupos 1 e 2 tratados com o Produto 1. Os infiltrados de neutrófilos foram classificados em discreto (D), moderado (M) e acentuado (A)

Estrutura examinadas	Grupo 1 (1 hora)			Grupo 2 (24 horas)		
	D	M	A	D	M	Outras
Conjuntiva bulbar	1,2,3	-	-	6	4,5	Hemorragia (5)
Pálpebra superior	3	1	2	4,6	-	Congestão (4)
Membrana nictante	1,3	2	-	-	4	-
Pálpebra inferior	-	1,2	3	4,5	6	Hemorragia (4,5) Hiperplasia linfóide (6)

^aNúmero do animal que apresentou alteração

As alterações observadas nos animais dos grupos 3 e 4 podem ser notadas na Tabela 17. Nos 3 animais do grupo 3 (eutanásia 48 horas após o tratamento), a córnea, a conjuntiva bulbar, palpebral e membrana nictante apresentaram processo inflamatório, caracterizado por infiltrado neutrofílico. Hemorragia, congestão, hiperplasia linfóide acompanharam o processo inflamatório em alguns animais. A córnea de todos os animais deste grupo apresentaram descamação epitelial. As alterações observadas nos animais do grupo 4 (eutanasiados 72 horas após o tratamento) se caracterizaram por processos inflamatórios na córnea, conjuntiva bulbar, corpo ciliar, e ainda na conjuntiva palpebral e membrana nictante. Além do infiltrado de neutrófilos, observou-se hiperplasia linfóide, congestão e hemorragia em alguns animais. Houve ainda descamação do epitélio da córnea de todos os 3 animais.

Tabela 17 – Reações inflamatórias observadas nos animais^a dos grupos 3 e 4 tratados com o Produto 1. Os infiltrados de neutrófilos foram classificados em discreto (D), moderado (M) e acentuado (A)

Estruturas examinadas	Grupo 3 (48 horas)				Grupo 4 (72 horas)		
	D	M	A	Outras	D	M	Outras
Córnea	7,8,9	-	-	-	12	10,11	-
Conjuntiva bulbar	8	7	9	Hemorragia (8,9)	12	10,11	Hiperplasia linfóide (10)
Corpo ciliar	-	-	-	-	12	-	-
Pálpebra superior	8	7,9	-	Congestão (8,9) Hiperplasia linfóide (9)	10	11	Congestão (12)
Membrana nictante	9	7,8	-	Hemorragia (8) Congestão (9) Hiperplasia linfóide (9)	10	11	Hemorragia (11) Hiperplasia linfóide (12)
Pálpebra inferior	9	7,8	-	-	12	10	Hiperplasia linfóide (10)

^aNúmero do animal que apresentou alteração

A Tabela 18 mostra as alterações microscópicas encontradas nos animais dos grupos 5, 6 e 7, submetidos à eutanásia 7, 14 e 21 dias após o tratamento, respectivamente. Os animais dos grupos 5 e 7 não apresentaram infiltrado inflamatório neutrofílico nas estruturas examinadas. No grupo 5 observou-se no epitélio da córnea hiperplasia, queratinização e descamação, nos animais 13, 14 e 15, respectivamente. Congestão e hiperplasia linfóide foram notadas na conjuntiva palpebral e membrana nictante de alguns animais dos grupos 5, 6 e 7. No grupo 6, o animal 16 apresentou ulceração e o animal 17 descamação na córnea, ambos acompanhados de intensa resposta inflamatória neutrofílica.

Tabela 18 – Reações inflamatórias observadas nos animais^a dos grupos 5, 6 e 7 tratados com o Produto 1. Os infiltrados de neutrófilos foram classificados em discreto (D), moderado (M) e acentuado (A)

Estruturas examinadas	Grupo 5 (7 dias)	Grupo 6 (14 dias)				Grupo 7 (21 dias)
	Outras	D	M	A	Outras	Outras
Córnea	-	-	17	16	-	-
Conjuntiva bulbar	-	16,17	-	-	-	-
Pálpebra superior	Congestão (13)	16	-	-	-	Congestão (19,21)
Membrana nictante	Congestão (13)	-	-	-	-	Congestão (21)
Pálpebra inferior	Congestão (13) Hiperplasia linfóide (13)	-	16	-	Congestão (16)	Congestão (19,21) Hiperplasia linfóide (21)

^aNúmero do animal que apresentou alteração

Produto 2

Os animais dos grupos 1 e 2 submetidos ao tratamento com o produto 2 apresentaram alterações microscópicas semelhantes (Tabela 19). Na córnea foi notada apenas a presença de descamação do epitélio nos três animais de cada grupo, enquanto na conjuntiva bulbar, palpebral e membrana nictante foram observados processos inflamatórios discretos e/ou moderados, acompanhados de hemorragia e hiperplasia linfóide em alguns animais.

Tabela 19 – Reações inflamatórias observadas nos animais^a dos grupos 1 e 2 tratados com o Produto 2. Os infiltrados de neutrófilos foram classificados em discreto (D) e moderado (M)

Estruturas examinadas	Grupo 1 (1 hora)			Grupo 2 (24 horas)		
	D	M	Outras	D	M	Outras
Conjuntiva bulbar	22,23,24	-	Hemorragia (23,24)	25,26,27	-	-
Pálpebra superior	24	22,23	Hiperplasia linfóide (23)	25,26,27	-	Hiperplasia linfóide (26)
Membrana nictante	22,24	-	Hiperplasia linfóide (23)	-	25,26	-
Pálpebra inferior	-	22,23,24	Hiperplasia linfóide (23)	26	-	-

^aNúmero do animal que apresentou alteração

Os animais do grupo 3 apresentaram infiltrado inflamatório discreto e moderado na córnea, com descamação do epitélio nos 3 animais (Tabela 20). Inflamação discreta na conjuntiva bulbar e discreta e/ou moderada na conjuntiva palpebral e membrana nictante foi observada, acompanhada de hemorragia e congestão em alguns olhos. As alterações observadas nos animais do grupo 4 (Tabela 20) se caracterizaram por processo inflamatório discreto na córnea, com descamação do epitélio nos 3 animais. Na conjuntiva bulbar, palpebral e membrana

nictante predominou um discreto infiltrado inflamatório, acompanhado de hemorragia e congestão em alguns animais.

Tabela 20 – Reações inflamatórias observadas nos animais^a dos grupos 3 e 4 tratados com o Produto 2. Os infiltrados de neutrófilos foram classificados em discreto (D) e moderado (M)

Estruturas examinadas	Grupo 3 (48 horas)			Grupo 4 (72 horas)		
	D	M	Outras	D	M	Outras
Córnea	28,30	29	-	31,32,33	-	-
Conjuntiva bulbar	28,29,30	-	Hemorragia (28)	31,32,33	-	Hemorragia (32)
Pálpebra superior	-	29,30	Congestão (28)	33	-	Congestão (32)
Membrana nictante	30	28	Congestão (28) Hemorragia (28)	31	-	-
Pálpebra inferior	28	-	Congestão (28)	32,33	31	Congestão (31,32,33) Hemorragia (32)

^aNúmero do animal que apresentou alteração

Na Tabela 21 estão resumidas as alterações microscópicas encontradas nos animais dos grupos 5, 6 e 7. No grupo 5 foi observado infiltrado inflamatório na córnea de um animal (35), com descamação epitelial, e no animal 34 observou-se queratinização do epitélio córneo e congestão e hiperplasia linfóide nas pálpebras e membrana nictante. No grupo 6 apenas um animal apresentou inflamação discreta na córnea. No grupo 7, hiperplasia do epitélio córneo, congestão e hiperplasia linfóide na pálpebra superior foram notados em um animal.

Tabela 21 – Reações inflamatórias observadas nos animais^a dos grupos 5, 6 e 7 tratados com o Produto 2. Os infiltrados de neutrófilos foram classificados em discreto (D) e moderado (M)

Estruturas examinadas	Grupo 5 (7 dias)		Grupo 6 (14 dias)	Grupo 7 (21 dias)
	M	Outras	D	Outras
Córnea	35	-	37	-
Pálpebra superior	-	Congestão (34)	-	-
Membrana nictante	-	Congestão (34)	-	Congestão (40) Hiperplasia linfóide (40)
Pálpebra inferior	-	Congestão (34) Hiperplasia linfóide (34)	-	-

^aNúmero do animal que apresentou alteração

Produto 3

Os animais do grupo 1 apresentaram apenas discreto infiltrado inflamatório na conjuntiva palpebral e membrana nictante (Tabela 22). Nos animais do grupo 2, 2 animais mostraram reação neutrofílica discreta, enquanto 1 animal apresentou reação acentuada, sendo que todos os 3 animais tiveram descamação do epitélio córneo. Processos inflamatórios predominantemente discretos foram notados nas conjuntivas, corpo ciliar e membrana nictante.

Tabela 22 – Reações inflamatórias observadas nos animais^a dos grupos 1 e 2 tratados com o Produto 3. Os infiltrados de neutrófilos foram classificados em discreto (D), moderado (M) e acentuado (A)

Estruturas examinadas	Grupo 1 (1 hora)	Grupo 2 (24 horas)			
	D	D	M	A	Outras
Córnea	-	46,48	-	47	-
Conjuntiva bulbar	-	46,48	47	-	-
Corpo ciliar	-	46,47,48	-	-	-
Pálpebra superior	44	46	-	-	Congestão (46,48)
Membrana nictante	43,44,45	46,47,48	-	-	-
Pálpebra inferior	43,44,45	48	46,47	-	-

^aNúmero do animal que apresentou alteração

Os animais dos grupos 3 e 4 (Tabela 23) apresentaram infiltrado inflamatório discreto e/ou moderado na córnea, com descamação do epitélio córneo de todos os animais, além das conjuntivas, corpo ciliar e membrana nictante. No grupo 4 a reação neutrofílica na pálpebra superior foi moderada e acentuada. Em um animal do grupo 4 foi notado ainda infiltrado inflamatório discreto na íris. O processo inflamatório na conjuntiva palpebral e membrana nictante de alguns animais dos grupos 3 e 4 foi seguido de congestão, hemorragia e hiperplasia linfóide (Tabela 23).

Tabela 23 – Reações inflamatórias observadas nos animais^a dos grupos 3 e 4 tratados com o Produto 3. Os infiltrados de neutrófilos foram classificados em discreto (D), moderado (M) e acentuado (A)

Estruturas examinadas	Grupo 3 (48 horas)			Grupo 4 (72 horas)			
	D	M	Outras	D	M	A	Outras
Córnea	51	49,50	-	52,53,54	-	-	-
Conjuntiva bulbar	51	49,50	-	52,53,54	-	-	-
Corpo ciliar	49,50	-	-	52,53	-	-	-
Íris	-	-	-	53	-	-	-
Pálpebra superior	50,51	-	Congestão (51)	-	52,54	53	-
Membrana nictante	49,50	51	-	52,53,54	-	-	Hemorragia (53)
Pálpebra inferior	-	50	Congestão (49) Hiperplasia linfóide (51)	52,54	53	-	Hiperplasia linfóide (52) Hemorragia (53)

^aNúmero do animal que apresentou alteração

A Tabela 24 mostra as reações inflamatórias encontradas nos animais dos grupos 5 e 7. Todos os animais do grupo 5 apresentaram infiltrado inflamatório na córnea e conjuntiva bulbar, com descamação do epitélio córneo do animal 55. Nos animais 58 e 60 do grupo 6, notou-se a presença de neovascularização na córnea. Apenas um animal do grupo 7 apresentou inflamação discreta na córnea, com neovascularização, e hemorragia na conjuntiva bulbar.

Tabela 24 – Reações inflamatórias observadas nos animais^a dos grupos 5 e 7 tratados com o Produto 3. Os infiltrados de neutrófilos foram classificados como discreto (D)

Estruturas examinadas	Grupo 5 (7 dias)	Grupo 7 (21 dias)	
	L	L	Outras
Córnea	55,56,57	61	Neovascularização (61)
Conjuntiva bulbar	55,56,57	-	Hemorragia (61)
Membrana nictante	57	-	-

^aNúmero do animal que apresentou alteração

Produto 4

As reações inflamatórias notadas nos animais dos grupos 1 e 2 estão apresentadas na Tabela 25. No grupo 1, apenas o animal 66 apresentou descamação do epitélio da córnea. Infiltrado inflamatório discreto foi notado nas conjuntivas e membrana nictante na maioria dos animais. Entre os animais do grupo 2, o animal 67 apresentou infiltrado de neutrófilos na córnea, e em todos os 3 animais houve descamação do epitélio. As conjuntivas e membrana nictante apresentaram predominantemente processo inflamatório discreto.

Tabela 25 – Reações inflamatórias observadas nos animais^a dos grupos 1 e 2 tratados com o Produto 4. Os infiltrados de neutrófilos foram classificados em discreto (D), moderado (M) e acentuado (A)

Estruturas examinadas	Grupo 1 (1 hora)			Grupo 2 (24 horas)		
	D	M	Outras	D	M	A
Córnea	-	-	-	67	-	-
Conjuntiva bulbar	66	64	-	67,68,69	-	-
Pálpebra superior	64,65,66	-	Hemorragia (66)	-	67,69	68
Membrana nictante	64	-	-	67,68,69	-	-
Pálpebra inferior	64,65,66	-	-	67,69	-	68

^aNúmero do animal que apresentou alteração

Na Tabela 26 estão demonstrados os achados inflamatórios microscópicos nos olhos dos animais dos grupos 3 e 4. Os 3 animais do grupo 3 tiveram infiltrado neutrofílico discreto e/ou moderado na córnea e conjuntiva bulbar, com descamação do epitélio da córnea de todos os animais. Na conjuntiva palpebral e membrana nictante observou-se infiltrado inflamatório predominantemente moderado e acentuado. O animal 70 apresentou reação inflamatória discreta no corpo ciliar. Na córnea dos animais do grupo 4 foi observada uma resposta inflamatória discreta e/ou moderada, com descamação do epitélio dos 3 animais, enquanto na conjuntiva bulbar a resposta foi moderada e/ou acentuada. Reação inflamatória neutrofílica foi observada no corpo ciliar dos 3 animais, acompanhada de congestão nos animais 73 e 74, e na íris do animal 75. A conjuntiva palpebral e membrana nictante tiveram resposta inflamatória moderada e/ou acentuada (Tabela 26).

Tabela 26 – Reações inflamatórias observadas nos animais^a dos grupos 3 e 4 tratados com o Produto 4. Os infiltrados de neutrófilos foram classificados em discreto (D), moderado (M) e acentuado (A)

Estruturas examinadas	Grupo 3 (48 horas)				Grupo 4 (72 horas)			
	D	M	A	Outras	D	M	A	Outras
Córnea	70,72	71	-	-	74,75	73	-	-
Conjuntiva bulbar	71,72	70	-	-	-	74	73,75	-
Corpo ciliar	70	-	-	-	73,74,75	-	-	Congestão (73,74)
Íris	-	-	-	-	75	-	-	-
Pálpebra superior	-	70,71	72	-	-	73,74	75	Hemorragia (73)
Membrana nictante	71	-	70	Hemorragia (70)	-	73,74,75	-	-
Pálpebra inferior	-	71	70,72	-	-	-	73,74,75	-

^aNúmero do animal que apresentou alteração

Os achados microscópicos nos animais dos grupos 5 e 6 estão demonstrados na Tabela 27. Nos animais do grupo 5 a resposta inflamatória observada na córnea, conjuntivas, corpo ciliar e membrana nictante foi predominantemente moderada. Na córnea o infiltrado inflamatório foi acompanhado de descamação do epitélio dos 3 animais e hiperplasia epitelial e neovascularização no animal 78. O processo inflamatório observado na íris foi discreto em dois animais. No grupo 6 o animal 81 apresentou rompimento da córnea e necrose das conjuntivas e membrana nictante, impossibilitando o exame microscópico das estruturas. O exame microscópico dos animais 79 e 80 revelaram na córnea acentuado infiltrado inflamatório, com ulceração e neovascularização em ambos os animais, bem como na íris e corpo ciliar. As conjuntivas e membrana nictante desses animais também apresentaram infiltrado inflamatório de intensidade variada (Tabela 27).

Tabela 27 – Reações inflamatórias observadas nos animais^a dos grupos 5 e 6 tratados com o Produto 4. Os infiltrados de neutrófilos foram classificados em discreto (D), moderado (M) e acentuado (A)

Estruturas examinadas	Grupo 5 (7 dias)				Grupo 6 (14 dias) ^b			
	D	M	A	Outras	D	M	A	Outras
Córnea	77	76,78	-	Neovascularização (78)	-	-	79,80	Neovascularização (79,80)
Conjuntiva bulbar	-	76,77,78	-	-	-	-	79,80	-
Corpo ciliar	-	76,77,78	-	Congestão (76)	-	-	79,80	-
Íris	76,77	-	-	-	-	-	79,80	-
Pálpebra superior	-	76	77	-	80	79	-	Congestão (79)
Membrana nictante	-	77,78	-	-	79	80	-	-
Pálpebra inferior	-	76,77,78	-	-	-	79	80	-

^aNúmero do animal que apresentou alteração; ^bForam perdidas as amostras do globo ocular e membrana nictante do animal 81.

Dois animais do grupo 7 (que deveriam ser sacrificados aos 21 dias após o tratamento) foram sacrificados ao 14^o dia devido ao rompimento da córnea. Por esta razão, apenas as estruturas oculares de um animal (84) foram examinadas microscopicamente. O animal sobrevivente do grupo 7 apresentou neovascularização e hiperplasia epitelial na córnea.

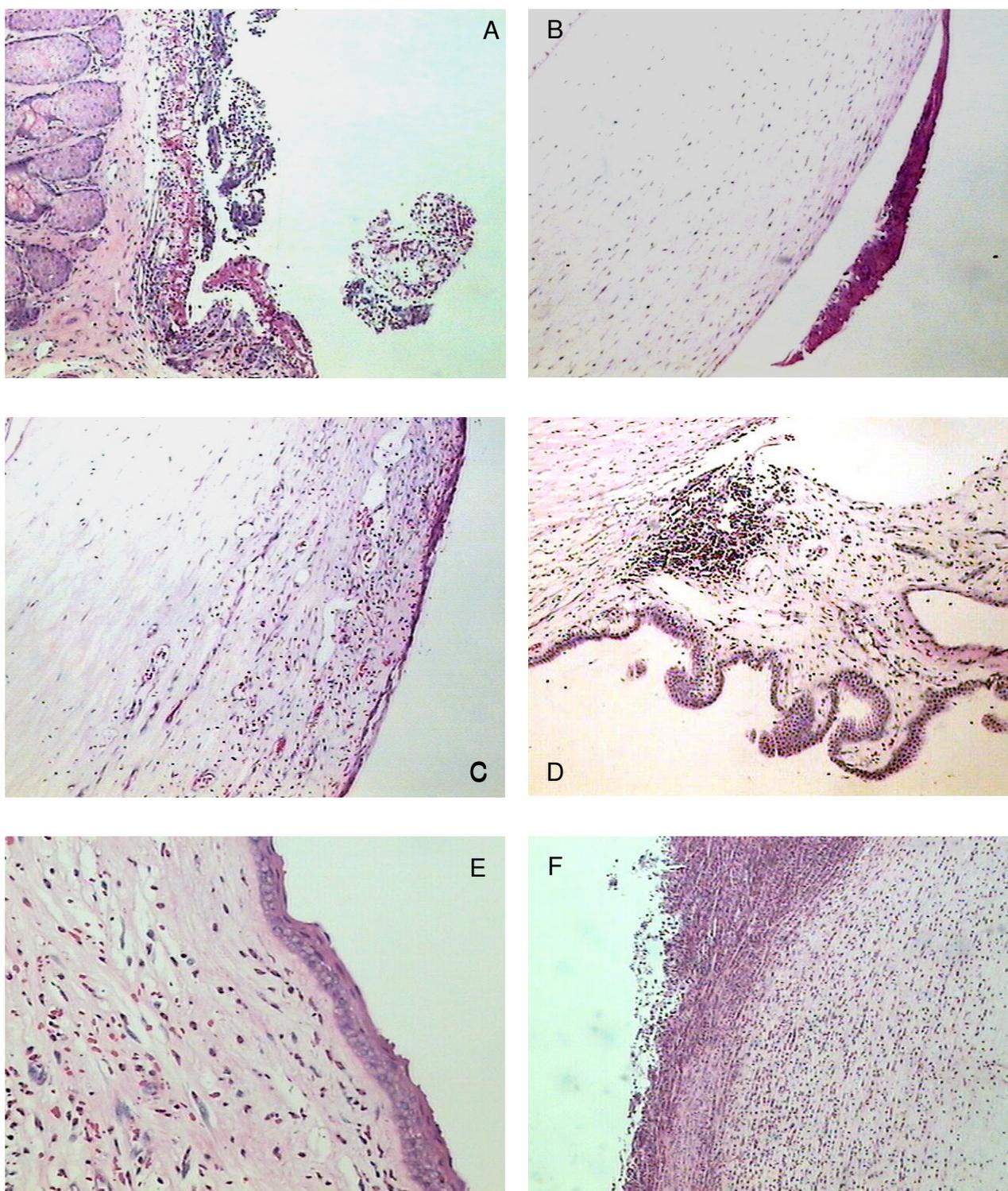


Figura 16 – Alterações microscópicas observadas no olho dos animais tratados com os produtos 1 (A e B), 2 (C), 3 (D) e 4 (E e F). **A.** descamação do epitélio da conjuntiva palpebral, animal 1, 1 hora após o tratamento. **B e C.** queratite com descamação epitelial, animal 15 e 35, 7 dias após o tratamento, respectivamente. **D.** infiltrado neutrofílico no corpo ciliar, animal 49, 48 horas após o tratamento. **E.** hiperplasia epitelial, animal 78, 7 dias após o tratamento. **F.** úlcera, animal 79, 14 dias após o tratamento (HE, A, B, C, D, E 40x; F 100x).

5 DISCUSSÃO

A razão de se estudar os efeitos de produtos contendo o princípio ativo 2,4-D sobre a superfície ocular reside no fato dos mesmos serem herbicidas amplamente utilizados no território nacional e por estarem freqüentemente envolvidos nos casos de acidentes ocupacionais com agrotóxicos.

O teste de irritação ocular, baseado no Teste Ocular de Draize de 1944, faz parte dos testes toxicológicos exigidos pelas agências regulatórias para o registro de agrotóxicos. Os dados obtidos deste teste tem grande importância na decisão quanto à classificação toxicológica de um produto, por ser muitas vezes o dado mais crítico entre os testes toxicológicos. Segundo a ANVISA (2007a), os produtos agrotóxicos e afins que, formulados, provocarem corrosão, ulceração ou opacidade na córnea, irreversível dentro de 7 dias após a aplicação nas conjuntivas dos animais testados, serão submetidos a estudo especial para concessão ou não de classificação toxicológica. Isto significa que estes produtos podem ter seus registros negados no país.

No teste original de Draize três tipos de tecidos são examinados: a córnea, íris e conjuntivas. Cada tecido tem diferentes características a serem avaliadas. Na córnea, a densidade e o tamanho da área de opacidade devem ser considerados; na íris, a irritação, e nas conjuntivas, a hiperemia (vermelhidão), o edema (inchaço) e a secreção. Desde 1981 quando o OECD publicou o primeiro protocolo para o Teste de Irritação Ocular, e nas duas revisões posteriores (OECD, 1987 e OECD, 2002), o sistema de graduação das alterações eram similares ao teste original de Draize, mas excluía a graduação da área de opacidade na córnea e da secreção nas conjuntivas.

A eliminação da quantificação da área da córnea envolvida se deve ao fato de uma vez que o produto é considerado irritante independente da área de opacidade na córnea. A secreção ocular é um parâmetro não específico e difícil de ser quantificado, pois não necessariamente determina efeito irritante, podendo ser consequência de uma infecção bacteriana. A superfície ocular é colonizada por microbiota bacteriana que contribui com a modulação de sua defesa, associada a fatores humorais próprios da sua superfície, inibindo o aparecimento de

microrganismos patogênicos, como o *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium spp* e *Propionibacterium acnes* (Souza *et al.*, 1999).

A córnea é a estrutura mais importante a ser avaliada no teste de irritação ocular, devido ao papel que desempenha no processo da visão. Qualquer desarranjo na superfície é porta de entrada para processos infecciosos ou causa de distúrbio funcional (Estévez, 2004). No presente estudo, as predominâncias da intensidade das alterações na córnea produzidas nos animais do pré-teste e do teste final até 72 horas foram semelhantes nos produtos 2 e 3. Em ambos os testes com o produto 2 foram observados alterações discretas e moderadas e com o produto 3 alterações moderadas e acentuadas. Para os produtos 1 e 4, os resultados obtidos no teste final foram diferentes daqueles observados no pré-teste. Os animais tratados com o produto 1 apresentaram no pré-teste alterações discretas, enquanto no teste final alterações discretas e moderadas. No produto 4 houve alterações moderadas e acentuadas no pré-teste e moderadas no teste final.

A variabilidade entre os resultados obtidos entre o pré-teste e o teste final pode estar relacionada com a natureza subjetiva do teste de Draize, o que dificulta a obtenção de resultados reprodutíveis e comparáveis. Estudos tem demonstrado que os resultados obtidos no teste ocular de Draize não podem ser reproduzidos de maneira satisfatória intra e entre laboratórios. Weil e Scala (1971; *appud* Scheiwiller, 2005) investigaram a correlação dos resultados dos testes de irritação ocular de 9 substâncias em 24 laboratórios diferentes. Em 15 dos 24 laboratórios avaliados a classificação individual das substâncias testadas de cada laboratório não correlacionou significativamente com a classificação geral de todos os laboratórios. Além disso, o teste com as 9 substâncias foi repetido em dois laboratórios, sendo que em cada laboratório um observador interno e um observador independente realizaram o re-teste. Notou-se que os observadores internos chegaram a resultados similares, porém mais leves que os testes realizados anteriormente, mas bem diferentes aos resultados obtidos pelos observadores independentes. Além do observador, os resultados são também influenciados pela variabilidade biológica dos indivíduos. No presente estudo, esta variabilidade foi demonstrada para todos os produtos com relação a alterações na córnea, íris e conjuntivas. Na córnea, esta

variabilidade pode ser confirmada ao longo dos 21 dias do experimento com os animais do grupo 7.

No caso das formulações testadas neste estudo a variabilidade entre os resultados do pré-teste e do teste final não acarretaria em classificação toxicológica diferente, e todos produtos seriam classificados como extremamente tóxicos (classe I), já que provocaram opacidade na córnea reversível ou não dentro de sete dias ou irritação persistente nas mucosas oculares dos animais testados (ANVISA, 2007a).

Os resultados do teste final mostraram que em contato com os olhos de coelhos, os produtos formulados de 2,4-D produziram lesões oculares graves, as vezes irreversíveis em 21 dias (produto 3). Os produtos 3 (960 g/kg) e 4 (670 g/L) que causaram lesões oculares mais acentuadas, tinham concentrações de 2,4-D bem mais elevadas quando comparadas aos produtos 1 (150 g/L) e 2 (240 g/L). Esses produtos também apresentavam pH extremamente ácido e básico, respectivamente, o que aumenta o potencial corrosivo dessas substâncias, enquanto o pH dos produtos 1 e 2 estavam próximos da neutralidade (Quadro 2). Segundo Wagoner (1997), tanto substâncias ácidas como alcalinas podem produzir lesões oculares severas. Os ácidos tendem a produzir lesões mais extensas na superfície ocular, enquanto os álcalis penetram rapidamente no interior do olho podendo causar lesões não só na córnea e conjuntivas, como também atingir a íris, corpo ciliar e cristalino. Adicionalmente, é provável que a solubilidade dos Produtos 1 e 2 testadas neste estudo tenha relação direta com sua absorção pela superfície da córnea. Porém, este parâmetro não pode ser avaliado já que não tivemos acesso a composição destas formulações outra que a concentração dos ingrediente ativos.

A presença de picloram nos produtos 1 e 2 em concentrações bem menores que a de 2,4-D provavelmente não contribuiu de maneira importante para a severidade das lesões observadas, já que este ingrediente ativo é considerado como um irritante ocular moderado (classe toxicológica III), enquanto o 2,4-D um irritante ocular severo (classe I).

A intensidade das lesões na córnea não aumentou proporcionalmente com o aumento da concentração de 2,4-D. Entre as formulações utilizadas, observou-se a seguinte ordem de gravidade das lesões, do mais leve para o mais

grave: produto 2, seguido dos produtos 1, 3 e 4 (Figuras 11, 10, 12 e 13, respectivamente). O produto 2 causou alterações discretas e moderadas entre 1 e 72 horas, com desaparecimento total das lesões clínicas em 21 dias. O produto 1 causou alterações discretas a acentuadas entre 1 e 72 horas e acentuadas em alguns animais em 7 e 14 dias, com regressão total em 21 dias. O produto 3, por sua vez, apresentou alterações discretas a acentuadas entre 1 e 72 horas, iniciou o processo de reversão em 7 dias, apresentando ainda um grande número de animais com alterações acentuadas; não houve reversibilidade total das lesões em um animal aos 21 dias. O produto 4 causou alterações moderadas a acentuadas entre 1 e 72 horas, que se agravaram para a maioria dos animais entre 7 e 14 dias, com rompimento da córnea de alguns animais em 14 dias. Este rompimento pode ser explicado pelo potencial corrosivo do produto (pH 9,54), que pode ter atingido estruturas mais internas do olho, retardando o processo de reparação da córnea e, conseqüentemente, predispondo a mesma à entrada de microorganismos infecciosos. Segundo Kenyon (1985) lesões graves podem levar à isquemia e/ou necrose dos vasos do limbo e da conjuntiva, reduzindo a vascularização e a disponibilidade de células inflamatórias e, conseqüentemente, a reparação da área lesada. Wagoner (1997) relata que a diminuição da vascularização pode contribuir parcialmente para ulceração e perfuração da córnea, visto que microorganismos oportunistas, tais como bactérias, fungos, vírus, protozoários e clamídeas, se instalam no local da lesão causando úlcera córnea infecciosa.

Em todos os tratamentos houve o desenvolvimento de vascularização na superfície da córnea de alguns animais. Na maioria dos casos os vasos foram notados clinicamente em 7 e 14 dias, enquanto em alguns animais com alterações na córnea mais graves a formação de novos vasos foi notada também aos 21 dias. Segundo Richard *et al.* (1979), a vascularização na superfície da córnea, proliferação de vasos sanguíneos provenientes do epitélio limbar, é uma manifestação que ocorre na fase reparatória da resposta inflamatória.

A reparação de uma ferida no epitélio córneo pode envolver migração epitelial e atividade mitótica. O metabolismo das áreas central e periférica são diferentes, havendo uma maior atividade metabólica na periferia. Em casos de

lesões envolvendo somente uma porção da córnea, o epitélio adjacente preenche o defeito epitelial. As células epiteliais migram no sentido centrípeto, num esforço de cobrir a área lesada (Srinivasan, 1982). Devido ao seu metabolismo acelerado, o epitélio córneo tem a capacidade de se regenerar em aproximadamente 7 dias, numa velocidade que dependerá da área e profundidade da lesão. Quanto mais profunda é a lesão, mais lento é o processo. Em casos de lesões mais extensas, com o envolvimento do limbo e da córnea, o epitélio conjuntival representa a única fonte de regeneração epitelial (Kuwabara *et al.*, 1976).

Uma das primeiras etapas da reparação córnea é o processo inflamatório, iniciado a partir dos vasos sangüíneos do limbo-conjuntival com a migração de células do sistema imune e fatores protéicos necessários para a restauração final da estrutura tecidual danificada (Wagoner, 1997). No local da inflamação, leucócitos polimorfonucleares (PMNs), particularmente neutrófilos, liberam enzimas proteolíticas para facilitar a fagocitose de células e material não-celular. Poucas horas após uma lesão na córnea já é possível notar a presença de infiltrado de PMNs (Srinivasan, 1982). Neste estudo, este tipo celular foi observado na córnea na maioria dos animais tratados com os produtos 1 e 2 a partir de 48 horas e com os produtos 3 e 4 a partir de 24 horas, indicando que o organismo responde mais rapidamente aos produtos mais irritantes. Outras células fagocíticas, principalmente macrófagos, vêm mais tardiamente para remover os resíduos remanescentes e elaborar citocinas, que irão organizar a atividade de outras células inflamatórias, fibroblastos e possivelmente novos vasos sangüíneos para concluir a fase reparadora tecidual (Wagoner, 1997).

O estudo histopatológico realizado nas córneas tratadas não confirmou a observação clínica em alguns casos. Por exemplo, as reações clínicas observadas na córnea dos animais após 1 e 24 horas do tratamento com os produtos 1 e 2 não foram confirmadas microscopicamente. Por outro lado, a reação infamatória não detectada clinicamente aos 14 dias na córnea do animal 37 tratado com o produto 2, foi observada microscopicamente (infiltrado neutrofílico), indicando que o processo de reparação ainda não estava totalmente finalizado. Adicionalmente, nem sempre se observou uma relação direta entre a intensidade das alterações macro e

microscópicas na córnea dos animais estudados. Por exemplo, os 3 animais tratados com o produto 3 (49, 50 e 51), avaliados em 48 horas após o tratamento tiveram alterações acentuadas na observação clínica, enquanto no exame microscópico foram observadas alterações discretas e moderadas. Numa situação inversa, um animal observado 7 dias após tratamento com produto 2 (35) apresentou alterações discretas na observação clínica e moderada no exame microscópico.

As avaliações microscópicas na córnea mostraram ainda alterações que não são possíveis de serem notadas em um exame externo de rotina e podem comprometer a visão, tais como hiperplasia, descamação e queratinização do epitélio da córnea (Netto, 2005).

O corante de fluoresceína, utilizado para detectar alterações anatômicas e fisiológicas mínimas na superfície da córnea que não são detectadas em um exame oftalmológico habitual, confirmou a presença das alterações. Apenas em um animal tratado com o produto 3 (63) foi notada a presença de área fluorescente na superfície da córnea quando alterações macroscópicas não foram notadas (escore 0), sugerindo que a córnea ainda apresentava alterações, não visíveis a olho nu. O exame microscópico confirmou que não havia nenhuma alteração na córnea deste animal.

Os resultados obtidos referentes à íris mostraram que a irritação produzida pelos produtos foi discreta, com a íris ainda reagindo ao estímulo da luz. Nos animais tratados com os produtos 1 e 2 essas alterações na íris ocorreram entre 24 e 72 horas, enquanto nos animais tratados com os produtos 3 e 4 elas foram notadas entre 24 horas e 7 dias. Histologicamente, nenhum dos animais tratados com os produtos 1 e 2 apresentaram infiltrado inflamatório na íris. O exame micro dos animais tratados com os produtos 3 e 4 confirmou o processo inflamatório na íris de poucos animais que haviam apresentado alterações clínicas. O exame micro foi capaz de detectar processo inflamatório na íris de dois animais do produto 4, que durante o exame clínico não foi visualizada e graduada devido às alterações acentuadas na córnea.

O exame micro ainda revelou a presença de reações inflamatórias no corpo ciliar de alguns animais tratados com os produtos 1, 3 e 4. O corpo ciliar, conjunto de músculos responsáveis pela acomodação do cristalino, é uma estrutura intra-ocular e não visualizada em um exame clínico, e uma vez afetado pode acarretar em distúrbios visuais.

Os achados relativos às conjuntivas, mostraram que os animais apresentaram reações inflamatórias, caracterizadas principalmente por hiperemia e edema, seguindo a aplicação dos produtos. A hiperemia, dilatação de vasos no local irritado, e o edema, aumento da permeabilidade vascular, são manifestações fisiológicas do organismo em resposta a um irritante, com o intuito de liberar mediadores químicos para desativar o agente irritante.

No presente estudo, observou-se que a hiperemia nas conjuntivas apresentou tendência a reversibilidade a partir do 7^o dia após o tratamento com os produtos 1 e 2 e a partir do 14^o dia com os produtos 3 e 4, acompanhando o processo de reparação do epitélio da córnea. A manifestação do edema mostrou ser semelhante para todos os produtos, com início de reversão já a partir de 24 horas na maioria dos tratamentos.

Os exames microscópicos puderam detectar a presença de infiltrado inflamatório neutrofílico nas conjuntivas e membrana nictante, mas não houve relação direta entre a intensidade das alterações clínicas e microscópicas em todos os casos. Além de outras alterações inflamatórias detectadas nas conjuntivas, tais como hemorragia e hiperplasia linfóide, o exame micro também revelou a presença de descamação do epitélio conjuntival, que não pode ser visualizada através de um exame oftálmico.

6 CONCLUSÃO E RECOMENDAÇÕES

Este estudo contribuiu para conhecer as alterações clínicas macroscópicas e microscópicas na superfície dos olhos de coelhos, expostos a produtos agrotóxicos contendo 2,4-D, em cada intervalo do teste de irritação ocular. Os resultados encontrados confirmaram a variabilidade inerente ao teste de irritação ocular. Porém, para os produtos avaliados neste estudo, esta variabilidade não afetaria a classificação toxicológica dos produtos de acordo com os parâmetros da legislação vigente.

O estudo mostrou que não houve relação de proporcionalidade entre concentração de 2,4-D e intensidade das alterações, mas que produtos com pH extremamente ácido ou básico causam reações mais severas na córnea.

O estudo histopatológico confirmou a presença de reação inflamatória neutrofílica na córnea, íris e conjuntivas na maioria dos animais que apresentaram alterações clínicas durante o estudo. Entretanto, não se observou em todos os casos relação direta entre a intensidade das alterações macro e microscópicas.

Este estudo mostrou que apesar do exame clínico ser suficiente para atender a legislação atual de classificação toxicológica dos produtos agrotóxicos, necessárias para o processo registro, o exame microscópico pode detectar alterações oculares adicionais, como hiperplasia, descamação e queratinização do epitélio da córnea e reações inflamatórias nas partes internas do olho, como o corpo ciliar, que podem comprometer a capacidade visual.

A legislação brasileira atual, de 1992, apresenta uma limitação ao considerar como de classe toxicológica I qualquer produto que apresente opacidade na córnea, reversível ou não em 7 dias, o que pode levar a uma classificação muito conservadora do produto. Neste sentido, é importante que a ANVISA revise sua legislação em harmonia com os procedimentos utilizados internacionalmente, como o *Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals* – GHS (OECD, 2001), endossado pelos conselhos econômico e social das Nações Unidas. Nesse sistema recomenda-se a classificação do produto em apenas duas

Categorias, sendo da Categoria 1 os produtos que causarem danos sérios às estruturas oculares (opacidade na córnea graduada como ≥ 3 e irite $> 1,5$ na escala de Draize, irreversível em 21 dias) e da Categoria 2 os produtos que causarem irritação nos olhos (opacidade na córnea ≥ 1 , irite > 1 , hiperemia e edema ≥ 2 , com os efeitos reversíveis em 21 dias). Segundo a legislação atual, todos os produtos utilizados neste estudo seriam classificados como Classe I, enquanto pelo sistema GHS, os produtos 1 e 2 seriam da Categoria 2 e os produtos 3 e 4 seriam da Categoria 1.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. Informação e documentação – Referências – Elaboração. NBR 6023:2002. Disponível em: http://www.unb.br/ciord/informacoes/defesa/abnt_nbr6023_2002_referencia.pdf.

Acessado em: 11/2007.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. VISALEGIS. Legislação em Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis>. Acessado em: 09/2007, 2007a.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Monografias 2007. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/index.htm>. Acessado em: 09/2007b.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/d27.pdf>. Acessado em: 03/2007c.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/p07.pdf>. Acessado em: 03/2007d.

AVMA. American Veterinary Medical Association. 2000 Report of the AVMA Panel on Euthanasia. JAVMA, 2001.

Balls M, Botham PA, Bruner LH, Spielmann H. The EC/HO International Validation Study on Alternatives to the Draize Eye Irritation Test. Toxicology in Vitro, 9:871–929, 1995.

Bradberry SM, Watt BE, Proudfoot AT, Vale JA. Mechanisms of Toxicity, Clinical Features, and Management of Acute Chlorophenoxy Herbicide Poisoning: A Review. Clinical Toxicology, 38:111-122, 2000.

Brantom PG, Bruner LH, Chamberlain M, De Silva O, Dupuis J, Earl LK, *et al.* A Summary Report of the COLIPA International Validation Study on Alternatives to the Draize Rabbit Eye Irritation Test. *Toxicology in Vitro*, 11:141-179, 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Indústria e Comércio. Decreto Federal nº 24.114, de 12 de abril de 1934. Novo Regulamento de Defesa Sanitária Vegetal.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº 007, de 13 de janeiro de 1981. Implantou o Receituário Agrônômico.

BRASIL. Lei 7802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, experimentação, produção, embalagem e rotulagem, transporte, armazenamento, comercialização, além da propaganda comercial, utilização, importação e exportação, destino final dos resíduos e embalagens, registro, classificação, controle, inspeção e fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 03, de 16 de janeiro de 1992. Definiu as “Diretrizes e Exigências do Ministério da Saúde, Referentes à Autorização de Registro, Renovação de Registro e Extensão de Uso de Agrotóxicos e Afins”.

BRASIL. Decreto nº 5981, de 06 de dezembro de 2006. Regulamentou a Lei 7802/89.

COBEA. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Princípios Éticos na Experimentação Animal, 1991. Disponível em: <http://www.cobea.org.br/etica.htm#3>. Acessado em: 03/2006.

Curren RD, Harbell JW. In Vitro Alternatives for Ocular Irritation. *Environmental Health Perspectives*, 106: 485-492, 1998.

Daston GP, McNamee P. Alternatives to Toxicity Testing in Animals: Challenges and Opportunities. Essays on the Future of Environmental Health Research. 2005. Disponível em: <http://www.ehponline.org/docs/2005/7723/7723.pdf>. Acessado em: 07/2007.

De Raat WK, Stevenson H, Hakkert BC, Van Hemmen JJ. Toxicological risk assessment of worker exposure to pesticides: some general principles. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 25:204-210, 1997.

Domingues MR, Bernardi MR, Ono EYS, Ono MA. Agrotóxicos: Risco à Saúde do Trabalhador Rural. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, 25:45-54, 2004.

Draize JH, Woodard G, Calvery HO. Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membrane. *Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics*, 82:377-390, 1944.

EPA (United States Environmental Protection Agency). Reregistration Eligibility Decision (RED): Picloram. Prevention, Pesticides, and Toxic Substances, EPA 738-R95-019. August 1995.

EPA (United States Environmental Protection Agency). Reregistration Eligibility Decision for 2,4-D. Prevention, Pesticides and Toxic Substances. EPA 738-R-05-002. June 2005.

Estévez RA. Efeito do Tacrolimo na reepitelização da córnea em coelhos 2004 (Tese de Doutorado).

Friedenwald JS, Hughes Jr WF, Hermann H: Acid-base tolerance of the cornea. *Archives of Ophthalmology*, 31:279–283, 1944.

Gandhi R, Snedeker SM. Pesticides and Breast Cancer Risk, An Evaluation of 2,4-D. Cornell University Program on Breast Cancer and Environmental Risk Factors in New York State. 1998.

Huhtala A. Corneal Epithelial and Retinal Pigment Epithelial Cell Culture Assays as Potential Alternatives to Animal Experimentation for the Evaluation of Ocular Toxicity. Helsinki University of Technology, 2003.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis. Portaria nº 84, de 15 de outubro de 1996. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=18660&word=toxicologia%20and%20experimental>. Acessado em: 03/2007.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis. Relatório de Consumo de Ingredientes Ativos de Agrotóxicos e Afins no Brasil, 2005.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores de Desenvolvimento Sustentável - Brasil 2004. Dimensão ambiental - Terra. Disponível em: <ftp://geofp.ibge.gov.br/documentos/recursosnaturais/ids/terra.pdf>. Acessado em: 2/2007.

ILAR. Institute of Laboratory Animal Resources. Commission on Life Sciences, National Research Council, Washington, D.C. 1996. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. (NIH Publication Nº 86-23, Fourth Printing, Washington, 2000).

Junqueira LC, Carneiro J. Histologia Básica, 10 ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004.

Kaufman SR. [Problems with the Draize Test](#). Americans for Medical Advancement. Disponível em: http://www.curedisease.com/Perspectives/vol_1_1989/Problems%20with%20the%20Draize.html. Acessado em: 07/2007.

Kenyon KR. Inflammatory mechanisms in corneal ulceration. Trans American Ophthalmological Society, 83:610-663, 1985.

Kotaka ET, Zambrone FAD. Contribuições para a Construção de Diretrizes de Avaliação do Risco Toxicológico de Agrotóxicos. Campinas,SP : ILSI Brasil, 2001 160 p.

Kuwabara T, Perkins DG, Cogan DG. Sliding of the epithelium in experimental corneal wounds. Investigative Ophthalmology, 15:4–14, 1976.

Lei nº 6.638 (1979), estabelece normas para a prática didático-científica da vivissecação de animais e determina outras providências. Publicada no Diário Oficial da União de 10.05.1979, Brasília. <http://www.imepa.org.br/lei6638.html>.

Liechoscki DA. Contribuição dos sistemas da qualidade para o controle de risco à saúde e ao meio ambiente pelo uso de agrotóxicos. Dissertação de Mestrado. Niterói: 2004.

Martinelli O. Relatório Setorial Preliminar – Setor: Agroquímicos. Porto Alegre: FINEP/Diretório de Pesquisa Privada (DPP), 2003. Disponível em: www.finep.gov.br/portaldpp/index.asp. Acessado em: 02/2007.

MS. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Manual de Vigilância da Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos. Brasília: OPAS/OMS, 1997. Disponível em: <http://www.opas.org.br/publicmo.cfm?codigo=19>. Acessado em: 03/2007.

MS. Ministério da Saúde. Nota Técnica Sobre Livre Comércio de Agrotóxicos e Impactos à Saúde Humana. Brasília, 2005.

MS. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Vigilância do câncer ocupacional e ambiental. Rio de Janeiro: INCA, 2005.

MS. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Protocolo de Atenção à Saúde dos Trabalhadores Expostos a Agrotóxicos. 2006. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolo_atencao_saude_trab_exp_agro_toxicos.pdf. Acessado em: 02/2007.

Moreira JC *et al.* Avaliação Integrada do Impacto do Uso de Agrotóxicos sobre a Saúde Humana em uma Comunidade Agrícola de Nova Friburgo, RJ. *Ciência e Saúde Coletiva*, 7:299-311, 2002.

Netto MV *et al.* Corneal wound healing response following different modalities of refractive surgical procedures. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, 68:140-149, 2005.

OECD GUIDELINES FOR TESTING OF CHEMICALS. Summary of Considerations in the Report from the OECD Expert Groups on Short Term and Long Term Toxicology. OECD, Paris, 1999.

OECD SERIES ON TESTING AND ASSESSMENT. Harmonised Integrated Classification System For Human Health And Environmental Hazards Of Chemical Substances And Mixtures. Number 33. 2001.

OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS. Section 4: Health Effects, No 405: Acute Eye Irritation/Corrosion. OECD, Paris, adopted 24 April 2002.

Oliveira-Silva JJ *et al.* Influence of social-economic factors on the pesticide poisoning, Brazil. *Revista de Saúde Pública*, 35:130-135, 2001.

Peres F *et al.* Desafios ao Estudo da Contaminação Humana e Ambiental por Agrotóxicos. *Ciência e Saúde Coletiva*, 10:27-37, 2005.

Polastro D. Estudo dos Casos de Intoxicação Ocasionadas pelo Uso de Agrotóxicos no Estado do Paraná, Durante o Período de 1993 a 2000. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2005.

Puy P, Benítez del Castillo JM, Jiménez Alfaro I, García Sánchez J. Alteración de la Permeabilidad del Epitelio Corneal en Pacientes con Ojo Seco. Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología, 73:495-499, 1998.

Recena MCP, Pires DX, Caldas ED. Acute Poisoning with Pesticides in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. Science of the Total Environment, 357: 88-95, 2006.

Richard AT. *et al.* Ocular Surface Epithelium and Corneal Vascularization in Rabbits. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 18:85-92, 1979.

Scheiwiller S. Review of the Draize Eye Irritation Test. Postgraduate Studies in Toxicology. University of Leipzig. Zurich, 2005.

SIA. Sistema de Informação sobre Agrotóxicos. Produtos Formulados 2007. Disponível em:

http://www4.anvisa.gov.br/AGROSIA/asp/frm_pesquisa_agrotoxico.asp.

Acessado em: 09/2007.

Silva JM *et al.* Agrotóxico e Trabalho: Uma Combinação Perigosa para a Saúde do Trabalhador Rural. Ciência & Saúde Coletiva, 10:891-903, 2005.

SINDAG. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola. Disponível em: <http://www.sindag.com.br/upload/consumo-mundial.xls>. Acessado em: 06/2007.

SINITOX. Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas. Casos Registrados de Intoxicação Humana por Agente Tóxico e Trimestre. Brasil, 2005. Disponível em: http://www.fiocruz.br/sinitox/2005/tab5_brasil.pdf. Acessado em: 09/2007.

Srinivasan BD. Corneal reepithelialization and anti-inflammatory agents [Review]. *Trans American Ophthalmological Society*, 80:758-822, 1982.

Soares WL, Freitas EAV de, Coutinho JAG. Trabalho rural e saúde: intoxicações por agrotóxicos no município de Teresópolis - RJ. *Revista de Economia e Sociologia Rural*, 43:685-701, 2005.

Souza LB, Lima ALH. Flora ocular normal. In: Lima ALH, Nishiwaki-Dantas MC, AlvesMR. *Manual do CBO: doenças externas oculares e córnea*. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1999. p.114-3.

Stoppelli IMBS, Magalhães CP. Saúde e Segurança Alimentar: A Questão dos agrotóxicos. *Ciência & Saúde Coletiva*, 10:91-100, 2005.

Stucki G, Daltroy L, Katz JN, *et al*: Interpretation of Change Scores in Ordinal Clinical Scales and Health Status Measures: The Whole May Not Equal the Sum of the Parts. *Journal of Clinical Epidemiology*, 49:711–717, 1996.

Tomita RY. Legislação de Agrotóxicos e sua Contribuição para a Proteção da Qualidade do Meio Ambiente. *Biológico*, 67:1-10, 2005.

Wagoner MD. Chemical injuries of the eye: current concepts in pathophysiology and therapy. *Survey of Ophthalmology*, 41:275-313, 1997.

Weil CS, Scala RA. Study of intra-and interlaboratory variability in the results of rabbit eye and skin irritation tests. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 19:276-360, 1971.

Wilhelmus KR. The Draize Eye Test. *Survey of Ophthalmology*, 45:493–515, 2001.

WHO. World Health Organization. Public health impact of pesticides used in agriculture, Geneve, WHO, 128p, 1990.

WHO. World Health Organization. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2000-2001. Geneva: World Health Organization, 2002. Disponível em: [http://www.wca-infonet.org/servlet/BinaryDownloaderServlet?filename=1065106192512_Classificatio](http://www.wca-infonet.org/servlet/BinaryDownloaderServlet?filename=1065106192512_Classificatio%20n.pdf&refID=113691)
[n.pdf&refID=113691](http://www.wca-infonet.org/servlet/BinaryDownloaderServlet?filename=1065106192512_Classificatio%20n.pdf&refID=113691). Acessado em: 04/2007.

York M, Steiling W. A Critical Review of the Assessment of Eye Irritation Potential Using the Draize Rabbit Eye Test. *Journal of Applied Toxicology*, 18:233–240, 1998.

Yudelman M *et al.* Pest Management and Food Production: Looking to the Future. International Food Policy Research Institute. Washington, 1998. Disponível em: <http://www.ifpri.org/2020/dp/dp25.pdf>. Acessado em: 01/2007.

Site acessado:

<http://pt.wikipedia.org/wiki/Herbicida>

ANEXO I – Tabelas de achados oculares macroscópicos (clínicos) dos pré-testes realizados com os Produtos 1, 2, 3 e 4

Tabela 1 – Resultados clínicos encontrados em 1 hora no pré-teste realizado com o Produto 1

Parâmetros avaliados	Alteração/animal	58	59	60	61
Córnea	Opacidade	0*	0*	0*	0*
	Área	0	0	0	0
Íris	Irite	0	0	0	0
	Hiperemia	1	1	1	1
Conjuntivas	Edema	1	1	1	1
	Secreção	1	1	1	1
	Fluoresceína	(+)	(+)	(+)	(+)

*leve diminuição do brilho normal; (+) fluorescência na superfície da córnea

Tabela 2 – Resultados clínicos encontrados em 24 horas no pré-teste realizado com o Produto 1

Parâmetros avaliados	Alteração/animal	59	60	61
Córnea	Opacidade	1	1	1
	Área	4	4	4
Íris	Irite	1 ^a	1 ^a	1 ^a
	Hiperemia	2	2	2
Conjuntivas	Edema	1	1	1
	Secreção	2	2	1
	Fluoresceína	(+)	(+)	(+)

^ahiperemia pericorneana; (+) fluorescência na superfície da córnea

Tabela 3 – Resultados clínicos encontrados em 48 horas no pré-teste realizado com o Produto 1

Parâmetros avaliados	Alteração/ animal	60	61
Córnea	Opacidade	1	1
	Área	4	4
Íris	Irite	1 ^a	1 ^a
Conjuntivas	Hiperemia	2	2
	Edema	1	1
	Secreção	2	2
Fluoresceína		(+)	(+)

^ahiperemia pericorneana; (+) fluorescência na superfície da córnea

Tabela 4 – Resultados clínicos encontrados em 72 horas no pré-teste realizado com o Produto 1

Parâmetros avaliados	Alteração/ animal	61
Córnea	Opacidade	1
	Área	4
Íris	Irite	1 ^a
Conjuntivas	Hiperemia	2
	Edema	0
	Secreção	1
Fluoresceína		(+)

^ahiperemia pericorneana; (+) fluorescência na superfície da córnea

Tabela 5 – Resultados clínicos encontrados em 1 hora no pré-teste realizado com o Produto 2

Parâmetros avaliados	Alteração/ animal	54	55	56	57
Córnea	Opacidade	0*	0*	0*	0*
	Área	0	0	0	0
Íris	Irite	0	0	0	0
Conjuntivas	Hiperemia	1	1	1	1
	Edema	1	1	1	1
	Secreção	1	1	1	1
Fluoresceína		(+)	(+)	(+)	(+)

*leve diminuição do brilho normal; (+) fluorescência na superfície da córnea

Tabela 6 – Resultados clínicos encontrados em 24 horas no pré-teste realizado com o Produto 2

Parâmetros avaliados	Alteração/ animal	55	56	57
Córnea	Opacidade	1	1	1
	Área	4	4	4
Íris	Irite	0	0	0
Conjuntivas	Hiperemia	2	2	2
	Edema	1	1	1
	Secreção	1	1	2
Fluoresceína		(+)	(+)	(+)

(+) fluorescência na superfície da córnea

Tabela 7 – Resultados clínicos encontrados em 48 horas no pré-teste realizado com o Produto 2

Parâmetros avaliados	Alteração/ animal	56	57
Córnea	Opacidade	2	2
	Área	4	4
Íris	Irite	0	0
Conjuntivas	Hiperemia	2	2
	Edema	1	1
	Secreção	2	2
Fluoresceína		(+)	(+)

(+) fluorescência na superfície da córnea

Tabela 8 – Resultados clínicos encontrados em 72 horas no pré-teste realizado com o Produto 2

Parâmetros avaliados	Alteração/ animal	57
Córnea	Opacidade	2
	Área	4
Íris	Irite	0
Conjuntivas	Hiperemia	2
	Edema	1
	Secreção	1
Fluoresceína		(+)

(+) fluorescência na superfície da córnea

Tabela 9 – Resultados clínicos encontrados em 1 hora no pré-teste realizado com o Produto 3

Parâmetros avaliados	Alteração/ animal	42	43	44	45
Córnea	Opacidade	1	2	3	2
	Área	4	4	1	4
Íris	Irite	1 ^a	1 ^a	1 ^a	1 ^a
Conjuntivas	Hiperemia	1	1	1	1
	Edema	1	1	1	1
	Secreção	1	1	1	1
Fluoresceína		(+)	(+)	(+)	(+)

^ahiperemia pericorneana; (+) fluorescência na superfície da córnea

Tabela 10 – Resultados clínicos encontrados em 24 horas no pré-teste realizado com o Produto 3

Parâmetros avaliados	Alteração/ animal	43	44	45
Córnea	Opacidade	3	4	2
	Área	1	1	4
Íris	Irite	1 ^a	1 ^a	1 ^a
Conjuntivas	Hiperemia	1	2	2
	Edema	1	1	1
	Secreção	1	1	1
Fluoresceína		(+)	(+)	(+)

^ahiperemia pericorneana; (+) fluorescência na superfície da córnea

Tabela 11 – Resultados clínicos encontrados em 48 horas no pré-teste realizado com o Produto 3

Parâmetros avaliados	Alteração/ animal	44	45
Córnea	Opacidade	4	2
	Área	1	4
Íris	Irite	1 ^a	1 ^a
Conjuntivas	Hiperemia	2	2
	Edema	0	0
	Secreção	1	1
Fluoresceína		(+)	(+)

^ahiperemia pericorneana; (+) fluorescência na superfície da córnea

Tabela 12 – Resultados clínicos encontrados em 72 horas no pré-teste realizado com o Produto 3

Parâmetros avaliados	Alteração/ animal	45
Córnea	Opacidade	2
	Área	2
Íris	Irite	1 ^a
Conjuntivas	Hiperemia	3
	Edema	0
	Secreção	1
Fluoresceína		(+)

^ahiperemia pericorneana; (+) fluorescência na superfície da córnea

Tabela 13 – Resultados clínicos encontrados em 1 hora no pré-teste realizado com o Produto 4

Parâmetros avaliados	Alteração/ animal	50	51	52	53
Córnea	Opacidade	4	4	3	4
	Área	1	1	4	1
Íris	Irite	1 ^a	1 ^a	1 ^a	1 ^a
Conjuntivas	Hiperemia	1	1	1	1
	Edema	1	1	1	1
	Secreção	0	0	0	0
Fluoresceína		(+)	(+)	(+)	(+)

^ahiperemia pericorneana; (+) fluorescência na superfície da córnea

Tabela 14 – Resultados clínicos encontrados em 24 horas no pré-teste realizado com o Produto 4

Parâmetros avaliados	Alteração/ animal	51	52	53
Córnea	Opacidade	4	4	4
	Área	2	3	1
Íris	Irite	1 ^a	1 ^a	1 ^a
Conjuntivas	Hiperemia	2	2	1
	Edema	1	1	1
	Secreção	1	2	1
Fluoresceína		(+)	(+)	(+)

^ahiperemia pericorneana; (+) fluorescência na superfície da córnea

Tabela 15 – Resultados clínicos encontrados em 48 horas no pré-teste realizado com o Produto 4

Parâmetros avaliados	Alteração/ animal	52	53
Córnea	Opacidade	4	4
	Área	2	1
Íris	Irite	1 ^a	1 ^a
Conjuntivas	Hiperemia	2	2
	Edema	1	1
	Secreção	2	1
Fluoresceína		(+)	(+)

^ahiperemia pericorneana; (+) fluorescência na superfície da córnea

Tabela 16 – Resultados clínicos encontrados em 72 horas no pré-teste realizado com o Produto 4

Parâmetros avaliados	Alteração/ animal	53
Córnea	Opacidade	2
	Área	1
Íris	Irite	1 ^a
Conjuntivas	Hiperemia	3
	Edema	1
	Secreção	2
Fluoresceína		(+)

^ahiperemia pericorneana; (+) fluorescência na superfície da córnea

ANEXO II – Tabelas de achados oculares macroscópicos (clínicos) dos testes realizados com os Produtos 1, 2, 3 e 4

Tabela 1 – Resultados clínicos encontrados em 1 hora nos animais tratados com o Produto 1

		Nº Animal																				
Parâmetros avaliados	Alteração	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Córnea	Opacidade	0*	0*	1	0*	0*	0*	0*	0*	1	0*	1	0*	0*	0*	0*	1	1	0*	1	0*	0*
	Área	0	0	4	0	0	0	0	0	4	0	4	0	0	0	0	4	4	0	4	0	0
Íris	Irite	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Conjuntivas	Hiperemia	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Edema	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1
	Secreção	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	0	1	1	2
Fluoresceína		(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

* leve diminuição do brilho normal; (+) fluorescência na superfície da córnea

Tabela 2 – Resultados clínicos encontrados em 24 horas nos animais tratados com o Produto 1

		Nº Animal																	
Parâmetros avaliados	Alteração	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Córnea	Opacidade	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1
	Área	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Íris	Irite	0	0	0	0	1 ^a	0	0	0	0	1 ^a	0	0	1 ^a	0	0	0	0	0
Conjuntivas	Hiperemia	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Edema	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
	Secreção	2	2	2 ^b	2	2	2	1	2	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1
Fluoresceína		(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

^a hiperemia pericorneana; ^b secreção muco purulenta; (+) fluorescência na superfície da córnea

Tabela 3 – Resultados clínicos encontrados em 48 horas nos animais tratados com o Produto 1

		Nº Animal															
Parâmetros avaliados	Alteração	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
Córnea	Opacidade	2	1	2	2	1	2	2	2	2	2	4	2	2	2	2	
	Área	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	1	4	4	4	4	
Íris	Irite	0	0	0	0	0	1 ^a	1 ^a	0	0	1 ^a	0	0	0	0	1 ^a	
Conjuntivas	Hiperemia	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
	Edema	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	
	Secreção	2 ^b	1 ^b	1	1	1	1	2	2	1	2 ^b	2 ^b	0	1	1	1	
Fluoresceína		(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	

^a hiperemia pericorneana; ^b secreção muco purulenta; (+) fluorescência na superfície da córnea

Tabela 4 – Resultados clínicos encontrados em 72 horas nos animais tratados com o Produto 1

		Nº Animal											
Parâmetros avaliados	Alteração	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Córnea	Opacidade	2	2	2	2	2	2	3	4	2	2	2	2
	Área	4	4	4	4	4	4	2	1	4	4	4	4
Íris	Irite	0	0	0	0	0	0	1 ^a	0	0	0	0	1 ^a
Conjuntivas	Hiperemia	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Edema	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	Secreção	1 ^b	1	1	1	1	1	2 ^b	2 ^b	0	0	1	1
Fluoresceína		(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

^a hiperemia pericorneana; ^b secreção muco purulenta; (+) fluorescência na superfície da córnea

Tabela 5 – Resultados clínicos encontrados em 7 dias nos animais tratados com o Produto 1

		Nº Animal								
Parâmetros avaliados	Alteração	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Córnea	Opacidade	1	0	1	4	2	1	2	0	0
	Área	1	0	4	1	4	1	4	0	0
Íris	Irite	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Conjuntivas	Hiperemia	1	0	1	2	0	0	1	0	0
	Edema	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Secreção	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Fluoresceína		(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)

(-) ausência de fluorescência; (+) fluorescência na superfície da córnea

Tabela 6 – Resultados clínicos encontrados em 14 dias nos animais tratados com o Produto 1

		Nº Animal					
Parâmetros avaliados	Alteração	16	17	18	19	20	21
Córnea	Opacidade	^a	1	0	0	0	0
	Área	^a	3	0	0	0	0
Íris	Irite	^a	0	0	0	0	0
Conjuntivas	Hiperemia	2	0	0	0	0	0
	Edema	0	0	0	0	0	0
	Secreção	0	0	0	0	0	0
Fluoresceína		(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)

^a não foi possível graduar devido à severidade das alterações na córnea; (-) ausência de fluorescência; (+) fluorescência na superfície da córnea

Tabela 7 – Resultados clínicos encontrados em 21 dias nos animais tratados com o Produto 1

		Nº Animal		
Parâmetros avaliados	Alteração	19	20	21
Córnea	Opacidade	0	0	0
	Área	0	0	0
Íris	Irite	0	0	0
Conjuntivas	Hiperemia	0	0	0
	Edema	0	0	0
	Secreção	0	0	0
Fluoresceína		(-)	(-)	(-)

(-) ausência de fluorescência na superfície da córnea

Tabela 8 – Resultados clínicos encontrados em 1 hora nos animais tratados com o Produto 2

		Nº Animal																				
Parâmetros avaliados	Alteração	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
Córnea	Opacidade	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	1	0*	1	1	0*	1	0*	0*	0*	1	0*	0*	0*
	Área	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	4	4	0	4	0	0	0	4	0	0	0
Íris	Irite	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Hiperemia	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Conjuntivas	Edema	1	1	1	2	2	1	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1
	Secreção	1	1	1	1	1	0	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	2	1
Fluoresceína		(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

* leve diminuição do brilho normal; (+) fluorescência na superfície da córnea

Tabela 9 – Resultados clínicos encontrados em 24 horas nos animais tratados com o Produto 2

		Nº Animal																		
Parâmetros avaliados	Alteração	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	
Córnea	Opacidade	1	1	1	1	1	2	1	2	2	1	2	2	1	1	2	1	2	1	
	Área	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
Íris	Irite	0	0	1 ^a	0	0	0	0	1 ^a	1 ^a	1 ^a	0	0	1 ^a	0	0	0	1 ^a	1 ^a	
	Hiperemia	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	
Conjuntivas	Edema	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	Secreção	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2	1	1	2	1	1	1	2	1	
Fluoresceína		(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	

^a hiperemia pericorneana; (+) fluorescência na superfície da córnea

Tabela 10 – Resultados clínicos encontrados em 48 horas nos animais tratados com o Produto 2

		Nº Animal														
Parâmetros avaliados	Alteração	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
Córnea	Opacidade	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2
	Área	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	2	4
Íris	Irite	0	0	0	0	1 ^a	1 ^a	1 ^a	0	0	0	0	0	1 ^a	1 ^a	0
Conjuntivas	Hiperemia	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Edema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	Secreção	1	0	0	2 ^b	1	1	2 ^b	2 ^b	1	1	1	1	1	2 ^b	1
Fluoresceína		(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

^a hiperemia pericorneana; ^b secreção muco purulenta; (+) fluorescência na superfície da córnea

Tabela 11 – Resultados clínicos encontrados em 72 horas nos animais tratados com o Produto 2

		Nº Animal											
Parâmetros avaliados	Alteração	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
Córnea	Opacidade	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Área	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Íris	Irite	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 ^a	0	0
Conjuntivas	Hiperemia	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Edema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Secreção	1 ^b	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1 ^b	1
Fluoresceína		(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

^a hiperemia pericorneana; ^b secreção muco purulenta; (+) fluorescência na superfície da córnea

Tabela 12 – Resultados clínicos encontrados em 7 dias nos animais tratados com o Produto 2

		Nº Animal									
Parâmetros avaliados	Alteração	34	35	36	37	38	39	40	41	42	
Córnea	Opacidade	1	1	0	2	0	1	2	0	0	
	Área	1	4	0	4	0	4	4	0	0	
Íris	Irite	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Conjuntivas	Hiperemia	1	0	0	1	0	1	1	0	0	
	Edema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Secreção	0	0	0	1	0	0	1	0	0	
Fluoresceína		(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	

(-) ausência de fluorescência; (+) fluorescência na superfície da córnea

Tabela 13 – Resultados clínicos encontrados em 14 dias nos animais tratados com o Produto 2

		Nº Animal					
Parâmetros avaliados	Alteração	37	38	39	40	41	42
Córnea	Opacidade	0	0	0	1	0	0
	Área	0	0	0	1	0	0
Íris	Irite	0	0	0	0	0	0
Conjuntivas	Hiperemia	0	0	0	0	0	0
	Edema	0	0	0	0	0	0
	Secreção	0	0	0	0	0	0
Fluoresceína		(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)

(-) ausência de fluorescência; (+) fluorescência na superfície da córnea

Tabela 14 – Resultados clínicos encontrados em 21 dias nos animais tratados com o Produto 2

		Nº Animal		
Parâmetros avaliados	Alteração	40	41	42
Córnea	Opacidade	0	0	0
	Área	0	0	0
Íris	Irite	0	0	0
Conjuntivas	Hiperemia	0	0	0
	Edema	0	0	0
	Secreção	0	0	0
Fluoresceína		(-)	(-)	(-)

(-) ausência de fluorescência na superfície da córnea

Tabela 15 – Resultados clínicos encontrados em 1 hora nos animais tratados com o Produto 3

		Nº Animal																				
Parâmetros avaliados	Alteração	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63
Córnea	Opacidade	1	1	1	1	4	1	2	4	4	2	1	1	2	4	2	2	2	2	2	1	2
	Área	4	4	4	4	1	4	4	1	1	4	4	4	4	1	4	4	4	4	4	4	4
Íris	Irite	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Conjuntivas	Hiperemia	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Edema	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	2	1
	Secreção	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Fluoresceína		(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

(+) fluorescência na superfície da córnea

Tabela 16 – Resultados clínicos encontrados em 24 horas nos animais tratados com o Produto 3

		Nº Animal																	
Parâmetros avaliados	Alteração	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63
Córnea	Opacidade	4	4	2	4	4	4	4	2	2	3	4	3	2	2	2	4	2	4
	Área	1	2	4	2	2	1	2	4	4	2	2	1	4	4	4	2	4	1
Íris	Irite	0	0	1 ^a	0	0	1 ^a	1 ^a	0	1 ^a	1 ^a	0	0	0	0	0	1 ^a	0	1 ^a
Conjuntivas	Hiperemia	1	2	1	1	2	1	1	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2
	Edema	1	1	0	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1
	Secreção	1	2 ^b	1 ^b	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	2	1	1
Fluoresceína		(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

^a hiperemia pericorneana; ^b secreção muco purulenta; (+) fluorescência na superfície da córnea

Tabela 17 – Resultados clínicos encontrados em 48 horas nos animais tratados com o Produto 3

		Nº Animal														
Parâmetros avaliados	Alteração	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63
Córnea	Opacidade	4	4	4	2	2	2	4	4	2	2	2	2	4	2	2
	Área	1	2	1	4	4	4	1	1	4	4	4	4	1	4	4
Íris	Irite	0	0	1 ^a	0	1 ^a	0	1 ^a	0	0						
Conjuntivas	Hiperemia	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Edema	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	Secreção	1 ^b	2 ^b	2 ^b	1	2	1	1	1 ^b	1	1	1	1 ^b	1	1	1
Fluoresceína		(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

^a hiperemia pericorneana; ^b secreção muco purulenta; (+) fluorescência na superfície da córnea

Tabela 18 – Resultados clínicos encontrados em 72 horas nos animais tratados com o Produto 3

		Nº Animal											
Parâmetros avaliados	Alteração	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63
Córnea	Opacidade	2	2	2	4	2	2	2	2	3	2	1	2
	Área	4	4	4	1	4	4	4	4	4	4	4	4
Íris	Irite	0	1 ^a	0	0	0	1 ^a	0	0				
Conjuntivas	Hiperemia	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2	2
	Edema	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0
	Secreção	1	1	1	1	1	1	0	1	2 ^b	0	0	0
Fluoresceína		(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

^a hiperemia pericorneana; ^b secreção muco purulenta; (+) fluorescência na superfície da córnea

Tabela 19 – Resultados clínicos encontrados em 7 dias nos animais tratados com o Produto 3

		Nº Animal									
Parâmetros avaliados	Alteração	55	56	57	58	59	60	61	62	63	
Córnea	Opacidade	4	3	3	3	1	4	3	0	0	
	Área	1	4	4	4	4	1	4	0	0	
Íris	Irite	0	1 ^a	1 ^a	0	0	0	0	0	0	
Conjuntivas	Hiperemia	1	2	2	2	1	3	2	1	1	
	Edema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Secreção	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
Fluoresceína		(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	

^a hiperemia pericorneana; (-) ausência de fluorescência; (+) fluorescência na superfície da córnea

Tabela 20 – Resultados clínicos encontrados em 14 dias nos animais tratados com o Produto 3

		Nº Animal					
Parâmetros avaliados	Alteração	58	59	60	61	62	63
Córnea	Opacidade	0	0	1	3	0	0
	Área	0	0	1	2	0	0
Íris	Irite	0	0	0	0	0	0
Conjuntivas	Hiperemia	0	0	1	1	0	0
	Edema	0	0	0	0	0	0
	Secreção	0	0	0	0	0	0
Fluoresceína		(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)

(-) ausência de fluorescência; (+) fluorescência na superfície da córnea

Tabela 21 – Resultados clínicos encontrados em 21 dias nos animais tratados com o Produto 3

		Nº Animal		
Parâmetros avaliados	Alteração	61	62	63
Córnea	Opacidade	1	0	0
	Área	2	0	0
Íris	Irite	0	0	0
Conjuntivas	Hiperemia	0	0	0
	Edema	0	0	0
	Secreção	0	0	0
Fluoresceína		(+)	(-)	(-)

(-) ausência de fluorescência; (+) fluorescência na superfície da córnea

Tabela 22 – Resultados clínicos encontrados em 1 hora nos animais tratados com o Produto 4

		Nº Animal																				
Parâmetros avaliados	Alteração	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
Córnea	Opacidade	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2	2	3	2	4	2	2	2	2	2	2	2
	Área	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	1	4	4	4	4	4	4
Íris	Irite	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Conjuntivas	Hiperemia	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Edema	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Secreção	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Fluoresceína		(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

(+) fluorescência na superfície da córnea

Tabela 23 – Resultados clínicos encontrados em 24 horas nos animais tratados com o Produto 4

		Nº Animal																	
Parâmetros avaliados	Alteração	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
Córnea	Opacidade	2	2	2	3	3	2	2	2	2	3	3	2	2	2	2	3	2	2
	Área	4	4	4	2	4	4	4	4	4	4	2	4	4	4	4	4	4	4
Íris	Irite	1 ^a																	
Conjuntivas	Hiperemia	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Edema	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	0
	Secreção	1	1 ^b	2	2	2	1	2	1	2	2	1	1	2	2	1	2	2	1
Fluoresceína		(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

^a hiperemia pericorneana; ^b secreção muco purulenta; (+) fluorescência na superfície da córnea

Tabela 24 – Resultados clínicos encontrados em 48 horas nos animais tratados com o Produto 4

		Nº Animal														
Parâmetros avaliados	Alteração	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
Córnea	Opacidade	3	3	2	2	2	3	4	3	2	2	3	2	3	2	2
	Área	3	4	4	4	4	4	2	2	4	4	4	4	4	4	4
Íris	Irite	1 ^a														
Conjuntivas	Hiperemia	2	2	2	2	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	3
	Edema	0	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	0	0	0	0
	Secreção	2 ^b	2 ^b	2 ^b	2 ^b	2	2 ^b	2	1	2	2 ^b	2 ^b	1	2 ^b	2 ^b	2 ^b
Fluoresceína		(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

^a hiperemia pericorneana; ^b secreção muco purulenta; (+) fluorescência na superfície da córnea

Tabela 25 – Resultados clínicos encontrados em 72 horas nos animais tratados com o Produto 4

		Nº Animal											
Parâmetros avaliados	Alteração	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
Córnea	Opacidade	2	2	3	4	3	2	2	3	2	4	4	2
	Área	4	4	4	2	2	4	4	4	4	1	1	4
Íris	Irite	1 ^a	0	1 ^a	1 ^a	1 ^a							
Conjuntivas	Hiperemia	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2
	Edema	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
	Secreção	2 ^b	2 ^b	2 ^b	2 ^b	2	1	1	2 ^b	1	2 ^b	2 ^b	1
Fluoresceína		(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

^a hiperemia pericorneana; ^b secreção muco purulenta; (+) fluorescência na superfície da córnea

Tabela 26 – Resultados clínicos encontrados em 7 dias nos animais tratados com o Produto 4

		Nº Animal								
Parâmetros avaliados	Alteração	76	77	78	79	80	81	82	83	84
Córnea	Opacidade	4	4	4	1	4	4	4	4	1
	Área	2	2	2	4	2	2	2	1	4
Íris	Irite	b	b	b	1 ^a	1 ^a	0	b	1 ^a	1 ^a
Conjuntivas	Hiperemia	1	2	2	2	2	1	2	2	1
	Edema	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Secreção	1	2	1	0	1	0	2	1	0
Fluoresceína		(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

^a hiperemia pericorneana; ^b não foi possível graduar devido à severidade das alterações na córnea; (+) fluorescência na superfície da córnea

Tabela 27 – Resultados clínicos encontrados em 14 dias nos animais tratados com o Produto 4

		Nº Animal					
Parâmetros avaliados	Alteração	79	80	81	82	83	84
Córnea	Opacidade	a	a	b	b	b	0
	Área	a	a	b	b	b	0
Íris	Irite	a	a	b	b	b	0
Conjuntivas	Hiperemia	2	2	b	b	b	0
	Edema	0	0	b	b	b	0
	Secreção	0	1	b	b	b	0
Fluoresceína		a	a	b	b	b	(-)

^a não foi possível graduar devido à severidade das alterações na córnea; ^b não foi possível avaliar devido ao rompimento da córnea; (-) ausência de fluorescência na superfície da córnea

Tabela 28 – Resultados clínicos encontrados em 21 dias nos animais tratados com o Produto 4

		Nº Animal		
Parâmetros avaliados	Alteração	82	83	84
Córnea	Opacidade	a	a	0
	Área	a	a	0
Íris	Irite	a	a	0
Conjuntivas	Hiperemia	a	a	0
	Edema	a	a	0
	Secreção	a	a	0
Fluoresceína		a	a	(-)

^a animal foi eutanasiado no 14º dia; (-) ausência de fluorescência na superfície da córnea