

NOTA TÉCNICA Nº 29/2022/SEI/GGTOX/DIRE3/ANVISA**Nota Técnica Conclusiva de Reavaliação do Carbendazim**

Apresenta as conclusões da reavaliação do Carbendazim após a Consulta Pública nº 1.099, de junho de 2022, sobre os desfechos toxicológicos que motivaram sua reavaliação (mutagenicidade, carcinogenicidade, toxicidade para o desenvolvimento embriofetal e neonatal e toxicidade para a fisiologia reprodutiva) e dos demais aspectos considerados relevantes, conforme disposto no Edital nº 01, de 19 de dezembro de 2019.

RESUMO

A Anvisa reavaliou o ingrediente ativo (IA) Carbendazim (CBZ) e concluiu pela proibição da produção, da importação, da exportação, da comercialização e/ou do uso desse IA no Brasil. A conclusão resultou em proposta de Resolução da Diretoria Colegiada, a qual foi objeto da Consulta Pública (CP) nº 1.099/2022. Todas as contribuições técnicas recebidas durante o período de CP e também nas diligências aos órgãos consultados foram analisadas e detalhadamente discutidas, mas não ensejaram em modificação dos aspectos técnicos submetido à CP. Desse modo, a conclusão decorre dos resultados positivos de estudos de mutagenicidade *in vivo* em células germinativas de mamíferos, que levam à classificação do CBZ como presumidamente mutagênico para células germinativas humanas (Categoria 1B). Além disso, há evidência suficiente em animais experimentais de que o produto causa efeito adverso sobre a fisiologia reprodutiva e sobre o desenvolvimento embriofetal e neonatal de seres humanos, que resultam na classificação do CBZ como presumidamente possui potencial de causar toxicidade reprodutiva para seres humanos (Categoria 1B). Ambos os desfechos toxicológicos e as respectivas categorias de classificação demandam a necessidade de proibição do registro de produtos à base deste IA, conforme determinado Lei nº 7.802/1989, pelo Decreto nº 4.074/2002 e pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) da Anvisa nº 294/2019, visto que condicionam a concessão de registro nessas categorias exclusivamente quando for possível determinar um limiar de dose que permita proceder com as demais etapas da avaliação do risco. Assim, concluiu-se com base no peso das evidências atualmente disponíveis, que o CBZ é um agente aneugênico e que não há evidência que permita estimar

adequadamente uma dose *in vivo* em que não se espera a ocorrência de danos cromossômicos às células germinativas em humanos. Isto é, não foi possível definir um limiar de dose adequado que seja capaz de prevenir a ocorrência dos efeitos aneugênicos induzidos pelo CBZ em células germinativas. Com relação à fisiologia reprodutiva, o CBZ produziu efeitos adversos por meio do mecanismo de aneugênese nos oócitos e espermatozoides, além de outros efeitos testiculares diretos decorrentes da inibição da polimerização dos microtúbulos. Ainda, não há evidências que permitam estimar uma dose segura *in vivo* em que não se espere a ocorrência desses danos cromossômicos às células germinativas em humanos; e, principalmente, não há evidências que permitam estimar uma dose segura *in vivo* em que não se espera a ocorrência desses efeitos sobre a fisiologia reprodutiva, os quais já foram verificados na menor dose testada, que foi 500 vezes inferior ao LOAEL definido para aneugenicidade em células germinativas. Logo, também não foi possível definir um limiar de dose capaz de impedir a ocorrência dos efeitos sobre a fisiologia reprodutiva induzidos pelo CBZ. Com relação aos efeitos sobre o desenvolvimento, o CBZ induziu as quatro manifestações da toxicidade para o desenvolvimento: 1) mortes, 2) anomalias estruturais, 3) alterações no crescimento e 4) déficits funcionais. Há indícios de que exposições únicas em dias específicos do período de organogênese já podem causar perdas pós-implantação e malformações graves em doses similares às que causaram esses efeitos após administração durante todo o período de organogênese. Além disso, a dinâmica dos microtúbulos regula as funções celulares no endométrio que o tornam receptivo ao embrião, cruciais durante a implantação embrionária. Como na menor dose testada já houve aumento significativo nas perdas pré-implantação em coelhos, não foi possível estabelecer um NOAEL para os efeitos do CBZ no desenvolvimento, que foram identificados em doses bastante inferiores ao NOAEL aneugênico em células somáticas. Isso indica que, além da maior susceptibilidade do organismo em desenvolvimento em relação a adultos, outros mecanismos relacionados à despolimerização dos microtúbulos (efeitos na migração e diferenciação celulares) podem estar atuando. Adicionalmente, foram observadas diferenças relevantes entre as espécies, com doses 30 vezes inferiores em ratos do que em camundongos sendo suficientes para causar efeitos similares, quando o fator de segurança padrão para extrapolação interespecie é de 10 vezes. Os efeitos entre as espécies variaram, de forma que, com o conhecimento atualmente disponível, não é possível explicar o porquê dessas diferenças ou quais efeitos poderiam ser induzidos em seres humanos após exposição a esse IA. Logo, também não foi possível definir um limiar de dose seguro para os efeitos adversos do CBZ sobre o desenvolvimento embriofetal e neonatal. Além de ser classificado em categorias toxicológicas proibitivas de registro pela indução de

mutagenicidade e toxicidade reprodutiva sem a possibilidade de determinação de limiar que adequadamente proteja a população humana exposta, o CBZ foi classificado como presumidamente carcinogênico para humanos (Categoria 1B). Para este desfecho, foi possível determinar um limiar de dose adequado para proteção da saúde da população. Assim, foi determinada como dose de referência humana para esse desfecho o valor de 0,0225 mg/kg p.c./dia, abaixo do qual não se espera nem mesmo a ocorrência de efeitos tóxicos pré-neoplásicos ou aneugênese em células somáticas, que é o mecanismo provável de carcinogenicidade para esse IA. O CBZ também foi classificado na Categoria 1 quanto à toxicidade a órgão-alvo específico após exposição única, pois leva a dano testicular (azoospermia e degeneração celular) em doses ≥ 50 mg/kg, e na Categoria 2 quanto à toxicidade a órgão-alvo específico após exposição repetida, com base na toxicidade hepática em doses ≥ 16 mg/kg p.c./dia. Foi identificado ainda que duas impurezas possuem importância toxicológica, a aminohidroxifenazina (AHP) e a diaminofenazina (DAP), devido a suas ações mutagênicas e, portanto, elas devem ser limitadas nos produtos técnicos às concentrações de 0,0005 g/kg e de 0,0006 g/kg, respectivamente. A partir dos usos aprovados de CBZ, verificou-se que existe potencial relevante de exposição pela via dietética (consumo de alimentos e ingestão de água), ocupacional (operadores e trabalhadores) e de residentes e transeuntes. Conclui-se, portanto, que o CBZ possui impurezas toxicologicamente relevantes e deve ser classificado nas seguintes categorias toxicológicas: Categoria 1 quanto à toxicidade a órgão-alvo por exposição única; Categoria 2 quanto à toxicidade a órgão-alvo por exposição repetida; Categoria 1B quanto à mutagenicidade, carcinogenicidade e toxicidade reprodutiva. Por não ser possível estabelecer limiar seguro para mutagenicidade e toxicidade reprodutiva, o CBZ deve ser proibido como IA de agrotóxicos no Brasil.

SIGLAS E ABREVIATURAS

Anvisa: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AHP: Aminohidroxifenazina

AIR: Análise de impacto regulatório

AOEL: *Acceptable Operator Exposure Level* (Nível aceitável de exposição ocupacional)

AOP: *Adverse Outcome Pathway* (Via de Efeito Adverso)

APMVA: *Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority* (Autoridade Australiana de Pesticidas e Medicamentos Veterinários)

AR: Avaliação de risco

BMDL: *Benchmark Dose Lower Bound* (Limite Inferior do Intervalo de Confiança da Dose Modelada)

CBZ: Carbendazim

CNA: Confederação Nacional da Agricultura
CP: Consulta Pública
Creav: Coordenação de Reavaliação de Agrotóxicos
DAP: Diaminofenazina
Dicol: Diretoria Colegiada da Anvisa
DG: Dia gestacional
DRfA: Dose de Referência Aguda
EChA: *European Chemicals Agency* (Agência Europeia de Químicos)
EFSA: *European Food Safety Authority* (Autoridade Europeia para Segurança dos Alimentos)
Embrapa: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPI: Equipamento de proteção individual
FT: Força-tarefa
GEMAR: Gerência de Monitoramento e Avaliação do Risco
GGTOX: Gerência-Geral de Toxicologia
IA: Ingrediente ativo
Ibama: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IDA: Ingestão diária aceitável
JMPR: *Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues* (Comitê de Especialistas FAO/OMS sobre Resíduos de Agrotóxicos)
LMR: Limite máximo de resíduos
LOAEL: *Lowest Observed Adverse Effect Level* (Nível mais Baixo de Efeito Adverso Observado)
MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MoA: Modo de ação
MPF: Ministério Público Federal
NOAEL: *No Observed Adverse Effect Level* (Nível de Efeito Adverso não Observado)
NT: Nota Técnica
PARA: Programa de avaliação de resíduos em alimentos
PL: Projeto de Lei
PoD: *Point of Departure* (Ponto de partida)
PMRA: *Health Canada's Pest Management Regulatory Agency* (Agência Reguladora de Controle de Pragas Canadense)
RDC: Resolução da Diretoria Colegiada
SAA: Sistemas de Abastecimento de Água
SAC: Solução Alternativa Coletiva
SAI: Solução Alternativa Individual
SBTox: Sociedade Brasileira de Toxicologia
SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificação
TGI: Trato gastrointestinal

TM: Tiofanato-metílico

TR: Toxicidade reprodutiva

USEPA: *United States Environmental Protection Agency* (Agência de Proteção Ambiental Americana)

Vigiagua: Programa Nacional de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano

VMP: Valor máximo permitido

WoE: *Weight of Evidence* (Peso da evidência)

RELATÓRIO

A reavaliação toxicológica do ingrediente ativo (IA) Carbendazim (CBZ) foi instituída por meio do Edital nº 01, de 19 de dezembro de 2019, em razão das suspeitas de mutagenicidade, de carcinogenicidade, de toxicidade para a fisiologia reprodutiva e de toxicidade para o desenvolvimento embriofetal e neonatal.

O escopo da reavaliação do CBZ incluiu, conforme elencado no documento preparatório do início da reavaliação, a caracterização da sua identidade e propriedades físico-químicas e análise de suas impurezas e de seus produtos de degradação; detalhamento da exposição humana dietética (pelo consumo de água e alimentos), ocupacional e de residentes e transeuntes; caracterização e classificação da sua toxicocinética, toxicidade aguda e toxicidade relacionada a desfechos não proibitivos de registro; e avaliação dos efeitos à saúde para os critérios proibitivos de registro com conclusão sobre o seu potencial mutagênico, carcinogênico e de toxicidade para a fisiologia reprodutiva e para o desenvolvimento embriofetal e neonatal.

A reavaliação do CBZ seguiu as determinações estabelecidas na Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) da Anvisa nº 221, de 28 de março de 2018. Conforme determinado na primeira reunião de reavaliação desse IA, em 27 de janeiro de 2020, a GGTOX recebeu das empresas registrantes, após o prazo de 180 dias, os documentos necessários para dar início à avaliação toxicológica. Paralelamente ao prazo concedido às empresas para a entrega dos documentos, a GGTOX realizou a busca sistematizada das referências bibliográficas na literatura científica e a seleção dessas referências, de acordo com o escopo da reavaliação.

Durante a análise toxicológica do CBZ, foram elaborados sete pareceres específicos sobre os aspectos relevantes incluídos no escopo dessa reavaliação. Nesses pareceres, foram incluídas discussões aprofundadas sobre as referências da literatura científica selecionadas após a busca sistematizada, sobre os relatórios e estudos encaminhados pelas empresas registrantes e pela Força Tarefa (FT) de Reavaliação do CBZ, além

daqueles descritos nos relatórios de organismos regulatórios internacionais, bem como as conclusões desses organismos. Nesses pareceres, também foram incluídas as conclusões e encaminhamentos da reavaliação do CBZ sobre os tópicos específicos estudados.

Destaca-se que foi proferida decisão judicial da 6ª Vara Regional Federal/DF, em 09 de junho de 2022, referente à Ação Civil Pública nº 0051862-73.2013.4.01.3400, ajuizada pelo Ministério Público Federal (MPF), determinando a conclusão da reavaliação do ingrediente ativo CBZ no prazo máximo de 60 (sessenta) dias, contados da intimação, sob pena de multa diária de quinhentos reais. Diante desta decisão, em 21 de junho de 2022, a Diretoria Colegiada da Anvisa (Dicol) reuniu-se e determinou a suspensão cautelar da importação, fabricação, comercialização e distribuição do ingrediente ativo CBZ até conclusão da reavaliação toxicológica. Ainda, foi determinada a abertura do processo de Consulta Pública (CP) da proposta de RDC de reavaliação do CBZ e adoção de cronograma para conclusão do processo. Cabe ressaltar que essa decisão não trouxe prejuízos à análise técnica, tendo em vista a robustez da avaliação realizada pelos servidores da Anvisa durante todo o período da reavaliação do IA, a qual resultou na elaboração dos pareceres mencionados.

Como etapa essencial da reavaliação, determinada no Artigo 3º, Inciso VII, da RDC nº 221/2018, esta Nota Técnica (NT) conclusiva reúne os resultados da avaliação do peso das evidências (WoE) para todas as análises realizadas, avalia as contribuições relevantes provenientes da CP para a conclusão sobre aspectos técnicos e visa resumir as conclusões da reavaliação do CBZ, além de propor minuta de RDC final com as recomendações para a proteção da saúde da população brasileira.

As contribuições à CP foram discutidas nos tópicos específicos desta NT conclusiva, de acordo com o assunto que abordaram. Na CP também foram recebidos documentos corroborando ou concordando integralmente com a análise técnica publicada na NT preliminar (SBTox, 2022; Coutinho et al., 2006). O documento enviado pela FT (Innvitro, 2022), concordou parcialmente com a análise da GGTOX, apresentando divergências nas conclusões relacionadas à possibilidade de estabelecimento de limiar para mutagenicidade, toxicidade para a fisiologia reprodutiva e toxicidade para o desenvolvimento embrionário e neonatal. Todos os argumentos apresentados pela FT foram profundamente discutidos nesta NT conclusiva. Também foram entregues documentos relacionados a aspectos agrônômicos e econômicos, os quais foram abordados nesta NT, no item 6 - Consolidação das contribuições à Consulta Pública nº 1.099/2022.

Cabe ressaltar que o documento enviado pela Sociedade Brasileira de Toxicologia (SBTox, 2022) foi enfático ao concordar com a análise feita pela GGTOX e destacou que a proteção da saúde humana e ambiental serão comprometidas em um cenário de continuidade do uso do CBZ no Brasil, manifestando-se **“veementemente a favor da resolução da ANVISA que estabelece a proibição do ingrediente ativo CBZ em produtos agrotóxicos no país”**.

BUSCA SISTEMATIZADA E SELEÇÃO DE REFERÊNCIAS DETALHADAS NO PARECER Nº 07/2021 (ANEXO 1 – SEI Nº [1451178](#)).

A reavaliação permite que IA de agrotóxicos com indícios de características impeditivas de registro sejam revistos à luz do conhecimento atual, de forma a garantir que alterações ou cancelamento de registro possam ser realizados, caso se conclua pela inaceitabilidade dos riscos à saúde. Para alcançar essa conclusão, é necessária a avaliação de todas as evidências disponíveis sobre os aspectos toxicológicos do IA. Por isso, o processo de reavaliação toxicológica de IA de agrotóxicos no âmbito da GGTOX inclui a etapa de busca sistematizada da literatura científica.

A busca sistematizada das referências foi realizada por terceiro por meio de Ordem de Serviço nº 001/2020 que especificou o seu formato e critérios. A busca foi seguida de seleção das referências relevantes, que leva em consideração os aspectos toxicológicos abordados na reavaliação de IA de agrotóxicos, bem como a relevância dos estudos no contexto regulatório. A estratégia de busca nas bases de dados, bem como os resultados com todas as referências encontradas, foram detalhadamente descritos no Parecer nº 07/2021 (Anexo 1 – SEI nº [1451178](#)).

Com relação à exposição humana, a busca sistemática encontrou 10 referências e a seleção dos revisores internos identificou oito artigos relevantes para análise, principalmente estudos de resíduos em culturas alimentares e um estudo de intoxicação humana. Para toxicidade reprodutiva e desregulação endócrina, a busca sistematizada encontrou 65 referências e 59 foram consideradas relevantes para análise. Ainda, a busca sistematizada encontrou 95 referências contendo informações sobre citotoxicidade e mutagenicidade e 78 foram consideradas relevantes para análise, dentre elas estudos *in vitro* e *in vivo* específicos de mutagenicidade, estudos de citotoxicidade e genotoxicidade geral, estudos mecanísticos e estudos envolvendo células germinativas. A busca sistematizada também obteve 16 referências contendo informações sobre carcinogenicidade e oito foram consideradas relevantes para análise, sendo sete artigos envolvendo estudos em animais e um artigo com estudo *in vitro*. Para outros aspectos toxicológicos, 11 referências foram encontradas, sendo sete artigos relevantes e outros quatro descartados.

Com relação à busca de documentos em agências reguladoras e outras instituições internacionais, foram encontrados, no total, 46 documentos das seguintes autoridades internacionais: Autoridade Australiana de Pesticidas e Medicamentos Veterinários (*Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority – APVMA*), Agência Europeia de Químicos (*European Chemicals Agency – EChA*), Autoridade Europeia para Segurança Alimentar (*European Food Safety Authority – EFSA*), Comitê de Especialistas FAO/OMS sobre Resíduos de Agrotóxicos (*Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues – JMPR*), Agência Reguladora de Controle de Pragas Canadense (*Health Canada Pest Management Regulatory Agency – PMRA*) e Agência de Proteção Ambiental Americana (*United States Environmental Protection Agency – USEPA*).

Além dos documentos obtidos na busca sistematizada, foram incluídas nas análises de reavaliação toxicológica do CBZ as referências encontradas nos relatórios das autoridades regulatórias internacionais, os estudos apresentados pelas empresas registrantes e outras referências necessárias para subsidiar as discussões sobre os aspectos toxicológicos avaliados.

É relevante mencionar que os aspectos toxicológicos que se enquadram em critérios de proibitivos de registro são detalhadamente avaliados e uma grande quantidade de estudos é utilizada para subsidiar as conclusões dos pareceres. Assim, para a avaliação desses desfechos, foram utilizados estudos perfazendo um total de: 59 para mutagenicidade, 13 para carcinogenicidade, 29 para toxicidade sobre o desenvolvimento e 48 para toxicidade sobre a fisiologia reprodutiva. Vale ressaltar que alguns estudos são utilizados predominantemente para um desses desfechos e, portanto, a análise é incluída em apenas um parecer. Entretanto, várias dessas evidências também subsidiam as discussões de outros desfechos. Por outro lado, alguns estudos avaliam detalhadamente mais de um desfecho e, nesses casos, a análise do estudo é incluída em mais de um parecer.

CONTEXTUALIZAÇÃO

Características do CBZ

O CBZ é um fungicida sistêmico de amplo espectro, pertencente à classe dos benzimidazóis, cuja ação pesticida decorre da inibição da polimerização de β -tubulina, o que impede a formação adequada do fuso acromático e, conseqüentemente, prejudica o processo de divisão celular. O CBZ é um metabólito do fungicida Tiofanato-metílico (TM), o qual também possui registro no Brasil; e do composto Benomil, que teve sua Monografia excluída pela Anvisa em 2002.

Usos atualmente aprovados para produtos à base de CBZ

No Brasil, o CBZ tem o uso agrícola aprovado para a modalidade foliar nas culturas de algodão, cana de açúcar, cevada, citros, feijão, maçã, milho, soja e trigo e para a aplicação em sementes nas culturas de algodão, arroz, feijão, milho e soja. Ainda, é aprovado o uso não agrícola como preservante de madeira. Seu uso como domissanitário não é permitido.

Situação Nacional do CBZ

Existem 41 produtos formulados e 33 produtos técnicos à base de CBZ com registro ativo no Brasil e um total de 25 empresas detentoras de registros de produtos formulados e técnicos (dados extraídos do Agrofit em 15 de julho de 2022). A empresa registrante Bayer, cumprindo o seu plano de descontinuação apresentado em reunião realizada em 17 de dezembro de 2019, já solicitou o cancelamento do registro de todos os seus produtos.

O CBZ é bastante comercializado no Brasil. A Figura 1 apresenta a progressão da quantidade de toneladas comercializadas de produtos formulados à base de CBZ de 2010 a 2019 (dados extraídos do portal do Ibama em 17 de maio de 2021). Verifica-se que houve tendência de redução do uso desse IA de 2011 a 2015, com pouca variação a partir de 2015 e leve aumento nos anos de 2018 e 2019. Essa tendência de redução no uso também pode ser observada pela queda na posição de comercialização de CBZ em relação aos demais IA (números em amarelo na Figura 1), com o CBZ passando a não figurar entre os dez agrotóxicos mais comercializados a partir de 2013 (o *ranking* conta com cerca de 90 IA). Entretanto, verifica-se que o CBZ continua a ocupar posição de comercialização relevante, consistentemente entre os 20 agrotóxicos mais comercializados.

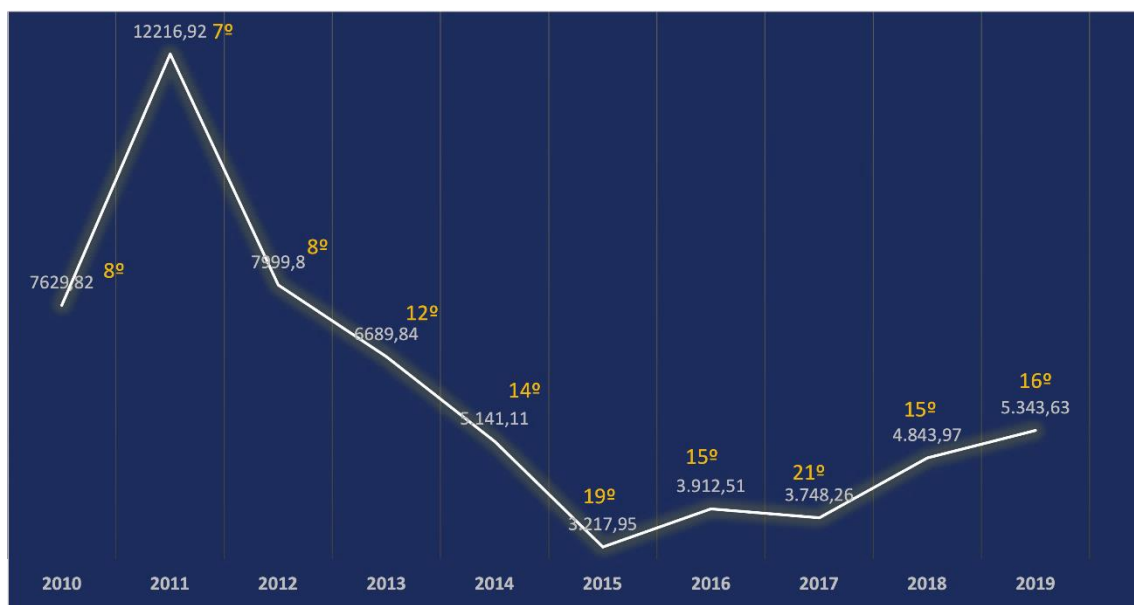


Figura 1. Em branco, toneladas de produtos formulados à base de Carbendazim (CBZ) comercializadas entre os anos de 2010 e 2019 e, em amarelo, posição do CBZ no *ranking* de toneladas de ingredientes ativos de agrotóxicos comercializadas entre os anos de 2010 e 2019.

Fonte: Ibama – Relatório de comercialização de agrotóxicos.

Situação Internacional do CBZ

O CBZ não é registrado no Canadá e nos Estados Unidos para uso em culturas alimentares (PMRA, 2019; USEPA, 2020). Porém, em reavaliações recentes, as agências regulatórias desses dois países concluíram que o CBZ é mutagênico, carcinogênico, promove degeneração testicular e é tóxico para o desenvolvimento embrionário (aumento de reabsorções e redução de implantações). A USEPA (2020) e a PMRA (2019) determinaram doses de referência para avaliação de risco (AR) de agrotóxicos à base desse IA, pois ele é produto de degradação do TM, agrotóxico com uso aprovado nesses países.

Na Europa, o uso de CBZ não é aprovado (UE, 2021). Em 2015, o CBZ foi incluído na lista de agrotóxicos candidatos para substituição por preencher critérios proibitivos de registro da legislação europeia, sendo classificado na Categoria 1B para toxicidade reprodutiva (UE, 2015). Atualmente, o CBZ também está classificado na Categoria 1B para mutagenicidade. Esses dois aspectos toxicológicos são proibitivos de registro na Europa (UE, 2021).

Em 2021, diante da necessidade de estabelecimento de tolerância para alimentos importados pela Europa, a União Europeia exigiu da EFSA a elaboração de relatório acerca do potencial clastogênico do CBZ. Ainda, em caso de exclusão de clastogenicidade, a EFSA deveria determinar valores de referência toxicológicos para realizar a AR dietético e a avaliação dos Limites Máximos de Resíduos (LMR). Isso se fez necessário pois, embora atualmente o CBZ não seja mais autorizado na União Europeia, as tolerâncias de importação continuam em vigor. No seu relatório, a EFSA (2021c) concluiu que o CBZ não é clastogênico, mas é aneugênico. Os valores de referência utilizados para o CBZ foram aqueles estabelecidos quando ele ainda era autorizado na Europa (IDA e DRfA de 0,02 mg/kg p.c./dia). A EFSA considerou que tais valores também poderiam ser usados para o potencial aneugênico. Na AR dietético, a EFSA constatou que há lacunas de dados, associada a um possível risco dietético agudo para os consumidores. Desse modo, a agência europeia concluiu que a AR dietético conduzida deve ser considerada apenas indicativa, uma vez que todas as propostas de LMR derivadas ainda requerem uma análise mais aprofundada pelos gestores de risco e que medidas para redução da exposição do

consumidor também devem ser consideradas. Vale lembrar que na Europa a mutagenicidade é um critério proibitivo de registro de agrotóxicos. Por outro lado, nesse contexto específico de importação de alimentos, há a necessidade de se proceder com uma AR, mesmo a substância estando proibida no país. Logo, verifica-se que a AR é feita independentemente da completa e aprofundada caracterização dose-resposta e de um forte embasamento experimental.

A APVMA (2012), em sua última reavaliação, concluiu que o CBZ causa malformações congênitas e infertilidade masculina irreversível e recomendou a inclusão na bula de frases alertando sobre esses perigos. Como a agência australiana não possui critérios proibitivos de registro, alguns usos aprovados para o CBZ foram mantidos mesmo após essas conclusões. Entretanto, houve descontinuação para os usos em que foi identificado risco inaceitável à saúde humana (pré-colheita e pós-colheita em uvas, corcubáceas, melões, frutas cítricas, maçã, manga, pomóideas e frutas de caroço, rosas, turfa e trevos) e para os usos em que não havia dados suficientes para adequada avaliação de risco (banana, morango, pastos, gengibre e cana-de-açúcar).

CONCLUSÃO DA GGTOX SOBRE OS EFEITOS À SAÚDE CAUSADOS PELO CBZ

Impurezas, produtos de degradação e definição de resíduos para o CBZ detalhados no Parecer nº 06/2021 (Anexo 2 – SEI nº [1437066](#)).

Além de ser registrado no Brasil como IA, o CBZ é metabólito do fungicida TM, o qual também possui registro no Brasil, e do composto Benomil, que teve sua Monografia excluída pela Anvisa em 2002. A aminohidroxifenazina (AHP) e a Diaminofenazina (DAP) são duas impurezas toxicologicamente relevantes para os produtos à base de CBZ, devido às suas ações mutagênicas. Portanto, elas devem ser limitadas nos produtos técnicos às concentrações de 0,0005 g/kg e de 0,0006 g/kg, respectivamente.

Com relação às propriedades físico-químicas, esse IA apresenta baixa solubilidade em água, baixa volatilidade, moderada lipossolubilidade e alta estabilidade no ambiente, a qual é afetada por aumento no pH e temperatura.

A principal via de exposição da população ao CBZ é por meio da ingestão de resíduos em culturas alimentares, sendo mantida a atual definição de resíduo prevista na monografia desse IA como a quantidade total de CBZ, em alinhamento às definições de resíduos das principais agências reguladoras internacionais.

Exposição humana ao CBZ detalhada no Parecer nº 03/2021 (Anexo 3 – SEI nº [1392941](#)) e no Parecer nº 26/2021 (Anexo 9 – SEI nº [1705915](#)).

A partir dos usos aprovados de CBZ, verificou-se potencial exposição pela via dietética (consumo de alimentos e ingestão de água), ocupacional (operadores e trabalhadores) e de residentes e transeuntes. Com base nos dados de monitoramento em água e alimentos, nos relatórios das principais agências reguladoras de agrotóxicos e nos estudos obtidos na busca sistemática, concluiu-se que há um potencial relevante de exposição humana dietética, por meio do consumo de alimentos e ingestão de água, e ocupacional, para residentes e transeuntes, pelas vias cutânea e inalatória. Esses cenários de potencial risco à população brasileira ensejam preocupação, uma vez que o CBZ foi caracterizado como mutagênico, carcinogênico e tóxico para a fisiologia reprodutiva e para o desenvolvimento embriofetal e neonatal.

Intoxicações

A GGTOX analisou os dados de notificação de intoxicação por CBZ obtidos do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), referentes ao período de 2008 a 2018. Verificou-se, de modo geral, um perfil oscilatório do número de notificações ao longo dos anos, sem relação aparente com o perfil de vendas desse IA. No intervalo de 10 anos, 37 casos de intoxicação foram confirmados, os quais se enquadraram no seguinte perfil: homens, adultos, brancos, trabalhadores agrícolas registrados e autônomos, com nível de escolaridade muito baixo; expostos no ambiente de trabalho, com uso acidental do produto, durante a atividade de pulverização, pelas vias inalatória e dérmica, na lavoura de soja. Vale destacar a ocorrência de dois casos de intoxicação nas lavouras de café e melão, para as quais não há aprovação do uso de CBZ. Os casos foram de gravidade leve, com evolução para cura sem sequelas em 86% deles.

Água

O programa de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano (Vigiagua) do Ministério da Saúde estabelece, por meio da Portaria nº 2.914/2011, um valor máximo permitido (VMP) de resíduos de CBZ de 120,0 µg/L. Os dados do Vigiagua foram analisados detalhadamente para os anos de 2014 a 2019 em relação à detecção de CBZ. Os bancos de dados foram obtidos do portal de dados abertos do governo federal e, após exclusão dos registros com inconsistências, uma análise descritiva foi realizada. Foram obtidos 68.941 registros e 5.624 (8,2%) deles foram excluídos por apresentarem inconsistências. Foram analisados 63.317 registros de amostras e destas, 15,45% (9.784/63.310) apresentaram detecção de CBZ, com mediana da concentração em 2 µg/L (mínimo 0,01 e

máximo de 662,0). Duas amostras apresentaram valores acima do VMP. Nas amostras coletadas nos sistemas de abastecimento de água (SAA), 16,44% (6.413/39.008) detectaram CBZ, sendo que em 13,12% (3.761/28.660) das amostras coletadas na saída do tratamento e em 28,58% (1.041/3.519) das amostras coletadas no sistema de distribuição houve detecção de CBZ. Entre as amostras coletadas nas soluções alternativas coletivas (SAC), 10,33% (2.383/23.060) apresentavam CBZ. Nas SAC, entre as amostras coletadas no ponto de consumo, em 22,5% (198/898) detectou-se de CBZ. Das amostras obtidas das soluções alternativas individuais (SAI), 79,10% (988/1.249). Conclui-se que a exposição dietética ao CBZ na água de abastecimento humano no Brasil é relevante e os métodos de tratamento não foram capazes de eliminar os resíduos de CBZ antes de chegar aos consumidores da água.

Alimentos

Em alinhamento aos dados das demais agências internacionais e dos estudos científicos avaliados, também se verifica exposição dietética ao CBZ por meio de alimentos. De acordo com o último relatório do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos (PARA), constatou-se que o CBZ foi detectado em 24% das amostras no ciclo de coletas de 2013-2015 e foi o terceiro IA mais detectado no ciclo 2017-2018, estando presente em 11% das amostras. Destaca-se ainda que, no ciclo 2017-2018, o número de irregularidades (valores acima do LMR ou resíduos em culturas não autorizadas) foi menor que no ciclo anterior. Ainda, no ciclo 2013-2015, verificou-se potencial risco dietético agudo para as culturas de abacaxi e mamão, enquanto no ciclo 2017-2018 não se verificou risco dietético agudo em nenhuma amostra. Contudo, com a publicação da RDC nº 295, de 29 de julho de 2019, houve mudança da dose de referência aguda (DRfA) adotada na avaliação dos resultados do ciclo de 2017-2018, de modo que os resultados dos diferentes ciclos não são comparáveis. Adicionalmente, não foi verificado risco dietético crônico nas amostras analisadas no período de 2013 a 2018.

É importante ressaltar que, nessas análises, foram considerados os LMR estabelecidos nas monografias do CBZ e do TM, uma vez que o segundo se converte no primeiro composto pela metabolização. Saliencia-se ainda que a conversão do TM em CBZ também pode ocorrer durante a análise laboratorial, a depender da metodologia analítica utilizada (Nakamura, 2010; JMPR, 2003; Anastassiades, 1998). Desse modo, não é possível dizer se todo o CBZ detectado estava de fato presente como CBZ ou como TM nas amostras analisadas.

Além disso, o risco dietético foi determinado com base nas doses de referência vigentes, as quais, após esta reavaliação, mostram-se inadequadas.

Exposição ocupacional, de residentes e de transeuntes

Nos relatórios das agências reguladoras internacionais, a conclusão sobre a exposição ocupacional ao CBZ é variável, visto que somente a Austrália ainda permite o seu uso agrícola; enquanto nos EUA e Canadá seu uso é permitido apenas em plantas ornamentais com aplicação por injeção e como preservativo industrial.

A agência australiana identificou risco ocupacional para operadores e trabalhadores de reentrada com base nos padrões de uso aprovados naquele país, com a necessidade de adoção de medidas de mitigação. Adicionalmente, foi identificado risco inaceitável à população em geral, referente à exposição dérmica e oral, com proibição do uso de CBZ em parques, campos de golfe e demais campos esportivos, bem como em gramados comerciais.

Na literatura científica, estudos relataram potencial relevância na exposição ocupacional ao CBZ. A exposição inalatória ao CBZ não foi preocupante nesses estudos, entretanto a exposição cutânea foi relevante, com detecção de altos níveis nos antebraços, mãos, tórax e pernas dos participantes do estudo, o que indicou fragilidades nas áreas de sobreposição das partes dos equipamentos de proteção individual (EPI). Ainda, a baixa escolaridade, associada à carência de orientação e assistência técnica, são fatores que predisõem a ocorrência de irregularidades no uso de agrotóxicos, desde a compra até sua aplicação. Isso representa um potencial risco à saúde dos trabalhadores rurais brasileiros.

Logo, verifica-se relevante exposição ocupacional ao CBZ em diversos cenários. Cabe lembrar que as AR relatadas foram feitas com base em doses de referências que não são consideradas adequadas, uma vez que esse IA deve ser considerado mutagênico e tóxico para a reprodução e desenvolvimento embrionário e neonatal, sem possibilidade de estabelecer limiar de dose humana, conforme será discutido nos próximos itens desta NT.

Efeitos à saúde humana não proibitivos de registro detalhados no Parecer nº 10/2021 (Anexo 4 – SEI nº [1463526](#)).

Conforme detalhado nos tópicos a seguir, foram identificados alguns efeitos tóxicos relevantes não proibitivos de registro para o CBZ relacionados à sua toxicidade para o testículo e para o fígado, o que levou à classificação desse IA na Categoria 1 quanto à toxicidade para órgão-alvo

específico após exposição única e na Categoria 2 quanto à toxicidade para órgão-alvo específico após exposição repetida, conforme critérios estabelecidos na RDC nº 294, de 29 de julho de 2019.

Toxicocinética

Na análise dos parâmetros toxicocinéticos, verificou-se que o CBZ possui rápida absorção pelo trato gastrointestinal (TGI), com elevada biodisponibilidade (85% após dose única via oral). É extensamente metabolizado pelo sistema microssomal hepático, formando como principal metabólito o 5-hidroxi-carbendazim (5-HBC). Em menor escala (2-4%), ocorre a formação de 2-aminobenzimidazol (2-AB) no plasma sanguíneo e em outros órgãos. Não há relato de acumulação tecidual do CBZ ou de seus metabólitos. Maiores níveis foram observados no fígado, seguido por rins, pele, TGI, sangue e pulmões. Embora os testículos sejam um órgão-alvo do CBZ, não houve detecção de resíduos nesse órgão.

Não foi relatada diferença mensurável quanto ao perfil de metabólitos do CBZ em ratos e camundongos, embora tenha ocorrido a saturação do mecanismo de desintoxicação hepática de forma mais pronunciada em camundongos, quando tratados com altas doses (300 mg/kg p.c./dia) por 29 dias, o que acarretou sinais de hepatotoxicidade. Em ratos, por outro lado, observou-se um aumento dessa capacidade de detoxificação com a exposição repetida, com maior taxa de eliminação. A etapa de excreção ocorre de forma rápida, predominantemente pela urina; e pelas fezes com o aumento da dose. A maioria dos metabólitos foi detectada na forma conjugada.

Toxicidade aguda

O CBZ apresenta baixa toxicidade para a exposição aguda pelas vias oral, cutânea e inalatória e não apresenta potencial para causar irritação cutânea ou ocular, nem é sensibilizador cutâneo. Os principais efeitos relatados após exposição aguda via oral em animais foram perda de peso, redução no consumo de alimentos e comprometimento de alguns órgãos-alvo, tais como: fígado (alterações bioquímicas, reação inflamatória, hipertrofia dos hepatócitos, infiltração periportal), rins (lesões degenerativas) e testículos (azoospermia, degeneração celular); além de mortalidade em ratos.

Com base nos resultados de estudos com ratos, conclui-se que ocorre toxicidade testicular após exposição única via oral ao CBZ em doses ≥ 50 mg/kg, o que embasa a sua classificação na Categoria 1 em função da toxicidade para órgão-alvo específico por exposição única, conforme previsto na Seção 2 do Anexo IV da RDC nº 294/ 2019.

Toxicidade repetida

Nos estudos de exposição repetida com roedores e cães, os principais órgãos-alvo afetados foram testículos, fígado, rins e tireoide, sendo o cão a espécie mais sensível, com Nível de Efeito Adverso não Observado (NOAEL) de 7,5 mg/kg p.c./dia a partir de dois estudos crônicos via oral. Outros efeitos indicados foram redução de peso corporal e alterações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos. Assim, em concordância com a classificação proposta pela FT, e com base na Seção 3 do Anexo IV da RDC nº 294/ 2019, conclui-se que o CBZ pode ser enquadrado na Categoria 2, em função da toxicidade para órgão-alvo específico por exposição repetida, com base na toxicidade hepática evidenciada nos estudos de 90 dias com ratos pela via oral, com menor Nível mais Baixo de Efeito Adverso Observado (LOAEL) de 16 mg/kg p.c./dia.

Neurotoxicidade e imunotoxicidade

Não foram relatadas evidências de efeitos neurotóxicos nos estudos de toxicidade oral aguda e tardia, nem de toxicidade cutânea. Entretanto, alguns efeitos de neurotoxicidade para o desenvolvimento foram identificados no estudo de toxicidade reprodutiva de uma geração estendida. Não foram relatadas evidências de efeitos imunotóxicos em doses relevantes para exposição humana.

Conclusão sobre os efeitos à saúde humana que são proibitivos de registro conforme a Lei nº 7.802/1989

O Decreto nº 4.074, de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei nº 7.802/1989, determina que é proibido o registro de agrotóxicos considerados a) mutagênicos; b) carcinogênicos; c) teratogênicos; d) que causem distúrbios hormonais ou que causem danos ao aparelho reprodutor; e) que se revelem mais perigosos para o homem do que os testes de laboratório com animais tenham podido demonstrar, segundo critérios técnicos e científicos atualizados. Ainda, a RDC nº 294/2019 esclarece que o pedido de avaliação toxicológica será indeferido quando as etapas de identificação do perigo e de avaliação dose-resposta indicarem evidências suficientes para os produtos serem categorizados como conhecidos ou presumidamente mutagênicos, carcinogênicos, teratogênicos, causadores de efeitos adversos ao desenvolvimento embrionário ou neonatal, de dano ao aparelho reprodutor ou de distúrbios hormonais e não for possível determinar um limiar de dose para algum desses desfechos que permita proceder com as demais etapas da avaliação do risco.

Após a avaliação do peso das evidências sobre a toxicidade do CBZ, concluiu-se pela sua classificação, de acordo com a RDC nº 294/2019, como presumidamente mutagênico para células germinativas de seres

humanos (Categoria 1B), presumidamente carcinogênico para humanos (Categoria 1B) e presumidamente tóxico para reprodução em humanos (Categoria 1B).

Embora o CBZ tenha sido classificado como presumidamente carcinogênico, foi possível determinar um limiar adequado para proteção da saúde da população para este desfecho e, portanto, de acordo com os critérios técnicos da RDC nº 294/2019, o CBZ não deve ser enquadrado nos critérios proibitivos de registro quanto à carcinogenicidade.

As evidências disponíveis até o momento também demonstram que o CBZ é mutagênico, (promove aneugênese em células germinativas), é tóxico para a fisiologia reprodutiva e para o desenvolvimento embrionário e neonatal. Entretanto, para esses desfechos, não é possível determinar limiar capaz de garantir a proteção adequada da saúde da população. Logo, com base nesses critérios proibitivos de registro, propõe-se a proibição do CBZ no Brasil.

As conclusões mais detalhadas a respeito de cada um desses desfechos proibitivos de registro foram detalhadas nos itens a seguir.

Conclusões sobre a mutagenicidade detalhadas no Parecer nº 01/2021 (Anexo 5 – SEI nº [1309909](#)).

Na avaliação do potencial de mutagenicidade do CBZ, foram considerados os estudos regulatórios apresentados pela FT, os estudos da literatura científica obtidos mediante busca sistemática e os relatórios das principais agências reguladoras internacionais. A partir deles, verificou-se que o CBZ não provoca danos diretos ao DNA, tampouco mutações pontuais *in vitro* em células bacterianas (teste de Ames) e em células de mamíferos, exceto na presença de impurezas com relevância toxicológica, para as quais ficou estabelecido como limite as concentrações de 0,0006 g/kg (DAP) e 0,0005 g/kg (AHP) para os produtos registrados no Brasil.

Nos estudos *in vitro* em células de mamíferos, o CBZ não induziu aberrações estruturais, mas causou aberrações numéricas em concentrações $\geq 0,2 \mu\text{g/mL}$ (NOEL = $0,1 \mu\text{g/mL}$). Os dados *in vivo* em células somáticas foram consistentes com os obtidos *in vitro* (ausência de mutações pontuais e clastogênese, com ocorrência de micronúcleo, poliploidia e aneuploidia), o que confere maior força ao WoE quanto ao potencial de aneugenicidade do CBZ. Para células somáticas, foi determinado um NOAEL de 50 mg/kg p.c.. Por fim, estudos *in vivo* com células germinativas de mamíferos (espermatozoides e ovócitos) também indicaram indução de aneuploidia em doses $\geq 50 \text{ mg/kg p.c.}$, dose que corresponde ao LOAEL.

Considera-se que essa dose de 50 mg/kg p.c. não pode ser utilizada para derivação de um limiar seguro para aneugenicidade em células germinativas de humanos, uma vez que: I) esse valor corresponde ao LOAEL, sendo desconhecida a dose sem efeito mutagênico para o CBZ (NOAEL); II) há evidências robustas demonstrando maior susceptibilidade dos ovócitos humanos à aneuploidia em comparação aos espermatozoides e às células somáticas humanas e, até mesmo, aos ovócitos de roedores; III) espera-se agravamento decorrente do processo de envelhecimento característico dos ovócitos e polimorfismos de subpopulações.

Ainda, cabe mencionar que os estudos *in vitro* e *in vivo* realizados com o CBZ, somados aos estudos mecanísticos avaliados, claramente indicam a indução do evento iniciador (ligação à tubulina) e de eventos-chave (despolimerização da tubulina, desorganização de fuso mitótico e indução de ovócitos aneuploides) de uma Via de Efeito Adverso (AOP) já internacionalmente caracterizada – AOP 106 - <https://aopwiki.org/aops/106> (ligação química à tubulina em ovócitos, levando a uma prole aneuploide). Portanto, a referida AOP corrobora a classificação do CBZ como mutagênico para células germinativas. A descrição dessa AOP e de seus eventos-chave aponta incertezas quantitativas que podem estar associadas a essa via e que interferem na escolha de um limiar adequado.

A partir do conjunto de dados de mutagenicidade, associado aos estudos mecanísticos e de toxicidade reprodutiva também analisados, concluiu-se que o CBZ é um agente aneugênico e ele foi classificado na Categoria 1B em função da mutagenicidade, conforme estabelecido na Seção 4, Anexo IV da RDC nº 294, de 29 de julho de 2019. Além disso, não foi possível definir um limiar de dose adequado capaz de prevenir a ocorrência dos efeitos aneugênicos induzidos pelo CBZ, o que enseja a proibição do seu registro.

Na CP, a FT encaminhou parecer da Innvitro (2022) apresentando discussão concordando com a classificação de mutagenicidade do CBZ na Categoria 1B – presumidamente induz mutações em células germinativas de seres humanos, mas discordando da conclusão sobre a impossibilidade de determinação de limiar. Após análise detalhada de toda discussão apresentada, considera-se que não há novas informações que alterem a conclusão técnica inicial da GGTOX. Além disso, a maioria dos argumentos utilizados baseiam-se em interpretação de estudos que já foram exhaustivamente abordados no parecer de mutagenicidade do CBZ (Parecer nº 01/2021) e não são suficientes para uma alteração do entendimento sobre limiar para esse desfecho toxicológico. De qualquer forma, todos os argumentos apresentados foram revisitados e explicados

pontualmente nesta NT conclusiva, de forma a esclarecer o posicionamento da GGTOX, conforme detalhado a seguir.

Inicialmente, o parecer questiona o posicionamento da GGTOX de considerar que o LOAEL obtido para o desfecho mutagenicidade não é um limiar adequado para garantir segurança da exposição ao CBZ, enquanto para carcinogenicidade foi utilizado o LOAEL como ponto de partida (PoD) para a derivação de uma dose segura para a população humana. Com relação a esse questionamento, é importante mencionar que há diferenças relevantes entre a abordagem adotada para carcinogenicidade e abordagem utilizada para mutagenicidade, isso porque avaliação toxicológica depende de uma avaliação de WoE e, obviamente, ele não é o mesmo para desfechos distintos, uma vez que o conjunto de dados disponíveis e as metodologias de análise são completamente diferentes. Para câncer, utilizou-se um LOAEL em que são observados efeitos pré-neoplásicos, ou seja, efeitos que ocorrem antes mesmo do aparecimento de um desfecho carcinogênico. Já para mutagenicidade, o LOAEL foi obtido para o desfecho mutagenicidade em si e não para um efeito que ocorre antes do efeito mutagênico. Dessa forma, é possível afirmar com segurança que, no LOAEL para efeitos pré-carcinogênicos, não ocorrem efeitos carcinogênicos. Efeitos carcinogênicos ocorreram apenas em doses superiores ao LOAEL. Logo, o LOAEL encontrado é igual ou está abaixo do limiar de carcinogenicidade. Por outro lado, no LOAEL do estudo de mutagenicidade, a única certeza que se tem é que os efeitos mutagênicos ocorrem nesta dose. Ou seja, o LOAEL, nesse caso, está acima do limiar esperado para mutagenicidade. Portanto, não há inconsistência no uso do LOAEL para determinação de doses seguras de exposição, mas sim conjuntos de dados completamente distintos que devem ser interpretados de forma individualizada com base no WoE disponíveis para cada um deles.

O Parecer da Innvitro (2022) argumenta ainda que a utilização de LOAEL como ponto de partida está acordo com a RDC nº 295/2019, que prevê na AR a utilização de LOAEL quando o NOAEL não for identificado, sendo necessário aplicar um fator adicional de 10x para essa extrapolação. Entretanto, considerando o entendimento da legislação vigente, não se vislumbra a utilização do LOAEL para definição de um limiar de dose para os desfechos proibitivos de registro. É importante esclarecer que, embora o LOAEL possa ser utilizado para escolha de um ponto de partida para a determinação de uma dose de referência, a RDC nº 294/2019 determina:

Art. 33. O pedido de avaliação toxicológica será indeferido quando as etapas de identificação do perigo e de avaliação dose-resposta indicarem evidências suficientes para os produtos serem categorizados como conhecidos ou presumidamente mutagênicos, carcinogênicos,

teratogênicos, causadores de efeitos adversos ao desenvolvimento embriofetal ou neonatal, de dano ao aparelho reprodutor ou de distúrbios hormonais e **não for possível determinar um limiar de dose para algum desses desfechos que permita proceder com as demais etapas da avaliação do risco**, conforme critérios definidos em norma complementar.

Ou seja, é necessária, antes mesmo da escolha de um PoD para derivação de doses de referência humanas, a determinação de um limiar para os desfechos proibitivos de registro observados nos estudos experimentais. Sendo possível a determinação de limiar para os desfechos em questão, aí sim é possível seguir com as demais etapas da AR, incluindo a escolha de uma dose como PoD (com base em todos os estudos disponíveis e não apenas no estudo de um desfecho toxicológico específico). Escolhendo um PoD, segue-se para a derivação da dose de referência humana. É importante destacar que limiar e PoD não são termos necessariamente intercambiáveis na toxicologia. É possível que se escolha o limiar de um desfecho proibitivo de registro como PoD para a derivação de doses de referência humanas, mas não necessariamente.

Portanto, busca-se esclarecer que a etapa de determinação de limiar é anterior à escolha dos PoD que serão usados para a AR e que, especificamente para desfechos proibitivos de registro, a RDC nº 294/2019 exige a determinação de limiar de dose para o desfecho específico e não de um PoD para derivação de doses de referência. Portanto, a escolha de um PoD se enquadraria no texto “proceder com as demais etapas da avaliação do risco” do artigo 33. Conforme discutido anteriormente, o limiar corresponde à dose abaixo da qual um efeito não é observado ou esperado, já o LOAEL corresponde à menor dose experimental em que se observou o efeito. Logo, apenas com base no LOAEL, não é possível saber qual é o limiar, pois todas as doses testadas apresentaram o efeito adverso proibitivo de registro.

Em seguida, o parecer da Innvitro (2022) discute alguns estudos relevantes utilizados na tomada de decisão pela GGTOX. O parecer concorda com toda a análise de estudos feita pela GGTOX no que diz respeito à mutagenicidade pontual e aberração cromossômica *in vitro* e *in vivo* em células bacterianas e em células somáticas de mamíferos, não levantando falhas de análise para nenhum desses estudos. Cabe ressaltar que todos os estudos do parecer são avaliados utilizando-se os mesmos critérios. Entretanto, foram apresentadas discordâncias na análise exclusivamente nos estudos com células germinativas de mamíferos.

Um dos pontos reiteradamente apontado na argumentação do parecer da Innvitro (2022) refere-se à utilização de estudos da literatura que

não seguem diretrizes específicas e não atendem a todos os seus requisitos. A *Innvitro* argumenta que, apesar de serem muito relevantes do ponto de vista biológico, esses estudos são limitados do ponto de vista regulatório. No entanto, considera-se que estudos relevantes do ponto de vista biológico e úteis para caracterização dos efeitos toxicológicos devem ser levados em consideração pelas agências reguladoras na avaliação do WoE. Logo, eles são relevantes também do ponto de vista regulatório. Todas as agências regulatórias utilizam estudos da literatura científica em suas análises. As limitações sempre são consideradas na avaliação, sendo o estudo da literatura ou regulatório. Para ambos os casos, não havendo razão para determinar que o estudo é inválido ou inconclusivo, ele será considerado relevante tanto do ponto de vista biológico quanto regulatório e irá constituir o WoE. Na avaliação do WoE, estudos regulatórios tendem a ter maior peso, porém outros vários aspectos são considerados.

A abordagem de WoE, utilizada pela GGTOX para a avaliação do potencial de mutagenicidade de agrotóxicos, segue o mesmo racional adotado pelas agências americana e europeia. Nesse tipo de abordagem, estudos de menor peso podem ser descartados somente quando os de maior peso são robustos o suficiente para alcançar uma conclusão. A RDC nº 294/2019 define WoE como a “interpretação dos dados toxicológicos no contexto de todas as informações disponíveis em que são avaliadas a força e a qualidade das evidências relacionadas a uma decisão”. Além disso, a avaliação do WoE baseia-se em três considerações fundamentais – confiabilidade, relevância e adequabilidade dos dados disponíveis – a fim de concluir se essas evidências combinadas são suficientes para responder a uma dada questão. Assim, em sua análise do WoE, a GGTOX considera os dados provenientes de todos os estudos disponíveis – tanto regulatórios quanto da literatura científica. Eles são avaliados quanto à força e especificidade da associação observada; consistência (reprodutibilidade dos achados); concordância e relação exposição-efeito; temporalidade; plausibilidade biológica e coerência (verificação de exposição-efeito em diferentes tipos de evidências – *in vitro*, *in vivo* em animais e em humanos); seleção de eventos-chave ou parâmetros mensuráveis, quando o mecanismo de ação ou a AOP são conhecidos. Nem sempre todos esses aspectos estão claros em todos os estudos, mesmo em estudos regulatórios, mas isso não invalida o estudo, que deve ser utilizado e interpretado em conjunto com as demais evidências disponíveis. Inclusive, aos dados provenientes de estudos não-regulatórios pode-se atribuir grande WoE quando algumas condições são atendidas, tais como (EChA, 2017): adequabilidade para fins de classificação e/ou AR; análise adequada e confiável dos principais parâmetros previstos para serem investigados; período de exposição à substância de duração compatível ou mais

prolongada do que aquela prevista na metodologia da diretriz correspondente; apresentação de relatório de estudo adequado e confiável.

Com relação à discussão sobre a pureza do CBZ utilizado nos estudos, embora nem sempre ela seja declarada, são excluídos da análise da reavaliação todos os estudos com produtos formulados. Para os demais estudos, em que se depreende o uso da substância em si, a ausência de pureza não os invalida; pois, na avaliação de WoE, é possível avaliar entre os resultados de diferentes estudos a consistência, concordância, reprodutibilidade, especificidade, dose-resposta, temporalidade. Esses aspectos são essenciais para avaliação do WoE e mais importantes do que a análise de um único estudo de forma individual. Esse mesmo entendimento é utilizado para a questão levantada sobre a não observação de dose-resposta em um estudo específico, ou seja, todos resultados disponíveis devem ser avaliados em conjunto. Neste contexto, há uma discordância a respeito da interpretação da Innvitro (2022) de que não há dose-resposta no estudo específico de Matsuo et al. (1999), pois aumento sutil de micronúcleo é observado na menor dose testada e um aumento significativo é observado na dose intermediária. Na maior dose, concluiu-se que o aumento foi menor do que na dose intermediária em decorrência da citotoxicidade (houve redução significativa de espermátides na fase 1 um dia após o tratamento). Isso já foi detalhado no Parecer de mutagenicidade do CBZ (Parecer nº 01/2021).

Nota-se que o parecer da Innvitro (2022) aponta falhas no estudo de Matsuo et al. (1999) utilizado pela GGTOX para mostrar que o CBZ atua em baixas doses (50 mg/kg p.c.), mas os outros estudos discutidos no parecer e usados como argumento de que a mutagenicidade ocorre em doses maiores possuem limitações semelhantes. Por isso, a abordagem de conclusão sobre mutagenicidade e limiar não deve ser feita com base em um único estudo, mas sim considerando todo o WoE e verificando como os estudos se complementam. Nenhum novo estudo de mutagenicidade em células germinativas foi apresentado e discutido. Todos os estudos utilizados na discussão da Innvitro (2022) foram usados na avaliação do WoE e todos eles foram positivos, com exceção do estudo de Adler et al. (2002). Ainda, mostrando forte concordância e reprodutibilidade desse desfecho, os estudos *in vivo* em células somáticas e os estudos *in vitro* para aneugenicidade também são positivos. Além disso, há unanimidade entre as agências reguladoras internacionais em considerar o CBZ aneugênico *in vivo*. Logo, o estudo de Adler et al. (2002) desvia dos achados predominantes. Os resultados dos estudos dependem de suas condições experimentais. Variações de resultados são esperadas e, por isso, a abordagem de WoE é importante para a conclusão sobre os aspectos

toxicológicos de uma substância. É importante mencionar que o parecer da Innvitro (2022) concorda que os resultados positivos para mutagenicidade são consistentes, considerando adequada a classificação do CBZ na Categoria 1B.

Diante do exposto, há discordância quanto a argumentação da Innvitro (2022) pois, se os estudos são adequados para demonstrar o efeito mutagênico do CBZ, eles também são adequados para mostrar as doses em que esses efeitos ocorrem. Ainda, corroborando esse entendimento, a Innvitro (2022) reforça o parecer da GGTOX dizendo que há dados de estudos toxicológicos (e não de genotoxicidade) que complementam a discussão sobre efeitos reprodutivos em doses inferiores ao limiar de 50 mg/kg p.c./dia para efeitos aneugênicos em espermátides de ratos. Os estudos indicados compreendem danos histológicos testiculares nas doses de 20, 30 e 50 mg/kg p.c./dia (Breslin et al., 2013; Dere et al., 2016), redução em peso testicular, nível de testosterona sérica e enzimas esteroidogênicas após a administração de 25 mg/kg/dia (Rajeswary et al., 2007) e alterações nos parâmetros espermáticos e interrupção da espermatogênese nas doses de 0,1, 10 e 50 mg/kg p.c./dia (Liu et al., 2019; Li et al. 2020; Pacheco et al., 2012).

Entretanto, a Innvitro (2022) ressalta que os estudos de Liu et al. (2019) e Li et al. (2020), cujas doses avaliadas estão muito abaixo daquelas dos demais estudos da literatura, são estudos desenhados com o objetivo de compreensão do modo de ação (MoA) e não de estabelecimento de limiar, não possuem controles positivos ou possuem informações mínimas sobre a pureza da substância teste avaliada, indicando que não são adequados para derivação de doses de referências. Cabe reforçar novamente que todos os estudos válidos devem ser considerados na avaliação do WoE e na determinação de limiar, especialmente quando estes detectam efeitos mais sutis e buscam caracterizar o MoA da substância. Dados de MoA que auxiliem na caracterização da relação dose-resposta em baixas ou altas doses de uma substância devem ser considerados (NRC, 2009). Estudos de MoA da literatura científica são usados por todas as autoridades regulatórias internacionais para caracterização da toxicidade da substância. Assim, esse conjunto de estudos corrobora que o CBZ afeta a espermatogênese em baixos níveis de dose, inferiores a 50 mg/kg p.c.

Nota-se uma contradição na argumentação apresentada pela Innvitro (2022) que, inicialmente, argumentou que o estudo de Matsuo et al. (1999) não poderia ser utilizado para concluir sobre o menor LOAEL encontrado para o CBZ dentre todos os estudos disponíveis. Porém, na conclusão, a Innvitro acaba optando por utilizar esse estudo como o adequado para estabelecer o menor NOAEL. Ou seja, na verdade, há apenas

uma divergência na interpretação do que significa a menor dose do estudo entre a GGTOX e a Innvitro (2022). Para a GGTOX, a menor dose com efeito foi a menor testada, pois, embora de baixa magnitude, os efeitos mutagênicos já são observados. Como discutido anteriormente, o limiar é a dose abaixo da qual não se observa ou se espera o efeito adverso. No caso desse estudo, já se observa efeito, mesmo que leve, na menor dose testada. Portanto, esta dose não corresponde ao limiar do desfecho e deve ser considerada como o LOAEL e não como o NOAEL. Essa conclusão também foi alcançada pela agência australiana (APVMA, 2009). Cabe referenciar a importância de considerar esses efeitos de menor magnitude e não apenas efeitos com significância estatística na avaliação toxicológica, pois essa é uma abordagem compartilhada entre as diferentes agências reguladoras internacionais. A EFSA (2017) esclarece que a seleção do efeito crítico não deve ser baseada apenas nos procedimentos estatísticos, mas sim na significância biológica. Logo, argumentos toxicológicos adicionais devem ser considerados na avaliação de um pacote completo de dados toxicológicos. Um grande problema na abordagem de NOAEL é que ele frequentemente é identificado com base na falta de significância estatística, o que depende fortemente do desenho e do poder estatístico do estudo para detectar efeitos adversos, como número e espaçamento de doses e número de animais por dose. Estudos de menor poder estatístico ou com metodologia pouco sensível para detecção do efeito crítico apenas vão ser capazes de detectar efeitos de grande magnitude, resultando em altos valores de NOAEL (USEPA, 2002; EFSA, 2017). A interpretação do NOAEL realmente depende de julgamento técnico, podendo diferir entre avaliadores. Por exemplo, quando a magnitude da resposta é pequena, é possível que um avaliador opte por desconsiderá-la, mesmo havendo diferença estatística; por outro lado, uma resposta pequena não significativa estatisticamente pode ser considerada biologicamente relevante (EFSA, 2017). Diante desses fatos, para a escolha de um limiar seguro para a exposição humana de aspectos toxicológicos proibitivos de registro, é prudente e razoável considerar os aumentos leves com significância biológica num contexto de avaliação do WoE, pois o objetivo é encontrar uma dose abaixo da qual o desfecho não é observado ou esperado.

O parecer da Innvitro (2022) discute ainda que a EFSA publicou documentos suplementares em 2021 a respeito de estudos de genotoxicidade do CBZ, cujos dados não foram considerados na totalidade pela GGTOX. Foram citados três ensaios de dominante letal realizados em camundongos expostos pela via intraperitoneal em doses até 1.280 mg/kg p.c., sendo dois deles com pureza informada de 94% e um sem pureza informada. Todos indicaram resultados negativos (EFSA, 2021a; 2021b). Realmente essa referência não foi incluída na análise da GGTOX, que

ocorreu anteriormente à sua publicação. A análise desses documentos é detalhada a seguir.

Com relação aos três estudos mencionados sobre dominante letal, não é possível a análise individualizada deles, pois eles não estão disponíveis na literatura aberta e não foram entregues pelas empresas registrantes no Brasil no momento da notificação de requisição de dados, no início da reavaliação. Entretanto, o documento do comitê da EFSA (EFSA 2021b), citado pela próprio parecer da Innvitro (2022), discute que nesses estudos não há a indicação de exposição das células-alvo, o que compromete significativamente o seu uso no WoE. Um resultado negativo, sem comprovação de que a substância alcançou a célula-alvo, tende a tornar o estudo inconclusivo. Além disso, a conclusão unânime entre os especialistas nesse documento é de que o CBZ é aneugênico. Como o documento apenas apresenta opiniões de diferentes especialistas, não houve consenso em relação ao limiar. A discussão sobre limiar foi superficial, não havendo aprofundamento em relação a diferenças de mecanismos de disjunção em ovócitos humanos, sua maior sensibilidade ou maior vulnerabilidade para certas populações.

O parecer da Innvitro (2022) cita ainda o *Guidance on Aneugenicity Assessment*, publicado pela EFSA (2021d) que indica que agentes genotóxicos que agem por mecanismos que não envolvem interação direta com o DNA costumam exibir limiares numa dose reposta não-linear, sendo possível estabelecer um limiar de dose. Sendo assim, a EFSA estabeleceu limiar para efeitos aneugênicos do CBZ utilizando a dose de 50 mg/kg p.c./dia como NOAEL. Com relação a essa argumentação, cabe ressaltar que a EFSA possui restrição quanto à aprovação de IA de agrotóxicos mutagênicos. Isto é, de acordo com a normativa europeia (EC 1107/2009), é proibida a aprovação de substâncias que se enquadrem nesse aspecto toxicológico. A mutagenicidade divide-se em mutações pontuais e aberrações cromossômicas, sendo a aneugenidade um tipo de aberração cromossômica numérica (EFSA, 2021d).

Apesar da proibição de agrotóxicos mutagênicos na Europa, é necessário o estabelecimento de tolerâncias de importação para resíduos mesmo quando um agrotóxico não tem o seu uso permitido, conforme regulamentado pela normativa EC 396/2005. Assim, embora o uso de CBZ não seja permitido na Europa (com indicação no relatório de reavaliação da EFSA de mutagenicidade e toxicidade reprodutiva para esse IA), fez-se necessária a determinação de valores de referência toxicológicos para uma AR dietético. Para isso, a União Europeia solicitou à EFSA (2021c) o estabelecimento de doses de referência, com base nos estudos disponíveis sobre os aspectos toxicológicos mais preocupantes para esse IA.

Diante dessa solicitação da União Europeia, para cumprir os requisitos da norma de tolerância de importação, a EFSA (2021c) escolheu os valores de referência de DRfA/IDA de 0,02 mg/kg p.c. com base na toxicidade reprodutiva (embora anteriormente ela já tenha considerado o enquadramento da substância como proibitiva de registro em relação a esse aspecto e à mutagenicidade). A EFSA considerou que tais valores eram suficientes também para a aneugenicidade. Entretanto, na AR dietético, a EFSA constatou que há lacunas de dados, associadas a um possível risco dietético agudo para os consumidores. Desse modo, a agência europeia concluiu que a AR dietético deveria ser considerada apenas indicativa, uma vez que todas as propostas de LMR derivadas ainda requerem uma análise mais aprofundada pelos gestores de risco e medidas para redução da exposição do consumidor também devem ser consideradas.

Em relação especificamente à avaliação de mutações do tipo aneugênicas, a EFSA (2021d) possui critérios gerais para determinação de limiares que abrangem uma grande diversidade de substâncias. Vale ressaltar que agrotóxicos aneugênicos enquadram-se nos critérios europeus de proibição e, portanto, não podem ser aprovados na Europa. Outras substâncias, em contrapartida, não possuem essa limitação, sendo feita a AR mesmo quando não é possível estabelecer claramente um limiar. O Guia de Aneugenicidade da EFSA (2021c) esclarece quando e como estabelecer um limiar para aneugenicidade na avaliação genérica das substâncias químicas num contexto regulatório, não se atendo especificamente a agrotóxicos, uma vez que a legislação vigente proíbe a aprovação destes quando mutagênicos.

De maneira geral, considera-se plausível a ocorrência de limiar para o desfecho aneugenicidade, conforme já discutido anteriormente pela própria GGTOX. A EFSA (2021d) concorda com essa afirmação e assume que, em princípio, é possível estabelecer uma dose de referência humana com base na aneugenicidade, caso este seja o desfecho toxicológico mais sensível. Porém, nem sempre é possível utilizar essa abordagem. No referido Guia da EFSA, foram descritas três abordagens para substâncias aneugênicas que podem ser consideradas relevantes no contexto de avaliação de IA de agrotóxicos. Em apenas uma delas, o limiar para o desfecho aneugenicidade é estabelecido, permitindo a derivação de doses de referência humanas para condução da AR de forma semelhante ao que é feito pela GGTOX. As demais abordagens não resultam em estabelecimento de dose segura para a população humana e permitem que a etapa de AR seja feita com base no julgamento científico sobre a aceitabilidade de uma margem de exposição ao IA ou na comparação de uma concentração estimada no TGI com os valores mutagênicos *in vitro* (para substâncias que

são aneugências sem ativação metabólica). Essas três abordagens serão detalhadas a seguir.

A primeira abordagem, que permite o estabelecimento de dose de referência humana para aneugenicidade, refere-se a substâncias com grande riqueza de dados (com dose-resposta *in vivo* bem caracterizada, tanto para a aneugenicidade quanto para outros desfechos toxicológicos). Nesse caso, o limiar para aneugenicidade, obtido a partir de dados experimentais, é comparado com o limiar para outros efeitos tóxicos. A EFSA (2021d) sugere, para a determinação do limiar de aneugenicidade, utilizar o Limite Inferior do Intervalo de Confiança da Dose Modelada - *Benchmark Dose* (BMDL) ao invés do NOAEL experimental (o uso de um LOAEL não é sequer considerado). Se o BMDL para aneugenicidade for maior que para outros desfechos, o desfecho toxicológico mais sensível deve ser utilizado para determinação de doses de referência aguda e crônica. Por outro lado, se o BMDL para aneugenicidade for menor ou similar ao limiar de outros desfechos, deve-se estabelecer uma DRfA para aneugenicidade, utilizando-se fatores de incerteza padrão de 100 vezes. Ao contrário da GGTOX, a EFSA não exige que a dose-resposta seja caracterizada com base em resultados *in vivo* de ensaios em células germinativas e considera que (teoricamente) seria possível utilizar um fator de incerteza adicional de 10 vezes quando há preocupação quanto à sensibilidade de células germinativas. Entretanto, esse fator adicional é arbitrário e, até o momento, não existe embasamento científico que possa explicar e quantificar as diferenças na sensibilidade entre células germinativas humanas, especialmente ovócitos, e células somáticas/ germinativas de roedores para a maioria dos mecanismos aneugênicos. Sabe-se, no entanto, que há diferenças relevantes e evidência de maior sensibilidade humana aos efeitos aneugênicos em mulheres em idade fértil.

A segunda abordagem é utilizada para substâncias com dados insuficientes de dose-resposta para aneugenicidade, quando não é possível estabelecer limiar humano para o desfecho aneugenicidade. Portanto, doses de referência humana para esse desfecho não são derivadas para a condução de posterior AR. Nesses casos, a EFSA permite, de acordo com julgamento científico, considerar a aplicação da metodologia de margem de exposição, para a qual utiliza-se o menor valor de NOAEL encontrado nos estudos experimentais e uma margem de exposição apropriada considerando o conjunto de informações disponíveis e suas limitações.

Quanto à terceira abordagem, ela inclui os casos para os quais apenas dados de genotoxicidade estão disponíveis. Embora agrotóxicos não se enquadrem nessa abordagem, ela é interessante por ser capaz de abranger situações em que apenas dados de dose-resposta *in vitro* estão

disponíveis. Nesse caso, para compostos aneugênicos sem ativação metabólica, seria possível comparar a concentração aneugênica *in vitro* com a concentração estimada da substância no TGI.

Verifica-se que a abordagem principal da EFSA (2021d) não diverge substancialmente da metodologia adotada pela GGTOX na avaliação de agrotóxicos aneugênicos. Tanto que, para células somáticas, foi determinado limiar de aneugenicidade para o CBZ, com base nas informações de dose-resposta disponíveis. Entretanto, a GGTOX detalhou com maior aprofundamento as preocupações com o impacto da aneugenicidade em células germinativas humanas, especialmente ovócitos, no Parecer de mutagenicidade do CBZ. Nas suas recomendações, a EFSA (2021d) aponta a necessidade de maior investigação da sensibilidade relativa entre células somáticas e germinativas de roedores e humanos. A EFSA também discute que a aneuploidia é sabidamente uma causa significativa de infertilidade e perda gestacional quando impacta as células germinativas. Ainda, relata que a transmissão hereditária da aneugenicidade já foi caracterizada para algumas substâncias e que há indícios de que os espermátócitos humanos podem ser mais sensíveis à indução química de aneugenicidade em comparação aos de ratos. Além disso, as evidências sobre a indução de doenças hereditárias em humanos por compostos aneugênicos ainda são limitadas e de difícil avaliação, pois a maioria dos conceitos aneuploides são abortados espontaneamente. Todos esses aspectos levantados pela EFSA (2021d), exhaustivamente discutidos no Parecer de mutagenicidade do CBZ, corroboram a grande preocupação do impacto da exposição de mulheres em idade fértil a substâncias aneugênicas, especialmente daquelas em idade mais avançada ou com polimorfismos e maior susceptibilidade para a aneugenicidade. Diante disso, a determinação de limiar de aneugenicidade que possa ser considerado seguro para a população humana está vinculada a uma adequada determinação da dose-resposta em células germinativas *in vivo*. Isso não está disponível para o CBZ. Ainda, não se considera adequada a utilização de fatores de incerteza para a falta de dados em células germinativas, pois ainda não há embasamento experimental que mostre que esse valor seja suficientemente seguro para englobar as diferenças relevantes na divisão celular desses tipos celulares, especialmente para ovócitos humanos. Até o momento, não há evidências experimentais que caracterizem essas diferenças de sensibilidade e possam embasar um valor de incerteza para essa extrapolação.

Ademais, vale lembrar que o contexto de determinação de limiar no âmbito da GGTOX se refere a proibitivos de registro. Dessa forma, o limiar precisa ser bem caracterizado e estar fortemente embasado em

dados experimentais para garantir que proteção da população pela legislação seja cumprida. Na Europa, a mutagenicidade também é um proibitivo de registro de agrotóxicos. Por outro lado, num contexto específico de importação de alimentos, há a necessidade de se proceder com uma AR, mesmo a substância estando proibida na Europa. Logo, verifica-se que nesse contexto que a AR precisa ser efetuada independente da completa e aprofundada caracterização dose-resposta e de um forte embasamento experimental.

Considerando toda a discussão apresentada, no caso específico do CBZ, conclui-se que não existe caracterização de dose-resposta suficientemente adequada para determinação de um limiar seguro para o aspecto proibitivo de registro mutagenicidade e, por isso, não se pode utilizar a abordagem proposta pela EFSA (2021d) de determinação de limiar para o desfecho aneugenicidade.

Ainda, não foram discutidos pela Innvitro (2022) os outros argumentos utilizados para mostrar que um limiar seguro não pode ser derivado: diferenças nos mecanismo de formação do fuso mitótico nos ovócitos, maior susceptibilidade dos ovócitos humanos a aneuploidias, tendência da população humana de reprodução em idades mais avançadas e os polimorfismos humanos. Foi apenas mencionado que “acredita-se que a aplicação dos fatores de segurança é necessária para anular diferenças de sensibilidades celulares intra e inter espécies e, portanto, essa dose seria segura para células germinativas masculinas e femininas.”. Os fatores de segurança mencionados pela Innvitro (2022) são adicionados após se encontrar um valor crítico adequado para o desfecho estudado que, no caso do CBZ, não foi possível ser identificado. Além disso, são fatores padrão, sendo que outros valores podem ser necessários para abranger todas incertezas e variabilidades do conjunto de dados disponível, sendo que a determinação desses valores é dependente de uma adequada caracterização experimental qualitativa e quantitativa (NRC, 2009). De qualquer forma, a RDC 294/2019 determina que deve ser estabelecido um limiar na etapa de avaliação do perigo e de avaliação dose-resposta, o que não foi possível para o CBZ, não sendo adequado seguir para a derivação de doses de referências humanas e caracterização do risco.

Assim, diante do conjunto de dados de mutagenicidade, estudos mecanísticos e de toxicidade reprodutiva, a GGTOX mantém a sua conclusão inicial sobre o CBZ ser um agente aneugênico e não haver evidência que permita estimar adequadamente uma dose *in vivo* em que não se espera a ocorrência desses danos cromossômicos às células germinativas em humanos. Isto é, não é possível definir um limiar de dose adequado, capaz de prevenir a ocorrência dos efeitos aneugênicos

induzidos pelo CBZ. Portanto, com base na avaliação do WoE disponíveis e considerando a legislação brasileira, conclui-se que o CBZ preenche os requisitos proibitivos de registro estabelecidos pela Lei nº 7.802, de julho de 1989 e pelo Decreto nº 4.074, de janeiro de 2002, devendo ser classificado na Categoria 1B em função da mutagenicidade conforme estabelecido na Seção 4, Anexo IV da RDC nº 294, de 29 de julho de 2019. Em tais dispositivos legais, fica estabelecida a proibição do registro de agrotóxicos que apresentem características mutagênicas e para os quais não seja possível determinar um limiar de dose que permita proceder com as demais etapas da AR.

Conclusões sobre a carcinogenicidade detalhadas no Parecer nº 05/2021 (Anexo 6 – SEI nº [1433818](#)).

Na avaliação do potencial carcinogênico do CBZ, verificou-se que esse IA está associado ao desenvolvimento de tumores hepáticos em camundongos das linhagens CD-1 e Swiss em doses $\geq 22,5$ mg/kg p.c./dia. Não foi possível estabelecer um NOAEL, pois nas menores doses utilizadas nos estudos foram observados efeitos pré-neoplásicos (22,5 mg/kg p.c./dia) e carcinoma (75 mg/kg p.c./dia). Não houve evidência de efeitos carcinogênicos em estudos com ratos e cães.

O MoA foi estabelecido tendo como evento chave inicial a interação do CBZ com a β -tubulina, impedindo a polimerização com alfa-tubulina e, conseqüentemente, impedindo a formação dos microtúbulos. Os microtúbulos estão envolvidos em vários processos metabólicos das células. A deficiência na formação dos microtúbulos nos hepatócitos pode levar à citotoxicidade para as células em intérfase e à aneugênese de células filhas, ocasionando reposição celular crônica e o surgimento de alterações cromossômicas. Essas duas condições são mecanismos de carcinogenicidade reconhecidos.

A menor capacidade de detoxificação do CBZ pelos camundongos, aliada a uma maior susceptibilidade natural das linhagens com resultados positivos ao desenvolvimento de câncer hepático, comparadas com ratos e cães, pode explicar a ocorrência de tumores apenas nesta espécie. Por outro lado, o MoA do CBZ ocorre em células humanas, não sendo possível descartar a sua ocorrência em humanos.

A partir da avaliação do WoE, concluiu-se que há evidência suficiente de carcinogenicidade em animais experimentais sem evidência de carcinogenicidade em seres humanos. Essa conclusão leva à classificação do CBZ como produto que presumidamente possui potencial carcinogênico para seres humanos (Categoria 1B), conforme critérios da RDC nº 294/2019. Com isso, foi necessário avaliar a possibilidade de estabelecer um limiar de

dose adequadamente protetivo da saúde da população para o desfecho carcinogenicidade.

A aneugênese é conhecidamente um mecanismo que apresenta limiar de dose para células somáticas. O LOAEL de 22,5 mg/kg p.c./dia, obtido de estudo crônico e de carcinogenicidade em camundongo pela observação de alterações celulares pré-neoplásicas, foi considerado suficientemente protetivo para efeitos carcinogênicos e pode ser escolhido como PoD para a derivação de uma dose de referência humana para carcinogenicidade. Neste caso, há segurança para concluir que o limiar de carcinogenicidade é igual ou está acima do LOAEL escolhido. Portanto o PoD escolhido é suficientemente protetivo para prevenir a ocorrência de câncer em humanos após a aplicação de fator de incerteza de 1.000 vezes (foi utilizado um fator adicional de 10x pelo uso do LOAEL). Assim, definiu-se uma dose de referência humana de 0,0225 mg/kg p.c./dia. Este valor também é suficientemente protetivo até mesmo para o mecanismo de aneugênese do CBZ, pois baseia-se na observação de efeitos ainda não considerados carcinogênicos, sendo que o NOAEL encontrado para efeito aneugênico em células somáticas foi ainda maior, de 50 mg/kg p.c., em estudo com ratos. Isso corrobora que o LOAEL escolhido para câncer pode ser considerado apropriado para a proteção da saúde da população com relação ao desfecho carcinogenicidade.

Conclusões sobre a toxicidade para o desenvolvimento embriofetal e neonatal detalhadas no Parecer nº 11/2021 (Anexo 7 – SEI nº [1505782](#)).

Na avaliação do potencial de toxicidade para o desenvolvimento embriofetal e neonatal do CBZ, foram considerados estudos regulatórios apresentados pela FT, estudos da literatura científica obtidos mediante busca sistemática e relatórios das principais agências reguladoras internacionais. A partir deles, verificou-se que o CBZ induziu as quatro manifestações da toxicidade para o desenvolvimento: 1) mortes, representadas principalmente por perdas pós-implantação em todas as espécies avaliadas, bem como por perdas pré-implantação em coelhos; 2) anomalias estruturais, representadas por malformações encefálicas (como exencefalia, hidrocefalia, entre outras) e oculares (anoftalmia e microftalmia) incompatíveis com a vida pós-natal ou severamente impactantes ao indivíduo, além de malformações esqueléticas (vértebras e costelas), entre outras; 3) alterações no crescimento, representadas por reduções no peso corpóreo fetal e variações esqueléticas; e 4) déficits funcionais, que não foram investigados adequadamente nos estudos com o CBZ, mas podem ser deduzidos a partir das evidências de alterações histopatológicas quantitativas significativas em regiões do cérebro

relacionadas ao controle motor, funções límbicas, cognitivas, sensório-motoras e somatossensoriais.

Ainda, há indicativos de que exposições únicas de ratos, coelhos e hamsters em dias específicos do período de organogênese já podem causar perdas pós-implantação e malformações severas em doses similares às que causaram esses efeitos após administração durante todo o período de organogênese.

Adicionalmente aos efeitos na gametogênese e no desenvolvimento do embrião in situ, atualmente se sabe que a dinâmica dos microtúbulos regula também as funções celulares no endométrio, cruciais durante a implantação embrionária, que o tornam receptivo ao embrião. Como na menor dose testada entre os diversos estudos, de 5 mg/kg p.c./dia em coelhos, obtida a partir de um estudo ao qual apenas a GGTOX teve acesso (Oliveira et al., 1999), já se observou aumento significativo nas perdas pré-implantação, não foi possível estabelecer um NOAEL para os efeitos do CBZ no desenvolvimento, que foram identificados em doses bastante inferiores ao NOAEL definido para os efeitos aneugênicos em células somáticas (50 mg/kg p.c.). Isso indica que, além da maior susceptibilidade do organismo em desenvolvimento em relação ao organismo adulto, outros mecanismos relacionados à despolimerização dos microtúbulos (efeitos na migração e diferenciação celulares), e não somente seu efeito antimitótico, podem estar atuando.

Foram observadas, ainda, diferenças relevantes entre as espécies, com doses 30 vezes inferiores em ratos do que em camundongos sendo suficientes para causar efeitos similares, quando o fator de segurança padrão para extrapolação interespecie é de 10 vezes. Ainda, os efeitos entre as espécies variaram, de forma que, com o conhecimento atualmente disponível, não é possível explicar o porquê dessas diferenças nos efeitos do CBZ entre as espécies e, principalmente, quais efeitos poderiam ser induzidos em seres humanos após exposição a esse IA.

A partir do conjunto das evidências disponíveis sobre a toxicidade para o desenvolvimento, concluiu-se na NT Preliminar que o CBZ induz efeitos adversos sobre o desenvolvimento embrionário e neonatal e ele foi classificado na Categoria 1B em função da toxicidade reprodutiva (toxicidade para o desenvolvimento embrionário e neonatal), conforme estabelecido na Seção 6, Anexo IV da RDC nº 294, de 29 de julho de 2019. Além disso, concluiu-se que não foi possível definir um limiar de dose adequado capaz de prevenir a ocorrência desses efeitos, o que enseja a proibição do seu registro.

No parecer apresentado durante a CP, a Innvitro (2022) concordou com a classificação do CBZ na Categoria 1B quanto à toxicidade para o desenvolvimento, mas discordou da conclusão da GGTOX sobre a não possibilidade de estabelecimento de limiar. Expressou preocupação quanto à limitada relevância de estudos utilizados para algumas das conclusões e sugeriu a revisão de alguns pontos.

Primeiramente, questionou a hipótese levantada pela GGTOX de que a dinâmica de microtúbulos alterada após a exposição ao CBZ impactaria nas funções celulares do endométrio que são cruciais para implantação embrionária, pelo fato de não existir na literatura dados que suportem uma associação direta, com indicação de dose-resposta, da relação entre a exposição ao CBZ e a despolimerização de microtúbulos em células epiteliais endometriais, prejudicando a fixação e adesão do blastocisto. No entanto, conforme já amplamente discutido no item 3.1.1b do Parecer de toxicidade para o desenvolvimento embriofetal e neonatal: 1) o agente despolimerizante Nocodazol, que possui o mesmo MoA do CBZ, demonstrou que a despolimerização de microtúbulos em células epiteliais endometriais inibe a fixação do blastocisto em estudo em camundongos (Shukla et al., 2019); 2) o CBZ mostrou efeitos na decídua em estudos *in vivo* em ratos (Spencer et al., 1996; Cummings et al., 1990); 3) o CBZ causou efeitos *in vitro* no trofoblasto placentário humano (Zhou et al., 2015). Ou seja, essas evidências indicam que o CBZ pode ter papel no comprometimento das funções celulares do endométrio e, consequentemente, na implantação embrionária, sendo este um dos efeitos adversos relevantes identificados nos estudos de desenvolvimento.

Em relação aos argumentos de que 1) pelo fato de a administração ter se iniciado após a implantação em coelhos, o aumento de perdas pré-implantação não pode ser atribuído ao CBZ; e de que 2) exposições durante o período de implantação não causaram alterações em ratos: já foi apresentada extensa discussão no item 3.1.1b do Parecer de toxicidade para o desenvolvimento embriofetal e neonatal sobre as diferenças do processo de implantação embrionária entre roedores e coelhos. Além disso, sabe-se que graus variados de discordância de efeitos sobre o desenvolvimento entre as espécies são muito comuns, podendo se manifestar como diferentes tipos de efeitos em duas espécies que respondem positivamente, efeitos semelhantes, mas com graus variados de sensibilidade, ou situações em que a substância é positiva em uma espécie e negativa em outra (Hood, 2012). Quanto ao dia de início da administração em coelhos, no estudo de Oliveira et al. (1999) a exposição dos animais se iniciou no dia gestacional (DG) 6, portanto, antes da implantação, que em coelhos se inicia no DG_{7,5} e ocorre até o DG₉ (Hood, 2012), e um dia antes do

estudo de Christian, 1985 (DG₇), que encontrou efeitos similares em dose superior.

A Innvitro (2022) argumentou também que, no estudo de Oliveira et al. (1999), não houve dose-dependência e que a porcentagem de perdas pré-implantação ficou entre 2,59% e 6,78%, dentro da taxa média em coelhos brancos *New Zealand*, que é de 13% (Paradis et al., 2019). De fato, a força do estudo é maior quando se verifica relação dose-resposta e quando a média do controle concorrente está dentro da faixa de controle histórico (Hood, 2012). No entanto, no caso do CBZ, não foi apresentado controle histórico do laboratório em que o estudo de Oliveira et al. (1999) foi conduzido. Além disso, os guias e diretrizes internacionais (OECD, 2008; Andersson et al., 2018) recomendam sempre priorizar a comparação de animais tratados com o grupo controle concorrente, podendo, quando não for possível, empregar-se dados de controle histórico. Mas o uso do controle histórico deve ser avaliado caso a caso e é adequado quando as seguintes condições são atendidas: estudos realizados no mesmo laboratório, dentro de um período razoável antes da interpretação do estudo (por exemplo, ± 2 anos) e com o mesmo desenho experimental (espécie, linhagem, fonte e idade dos animais experimentais; veículo, via e duração da administração). Informações de controle histórico compiladas por fornecedores de animais ou através de pesquisas em vários laboratórios também podem ser úteis em algumas situações, mas com as devidas ressalvas (OECD, 2008). No caso do CBZ, os dados de controle histórico obtidos por Paradis et al. (2019) e utilizados pela Innvitro (2022) para comparar com os dados de Oliveira et al. (1999) não atendem às condições anteriormente descritas (estudos conduzidos em laboratórios localizados em três diferentes países, entre 2009 e 2016, com diversas vias de administração além da gavagem, uso de veículo diferente, entre outras questões). Ressalta-se que o uso de controles históricos pode ser útil e importante quando da avaliação e interpretação da significância de eventos raros ou que ocorrem em baixa incidência, como variações e malformações fetais (Hood, 2012). Inclusive, esse racional foi utilizado no Parecer de toxicidade para o desenvolvimento embriofetal e neonatal para a discussão da significância biológica dos casos de exencefalia observados em fetos de ratos expostos ao CBZ.

Em relação à ausência de relação dose-resposta, é importante mencionar que não foi apresentado teste estatístico especificamente para essa avaliação. No entanto, houve consistência, concordância temporal e de doses e plausibilidade biológica quando se avalia em conjunto, numa abordagem de WoE, os resultados dos estudos de Oliveira et al. (1999) e de Christian (1985), que também observou efeitos do CBZ na taxa de implantação de coelhos. Portanto, ambos estudos são

considerados válidos e relevantes para a conclusão sobre esse aspecto toxicológico.

Com base nos argumentos acima apresentados e no fato do mecanismo de ação do CBZ estar relacionado à interação com microtúbulos, a Innvitro (2022) acredita ser possível estabelecer um limiar para a toxicidade para o desenvolvimento com base nos demais estudos que foram utilizados por outras agências reguladoras para definir o NOAEL de 10 mg/kg p.c./dia (Alvarez, 1987; Hoffman e Peh, 1987ab; Christian, 1985). Sugere a aplicação de um fator de segurança de 10x em decorrência das incertezas dos achados de Oliveira et al. (1999), além do fator padrão inter/intraespécie de 100x, o que resultaria uma IDA/AOEL de 0,01 mg/kg p.c./dia.

No entanto, é importante ressaltar que há outros estudos, que foram realizados em ratos e testaram doses inferiores ou próximas ao NOAEL de 10 mg/kg p.c./dia proposto pela Innvitro (2022), com efeitos significativos. No estudo de Sitarek et al. (2001) houve aumento de variações esqueléticas em fetos de ratos na menor dose testada (8 mg/kg p.c./dia) e no estudo de Quintanilha et al. (1999) foi verificado aumento biologicamente relevante de fetos de ratos com malformações raras e severas (exencefalia – efeito observado em diversos estudos em doses superiores) na dose de 12,5 mg/kg p.c./dia, a menor testada no estudo. Esses resultados reforçam que o NOAEL de 10 mg/kg p.c./dia proposto pela Innvitro (2022) é inadequado para ser utilizado como limiar para os efeitos do CBZ sobre o desenvolvimento, pois ele não seria suficientemente protetivo.

Quanto à aplicação do fator de 10x, já foi discutido detalhadamente no Parecer de toxicidade para o desenvolvimento embriofetal e neonatal que foram encontradas diferenças de mais de 30x entre as doses com efeitos nas diferentes espécies de roedores, de modo que um fator adicional de 10x poderia ser considerado inadequado para o CBZ.

Em resumo, mantém-se a conclusão do Parecer nº 11/2021 de que não se conhece todas as vias de efeito adverso e nem as diferenças interespecie relacionadas à toxicidade para o desenvolvimento que poderiam ser afetadas pela ação do CBZ na inibição da polimerização dos microtúbulos, de modo que o LOAEL de 5 mg/kg p.c./dia para perdas pré-implantação identificado no estudo em coelhos não pode ser considerado uma dose segura para extrapolação de um nível aceitável de exposição para humanos por meio da aplicação de fatores de segurança adicionais. Isso corrobora o entendimento da legislação vigente de não se vislumbrar a utilização do LOAEL para definição de um limiar de dose para os desfechos

proibitivos de registro. Assim, com os dados disponíveis, não é possível determinar um limiar de dose seguro para seres humanos para os efeitos do CBZ sobre o desenvolvimento.

Portanto, com base na avaliação do WoE disponíveis e considerando a legislação brasileira, conclui-se que o CBZ preenche os requisitos proibitivos de registro estabelecidos pela Lei nº 7.802, de julho de 1989 e pelo Decreto nº 4.074, de janeiro de 2002, devendo ser classificado na Categoria 1B em função da toxicidade reprodutiva (toxicidade para o desenvolvimento embrionário e neonatal) conforme estabelecido na Seção 6, Anexo IV da RDC nº 294, de 29 de julho de 2019. Em tais dispositivos legais, fica estabelecida a proibição do registro de agrotóxicos que apresentem características teratogênicas e para os quais não seja possível determinar um limiar de dose que permita proceder com as demais etapas da avaliação do risco.

Conclusões sobre a toxicidade para a fisiologia reprodutiva detalhadas no Parecer nº 12/2020 (Anexo 8 – SEI nº [1517596](#)).

Quanto à toxicidade reprodutiva (TR), verificou-se que o CBZ acarreta efeitos adversos na função sexual ou na capacidade reprodutiva masculina e feminina. No sexo masculino, verificou-se que o testículo é um órgão-alvo, em roedores e cães, após exposição única ou repetida ao CBZ, com ocorrência de vários efeitos adversos de curto e longo prazo, inclusive irreversíveis. Dentre esses efeitos, estão: 1) resposta testicular reversível, induzida principalmente por dosagens baixas a moderadas (50 - 100 mg/kg p.c), causando danos diretos ao epitélio seminífero, com consequente descamação de células germinativas imaturas, necrose de células em divisão e alterações na formação do núcleo de espermátides; e 2) oclusão irreversível dos ductos eferentes, induzida por doses moderadas a altas (100 - 800 mg/kg p.c.), com acúmulo de fluido, estase de espermatozoides, aumento do peso testicular, dano epitelial, resposta inflamatória, fibrose tecidual, formação de ductos anormais, atrofia do epitélio seminífero e do testículo, seguida de infertilidade permanente. Não foi possível a definição de um NOAEL para a TR no sexo masculino, posto que já na menor dose testada (0,1 mg/kg p.c./dia) foram verificados efeitos adversos.

Com relação aos efeitos no sexo feminino, foram relatados redução no ganho de peso corporal materno, no tamanho da ninhada e na viabilidade fetal, atraso/interrupção no desenvolvimento embrionário pré-implantação, redução nos sítios de implantação, além de alterações morfológicas nos óvulos após a fertilização. A extensão da perda gestacional e da aneuploidia em zigotos foi maior com a administração de CBZ no proestro, o que indica que o oócito parece ser mais sensível aos efeitos induzidos pelo CBZ durante a formação do fuso (maturação do oócito) do

que após ele ter sido formado. O mecanismo de ação subjacente aos efeitos relatados em ambos os sexos é a interrupção da polimerização dos microtúbulos pela ligação do CBZ à β -tubulina, inclusive com AOP já caracterizada (AOP 106 - <https://aopwiki.org/aops/106>) para a geração de oócitos aneuplóides após exposição ao CBZ. Tais oócitos, quando fertilizados, vão gerar descendentes aneuploides, com incidência aumentada de síndromes na prole, o que corresponde ao evento adverso observável. Também não foi possível o estabelecimento de um NOAEL para os efeitos do CBZ no sexo feminino, pois as doses testadas em todos os estudos disponíveis foram muito altas e em todas foram observados efeitos adversos (≥ 250 mg/kg p.c.).

Esse conjunto de efeitos adversos foi associado à interação do CBZ com a β -tubulina, com impedimento da montagem adequada dos fusos acromáticos nos processos de mitose e meiose ocorridos durante a espermatogênese/ovogênese, resultando em falha na segregação cromossômica e, conseqüentemente, aneuploidia nas células germinativas masculinas/femininas. Na ovogênese, especificamente, há uma AOP bem caracterizada (AOP 106 - <https://aopwiki.org/aops/106>) para a relação entre a exposição a compostos que se ligam à tubulina, como o CBZ, e a indução de aneuploidia na prole. Entretanto, não foram desenvolvidos modelos quantitativos para a relação entre os eventos dessa AOP, o que impede o estabelecimento de limiar de dose seguro associado à ocorrência desses efeitos.

Além desse efeito antimitótico, outros mecanismos relacionados à despolimerização dos microtúbulos devem estar envolvidos na geração dos efeitos adversos relatados no sexo masculino, pois, além da formação adequada do fuso acromático, os microtúbulos desempenham diversas e importantes funções nas células, quais sejam: localização do centro da célula e posicionamento de diferentes organelas (aparelho de Golgi, retículo endoplasmático, mitocôndrias, dentre outras); manutenção do formato e migração celular, transporte de carga dentro das células, etc.

Desse modo, considerando que o CBZ é um agente aneugênico, conforme já discutido no item 4.4.1, e que induz os efeitos de TR por meio desse mecanismo de aneuploidia nos oócitos e espermatozoides, além de outros efeitos testiculares diretos decorrentes da inibição da polimerização dos microtúbulos; considerando ainda que não há evidências que permitam estimar uma dose segura *in vivo* em que não se espera a ocorrência desses danos cromossômicos às células germinativas em humanos; e, principalmente, que não há evidências que permitam estimar uma dose segura *in vivo* em que não se espera a ocorrência desses efeitos sobre a fisiologia reprodutiva, os quais já foram verificados na menor dose testada

(0,1 mg/kg p.c./dia), a qual é 500 vezes inferior ao LOAEL definido para aneugenicidade em células germinativas; concluiu-se na NT preliminar que não seria possível definir um limiar de dose capaz de impedir a ocorrência dos efeitos sobre a fisiologia reprodutiva induzidos pelo CBZ.

Durante a CP, a FT apresentou parecer (Innvitro, 2022) com manifestação alinhada ao enquadramento do CBZ na Categoria 1B porém, com discordância da conclusão sobre a impossibilidade de determinação de limiar. Sobre isso, o referido parecer apontou limitações nos dois estudos da literatura – Liu et al., 2019; Li et al., 2020 – que embasaram a conclusão da GGTOX acerca da ocorrência de efeitos adversos masculinos já na dose de 0,1 mg/kg p.c./dia. As limitações citadas pela FT foram: ausência de controles positivos e de dados sobre a pureza do CBZ utilizado em ambos os estudos; ausência de dose-dependência na redução da motilidade espermática relatada por Liu et al. (2019); ausência de dados de desvio padrão ou análise estatística nos resultados apresentados por Li et al. (2020). Com base nisso, foi argumentado que tais estudos possuem relevância toxicológica questionável e, portanto, um baixo WoE. Em razão disso, a FT sugeriu o estabelecimento de limiar a partir do LOAEL de 20 mg/kg p.c./dia fornecido pelo estudo de Breslin et al. (2013), com aplicação de um fator de segurança de 1000x (fator padrão de 100x e fator adicional de 10x devido à utilização de LOAEL). Com essa abordagem, o valor de IDA/AOEL resultante seria de 0,02 mg/kg p.c./dia.

Por oportuno, destaca-se que toda a argumentação do parecer supracitado (Innvitro, 2022) se baseia nessas limitações acima listadas, a fim de descartar as evidências fornecidas pelos dois estudos em questão. Ou seja, não houve discussão de novos estudos, além daqueles já abordados pela GGTOX no Parecer nº 12/2021(SEI nº 1517596), quando da elaboração da NT preliminar, sendo a argumentação ora apresentada considerada insuficiente para uma alteração no entendimento acerca da ausência de limiar para esse desfecho toxicológico. A seguir, será detalhado esse posicionamento da GGTOX em relação aos argumentos levantados pela FT durante a CP.

Primeiramente, insta esclarecer que, na análise do WoE conduzida pela GGTOX, a qual segue o mesmo racional adotado por outras agências reguladoras internacionais, todas as evidências disponíveis, provenientes de estudos regulatórios e da literatura científica, são consideradas conjuntamente para se alcançar uma conclusão. Assim, o processo de análise do WoE se baseia em três considerações fundamentais – confiabilidade, relevância e consistência (reprodutibilidade dos achados) dos dados disponíveis – a fim de concluir se essas evidências combinadas são suficientes para responder a uma dada questão.

Desse modo, para se concluir quanto ao enquadramento do CBZ na Categoria 1B e à impossibilidade de definição de limiar de dose, os dados provenientes da análise de todos os desfechos reportados em todos os estudos que integram a base de dados desse IA foram considerados coletivamente. Isso significa que, ainda que individualmente alguns estudos tenham apresentado limitações – relato limitado de metodologia e resultados – quando analisados em conjunto, em termos de reprodutibilidade e relevância dos resultados, embasaram satisfatoriamente a decisão regulatória adotada.

Especificamente no tocante às limitações levantadas pela FT (Innvitro, 2022), os dados de pureza do CBZ utilizado, de fato, não foram informados em alguns dos estudos da literatura incluídos na análise, não só do desfecho de TR, mas também de outros desfechos toxicológicos. Isso porque a GGTOX considera que, isoladamente, a ausência desse dado não invalida uma evidência, a menos que fique claro no relato da metodologia que o estudo foi conduzido com o produto formulado. Ou seja, sempre que for possível presumir que a substância em si foi empregada no protocolo do estudo, ainda que a pureza não tenha sido informada, seus dados são avaliados e considerados em conjunto com as demais evidências da base de dados, numa análise de WoE.

Similarmente, a ausência de controle positivo, dos dados de desvio padrão ou do detalhamento da análise estatística – também apontados pela FT – ainda que sejam fatores capazes de reduzir o WoE, todos eles foram considerados na avaliação da base de dados como um todo, tanto nos estudos provenientes da literatura quanto os regulatórios. Esse mesmo entendimento se aplica à ausência de dose-resposta apontada em um estudo específico (Liu et al., 2019), ou seja, todos os resultados disponíveis foram avaliados em conjunto e, ainda que este não tenha apresentado dose-dependência, houve sim diferença estatística significativa em relação ao controle concorrente ($p < 0,05$).

A FT pontuou ainda que a GGTOX, no comparativo entre os estudos de Correa et al. (2002) e Evenson et al. (1987) – os quais indicaram ausência de efeitos teciduais em camundongos após exposição a doses entre 164 e 250 mg/kg p.c./dia, e os estudos de Liu et al. (2019) e Li et al. (2020) – nos quais foram relatados efeitos em parâmetros espermáticos em doses a partir de 0,1 mg/kg p.c./dia; atribuiu essas diferenças ao desenho experimental (tempo avaliado, número de animais, sensibilidade dos parâmetros avaliados e descrição de pureza), sendo que o único estudo que possui pureza informada (98,1 %) é o de Evenson et al. (1987). Diante disso, a FT argumentou que: “além dos problemas relacionados aos estudos de Liu et al. (2019) e Li et al. (2020), que foram discutidos acima, resultados

conflitantes para o mesmo parâmetro diminuem ainda mais o peso dessas evidências” (Innvitro, 2022).

Sobre esse ponto, resta claro no parecer da GGTOX que, de fato, as divergências observadas entre os resultados obtidos pelos dois primeiros e pelos dois últimos estudos supracitados foram atribuídas a diferenças no desenho experimental deles, tendo os dois últimos estudos as seguintes vantagens: período de exposição mais prolongado (5 semanas), maior grupo amostral (30 animais/grupo, o que confere um maior poder estatístico) e a mensuração de parâmetros bastante sensíveis para a avaliação da toxicidade no aparelho reprodutor masculino, como a motilidade espermática (não avaliada nos estudos de Correa et. al., 2002 e Evenson et. al., 1987). Ou seja, no Parecer nº 12/2021 (SEI nº 1517596) não foi levantada pela GGTOX a informação ou não de pureza como fator decisório para inclusão ou exclusão de determinada evidência na análise. Em especial, porque muitos desses estudos da literatura avaliados não continham dado de pureza, mas, ainda assim, foram incluídos no WoE, conforme racional seguido pela agência e já explicado anteriormente neste parecer. Ainda, a alegação de que os resultados conflitantes para o mesmo parâmetro, fornecidos por esses estudos, deveriam diminuir ainda mais o peso dessas evidências está equivocada, pois não houve resultado conflitante para a motilidade espermática, posto que tal parâmetro sequer foi avaliado por Correa et al. (2002) e Evenson et al. (1987).

Então, a GGTOX conclui que nenhuma das limitações apontadas pelo parecer apresentado (Innvitro, 2022) invalida as evidências fornecidas pelos estudos de Liu et al. (2019) e Li et al. (2020); e mantém o seu posicionamento pela manutenção de tais evidências na integração do WoE, pois: 1) Sabe-se que a motilidade espermática pode ser um dos primeiros e mais sensíveis parâmetros para avaliação da toxicidade no aparelho reprodutor masculino (Hood, 2012), então há coerência, do ponto de vista fisiológico, da sua alteração em baixas doses com os demais efeitos adversos reprodutivos observados em doses maiores – alterações no peso testicular, aumento do diâmetro e atrofia dos túbulos seminíferos, obstrução de dutos eferentes, descamação de células germinativas, alteração na morfologia e contagem espermáticas, inibição da espermatogênese, culminando em infertilidade irreversível; 2) Outros estudos incluídos pela GGTOX na análise do WoE (Salihu et al., 2017a,b; Gray et al., 1990; Yu et al., 2009) também relataram redução significativa da motilidade espermática após exposição oral ao CBZ, o que demonstra que há reprodutibilidade desse achado entre os diferentes estudos avaliados; 3) A alteração da motilidade espermática tem coerência com o já conhecido mecanismo de ação do CBZ, extensamente detalhado no parecer de

toxicidade para a fisiologia reprodutiva: interação com β -tubulina, com indução de problemas durante a diferenciação das espermatídes (alterações no núcleo, acrossomo e manchete) e redução da motilidade durante a espermiogênese, as quais podem ser resultantes de anormalidades morfológicas decorrentes da aneuploidia induzida nos espermatozoides, bem como por efeito direto sobre os microtúbulos presentes no flagelo.

Por fim, a FT (Innvitro, 2022) pontuou também que o posicionamento pela não definição de limiar pela GGTOX se baseou em duas principais justificativas: 1) ausência de evidências suficientes para se estimar uma dose segura *in vivo* em que não se espera a ocorrência de danos cromossômicos às células germinativas em humanos, baseado na consideração de um efeito não significativo estatisticamente relatado no estudo de Matsuo et al. (1999); e 2) ausência de evidências suficientes para se estimar uma dose segura *in vivo* na qual não se espera a ocorrência de efeitos na fisiologia reprodutiva masculina, com base nos achados de Liu et al. (2019) e Li et al. (2020), os quais indicaram efeito na dose de 0,1 mg/kg p.c./dia.

Sobre o primeiro ponto, ressalta-se que não houve alteração do entendimento da GGTOX sobre a possibilidade de definição de limiar para aneugenicidade induzida pelo CBZ, conforme discutido no item 4.4.1 desta NT conclusiva, que trata dos aspectos mutagênicos desse IA. Então, considerando que os efeitos de TR nas células germinativas masculinas e femininas são consequência da ação aneugênica do CBZ, essa conclusão alcançada para o potencial mutagênico já seria suficiente para, em alinhamento, se optar pela impossibilidade de determinação de um limiar de dose seguro para o CBZ capaz de impedir a ocorrência dos efeitos de TR. A isso, soma-se toda a explanação feita acima referente a análise do WoE para os desfechos de TR, o que responde ao segundo ponto levantado pela FT no parágrafo anterior.

Adicionalmente, é importante ressaltar que, ainda que a argumentação da FT (Innvitro, 2022) fosse acatada e que os estudos de Liu et al. (2019) e Li et al. (2020) fossem desconsiderados na análise do WoE, não há nenhum outro estudo que possibilite a determinação de NOAEL, uma vez que, já nas menores doses testadas, tanto para os desfechos no sexo feminino quanto masculino, foram observados efeitos adversos. Tanto é que, no parecer apresentado (Innvitro, 2022), sugeriu-se a utilização da dose de 20 mg/kg p.c./dia como LOAEL, mas não NOAEL, como base para o estabelecimento de limiar. Isso significa que não há evidências que mostrem um nível de dose em que esses efeitos adversos não ocorreram. Quanto a esse racional sugerido pela FT, a GGTOX reitera que não se vislumbra, considerando a legislação vigente, a utilização do LOAEL como base para

definição de um limiar de dose considerado seguro para desfechos proibitivos de registro, posto que tal limiar precisa ser bem caracterizado e estar fortemente embasado em dados experimentais, de modo a garantir o adequado cumprimento da legislação sanitária brasileira e, conseqüentemente, a proteção da saúde da população.

Portanto, com base na avaliação do WoE disponíveis e considerando a legislação brasileira, conclui-se que o CBZ preenche os requisitos proibitivos de registro estabelecidos pela Lei nº 7.802, de julho de 1989 e pelo Decreto nº 4.074, de janeiro de 2002; devendo ser classificado na Categoria 1B em função da toxicidade reprodutiva, conforme estabelecido na Seção 6, Anexo IV da RDC nº 294, de 29 de julho de 2019. Em tais dispositivos legais, fica estabelecida a proibição do registro de agrotóxicos categorizados como conhecidos ou presumidamente causadores de dano ao aparelho reprodutor, e para os quais não seja possível determinar um limiar de dose que permita proceder com as demais etapas da avaliação do risco.

CLASSIFICAÇÃO DO CARBENDAZIM DE ACORDO COM OS CRITÉRIOS DA RDC Nº 294/2019

A classificação de IA de agrotóxicos determinada pela RDC nº 294/2019 exige que conste na monografia a classificação e, em bula, conste as categorias, pictogramas específicos e frases de perigo. O Quadro 1 a seguir resume as classificações e NOAEL, LOAEL ou limiares atribuídos ao CBZ durante a reavaliação toxicológica desse IA, bem como as respectivas frases de perigo para cada desfecho que levou à necessidade de classificação toxicológica do CBZ.

Quadro 1. Classificação toxicológica do CBZ segundo os critérios estabelecidos pela RDC nº 294/2019, com respectiva indicação de NOAEL, LOAEL ou limiares e frases de perigo.			
Desfecho	Classificação	NOAEL, LOAEL ou limiar	Frase de perigo
Toxicidade para órgão-alvo específico por exposição única	Categoria 1 – presumidamente produz toxicidade significativa em humanos após exposição única.	LOAEL=50 mg/kg p.c.*	Provoca danos aos testículos.
Toxicidade para órgão-alvo específico por exposição repetida	Categoria 2 – presumidamente possui potencial de produzir dano à saúde humana após exposição repetida.	LOAEL=16 mg/kg p.c./dia* RDC não requer limiar específico para esse desfecho.	Pode provocar danos ao fígado por exposição repetida ou prolongada.
Mutagenicidade	Categoria 1B – presumidamente induz mutações em células	Não há limiar que adequadamente proteja a população exposta.	***

	germinativas de seres humanos.		
Carcinogenicidade	Categoria 1B – presumidamente possui potencial carcinogênico para seres humanos.	LOAEL=22,5 mg/kg p.c./dia**	Perigo. Pode provocar câncer em doses acima de 0,0225 mg/kg p.c./dia.
Toxicidade reprodutiva	Categoria 1B – presumidamente possui potencial de causar toxicidade reprodutiva para seres humanos.	Não há limiar que adequadamente proteja a população exposta.	***

* Não corresponde ao limiar, mas sim à menor dose testada.

** Valor igual ou abaixo do limiar de carcinogenicidade. Pode ser utilizado com segurança como PoD para esse desfecho, sendo suficientemente protetivo para o desencadeamento de câncer na população humana quando utilizado fator de segurança de 1.000x na derivação da dose de referência.

***Não se aplica, pois a substância preenche critérios proibitivos de registro e não foi possível determinar limiar de seguro para a exposição humana.

CONSOLIDAÇÃO DAS CONTRIBUIÇÕES À CONSULTA PÚBLICA Nº 1.099/2022

As contribuições recebidas durante a CP podem ser divididas, de maneira geral, em cinco grupos: aspectos toxicológicos, prazos de descontinuação, extensão da proibição aos preservativos de madeira, aspectos agrônômicos e aspectos econômicos e concorrenciais. Houve ainda contribuições que discordaram da proibição do CBZ, mas se limitaram a expressar sua opinião sem fazer qualquer contribuição técnica ou ao texto da norma, por isso, foram consideradas como ‘Inválida (Fora do escopo)’. A planilha com a análise das contribuições pode ser acessada no Anexo 11 (SEI nº [1978456](#)).

Sobre os aspectos toxicológicos, as contribuições versam sobre a concordância ou discordância em relação à proibição do uso do CBZ em agrotóxicos no Brasil.

As discordâncias foram no sentido de um entendimento de que é possível estabelecer uma dose baixa o suficiente de exposição da população ao CBZ que seja considerada segura para os desfechos toxicológicos mutagenicidade e toxicidade para a fisiologia reprodutiva e para o desenvolvimento embriofetal. Em decorrência desse entendimento, foram feitas outras contribuições em diversos dispositivos da norma. Contudo, o posicionamento da área técnica para estas contribuições, como explicado detalhadamente nas seções específicas desta NT para cada desfecho toxicológico, foi de classificá-las como ‘Não aceita’, mantendo-se a posição inicial exarada nos documentos Parecer nº 1/2021 – Mutagenicidade (SEI nº [1309909](#)), Parecer nº 11/2021 – Toxicidade para o

desenvolvimento embrionário e neonatal (SEI nº [1505782](#)) e Parecer nº 12/2021 – Toxicidade para a fisiologia reprodutiva (SEI nº [1517596](#)).

Sobre os prazos para descontinuação, as contribuições se ativeram a propor prazos superiores a dois anos para descontinuação do CBZ. Essas contribuições também foram classificadas como ‘Não aceita’, por serem esses prazos considerados excessivos. O prazo de dois anos não foi considerado adequado devido às características toxicológicas proibitivas de registro do CBZ para as quais não há dose considerada segura para o ser humano, com potencial risco agudo e crônico na saúde da população, conforme detalhado nos pareceres acima elencados. Além disso, conforme discutido no Parecer nº 10/2022 – Análise das diligências direcionadas ao MAPA, Embrapa, Ibama e Ministério da Saúde sobre a descontinuação dos produtos à base do ingrediente ativo Carbendazim (SEI nº [1970728](#)), os órgãos ligados ao setor agrícola informaram haver outros IAs que podem servir como substitutos do CBZ. Já o Ibama relatou a forte presença do IA no ambiente, em concordância com as conclusões da GGTOX detalhadas no Parecer nº 3/2021 – Caracterização da exposição humana ao Carbendazim (SEI nº [1392941](#)), o que motiva a área técnica a não acatar tais proposições de prazos de descontinuação. As propostas para os prazos de descontinuação do CBZ podem ser conferidas no Parecer nº 11/2022 (SEI nº [1977850](#)).

Para o grupo de contribuições que trataram da extensão da proibição do CBZ aos preservativos de madeira, foi argumentado que a regulação de preservativos de madeira é feita por normas diferentes daquelas dos agrotóxicos e, portanto, as decisões da reavaliação do CBZ não poderiam se estender ao setor de tratamento de madeira. De fato, o arcabouço normativo dos preservativos de madeira é diferente dos agrotóxicos e cabe ao Ibama a decisão pela proibição do uso do CBZ nestes produtos. Detalhes do processo de registro de preservativos de madeira podem ser consultados em: <http://www.ibama.gov.br/preservativos-de-madeiras>. Todavia, como previsto no art. 29 da RDC nº 221, de 28 de março de 2018, que dispõe sobre os critérios e os procedimentos para o processo de reavaliação toxicológica de IA de agrotóxicos no âmbito da Anvisa, ao fim do processo de reavaliação toxicológica o MAPA e o Ibama serão oficializados da decisão.

Contribuições técnicas sobre impactos econômicos e agrônômicos foram enviados pela Coordenação-Geral de Inovação, Indústria de Rede e Saúde do Ministério da Economia e pela Confederação Nacional da Agricultura (CNA).

O documento enviado pela Coordenação-Geral de Inovação, Indústria de Rede e Saúde do Ministério da Economia apresenta

preocupação principal com o fato da Anvisa ter decidido pela dispensa de Análise de Impacto Regulatório (AIR) para a RDC de reavaliação do CBZ e pela decisão de aprovar um prazo curto de CP para esta RDC. Ainda, o documento argumenta que questões concorrenciais deveriam ter sido consideradas para uma melhor decisão da Agência. Os motivos que levaram a Anvisa a dispensar a AIR e, excepcionalmente, a reduzir o prazo de contribuição da CP foram largamente explicados durante o processo decisório nos votos dos diretores. Quanto à análise concorrencial, este aspecto não faz parte do escopo de atuação da Anvisa quando a Agência autoriza, registra ou proíbe um produto sujeito à vigilância sanitária. O escopo se restringe a questões relacionadas à saúde, pois a missão da Agência é a promoção e proteção da saúde humana. Por vezes, o desabastecimento do mercado é considerado no gerenciamento do risco à saúde. Assim, questões relacionadas à concorrência comercial não estão no escopo da Agência como um todo.

Especificamente para agrotóxicos, cabe esclarecer que a Anvisa não concede o registro; a Agência faz a avaliação toxicológica para fins de registro, verificando as relações do produto com a saúde humana, e aponta a classificação toxicológica do produto. No âmbito da reavaliação de um IA, o foco da atuação também é esse, não havendo nenhuma relação com a prática concorrencial.

O documento apresentado pela Coordenação-Geral de Inovação, Indústria de Rede e Saúde do Ministério da Economia tem a preocupação em recomendar que a Anvisa cumpra seu papel institucional de considerar minuciosamente as contribuições no âmbito da CP 1.099/2022. Neste sentido, cabe esclarecer que a Anvisa, reconhecida pela transparência e pelo estímulo à participação social, jamais deixou de apresentar, em todas as suas CP de reavaliação de agrotóxicos, a análise minuciosa das contribuições, respeitando o cidadão e as instituições que contribuem com o processo decisório da Agência. Portanto, é vasta a experiência institucional da Anvisa neste instrumento.

A CNA apresentou documento com informações sobre os impactos econômicos e agronômicos da proibição do CBZ para o setor agrícola, apontando algumas culturas em que a proibição poderá resultar em aumento no custo de produção. Quanto a essas preocupações, a Anvisa tem realizado reavaliações de IA de agrotóxicos desde a sua criação e sempre ponderou as questões agronômicas e os impactos da proibição ao setor agrícola para o gerenciamento do risco à saúde, determinando períodos de descontinuação gradual do uso dos agrotóxicos banidos. O parecer com as análises das diligências (SEI [1970728](#)), apresenta um quadro resumo com os prazos de descontinuação de uso de agrotóxicos banidos

pela Anvisa e com as medidas de mitigação durante o período de descontinuação. A seção 7 apresenta os pontos mais relevantes desta análise.

Não houve contribuição da CNA quanto às mitigações a serem realizadas pelos agricultores para proteger a saúde dos trabalhadores contratados para o trabalho nas lavouras, os quais são os primeiros e mais impactados pelos potenciais efeitos deletérios na saúde apontados na avaliação toxicológica. Também não foram apresentados pela CNA impactos econômicos que são gerados pelos desfechos graves que podem ocorrer aos trabalhadores e consumidores de alimentos quando expostos ao CBZ, impactos estes que podem, eventualmente, ser muito maiores para a sociedade brasileira em geral, que os impactos no custo da produção agrícola.

Ainda, a CNA apresentou uma defesa do Projeto de Lei (PL) nº 1.459/2022 que tramita no Senado Federal (PL nº 6.299/2002 da Câmara dos Deputados). A Anvisa já se manifestou contrária a este PL por diversas vezes em documentos técnicos (Anexo 12 - SEI nº [1975053](#)) por entender que a sua aprovação compromete a atuação regulatória da Agência, especialmente nos processos de reavaliação toxicológica, o que pode resultar em risco inaceitável à saúde da população brasileira por meio da exposição a agrotóxicos sem a adequada avaliação do órgão da saúde.

PLANO DE DESCONTINUAÇÃO APÓS A PROIBIÇÃO DO CBZ DETALHADO NO PARECER Nº 10/2022 (ANEXO 10 - SEI Nº [1970728](#))

Conforme o exposto no Parecer nº 11/2022, os seguintes pontos são relevantes para a tomada de decisão quanto à descontinuação dos produtos à base de CBZ:

- a descontinuação é, normalmente, a medida adotada nas decisões de banimento de agrotóxicos por agências regulatórias internacionais;
- a Anvisa tem atuação consuetudinária no estabelecimento de períodos de descontinuação de uso de agrotóxicos proibidos por fatores relacionados a saúde;
- não existem parâmetros objetivos determinados pela Anvisa para o estabelecimento de períodos de descontinuação;
- do ponto de vista do impacto ambiental, o Ibama conclui que a incineração é geralmente mais preocupante do que o esgotamento do estoque dos produtos;
- do ponto de vista agrônômico, o MAPA e a Embrapa consideram que existem alternativas disponíveis; entretanto, principalmente para o tratamento de sementes, é importante a combinação de diversos agrotóxicos;
- o MAPA apontou que o tratamento industrial de sementes para atender a safra de verão se inicia em julho. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (<http://www.conab.gov.br>), que monitora os ciclos de cultivo no Brasil, o plantio

das culturas de verão se encerram, de maneira geral, entre os meses de fevereiro e março;

- do ponto de vista da produção de alimentos, o MAPA esclareceu que não se espera desabastecimento, mas deve ocorrer aumento de custos de produção com consequente aumento de preço dos alimentos (especialmente do feijão, cuja produção atende principalmente à demanda interna).

Portanto, os seguintes critérios serão adotados para a descontinuação de uso do Carbendazim, conforme proposta de RDC de reavaliação do CBZ:

- a) Proibição imediata da importação e produção de produtos técnicos;
- b) Proibição imediata da importação de produtos formulados;
- c) Proibição, após três meses da data da vigência da RDC, da produção de produtos formulados;
- d) Proibição, após seis meses da data da vigência da RDC, da comercialização de produtos formulados;
- e) Proibição, após 12 meses da data da vigência da RDC, da exportação de produtos técnicos e de produtos formulados;
- f) Os produtos formulados adquiridos pelos usuários finais, pessoas físicas ou jurídicas, poderão ser usados até o seu esgotamento;
- g) Serão proibidas, imediatamente, as tecnologias de aplicação que apresentam maior potencial de exposição do trabalhador, pois o CBZ apresenta desfechos toxicológicos proibitivos que podem ocorrer após exposição única.

CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES RELATIVAS À REAVALIAÇÃO DO CARBENDAZIM

Com base na avaliação toxicológica realizada e conforme os critérios proibitivos de registro estabelecidos pela Lei nº 7.802/1989, pelo Decreto nº 4.074/2002 e pela RDC nº 294/2019, sugere-se a proibição da produção, da importação, da exportação, da comercialização e/ou do uso agrícola do Carbendazim, seus produtos técnicos e formulados devido ao seu potencial de causar mutagenicidade, toxicidade para a fisiologia reprodutiva e toxicidade para o desenvolvimento embriofetal e neonatal e da impossibilidade de determinação de limiares seguros de exposição humana para esses desfechos toxicológicos.

Medidas a serem implementadas pela Anvisa

Publicar RDC determinando a proibição da produção, da importação, da exportação, da comercialização e do uso do IA de agrotóxico CBZ, seus produtos técnicos e formulados, incluindo um plano para descontinuação de uso baseado nas orientações da seção 7 (Anexo 13 - Minuta de RDC de reavaliação do CBZ - SEI nº [1978936](#)).

Incluir na monografia da Aminohidroxifenazina (AHP) e a Diaminofenazina (DAP) como impurezas de relevância toxicológica para o CBZ com o limite máximo de 0,5 ppm e 0,6 ppm, respectivamente.

Incluir na monografia da Classificação toxicológica do CBZ na Categoria 1 quanto à toxicidade a órgão-alvo por exposição única; na Categoria 2 quanto à toxicidade a órgão-alvo por exposição repetida; na Categoria 1B quanto à mutagenicidade; na Categoria 1B quanto à carcinogenicidade; e na Categoria 1B quanto à toxicidade reprodutiva.

Excluir o uso agrícola da monografia do CBZ.

Manter as informações sobre o uso agrícola do CBZ na monografia para fins de monitoramento de resíduos de agrotóxicos nos alimentos até prazo a ser estabelecido na proposta de RDC.

Atualizar a Certidão de Classificação Toxicológica dos produtos que contenham CBZ e que sejam utilizados como preservativos de madeira.

Oficiar o MAPA sobre a decisão do processo de reavaliação para o IA de agrotóxico CBZ.

Oficiar o Ibama sobre a decisão do processo de reavaliação para o IA de agrotóxico CBZ e anexar ao ofício a Certidão de Classificação Toxicológica atualizada dos produtos que contenham CBZ e que sejam utilizados como preservativos de madeira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adler, I., Schmid, T.E., Baumgartner, A. Induction of aneuploidy in male mouse germ cells detected by the sperm-FISH assay: a review of the present data base, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Volume 504, Issues 1–2, Pages 173-182, 2002.

Alvarez, L. Teratogenicity study of INE-965 (carbendazim) in rats. Unpublished report No MR- 7976-001 HLR 281-87 from E.I. DuPont de Nemours and Co.,Haskell Laboratory, Newark, Delaware, USA. Previously submitted to WHO by E.I. du Pont de Nemours and Company, Wilmington, Delaware, USA. 1987. Apud APVMA 2009; EFSA 2009a e USEPA 2020.

Anastassiades, M.; Schwack, W. Analysis of carbendazim, benomyl, thiophanate methyl and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in fruits and

vegetables after supercritical fluid extraction. *Journal of Chromatography A*, [S. l.], v. 825, n. 1, p. 45–54, 1998.

Andersson, N., Arena, M., Auteri, D., Barmaz, S., Grignard, E., Kienzler, A., Lepper, P., Lostia, A. M., Munn, S., Parra Morte, J. M., Pellizzato, F., Tarazona, J., Terron, A., Van der Linden, S. Guidance for the identification of endocrine disruptors in the context of Regulations (EU) No 528/2012 and (EC) No 1107/2009. *EFSA Journal*, 16(6), 1–135. 2018.

APMVA. Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. Office of Chemical Safety and Environmental Health Office of Health Protection. Chemical Review Program. Human health risk assessment of Carbendazim. Volume 2. December 2009.

APVMA. Carbendazim Review Findings Report. Agosto 2012.

Breslin WJ, Paulman A, Sun-Lin D, Goldstein KM, Derr A. The inhibin B (InhB) response to the testicular toxicants mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP), 1,3 dinitrobenzene (DNB), or carbendazim (CBZ) following short-term repeat dosing in the male rat. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 98(1):72-81, 2013.

Christian, Hoberman, Feussner. Developmental toxicity study of H-15647 administered via gavage to New Zealand White rabbits. DuPont Report no. HLO 515-85.1985. Apud APVMA 2009; EFSA 2009^a e USEPA 2020.

Correa LM, Nakai M, Strandgaard CS, Hess RA, Miller MG. Microtubules of the mouse testis exhibit differential sensitivity to the microtubule disruptors Carbendazim and colchicine . *Toxicol Sci*. 69(1):175-82, 2002.

Coutinho, C.F.B.; Galli, A.; Mazo, L.H.; Machado, S.A.S. Carbendazim e o Meio Ambiente: Degradação e Toxidez. *Pesticidas: r. ecotoxicol. e meio ambiente*, Curitiba, v.16, jan/dez, 2006.

Cummings, A. M., Harris, S. T., & Rehnberg, G. L. Effects of methyl benzimidazole carbamate during early pregnancy in the rat. *Toxicological Sciences*, 15(3), 528–535. 1990.

Dere, E., Wilson, S., Anderson, L., Boekelheide, K. Sperm Molecular Biomarkers Are Sensitive Indicators of Testicular Injury Following Subchronic Model Toxicant Exposure . *Toxicological Sciences*. 153. kfw137. 10.1093/toxsci/kfw137. 2016.

EChA. European Chemicals Agency. Guidance for Human Health Risk Assessment for Biocidal Active Substances and Biocidal Products. Guidance on the BPR: Volume III Assessment & Evaluation (Parts B+C) Version 2.1. EChA-13-G-18-EN. 2017.

EFSA. European Food Safety Authority, Update: use of the benchmark dose approach in risk assessment. EFSA Journal 15(1):4658. 2017.

EFSA. Reasoned opinion on the toxicological properties and MRLs for carbendazim and thiophanate-methyl. Genotoxicity studies on carbendazim (MBC). 2021a

EFSA. Report of Pesticide Peer Review Meeting TC 39 Thiophanate- Methyl and Carbendazim. 2021b.

EFSA. Reasoned opinion on the toxicological properties and maximum residue levels (MRLs) for the benzimidazole substances carbendazim and thiophanate-methyl. EFSA Journal, v. 19, n. 7, p. 6773. 2021c.

EFSA. Guidance on aneugenicity assessment. Scientific opinion. EFSA Journal, v. 19, n. 8, p. 6770. 2021d.

Evenson DP, Janca FC, Jost LK. Effects of the fungicide methyl-benzimidazol-2-yl carbamate (MBC) on mouse germ cells as determined by flow cytometry . J Toxicol Environ Health. 20(4):387-99, 1987.

Gray LE Jr, Ostby J, Linder R, Goldman J, Rehnberg G, Cooper R. Carbendazim-induced alterations of reproductive development and function in the rat and hamster. Fundam Appl Toxicol. 15(2):281-97, 1990.

Hofmann, H.T.; Peh, J. Report on the study of methyl benzimidazole-2-cabamate (MBC) in rats. Unpublished report No. 87/091, Doc. No. A52506 from BASF AG, Ludwigshafen, Germany. 1987a. Apud APVMA 2009, EFSA 2009^a e JMPR (2005).

Hofmann, H.T.; Peh, J. Report on the study of methyl benzimidazole-2-cabamate (MBC) in rats. Unpublished report No. 87/092, Doc. No. A52505 from BASF AG, Ludwigshafen, Germany; 1987b. Apud APVMA 2009, EFSA 2009^a e JMPR (2005).

Hood, Ronald D. Developmental and reproductive toxicology: a practical approach. 3. ed. London: Informa Healthcare, 2012.

Innvitro Suporte e Gestão em Toxicologia. Villela, I.V.; Henriques, J.A.P.; Machado, M.S; Fonseca, M.B. P66/22-2 – PARECER NOTA TÉCNICA PRELIMINAR DE REAVALIAÇÃO DO CARBENDAZIM, revisão 02, de 11/07/2022. Elaborado por Innvitro. Solicitante Força Tarefa Carbendazim.

JMPR. THIOPHANATE-METHYL (077), 2003. Disponível em https://www.fao.org/fileadmin/user_upload/IPM_Pesticide/JMPR/Evaluations/2004/Thiophanat.pdf .

Li H., Zhangb P., Zhao Y., Zhangc H. Low doses of carbendazim and chlorothalonil synergized to impair mouse T spermatogenesis through

epigenetic pathways. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 188, p. 1-10. 2020.

Liu J, Zhang P, Zhao Y, Zhang H. Low dose carbendazim disrupts mouse spermatogenesis might be through estrogen receptor related histone and DNA methylation. *Ecotoxicol Environ Saf.* 176:242-249, 2019.

Matsuo F., Masaaki N., Nasu T. The Fungicide Carbendazim Induces Meiotic Micronuclei in the Spermatids of the Rat Testis. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 61, n.5, p. 573-576. 1999.

Michelangelo Anastassiades, Wolfgang Schwack; Analysis of carbendazim, benomyl, thiophanate methyl and 2,4- dichlorophenoxyacetic acid in fruits and vegetables after 1 supercritical fluid extraction; *Journal of Chromatography A*, 825 (1998) 45–54; 25 de agosto de 1998.

Nakamura, M.; et. al. Determination of Carbendazim, Thiophanate, Thiophanate-methyl and Benomyl Residues in Agricultural Products by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry; *Food Hyg. Saf. Sci.* Vol. 52, No. 3; 5 de outubro de 2010.

NRC. National Research Council of the National Academies. Science and decisions: Advancing Risk Assessment. Board on Environmental Studies and Toxicology. Division on Earth and Life Studies Committee on Improving Risk Assessment Analysis Approaches Used by the USEPA. 2009.

OECD. Guidance document on mammalian reproductive toxicity testing and assessment. ENV/JM/MONO(2008)16. Series on testing and assessment. Number 43. 2008.

Oliveira, M.S.; Lessa, S.C.; Farah, E.; Vargas, M.A.T. G2104C-414/98 - Toxicidade pré-natal em coelhos New Zealand após administração oral por gavage do carbendazim técnico. Bioagri Laboratórios Ltda. Contratante: Milênia AgroCiências S/A. 1999.

Pacheco SE, Anderson LM, Sandrof MA, Vantangoli MM, Hall SJ, Boekelheide K. Sperm mRNA transcripts are indicators of sub-chronic low dose testicular injury in the Fischer 344 rat. *PLoS One*. 7(8):e44280, 2012.

Paradis, F.H.; Downey, A.M.; Beaudry, F.; Pinêtre, C.; Ellemann-Laursen, S.; Makin, A.; Hill, K.; Singh, P.; Hargitai, J.; Forster, R.; Tavcar, R.; Authier, S. Interspecies Comparison of Control Data from Embryo-Fetal Development Studies in Sprague-Dawley Rats, New Zealand White Rabbits, and Göttingen Minipigs. *International journal of toxicology*, 38(6), 476–486, 2019.

PMRA. Thiophanate-methyl and Its Associated End-use Products. Proposed Re-evaluation Decision. 2019.

Quintanilha, L.C.; Lessa, S.C.; Farah, E.; Vargas, M.A.T. G2104R-414/98 - Toxicidade pré-natal em ratos Wistar após administração oral por gavage do carbendazim técnico. Bioagri Laboratórios Ltda. Contratante: Milênia AgroCiências S/A. 1999.

Rajeswary S, Kumaran B, Ilangovan R, Yuvaraj S, Sridhar M, Venkataraman P, Srinivasan N, Aruldas MM. Modulation of antioxidant defense system by the environmental fungicide carbendazim in Leydig cells of rats. Reproductive Toxicology, Volume 24, Issues 3–4, 2007.

Salihu M, Ajayi BO, Adedara IA, Farombi EO. 6-Gingerol-rich fraction prevents disruption of histomorphometry and marker enzymes of testicular function in carbendazim-treated rats. Andrologia. 49(10), 2017a.

Salihu M, Ajayi BO, Adedara IA, de Souza D, Rocha JBT, Farombi EO. 6-Gingerol-rich fraction from Zingiber officinale ameliorates carbendazim-induced endocrine disruption and toxicity in testes and epididymis of rats. Andrologia. 49(5), 2016.

SBTox (Sociedade Brasileira de Toxicologia). Manifesto de apoio à proposta de Resolução de Diretoria Colegiada que dispõe sobre a proibição do ingrediente ativo Carbendazim em produtos agrotóxicos no país. 6 p. 05/07/2022.

Shukla V, Kaushal JB, Kumar R, Popli P, Agnihotri PK, Mitra K, Dwivedi A. Microtubule depolymerization attenuates WNT4/CaMKIIa signaling in mouse uterus and leads to implantation failure. Reproduction. 158(1):47-59, 2019.

Sitarek, K. Embryolethal and teratogenic effects of carbendazim in rats. Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis, 21(5), 335–340. 2001.

Spencer, F., Chi, L.; Zhu, M. X. Effect of benomyl and carbendazim on steroid and molecular mechanisms in uterine decidual growth in rats. Journal of Applied Toxicology, 16(3), 211–214; 1996.

UE. European Union Pesticide Database. *Acessado em: 17 de maio de 2021. Disponível em:* https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/active-substances/?event=as.details&as_id=506

UE. Regulamento de Execução (UE) 2015/408 da comissão PMRA. Jornal Oficial da União Europeia. 11 de março de 2015.

USEPA. United States Environmental Protection Agency, A Review of the Reference Dose and Reference Concentration Processes, EPA/630/P-02/002F. 2002.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. Thiophanate-Methyl and Carbendazim: Draft Human Health Risk Assessment. Memorandum Decision No. 452566. DP D452566. Março 2020.

Yu G, Guo Q, Xie L, Liu Y, Wang X. Effects of subchronic exposure to carbendazim on spermatogenesis and fertility in male rats. Toxicol Ind Health. Feb; 25(1):41-7, 2009.

Zhou, J., Xiong, K., Yang, Y., Ye, X., Liu, J., & Li, F. Deleterious effects of benomyl and carbendazim on human placental trophoblast cells. Reproductive Toxicology, 51, 64–71, 2015.

ANEXOS

Anexo 1 – documento SEI nº [1451178](#) – Parecer nº 07/2021 – Busca Sistematizada e Seleção de Referências para a reavaliação toxicológica do Carbendazim.

Anexo 2 – documento SEI nº [1437066](#) – Parecer nº 06/2021 – Identidade, propriedades físico-químicas, impurezas resíduos e produtos de degradação do Carbendazim.

Anexo 3 – documento SEI nº [1392941](#) – Parecer nº 03/2021 – Exposição humana ao Carbendazim.

Anexo 4 – documento SEI nº [1463526](#) – Parecer nº 10/2021 – Toxicocinética, toxicidade aguda e outros efeitos tóxicos não proibitivos de registro relativos ao Carbendazim.

Anexo 5 – documento SEI nº [1309909](#) – Parecer nº 01/2020 – Mutagenicidade do Carbendazim.

Anexo 6 – documento SEI nº [1433818](#) – Parecer nº 05/2021 – Carcinogenicidade do Carbendazim.

Anexo 7 – documento SEI nº [1505782](#) – Parecer nº 11/2021 – Toxicidade do Carbendazim para o desenvolvimento embriofetal e neonatal.

Anexo 8 – documento SEI nº [1517596](#) – Parecer nº 12/2021 – Toxicidade do Carbendazim para a fisiologia reprodutiva.

Anexo 9 – documento SEI nº [1705915](#) – Parecer nº 26/2021 – Análise dos dados do Sisagua, complementar ao Parecer nº 03/2021.

Anexo 10 – documento SEI nº [1977850](#) – Parecer nº 11/2022 – Análise das diligências direcionadas ao MAPA, Embrapa e Ibama e Ministério da Saúde sobre a descontinuação dos produtos à base do ingrediente ativo Carbendazim.

Anexo 11 - documento SEI nº [1978456](#) - Planilha com análise das contribuições à CP 1.099/2022

Anexo 12 - documento SEI nº [1975053](#) - Compilado das manifestações da Anvisa contrárias ao PL 6.299/2022 (Câmara dos Deputados)



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Alexandre Oliveira Gomes, Gerente-Geral de Toxicologia**, em 04/08/2022, às 09:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/D10543.htm.



Documento assinado eletronicamente por **Adriana Torres de Sousa Pottier, Gerente de Monitoramento e Avaliação do Risco**, em 04/08/2022, às 09:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/D10543.htm.



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Roberto Coradi de Freitas, Coordenador(a) de Reavaliação**, em 04/08/2022, às 10:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/D10543.htm.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.anvisa.gov.br/autenticidade>, informando o código verificador **1989741** e o código CRC **FA13D3E5**.

PARECER Nº 7/2021/SEI/CREAV /GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA

Processo nº 25351.945793/2019-57

Interessado: Coordenação de Reavaliação, Gerência de Monitoramento e Avaliação do Risco, GGTOX

Assunto: **Busca sistematizada e seleção da literatura científica para o ingrediente ativo Carbendazim.**

Descreve o procedimento de busca sistematizada e seleção de estudos e de documentos realizado para o ingrediente ativo Carbendazim, incluindo as etapas de busca dos artigos científicos e dos demais documentos por terceiro e de seleção interna das referências relevantes; como parte da reavaliação toxicológica desse ingrediente ativo, conforme RDC nº 221, de 28 de março de 2018.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anvisa: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APMVA: *Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority* (Autoridade Australiana de Pesticidas e Medicina Veterinária).

ECHA: *European Chemicals Agency* (Agência Europeia de Químicos)

EFSA: *European Food Safety Authority* (Autoridade Europeia para Segurança dos Alimentos)

FT: Força-tarefa

IA: Ingrediente ativo

JMPR: *Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues* (Comitê de Especialistas FAO/OMS sobre Resíduos de Agrotóxicos)

LMR: Limite máximo de resíduos

LOAEL: *Lowest Observed Adverse Effect Level* (Nível mais Baixo de Efeito Adverso Observado)

NOAEL: *No Observed Adverse Effect Level* (Nível de Efeito Adverso não Observado)

PARA: Programa de avaliação de resíduos em alimentos

PMRA: *Health Canada's Pest Management Regulatory Agency* (Agência Reguladora de Controle de Pragas Canadense)

USEPA: *United States Environmental Protection Agency* (Agência de Proteção Ambiental Americana)

RESUMO

A reavaliação permite que ingredientes ativos de agrotóxicos com indícios de características impeditivas de registro sejam revistos à luz do conhecimento atual, de forma a garantir que alterações ou cancelamento de registro possam ser realizados, caso se conclua pela inaceitabilidade dos riscos à saúde. Para alcançar essa conclusão, é necessária a avaliação de todas as evidências disponíveis sobre os aspectos toxicológicos do ingrediente ativo. Por isso, o processo de reavaliação toxicológica de ingredientes ativos de agrotóxicos no âmbito da Anvisa inclui a etapa

de busca sistematizada da literatura científica. A busca das referências é realizada por terceiros por meio de Ordens de Serviços que especificam o formato dessa busca é seguida seleção das referências relevantes, que leva em consideração os aspectos toxicológicos abordados na reavaliação de ingredientes ativos de agrotóxicos, bem como a relevância dos estudos no contexto regulatório. Com relação à exposição humana, a busca sistemática encontrou 10 referências e a seleção dos revisores internos identificou oito artigos relevantes para análise, principalmente estudos de resíduos em culturas alimentares e um estudo de intoxicação humana. Para toxicidade reprodutiva e desregulação endócrina, a busca sistematizada encontrou 65 referências e 59 foram consideradas relevantes para análise. Ainda, a busca sistematizada encontrou 95 referências contendo informações sobre carcinogenicidade e 78 foram consideradas relevantes para análise, dentre elas estudos *in vitro* e *in vivo* específicos de mutagenicidade, estudos de citotoxicidade e genotoxicidade geral, estudos mecanísticos e estudos envolvendo células germinativas. A busca sistematizada também obteve 16 referências contendo informações sobre carcinogenicidade e oito foram consideradas relevantes para análise, sendo sete artigos envolvendo estudos em animais e um artigo com estudo *in vitro*. Para outros desfechos toxicológicos, 11 referências foram encontradas, sendo sete artigos relevantes e outros quatro descartados. Com relação à busca de documentos em agências reguladoras e outras instituições internacionais, foram encontrados 46 documentos da APVMA, ECHA, EFSA, JMPR, PMRA e USEPA. Além dos documentos obtidos na busca sistematizada, também foram incluídas nas análises de reavaliação toxicológica do Carbensulfam as referências encontradas nos relatórios das autoridades regulatórias internacionais, os estudos apresentados pelas empresas registrantes e outras referências necessárias para subsidiar as discussões sobre os aspectos toxicológicos avaliados.

1. INTRODUÇÃO

A reavaliação toxicológica é o instrumento disponível para a revisão do registro de ingredientes ativos de agrotóxicos com potenciais riscos à saúde que não haviam sido identificados no momento da concessão de registro, mas que posteriormente foram revelados por novos estudos ou por novas interpretações e percepções do risco decorrentes do avanço do conhecimento científico.

A reavaliação permite que ingredientes ativos de agrotóxicos com indícios de características impeditivas de registro sejam revistos à luz do conhecimento atual, de forma a garantir que alterações ou cancelamento de registro possam ser realizados caso se conclua pela inaceitabilidade dos riscos à saúde. Para alcançar essa conclusão, é necessária a avaliação de todas as evidências disponíveis sobre os aspectos toxicológicos do ingrediente ativo. Por isso, o processo de reavaliação toxicológica de ingredientes ativos de agrotóxicos no âmbito da Anvisa inclui a etapa de busca sistematizada da literatura científica.

A busca sistematizada das referências é realizada por terceiros por meio de Ordens de Serviços que especificam o formato dessa busca. Após a busca, segue-se para a etapa de seleção das referências relevantes, que leva em consideração os aspectos toxicológicos abordados na reavaliação de ingredientes ativos de agrotóxicos, bem como a relevância dos estudos no contexto regulatório. A seleção é realizada por servidores internos da CREA.

Além das referências obtidas na busca sistematizada, também foram incluídas nas análises de reavaliação toxicológica do Carbensulfam as referências encontradas nos relatórios das autoridades

regulatórias internacionais, os estudos apresentados pelas empresas registrantes e outras referências necessárias para subsidiar as discussões sobre os aspectos toxicológicos avaliados.

2. BUSCA SISTEMATIZADA

A busca sistematizada das referências é realizada por terceiros por meio de Ordens de Serviços que especificam o formato da busca. Resumidamente, são utilizados descritores específicos para os desfechos toxicológicos de interesse para buscas nas seguintes bases de informação científica: Medline via Pubmed, EMBASE e LILACS.

A busca também é realizada de modo manual nas referências dos artigos científicos e na literatura cinzenta por meio do *Google Scholar*. Além das bases de informação científica, as seguintes autoridades regulatórias de agrotóxicos e de saúde são acessadas: Autoridade Europeia para Segurança Alimentar (*European Food Safety Authority* – EFSA), Agência Europeia de Químicos (*European Chemicals Agency* – ECHA), Agência de Proteção Ambiental Americana (*United States Environmental Protection Agency* – USEPA), Agência Canadense de Regulamentação de Agrotóxicos (*Health Canada Pest Management Regulatory Agency* – PMRA), Autoridade Australiana de Pesticidas e Medicamentos Veterinários (*Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority* – APVMA), Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (*Food and Agriculture Organization of the United Nations* – FAO), Organização das Nações Unidas (*World Health Organization* – WHO), Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (*International Agency for Research on Cancer* – IARC), Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Comissão de Segurança Alimentar do Japão (*Food Safety Commission of Japan* – FSCJ), Instituto para o Controle de Agrotóxicos da República Popular da China (*Institute for the Control of Agrochemicals, Ministry of Agriculture, P.R. China* – ICAMA) e Convenção de Roterdã.

A busca principal nas bases de informação científica foi executada no dia 17 de julho de 2020.

As estratégias utilizadas para as bases de informação foram:

#1 (Carbendazim OR 2-(methoxycarbonylamino)benzimidazole OR benzimidazolecarbamate methyl ester OR carbendazin OR carbendazine OR carbendazole OR carbendazyme OR methoxybenzimidazole-2-carbamic acid OR methyl 2-benzimidazol carbamate OR methyl-2-benzimidazole carbamate OR methyl-N-(2-benzimidazolyl)carbamate OR methylbenzimidazole-2-ylcarbamate OR 1h-benzimidazole-2-carbamic acid, methyl ester)

#2 (Risk OR Risks OR Toxicity OR Toxicological OR Mutagenicity OR Genotoxicity OR Immunotoxicity OR Toxicokinetic OR Teratogenicity OR Toxicodynamic OR Carcinogenicity OR Intoxication OR Endocrine deregulation OR hormonal deregulation OR Neurotoxicity OR Residues in food OR Residues in water OR biological samples OR biomonitoring OR absorption)

#3 = #1 AND #2

Na busca cinzenta e nos portais das agências, a fim de aumentar a sensibilidade, foram utilizados os apenas os termos principais relacionados ao agrotóxico: (Carbendazim OR Thiophanate Methyl)

Os critérios de elegibilidade para inclusão dos estudos foram os seguintes:

- I. Quanto ao desenho de estudo:** estudos *in vitro*, *in vitro* ou *ex vivo*; séries de casos ou estudos comparativos (observacionais ou experimentais); revisões sistemáticas ou narrativas; e informações regulatórias das agências (guias, normas, legislação, material de suporte a registros, registros, atos regulatórios, informações toxicológicas, dossiês, memorandos, relatórios, decisões oficiais, etc.);
- II. Quanto ao período consultado:** não houve restrição;
- III. Quanto aos idiomas:** português, espanhol e inglês;
- IV. Quanto à disponibilidade de texto:** completo ou resumo;
- V. Quanto às populações de interesse:** células, tecidos, órgãos ou sujeitos animais (mamíferos) ou humanos;
- VI. Quanto às associações toxicológicas:** não houve restrição, sendo esta ampliada também para associações indiretas, como por exemplo ingestão de alimentos contaminados;

3. SELEÇÃO DAS REFERÊNCIAS

Os artigos foram selecionados por um revisor externo, docente da Universidade de São Paulo, com base nos critérios descritos no tópico 2 e divididas em grupos de acordo com o aspectos toxicológicos que abordavam: 1) Citotoxicidade e genotoxicidade; 2) Toxicidade reprodutiva e desregulação endócrina; 3) Carcinogenicidade; 4) Outros desfechos toxicológicos; 5) Exposição humana; 6) Intoxicação.

Posteriormente, dois revisores internos da CREA V leram o título e o resumo dos artigos selecionados e avaliaram a adequabilidade de inclusão dos artigos nas análises de reavaliação toxicológica, de acordo com a relevância deste para a discussão dos aspectos toxicológicos relevantes nos pareceres e reavaliação. As discordâncias entre os dois revisores foram resolvidas por um terceiro revisor interno da CREA V.

4. RESULTADOS DA BUSCA SISTEMATIZADA

4.1 Relatórios de autoridades regulatórias internacionais

Em relação à busca de documentos em agências reguladoras e outras instituições internacionais, as agências em que foram encontrados documentos foram APVMA, ECHA, EFSA, JMPR, PMRA e USEPA. Um total de 46 documentos foi obtido; muitos desses documentos apresentam a descrição de estudos regulatórios e da literatura científica. Quando a descrição foi suficientemente detalhada, a Anvisa incluiu os dados destes estudos na sua avaliação.

4.2 Citotoxicidade e genotoxicidade

A busca sistematizada encontrou 95 referências contendo informações sobre mutagenicidade. A seleção dos revisores internos identificou 78 referências relevantes para análise, dentre elas estudos *in vitro* e *in vivo* específicos de mutagenicidade, estudos de citotoxicidade e genotoxicidade geral, estudos mecanísticos e estudos envolvendo células germinativas. Os estudos que mostraram efeitos tóxicos às células germinativas, mas não especificamente mutagenicidade foram considerados nas análises, mas suas descrições foram incluídas apenas no parecer de toxicidade reprodutiva. Foram descartados 22 artigos nesta etapa. O Quadro 2 apresenta a lista com as 95 referências e o resultado da seleção, com as respectivas justificativas de exclusão.

4.3 Toxicidade reprodutiva e desregulação endócrina

A busca sistematizada encontrou 65 referências contendo informações sobre toxicidade reprodutiva e desregulação endócrina. A seleção dos revisores internos identificou 59 referências relevantes para análise. Foram descartados 6 artigos nesta etapa. O Quadro 3 apresenta a lista com as 65 referências e o resultado da seleção, com as respectivas justificativas de exclusão.

4.4 Carcinogenicidade

A busca sistematizada encontrou 16 referências contendo informações sobre carcinogenicidade. A seleção dos revisores internos identificou oito artigos relevantes para análise, sendo sete artigos envolvendo estudos em animais e um artigo com estudo *in vitro*. Foram descartados oito artigos. O Quadro 4 apresenta a lista das 16 referências e o resultado da seleção, com as respectivas justificativas de exclusão.

4.5 Outros desfechos toxicológicos

A busca sistematizada encontrou 11 referências contendo informações sobre outros desfechos toxicológicos além dos incluídos nos itens 4.2, 4.3 e 4.4. A seleção dos revisores internos identificou sete artigos relevantes para análise, dentre eles, artigos *in vivo* e *in vitro*. Foram descartados quatro artigos. O Quadro 5 apresenta a lista das 11 referências e o resultado da seleção, com as respectivas justificativas de exclusão.

4.6 Exposição humana

A busca sistematizada encontrou 10 referências contendo informações sobre exposição humana. A seleção dos revisores internos identificou oito artigos relevantes para análise, principalmente estudos de resíduos em culturas alimentares e um estudo de intoxicação humana. Foram descartados dois artigos. O Quadro 6 apresenta a lista das 10 referências e o resultado da seleção, com as respectivas justificativas de exclusão.

5. Quadros com os resultados de busca sistematizada e seleção por desfecho toxicológico

Quadro 1. Documento de agências internacionais encontrados na busca sistematizada.	
APVMA	1. THIOPHANATE-METHYL. FINAL REVIEW REPORT AND REGULATORY DECISION. November 2010. Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority (APVMA). 2. The Reconsideration of Registrations of Products Containing Carbendazim or Thiophanate methyl and Their Associated Approved Labels. February 2007. Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. 3. CARBENDAZIM. PRELIMINARY REVIEW FINDINGS REPORT. VOLUME ONE: SUMMARY. MAY 2011. Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. 4. HUMAN HEALTH RISK ASSESSMENT OF CARBENDAZIM. Office of Chemical Safety and Environmental Health. Office of Health Protection of the Department of Health and Ageing. Canberra. June 2008. Revised December 2009. Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. 5. CARBENDAZIM. PRELIMINARY REVIEW FINDINGS: TECHNICAL REPORTS. VOLUME THREE: RESIDUES EVALUATION REPORT. Review of dietary exposure. MAY 2011. Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. 6. CARBENDAZIM. REVIEW FINDINGS REPORT. AUGUST 2012. Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. 7. AUSTRALIAN PESTICIDES AND VETERINARY MEDICINES AUTHORITY AUSTRALIA. CHEMICAL REVIEW PROGRAM. HUMAN HEALTH RISK ASSESSMENT. THIOPHANATE-METHYL. June 2008. Revised December 2009. Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority.
EFSA	8. REASONED OPINION OF EFSA. MRLs of concern for the active substance carbendazim. Prepared by the Pesticides Unit (PRAPeR). Question No EFSA-Q-2008-651. EFSA Scientific Report (2008) 158, 1-31. 9. REASONED OPINION OF EFSA. Refined risk assessment regarding certain MRLs of concern for the active substances carbendazim and thiophanate-methyl. Prepared by the Pesticides Unit (PRAPeR). Question No EFSA-Q-2009-00467 and EFSA-Q-2009-00468. EFSA Scientific Report (2009) 289, 1-29. 10. CONCLUSION ON PESTICIDE PEER REVIEW. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance carbendazim. European Food Safety Authority. European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy. EFSA Journal 2010; 8(5):1598. 11. REASONED OPINION OF EFSA. Reasoned opinion on the modification of the existing MRLs for thiophanate-methyl and carbendazim in apples and pears. European Food Safety Authority. European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy. EFSA Journal 2012;10(4):2685. 12. REASONED OPINION OF EFSA. Reasoned opinion on the review of the existing maximum residue levels (MRLs) for thiophanate-methyl and carbendazim according to Article 12 of Regulation (EC) No 396/20051. European Food Safety Authority. European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy. EFSA Journal 2014;12(12):3919. 13. Draft Re-Assessment Report 16 July 2009. Carbendazim. Volumes 1. Report and Proposed Decision. Rapporteur Member State: Germany. 14. Draft Re-Assessment Report 16 July 2009. Carbendazim. Volume 2. Report and Proposed Decision. Rapporteur Member State: Germany. 15. Draft Re-Assessment Report 16 July 2009. Carbendazim. Volume 3 (B1-B5). Report and Proposed Decision. Rapporteur Member State: Germany. 16. Draft Re-Assessment Report 16 July 2009. Carbendazim. Volume 3 (B6). Report and Proposed Decision. Rapporteur Member State: Germany.
FAO/WHO	17. CARBENDAZIM (072). Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO. 18. THIOPHANATE-METHYL (077). Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO. 19. THIOPHANATE-METHYL (077)/ CARBENDAZIM (072). Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO.

	20. Pesticide residues in food 2017. Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues. Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group on Pesticide Residues. Geneva, Switzerland, 12–21 September 2017. 21. Pfeil R, Dellarco V. CARBENDAZIM –1 JMPR 2005. Inventory of evaluations performed by the Joint Meeting on Pesticide Residues (JMPR).
PMRA	22. Carbendazim. Proposed Registration Decision. PRD2011-04. Health Canada Pest Management Regulatory Agency.
USEPA	23. Carbendazim C9H9N3O2 – PubChem. 24. BEAD Chemical Profile (BCP) for Registration Review: Thiophanate Methyl (102001) and Carbendazim (methyl2-benzimidazole carbamate MBC) (128872). UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. January 8, 2014. 25. Thiophanate Methyl and Carbendazim (MBC). Human Health Assessment Scoping Document in Support of Registration Review. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. March 20, 2014. 26. Thiophanate Methyl & Carbendazim Preliminary Work Plan. Docket EPA-HQ-OPP-2014-0004. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 27. Preliminary problem formulation for the ecological risk, environmental fate, endangered species, and drinking water assessments to be conducted as part of the registration review of Thiophanate methyl [Dimethyl((1,2,-phenylene)bis(iminocarbonothioyl))bis (carbamate) and carbendazim (methyl benzimidazol-2-ylcarbamate). The Environmental Fate and Effects Division (EFED) and the Antimicrobial Division (AD). UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 28. Registration Review Draft Occupational and Residential Exposure Assessment for Antimicrobial Uses of Carbendazim (MBC). March 24, 2020. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 29. Thiophanate-Methyl: Acute, Chronic, and Cancer Dietary Exposure and Risk Assessments in Support of the Draft Human Health Risk Assessment for Registration Review. 3/20/2020. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 30. Carbendazim and 2-Aminobenzimidazole: Acute, Chronic, and Cancer Dietary Exposure and Risk Assessments in Support of the Draft Human Health Risk Assessment for Registration Review. 3/20/2020. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 31. Thiophanate Methyl. Occupational and Residential Exposure Assessment for Registration Review. March 20, 2020. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 32. Environmental Protection Agency (EPA); 40 CFR Parts 302 and 355. Reportable Quantity Adjustments for Carbamates and Carbamate-Related Hazardous Waste Streams; Reportable Quantity Adjustment for Inorganic Chemical Manufacturing Processes Waste (K178); Proposed Rule. Part IV. December 4, 2003.
ECHA	33. Substance Information – ECHA. Carbendazim. 34. Carbendazim - Brief Profile – ECHA. 35. Substance Regulatory Obligations – Carbendazim. ECHA Legislation Regulatory Obligations. 36. Carbendazim - Registration Dossier – ECHA. Biodegradation in water: screening tests. 37. Carbendazim - Registration Dossier – ECHA. Short-term toxicity to aquatic invertebrates. 38. Carbendazim - Registration Dossier – ECHA. Toxicity to aquatic algae and cyanobacteria. 39. Carbendazim - Registration Dossier – ECHA. Acute Toxicity: oral. 40. Carbendazim - Registration Dossier – ECHA. Skin irritation / corrosion. 41. Carbendazim - Registration Dossier – ECHA. Eye irritation. 42. Carbendazim - Registration Dossier – ECHA. Skin sensitization. 43. Carbendazim - Registration Dossier – ECHA. Endpoint summary.

44. Carbendazim - Registration Dossier – ECHA. Genetic toxicity: in vitro.
 45. Carbendazim - Registration Dossier – ECHA. Genetic toxicity: in vivo.
 46. Carbendazim - Registration Dossier – ECHA. Guidance on Safe Use.

Quadro 2. Resultado da busca sistematizada e da seleção para citotoxicidade e genotoxicidade.

N	Primeiro autor	Ano de publicação	DOI/domínio/Título	Revisor 1	Revisor 2	Revisor 3	Justificativa de exclusão
1	Abolaji AO	2017	10.1177/0960327116652459	EXCLUÍDO	EXCLUÍDO		Não avalia genotoxicidade ou danos a célula germinativa e sim mecanismo de dano hepático (estresse oxidativo).
2	Adedara IA	2013	10.1016/j.etap.2013.01.010	EXCLUÍDO	INCLUÍDO	EXCLUÍDO	
3	Adler ID	2002	10.1016/s0027-5107(02)00090-8	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
4	Akbarsha MA**	2001	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11831377/	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
5	Akbarsha MA**	2000	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11411049/	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
6	Banduhn N	1985	10.1016/0165-1218(85)90065-5	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
7	Barale R	1993	10.1016/0165-1218(93)90135-z	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
8	Bentley KS	2000	10.1016/s1383-5718(99)00165-5	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
9	Birkett CR	1981	10.1016/0006-2952(81)90390-7	EXCLUÍDO	EXCLUÍDO		Não avalia genotoxicidade ou danos a célula germinativa e sim citotoxicidade <i>in vitro</i> para células hepáticas.
10	Bowen DE	2011	10.1016/j.mrgentox.2011.02.009	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
11	Breslin WJ	2013	10.1002/bdrb.21043	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
12	Campion SN	2012	10.1016/j.reprotox.2012.01.014	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
13	Can A	1997a	10.1016/s0027-5107(96)00184-4	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
14	Can A	1997b	10.1002/(SICI)1098-2795(199703)46:3<351::AID-MRD14>3.0.CO;2-1	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
15	Chang CC	2010	10.1016/S1028-4559(10)60097-6	EXCLUÍDO	EXCLUÍDO		Não avalia genotoxicidade e sim citotoxicidade <i>in vitro</i> para células endometriais.
16	Coffing S	2011	10.1002/em.20616	INCLUÍDO	INCLUÍDO		

17	Correa LM	2002	10.1093/toxsci/69.1.175	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
18	Correa LM	2001	10.1095/biolreprod64.6.1644	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
19	Daundkar PS	2014	10.1016/j.etap.2014.09.007	EXCLUÍDO	EXCLUÍDO		Não avalia genotoxicidade e sim mecanismo de toxicidade sistêmica (estresse oxidativo).
20	de Stoppelaar JM	1999	10.1093/mutage/14.6.621	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
21	Dere E	2016	10.1093/toxsci/kfw137	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
22	Dierickx PJ	1999	10.1016/s0887-2333(99)00045-4	EXCLUÍDO	EXCLUÍDO		Não avalia genotoxicidade e sim mecanismo de citotoxicidade (ativação CYP1/2).
23	Dikić D	2012	10.1111/j.1742-7843.2011.00831.x	EXCLUÍDO	EXCLUÍDO		Não avalia genotoxicidade e sim toxicidade hepática (atividade enzimática celular)
24	Đikić D	2012	10.1177/0960327111417910	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
25	Elhajouji A	1998	10.1093/mutage/13.2.193	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
26	Elhajouji A	1997	10.1093/mutage/12.3.133	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
27	Elhajouji A	1995	10.1002/em.2850260405	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
28	Erdos Z	2013	10.1002/bdrb.21035	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
29	Ermler S	2013	10.1093/mutage/get019	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
30	Evenson DP	1987	10.1080/15287398709530992	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
31	Fellows MD	2007	10.1093/mutage/gem013	EXCLUÍDO	EXCLUÍDO		Não avalia genotoxicidade e sim a dependência metodológica da avaliação de citotoxicidade de substâncias químicas, que pode influenciar a escolha do protocolo de estudos regulatórios de mutagenicidade.
32	Gray LE Jr**	1989	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2666989/	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
33	Hashem MA	2018	10.1007/s11356-017-0542-9	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
34	Helali I	2016	10.1080/1547691X.2016.1181124	EXCLUÍDO	EXCLUÍDO		Não avalia genotoxicidade e sim resposta imune (produção de citocinas pro-inflamatórias e atividade de enzimas lisossomais de macrófagos).
35	Hess RA	2000	10.14670/HH-15.207	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
36	Igarashi M	2007	10.1016/j.mrgentox.2007.04.012	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
37	Itoh S	2015a	10.1016/j.mrgentox.2015.03.008	INCLUÍDO	INCLUÍDO		

38	Itoh S	2015b	10.2131/jts.40.109	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
39	Itoh S	2012a	10.1016/j.toxlet.2012.09.003	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
40	Itoh S	2012b	10.1016/j.mrgentox.2012.04.007	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
41	Jeffay SC	1996	10.1016/0890-6238(96)00020-2	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
42	Jin C	2018	10.1093/toxsci/kfy205	EXCLUÍDO	EXCLUÍDO		Não avalia genotoxicidade e sim composição da microbiota de camundongos expostos e metabolismo de lipídeos.
43	Jin Y	2015	10.1093/toxsci/kfv115	EXCLUÍDO	EXCLUÍDO		Não avalia genotoxicidade e sim composição da microbiota de camundongos expostos e metabolismo de lipídeos.
44	Jones OA	2013	10.1016/j.fct.2013.06.041	EXCLUÍDO	EXCLUÍDO		Não avalia genotoxicidade e sim toxicidade sistêmica (alteração perfil urinário).
45	Kadalmani B**	2002	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12561966/	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
46	Kawata R	2020	10.1016/j.tox.2020.152490	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
47	Kirsch-Volders M	2003	10.1016/s0378-4274(02)00498-8	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
48	Kucera SP	1995	10.1080/03601239509372965	EXCLUÍDO	EXCLUÍDO		Não avalia genotoxicidade e sim citotoxicidade e função de células traqueais ciliadas.
49	Lamb MJ	1980	10.1016/0300-483x(80)90030-x	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
50	Lebailly P	1997	10.1016/s0027-5107(97)00015-8	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
51	Li H	2020	10.1016/j.ecoenv.2019.109908	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
52	Lim J	1997a	10.1006/faat.1997.2315	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
53	Lim J	1997b	10.1006/taap.1996.8042	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
54	Liu J	2019	10.1016/j.ecoenv.2019.03.103	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
55	Markelewicz RJ Jr	2004	10.1093/toxsci/kfh140	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
56	Marshall RR	1996	10.1016/s0027-5107(96)00143-1	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
57	Matsuo F	1999	10.1292/jvms.61.573	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
58	McCarroll NE	2002	10.1016/s1383-5742(02)00026-1	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
59	Moffit JS	2013	10.1002/bdrb.21045	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
60	Muthuvivegan andavel V	2008	10.2131/jts.33.25	EXCLUÍDO	EXCLUÍDO		Não avalia genotoxicidade e sim toxicidade sistêmica (hematologia e bioquímica).

61	Nakai M	1994	10.1016/0040-8166(94)90041-8	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
62	Nakai M	2002	10.1016/s0040-8166(02)00006-x	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
63	Nakai M	1998a	10.1679/aohc.61.433	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
64	Nakai M	1998b	10.1007/s004410051164	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
65	Nakai M	1997a	10.1016/s0040-8166(97)80033-x	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
66	Nakai M	1997b	10.1002/(SICI)1097-0185(199703)247:3<379::AID-AR9>3.0.CO;2-P	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
67	Nakai M	1993	10.1002/ar.1092350106	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
68	Nakai M**	1995	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8575980/	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
69	Pacheco SE	2012	10.1371/journal.pone.0044280	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
70	Perreault SD	1992	10.1016/0041-008x(92)90072-z	INCLUÍDO	EXCLUÍDO	EXCLUÍDO	Não avaliou desfecho de genotoxicidade, nem fornece dados mecanísticos em células germinativas.
71	Peyre L	2014	10.1016/j.tiv.2014.06.009	EXCLUÍDO	EXCLUÍDO		Não avalia genotoxicidade e sim moduladores da homeostase hepática <i>in vitro</i> .
72	Pisani C	2016	10.14573/altex.1601253	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
73	Radice S	1997	10.1016/s0300-483x(97)00122-4	EXCLUÍDO	EXCLUÍDO		Não avalia genotoxicidade e sim mecanismo de citotoxicidade (ativação CYP1/2).
74	Rai B	2020	10.1007/s11356-019-07088-5	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
75	Rajeswary S	2007	10.1016/j.reprotox.2007.03.010	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
76	Sakr SA	2014	10.1177/0748233712456059	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
77	Salihu M	2016	10.3109/19390211.2015.1107802	EXCLUÍDO	EXCLUÍDO		Não avalia genotoxicidade e sim mecanismo de dano hepático e renal (estresse oxidativo).
78	Sarrif AM	1994	10.1016/0027-5107(94)90018-3	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
79	Spencer F	1996	10.1002/(SICI)1099-1263(199605)16:3<211::AID-JAT334>3.0.CO;2-X	EXCLUÍDO	EXCLUÍDO		Não avalia mutagenicidade e sim toxicidade uterina (níveis de estrógeno e progesterona e proteínas).
80	Styles JA	1974	10.1016/s0027-5107(74)80072-2	EXCLUÍDO	INCLUÍDO	EXCLUÍDO	Não avalia genotoxicidade e sim citotoxicidade <i>in vitro</i> .
81	Takeshita K	2016	10.1186/s41021-016-0047-7	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
82	Tates AD	1979	10.1289/ehp.7931151	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
83	Tollstadius BF	2019	10.1016/j.tiv.2019.03.004	INCLUÍDO	EXCLUÍDO	INCLUÍDO	

84	Van Hummelen P	1995a	10.1093/mutage/10.1.23	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
85	Van Hummelen P	1995b	10.1002/em.2850250402	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
86	Vanhauwaert A	2001	10.1093/mutage/16.1.39	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
87	Vigreux C	1998	10.1016/s1383-5718(98)00126-0	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
88	Warr JR	1982	10.1016/0309-1651(82)90117-5	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
89	Winder BS	2001	10.1093/toxsci/59.1.138	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
90	Yamada T	2005	10.1016/j.taap.2004.09.002	EXCLUÍDO	INCLUÍDO	INCLUÍDO	
91	Yu G	2009	10.1177/0748233709103033	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
92	Zari TA**	2011	https://europepmc.org/article/med/21608437	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
93	Zhou J	2015	10.1016/j.reprotox.2014.12.008	EXCLUÍDO	EXCLUÍDO		Não avalia genotoxicidade e sim citotoxicidade <i>in vitro</i> para células placentárias.
94	Zuelke KA	1995	10.1002/mrd.1080420209	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
95	Coffing S.L., 2009	2009	Comparison of micronucleus induction in duodenum, colon and bone marrow in sprague-dawley rats	EXCLUÍDO	EXCLUÍDO		Resumo de congresso. O artigo completo foi publicado na mesma revista em 2011 e já foi incluído nesta busca sistematizada.

Quadro 3. Resultado da busca sistematizada e da seleção para toxicidade reprodutiva e desregulação endócrina.

N	Primeiro autor	Ano de publicação	DOI/domínio/Título	Revisor 1	Revisor 2	Revisor 3	Justificativa de exclusão
1	Adedara IA	2013	10.1016/j.etap.2013.01.010	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
2	Akbarsha MA	2001	Carbendazim generates symplasts in rat spermatogenic clones	INCLUÍDO	INCLUÍDO		

3	Akbarsha MA	2000	Carbendazim generates symplasts in rat spermatogenic clones	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
4	Barlas N	2002	10.1191/0960327102ht187oa	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
5	Breslin WJ	2013	10.1002/bdrb.21043	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
6	Campion SN	2012	10.1016/j.reprotox.2012.01.014	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
7	Can A	1997	10.1002/(SICI)1098-2795(199703)46:3<351::AID-MRD14>3.0.CO;2-1	EXCLUÍDO	EXCLUÍDO		Estudo sobre mecanismo de mutagenicidade. Incluído no parecer de mutagenicidade.
8	Carter SD	1987	10.1095/biolreprod37.3.709	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
9	Correa LM	2002	10.1093/toxsci/69.1.175	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
10	Cummings AM	1992	10.1016/0272-0590(92)90057-o	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
11	Cummings AM	1990	10.1016/0272-0590(90)90039-m	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
12	de Stoppelaar JM	1999	10.1093/mutage/14.6.621	EXCLUÍDO	EXCLUÍDO		Estudo de mutagenicidade. Incluído no parecer de mutagenicidade.
13	Dere E	2016	10.1093/toxsci/kfw137	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
14	Dierickx PJ	1999	10.1016/s0887-2333(99)00045-4	INCLUÍDO	EXCLUÍDO	EXCLUÍDO	Não aborda desfecho relevante para reprotox.
15	Durand P	2017	10.1016/j.tiv.2017.05.022	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
16	Erdos Z	2013	10.1002/bdrb.21035	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
17	Evenson DP	1987	10.1080/15287398709530992	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
18	Farag A	2011	10.1002/bdrb.20290	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
19	Goldman JM	1989	10.1016/0300-483x(89)90163-7	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
20	Gotoh Y	1999	10.1292/jvms.61.755	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
21	Gray LE Jr	1990	10.1016/0272-0590(90)90055-o	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
22	Gray LE Jr	1989	Correlation of sperm and endocrine measures with reproductive success in rodents	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
23	Halwachs S	2016	10.1016/j.taap.2016.06.007	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
24	Hess RA	2000	10.14670/HH-15.207	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
25	Janardhan A	1984	10.1007/BF01625540	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
26	Jeffay SC	1996	10.1016/0890-6238(96)00020-2	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
27	Kadalmani B	2002	Male reproductive toxic effects of carbendazim: hitherto unreported targets in testis	INCLUÍDO	INCLUÍDO		

28	Kawaratani Y	2015	10.1016/j.etap.2014.11.032	INCLUÍDO	EXCLUÍDO	INCLUÍDO	
29	Kawata R	2020	10.1016/j.tox.2020.152490	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
30	Li H	2020	10.1016/j.ecoenv.2019.109908	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
31	Lim J	1997a	10.1006/faat.1997.2315	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
32	Lim J	1997b	10.1006/taap.1996.8042	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
33	Liu J	2019	10.1016/j.ecoenv.2019.03.103	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
34	Lu SY	2004	10.1080/15287390490486833	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
35	Markelewicz RJ Jr	2004	10.1093/toxsci/kfh140	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
36	Moffit JS	2007	10.1080/01926230701481931	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
37	Moffit JS	2013	10.1002/bdrb.21045	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
38	Nakai M	1998a	10.1679/aohc.61.433	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
39	Nakai M	1998b	10.1007/s004410051164	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
40	Nakai M	1997a	10.1016/s0040-8166(97)80033-x	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
41	Nakai M	1997b	10.1002/(SICI)1097-0185(199703)247:3<379::AID-AR9>3.0.CO;2-P	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
42	Nakai M	1995	Deformation of the rat Sertoli cell by oral administration of carbendazim (methyl 2-benzimidazole carbamate)	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
43	Nakai M	1993	10.1002/ar.1092350106	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
44	Nakai M	1992		INCLUÍDO	INCLUÍDO		
45	Nakai M	1994	10.1016/0040-8166(94)90041-8	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
46	Nakai M	2002	10.1016/s0040-8166(02)00006-x	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
47	Pacheco SE	2012	10.1371/journal.pone.0044280	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
48	Perreault SD	1992	10.1016/0041-008x(92)90072-z	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
49	Petrelli G	2003	10.1007/BF02897919	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
50	Pisani C	2016	10.14573/altex.1601253	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
51	Radice S	1997	10.1016/s0300-483x(97)00122-4	INCLUÍDO	EXCLUÍDO	EXCLUÍDO	Não aborda desfecho relevante para reprotóx.
52	Rajeswary S	2007	10.1007/s00204-007-0204-7	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
53	Rama EM	2014	10.1016/j.yrtph.2014.05.016	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
54	Sakr SA	2014	10.1177/0748233712456059	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
55	Salihu M	2017a	10.1111/and.12782	INCLUÍDO	INCLUÍDO		

56	Salihu M	2017b	10.1111/and.12658	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
57	Sitarek K	2001	Embryolethal and teratogenic effects of carbendazim in rats	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
58	Spencer F	1996	10.1002/(SICI)1099-1263(199605)16:3<211::AID-JAT334>3.0.CO;2-X	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
59	Yamada T	2005	10.1016/j.taap.2004.09.002	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
60	Yu G	2009	10.1177/0748233709103033	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
61	Zari TA	2011	Therapeutic effects of olive leaves extract on rats treated with a sublethal concentration of carbendazim.	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
62	Zhou J	2015	10.1016/j.reprotox.2014.12.008	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
63	Zuelke KA	1995	10.1002/mrd.1080420209	EXCLUÍDO	EXCLUÍDO		Estudo sobre mecanismo de mutagenicidade. Incluído no parecer de mutagenicidade.
64	Wicpolt	2019	http://www.scielo.br/scielo.php?script=sciarttext&pid=S0100-736X2019000600371	EXCLUÍDO	EXCLUÍDO		Estudo conduzido com vacas. Não é animal experimental.
65	Upadhyay	2019	http://www.scielo.br/scielo.php?script=sciarttext&pid=S1984-82502019000100507	INCLUÍDO	INCLUÍDO		

Quadro 4. Resultado da busca sistematizada e da seleção para carcinogenicidade.

N	Primeiro autor	Ano de publicação	DOI/domínio/Título	Revisor 1	Revisor 2	Revisor 3	Justificativa de exclusão
1	Akbarsha MA	2000	10.1016/S0944-7113(00)80036-7	EXCLUÍDO	EXCLUÍDO		O estudo avalia os danos agudos no fígado e rins após dose única.
2	Barale R	1993	10.1016/0165-1218(93)90135-z	EXCLUÍDO	EXCLUÍDO		Mutagenicidade. Incluído no parecer de Mutagenicidade
3	Börzsönyi M	1976	10.1002/ijc.2910170609	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
4	Börzsönyi M	1975	10.1002/ijc.2910150515	INCLUÍDO	INCLUÍDO		

5	Janardhan A	1988	10.1007/BF02021022	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
6	Janardhan A	1987	10.1007/BF01616717	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
7	McCarroll NE	2002	10.1016/s1383-5742(02)00026-1	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
8	Muthuviveganandavel V	2008	10.2131/jts.33.25	EXCLUÍDO	EXCLUÍDO		Não avaliado o desfecho câncer nem mecanimos. Apenas toxicidade aguda
9	Peyre L	2014	10.1016/j.tiv.2014.06.009	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
10	Selmanoglu G	2001	10.1191/096032701718890603	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
11	Siddiqui MF	2019	10.1080/07391102.2018.1481768	EXCLUÍDO	EXCLUÍDO		Estudo in vitro sobre aligação do carbendazim a albumina
12	Songür SH	2005	10.1002/cbf.1181	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
13	Styles JA	1974	10.1016/s0027-5107(74)80072-2	EXCLUÍDO	EXCLUÍDO		Mutagenicidade. Incluído no parecer de Mutagenicidade
14	Veerappan M	2012	10.1111/j.1365-2613.2012.00828.x	EXCLUÍDO	EXCLUÍDO		Não avaliado o desfecho câncer nem mecanismo
15	Oledzka R	1987a	<i>Bromatologia i Chemia Toksykologiczna (1987) 20:2 (118-123).</i>	EXCLUÍDO	EXCLUÍDO		Não avaliado o desfecho câncer nem mecanismo
16	Oledzka R	1987b	<i>Bromatologia i Chemia Toksykologiczna (1987) 20:3-4 (265-271)</i>	EXCLUÍDO	EXCLUÍDO		Não avaliado o desfecho câncer nem mecanismo

Quadro 5. Resultado da busca sistematizada e da seleção para outros efeitos toxicológicos.

N	Primeiro autor	Ano de publicação	DOI/domínio/Título	Revisor 1	Revisor 2	Revisor 3	Justificativa de exclusão
1	Abolaji AO	2017	10.1177/0960327116652459	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
2	Daundkar PS	2014	10.1016/j.etap.2014.09.007	EXCLUÍDO	EXCLUÍDO		Estudo realizado em cabras. Não é animal experimental.
3	Dikić D	2012a	10.1111/j.1742-7843.2011.00831.x	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
4	Helali I	2016	10.1080/1547691X.2016.1181124	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
5	Jin C	2018	10.1093/toxsci/kfy205	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
6	Jin Y	2015	10.1093/toxsci/kfv115	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
7	Jones OA	2013	10.1016/j.fct.2013.06.041	EXCLUÍDO	EXCLUÍDO		Exposição aguda para avaliação do perfil de metabólitos. Artigo de metodologia (uso de

							metabolômica em ensaios de toxicidade de alimentos)
8	Muthuviveganandavel V	2008	10.2131/jts.33.25	EXCLUÍDO	EXCLUÍDO		via não relevante para avaliação dos desfechos de interesse (intradérmica) .
9	Salihu M	2016	10.3109/19390211.2015.1107802	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
10	Zari TA	2011	Therapeutic effects of olive leaves extract on rats treated with a sublethal concentration of carbendazim.	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
11	Veerappan M	2012	10.1111/j.1365-2613.2012.00828.x	EXCLUÍDO	EXCLUÍDO		via não relevante para avaliação dos desfechos de interesse (intradérmica) .

Quadro 6. Resultado da busca sistematizada e da seleção para exposição humana.

N	Primeiro autor	Ano de publicação	DOI/domínio/Título	Revisor 1	Revisor 2	Revisor 3	Justificativa de exclusão
1	Peng FJ	2020	10.1016/j.envint.2020.105633	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
2	Nougadère A	2020	10.1016/j.envint.2020.105529	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
3	López A	2017	10.1016/j.scitotenv.2016.08.149	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
4	Lesmes-Fabian C	2013	10.3390/ijerph10041168	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
5	Pennycook FR	2004	10.1179/oeh.2004.10.3.304	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
6	Lima C A B	2009	http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782009000300041	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
7	Coutinho C F B	2006	https://revistas.ufpr.br/pesticidas/article/view/4469	EXCLUÍDO	EXCLUÍDO		Artigo não fornece dados relevantes de exposição humana. Trata-se de uma revisão geral do CBZ.
8	Embrapa		https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Rpositorio/Melo_Biodegradacao_FungicidasBenzimidazois_000fdqbage302wx5eo0a2ndxyjebw1mn.pdf	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
9	Boucaud-Maitre D	2019	10.1016/j.etap.2019.03.017	INCLUÍDO	INCLUÍDO		
10	Uludag B	2001	10.1136/jnnp.70.4.563	EXCLUÍDO	EXCLUÍDO		Desvio de uso.



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Roberto Coradi de Freitas, Coordenador(a) de Reavaliação**, em 15/07/2021, às 19:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/D10543.htm.



Documento assinado eletronicamente por **Juliana Machado Braz, Especialista em Regulação e Vigilância Sanitária**, em 27/07/2021, às 10:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/D10543.htm.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.anvisa.gov.br/autenticidade>, informando o código verificador **1451178** e o código CRC **6560E25F**.

Referência: Processo nº 25351.945793/2019-57

SEI nº 1451178

Criado por juliana.braz, versão 6 por larissa.aguiar em 09/07/2021 20:28:29.

**PARECER Nº 6/2021/SEI/CREAV /GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA**

Processo nº 25351.945793/2019-57

Interessado: Coordenação de Reavaliação, Gerência de Monitoramento e Avaliação do Risco, GGTOX

Assunto: **Análise da identidade, propriedades físico-químicas, impurezas, resíduos e produtos de degradação relativos ao Carbendazim**

Avalia o relatório apresentado pela força-tarefa Carbendazim e os relatórios de outras agências reguladoras de agrotóxicos acerca dos tópicos: identidade, propriedades físico-químicas, impurezas, resíduos e produtos de degradação; como parte da reavaliação toxicológica desse ingrediente ativo, conforme RDC nº 221, de 28 de março de 2018.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anvisa: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AHP: Aminohidroxifenazina

APMVA: *Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority* (Autoridade Australiana de Pesticidas e Medicina Veterinária).

2-AB: 2-aminobenzimidazol

CBZ: Carbendazim

DAP: Diaminofenazina

DRfa: Dose de referência aguda

EFSA: *European Food Safety Authority* (Autoridade Europeia para Segurança dos Alimentos)FAO: *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação)

FT: Força-tarefa Carbendazim

5-HBC: 5-hidroxi-1H-benzimidazol-2-yl-carbamato

LMR: Limite máximo de resíduos

LOAEL: *Lowest Observed Adverse Effect Level* (Nível mais Baixo de Efeito Adverso Observado)NOAEL: *No Observed Adverse Effect Level* (Nível de Efeito Adverso não Observado)

PARA: Programa de avaliação de resíduos em alimentos

PMRA: *Health Canada's Pest Management Regulatory Agency* (Agência Reguladora de Controle de Pragas Canadense)

TM: Tiofanato-metílico

USEPA: *United States Environmental Protection Agency* (Agência de Proteção Ambiental Americana)**RESUMO**

O Carbendazim (CBZ) é um fungicida sistêmico de amplo espectro, pertencente à classe dos benzimidazóis, cuja ação pesticida decorre da inibição da polimerização de β -tubulina, o que impede a formação adequada do fuso acromático e, consequentemente, prejudica o processo de divisão celular. O CBZ é um metabólito do fungicida Tiofanato-metílico (TM), o qual também possui registro no Brasil; e do composto Benomil, cujo uso foi proibido no país. Duas impurezas possuem importância toxicológica, a aminohidroxifenazina (AHP) e a diaminofenazina (DAP), devido a sua ação mutagênica e, portanto, devem ser limitadas nos produtos técnicos às concentrações de 0,0005 g/kg e de 0,0006 g/kg, respectivamente. Com relação às propriedades físico-químicas, esse ingrediente ativo (IA) apresenta baixa solubilidade em água, baixa volatilidade, moderada lipossolubilidade e alta estabilidade no ambiente, a qual é afetada por aumento no pH e temperatura. A principal via de exposição da população ao CBZ é por meio da ingestão de resíduos em culturas alimentares, sendo mantida como Carbendazim a atual definição de resíduo prevista na monografia desse IA, em alinhamento às principais agências reguladoras internacionais.

1. INTRODUÇÃO

O CBZ é o primeiro ingrediente ativo a ser reavaliado a partir dos critérios de priorização com base no risco à saúde humana, etapa do processo de reavaliação prevista no inciso I, Art 3º da RDC nº 221, de 28 de março de 2018. Trata-se de um fungicida sistêmico de amplo espectro, cuja ação pesticida decorre da inibição da polimerização de β -tubulina, o que impede a formação adequada do fuso acromático e, consequentemente, prejudica o processo de divisão celular.

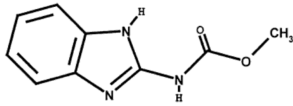
Esse ingrediente ativo (IA) é um metabólito do fungicida TM, o qual também possui registro no Brasil; e do composto Benomil, cujo uso foi proibido no país. No Brasil, o CBZ tem o uso agrícola aprovado para a modalidade foliar nas culturas de algodão, cevada, citros, feijão, maçã, milho, soja e trigo e para a aplicação em sementes nas culturas de algodão, arroz, feijão, milho e soja. Ainda, é aprovado o uso não agrícola como preservante de madeira. Seu uso como domissanitário não é permitido.

2. IDENTIDADE QUÍMICA E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO CARBENDAZIM

O CBZ pertence à classe dos benzimidazóis, consistindo em uma molécula de 2-aminobenzimidazol com a substituição do grupo amino primário por um grupo metoxycarbonil. As informações referentes à identidade química e às propriedades físico-químicas estão

descritas nos quadros 1 e 2, respectivamente.

Quadro 1. Identidade química do Carbendazim

Características	Informações
Nome Comum ¹	Carbendazim
Nome Químico ¹	Methyl N-(1H-benzimidazol-2-yl)carbamate
Grupo Químico ¹	Benzimidazol
Número CAS ¹	10605-21-7
Fórmula Molecular ¹	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂
Peso Molecular ³	191,2 g/mol
Fórmula Estrutural ³	
Estado Físico ⁴	Cristais incolores ou pó branco a cinza.
Cor ⁴	Branco a cinza
Odor ^{3,4}	Sem odor
Pureza ³	>98%
Impurezas toxicologicamente relevantes ^{1,2}	Aminohidroxifenazina (AHP) Diaminofenazina (DAP)

Fonte: 1. Monografia Anvisa C24; 2. Parecer SEI [1309909](#) (Mutagenicidade); 3. FAO/WHO (1998);

4. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Carbendazim#section=Color-Form>.

Quadro 2. Propriedades físico-químicas do Carbendazim

Propriedade	Informações	Interpretação
Pressão de vapor a 25°C ¹	1,5 x 10 ⁻⁴ Pa	Baixo potencial de volatilização
Solubilidade (mg/L a 24°C) ^{1,3}	Água: 29 (pH 4); 8 (pH 7); 1,49 (pH 8) Hexano: 0,5 Benzeno: 36 Diclorometano: 68 Clorofórmio: 100 Acetona: 300 Etanol: 300 Dimetilformamida: 5000	Pouco solúvel em água. Solúvel em compostos orgânicos.
Coefficiente de partição octanol/água (log K _{ow}) ¹ 25°C; pH 5	1,49	Lipossolubilidade moderada - Elevada biodisponibilidade oral, metabolismo e excreção facilitada; baixo potencial de bioacumulação
Constante de Dissociação (pKa; pureza 99,6%) ^{1,3}	4,29	Base fraca
Espectro Ultravioleta (UV) / Visível ²	λ _{máx} = 242.5 – 244 nm	Não há absorção UV significativa em 300 nm (Baixo potencial de fototransformação).

Fonte: 1. FAO/WHO (1998); 2. PMRA (2011); 3. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Carbendazim#section=Color-Form>

3. IMPUREZAS COM RELEVÂNCIA TOXICOLÓGICA

Em determinadas condições de síntese, o CBZ pode conter como impurezas os compostos AHP e DAP, pertencentes à classe das aminofenazinas. Sabe-se que alterações no processo de síntese, executadas por alguns fabricantes, podem evitar a formação desses compostos. Quando outros benzimidazóis, tais como Benomil e TM, são metabolizados a CBZ, não há a formação dessas fenazinas como contaminantes (IPCS, 1993). Anteriormente à reavaliação toxicológica do CBZ, a Anvisa havia estabelecido o limite máximo total de 3,5 ppm para essas duas impurezas (AHP e DAP), em decorrência do seu elevado potencial de genotoxicidade, pois pequenas alterações nas suas concentrações podem modificar o perfil toxicológico do componente ativo de grau técnico. Para esses mesmos contaminantes, a FAO (1992) e a EFSA (2010) definiram o limite de 0,0005 g/kg para AHP; já para DAP, foram definidos os limites de 0,003 g/kg e 0,0006 g/kg, pela FAO e pela EFSA, respectivamente.

Na reavaliação toxicológica do CBZ, foi avaliado o potencial de genotoxicidade dos produtos técnicos, com conclusão, no Parecer nº 1/2021/SEI/CREAV /GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA, que novos valores limites devem ser adotados pela Anvisa para esses contaminantes, com base nos resultados dos testes de Ames e discussões das autoridades regulatórias internacionais. Desse modo, para DAP, foi estabelecido como aceitável o valor máximo de 0,6 ppm nos produtos técnicos. Para a AHP, embora os testes de Ames não tenham sido positivos para concentrações acima de 0,004 g/kg, concluiu-se por alinhar os valores aos limites máximo estabelecidos pela FAO (1992) e EFSA (2010) de 0,5 ppm.

4. RESÍDUOS E PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

Uma vez introduzido no meio ambiente, o CBZ apresenta elevada adsorção ao solo e baixa permeabilidade, o que representa um baixo potencial de lixiviação ou movimentação significativa a partir do local de aplicação, sendo seus resíduos detectados por até 3 anos. Sua capacidade de adsorção no solo é dependente do conteúdo argiloso, de matéria orgânica, de nitrogênio e da capacidade de troca catiônica (Silva et al., 1997). Sua persistência em água é moderada, com baixo potencial de contaminação de lençóis freáticos por lixiviação. O processo de decomposição ocorre com tempo de meia-vida relativamente alto: de 6 a 12 meses em solo descoberto; de 3 a 6 meses em turfa; e de 2 e 25 meses em água, em condições aeróbicas e anaeróbicas, respectivamente. Esse processo de degradação é mediado principalmente por microrganismos, com a ocorrência de hidrólise do ingrediente ativo a 2-aminobenzimidazol (2-AB) – principal metabólito no solo e nas plantas (IPCS, 1993). Esse composto se dissipa rapidamente em solos expostos à molécula-mãe (CBZ), permanecendo somente 6% deste após 4 dias de aplicação (Silva et al., 1997). Em animais, o CBZ é metabolizado principalmente a 5-hidroxi-1H-benzimidazol-2-yl-carbamato (5-HBC), com a formação de outros compostos polares em menor quantidade. Esses metabólitos são rapidamente excretados do organismo pela urina e fezes. Ou seja, esse IA não apresenta um potencial de acumulação em nenhum sistema biológico (IPCS, 1993).

Estudos de metabolismo geral nas plantas indicaram que o CBZ inalterado é o principal composto residual na colheita, sendo os demais metabólitos detectados em menores proporções. Na cultura de arroz, entretanto, na qual todas as amostras foram analisadas com a utilização de dois procedimentos diferentes de extração, cabe destacar que o metabólito 2-AB foi o componente principal quando extraído em condições alcalinas. Em estudos executados com rotação de cultura, o CBZ inalterado também apareceu como o principal composto (EFSA, 2010). Adicionalmente, estudos de metabolização do CBZ em vacas leiteiras e galinhas poedeiras mostraram que esse IA é extensamente metabolizado a 5-OH-carbendazim e, em menor grau, em 4-OH-carbendazim (identificado apenas no leite). Entretanto, em seu relatório, a EFSA considerou que a ingestão por esses animais não é relevante ao ponto de representar um nível de resíduo preocupante em produtos de origem animal (EFSA, 2010).

Dentre os fatores abióticos que afetam a sua estabilidade, verificou-se que a elevação da temperatura e do pH causam aumento da degradação hidrolítica do CBZ. O tempo de meia-vida calculado em pH 5 e nas temperaturas de 22, 50 e 70 °C foram 457, 108 e 29 dias, respectivamente. Na faixa de pH 7 e a 50 e 70 °C, a meia-vida foi 43 e 12 dias, sem declínio significativo a 22 °C. Em pH 9 e a 22, 50 e 70 °C, os valores foram 22, 1,4 e 0,3 dias, respectivamente (IPCS, 1993). Quanto à estabilidade durante o armazenamento, verificou-se que o CBZ é estável por mais de 30 meses quando armazenado a -20°C, em matrizes contendo água (beterraba, tomate) e em cereais (EFSA, 2010).

No Brasil, a principal via de exposição da população é por meio da ingestão de resíduos de CBZ em culturas alimentares. De acordo com o último relatório do Programa de avaliação de resíduos em alimentos (PARA), esse é o terceiro IA com maior número de detecções, tendo sido verificado em 526 amostras, o que corresponde a 11% das amostras analisadas no período de 2017 a 2018. Destas, 21 amostras (4%) foram consideradas insatisfatórias pelo quantitativo de resíduos superior ao valor de LMR (ANVISA, 2019). Nessa análise, foram considerados os LMR estabelecidos nas monografias do CBZ e do TM, uma vez que o segundo se converte no primeiro composto durante a metabolização.

Em seu relatório, a FT propôs a definição de resíduo, para fins de monitoramento, somente como Carbendazim. Quanto às agências reguladoras internacionais, a USEPA (2020) utiliza, para avaliação da exposição dietética a partir de *commodities* agrícolas, o CBZ e seu metabólito 2-AB; e a partir da água potável, somente o CBZ. Já a APVMA (2009), a EFSA (2010) e a FAO (1998) definiram somente o CBZ como resíduo. Então, fica mantida a definição de resíduo estabelecida atualmente na monografia desse IA, na qual está disposto que, para fins de monitoramento de resíduos, devem ser considerados os LMR estabelecidos nas monografias do CBZ e do TM, cujos resíduos são expressos como Carbendazim.

5. CONCLUSÃO

Com base no relatório apresentado pela FT e nos relatórios das principais agências reguladoras internacionais, a CREAV detalhou no presente parecer as características referentes à identidade química e às propriedades físico-químicas do CBZ. Adicionalmente, também foram discutidas as impurezas com relevância toxicológica, AHP e DAP, as quais tiveram seus limites de concentração alterados nos produtos técnicos para os valores de 0,5 ppm e de 0,6 ppm, respectivamente, devido a sua ação mutagênica detalhada no Parecer nº 1/2021/SEI/CREAV/GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA (SEI nº [1309909](#)). Por fim, foram abordados os resíduos e produtos de degradação do CBZ e foi mantida como Carbendazim a atual definição de resíduo prevista na monografia desse IA, em alinhamento às principais agências reguladoras internacionais.

6. ENCAMINHAMENTOS

A CREAV propõe a seguinte alteração na monografia do CBZ: Contaminante(s) de importância toxicológica para o ingrediente ativo e seu limite máximo: Aminohidroxifenazina (AHP) = 0,5 ppm e Diaminofenazina (DAP) = 0,6 ppm.

7. REFERÊNCIAS

- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Monografia C-24, do ingrediente ativo Carbendazim. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/c/4227json-file-1>. Acesso em 11/01/2021.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos - PARA – Relatório das análises de amostras monitoradas no período de 2017 a 2018. Brasília, 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos>. Acesso em 11/01/2021.
- APVMA. Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. Australia Chemical Review Program. Human Health Risk Assessment of Carbendazim. 2009.
- EFSA. European Food Safety Authority. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance carbendazim. 2010.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO specifications for plant protection products Carbendazim (AGP: CP/220). Rome, 1992.
- IPCS. International Program on Chemical Safety. Environmental health criteria 149. Carbendazim. 1993.
- Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (JMPR). Pesticide residues in food. Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group. Part I, residues, volume I. 1998.

PMRA. Health Canada Pest Management Regulatory Agency. Proposed Registration Decision PRD2011-04. Carbendazim. 2011.

PUBCHEM. National Institutes of Health (NIH). Compound summary Carbendazim. Disponível em:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Carbendazim#section=Color-Form>. Acesso em 11/01/2021.

Silva C.M.M.S; de Melo I.S. Biodegradação de Fungicidas Benzimidazóis. Microbiologia ambiental. Jaguariuna: EMBRAPA-CNPMA. 438 p..

Disponível em:

https://www.agencia.cnpia.embrapa.br/Repositorio/Melo_BiodegradacaoFungicidasBenzimidazois_000fdqbaqe302wx5eo0a2ndxyjebw1mn.pdf. 1997

USEPA. United States Environmental Protection Agency. Thiophanate-methyl and Carbendazim (MBC). Human health assessment scoping document in support of registration review. 2014.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. Thiophanate-Methyl and Carbendazim: Draft Human Health Risk Assessment.

Memorandum Decision No. 452566. DP D452566. March 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Larissa Muratori Aguiar, Especialista em Regulação e Vigilância Sanitária**, em 09/07/2021, às 20:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/D10543.htm.



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Roberto Coradi de Freitas, Coordenador(a) de Reavaliação**, em 15/07/2021, às 19:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/D10543.htm.



Documento assinado eletronicamente por **Juliana Machado Braz, Especialista em Regulação e Vigilância Sanitária**, em 27/07/2021, às 10:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/D10543.htm.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.anvisa.gov.br/autenticidade>, informando o código verificador **1437066** e o código CRC **6A040874**.

Referência: Processo nº 25351.945793/2019-57

SEI nº 1437066

Criado por [larissa.aguiar](#), versão 6 por [larissa.aguiar](#) em 04/05/2021 17:59:17.

PARECER Nº 3/2021/SEI/CREAV /GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA

Processo nº 25351.945793/2019-57

Interessado: Coordenação de Reavaliação, Gerência de Monitoramento e Avaliação do Risco, GGTOX

Assunto: **Caracterização da exposição humana ao Carbendazim.**

Avalia os relatórios apresentados pela pelas entidades detentoras de registro de produtos à base de Carbendazim, documentos de outras agências reguladoras, documentos obtidos em busca sistemática de dados de intoxicação do Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN (2007 a 2018), do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) e dados de monitoramento da qualidade da água no âmbito do Vigiágua para avaliar a exposição humana ao Carbendazim como parte da reavaliação toxicológica desse ingrediente conforme RDC nº 221, de 28 de março de 2018.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS:

Anvisa: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APMVA: *Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority* (Autoridade Australiana de Pesticidas e Medicina Veterinária).

CBZ: Carbendazim

CI: Coeficiente de Incidência

CORSAN: Companhia Riograndense de Saneamento

DATASUS: Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde

DANTPS: Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde

DRfA: Dose de referência aguda

EFSA: *European Food Safety Authority* (Autoridade Europeia para Segurança dos Alimentos)

EPI: equipamento de proteção individual

FAO: *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação)

FT: Força-tarefa Carbendazim

IA: Ingrediente Ativo

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IDA: Ingestão diária aceitável

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

LD: *Limit of Detection* (Limite de Detecção)

LMR: Limite máximo de resíduos

LQ: *Limit of Quantification* (Limite de Quantificação)

PARA: Programa de Avaliação de Resíduos em Alimentos

PMRA: *Health Canada's Pest Management Regulatory Agency* (Agência Reguladora de Controle de Pragas Canadense)

SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SAA: sistema de abastecimento de água

SAC: sistema alternativo coletivo

TM: Tiofanato-metílico

UF: Unidades da Federação

UE: União Europeia

USEPA: *United States Environmental Protection Agency* (Agência de Proteção Ambiental Americana)

VMP: Valor Máximo Permitido

RESUMO

O CBZ (CBZ) é um fungicida sistêmico de amplo espectro, pertencente à classe dos benzimidazóis. No Brasil, ele tem o uso agrícola aprovado para a modalidade foliar nas culturas de algodão, cevada, citros, feijão, maçã, milho, soja e trigo e para a aplicação em sementes nas culturas de algodão, arroz, feijão, milho e soja. Ainda, é aprovado para uso não agrícola como preservante de madeira. Seu uso como domissanitário não é permitido. A partir dos usos aprovados, verifica-se que existe potencial exposição pela via dietética (consumo de alimentos e ingestão de água), ocupacional (operadores e trabalhadores) e de residentes e transeuntes que a depender das doses de referência a serem revisadas pela reavaliação do CBZ, pode pôr em risco a população brasileira. Nos dados de avaliação de resíduos de CBZ em água verificou-se que este IA é um dos mais frequentemente

encontrados, porém em quantidades inferiores ao limite estabelecido até o momento no Brasil. O PARA constatou que no ciclo 2017-2018 o CBZ foi terceiro mais detectado, estando presente em 11% das amostras, quantidade inferior ao do ciclo anterior (2013-2015) no qual foi detectado em 21% das amostras. Contudo, no ciclo mais recente o número de irregularidades (resíduos acima do LMR ou resíduos em culturas não autorizadas) foi ligeiramente maior do que no ciclo anteriores. Mas em relação ao risco, no ciclo anterior foi detectado risco agudo em amostras de abacaxi e mamão. Já no ciclo mais recente nenhuma das amostras apresentaram resíduos que oferecesse risco agudo ou crônico. Com relação à exposição ocupacional, de residentes e transeuntes, as conclusões dos relatórios das agências reguladoras internacionais é muito variável, visto que somente a Austrália ainda permite o seu uso agrícola; enquanto nos EUA e Canadá, seu uso é permitido apenas em plantas ornamentais com aplicação por injeção e como preservativo industrial. A agência regulatória australiana identificou risco ocupacional para operadores e trabalhadores de reentrada com base nos padrões de uso aprovados naquele país, com a necessidade de adoção das seguintes medidas de mitigação. Adicionalmente, foi identificado risco inaceitável à população em geral, referente à exposição dérmica e oral, com proibição do uso de CBZ em parques, campos de golfe e demais campos esportivos, bem como em gramados comerciais. Na literatura científica, estudos relataram potencial relevância na exposição ocupacional ao CBZ. A exposição inalatória ao CBZ não foi preocupante nesses estudos, entretanto a exposição cutânea foi relevante, com detecção de altos níveis nos antebraços, mãos, tórax e pernas dos participantes do estudo, o que indicou fragilidades nas áreas de sobreposição das partes dos EPI. Ainda, a baixa escolaridade, associada à carência de orientação e assistência técnica, são fatores que predispõem a ocorrência de irregularidades no uso de agrotóxicos, desde a compra até sua aplicação. Isso representa um potencial risco à saúde dos trabalhadores rurais brasileiros. A Anvisa também analisou os dados de notificação de intoxicação por Carbendazim (CBZ), obtidos do SINAN, referentes ao período de 2008 a 2018. Verificou-se, de modo geral, um perfil oscilatório do número de notificações ao longo dos anos, sem relação aparente com o perfil de vendas desse ingrediente ativo. No intervalo de 10 anos, 37 casos de intoxicação foram confirmados, os quais se enquadraram no seguinte perfil: homens, adultos, brancos, trabalhadores agrícolas registrados e autônomos, com nível de escolaridade muito baixo; expostos no ambiente de trabalho, com uso acidental do produto, durante a atividade de pulverização, pelas vias inalatória e dérmica, na lavoura de soja. Vale destacar a ocorrência de dois casos de intoxicação nas lavouras de café e melão, nas quais não há aprovação para o uso de CBZ. Os casos foram de

gravidade leve, com evolução para cura sem sequelas na maioria deles. Ainda, no mesmo período de análise, foram registrados nove casos de tentativas de suicídio e um de tentativa de homicídio com o uso do CBZ.

INTRODUÇÃO

O CBZ é o primeiro ingrediente ativo (IA) a ser reavaliado a partir dos critérios de priorização com base no risco à saúde humana, etapa do processo de reavaliação prevista no inciso I, Art 3º da RDC nº 221, de 28 de março de 2018. Trata-se de um fungicida sistêmico de amplo espectro, pertencente à classe dos benzimidazóis, que atua – em células de fungos e de mamíferos – por meio da inibição da polimerização de β -tubulina, o que impede a formação adequada do fuso acromático e, consequentemente, prejudica o processo de divisão celular, sendo considerado um agente aneugênico (PARECER Nº 1/2021/SEI/CREAV/GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA; SEI nº [1309909](#)).

É um metabólito do fungicida Tiofanato-metílico (TM), o qual também possui registro no Brasil; e do composto Benomil, cujo uso foi proibido no país. No Brasil, o CBZ tem o uso agrícola aprovado para a modalidade foliar nas culturas de algodão, cevada, citros, feijão, maçã, milho, soja e trigo e para a aplicação em sementes nas culturas de algodão, arroz, feijão, milho e soja. Ainda, é aprovado o uso não agrícola como preservante de madeira. Seu uso como domissanitário não é permitido. Esse IA apresenta baixa toxicidade aguda, em caso de exposição pelas vias oral, cutânea e inalatória. Não apresenta potencial para causar irritação dérmica ou ocular, tampouco é sensibilizador cutâneo (USEPA, 2020; APVMA, 2009; PMRA, 2011; EFSA, 2010).

A partir dos usos aprovados, verifica-se que as exposições dietética (consumo de alimentos e a ingestão de água) e ocupacional (operadores, trabalhadores) e de residentes e transeuntes são cenários de potencial risco à população brasileira. As evidências de exposição, detalhadas nos itens a seguir, ensejam preocupação uma vez que há indícios de carcinogenicidade, mutagenicidade e toxicidade reprodutiva associados ao CBZ. Esses desfechos serão aprofundados em pareceres específicos.

Neste parecer, foram discutidas evidências de exposição humana a partir do consumo de alimentos, com base nos dados do Programa de Avaliação de Resíduos em Alimentos (PARA); e de água potável, com base nos dados de monitoramento de resíduos de CBZ obtidos do SISÁGUA - conforme previsão de monitoramento disposta no Anexo VII da Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Ainda, foram analisadas as notificações de intoxicação exógena do SINAN, de 2008 a 2018,

envolvendo produtos que continham CBZ em sua formulação, com recomendação de medidas de prevenção e controle para reduzir os casos de intoxicação exógena por esse IA.

Como parte do processo de reavaliação do CBZ, foi conduzida uma busca sistemática da literatura científica para identificar estudos relevantes de exposição humana dietética (água e alimentos) e ocupacional, além de relatos de casos de intoxicação por exposição ao CBZ. Então, neste parecer foram incluídas as evidências de exposição humana obtidas na busca sistemática da literatura científica, no relatório apresentado pela Força-Tarefa CBZ (FT) e nos documentos das principais agências reguladoras internacionais.

EXPOSIÇÃO DIETÉTICA

Com relação à análise das agências reguladoras internacionais, a APMVA (2012) identificou risco dietético agudo, com proibição do uso do CBZ nas culturas de uva, frutas cítricas, mangas, melões, maçãs e peras, com detecção de níveis superiores à DRfA mesmo na ausência de extrapolações do valor de LMR. Além disso, foi proibido o uso nas culturas de banana, morango, gengibre, cana de açúcar e pastagem, pois os dados disponíveis são insuficientes para garantir que os valores atuais de LMR sejam apropriados para a proteção da saúde humana. A agência australiana concluiu ainda que a exposição da população em geral por ingestão de água potável é toxicologicamente irrelevante. A USEPA (2020) identificou risco dietético agudo (alimentos e água potável) associado ao uso do CBZ em plantas ornamentais para todos os subgrupos populacionais, sendo as crianças < 1 ano as mais afetadas. Após refinamento, com dados de uso não-ornamental, não se verificou risco para nenhum subgrupo. A USEPA relatou ainda que a água potável é um fator importante de contribuição para a exposição dietética aguda ao CBZ. A EFSA (2010) não relatou risco dietético agudo, entretanto, é importante mencionar que, nesse processo, foram utilizados valores de referência estipulados anteriormente à reavaliação desse IA, e que isso não se aplica atualmente, uma vez que o CBZ foi proibido na União Europeia (UE), após ser classificado na categoria 1B para toxicidade reprodutiva e mutagenicidade. Quanto ao risco dietético crônico, as agências australiana, americana e europeia não identificaram potencial risco associado à exposição ao CBZ (APMVA, 2012; USEPA, 2020; EFSA, 2010). Já a PMRA, tendo em vista não possuir uso agrícola aprovado para o CBZ, conduziu a avaliação de risco dietética em razão do TM e do Benomil, cujo uso agrícola é permitido lá. Então, essa avaliação foi feita separadamente para cada substância, mas com a utilização de todos os resíduos de CBZ encontrados, pois não é possível distinguir a fonte de CBZ,

por ser um metabólito comum aos dois compostos utilizados (TM e Benomil). Os riscos dietéticos agudo e crônico para o CBZ ficaram abaixo do nível de preocupação (PMRA, 2019).

MONITORAMENTO EM ÁGUA

No Brasil, os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade são determinados pela Portaria nº 2.914/2011 e aplicam-se a água proveniente de sistema de distribuição coletiva (instalação composta por um conjunto de obras civis, materiais e equipamentos, desde a zona de captação até as ligações prediais, destinada à produção e ao fornecimento coletivo de água potável, por meio de rede de distribuição) ou de solução alternativa coletiva de água (modalidade de abastecimento coletivo destinada a fornecer água potável, com captação subterrânea ou superficial, com ou sem canalização e sem rede de distribuição). As soluções alternativas individuais de abastecimento de água (modalidade de abastecimento coletivo destinada a fornecer água potável, com captação subterrânea ou superficial, com ou sem canalização e sem rede de distribuição) também estão sujeitas à vigilância da qualidade da água.

A Portaria define que o controle da qualidade da água deve ser exercido pelo responsável pelo sistema ou pela solução alternativa coletiva de abastecimento a fim de garantir a potabilidade da água fornecida, seguindo os parâmetros de monitoramento regidos pela própria Portaria. Já a vigilância da qualidade da água é de responsabilidade da autoridade de saúde pública e, levando em consideração as características locais, objetiva verificar o atendimento à Portaria. A vigilância da qualidade da água é realizado independentemente das análises de controle, através de ação direta da autoridade de saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

O Anexo VII da Portaria descreve o padrão de potabilidade da água para substâncias químicas que representam risco à saúde, dentre elas alguns ingredientes ativos de agrotóxicos, incluindo o CBZ. O Valor Máximo Permitido (VMP) é calculado em função da soma de resíduos de CBZ e Benomil e fixado em 120 µg/L. O Benomil é um composto muito instável e se degrada rapidamente a CBZ, sendo que essas taxas degradação são maiores em solventes orgânicos do que em água (ANASTASSIADES; SCHWACK, 1998). O Benomil não é mais autorizado como IA de agrotóxicos no Brasil. Já o CBZ é mais estável e possui baixa solubilidade em água. No solo o CBZ, assim como seus compostos parentais Benomil e Tiofanato, é relativamente imóvel e por isso espera-se que esses compostos não se

movimentem significativamente no solo, sendo improvável a sua lixiviação, ficando restrito às áreas onde a aplicação ocorreu (SILVA; MELO, 1997).

A Portaria define ainda que os responsáveis pelo controle da qualidade da água de sistemas ou soluções alternativas coletivas de abastecimento devem coletar semestralmente amostras de água bruta no ponto de captação (art. 40º). Com o mesmo intervalo, devem também coletar uma amostra na saída do tratamento e no caso de o parâmetro ser detectado nessa amostra, outra amostra precisa ser coletada no sistema de distribuição (reservatórios e redes). A norma permite que os responsáveis pelos sistemas e soluções alternativas coletivas solicitem à autoridade de saúde pública alteração na frequência de amostragem mediante justificativa técnica e análise conjunta do histórico de dados de pelo menos dois anos.

Já a Diretriz Nacional do Plano de Amostragem da Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016) determina que o plano de monitoramento de agrotóxicos deve ser feito pelos técnicos da Secretaria de Saúde dos estados em conjunto com os técnicos das Secretarias Municipais de Saúde, ou entre os representantes da Secretaria de Saúde e das Regiões Administrativas no caso do Distrito Federal. Dessa forma, a Diretriz abre a possibilidade de que o plano de amostragem leve em consideração características de cada região, priorizando os municípios com maiores chances de ocorrência de agrotóxicos na água de consumo e adequando à necessidade e capacidade de cada cidade. Assim, é possível que determinada região ou município não registrem amostras de vigilância para monitoramento de agrotóxicos em água para consumo humano.

Sobre os dados de controle da qualidade da água para consumo humano

Para os anos de 2014 e 2019, foram registradas 65.670 amostras para análise de CBZ, sendo que destas 3.938 foram em 2014, 5.945 em 2015, 7.667 em 2016, 13.421 em 2017, 15.943 em 2018 e 18.756 em 2019. Logo, houve um aumento no número de amostras analisadas a cada ano de monitoramento, totalizando um incremento ao longo dos 6 anos de 376,3%. Por outro lado, a comercialização de produtos à base de CBZ sofreu algumas flutuações no mesmo período e terminou com um incremento de menos de 4%. Os dados detalhados podem ser verificados na Tabela 1.

Tabela 1. Número de amostras de controle analisadas por ano em relação à comercialização anual de produtos à base de CBZ.

Ano	Número de Amostras	Incremento anual de no amostras (%)	Comercialização (Toneladas)	Incremento anual de Comercialização (%)
2014	3938	-	5141,120	-
2015	5945	51,0	3217,952	-37,4
2016	7667	29,0	3912,512	21,6
2017	13421	75,0	3748,258	-4,2
2018	15943	18,8	4843,969	29,2
2019	18756	17,6	5343,635	10,3
Total Geral	65670	376,3	26207,445	3,9

Na Tabela 2, pode ser verificada a porcentagem do número de amostras coletada por cada estado em relação ao total de amostras. O Maranhão foi o que menos coletou amostras em relação ao total (0,003%), seguido por Alagoas (0,005%), Piauí (0,034%), Ceará (0,056%) e Pará (0,081%). As coletas de Amazonas, Paraíba, Goiás, Distrito Federal, Sergipe, Espírito Santo e Bahia também representam menos de 1% do total cada, sendo que todos estes somados chegaram a 3,24% do total. Já em situação oposta, São Paulo sozinho foi responsável pela coleta de quase 64% das amostras, seguido de Paraná (12,05%), Santa Catarina (5,88%), Minas Gerais (4,41%), Mato Grosso do Sul (3,52%), Tocantins (2,29%), Rio Grande do Sul (2,05%), Mato Grosso (1,58%) e Rio de Janeiro (1,08%). Para Rondônia, Roraima, Acre, Amapá, Rio Grande do Norte e Pernambuco não foram registradas coletas de amostras de água, mesmo que estes estados tenham comercializado em seus territórios 227,154 toneladas de produtos à base de CBZ. Outras 792,338 toneladas de produto foram descritas como 'Vendas sem definição de UF' (IBAMA, [s.d.]).

Para efeito de comparação, foi calculado o número de amostras coletadas em cada UF em relação à quantidade de produtos à base de CBZ comercializada no estado segundo dados de comercialização consolidados. Ressalta-se que são divulgados apenas os dados de comercialização de IAs para os quais existam pelo menos 3 empresas detentoras de registros para salvaguardar o sigilo comercial (IBAMA, [s.d.]). O Maranhão, Goiás, Piauí, Mato Grosso, Pará, Alagoas, Rio Grande do Sul e Bahia (em ordem crescente) coletaram menos de uma amostra para cada tonelada de produto comercializado no estado. O Rio de Janeiro foi o que mais realizou coletas por quantidade de produto comercializado, cerca de 179 amostras para cada tonelada de produto, seguido por Amazonas (43,9 amostras/tonelada), São Paulo (17,7 amostras/tonelada), Espírito Santo (11,38 amostras/tonelada) e Paraíba (10,61 amostras/tonelada). Os dados mais detalhados podem ser conferidos na Tabela 2.

Tabela 2. Ranqueamento das UF's em relação ao total de amostras de controle analisadas e à comercialização de produtos à base de CBZ.

Sigla UF	Nº de Amostras	% do total de amostras	Comercialização (Toneladas)	Amostras/Toneladas	Ranking maior nº de amostras	Ranking maior comercialização
CE*	37	0,056	-4,069	-	18	28
Não conhecido	0	0,000	792,338	0,00	Sem amostras	9
RO	0	0,000	186,814	0,00	Sem amostras	15
RR	0	0,000	19,595	0,00	Sem amostras	19
PE	0	0,000	9,828	0,00	Sem amostras	21
RN	0	0,000	9,536	0,00	Sem amostras	22
AC	0	0,000	0,701	0,00	Sem amostras	26
AP	0	0,000	0,680	0,00	Sem amostras	27
MA	2	0,003	311,644	0,01	21	11
GO	188	0,286	3711,882	0,05	14	3
PI	22	0,034	275,896	0,08	19	12
MT	1039	1,582	5796,721	0,18	8	1
PA	53	0,081	253,055	0,21	17	13
AL	3	0,005	8,895	0,34	20	23
RS	1343	2,045	2668,918	0,50	7	4
BA	639	0,973	1119,505	0,57	10	7
MG	2899	4,414	2554,060	1,14	4	5
PR	7910	12,045	4249,543	1,86	2	2
MS	2314	3,524	974,271	2,38	5	8
DF	193	0,294	69,956	2,76	13	16
TO	1502	2,287	248,177	6,05	6	14
SE	301	0,458	39,187	7,68	12	18
SC	3856	5,872	470,650	8,19	3	10
PB	141	0,215	13,284	10,61	15	20
ES	588	0,895	51,658	11,38	11	17
SP	41855	63,735	2369,047	17,67	1	6
AM	75	0,114	1,707	43,94	16	25
RJ	710	1,081	3,969	178,90	9	24
Total	65670		26207,445	2,51		

*O sinal negativo indica que os produtos retornaram das vendas para a indústria.

Das 65.670 amostras coletadas entre 2014 e 2019, apenas duas apresentaram resíduos de CBZ + Benomil acima do VMP (120,0 µg/L). Uma dessas amostras foi coletada no ponto de captação de um sistema de abastecimento de água (SAA) em Curitiba/SC (202 µg/L) em janeiro de 2016 e a outra em Paulínia/SP (662 µg/L) também no ponto de captação, mas de um sistema alternativo coletivo (SAC) em julho de 2015. Os resultados da análise da cidade de Paulínia não informaram os valores do limite de detecção (LD) e do limite de quantificação (LQ) para validação da metodologia analítica, o que impossibilita fazer afirmações unicamente com o valor do resultado.

Para a amostra de Curitiba/SC, os valores do LD e LQ foram informados e são apropriados para validação do resultado. Contudo, a Portaria 2.914/2011 estabelece que resultados acima do VMP não devem ser analisados de forma pontual, mas sim em conjunto com o histórico da qualidade da água (art. 39, §3º). Em Curitiba/SC, foram realizadas, no mesmo dia da coleta da amostra com resultado insatisfatório, outras duas amostragens na saída do tratamento e no sistema de distribuição e ambas apresentaram resíduos satisfatórios de CBZ + Benomil de 20 µg/L. Já em Paulínia/SP foram coletadas outras 23 amostras no ponto de captação e mais uma na saída do tratamento durante o ano de 2015 e todas deram resultados satisfatórios (para somente duas dessas amostras foram apresentados os valores do LD e do LQ). Da cidade de Amparo/SP foi registrada uma amostra de junho de 2017 sem o resultado da análise.

Das 65.667 amostras com resultados, a princípio, satisfatórios, 5.467 (8,3%) apresentaram resultado menor que o LD, mas destes 737 não apresentaram o valor do LD e 81 apresentaram somente valores de LQ, sendo todos compatíveis com as magnitudes dos resultados. Das 50.102 (76,3%) amostras que tiveram resultado abaixo do LQ, 1.493 não informaram o valor do LQ e destes 23 apresentaram somente o valor do LD. Além disso, 5.203 (7,9%) não apresentaram os valores nem do LD nem do LQ. E 4.938 (7,5%) apresentaram os valores de ambos parâmetros.

Os estados do Acre, Amapá, Rondônia, Roraima, Pernambuco e Rio Grande do Norte não registraram resultados de análises para o monitoramento de CBZ. O Brasil possui 5.570 municípios e aproximadamente 72 milhões de domicílios, destes mais de 61 milhões (85,5%) têm a rede geral como principal forma de abastecimento de água, dados de 2019 (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, [s.d.], [s.d.]). No entanto, nos dados do Sisagua constam registro de amostras coletadas em 2.285 cidades, cerca de 41% do total. Ou seja, as amostras foram coletadas em menos da metade dos municípios. Além disso, um terço dos municípios (764) para os quais existem dados no Sisagua, coletaram em

média menos de uma amostra por ano durante o período do monitoramento.

Sobre os dados de vigilância da qualidade da água para consumo humano

Para o período compreendido entre o ano de 2014 a Julho de 2020 foram registradas 3.617 coletas de amostras de vigilância para análise de CBZ. Destas, 14 amostras foram coletadas em 2014, 116 em 2015, 196 em 2016, 197 em 2017, 1034 em 2018, 1714 em 2019 e 346 em 2020. Excluindo o ano de 2020, por se tratar de dados parciais, o número de amostras coletadas ano a ano aumentou mais de 120 vezes no período, mesmo que a comercialização tenha permanecido estável, como explicado no item 2.1.1 deste parecer. Para dados mais detalhados ver Tabela 3.

Tabela 3. Ranqueamento das UFs em relação ao total de amostras de vigilância analisadas e à comercialização de produtos à base de CBZ.

Ano	Número de amostras	Incremento anual nº amostras (%)	Comercialização (Toneladas)	Incremento anual de Comercialização (%)
2014	14	-	5141,1	-
2015	116	728,6	3218,0	-37,4
2016	196	69,0	3912,5	21,6
2017	197	0,5	3748,3	-4,2
2018	1034	424,9	4844,0	29,2
2019	1714	65,8	5343,6	10,3
2020*	346	-	-	-
Total Geral	3617	12142,9	26207,4	3,9

*Os dados de 2020 não foram incluídos na comparação por se tratar de dados parciais.

Na Tabela 4, consta o ranqueamento das UFs em relação ao total de amostras de vigilância analisadas e à comercialização de produtos à base de arbendazim no período avaliado. Na tabela é possível verificar que 15 UFs (AP, AC, AM, RJ, AL, RN, PE, PB, RR, DF, RO, TO, PA, PI, MA) não coletaram amostras de vigilância da qualidade da água. Outras 10 (BA, MT, GO, RS, MS, SC, SE, SP, PR e MG) coletaram menos de uma amostra por tonelada de produto comercializado em seu território. Ainda que os estados de SP, PR e MG tenham coletado proporcionalmente menos de uma amostra por tonelada de produto, o número de amostras totais analisadas foram substancialmente maior do que nos demais, sendo as quantidades de amostras 92, 217 e 1607 respectivamente. O Espírito Santo foi o único estado que coletou mais de uma amostra por produto comercializado, 13,9 amostras/tonelada. Mesmo que o número absoluto de amostras para alguns estados tenha sido maior do que os demais, não há como afirmar se

tais amostragens foram representativas das condições reais gerais do estado.

Tabela 4. Ranqueamento das UFs em relação ao total de amostras de vigilância analisadas e à comercialização de produtos à base de CBZ.

Sigla UF	Nº de	% do total de	Comercialização	Amostras/Toneladas	Ranking maior nº	Ranking maior comercialização
AP	0	0,000	0,680	0,000	Sem amostras	2
AC	0	0,000	0,701	0,000	Sem amostras	3
AM	0	0,000	1,707	0,000	Sem amostras	4
RJ	0	0,000	3,969	0,000	Sem amostras	5
AL	0	0,000	8,895	0,000	Sem amostras	6
RN	0	0,000	9,536	0,000	Sem amostras	7
PE	0	0,000	9,828	0,000	Sem amostras	8
PB	0	0,000	13,284	0,000	Sem amostras	9
RR	0	0,000	19,595	0,000	Sem amostras	10
DF	0	0,000	69,956	0,000	Sem amostras	13
RO	0	0,000	186,814	0,000	Sem amostras	14
TO	0	0,000	248,177	0,000	Sem amostras	15
PA	0	0,000	253,055	0,000	Sem amostras	16
PI	0	0,000	275,896	0,000	Sem amostras	17
MA	0	0,000	311,644	0,000	Sem amostras	18
Não conhecido	0	0,000	792,338	0,000	Sem amostras	20
BA	2	0,055	1119,505	0,002	11	22
MT	16	0,442	5796,721	0,003	9	28
GO	24	0,664	3711,882	0,006	7	26
RS	45	1,244	2668,918	0,017	6	25
MS	18	0,498	974,271	0,018	8	21
SC	10	0,276	470,650	0,021	10	19
SE	1	0,028	39,187	0,026	12	11
SP	92	2,544	2369,047	0,039	5	23
PR	217	5,999	4249,543	0,051	4	27
MG	1607	44,429	2554,060	0,629	1	24
ES	717	19,823	51,658	13,880	3	12
CE*	868	23,998	-4,069	-	2	1
Total	3617		26207,445	0,14		

*O sinal negativo indica que os produtos retornaram das vendas para a indústria.

Sobre a literatura científica

Nos estudos da literatura científica nacional e internacional que se propuseram a avaliar o nível de resíduos de CBZ na água, os pesquisadores observaram que frequentemente este composto é um dos mais detectados nas amostras. Contudo, quando encontrados, as concentrações eram da ordem do nanogramas por litro (ng/L) ou 10^{-3} µg/L, ressaltando que o VMP pela legislação é brasileira é 120 µg/L.

Caldas et al. (2013) avaliaram amostras de água pré e pós-tratamento, coletadas quinzenalmente entre outubro de 2010 e março de 2011 na Companhia Riograndense de Saneamento (CORSAN/RS) e as quantidades encontradas foram inferiores ao limite de quantificação (LQ – *Limit of Quantification*) que era de 8 ng/L. Já Montagner et al. (2014) analisaram 46 amostras de água de rio e outras 18 de água pós-tratamento, coletadas em 13 cursos d'água e 9 cidades na região de Campinas/SP. As frequências de detecção de CBZ nas amostras foram de 85% na água pré-tratamento e de 5,6% na água potável, sendo que as concentrações máximas encontradas foram de 781 ng/L e 9 ng/L, respectivamente. No mesmo sentido, Arruda, Lima e Cardoso (2016) avaliaram, além de outras coisas, os resíduos de CBZ em amostras de água de rio no Mato Grosso do Sul e estes não foram detectados.

Resultados semelhantes foram encontrados em outros países, na Etiópia a maior concentração encontrada em amostra do Lago Ziway foi de 9,1 µg/L (TEKLU et al., 2018). Na Grécia, quando encontrados a quantidade máxima dos resíduos foi de 11,1 ng/L, na Índia os resultados foram inferiores aos limites de detecção (<0,001-0,05 µg/L) (ARORA et al., 2014; KALOGRIIDI et al., 2014). Estudos independentes na Romênia (CHITESCU et al., 2015; CHITESCU; NICOLAU, 2014) e da Sérvia (RADOVIĆ et al., 2014) avaliaram amostras do Rio Danúbio e encontraram no máximo 30 e 29 ng/L de resíduos de CBZ, respectivamente. Um outro estudo realizado próximo ao Brasil, avaliou amostras de curso d'água pertencente ao Sistema Aquífero Guarani no Paraguai, em região fronteira com o Paraná e os resultados foram inferiores ao LD de 0,05 µg/L (HOUBEN et al., 2015).

MONITORAMENTO EM ALIMENTOS

Na busca sistemática, foram analisados dois artigos que relataram exposição dietética ao CBZ (Nougadère et al., 2020; Pennycook et al., 2004). No primeiro deles, foi descrito um estudo de dieta total infantil (iTDS, *infant total diet study*) conduzido na França entre 2010 e 2016, no

qual foi avaliada a exposição dietética crônica de bebês e crianças menores de 3 anos a resíduos de CBZ em 309 amostras combinadas de alimentos, incluindo 219 alimentos industrializados para bebês e 90 alimentos comuns, relatou-se que o CBZ ficou entre os IA mais frequentemente detectados (14% das amostras), mas sem extrapolação dos valores de LMR. Vale ressaltar que o CBZ não tem seu uso aprovado na França desde 2014, mas é um metabólito do Tiofanato-Metílico (TM), cujo uso era autorizado até 2019. Os autores também relataram que o CBZ está entre os IA de agrotóxicos mais frequentemente encontrados em alimentos para bebês tanto no iTDS quanto nos programas de monitoramento da EU de 2012, com detecção principalmente em sucos de frutas (Nougadère et al., 2020).

No segundo estudo, foi avaliada a exposição dietética de crianças de um ano e meio a 4 anos e meio, no Reino Unido, a resíduos de CBZ encontrados em maçãs e peras, frutas escolhidas com base nos dados de pesquisa nutricional nacional. O risco real foi quantificado por uma modelagem do consumo, a partir de dados de pesquisas dietéticas, com pesos corporais individuais, contra resultados de resíduos publicados para 2000-2002 e a variabilidade da distribuição de resíduos dentro dos lotes. Os resultados desse processo de modelagem indicaram que a variação nos resíduos de CBZ é suficiente para fazer com que as crianças estejam submetidas a exposições ocasionais em níveis superiores aos limites aceitos. Então, os resultados dessa análise indicaram 19 e 32,5 crianças por dia com provável ingestão de resíduos de CBZ superior a DRfA, para peras e maçãs respectivamente (Pennycook et al., 2004).

Em alinhamento aos dados das demais agências internacionais e dos estudos científicos supracitados, no Brasil também se verifica exposição dietética da população. De acordo com o último relatório do Programa de Avaliação de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA 2017-2018), esse é o terceiro IA com maior número de detecções, tendo sido verificado em 526 amostras, o que corresponde a 11% das amostras analisadas. Destas, 62 amostras (12%) foram consideradas insatisfatórias pelo quantitativo de resíduos superior ao valor de LMR (21 amostras) ou pela detecção em culturas não autorizadas (41 amostras – abacaxi, goiaba, alface, chuchu, pimentão, batata-doce, beterraba) (ANVISA, 2019).

Embora isso possa caracterizar uma melhoria em relação ao ciclo de análises anterior (2013-2015), no qual o CBZ foi detectado em um maior número de amostras (2553 amostras ou 21% do total analisado), o percentual de detecções irregulares foi de 3,06%, inferior ao valor do ciclo mais recente (12%). Ainda, no ciclo anterior, verificou-se risco dietético agudo para as culturas de abacaxi e mamão; enquanto no ciclo 2017-2018, não se verificou risco dietético agudo em nenhuma amostra, o que

representa uma melhora efetiva, acompanhando a tendência dos demais IA analisados. Adicionalmente, não foi verificado risco dietético crônico nas amostras analisadas no período de 2013 a 2018. É importante ressaltar que, nessas análises, foram considerados os LMR estabelecidos nas monografias do CBZ e do TM, uma vez que o segundo se converte no primeiro composto pela metabolização, e que o risco dietético foi determinado com base nas doses de referência vigentes, as quais podem ser alteradas ou não estabelecidas após o processo de reavaliação desse IA.

EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL

Nos relatórios das agências reguladoras internacionais, a avaliação da exposição ocupacional ao CBZ é muito variável, visto que somente a Austrália ainda permite o seu uso agrícola; enquanto nos EUA e Canadá, seu uso é permitido apenas em plantas ornamentais com aplicação por injeção e como preservativo industrial. A APMVA (2012) identificou risco ocupacional para operadores e trabalhadores de reentrada com base nos padrões de uso aprovados naquele país, com a necessidade de adoção das seguintes medidas de mitigação: proibição das culturas de uva, maçãs, peras, rosas e gramado; proibição da aplicação manual em plantas ornamentais e gramado comercial; ampliação do intervalo de reentrada e uso de equipamento de proteção individual (EPI) completo para as culturas de pastagem e morangos; adoção de protetores faciais para todos os produtos de formulação líquida e o uso de respiradores para formulações em pó molhável, durante a mistura/ abastecimento do concentrado. Adicionalmente, foi identificado risco inaceitável à população em geral, referente à exposição dérmica e oral, com proibição do uso de CBZ em parques, campos de golfe e demais campos esportivos, bem como em gramados comerciais. A USEPA (2020) identificou risco ocupacional relacionado à exposição cutânea e inalatória do manipulador, referente ao uso do CBZ como preservativo industrial (em tintas, por exemplo).

Na literatura científica, três estudos relataram exposição ocupacional cutânea e inalatória ao CBZ, em diferentes locais e cenários de emprego. López e colaboradores (2017) avaliaram o risco inalatório na população da Região de Valência/ Espanha, com base na determinação quantitativa (alvo) e semiquantitativa (triagem retrospectiva) de agrotóxicos em material particulado inalável; com coleta de 345 amostras entre 2008 a 2014, em seis áreas rurais, duas áreas urbanas e uma área remota (sem cultivo nas proximidades). O risco associado a exposições inalatórias crônicas (> 1 ano) foi avaliado em três populações distintas: bebês (6 meses - 1 ano), crianças (1 - 6 anos) e adultos (> 12 anos). Apesar da atual proibição de uso na UE, esse IA era permitido durante o período de

amostragem do estudo. Relatou-se que o CBZ teve a maior frequência de detecção (47%) dentre os 16 fungicidas investigados, sendo detectado em todas as áreas avaliadas. Nas estações rurais, cercadas por pomares de frutas cítricas, o CBZ foi o IA detectado com maior frequência e em maiores concentrações. Apesar disso, na avaliação de risco, a exposição inalatória ao CBZ estava abaixo do nível de preocupação.

Em um estudo de caso, foi investigada a exposição ocupacional cutânea e inalatória ao CBZ (pureza 50%) em uma estufa de rosas na Colômbia. Os autores identificaram um potencial risco à saúde dos operadores, em razão da estimativa de absorção cutânea diária ter excedido o valor de AOEL. A exposição inalatória foi considerada irrelevante, sendo a cutânea o principal fator para a exposição total, com detecção de altos níveis nos antebraços, mãos, tórax e pernas dos participantes do estudo. Isso indicou fragilidades nas áreas de sobreposição das partes dos EPI (Lesmes-Fabian et al., 2013).

O terceiro estudo foi conduzido no Brasil, com avaliação da exposição ocupacional na cultura do pessegueiro, a partir da aplicação de questionários nas propriedades rurais, junto a 135 persicultores no RS, no período de maio a dezembro de 2007. Os autores relataram que a mão-de-obra foi predominante familiar, com baixo nível de escolaridade (ensino fundamental incompleto); que os agrotóxicos foram adquiridos em lojas credenciadas (98,5%), porém, sem receituário agrônomo (97,1%) e que o período de carência, em geral, foi respeitado (83,7%). Um ponto importante relatado foi o uso do CBZ por 88,2% dos persicultores, apesar de não ter aprovação para o seu emprego nessa cultura. Ainda, destaca-se o relato de uso do fungicida Benomyl® (benlate) por 70,3% dos persicultores. Esse IA tem o CBZ como principal metabólito e seu uso e comercialização estão proibidos no Brasil. Relatou-se também que a utilização de EPI é uma prática incomum entre os aplicadores (somente 25,2% com uso de EPI completo). Com relação à destinação das embalagens vazias, 80,8% as guardam para posterior recolhimento a ser realizado pela prefeitura ou pelas revendas de agrotóxicos. Então, a partir dos resultados, verifica-se que a baixa escolaridade, associada à carência de orientação e assistência técnica, são fatores que predispõem a ocorrência de irregularidades no uso de agrotóxicos, desde a compra até sua aplicação. Isso representa um potencial risco à saúde dos trabalhadores rurais brasileiros (Lima et al., 2009).

Com relação aos usos atualmente permitidos no Brasil, para a aplicação foliar, não há restrição quanto ao tipo de formulação para esse IA, com registro de produtos com as seguintes formulações líquidas: suspensão concentrada (SC), suspensão concentrada para o tratamento de sementes (FS) e suspo-emulsão (SE). Tampouco há restrição quanto ao tipo de

equipamento utilizado. Portanto, espera-se exposição ocupacional para operadores (mistura/abastecimento e aplicação), trabalhadores, residentes e transeuntes. Para o tratamento de sementes, espera-se exposição de operadores durante as atividades de mistura/abastecimento e de plantio das sementes tratadas, sem relevante exposição dietética. Nesses casos, não se espera exposição significativa de trabalhadores de reentrada, residentes e transeuntes.

BIOMONITORAMENTO EM HUMANOS

Peng e colaboradores (2020) avaliaram a exposição não ocupacional de 204 mulheres adultas saudáveis, residentes em duas cidades da China, por meio da dosagem de resíduos de CBZ em amostras de cabelo. Relatou-se a detecção de CBZ em 100% das amostras, em ambas as cidades, com concentração mediana de 5,07 pg/mg e 7,93 pg/mg, correspondente ao quarto e ao segundo lugar, respectivamente, dentre os 10 compostos que também foram detectados em todas as amostras, em cada cidade. Por meio de modelos de regressão linear, os autores relataram ainda que o CBZ foi positivamente associado ao índice de massa corporal (IMC), o que pode estar relacionado à maior ingestão alimentar de indivíduos com IMC maior, uma vez que a dieta é geralmente considerada a principal fonte de exposição humana da população geral aos agrotóxicos. Adicionalmente, foi relatado que os níveis de CBZ não apresentaram uma associação significativa à frequência de consumo de carne vermelha ou peixe / frutos do mar.

INTOXICAÇÕES EXÓGENAS

FONTE DOS DADOS

Os dados das notificações de intoxicação foram obtidos do banco de dados do SINAN, extraído em 18/03/2020.

Para selecionar as notificações de intoxicações por CBZ, foram utilizadas as variáveis AGENTE_1, AGENTE_2 e AGENTE_3. Todas as notificações que apresentaram uma ou mais das palavras (e variações) listadas a seguir, nas variáveis supracitadas, foram incluídas na análise:

Agrotóxicos - Agroben 500; Apollo 500 SC; Battle; Bavistin; Bendazol; Carben 500 SC; Carbendazim CCAB 500 SC; Carbendazim Nortox; Carbendazim Nortox 500 SC; Carbendazim SC Cheminova; Carbendazim Stk 500 SC-A; Carbendazim STK 500 SC-B; Carbomax 500 SC; Concreto; Czar; Derosal Plus; Derosal 500 SC; Derox; Fungicarb 500 SC; Hexin 500 SC; Impact Plus; ImperadorBR; Lead; Locker; Mandarin; Minx 500 SC; Novazin

Proquimur; Portero; Prevent; Protreat; Rivamax; Rivax; Rodazim 500 SC; STK ZIM; Streak 500 SC; Tebuzim 250 SC; Toplus; Virtuoso 250 SC; Wish 500 SC.

A população das Unidades da Federação (UF) foi obtida do sítio eletrônico do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS) do Ministério da Saúde, por meio do Tabnet (<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?ibge/cnv/poptuf.def>, acessado em 08/03/2019), sendo utilizada a população residente das estimativas de 2008 a 2018 utilizadas pelo TCU para determinação das cotas do Fundo de Participação dos Municípios. Os dados de comercialização do CBZ foram obtidos do portal eletrônico do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama), seção agrotóxicos, Relatórios de comercialização de agrotóxicos (<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>). Foram utilizados os arquivos Vendas de ingredientes Ativos por UF.xls para obtenção dos valores (Ibama, 2018).

DEFINIÇÕES DE CASO

Foram utilizadas duas definições de caso: definição de caso de intoxicação por CBZ e definição de caso de tentativa de suicídio, homicídio ou aborto com CBZ. A definição de caso de intoxicação por CBZ foi a seguinte:

Paciente com data de início dos sintomas entre 01 de janeiro de 2008 à 31 de dezembro de 2019, cuja notificação no SINAN apresentava as seguintes condições:

a. Classificação final da notificação registrada como “1-Intoxicação confirmada” ou “3-Reação adversa”;

E

b. Classificação geral do grupo do agente tóxico registrada como “02-Agrotóxico/uso agrícola” ou “03-Agrotóxico/uso doméstico” ou “04-Agrotóxico/uso saúde pública”;

E

c. Circunstância da exposição diferente de “10- Tentativa de suicídio” ou “11- Tentativa de aborto” ou “12-Violência / homicídio”.

A definição de caso de tentativa de suicídio, homicídio ou aborto com CBZ foi a seguinte:

Paciente com data de início dos sintomas entre 01 de janeiro de 2008 à 31 de dezembro de 2019, cuja notificação no SINAN apresentava as seguintes condições:

a. Classificação geral do grupo do agente tóxico registrada como “02-Agrotóxico/uso agrícola” ou “03-Agrotóxico/uso doméstico” ou “04-Agrotóxico/uso saúde pública”;

E

b. Classificação da exposição igual a “10- Tentativa de suicídio” ou “11- Tentativa de aborto” ou “12-Violência / homicídio”.

ANÁLISE DOS DADOS

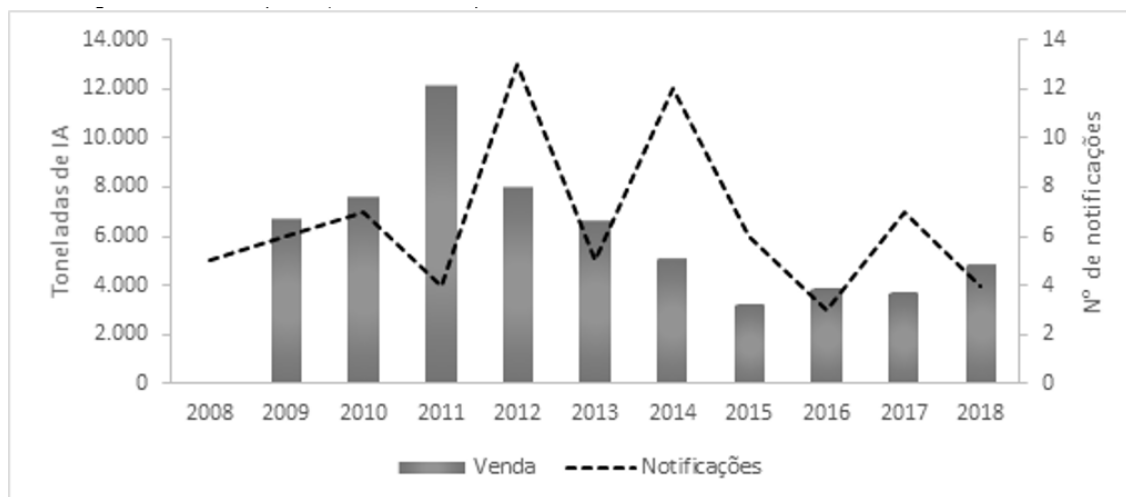
Os dados foram analisados utilizando-se os aplicativos Excel 2016 e EPIINFO 7.2.2.2.

RESULTADOS

Descrição das notificações (geral) por tempo, lugar e pessoa

Entre 2008 e 2018, foram registradas 72 notificações de intoxicação por CBZ no SINAN, as quais apresentaram um perfil oscilatório ao longo dos anos, com a ocorrência de dois picos em 2012 e 2014. Isso não acompanha o perfil de vendas desse IA, no qual observa-se um pico em 2011, seguido por um decréscimo entre 2012-2015, com posteriores aumentos menos proeminentes até o ano de 2018. Ou seja, a partir dessa análise comparativa, não é possível traçar uma relação entre o número de notificações e a quantidade comercializada desse IA ao longo do período de análise.

Figura 1. Número de notificações de intoxicação por CBZ (Brasil, 2008 a 2018) e dados de comercialização desse ingrediente ativo (Brasil, 2009 a 2018).



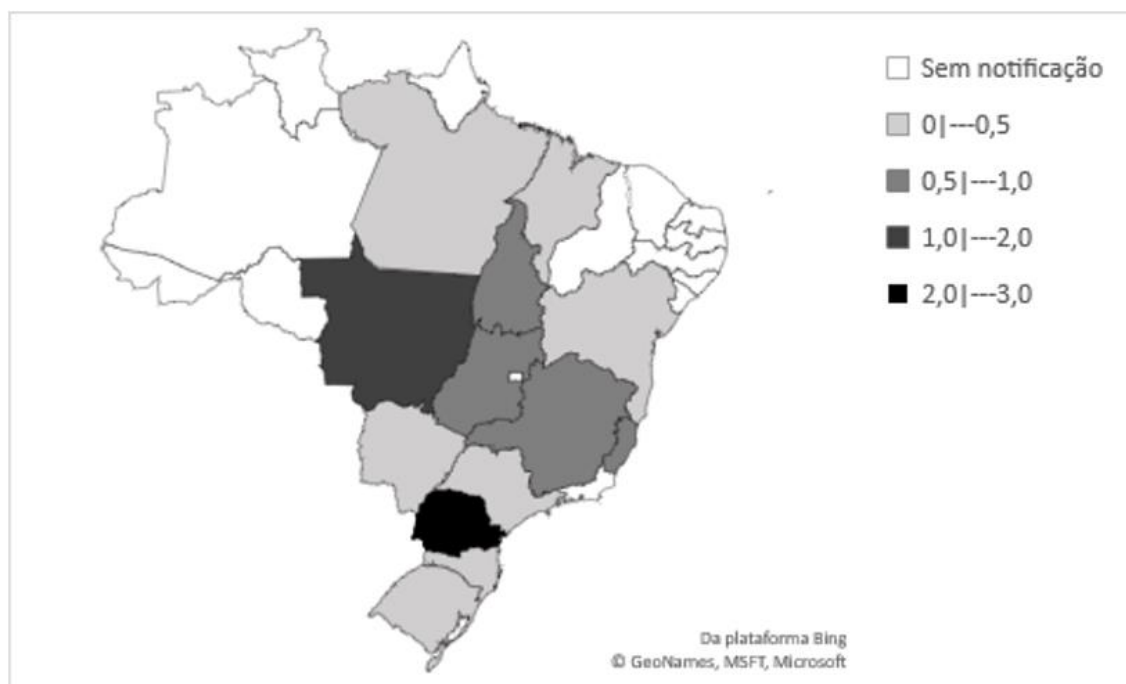
Em comparação aos demais IA reavaliados para os quais se avaliou as intoxicações agudas do SINAN, o número de notificações de intoxicação por CBZ ficou abaixo do Glifosato (2269), do 2,4-D (619) e do Acefato (141). E foi superior apenas à Abamectina e ao Tiram, com 64 e 29 notificações, respectivamente.

Como forma de dimensionar as UF mais afetadas pelo agravo, calculou-se a razão de notificações por UF com a seguinte fórmula:

$$\text{Razão de notificação: } \frac{(\text{n}^\circ \text{ de notificações de 2008 a 2018})}{(\text{Média da população residente de 2008 a 2018})}$$

A razão de notificação para o Brasil foi 0,36 notificações por milhão de habitantes. A Figura 2 apresenta o mapa do Brasil com as razões de notificação divididas em quatro faixas de valores. A UF que apresentou a maior razão de notificação foi o PR com 2,93 notificações por milhão de habitantes, seguido do MT (1,57) e GO (0,94).

Figura 2. Mapa com a distribuição das razões de notificação (por 1.000.000 de habitantes) por unidade da federação. Brasil, 2008 a 2018.



A descrição dos dados pessoais e epidemiológicos das notificações estão apresentadas na Tabela 5. Observa-se a predominância do sexo masculino (78%), na faixa etária de 20 a 49 anos (78%). O CBZ como agrotóxico de uso agrícola foi implicado em 97% das notificações. O restante foi associado à utilização de um agrotóxico de uso doméstico, apesar de não haver autorização para essa modalidade de uso no país.

Tabela 5. Descrição das notificações de intoxicação por CBZ segundo dados pessoais e epidemiológicos.
Brasil, 2008 a 2018.

Variáveis	N=72	%
Sexo masculino	56	78
Faixa etária (em anos)	N=72	100
< 1	2	3
01 a 04	1	1
05 a 09	0	0
10 a 14	1	1
15 a 19	4	6
20 a 29	21	29
30 a 39	18	25
40 a 49	17	24
50 a 59	6	8
≥60	2	3
Circunstância da exposição	N=72	100

Acidental	37	51
Uso habitual	22	31
Tentativa de suicídio	9	13
Erro de administração ou prescrição médica inadequada	2	3
Ingestão de alimento ou bebida	1	1
Violência / homicídio	1	1
Grupo do agente tóxico	N=72	100
Uso agrícola	70	97
Uso doméstico	2	3
Classificação final	N=72	100
Confirmado	40	56
Somente exposição	25	35
Evento adverso	3	4
Diagnóstico diferencial	2	3
Síndrome de abstinência	1	1
Ignorado	1	1

Do total de notificações, 82% corresponderam a uma circunstância acidental ou pelo uso habitual do produto. Porém, 13% apontaram como circunstância da exposição a tentativa de suicídio e 1% a violência/homicídio. Ainda, 35% relataram apenas exposição ao CBZ. Desse modo, a fim de serem analisados com maior detalhamento apenas os casos confirmados de intoxicações, foram utilizadas duas definições de casos, já descritas no subitem 2.2. As análises para cada uma dessas definições serão apresentadas separadamente a seguir.

Descrição por tempo, lugar e pessoa dos casos de intoxicação

Entre 2008 e 2018, 37 notificações, ou seja, aproximadamente 51% do total das notificações registradas no período, atenderam a definição de caso de intoxicação por CBZ. Observa-se, no gráfico da figura 3, um aumento bastante proeminente de 2008 a 2010, com um perfil oscilatório nos anos subsequentes.

Figura 3. Número de casos de intoxicação por CBZ (N=37) e ano de ocorrência. Brasil, 2008 a 2018.



A Tabela 6 apresenta a distribuição dos casos de intoxicação segundo as UF. Destacam-se os estados do Paraná, com 43,2%, e Mato Grosso e Minas Gerais, com 13,5% do total de casos.

Tabela 6. Distribuição dos casos de intoxicação por CBZ segundo a UF de residência do caso. Brasil, 2008 a 2018.

UF	N	%
Paraná	16	43,2
Mato grosso	5	13,5
Minas Gerais	5	13,5
São Paulo	3	8,1
Goiás	2	5,4
Pará	2	5,4
Bahia	1	2,7
Maranhão	1	2,7
Rio Grande do Sul	1	2,7
Tocantins	1	2,7
BRASIL	37	100

O Coeficiente de Incidência (CI) de intoxicação por CBZ no Brasil, de 2008 a 2018, segundo dados do SINAN, foi 0,19 casos para cada um milhão de habitantes. A distribuição dos CI está apresentada na Figura 4. Destacam-se os estados do Mato Grosso e Paraná, com 1,57 e 1,47 casos por milhão de habitantes, respectivamente.

Figura 4. Mapa com a distribuição dos CI (por 1.000.000 de habitantes) de intoxicações por CBZ por UF. Brasil, 2008 a 2018.



Os dados relacionados às características pessoais estão apresentados na Tabela 7. Em geral, os casos de intoxicação por CBZ se enquadram no seguinte perfil: homens, adultos, brancos, trabalhadores agrícolas registrados com carteira assinada, com nível de escolaridade muito baixo (59% indicaram ensino fundamental incompleto). Esse mesmo perfil epidemiológico foi observado para os casos confirmados de intoxicação com produtos à base de Glifosato, 2,4-D e Abamectina.

Tabela 7. Descrição dos casos de intoxicação por CBZ segundo os dados pessoais. Brasil, 2008 a 2018.

Variáveis	N	%
Sexo masculino	34	92
Faixa etária (em anos)	N=37	100
< 1	1	3
10 a 14	1	3
15 a 19	2	5
20 a 29	7	19
30 a 39	10	27
40 a 49	11	30
50 a 59	5	14
Raça/cor	N=32	86
Branca	19	59
Parda	12	38

Amarela	1	3
Escolaridade	N=29	78
Fundamental incompleto	17	59
Fundamental completo	8	28
Médio completo	3	10
Não se aplica	1	3
Ocupação	N=26	70
Trabalhador agrícola	20	77
Outros	6	23
Situação de trabalho	N=37	100
Empregado registrado com carteira assinada	17	46
Autônomo/conta própria	6	16
Empregado não registrado	3	8
Trabalho temporário	3	8
Empregador	1	3
Servidor público estatutário	1	3
Trabalhador avulso	1	3
Desempregado	1	3
Ignorado	4	11

Com relação aos dados de exposição ao agrotóxico, a descrição detalhada consta na Tabela 8. A maioria dos casos foi exposto na zona rural, durante o exercício do trabalho, como consequência de acidentes ou pelo uso habitual dos produtos, principalmente na lavoura de soja, nas atividades de pulverização e tratamento de sementes, em exposição aguda - principalmente pelas vias inalatória e dérmica. Os principais produtos implicados foram Derosal, Bendazol e Carbomax.

Tabela 8. Descrição dos casos de intoxicação por CBZ segundo as características da exposição.
Brasil, 2008 a 2018.

Variáveis	N	%
Zona de exposição	N=9	24
Rural	9	100
Local da exposição	N=36	97
Ambiente de Trabalho	32	89
Ambiente externo	2	6
Residência	1	3
Outro	1	3
Circunstância	N=37	100
Acidental	22	59
Uso habitual	15	41

Atividade exercida*	N=36	97
Pulverização	21	58
Tratamento sementes	11	31
Transporte	5	14
Diluição	8	22
Armazenamento	3	8
Colheita	3	8
Produção/formulação	1	3
Outras	1	3
Tipo de exposição	N=36	97
Aguda – única	26	72
Aguda – repetida	8	22
Crônica	1	3
Aguda sobre crônica	1	3
Via de exposição*	N=37	100
Inalatória	32	86
Dérmica	21	57
Digestiva	5	14
Ocular	4	11
Outras	1	3
Produto implicado	N=27	73
Derosal	10	37
Bendazol	6	22
Carbomax	5	19
Protreat	2	7
Portero	2	7
Novazin	1	4
Battle	1	4
Lavoura predominante	N=18	49
Soja	11	61
Feijão	2	11
Café	1	6
Citros	1	6
Arroz	1	6
Melão	1	6
Sementes em geral	1	6

*Permite mais de uma opção

Aqui, cabe destacar a ocorrência de dois casos de intoxicação nas lavouras de café e melão, nas quais não há aprovação para uso de CBZ. Além disso, conforme verificado para outros IAs reavaliados pela Anvisa (Glifosato, 2,4D e Abamectina), a atividade de pulverização foi a mais implicada nos casos de intoxicação por CBZ. Isso corrobora o entendimento de que essa atividade é a que oferece maior risco ocupacional e, portanto, requer medidas adequadas de mitigação de risco. Apenas um caso foi

relatado com ocorrência em ambiente residencial, o qual ocorreu em um adulto, exposto pelas vias cutânea e respiratória, a um produto de uso agrícola, durante as atividades de diluição e tratamento de sementes. Vale ressaltar que o uso domiciliar desse IA não está autorizado pela Anvisa.

A Tabela 9 apresenta as características dos casos de intoxicação. Observa-se que a maioria dos casos recebeu atendimento hospitalar, com necessidade de internação em 32% dos casos. O critério de confirmação foi clínico em 64% dos casos e clínico-epidemiológico em 36% deles. Quanto à evolução, 86% evoluíram para cura sem sequelas, 8% para cura com sequela e um caso resultou em óbito por intoxicação exógena. Esse caso ocorreu em 2009, no município de Itamaraju na Bahia, após exposição aguda - pelas vias inalatória e dérmica - de um homem de 46 anos, em seu ambiente de trabalho, durante o uso habitual do produto à base de CBZ – em associação com Glifosato e Metamidofós, na execução da atividade de pulverização na lavoura de café. Conforme disposto na RDC nº 1/2011, o Metamidofós teve seu uso proibido e sua monografia cancelada em 2012, devido a sua neurotoxicidade e imunotoxicidade, além de toxicidade para os sistemas endócrino, reprodutor e desenvolvimento embrionário. Portanto, considerando a baixa toxicidade aguda do Glifosato e do CBZ, é provável que o agravamento desse caso e o consequente óbito tenha sido decorrente da exposição associada ao Metamidofós. Isso pode justificar o elevado coeficiente de letalidade (2,7%), o qual é superior à letalidade associada a agrotóxico agrícola (1,3%) e a drogas de abuso (2,1%), sendo inferior apenas às intoxicações causadas por outros agentes tóxicos (4,7%) (Tabela 10).

Tabela 9. Descrição dos casos de intoxicação por CBZ segundo as características da intoxicação.
Brasil, 2008 a 2018.

Variáveis	N	%
Tipo de atendimento	N=37	100
Hospitalar	25	68
Ambulatorial	12	32
Internação hospitalar*	12	32
Critério de confirmação	N=36	97
Clínico	23	64
Clínico-epidemiológico	13	36
Evolução	N=36	97
Cura sem sequela	31	86
Cura com sequela	3	8
Óbito por intoxicação exógena	1	3
Ignorado	1	3

*Relativo ao número de atendimentos hospitalar e ambulatorial que evoluíram para internação.

Tabela 10. Evolução dos casos de intoxicações exógenas* e o coeficiente de letalidade segundo o agente tóxico. Brasil, 2007 – 2015.

Agente Tóxico	Cura sem seqüela	Cura com seqüela	Óbito por intoxicação Exógena	Óbito por outra causa	Perda de Seguimento	Total	Coeficiente de Letalidade (%)
Outro	6061	373	321	8	99	6862	4,7
Drogas de abuso	34804	2777	863	183	2556	41183	2,1
Agrotóxico agrícola	9893	214	136	19	89	10351	1,3
Agrotóxico em geral**	13980	297	153	24	149	14603	1,0
Prod. veterinário	1978	27	21	1	29	2056	1,0
Raticida	3637	35	38	-	59	3769	1,0
Medicamento	52433	439	337	194	625	54028	0,6
Prod. químico	10472	218	61	17	240	11008	0,6
Metal	393	219	3	8	52	675	0,4
Agrotóxico doméstico	3365	32	15	4	49	3465	0,4
Alimento e bebida	35211	624	104	48	327	36314	0,3
Planta tóxica	2833	24	8	2	43	2910	0,3
Agrotóxico saúde pública	722	51	2	1	11	787	0,3
Prod. uso domiciliar	15420	174	38	7	199	15838	0,2
Cosmético	2892	31	7	1	41	2972	0,2
Total	187268	5414	2029	509	4521	199741	1,0

Descrição por tempo, lugar e pessoa dos casos de tentativas de suicídios e tentativas de homicídio com utilização de CBZ

No período analisado, foram registrados 9 casos de tentativas de suicídio e um caso de tentativa de homicídio com uso do CBZ. Esse valor corresponde a 13,9% do total de notificações por esse IA, no mesmo período avaliado. Essa porcentagem é aproximadamente quatro vezes menor que o total de casos confirmados de intoxicação por CBZ, conforme definição utilizada neste parecer. Vale mencionar que a porcentagem de tentativas de suicídio por CBZ (12,5%) é inferior à de outros agrotóxicos que já tiveram esses dados avaliados pela Anvisa, tais como: Acefato (14,2%), 2,4-D (16,3%), Abamectina (25%) e Glifosato (40%).

O caso de tentativa de homicídio ocorreu em 2014 no município de Venda Nova do Imigrante (ES). A vítima – homem branco, 19 anos, trabalhador autônomo com ensino fundamental incompleto – foi exposta na residência, de forma aguda pela via digestiva. Recebeu atendimento hospitalar, sem necessidade de internação, e evoluiu para cura sem seqüela.

Quanto aos casos de tentativa de suicídio, a distribuição ao longo do período analisado foi bastante regular, variando de 0-2 casos por ano. O CI no Brasil foi 0,04 casos para cada um milhão de habitantes, no

período de 2008 a 2018. A Tabela 11 exibe a distribuição do número de casos e dos CI de tentativa de suicídio nos estados brasileiros.

Tabela 11. Distribuição do número de casos e dos CI de tentativa de suicídio por CBZ nas UF. Brasil, 2008 a 2018.

Unidade da Federação	N	CI
Goiás	1	0,16
São Paulo	1	0,02
Minas Gerais	3	0,15
Paraná	4	0,37
BRASIL	9	0,04

A Tabela 12 apresenta as características gerais dos casos de tentativas de suicídio por CBZ.

Tabela 12. Características gerais dos casos de tentativas de suicídio por CBZ. Brasil, 2008 a 2018.

Variáveis	N=9	%
Sexo masculino	5	56
Faixa etária (em anos)	N=9	100
15 a 19	1	11
20 a 29	5	56
30 a 39	1	11
40 a 49	1	11
60 ou mais	1	11
Raça/cor	N=9	100
Branca	7	78
Parda	2	22
Escolaridade	N=8	89
Fundamental incompleto	2	25
Fundamental completo	1	13
Médio completo	2	25
Ignorado	3	38
Zona de exposição	N=3	33
Rural	2	67
Urbana	1	33
Local da exposição	N=9	100
Residência	6	67
Ambiente externo	2	22
Ambiente de trabalho	1	11
Via da exposição*	N=7	100
Digestiva	7	100
Dérmica	1	14

Inalatória	1	14

*Permite mais de uma opção

O perfil dos casos de tentativa de suicídio por esse IA é: homem branco, na faixa etária de 20 a 29 anos. A exposição na zona rural foi mais predominante (67%), porém apenas 3 dos 9 casos forneceram essa informação. O nível de escolaridade ficou equiparado entre fundamental incompleto e médio completo (25% em cada categoria), porém 38% não informou esse dado.

A intoxicação foi confirmada para 6 casos (66,7%), dos quais 4 necessitaram de internação hospitalar. Quanto à evolução dos casos, 5 (83,3%) evoluíram para cura sem sequelas e 1 (16,7%) resultou em óbito por intoxicação exógena. Dos casos confirmados, 66,7% foram associados ao uso de CARBOMAX 500 SC.

DISCUSSÃO

A notificação de intoxicações exógenas, incluindo aquelas por agrotóxicos, é compulsória no Brasil desde 2011 (Portaria GM/MS nº 104, publicada em 26 de janeiro de 2011). Porém, desde 1994, é possível notificar intoxicações por agrotóxicos no SINAN (Malaspina e colaboradores, 2011). É importante reconhecer as limitações do uso dos dados de vigilância para decisões regulatórias, uma vez que: 1) há a possibilidade de equívocos na determinação das causas associadas a muitas notificações; 2) observa-se comumente erros de notificação e incoerências, particularmente em sistemas de vigilância de base nacional, os quais são alimentados por uma grande quantidade de notificadores e não são submetidos à avaliação rotineira. Contudo, uma análise geral das informações contidas no SINAN pode auxiliar, conjuntamente com outros dados de vigilância e estudos epidemiológicos, na compreensão de tendências e padrões, de modo a fornecer um panorama importante para determinar os riscos à saúde associados à exposição aguda aos agrotóxicos, bem como subsidiar a caracterização desse risco.

A fim de melhor contextualizar o resultado das análises das notificações obtidas no SINAN, descrita no item 3, aqui serão detalhadas as informações apresentadas no relatório da FT e das agências americana, canadense e europeia, como também os dados fornecidos pelo estudo de Boucaud-Maitre e colaboradores (2019). Primeiramente, a FT informou que, com base nos registros de intoxicação das empresas participantes, uma única notificação de intoxicação com produtos à base de CBZ foi registrada

nos últimos cinco anos, sendo este caso relacionado a utilização incorreta do produto. Em período anterior a esse, foram relatados cinco casos de intoxicação, sendo quatro relacionados à má utilização do produto e um à exposição aguda com efeito local. Nenhum dos relatos informou manifestação clínica grave, sendo descritos sintomas gástricos e irritação local. As vias de intoxicação mais relatadas foram a ocular, cutânea e inalatória.

Com relação aos dados das agências reguladoras, segundo a PMRA (2011), não houve registro de qualquer incidente associado ao CBZ a partir da data em que esse relato passou a ser obrigatório pelas empresas registrantes (2007) até a elaboração do relatório pela agência canadense (2010). A USEPA (2020) relatou que, no Sistema de dados de incidentes (*Incident Data System – IDS*) entre 2014 e 2019, não foram registrados incidentes envolvendo CBZ. Similarmente, relatou que, no Sistema de notificação de evento sentinela para risco ocupacional (*Sentinel Event Notification System for Occupational Risk – SENSOR*) entre 2010 e 2015, nenhum incidente envolvendo CBZ foi registrado. Aqui, vale ressaltar que o uso agrícola desse IA não é aprovado no Canadá ou nos Estados Unidos, sendo autorizado apenas para uso em plantas ornamentais e como preservativo industrial. A EFSA (2010) citou somente um relatório de incidentes de intoxicação investigados pelas Inspetorias Agrícolas e de Fábrica HM, entre 1988 e 1991, o qual compreende 8 casos, sendo 4 considerados como confirmados, com queixas de irritação nos olhos e no rosto.

Por fim, Boucaud-Maitre e colaboradores (2019) relatou a ocorrência de 11 casos (2,7%) de intoxicação por CBZ no período de 2012 – 2016 na França, sendo o nono maior número de casos dentre os 30 IA de agrotóxicos avaliados, todos com proibição de comercialização nesse país. Com relação à circunstância da exposição, todos os casos envolvendo o CBZ foram exclusivamente não intencionais, sendo 3 dos 11 casos relacionados a acidentes ocupacionais.

Assim, com base nas informações fornecidas pela FT, pelos relatórios das agências reguladoras internacionais e pelo estudo da literatura avaliado, verifica-se que há, de fato, um baixo número de casos de intoxicação associado à exposição ao CBZ, conforme constatado pela análise das notificações no SINAN (37 casos entre 2008 e 2018). Isso está de acordo com a baixa toxicidade aguda desse IA, pelas vias oral, cutânea e inalatória.

CONCLUSÕES

Com base nos dados de monitoramento em água e alimentos, nos relatórios das principais agências reguladoras de agrotóxicos e nos estudos obtidos na busca sistemática, conclui-se que há um potencial relevante de exposição humana dietética, por meio do consumo de alimentos e ingestão de água, e ocupacional, para residentes e transeuntes, pelas vias cutânea e inalatória. Esses cenários de potencial risco à população brasileira ensejam preocupação uma vez que há indícios de carcinogenicidade, mutagenicidade e toxicidade reprodutiva associados ao CBZ. Esses desfechos serão aprofundados em pareceres específicos.

A princípio, as amostras de controle e vigilância da água coletadas para fins de monitoramento, bem como os resultados encontrados na literatura científica estavam abaixo do limite estabelecido pela Portaria nº 2.914/2011 (VMP=120,0 µg/L). Contudo, podem ocorrer alterações nas doses de referência após conclusão da reavaliação toxicológica do CBZ e os níveis encontrados passarem a ser considerados relevantes para a saúde humana. Além disso, foi verificado que algumas UF não coletaram amostras, mesmo que o produto tenha sido comercializado em seus territórios. A Portaria permite que as amostras deixem de ser coletadas desde que se tenha um histórico de amostras satisfatórias, o que não ocorreu. Temos também que um número significativo de resultados não apresentaram os LD e LQ para validação da metodologia analítica, o que impossibilita conclusões mais assertivas a partir das análises.

Com relação à análise dos dados de intoxicação exógena, as notificações de intoxicação por CBZ apresentaram um perfil oscilatório ao longo dos anos (2008-2018), sem relação aparente com o perfil de vendas desse IA. Do total de notificações, 51% atenderam a definição de caso de intoxicação por CBZ (37 casos), com CI no Brasil de 0,19 casos/milhão habitantes. Os estados com maior CI foram Mato Grosso e Paraná, com 1,57 e 1,47 casos/milhão habitantes, respectivamente. O perfil epidemiológico dos casos de intoxicação foi: homens, adultos, brancos, trabalhadores agrícolas com nível de escolaridade muito baixo, tendo a maioria ensino fundamental incompleto. A exposição ocorreu principalmente no ambiente de trabalho, com uso acidental do produto, na atividade de pulverização, pela via inalatória e dérmica, na lavoura de soja. O principal produto implicado foi o Derosal.

Os casos foram de gravidade leve, com evolução para cura sem sequelas em 86% deles. Verificou-se a ocorrência de dois casos de intoxicação nas lavouras de café e melão, nas quais não há aprovação para uso de CBZ. Houve um caso, no ano de 2009, que evoluiu para óbito por intoxicação exógena, provavelmente atribuído à exposição concomitante ao Metamidofós – ingrediente ativo cujo uso está proibido pela Anvisa

desde 2012. Do total de notificações, 13,9% corresponderam a tentativas de suicídio (9 casos) e de homicídio (1 caso) com uso do CBZ. O perfil e a evolução das tentativas de suicídio são muito semelhantes aos dos casos de intoxicação já mencionados acima. A baixa ocorrência de casos de intoxicação por CBZ no Brasil, com baixa gravidade dos casos existentes, está alinhada ao cenário descrito pelas agências europeia, americana e canadense, como também ao que foi relatado pela FT e pelo estudo científico avaliado. O que pode ser explicado pela baixa toxicidade aguda desse IA pelas vias mais relevantes de exposição humana.

RECOMENDAÇÕES

As análises apresentadas devem ser avaliadas em conjunto com os demais resultados da reavaliação do CBZ, a fim de auxiliar no embasamento de possíveis medidas restritivas ou de mitigação de riscos para os produtos à base desse IA no Brasil.

A Anvisa deve comunicar ao Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde (DANTPS) da Secretaria de Vigilância em Saúde sobre a necessidade de incluir na ficha de notificação de intoxicações exógenas os sinais e sintomas da intoxicação, bem como mais informações sobre a circunstância da exposição, quando for ocupacional, como uso de equipamento de proteção individual e tipo de aplicação no momento da exposição. Com isso, as intoxicações podem ser mais bem qualificadas e analisadas.

Caso o CBZ seja mantido no país, também é necessário discutir com a Coordenação Geral de Vigilância em Saúde Ambiental (CGVAM) sobre a motivação da não realização das análises em alguns territórios e sobre a falta de informação dos parâmetros de validação (LD e LQ), bem como possíveis medidas a serem adotadas para contornar essas situações.

A Anvisa deve divulgar amplamente este relatório, em especial para o Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, para todas as VISAs estaduais e municipais, para o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, para o Ministério do Trabalho e para os órgãos estaduais responsáveis pela fiscalização da venda e prescrição e pela capacitação sobre uso de agrotóxicos.

REFERÊNCIAS

ANASTASSIADES, Michelangelo; SCHWACK, Wolfgang. **Analysis of carbendazim, benomyl, thiophanate methyl and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in fruits and vegetables after supercritical fluid extraction.** Journal of Chromatography A, [S. l.], v. 825, n. 1, p. 45–54, 1998. DOI: 10.1016/S0021-9673(98)00691-8.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Monografia C-24, do ingrediente ativo Carbendazim.** 2020. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/c24.pdf/a019eb91-b52d-492d-8140-ae82f54d5698>. Acesso em 18/02/2020.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos - PARA – **Relatório das análises de amostras monitoradas no período de 2013 a 2015.** Brasília, 2016.

Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos>. Acesso em 11/01/2021.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos - PARA – **Relatório das análises de amostras monitoradas no período de 2017 a 2018.** Brasília, 2019.

Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos>. Acesso em 11/01/2021.

APMVA. Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. Australia Chemical Review Program. **Human Health Risk Assessment of Carbendazim.** 2009.

ARORA, Sumitra; MUKHERJI, Irani; KUMAR, Aman; TANWAR, R. K. Pesticide residue analysis of soil, water, and grain of IPM basmati rice. **Environmental Monitoring and Assessment**, Índia, v. 186, n. 12, p. 8765–8772, 2014. DOI: 10.1007/s10661-014-4042-9.

ARRUDA, Gilberto J.; LIMA, Fábio De; CARDOSO, Claudia A. L. Ultrasensitive determination of carbendazim in water and orange juice using a carbon paste electrode. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, [S. l.], v. 51, n. 8, p. 534–539, 2016. DOI: 10.1080/03601234.2016.1170550.

Boucaud-Maitre D, Rambourg MO, Sinno-Tellier S, Puskarczyk E, Pineau X, Kammerer M, Bloch J, Langrand J. **Human exposure to banned pesticides reported to the French Poison Control Centers: 2012-2016.** Environ Toxicol Pharmacol. 2019 Jul;69:51-56. doi: 10.1016/j.etap.2019.03.017. Epub. PMID: 30953934. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Anvisa. RDC nº 221, de 28 de março de 2018. **Estabelece os critérios e os procedimentos para a reavaliação toxicológica de ingredientes ativos de agrotóxicos no âmbito da Anvisa**. Dou de 29/03/2018 (nº 61, Seção 1, pág. 228).

CALDAS, Sergiane Souza; BOLZAN, Cátia Marian; GUILHERME, Juliana Rocha; SILVEIRA, Maria Angelis Kisner; ESCARRONE, Ana Laura Venquiaruti; PRIMEL, Ednei Gilberto. Determination of pharmaceuticals, personal care products, and pesticides in surface and treated waters: Method development and survey. **Environmental Science and Pollution Research**, [S. l.], v. 20, n. 8, p. 5855–5863, 2013. DOI: 10.1007/s11356-013-1650-9.

CHITESCU, Carmen Lidia; KAKLAMANOS, George; NICOLAU, Anca Ioana; STOLKER, Alida Adriana Maria Linda. High sensitive multiresidue analysis of pharmaceuticals and antifungals in surface water using U-HPLC-Q-Exactive Orbitrap HRMS. Application to the Danube river basin on the Romanian territory. **Science of the Total Environment**, [S. l.], v. 532, p. 501–511, 2015. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2015.06.010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.010>.

CHIȚESCU, Carmen Lidia; NICOLAU, Anca Ioana. Preliminary survey of pharmaceutical residues in some important Romanian rivers. **Toxicological and Environmental Chemistry**, [S. l.], v. 96, n. 9, p. 1333–1345, 2014. DOI: 10.1080/02772248.2015.1005092.

EFSA. European Food Safety Authority. **Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance carbendazim**. 2010

HOUBEN, Georg J.; EISENKÖLBL, Alicia; DOSE, Eduardo J.; VERA, Sofia. The impact of high-intensity no-till agriculture on groundwater quality in the subtropical Capiibary catchment, SE Paraguay. **Environmental Earth Sciences**, [S. l.], v. 74, n. 1, p. 479–491, 2015. DOI: 10.1007/s12665-015-4055-x.

IBAMA. **Relatório de comercialização de agrotóxicos**. Disponível em <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>. Acesso em 18/02/2020.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **IBGE Cidades - Panorama**. [s.d.]. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/panorama>. Acesso em: 24 fev. 2021a.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **IBGE - Educa | Crianças | Como são os domicílios dos brasileiros?** [s.d.]. Disponível em: <https://educa.ibge.gov.br/criancas/brasil/nosso-povo/20825-como-sao-os-domicilios-dos-brasileiros.html>. Acesso em: 24 fev. 2021b.

Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (JMPR). **Pesticide residues in food - 1998**. Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group. Part I, residues, volume I.

KALOGRIDIS, Eleni Chrysoula; CHRISTOPHORIDIS, Christophoros; BIZANI, Erasmia; DRIMAROPOULOU, Garyfallia; FYTIANOS, Konstantinos. Part I: Temporal and spatial distribution of multiclass pesticide residues in lake waters of Northern Greece: Application of an optimized SPE-UPLC-MS/MS pretreatment and analytical method. **Environmental Science and Pollution Research**, [S. l.], v. 21, n. 12, p. 7239–7251, 2014. DOI: 10.1007/s11356-014-2793-z.

Lesmes-Fabian C, Binder CR. **Pesticide flow analysis to assess human exposure in greenhouse flower production in Colombia**. Int J Environ Res Public Health. 25;10(4):1168-85. doi: 10.3390/ijerph10041168. PMID: 23528812; PMCID: PMC3709311. 2013.

Lima, C.A.B.; Grützmacher, D.D.; Krüger, L.R.; Grützmacher, A.D.. **Diagnóstico da exposição ocupacional a agrotóxicos na principal região produtora de pêssego para indústria do Brasil**. Ciênc. rural;39(3): 900-903, maio-jun. 2009.

López A, Yusà V, Muñoz A, Vera T, Borràs E, Ródenas M, Coscollà C. **Risk assessment of airborne pesticides in a Mediterranean region of Spain**. Sci Total Environ. 1;574:724-734. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.08.149. Epub 2016 Oct 14. PMID: 27664759. 2017.

MALASPINA, F.G.; LISE, M.L.Z.; BUENO, P.C. **Perfil epidemiológico das intoxicações por agrotóxicos no Brasil, no período de 1995 a 2010**. Cad. Saúde Colet. 2011; 19(4): 425-34.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Diretriz Nacional do Plano de Amostragem da Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://editora.saude.gov.br>. Acesso em: 28 dez. 2020.

MONTAGNER, Cassiana C.; VIDAL, Cristiane; ACAYABA, Raphael D.; JARDIM, Wilson F.; JARDIM, Isabel C. S. F.; UMBUZEIRO, Gisela A. Trace analysis of pesticides and an assessment of their occurrence in surface and drinking waters from the State of São Paulo (Brazil). **Analytical Methods**, [S. l.], v. 6, n. 17, p. 6668–6677, 2014. DOI: 10.1039/c4ay00782d.

Nougadère A, Sirot V, Cravedi JP, Vasseur P, Feidt C, Fussell RJ, Hu R, Leblanc JC, Jean J, Rivière G, Sarda X, Merlo M, Hulin M. **Dietary exposure to pesticide residues and associated health risks in infants and young children - Results of the French infant total diet study**. Environ Int. 137:105529. doi: 10.1016/j.envint.2020.105529. PMID: 32045778. 2020.

Peng FJ, Hardy EM, Mezzache S, Bourokba N, Palazzi P, Stojiljkovic N, Bastien P, Li J, Soeur J, Appenzeller BMR. **Exposure to multiclass pesticides among female adult population in two Chinese cities revealed by hair analysis.** Environ Int. 138:105633. doi: 10.1016/j.envint.2020.105633. Epub 2020 Mar 14. PMID: 32179318. 2020.

Pennycook FR, Diamand EM, Watterson A, Howard CV. **Modeling the dietary pesticide exposures of young children.** Int J Occup Environ Health. 10(3):304-9. doi: 10.1179/oeh.2004.10.3.304. PMID: 15473085. 2004.

PMRA. Health Canada Pest Management Regulatory Agency. **Proposed Registration Decision PRD2011-04. Carbendazim.** 2011.

RADOVIĆ, Tanja; GRUJIĆ, Svetlana; PETKOVIĆ, Anđelka; DIMKIĆ, Milan; LAUŠEVIĆ, Mila. Determination of pharmaceuticals and pesticides in river sediments and corresponding surface and ground water in the Danube River and tributaries in Serbia. **Environmental Monitoring and Assessment**, [S. l.], v. 187, n. 1, 2014. DOI: 10.1007/s10661-014-4092-z.

SILVA, Célia Maria Maganhoto de Souza e; MELO, Itamar Soares De. **Biodegradação de fungicidas benzimidazóis**JaguariúnaEmbrapa Meio Ambiente, , 1997. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/catalogo/REC000fdqbaqfu02wx5eo0a2ndxy4yfjvnq.html.

TEKLU, Berhan M.; HAILU, Amare; WIEGANT, Daniel A.; SCHOLTEN, Bernice S.; VAN DEN BRINK, Paul J. Impacts of nutrients and pesticides from small- and large-scale agriculture on the water quality of Lake Ziway, Ethiopia. **Environmental Science and Pollution Research**, [S. l.], v. 25, n. 14, p. 13207–13216, 2018. DOI: 10.1007/s11356-016-6714-1.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. **Thiophanate-methyl and Carbendazim (MBC). Human health assessment scoping document in support of registration review.** 2014.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. **Thiophanate-Methyl and Carbendazim: Draft Human Health Risk Assessment.** Memorandum Decision No. 452566. DP D452566. March 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Larissa Muratori**

Aguiar, Especialista em Regulação e Vigilância Sanitária, em 09/07/2021, às 21:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/D10543.htm.



Documento assinado eletronicamente por **Thiago Santana dos Santos, Técnico em Regulação e Vigilância Sanitária**, em 13/07/2021, às 10:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/D10543.htm.



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Roberto Coradi de Freitas, Coordenador(a) de Reavaliação**, em 15/07/2021, às 19:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/D10543.htm.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.anvisa.gov.br/autenticidade>, informando o código verificador **1392941** e o código CRC **4736741E**.

Referência: Processo nº 25351.945793/2019-57

SEI nº 1392941

Criado por larissa.aguiar, versão 48 por larissa.aguiar em 09/07/2021 21:53:00.

**PARECER Nº 10/2021/SEI/CREAV /GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA**

Processo nº 25351.945793/2019-57

Interessado: Coordenação de Reavaliação, Gerência de Monitoramento e Avaliação do Risco, GGTOX

Assunto: **Análise da toxicocinética, toxicidade aguda, neurotoxicidade, imunotoxicidade e outros efeitos à saúde relacionados ao Carbendazim**

Avalia o relatório apresentado pela Força-tarefa Carbendazim, os relatórios de outras agências reguladoras de agrotóxicos e os estudos obtidos na busca sistemática acerca dos seguintes tópicos: toxicocinética, toxicidade aguda, neurotoxicidade, imunotoxicidade e outros efeitos à saúde associados à exposição ao Carbendazim; como parte da reavaliação toxicológica desse ingrediente ativo, conforme RDC nº 221, de 28 de março de 2018.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT: Alanina aminotransferase

AST: Aspartato aminotransferase

Anvisa: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APMVA: *Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority* (Autoridade Australiana de Pesticidas e Medicina Veterinária).

2-AB: 2-aminobenzimidazol

CBZ: Carbendazim

DNT: *Developmental neurotoxicity* (Neurotoxicidade para o desenvolvimento)

DRfa: Dose de referência aguda

EFSA: *European Food Safety Authority* (Autoridade Europeia para Segurança dos Alimentos)

FAO: *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação)

FOB: *Functional observation battery* (Bateria de observação funcional)

FT: Força-tarefa Carbendazim

GHS: *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals* (Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos)

GH: *Growth Hormone* (Somatotropina, Hormônio do crescimento)

GPT: Alanina aminotransferase

IA: Ingrediente ativo

5-HBC: 5-hidroxi-1H-benzimidazol-2-yl-carbamato

LMR: Limite máximo de resíduos

LOAEL: *Lowest Observed Adverse Effect Level* (Nível mais Baixo de Efeito Adverso Observado)

NOAEL: *No Observed Adverse Effect Level* (Nível de Efeito Adverso não Observado)

NUS: Nitrogênio da ureia no sangue

NT: Neurotoxicidade

PMRA: *Health Canada's Pest Management Regulatory Agency* (Agência Reguladora de Controle de Pragas Canadense)

PoD: *Point of Departure* (Ponto de partida)

SNC: Sistema nervoso central

SNP: Sistema nervoso periférico

TGI: Trato gastrointestinal

TM: Tiofanato-Metílico

T₃: Triiodotironina

T₄: Tiroxina

TR: Toxicidade reprodutiva

TSH: *Thyroid stimulating hormone* (hormônio estimulador da tireoide)

UE: União Europeia

USEPA: *United States Environmental Protection Agency* (Agência de Proteção Ambiental Americana)

WoE: *Weight of evidence* (peso da evidência)

RESUMO

O Carbendazim (CBZ) é um fungicida sistêmico de amplo espectro, pertencente à classe dos benzimidazóis. Na análise dos parâmetros toxicocinéticos, verificou-se que esse ingrediente ativo (IA) possui rápida absorção pelo trato gastrointestinal (TGI), com elevada biodisponibilidade (85% após dose única via oral). É extensamente metabolizado pelo sistema microsomal hepático, formando como principal metabólito o 5-hidroxi-carbendazim (5-HBC). Em menor escala (2-4%), ocorre a formação de 2-aminobenzimidazol (2-AB), no plasma sanguíneo e outros órgãos. Não há relato de acumulação tecidual do CBZ – ou de seus metabólitos. Maiores níveis foram observados no fígado, seguido por rins, pele, TGI, sangue e pulmões. Embora os testículos sejam um órgão-alvo do CBZ, não houve detecção de resíduos nesse órgão. Não foi relatada diferença mensurável quanto ao perfil de metabólitos do CBZ em ratos e camundongos, embora tenha ocorrido a saturação do mecanismo de desintoxicação hepática de forma mais pronunciada em camundongos, quando tratados com altas doses (300 mg/kg p.c./dia) por 29 dias, o que acarretou sinais de hepatotoxicidade. Em ratos, por outro lado, observou-se um aumento dessa capacidade de detoxificação com a exposição repetida, com maior taxa de eliminação. A etapa de excreção ocorre de forma rápida, predominantemente pela urina; e pelas fezes com o aumento da dose. A maioria dos metabólitos foi detectada na forma conjugada. Apresenta baixa toxicidade, em caso de exposição aguda, pelas vias oral, cutânea e inalatória. Não apresenta potencial para causar irritação cutânea ou ocular, nem é sensibilizador cutâneo. Os principais efeitos relatados após exposição aguda via oral foram perda de peso, redução no consumo de alimentos e comprometimento de alguns órgãos-alvo, tais como: fígado (alterações bioquímicas, reação inflamatória, hipertrofia dos hepatócitos, infiltração periportal); rins (lesões degenerativas) e testículos (azoospermia, degeneração celular); além de mortalidade em ratos. Com base nos dados disponíveis, conclui-se que ocorre toxicidade testicular após exposição única via oral ao CBZ, em doses ≥ 50 mg/kg, o que embasa a sua classificação na Categoria 1 em função da toxicidade para órgão-alvo específico por exposição única, conforme previsto na Seção 2 do Anexo IV da RDC nº 294/ 2019. Ainda, não foram relatadas evidências de efeitos neurotóxicos nos estudos de toxicidade oral aguda e tardia, nem de toxicidade cutânea. Entretanto, alguns efeitos de neurotoxicidade para o desenvolvimento foram identificados no estudo de toxicidade reprodutiva de uma geração estendida. Não foram relatadas evidências de efeitos imunotóxicos em doses relevantes para exposição humana. Nos estudos de exposição repetida, em roedores e cães, os principais órgãos-alvo afetados foram testículos, fígado, rins e tireoide, sendo o cão a espécie mais sensível, com NOAEL de 7,5 mg/kg p.c./dia a partir de dois estudos crônicos via oral. Outros efeitos indicados foram redução de

peso corporal e alterações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos. Por fim, em concordância com a classificação proposta pela FT, e com base na Seção 3 do Anexo IV da RDC nº 294/ 2019, conclui-se que o CBZ pode ser enquadrado na Categoria 2, em função da toxicidade para órgão-alvo específico por exposição repetida, com base na toxicidade hepática evidenciada nos estudos de 90 dias em ratos pela via oral, com menor LOAEL de 16 mg/kg p.c./dia.

1. INTRODUÇÃO

O CBZ é o primeiro IA a ser reavaliado a partir dos critérios de priorização com base no risco à saúde humana, etapa do processo de reavaliação prevista no inciso I, Art 3º da RDC nº 221, de 28 de março de 2018. Trata-se de um fungicida sistêmico de amplo espectro, cuja ação pesticida decorre da inibição da polimerização de β -tubulina, o que impede a formação adequada do fuso acromático e, consequentemente, prejudica o processo de divisão celular (mitose e meiose).

Esse IA é um metabólito dos fungicidas Tiofanato-metílico (TM), o qual também possui registro no Brasil; e Benomil, cujo uso foi proibido no país. Tendo em vista a grande instabilidade do Benomil *in vivo* e em solução aquosa no ambiente, o que acarreta sua rápida hidrólise em CBZ; além da similaridade no metabolismo e nos perfis toxicológicos desses dois compostos; nos relatórios de algumas agências (USEPA, 2020; PMRA, 2011), estudos com Benomil foram incluídos na análise de certos desfechos toxicológicos, quando da ausência de estudos conduzidos especificamente com o CBZ, conforme será detalhado nos itens específicos deste parecer.

A reavaliação toxicológica desse IA foi motivada pela preocupação com os aspectos toxicológicos referentes à mutagenicidade, à toxicidade reprodutiva e para o desenvolvimento, os quais são proibitivos de registro, conforme a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, o Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002 e a RDC nº 294, de 29 de julho de 2019. Assim, esses aspectos serão o foco da reavaliação, porém, demais aspectos considerados relevantes para a avaliação toxicológica também serão incluídos nas análises.

Como parte do processo de reavaliação desse IA, foi conduzida uma busca sistematizada da literatura científica para identificar estudos que relatam toxicidade associada à exposição ao CBZ, a fim de integrar esses dados aos estudos regulatórios disponibilizados pelas empresas registrantes, por meio de uma análise de peso da evidência (WoE).

Neste parecer, constam as análises, efetuadas pela CREA, dos estudos científicos selecionados na busca sistematizada, como também das evidências fornecidas pelo relatório apresentado pela FT e pelos relatórios das agências reguladoras internacionais, quanto aos parâmetros toxicocinéticos, toxicidade aguda, neurotoxicidade, imunotoxicidade e outros efeitos à saúde associados à exposição ao CBZ.

2. TOXICOCINÉTICA

2.1. Absorção

O CBZ sofre rápida absorção pelo trato gastrointestinal, com biodisponibilidade de 85% após dose única (12 mg/kg p.c.) via oral de ^{14}C -carbendazim, valor calculado com base na excreção urinária do composto total e de seus metabólitos 5-HBC e 2-AB (Krechniak & Klosowska, 1986). Após administração oral de ^{14}C -carbendazim em ratos machos e fêmeas, o pico plasmático (C_{max} = 1,03 $\mu\text{g/ml}$) foi atingido entre 15-40 minutos, nas doses de 3 e 12 mg/kg p.c.. Após alta dose (300 mg/kg p.c.), a absorção foi significativamente mais lenta, com pico de concentração plasmática de 16-17 $\mu\text{g/mL}$, alcançado entre 0,4 e 4h. Esses mesmos níveis sanguíneos foram alcançados após administração diária pela dieta, por 14 a 29 dias. Sob as mesmas condições experimentais, camundongos exibiram um valor similar de C_{max} na menor dose, enquanto na dose de 300 mg/kg p.c. o C_{max} foi superior (36-53 $\mu\text{g/ml}$) (Kellner e Eckert, 1983 apud FAO/WHO, 1998; EFSA, 2009).

Em outro estudo, ratos do sexo masculino e feminino foram tratados com ^{14}C - carbendazim via gavagem, agrupados em três regimes de dosagem distintos: 1) Dose baixa: dose oral única de 50 mg/kg p.c.; 2) Dose baixa pré-condicionada: dose oral de 50 mg/kg após pré-tratamento por 14 dias com CBZ não radiomarcado (v.o.; 50 mg/kg p.c.); 3) Dose alta: dose oral única de 1.000 mg/kg p.c.. Nos três grupos, a excreção do composto radiomarcado, via urina e fezes, foi monitorada a cada 12h por 72h. Verificou-se que a eficiência de absorção do CBZ foi de aproximadamente 80% da dose administrada, em todos os esquemas de dose, valor calculado com base no nível de radioatividade quantificado na urina e nas fezes (somatória de todos os metabólitos e CBZ livre) (Monson, 1990 apud FAO/WHO, 1998).

Jia e colaboradores (2003), após administração de 1.000mg/kg de ^{14}C -carbendazim via oral a camundongos, enquadra seu perfil cinético no modelo de dois compartimentos com eliminação sérica de primeira ordem, ou seja, de modo exponencial, com a C_{max} de 18,4 $\mu\text{g/ml}$ alcançada em um T_{max} de 2h. Assim, a maior parte da dose de CBZ é absorvida rapidamente, mas uma pequena fração tem absorção lenta após o pico plasmático. Os autores também discutiram a extensão da absorção oral em função da solubilidade pH-dependente em diferentes seções do TGI, com absorção aumentada no estômago e duodeno, em valores de pH em torno de 4-5, no qual há aumento da solubilidade desse composto.

2.2. Distribuição

As agências reguladoras internacionais relatam baixo potencial de acumulação tecidual do CBZ ou de seus metabólitos (APMVA, 2009; PMRA, 2010; USEPA, 2020; FAO/WHO, 1998). Em um estudo de autorradiografia de corpo inteiro, conduzido em ratos e camundongos, foram detectados apenas traços do composto radiomarcado, em 12h após administração. Verificou-se, após administração de 3mg/kg de ^{14}C -carbendazim, um padrão de distribuição para o fígado e rins, em dez minutos após dose oral (FAO/WHO, 1998). Entretanto, segundo a PMRA (2011), o nível de resíduos nos tecidos foi mínimo, com detecção de somente 0,3% e 0,08% no fígado, em sete e em 14 dias, respectivamente, pós-administração de dez doses diárias (2 mg/kg p.c.). Ainda, os níveis sanguíneos e em outros órgãos (rins, tecido adiposo, músculos e gônadas) não excederam 0,03% da dose administrada, em sete dias pós-administração dos 10 dias de tratamento.

Similarmente, a USEPA (2020) também relatou que não foi observada bioacumulação tecidual, com permanência nos tecidos de somente 1% e menos de 0,7% da dose, após 72 horas de administração da menor e maior dose, respectivamente. Maiores níveis foram observados no fígado, seguido por rins, pele, TGI, sangue e pulmões. Embora os testículos sejam um órgão-alvo do CBZ, não houve detecção de resíduos nesse órgão.

Jin e colaboradores (2015) realizaram dosagem de resíduos de CBZ no fígado, intestino e fezes de camundongos, tratados via oral com 100 e 500 mg/kg p.c./dia por 28 dias. Verificou-se um aumento dose-dependente nos níveis de CBZ nesses três locais avaliados. O conteúdo de CBZ nos grupos tratados com 100 e 500 mg/kg atingiu 0,05 e 0,38 mg/g de peso hepático, respectivamente. Quanto aos resíduos de CBZ nas fezes, seus níveis nos grupos tratados com 100 e 500 mg/kg alcançaram 0,19 e 0,29 mg/g de peso fecal, respectivamente. O conteúdo de CBZ no intestino foi similar ao do fígado e o nível fecal de CBZ foi cerca de 1000 vezes maior que no fígado ou intestino. Esses dados indicam que apenas uma pequena parte do CBZ administrado foi absorvida e transferida para o fígado e intestino, sugerindo que a maior parte pode permanecer no TGI até a eliminação nas fezes.

2.3. Metabolismo

A rota principal de metabolização do CBZ, mediada principalmente pelas enzimas do citocromo P-450 (CYP-450), consiste na oxidação do anel fenílico, com posterior hidroxilação na posição C-5, formando como principal metabólito o 5-hidroxi-carbendazim (5-HBC); e, em menor frequência, na posição C-6, com a formação de 5,6-di-hidroxi-carbendazim. Esses derivados hidroxilados, em seguida, podem passar por etapas de biotransformação – conjugação com sulfato ou glicuronídeo. Além disso,

reações no nitrogênio do anel imidazólico podem formar os derivados N-óxido. Em menor escala (2-4%), o CBZ é convertido em 2-aminobenzimidazol (2-AB), pela ação de enzimas hidrolíticas presentes no plasma sanguíneo e outros órgãos (PMRA, 2011).

Krechniak & Klosowska (1986) descreveram que, em 15 minutos após administração i.v. de ¹⁴C-carbendazim, os metabólitos 5-HBC e 2-AB atingem concentração máxima nos rins e fígado, evidenciando que as atividades enzimáticas desses órgãos exercem um papel significativo no processo de metabolização. Adicionalmente, após 2h, há predominância de CBZ inalterado no sangue (82,8%), e do metabólito 5-HBC no fígado (80,6%) e nos rins (87,5%), com detecção de 2-AB apenas em pequenas concentrações (6,8 – 11,8%) nesses três locais avaliados. Nesse mesmo estudo, também foi avaliada a presença de ¹⁴C-carbendazim nas frações subcelulares hepáticas em 90 minutos após administração oral, quando houve o pico de concentração nesse órgão. Verificou-se que a disposição de ¹⁴C-carbendazim independe do conteúdo lipídico dessas frações e que o 5-HBC foi o principal componente em cada uma delas, com maior concentração (64%) no citosol. A maior concentração relativa de 2-AB (34%) foi nos microsomas e de CBZ inalterado (33%) na mitocôndria.

Em um estudo comparativo da metabolização em ratos e camundongos, esses animais foram tratados com uma dose única via oral de 3mg/kg ou 300mg/kg p.c. de ¹⁴C-carbendazim. Verificou-se que os mesmos metabólitos foram eliminados pela urina, com diferença apenas quantitativa entre as espécies (PMRA, 2011). Adicionalmente, esse estudo relatou que a administração prévia de CBZ não marcado (via dieta; em ratos: 50 e 500 mg/kg; em camundongos: 30 e 300 mg/kg), por 14 ou 29 dias consecutivos, não alterou o perfil qualitativo dos metabólitos. Entretanto, em camundongos, a administração da maior dose por 29 dias saturou a capacidade de detoxificação hepática, com sinais de hepatotoxicidade. Em ratos, por outro lado, observou-se um aumento dessa capacidade de detoxificação com a exposição repetida, com maior taxa de eliminação (Dorn et al., 1983 apud FAO/WHO, 1998; EFSA, 2009; APMVA, 2009).

A PMRA (2011) descreveu, com base em estudos de indução de enzimas hepáticas em ratos e camundongos, que não há diferença mensurável entre essas espécies animais com relação ao metabolismo do CBZ, embora tenha ocorrido a saturação do mecanismo de desintoxicação de forma mais pronunciada em camundongos tratados com altas doses, conforme exposto acima. A desintoxicação e eliminação de CBZ e seus metabólitos ocorreram mais rapidamente em ratos do que em camundongos, conforme refletido pelo aumento do conteúdo de glutathione hepática e aumento da atividade enzimática de fase II em ratos.

No estudo de Monson et al (1990) já descrito no item 4.1, identificou-se o 5-HBC-S (21-43% da dose administrada) como principal metabólito, exceto para fêmeas tratadas com a maior dose e para grupos de dose pré-condicionada (5,5 - 10%). Nos grupos de fêmeas, houve predominância do metabólito 5,6-HOBC-N-óxido-G (10-19%). Tanto o 5,6-DHBC-S quanto o 5,6-DHBC-G foram identificados em pequenas quantidades em todos os grupos analisados.

2.4. Excreção

O CBZ é rapidamente excretado pela urina e fezes, com eliminação (predominante pela urina) superior a 98% em 72 horas, após administração de uma única dose e tempo de meia-vida de 12 horas. Após 6 horas, relatou-se a eliminação de 46 a 63% da menor dose (3 mg/kg p.c.) e de 8 a 19% da maior dose (300 mg/kg p.c.). A administração por 10 dias consecutivos resultou em eliminação de 60% pela urina e 35% pelas fezes. Ainda, verificou-se uma eliminação bifásica: rápida durante os três primeiros dias e mais lenta após esse período (EFSA, 2009). Praticamente todos os metabólitos foram detectados na forma de conjugados glicuronídeo e sulfato. Após a clivagem desses conjugados, os principais compostos gerados foram 5-HBC (39-90%), CBZ inalterado (2-6%), 2-AB (2-4%) e hidroxilado-2-aminobenzimidazol (até 5%) em ambas as espécies de roedores (PMRA, 2011).

Krechniak & Klosowska (1986) também descreveram o processo de excreção do CBZ como sendo bifásico, com uma etapa rápida seguida de uma lenta, conforme um modelo cinético de dois compartimentos, com predominância de eliminação pela via urinária. Na administração intravenosa, após

a fase rápida ($T_{1/2} = 1,37h$), mais de 71% do composto radiomarcado foi eliminado pela urina e, em 12h, verificou-se que a composição desses compostos eram 94% de 5-HBC, 3% de 2-AB e 3% de CBZ inalterado. Pela via oral, a eliminação pela urina após a fase rápida ($T_{1/2} = 2,5h$) foi de 91% do composto radiomarcado, sendo a sua composição após 12h bem similar ao descrito anteriormente para a administração intravenosa.

No estudo de Monson e colaboradores (1990) descrito anteriormente, após monitoramento da excreção do composto radiomarcado, via urina e fezes a cada 12h por 72h, verificou-se uma eliminação superior a 98% da dose administrada após esses 3 dias, com predominância da via urinária. Nos grupos de dose baixa única (50mg/kg p.c.) e dose baixa pré-condicionada (50mg/kg p.c. por 14 dias), a excreção urinária representou 62-66% da dose em machos e 54-62% em fêmeas. Nos grupos de dose alta (1.000 mg/kg p.c.), a via urinária representou 41% em ambos os sexos, o que indica que, em altas doses, a via urinária se torna saturada. A excreção fecal correspondeu ao restante, com a detecção de um pequeno percentual de CBZ inalterado (10-15% da dose administrada), além do metabólito principal 5-HBC. Esses dados indicam que, assim como a absorção, a excreção ocorre de forma semelhante em machos e fêmeas, de modo dose-dependente, com um maior percentual de excreção fecal em altas doses.

A APMVA (2009) relatou que o metabolismo, a distribuição e a excreção desse IA exercem grande influência na sua toxicidade para o desenvolvimento. Após administração de Benomil via gavagem a ratas grávidas, no período de DG 7-16, constatou-se que o Benomil e seu metabólito CBZ atravessam a membrana placentária, com maior dosagem desses dois IA no sangue materno e tecido embrionário, em uma hora após a administração. O tempo de meia-vida do Benomil foi de aproximadamente 45 minutos no sangue materno e inferior a isso nos embriões. Observou-se ainda que os níveis de Benomil e CBZ, quando dosados uma hora após o tratamento, diminuíram com o número crescente de administrações, enquanto o nível de 5-HBC-S aumentou com a exposição repetida, sendo a meia-vida do 5-HBC-S de 2-3h no sangue materno e de 4-8h em embriões. Isso sugere que a exposição repetida leva a uma aceleração no metabolismo do Benomil, provavelmente em decorrência da indução de enzimas hepáticas.

Em um segundo estudo, com administração de Benomil pela dieta em uma dose aproximadamente 4 vezes superior àquela administrada via gavagem, não se detectou Benomil e CBZ nos embriões, sendo o nível máximo desses compostos no sangue materno marcadamente inferior ao quantificado após o início da administração por gavagem. No entanto, as concentrações máximas de 5-HBC-S no sangue materno e nos embriões foram aproximadamente o dobro daquelas detectadas após a administração por gavagem. Isso indica que o Benomil administrado na dieta é metabolizado mais rapidamente do que por gavagem (APMVA, 2009).

Na Tabela 1, há um resumo dos principais resultados dos estudos de toxicocinética descritos nos relatórios das agências reguladoras.

Tabela 1: Quadro-resumo das informações relevantes obtidas a partir dos estudos de toxicocinética	
Espécie/dose	Resultados
Rato e camundongo 3 mg/kg ou 300 mg/kg de ^{14}C -carbendazim por v.o. e i.v. (Padrões de distribuição foram investigados em ratos e camundongos por autorradiografia de corpo inteiro após administração i.v. e v.o. de 3 mg/kg p.c. de ^{14}C -carbendazim).	<u>Absorção:</u> - Ratos: $C_{max} = 1,03 \mu g/ml$ em 15-40 min, na dose de 3 mg/kg p.c.; e $C_{max} = 16 \mu g/ml$ em 0,4-4 h, na dose de 300 mg/kg p.c. - Camundongos: C_{max} similar na menor dose; $C_{max} = 36-53 \mu g/ml$ na dose de 300 mg/kg p.c. <u>Distribuição:</u> Maiores concentrações no fígado e rins; nas gônadas os níveis foram próximos ou abaixo das concentrações sanguíneas. <u>Excreção:</u> Quase total em 24h - Ratos após 6h: 3mg/kg - Urina: 46-63%; 300mg/g - Urina: 8-19%.

	Camundongos após 6h: 3mg/kg - Urina: 33-75%; Fezes: 10%; 300mg/kg - Urina: 10-24%; Fezes: 27%.
Rato 12mg/kg p.c. de ^{14}C-carbendazim por via gavagem ou i.v.	<u>Absorção</u>: biodisponibilidade de 85% após dose única; <u>Distribuição</u>: Maior dosagem nos rins e menor dosagem no sangue; <u>Metabolismo</u>: - Hidroxilação pelo CYP-450, gerando 5-HBC como principal metabólito; posterior conjugação com sulfato ou glicuronídeo; - Hidrólise em 2-AB pela ação de enzimas do plasma sanguíneo e outros órgãos. <u>Excreção</u>: Predominantemente renal e quase total em 24h. Comportamento bifásico, conforme modelo cinético de dois compartimentos.
Rato 8mg/kg p.c. de ^{14}C-carbendazim por v.o. por 10 dias consecutivos	<u>Excreção</u>: 60% urina e 35% fezes por 5 dias. Principal metabólito 5-HBC livre (fezes) ou conjugado (fezes e urina).
Rato e camundongo 3mg/kg ou 300mg/kg p.c. de ^{14}C-carbendazim por via gavagem em dose única; Grupos de pré-tratamento com CBZ não marcado via gavagem, por 14 ou 29 dias consecutivos, com posterior dose única de ^{14}C-carbendazim (3mg/kg ou 300mg/kg p.c.).	<u>Metabolismo</u>: Metabólitos como conjugados glicuronídeo e sulfato: 5-HBC (39% - 90%), CBZ inalterado (2% - 6%), 2-AB (<2% - 4%), 2-AB hidroxilado (0% - 5%); <u>Distribuição</u>: Conteúdo residual no fígado foi menor em ratos (12-18%, dose única; 2-4% dose repetida) do que em camundongos (26-29%, dose única, <2-28% dose repetida) – saturação da capacidade de detoxificação hepática na dose de 300 mg/kg; <u>Excreção</u>: Aproximadamente, 60-84% (dose baixa) e 10-24% (dose alta) pela urina.
Rato 50 mg/kg p.c. ^{14}C - carbendazim v.o. dose única 1000 mg/kg p.c. ^{14}C - carbendazim v.o. dose única 50 mg/kg p.c. ^{14}C - carbendazim após 14 dias de pré-tratamento com 50 mg/kg p.c.	<u>Metabolismo</u>: principal metabólito em M e F: 5-HBC. Em fêmeas após pré-TTT: presença de 5,6-HOBC-N-óxido. Identificados 5,6-DHBC-S e 5,6-DHBC-G em menor quantidade. <u>Excreção</u>: Em 72h: > 98% excreção pela urina e fezes. 50 mg/kg com ou sem pré-ttt - excreção urinária: 62-66% (M) e 54-62% (F); 1000 mg/kg - excreção urinária: 41%. OBS: Eliminação nas fezes constitui o restante.
Rato 2 mg/kg p.c./dia ^{14}C - carbendazim via gavagem por 10 dias.	<u>Distribuição</u>: Resíduos no fígado: 0,3% em 7d e 0,08% em 14d após a última dose; níveis no sangue e outros órgãos (rim, gordura, músculo e gônadas) não excederam 0,03% após 7 dias. <u>Excreção</u>: Eliminação rápida do sangue – bifásica com uma taxa rápida durante os primeiros 3 dias e fase mais lenta depois disso (59% excretado na urina e 36% nas fezes).
v.o.: via oral; i.v.: intravenosa Fontes: PMRA, 2010; APMVA, 2009; EFSA, 2009; FAO/WHO, 1998; Krechniak & Klosowska, 1986; Monson et al., 1990.	

3. TOXICIDADE APÓS EXPOSIÇÃO ÚNICA

As agências europeia, americana, canadense e australiana são consoantes quanto à baixa toxicidade do CBZ, quando administrado de forma aguda, pelas vias oral, cutânea e inalatória (USEPA, 2020; APVMA, 2009; PMRA, 2011; EFSA, 2010). Esse IA não apresenta potencial para causar irritação cutânea ou ocular. Quanto à sensibilização cutânea, a EFSA (2010) o classifica como sensibilizante quando analisado no teste de maximização e não sensibilizante pelo teste de Buehler. Já as agências canadense, americana e australiana o classificam como não sensibilizante cutâneo, com base em ambos os testes (USEPA, 2020; PMRA, 2011; APMVA, 2009). Isso está de acordo com os estudos descritos no relatório da FT, onde o CBZ não foi considerado sensibilizante cutâneo, nem irritante cutâneo/ ocular. Referente à DL₅₀ oral e cutânea, o menor valor descrito para ambas foi > 2.000 mg/kg p.c. (APMVA, 2009; EFSA, 2010; PMRA, 2011) e a menor CL₅₀ foi > 5-5,8 mg/L (PMRA, 2011). Todos esses valores foram obtidos com o produto técnico (alta pureza), em estudos conduzidos em ratos.

Com relação à classificação em função da toxicidade aguda, embora a FT tenha sugerido um enquadramento na Categoria 5, este não é cabível no processo de reavaliação, pois a classificação que consta no rótulo e na bula deve considerar o produto formulado e não apenas o IA.

Estudos de toxicidade aguda foram conduzidos em diferentes espécies animais, por distintas vias de administração, sendo a perda de peso e a redução no consumo de alimentos um efeito comum a todas as espécies. Quando administrados a ratos e cachorros pela via oral (dieta ou gavagem), por exemplo, os órgãos-alvo afetados foram fígado e rins, associado a um comprometimento severo dos testículos em doses mais altas. Os principais efeitos observados foram: alterações hematológicas e bioquímicas, lesões degenerativas nos rins, danos hepáticos (reação inflamatória, hipertrofia dos hepatócitos, infiltração periportal), azoospermia, degeneração celular dos testículos; bem como mortalidade em ratos (EFSA, 2010; PMRA, 2011).

Embora a FT não tenha discutido em seu relatório a toxicidade para órgão-alvo específico por exposição única, vários estudos da literatura indicaram toxicidade testicular após exposição única via oral ao CBZ, em doses ≥ 50 mg/kg (Nakai et al., 1992, 1993; 1994; 1995; 1997a; 1997b; 1998b; 2002; Markelewicz, 2004; Kawata et al., 2020). A sequência de eventos tem início com a indução de alterações morfológicas nas células de Sertoli, com posterior descamação de células germinativas imaturas, o que acarreta obstrução e distensão dos ductos eferentes, decorrente da presença de conteúdo luminal altamente compactado, com sinais de inflamação; em seguida, ocorre grave desorganização epitelial, necrose e consequente fibrose tecidual. Essa oclusão dos ductos resulta em um rápido inchaço testicular e, por fim, atrofia tubular seminífera e infertilidade. Os principais efeitos adversos descritos foram observados logo após 90 minutos, com persistência por até 70 dias pós-exposição.

Nakai e colaboradores (1992) conduziram dois protocolos experimentais em ratos: 1) Perfil de monitoramento de efeitos entre 2 horas e 32 dias após a exposição (0 e 400 mg/kg p.c.); e 2) Curva dose-resposta em 2 e 70 dias após a exposição (50, 100, 200, 400 ou 800 mg/kg p.c.). No experimento 1, verificou-se, já a partir de 8h após exposição, um aumento no peso testicular acompanhado de redução na contagem e motilidade, além de alterações morfológicas em espermatozoides, com duração desses efeitos pelos 32 dias de análise. No experimento 2, observou-se, no segundo dia pós-exposição, toxicidade testicular já na menor dose testada (50 mg/kg p.c.), com descamação precoce de células germinativas imaturas; além de aumento no peso testicular, ausência de células germinativas, oclusão e dilatação dos dutos eferentes, dilatação de túbulos seminíferos nas maiores doses testadas. Essa cascata de efeitos é desencadeada pela inibição da montagem dos microtúbulos nas células de Sertoli, com consequente falha no processo de divisão, maturação e migração das células germinativas. O tratamento com doses a partir de 100 mg/kg p.c. acarretou um aumento dose-dependente no peso testicular e no diâmetro dos túbulos seminíferos, além de oclusões nos dutos eferentes, causadas por conteúdo luminal compactado, granulomas espermáticos, mineralização e obliteração do lúmen original por tecido conjuntivo fibrótico. Na análise realizada após 70 dias de exposição, observou-se uma redução dose-dependente no peso testicular e no diâmetro dos túbulos seminíferos, decorrentes de um aumento na atrofia dos túbulos seminíferos. Essa atrofia testicular a longo prazo parece ser decorrente do processo de oclusão associado à exposição às maiores doses. Com base nesse estudo, fica definido um LOAEL de

50 mg/kg p.c. para efeitos testiculares após exposição aguda, sem definição de NOAEL, em alinhamento ao estabelecido pelas agências canadense e australiana (APMVA, 2009; PMRA, 2011).

Então, a partir do conjunto de dados apresentados, há evidência suficiente indicativa de toxicidade testicular após exposição única via oral ao CBZ, em doses ≥ 50 mg/kg, o que embasa a classificação do CBZ na Categoria 1 em função da toxicidade para órgão-alvo específico por exposição única, conforme previsto na Seção 2 do Anexo IV da RDC nº 294/ 2019. Esse enquadramento se fundamenta na tabela 3.8.1 do Capítulo 3.8 do GHS (GHS, 2017), visto que a menor dose associada à toxicidade testicular foi 50 mg/kg p.c., isto é, uma dose inferior ao valor indicativo (C) de 300 mg/kg p.c..

4. TOXICIDADE APÓS EXPOSIÇÃO REPETIDA

4.1. Aspectos gerais

Em seu relatório, a FT revisou um total de 16 estudos de toxicidade para exposições repetidas, sendo 5 regulatórios e 11 provenientes da literatura científica. Dos estudos regulatórios, 4 foram conduzidos em ratos, com administração pela via oral (alta pureza; gavagem, água ou alimento), por 28 a 91 dias, 5-7 dias/ semana. O menor NOAEL foi 102-107 mg/kg p.c./dia (para machos e fêmeas, respectivamente), com base nos seguintes efeitos adversos: leve a moderada redução de hemoglobina, hematócrito e contagem de eritrócitos, quando tratados com 518-564 mg/kg p.c./dia (machos e fêmeas); discreta elevação de alanina aminotransferase (ALT), persistente até o final do período de observação; aumento significativo de nitrogênio da ureia no sangue (NUS) e de ureia, evidente somente ao final do período de observação; redução no peso do baço, verificado ao final do período de tratamento. A FT incluiu ainda para discussão outros estudos pela via oral disponíveis na literatura científica, os quais não apresentaram a pureza do CBZ ou foram conduzidos com o produto formulado, estando, por essa razão, fora do escopo deste parecer. De modo geral, os dados da literatura e os relatórios das agências reguladoras indicaram, em roedores e cães, os seguintes órgãos-alvo afetados pela exposição ao CBZ: testículos, fígado, rins e tireoide. Outros efeitos indicados foram redução de peso corporal e alterações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos (USEPA, 2020; APVMA, 2009; PMRA, 2011; EFSA, 2010).

Pela via dérmica, a FT apresentou um estudo regulatório conduzido em ratos, por 92 dias (5 dias/semana). O NOAEL estabelecido foi 10 mg/kg p.c./dia, com base no aumento de eosinófilos, redução de leucócitos e linfócitos verificado na dose de 100 mg/kg p.c./dia. A agência americana também relatou, no estudo de exposição dérmica de 28 dias em ratos, degeneração dos túbulos seminíferos, hipospermia, lesões em espermatozoides com formação de granulomas em machos; e alterações nos parâmetros hematológicos em fêmeas, em doses superiores ao NOAEL indicado no estudo da FT (NOAEL = 20 mg/kg/dia) (USEPA, 2020).

A FT não incluiu estudo de exposição repetida pela via inalatória. A USEPA (2020), em razão da ausência de estudos conduzidos especificamente com o CBZ, incluiu um estudo de exposição inalatória em ratos, por 90 dias, com Benomil, indicando um NOAEC de 0,010mg/L com base na degeneração do epitélio olfativo na cavidade nasal e redução do peso corporal em doses mais altas.

As evidências obtidas dos estudos da literatura científica, avaliados pela CREAV, constam na Tabela 2 e serão detalhadas posteriormente nos itens específicos.

Tabela 2: Avaliação de estudos de toxicidade por exposição repetida ao Carbendazim.

Referência	Pureza IA/ Cepa ou Linhagem/ Delineamento/	Resultados segundo autor	Limitações, inconsistências e considerações relevantes	Conclusão
Abolaji et al., 2016	Pureza: 97%; Linhagem: Ratas Wistar; Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> (n=8) – CBZ administrado via	Sem alteração no peso corporal e peso relativo do fígado, baço e rins; ↓ ganho de peso corporal.	A depleção do status antioxidante, níveis elevados de marcadores inflamatórios e	CBZ induziu toxicidade hepática e renal, associadas ao estresse oxidativo e processo

	oral (50 mg/kg p.c.) por 7d. Análise: dosagens bioquímicas (ALT, AST, ureia e creatinina), atividade antioxidante e histopatologia (fígado, rim e baço).	• ↑* ALT, AST, creatinina e ureia plasmáticas. • ↓* enzimas antioxidantes: GSH, SOD e GST no fígado, rins e baço; CAT somente rins e baço; com ↑* biomarcadores inflamatórios e de peroxidação lipídica (H₂O₂, ON, MPO) nos três órgãos. • Análise histopatológica: focos de necrose e células inflamatórias no fígado, infiltração neutrofílica no baço e congestão leve e infiltração neutrofílica nos rins.	peroxidação lipídica foram acompanhados por danos oxidativos hepáticos, renais e esplênicos em ratos.	inflamatório nesses órgãos (LOAEL = 50mg/kg)
Barlas et al., 2002	Pureza: 98%; Linhagem: Ratos Wistar Swiss albinos ♂; Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> (n=10) – CBZ administrado via gavagem (150, 300 e 600 mg/kg p.c./dia) por 105 dias. Análise: dosagem hormonal e histopatologia da tireoide, paratireoide, adrenal e hipófise.	• ↑* T₃ (300 mg/kg p.c./dia); • Alterações histopatológicas em todas as doses: I) tireoide: folículos danificados e expandidos, infiltração de células linfoides, congestão e aumento do tecido intersticial; II) Paratireoide: degeneração celular, congestão, lesões amiloides; III) Adrenais: degeneração celular, gotículas de lipídios e edema.	-	CBZ induziu danos histopatológicos na tireóide, paratireoide e adrenais (LOAEL = 150 mg/kg p.c./dia)
Đikić et al., 2012a	Pureza: 95%;	• ↓* ganho de peso corporal, sem alteração no	• Estudo conduzido conforme Diretriz OECD 407 (Teste	CBZ induziu toxicidade hepática verificada por

	Linhagem: Camundongos <i>Swiss</i> ♂/♀; Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> (n=10) – CBZ administrado via oral (20 mg/kg p.c.) por 28d. Análise: dosagens bioquímicas (ALT, AST, amilase, FA, LD, CK, creatinina e proteínas totais) e histopatologia do fígado.	peso do fígado e no índice hepatossomático; - Dosagem bioquímica: ↑* AST e CK (indicativa de condição de hipóxia induzida pelo CBZ), sem alteração nas demais; - Histopatologia: alteração na arquitetura lobular decorrente de morte celular e alterações visíveis na heterocromatina nuclear; - Sem alteração no nível de proteína total, o que indica que fígado permaneceu funcional.	de toxicidade subcrônica (28 dias) em roedores); Experimento feito em duplicata, sem diferença estatística entre o primeiro e o segundo experimento.	alteração da atividade enzimática e histopatológica (LOAEL = 20mg/kg)
Helali et al., 2016	Pureza: >98%; Linhagem: Macrófagos peritoneais de camundongos <i>Swiss</i>; Delineamento: Estudo <i>in vitro</i>. Exposição ao CBZ (0,001 - 10 µM) por 24h. Análise da atividade enzimática lisossomal do macrófago e da produção / liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF-α e IL-1β) e de ON.	Inibição concentração-dependente da atividade enzimática lisossomal e da produção de ON, TNF-α e IL-1β (↓* em 1µM), o que foi considerado um potencial mecanismo imunossupressor, por meio do qual o CBZ inibe resposta imune inata.	- Elevada citotoxicidade observada a 100 µM (concentração excluída do estudo); - Avaliação das culturas em duplicata. - Concentrações de CBZ selecionadas com base em LMR estabelecidos pela UE e FAO.	CBZ exibiu efeitos imunomoduladores, com potencial ação imunossupressora <i>in vitro</i> (inibição da função pró-inflamatória dos macrófagos).
Janardhan et al., 1987	Pureza: 98%; Linhagem: Ratos Wistar ♂/♀; Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> (n = 10♂ e 10♀). Administração via gavagem de CBZ (16, 32 e 64 mg/kg p.c./dia) por	- Alterações hematológicas: ↓ leucócitos e linfócitos; - Alterações bioquímicas: ↑* ALT e bilirrubina; - Alterações histopatológicas	Ausência de análise estatística nos dados de parâmetros hematológicos.	CBZ induziu alterações hematológicas, bioquímicas e histopatológicas (rins e fígado) (LOAEL = 16 mg/kg p.c./dia)

	90 dias. Análise: parâmetros hematológicos, bioquímicos (glicose, ureia, FA, ALT, AST, bilirrubina) e histopatologia do fígado e rins.	dose-dependentes hepática (congestão da veia porta e degeneração hidrópica) e renal (dilatação tubular, degeneração hidrópica, fibrose periglomerular).		
Janardhan et al., 1988	Pureza: 98%; Linhagem: Cães ♂/♀; Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> (n = 3♂ e 3♀). Administração oral de CBZ (20, 40 e 80 mg/kg p.c./dia) por 90 dias. Análise: parâmetros hematológicos, bioquímicos (glicose, ureia, FA, ALT, AST, bilirrubina) e histopatologia do fígado e rins.	- Alterações hematológicas: ↓* leucócitos; - Alterações bioquímicas: ↑* ALT, AST, ureia e bilirrubina; - Alterações histopatológicas dose-dependentes: I) fígado: infiltração esparsa de células inflamatórias, infiltração lipídica, congestão extensa e alterações inflamatórias e degenerativas; II) rins: (dilatação tubular, degeneração hidrópica, fibrose periglomerular, hialinização e extensa congestão vascular).	Autores concluíram que cães apresentam uma susceptibilidade aumentada aos efeitos hepatotóxicos e nefrotóxicos, em comparação aos ratos.	CBZ induziu alterações hematológicas, bioquímicas e histopatológicas (rins e fígado) (LOAEL = 20 mg/kg p.c./dia)
Jin et al., 2015	Pureza: >98%; Linhagem: Camundongos ICR ♂; Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> (n=15). Administração oral de CBZ (100 e 500 mg/kg p.c./dia) por 28d. Eutanásia nos dias 8 (n=7) e 28 (n=8). Análise: dosagem sérica de glicose, CT, HLD, LDL, ácidos graxos livres, TG,	- Alteração histopatológica hepática: ↑* acúmulo de lipídios (500mg/kg) e taxa de degeneração hidrópica (ambas as doses); - Dosagens bioquímicas: ↑* CT (duas doses) e HDL (500 mg/kg) séricos; ↑* CT	Alteração no metabolismo lipídico e dano hepático: acúmulo de lipídios, aumento de TG, taxa de degeneração hidrópica	CBZ induziu alterações histopatológicas hepáticas, distúrbio do metabolismo lipídico, disbiose da microbiota intestinal e inflamação em camundongos (LOAEL = 100 mg/kg p.c./dia)

	piruvato; dosagem hepática de TG, piruvato, proteínas; extração de RNA e RT-qPCR; dosagem sérica de IL-1β e IL-6; sequenciamento de DNA do genoma microbiano; dosagem dos níveis hepático, intestinal e fecal de resíduos de CBZ (HPLC); histopatologia hepática.	(100mg/kg) e TG (500 mg/kg) hepáticos; • CBZ interrompeu o metabolismo lipídico do fígado por meio da regulação positiva de muitos genes-chave; • CBZ induziu resposta inflamatória no fígado $\uparrow^*$ IL-1β e IL-6 séricas (500mg/kg); $\uparrow^*$ RNAm de IL-1β e IL-6 no fígado (ambas as doses), contribuindo para o distúrbio do metabolismo lipídico. • CBZ não absorvido no TGI induziu disbiose intestinal, com redução da diversidade bacteriana		
Jin et al., 2018	Pureza: $\geq 98\%$; Linhagem: Camundongos C57BL/6 σ; Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> (n=8). Administração oral de CBZ (0,2; 1 e 5 mg/kg p.c./dia) por 98 dias. Análise: histoquímica da gordura epididimal, fígado e cólon; dosagem sérica de glicose, CT, ácidos graxos livres, TG, LPL, insulina, LCN-2, TNF-α, IL-1β, LPS; dosagem hepática de TG; determinação das atividades LPL; sequenciamento de DNA do genoma microbiano; extração de RNA total e análise da expressão gênica.	• $\uparrow^*$ peso relativo do fígado ($\geq 0,2$ mg/kg) e da gordura epididimal (≥ 1 mg/kg); • Metabolismo lipídico: $\downarrow^*$ LPL sérico, com $\uparrow^*$ TG sérico ($\geq 0,2$ mg/kg, sem alteração no TG hepático; $\uparrow^*$ ácidos graxos livres; • Histopatologia: sem acúmulo lipídico no fígado; infiltrado de células inflamatórias na gordura epididimal e no cólon; • CBZ apresentou ação pró-	• CBZ induziu expressões gênicas relacionadas à síntese de TG, de ácidos graxos e ao armazenamento no tecido adiposo	CBZ induziu disbiose da microbiota intestinal, alteração no metabolismo lipídico, com hiperlipidemia e resposta inflamatória em múltiplos tecidos (LOAEL = 0,2 mg/kg)

		inflamatória ($\uparrow$*TNF-α, IL-1β, LCN-2) e imunossupressora ($\downarrow$* IL-17 α).		
Salihu et al., 2015	Pureza: $\geq 98\%$; Linhagem: Ratos Wistar σ; Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> (n=10). Administração oral de CBZ (50 mg/kg p.c./dia) por 14 dias. Análise: parâmetros hematológicos; dosagem bioquímica (ALT, AST, FA, GGT, bilirrubina, ureia e creatinina) e de indicadores de estresse oxidativo (SOD, CAT, GST, GPX, GSH, H₂O₂); histopatologia renal e hepática.	• $\uparrow$* peso relativo fígado; • $\downarrow$* leucócitos, linfócitos e plaquetas; $\uparrow$* neutrófilos; • $\uparrow$* ALT, AST, FA, GGT, bilirrubina, ureia e creatinina, indicando danos de função hepática e renal; • $\downarrow$* SOD, CAT, GST GSH (fígado e rins) e $\downarrow$* GPX (fígado); $\uparrow$* H₂O₂ e MDA (indicando peroxidação lipídica no fígado e rins); • Alterações histopatológicas renal (degeneração severa, inflamação com congestão de vasos, infiltração lipídica da medula e túbulos convolutos) e hepática (necrose, discreta dilatação de sinusóides com presença de células inflamatórias).	• CBZ usado como modelo de toxicidade hepática e renal, para verificação dos efeitos do composto 6-gingerol.	CBZ induziu toxicidade renal e hepática (alteração bioquímica e histopatológica), associados à imunossupressão, indução de inflamação e estresse oxidativo (LOAEL = 50 mg/kg p.c./dia)
Selmanoglu et al., 2001	Pureza: $\geq 98\%$; Linhagem: Ratos Wistar Swiss albinos σ; Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> (n=10) – CBZ administrado via gavagem (150, 300 e 600 mg/kg p.c.) por 105 dias. Análise: parâmetros hematológicos; dosagem	• ≥ 150 mg/kg p.c./dia: $\downarrow$* leucócitos e linfócitos; • Em 600 mg/kg p.c./dia: $\uparrow$* colesterol sérico, albumina, glicose e creatinina; e $\downarrow$* VLDL;	-	CBZ induziu alterações hematológicas, bioquímicas e histopatológicas no fígado e rins (LOAEL = 150 mg/kg p.c./dia)

	bioquímica; histopatologia renal e hepática.	Alterações histopatológicas (≥ 150 mg/kg p.c./dia): I) Hepática: congestão da veia porta, infiltração de células mononucleares, degeneração hidrópica; e II) Renal: degeneração tubular, congestão, infiltração de células mononucleares, fibrose.		
Songur et al., 2004	Pureza: 98%; Linhagem: Ratos Wistar Swiss albinos ♂; Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> (n=10) – CBZ administrado via gavagem (150, 300 e 600 mg/kg p.c.) por 105 dias. Análise: histopatologia do timo e IHQ para fibronectina (FN).	↓* dose-dependente no peso relativo do timo e ↑* marcação de FN (≥ 150 mg/kg p.c./dia); - Alterações histopatológicas: fibrose e edema (300 e 600 mg/kg p.c./dia).	Aumento da densidade de FN pode estar associado ao aumento do tecido conectivo intersticial nas regiões com fibrose e edema no timo.	CBZ induziu alterações histopatológicas no timo (LOAEL = 150 mg/kg p.c./dia)
Zari et al., 2011	Pureza: Alta pureza; Linhagem: Ratos (<i>Rattus norvegicus</i>) ♂; Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> (n=10). Administração oral de CBZ (200 mg/kg p.c./dia) por 30 dias. Análise: parâmetros hematológicos; dosagem bioquímica (glicose, proteína total, TG, colesterol, creatinina, ALT, AST séricos; glicogênio, lipídeo e proteína hepáticos) e histopatologia renal, hepática e testicular.	- Parâmetros hematológicos: ↓* hemácias, Hb, hematócrito; ↑* leucócitos; - Dosagens bioquímicas: ↓* proteína total sérica e hepática; ↑* glicose, TG, colesterol, creatinina, ALT, AST, glicogênio e lipídeo total; - Alterações histopatológicas: I) hepáticas: desarranjo dos filamentos, aumento dos sinusoides, formação de vacúolos,	- CBZ usado como modelo de dano testicular; - Influência do CBZ nos órgãos de hematopoese, com indução de anemia - Alteração no metabolismo da glicose no fígado (inibição da glicogenólise e estimulação da gliconeogênese); redução na taxa de síntese proteica.	CBZ induziu alterações hematológicas, bioquímicas e histopatológicas, características de toxicidade hepática, renal e testicular (LOAEL = 200mg/kg p.c./dia)

		dilatação e congestão dos vasos sanguíneos com hemorragia; II) renais: desarranjo do córtex renal e tecidos da medula com congestão severa de vasos sanguíneos e hemorragia; corpúsculos renais com degeneração dos glomérulos e cápsulas de Bowman; III) testiculares: ausência total de espermatogônias, espermatócitos primários e secundários, espermatídes e espermatozoides.		
Salihu et al., 2017b	Pureza: 97%; Linhagem: Ratos <i>Wistar</i> ♂ adultos (10 semanas de idade); Delineamento: Estudo <i>in vivo</i>: CBZ administrado (gavagem – 50mg/kg p.c./dia; n = 10) por 14 dias. Eutanásia em 24h pós-tratamento; análise histopatológica e status antioxidante (testículo e epidídimo), dosagens hormonal (TSH, T₃, T₄, prolactina, testosterona, LH, FSH) e bioquímica.	• ↑* pesos absoluto e relativo dos testículos; sem efeitos no ganho de peso corporal e nos pesos absoluto e relativo do epidídimo, vesícula seminal e próstata; • ↓* motilidade, contagem de espermatozoides testiculares e epididimais, alterações morfológicas (cabeças sem cauda, peças intermediárias curvadas e dobradas); • Redução da capacidade antioxidante com indução de estresse oxidativo e peroxidação	• Impossibilidade de avaliar efeito dose-dependente, pois somente um nível de dose foi utilizado. • CBZ usado como modelo de toxicidade testicular; • Análise morfológica de 400 espermatozoides/animal;	CBZ induziu toxicidade testicular, estresse oxidativo e alterações em hormônios sexuais e tireoidianos (LOAEL = 50mg/kg p.c./dia)

		lipídica (↓* catalase, GST e GSH e ↑* H₂O₂, ↑* MDA) nos testículos e epidídimo; ↓* dos níveis plasmáticos de testosterona, TSH, T₃, T₄; ↑* FSH sem afetar LH e prolactina; - Alterações histopatológicas: epitélio seminífero degenerado com poucos espermatozoides, presença de células espermatogênicas descamadas no lúmen de alguns túbulos; congestão severa dos vasos intersticiais; epidídimo com formato irregular e poucos espermatozoides.		
Estudo de uma geração estendida (EOGRS, 2014) Análise baseada no relatório da USEPA (2020) e e PMRA (2019).	Pureza: 99,5%; Linhagem: Ratos Wistar Hannover [CrI:WI (HAN)]; Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> de uma geração estendida. Geração P: Administração dietética de CBZ (n = 30/ sexo/ dose; 0, 250, 1000 ou 2000 ppm (equivalente à dose média diária pré-acasalamento na geração P de 0; 13,9; 53,2 ou 106,7 mg/kg p.c./dia em ♂ e 0; 16,2; 67,6 ou 136,8 mg/kg p.c./dia em ♀) por 4 semanas antes do acasalamento, por 14 dias de acasalamento e	<u>Toxicidade parental (P e F1 adultos):</u> ≥250ppm: ↑ T₄ e TSH em ♀P (sg somente em 1000ppm); ≥1000ppm: ↓sg T₃ em ♂ F1 coorte 1b; ↓sg área coloidal e ↑ altura das células foliculares em ♀P; 2000ppm: ↑sg peso absoluto/ relativo tireoide, ↓área coloidal/ ↑ altura das células foliculares em ♀ F1 coorte 1b. <u>Prole:</u>	Estão aqui detalhados somente os efeitos adversos para a tireoide. Os efeitos sobre o desenvolvimento e a fisiologia reprodutiva serão detalhados em pareceres específicos.	CBZ induziu alterações na homeostase tireoidiana (LOAEL = 16,2 mg/kg p.c./dia)

até DPN ₈₅ (♂) ou até o desmame da prole F1 no DL ₂₂ (♀); <u>Geração F1:</u> Administração dietética do desmame ao término do estudo. Coorte 3 (12/sexo/ dose) - Dosagem de hormônios tireoidianos, necropsia e patologia do órgão-alvo no DPN ₂₃ .	• ≥1000ppm: ↓ dose-dependente T₄ no DPN₄ de F1 (sg em 2000ppm); ↑sg T₄ (♂) e TSH (♀/♂), além de ↓sg área coloidal/ ↑ altura das células foliculares (♂) no DPN₂₃; • 2000ppm: ↑sg T₄ (♀/♂) e TSH (♀); ↓sg área coloidal/ ↑ altura das células foliculares (♀/♂ no DPN₂₃).		

MPO: Mieloperoxidase; ON: óxido nítrico; FA: fosfatase alcalina; LD: Lactato desidrogenase; CK: creatina kinase; CT: colesterol total; LPL: lipase lipoproteica; GSH: Glutathione, SOD: Superóxido dismutase; GST: Glutathione tranferase; CAT: Catalase; GPX: Glutathione peroxidase; MDA: malondialdeído; H₂O₂: peróxido de hidrogênio; P: Parental; DPN: Dia pós-natal; DL: Dia lactacional.

Quanto à classificação do CBZ, segundo a RDC nº 294, de julho de 2019, a FT sugere o seu enquadramento na Categoria 2 em função da toxicidade para órgão-alvo específico por exposição repetida, com base na toxicidade hepática evidenciada nos estudos.

4.2. Toxicidade testicular

Na busca sistemática, vários estudos analisados relataram toxicidade testicular após exposição repetida ao CBZ (alta pureza) pela via oral, em ratos e camundongos (Evenson et al., 1987; Gray et al., 1989; Rajeswary et al., 2007; Yu et al., 2009; Jones e Al-Attar, 2011; Pacheco et al., 2012; Moffit et al., 2013; Breslin et al., 2013; Dere et al., 2016; Sakr e Shalaby, 2014; Liu et al., 2019; Li et al., 2020). Dentre os efeitos adversos descritos, os principais foram: redução no peso testicular, no nível de testosterona sérica, na atividade das enzimas esteroideogênicas (Rajeswary e colaboradores, 2007) e em vários parâmetros espermáticos – como na motilidade espermática já em doses ≥ 0,1mg/kg p.c./dia (Liu et al., 2019); alterações histopatológicas testiculares (dilatação e degeneração tubular, esfoliação de células germinativas, vacuolização de células de Sertoli) e epididimárias (edema, presença de detritos celulares e redução de espermatozoides intratubulares) em doses ≥ 20 mg/kg p.c./dia, com incidência e gravidade progressivas em relação à dose/duração (Breslin et al., 2013); toxicidade direta às células germinativas com interrupção da espermatogênese; infertilidade, a qual foi altamente correlacionada com depleção de células germinativas, elevação de LH e FSH séricos e alterações nas funções das células de Leydig (Gray et al., 1989).

A exposição crônica dietética ao CBZ também revelou degeneração testicular progressiva em ratos e cães. Num estudo conduzido em ratos, com exposição por dois anos, (Sherman et al., 1972 apud APMVA, 2009), foram observadas incidências aumentadas de atrofia testicular difusa na dose de 250 mg/kg p.c./dia. Em cães, também após 2 anos de exposição ao CBZ, foi relatada a ocorrência de infiltrados de células inflamatórias mononucleares intersticiais e de túbulos atróficos dos testículos, com NOAEL de 7,5 mg/kg p.c./dia (Reuzel et al., 1976 apud APMVA, 2009).

Nos relatórios das agências canadense e europeia, os testículos também foram considerados órgão-alvo para a exposição ao CBZ (PMRA, 2010; EFSA, 2011). Já a agência americana, em seu relatório, expôs que, apesar do conjunto de evidências indicativas dos testículos como um órgão-alvo, os efeitos não foram observados em todos os estudos e a exposição via gavagem parece potencializar o efeito tóxico, em comparação à exposição dietética. Já no estudo de exposição dérmica por 28 dias em ratos, verificou-se degeneração dos túbulos seminíferos testiculares e hipospermia, com persistência

durante um período de recuperação de 10 semanas. Quanto a isso, a USEPA discutiu que a administração dérmica efetuada em um veículo oleoso pode ter potencializado a absorção percutânea em relação às diluições aquosas. Adicionalmente, a ausência de metabolismo de primeira passagem após a absorção dérmica pode ter contribuído para o aumento da dose testicular, em relação à administração oral de uma dose equivalente. Em contraste, a USEPA relata que nenhum efeito adverso testicular foi observado na geração parental ou filial no estudo de toxicidade reprodutiva de uma geração estendida, conduzido em ratos com exposição dietética, nem na maior dose testada (107 mg/kg p.c./dia em machos) (USEPA, 2020).

O dano testicular causado pelo CBZ decorre da inibição da associação de microtúbulos, o que acarreta falha na segregação cromossômica durante a meiose espermatócica, necrose dos espermatócitos meióticos, descamação de espermatídes imaturas, atrofia do túbulo seminífero, anormalidades nas espermatídes longas e alongadas (inclusive no acrossoma), com formação de magaespermatídes e simplastos (PARECER Nº 1/2021/SEI/CREAV /GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA - SEI nº [1309909](#)). Então, diante das evidências acima descritas, conclui-se que a toxicidade testicular é um importante desfecho toxicológico associado à exposição ao CBZ, o qual teve a sua discussão aprofundada, por ser um aspecto toxicológico proibitivo de registro, no parecer nº 12/2021/SEI/CREAV /GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA (SEI nº [1517596](#)), com a análise dos estudos específicos relevantes. Adicionalmente, o Parecer de Mutagenicidade (SEI nº [1309909](#)) pode ser consultado para a obtenção de informações acerca do mecanismo subjacente à toxicidade testicular, o qual está relacionado à capacidade de interação do CBZ com elementos do citoesqueleto, como os microtúbulos, com consequente indução de aneuploidia.

4.3. Toxicidade para a tireoide

A tireoide foi considerada um órgão-alvo pela agência americana (USEPA, 2020), tendo sido relatada também por outras agências internacionais a ocorrência de efeitos adversos nessa glândula (EFSA, 2010; PMRA, 2011; APMVA, 2009). No estudo de toxicidade dérmica de 28 dias em ratos, os níveis de T₄ aumentaram em fêmeas nos dois grupos de dose mais elevadas (40%, p<0,05 em 480 mg/kg/dia; e 31% em 720 mg/kg/dia), sem alterações relevantes no peso ou na histopatologia desse órgão. Em cães, três estudos crônicos pela via oral relataram aumento de TSH sérico, redução de T₄, aumento no peso absoluto e relativo da tireoide e hipertrofia dos folículos, com definição de NOAEL em 7,5 mg/kg p.c./dia (USEPA, 2020; Reuzel et al., 1976; Til et al., 1972 apud APMVA, 2009).

No estudo de toxicidade reprodutiva de uma geração estendida (EOGRTS, 2014), foram relatadas alterações nos níveis plasmáticos de hormônios e na histopatologia da tireoide em 1.000 e 2.000 ppm (≥ 53 mg/kg p.c./dia), nos animais das gerações parental (P) e F1 adulta, como também na prole F1 e F2. Os efeitos foram mais pronunciados em fêmeas P, nas quais os níveis plasmáticos de T₄ aumentaram em todos os grupos tratados (p > 0,05 a 16,2 e 67,6 mg/kg p.c./dia), como também os níveis de TSH (64, 164 e 92%, p < 0,05 a 67,6 mg/kg p.c./dia). Ainda nas fêmeas P, verificou-se uma mínima a leve hipertrofia microscópica da célula folicular em 67,6 (2/29) e 136,8 (3/23) mg/kg p.c./dia. Uma diminuição estatisticamente significativa na área coloidal e um aumento na altura das células foliculares foram observados na análise microscópica semiquantitativa da tireoide a partir de 67,6 mg/kg p.c./dia. Nenhum efeito foi observado em machos P, exceto por uma diminuição não significativa (19%) em T₄ em 106,7 mg/kg p.c./dia. Similarmente, na prole F1 adulta, nenhum efeito sobre a tireoide foi observado em machos (DPN₁₄₈) ou fêmeas (DG₂₀) da coorte 1a. Já em machos da coorte F1 1b (DPN₁₇₅) foi verificada uma diminuição significativa em T₃ (19% e 18%), em doses a partir de 53,2 mg/kg p.c./dia, mas nenhum outro efeito nos hormônios tireoidianos ou na análise histopatológica. Nas fêmeas da coorte F1 1b (DL₂₂), não foram relatados efeitos hormonais, mas houve um aumento significativo no peso absoluto/ relativo da tireoide (18%/ 25%) na maior dose. Também foram observadas diminuição da área coloidal/ aumento da altura das células foliculares (USEPA, 2020). Com relação à prole ainda jovem, também foram relatadas alterações nos níveis dos hormônios tireoidianos, na área coloidal e na altura das células foliculares, porém sem consistência entre as coortes ou diferentes idades analisadas. Em F1, no DPN₄ relatou-se diminuição dose-dependente nos níveis séricos de T₄, nos níveis de dose

intermediária (53,2 e 67,6 mg/kg p.c./dia, respectivamente ♂/♀) e alta (106,7 e 136,8 mg/kg p.c./dia, respectivamente ♂/♀), sendo significativo somente na maior dose. Porém, o TSH não foi afetado e a histopatologia não foi avaliada (USEPA, 2020). Essa redução nos níveis séricos de T_4 sem alteração de TSH foi atribuída à imaturidade do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide, sabidamente presente em ratos no período pós-natal inicial (PMRA, 2019). No DPN₂₃, machos F1 (coorte 3) tratados com 53,2 mg/kg p.c./dia exibiram aumentos significativos em T_4 e TSH (42% /21%) e alterações significativas na área coloidal/altura das células foliculares (-12%/+ 43%). Já em fêmeas, apenas o TSH foi aumentado (28%). No maior nível de dose (106,7 e 136,8 mg/kg p.c./dia, em machos e fêmeas respectivamente), foram relatados aumentos significativos nos níveis de T_4 (53% ♂/ 22% ♀) e TSH (41% ♀), além de significativa redução na área coloidal/ aumento na altura de células foliculares em ambos os sexos. Em contraste, filhotes F2 no DPN₂₃ mostraram apenas aumentos não significativos em T_4 (20% ♂) e TSH (26% ♀). No DPN₄₅, essas alterações permaneceram em fêmeas tratadas com a maior dose. Não se verificou uma correlação positiva consistente entre a altura da célula folicular e os níveis de T_4 ou TSH nos animais tratados. Nenhuma mudança nos parâmetros tireoidianos foi observada na prole tratada com a menor dose (13,9 e 16,2 mg/kg p.c./dia, em machos e fêmeas respectivamente).

No geral, embora os efeitos na tireoide não tenham sido consistentes entre os sexos, idades e gerações, em fêmeas P, as evidências de alterações em T_4 e TSH, juntamente com leve hipertrofia da tireoide e aumento da altura das células foliculares / diminuição da área colóide folicular, foram considerados pela USEPA como indícios de perturbação da homeostase da tireoide e, portanto, um efeito adverso (USEPA, 2020). Em alinhamento, a PMRA considerou o aumento do TSH em associação às alterações histopatológicas observadas na tireoide como sugestivos de que a exposição ao CBZ induziu hipotireoidismo em animais adultos (PMRA, 2019).

Com relação aos estudos da literatura, Salihu et al (2017b) também relataram que a exposição ao CBZ (gavagem; 50 mg/kg p.c./dia) por 14 dias induziu uma redução dos hormônios tireoidianos (TSH, T_3 e T_4), os quais desempenham um papel regulador na atividade metabólica basal testicular, esteroidogênese e espermatogênese. Em oposição, se verificou aumento significativo de T_3 e alterações histopatológicas na tireoide, em doses ≥ 150 mg/kg p.c./dia por 105 dias (Barlas et al, 2002). Isso se assemelha às inconsistências observadas entre os sexos, idades e gerações relatadas no estudo EOGRTS (2014). Portanto, conclui-se que há evidências sugestivas de efeitos do CBZ na homeostase da tireoide, conforme também apontado pelas agências americana (USEPA, 2020) e canadense (PMRA, 2019).

4.4. Toxicidade hepática e renal

A administração dietética e via gavagem, de curta e longa duração em ratos e cães, está associada a efeitos no fígado e rins, os quais são órgãos-alvo primários em ambas as espécies. A natureza e a gravidade dos efeitos verificados diferem a depender do método de administração. Então, em estudos subcrônicos de toxicidade oral, o aumento do peso do fígado foi o principal efeito em ratos e cães, em associação a alterações patológicas hepáticas e efeitos no peso corporal em doses mais elevadas no cão. Verificou-se efeitos mais severos após administração de doses inferiores via gavagem, em ratos e cães, incluindo efeitos hematológicos e bioquímicos, lesões renais degenerativas e alterações patológicas no fígado (reações inflamatórias, inchaço dos hepatócitos, infiltração periportal hepática, regeneração hepática), bem como mortalidade em ratos (PMRA, 2011). Um estudo com exposição dietética por 13 semanas em ratos relatou aumento no peso relativo do fígado na maior dose testada (67,5 mg/kg p.c./dia), com definição de NOAEL em 22,5 mg/kg p.c./dia (APVMA, 2009). Em cães, a administração dietética de CBZ (pureza não informada) por 28 dias acarretou aumento no peso do fígado e alterações histopatológicas (infiltração celular periportal, hepatócitos aumentados e de coloração diferente), com definição de NOAEL em 19-21 mg/kg p.c./dia (fêmeas e machos) (Til et al., 1971 apud APVMA, 2009).

A administração prolongada de CBZ está associada a efeitos adversos hepáticos, observados em camundongos, ratos e cães. Em ratos, os efeitos relatados foram inchaço hepatocelular, necrose e hipertrofia celular em áreas centrolobulares e intermediárias. Adicionalmente, em ratos e cães,

verificou-se um aumento do peso do fígado, associado a níveis elevados de alanina aminotransferase sérica e/ou fosfatase alcalina (PMRA, 2011). Estudos crônicos (2 anos) em ratos evidenciaram aumento do peso relativo do fígado, redução dos níveis de AST e outros sinais de hepatotoxicidade na dose de 100 mg/kg p.c./dia (Til et al., 1976 apud APMVA, 2009; USEPA, 2020), com menor NOAEL de 15 mg/kg p.c./dia para ratos. Já dois estudos em cães, com administração dietética de CBZ (pureza não informada) por 90 dias e dois anos, evidenciaram aumento de fosfatase alcalina e peso relativo do fígado na dose de 50 mg/kg p.c./dia, com NOAEL de 7,5 mg/kg p.c./dia (Reuzel et al., 1976; Til et al., 1972 apud APMVA, 2009). Na busca sistemática, uma série de estudos da literatura indicaram toxicidade hepática após exposição repetida ao CBZ (alta pureza) pela via oral, em ratos e camundongos (Abolaji et al., 2016; Đikić et al., 2012a; Janardhan et al., 1987; Jin et al., 2015; Jin et al., 2018; Salihu et al., 2015; Selmanoglu et al., 2001; Zari et al., 2011) e em cães (Janardhan et al., 1988), verificada pelo aumento dos marcadores de função hepática (ALT e AST) e de bilirrubina, além de várias alterações histopatológicas, verificadas já a partir de 7 dias de exposição. As principais evidências foram: dilatação de sinusóides, desarranjo dos filamentos, formação de vacúolos, degeneração hidrópica, presença de células inflamatórias, infiltração de células mononucleares, focos de necrose com alteração na arquitetura lobular, alterações na heterocromatina nuclear, dilatação e congestão da veia porta com hemorragia. O valor de LOAEL estabelecido a partir desses estudos foi 16 mg/kg p.c./dia em ratos (Janardhan et al., 1987) e 20 mg/kg p.c./dia em cães (Janardhan et al., 1988).

Segundo esses estudos, a toxicidade hepática pode ser decorrente do processo inflamatório e de estresse oxidativo induzidos pelo CBZ no fígado, com depleção da capacidade antioxidante (GSH, SOD, GST, CAT, GPX) e elevação nos níveis de marcadores inflamatórios (ON, IL-1 β e IL-6) e de peroxidação lipídica (H₂O₂, MPO, MDA). Como consequência da toxicidade hepática, alguns estudos indicaram alteração no metabolismo lipídico (elevação de TG e colesterol) e redução dos níveis de proteína total.

Adicionalmente, dados da literatura indicaram toxicidade renal em roedores (Abolaji et al., 2016; Janardhan et al., 1987; Salihu et al., 2015; Selmanoglu et al., 2001; Zari et al., 2011) e em cães (Janardhan et al., 1988), após exposição oral repetida ao CBZ, com ocorrência de aumento nos níveis de ureia e creatinina séricas (marcadores de função renal), além de várias alterações histopatológicas renais: infiltração neutrofílica, dilatação tubular, degeneração hidrópica, fibrose periglomerular, infiltração lipídica da medula e túbulos convolutos, hialinização e extensa congestão vascular com hemorragia; corpúsculos renais com degeneração dos glomérulos e cápsula de Bowman. Assim como no fígado, nos rins também se verificou ocorrência de estresse oxidativo e processo inflamatório.

4.5. Outros efeitos associados à exposição ao Carbendazim

Dois estudos avaliaram o efeito do CBZ sobre a microbiota intestinal de camundongos, com as possíveis alterações metabólicas e histopatológicas, além dos processos inflamatórios associados (Jin et al., 2015; Jin et al., 2018) (Tabela 1). No primeiro estudo, Jin e colaboradores (2015) relataram que a administração oral de altas doses de CBZ (≥ 100 mg/kg p.c./dia, por 28 dias) alterou rapidamente a composição da microbiota intestinal, resultando em distúrbio metabólico lipídico hepático e processo inflamatório. Houve redução na proporção de bactérias benéficas e aumento das bactérias patogênicas. No segundo estudo, Jin e colaboradores (2018) relataram que a exposição crônica a baixas doses de CBZ ($\geq 0,2$ mg/kg p.c./dia, por 14 semanas), também induziu disbiose da microbiota intestinal (redução da diversidade bacteriana), o que acarretou aumento da absorção de TG exógeno pelo intestino e redução no consumo de TG (causa direta da hiperlipidemia e da resposta inflamatória multitecidual). Com isso, houve aumento de TG sérico e, conseqüentemente, inibição da síntese hepática de TG e indução do armazenamento de lipídios no tecido adiposo, de modo a compensar a absorção intestinal em excesso. Essa alteração na microbiota também afetou a barreira imunológica, o que acarretou o aumento na secreção de muco e resposta inflamatória no cólon, além de outros tecidos (Jin et al., 2018).

5. EVIDÊNCIAS DE NEUROTOXICIDADE (NT)

Em seu relatório, a FT mencionou os posicionamentos da EFSA e da USEPA quanto à ausência de qualquer potencial neurotóxico direto do CBZ. Então, considerando que nenhum estudo específico de NT foi apresentado pela FT, tampouco foram obtidos estudos com esse desfecho na busca sistemática realizada pela CREAV, as conclusões apresentadas nesse item se embasaram nas discussões dos relatórios das principais agências reguladoras internacionais consultadas. Desse modo, para a análise desse desfecho toxicológico, as evidências disponíveis nos relatórios foram: estudo de NT aguda oral em ratos; estudo de NT tardia após exposição aguda, conduzido em galinhas; estudo de toxicidade reprodutiva (TR) de uma geração estendida em ratos (Diretriz OECD 443); estudo de toxicidade dérmica de 28 dias em ratos. Todas as agências consultadas relataram que não foram verificadas evidências clínicas ou histopatológicas de NT relacionada ao CBZ (USEPA, 2020; EFSA, 2010; PMRA, 2011; APVMA, 2012).

5.1. Estudo de NT aguda

Não estão disponíveis estudos de NT conduzidos pela via oral em roedores para o CBZ. No relatório da agência americana (USEPA, 2020), foi utilizado um estudo conduzido com o Benomil (pureza de 94,7%) em ratos, com administração única via oral (por gavagem) nas doses de 500, 1.000 ou 2.000 mg/ kg. Considerando a rápida metabolização de Benomil em CBZ, as doses equivalentes de CBZ foram calculadas, por meio de um fator de 0,67 para as diferenças no peso molecular, resultando nas doses de 335, 670 ou 1.340 mg/ kg. Foram conduzidos sequencialmente os testes de bateria de observação funcional (FOB) e de atividade motora, em 2 horas pós-dosagem no dia 0, 1, 7 e 14. Foi realizada análise macroscópica e microscópica dos tecidos do sistema nervoso central e periférico (SNC e SNP) de 5 ratos/sexo/dose ao término do estudo, no dia 14, após a perfusão *in situ*. Nas doses de 500 mg/kg e 1.000 mg/kg, foram verificadas alterações testiculares na necropsia, as quais foram consideradas relacionadas ao tratamento, mesmo na ausência de dose-resposta, tendo em vista que os testículos são, sabidamente, um órgão-alvo para o Benomil e o CBZ, conforme será detalhado posteriormente no item específico de toxicidade testicular. Quanto aos parâmetros de NT, na maior dose testada (2.000 mg/kg), verificou-se redução da atividade motora em fêmeas no dia um (-39% abaixo do grupo controle), com recuperação no dia oito. Não foram verificados efeitos adversos relacionados ao tratamento na sobrevivência, sinais clínicos, peso corporal médio, parâmetros da FOB ou no exame neuropatológico. Houve redução das atividades motoras médias, em machos e fêmeas, somente no dia um (39% e 38% abaixo do controle, respectivamente). Entretanto, essas alterações não foram consideradas adversas por não terem significância estatística em relação ao controle e não terem sido observadas nos momentos de avaliação posteriores (dias sete e 14). Os estudos de controle positivo demonstraram a capacidade do laboratório em conduzir testes de triagem de NT.

5.2. Estudo de NT tardia

O estudo disponível de NT tardia após exposição aguda antecede a publicação da Diretriz OECD 418, entretanto, o protocolo de teste está, em grande medida, em conformidade com a referida diretriz. Os desvios verificados são: não há relato sobre o estado inicial de saúde dos animais; a faixa de idade dos animais foi de seis a 14 meses; não foram efetuados cortes da medula oblonga; foram utilizadas 10 galinhas nos grupos tratados e 20 galinhas nos respectivos grupos controle negativo e positivo, o que excede ao previsto na diretriz; o período de observação foi de 28 dias (EFSA, 2010). O CBZ foi administrado em dose única (gavagem – 500, 2.500 e 5.000 mg/kg) a galinhas poedeiras, enquanto o grupo controle positivo recebeu TOCP (triortocresil fosfato). Diariamente, por quatro semanas, foram registradas as taxas de mortalidade e demais sinais clínicos de NT. No grupo controle positivo, foram verificados efeitos neurotóxicos (fraqueza nas pernas, ataxia). Na maior dose testada (5.000 mg/kg), verificou-se toxicidade sistêmica e sinais neurotóxicos transitórios (ataxia e fraqueza nas pernas). Já nos grupos de doses inferiores (500 e 2.500 mg/kg), verificou-se apenas leve salivação. Adicionalmente, o exame microscópico não indicou degeneração axonal ou desmielinização em nenhum dos grupos tratados (Goldenthal, 1978). Como conclusão desse estudo, a EFSA (2010) estabeleceu um NOAEL para NT de 2.500 mg/kg p.c., com base na ataxia e fraqueza nas pernas observados no nível de dose superior a

esse. Um NOAEL para toxicidade sistêmica não pode ser estabelecido devido à salivação verificada em todos os grupos tratados. Nos relatórios das agências canadense e europeia, consta ainda um estudo complementar em galinhas – com administração dietética por 21 dias (40, 80 e 400 mg / kg p.c.) – no qual se verificou, somente em um animal do grupo de maior dose (400 mg/kg p.c.), aumento na atividade de colinesterase sérica e leve ataxia por aproximadamente dois dias, seguidos de completa recuperação. Nenhum outro efeito neurotóxico foi observado nos demais animais (EFSA, 2010; PMRA, 2011). Nos relatórios mais recentes das agências europeia, australiana e americana, concluiu-se que não há NT tardia associada ao CBZ (EFSA, 2010; USEPA, 2020; APVMA, 2012). Já a agência canadense concluiu que há sinais de NT tardia na maior dose testada (400 mg/kg) (PMRA, 2011).

Dois estudos não regulatórios relataram que o CBZ não apresentou efeito inibitório de atividade de colinesterase em ratos (via gavagem, por 90 dias) e em cães (administração pela dieta, por 13 semanas) (Janardhan et al., 1987, 1988). Diante das evidências apresentadas, e alinhada às demais agências internacionais, conclui-se que não há indício de NT tardia induzida pela exposição ao CBZ.

5.3. Estudo de toxicidade reprodutiva de uma geração estendida (Diretriz OECD 443)

Considerando que esse estudo inclui uma coorte de neurotoxicidade para o desenvolvimento (DNT), ele é considerado adequado para avaliar desfechos de DNT, em substituição ao estudo regulatório específico para DNT (Diretriz OECD 426). Nos relatórios das agências europeia e australiana, esse estudo ainda não estava disponível, o que levou à exigência, em razão da constatação de evidências de danos ao desenvolvimento do sistema nervoso, possivelmente induzidos pelo CBZ. Então, segundo o relatório da USEPA (2020), não houve alteração relacionada ao tratamento nos sinais clínicos, exame oftalmológico, parâmetros de FOB, atividade motora e locomotora, parâmetros de sobressalto auditivo, pesos cerebrais, medições cerebrais macroscópicas e microscópicas, neuropatologia cerebral ou quaisquer outras evidências neuropatológicas. Ela relata ainda que as diferenças estatisticamente significativas na morfometria cerebral foram de pequena magnitude, não exibiram um padrão dose-dependente e, portanto, não foram consideradas relacionadas ao tratamento. Por outro lado, no estudo de toxicidade para o desenvolvimento pré-natal, conduzido em ratos, foram observadas malformações fetais referentes ao desenvolvimento da cabeça e do sistema nervoso central (SNC), tanto na presença quanto na ausência de toxicidade materna (PMRA, 2011). Foram observadas exencefalia, hidrocefalia, distensão dos ventrículos laterais, anoftalmia ou microftalmia e malformações cranianas na presença de toxicidade materna, no maior nível de dose (90 mg/kg/dia) (USEPA, 2020).

A agência americana alega que essas evidências são consistentes com os dados obtidos no mesmo tipo de estudo, efetuado com o fungicida Benomil, mas que evidências semelhantes não foram observadas em coelhos ou na coorte de DNT no estudo de toxicidade reprodutiva, conforme falado anteriormente, no qual o CBZ foi administrado na dieta e não por gavagem. Além disso, ela relata que esses dados estão alinhados aos estudos efetuados com o fungicida Benomil, cujos dados de NT aguda e subcrônica também não evidenciaram NT em doses relevantes para a avaliação do risco à saúde humana. Então, ela considera que os desfechos selecionados para avaliação de risco à saúde humana são protetores dos efeitos para o desenvolvimento descritos acima para ratos (USEPA, 2020). O conjunto de evidências aqui apresentado é insuficiente para se alcançar uma conclusão acerca do potencial de DNT associado ao CBZ, sendo necessária a análise direta dos estudos de toxicidade supracitados, cuja discussão é objeto do parecer de toxicidade para o desenvolvimento (Parecer SEI nº [1505782](#)).

5.4. Estudo de toxicidade cutânea de 28 dias em ratos

Os parâmetros neurocomportamentais (bateria de observação funcional e atividade motora) avaliados nesse estudo não indicaram efeitos relacionados ao tratamento com CBZ, tendo sido verificados somente um leve aumento na força de preensão dos membros anteriores e/ou posteriores em ambos os sexos (PMRA, 2011; USEPA, 2020).

6. EVIDÊNCIAS DE IMUNOTOXICIDADE

No relatório da FT, o desfecho de imunotoxicidade não foi mencionado. Similarmente, não foram relatadas evidências relevantes de imunotoxicidade por nenhuma agência reguladora (USEPA, 2020; PMRA, 2011; EFSA, 2010; APMVA, 2012). A USEPA, por exemplo, declarou em seu relatório que não há estudo de imunotoxicidade disponível para o CBZ, mas que foi recomendado que o requerimento para esse estudo seja dispensado. No estudo de toxicidade reprodutiva de uma geração estendida conduzido em ratos, não foi incluída a coorte de imunotoxicidade. No entanto, o estudo, conforme conduzido, não evidenciou um potencial imunotóxico do CBZ, com base na ausência de efeitos observados nos parâmetros hematológicos, de peso do órgão ou histopatologia (USEPA, 2020). No estudo de carcinogenicidade, os camundongos exibiram um aumento na depleção linfóide tímica na dose média de 225 mg/kg p.c./dia, mas tal efeito foi observado somente ao término do estudo e na presença de toxicidade hepática aumentada, inclusive com incidência aumentada de tumores hepáticos (USEPA, 2020).

Em um estudo não regulatório de toxicidade oral subcrônica, conduzido em ratos, relatou-se que a exposição ao CBZ (150, 300 e 600 mg/kg/dia; via gavagem por 15 semanas) induziu alterações histopatológicas (fibrose e edema) e redução dose-dependente no peso absoluto/ relativo do timo (≥ 150 mg/kg/dia), além de aumento na marcação de fibronectina (FN) (≥ 300 mg/kg/dia) (Songur et al., 2004). Adicionalmente, foram verificadas reduções significativas na contagem de leucócitos e linfócitos em roedores (Selmanoglu et al., 2001; Janardhan et al., 1987; Salihu et al., 2015) e em cães (Janardhan et al., 1988), em doses ≥ 16 mg/kg p.c./dia (Tabela 1).

Um estudo *in vitro* relatou inibição concentração-dependente da atividade enzimática lisossomal e da produção de óxido nítrico, TNF- α e IL-1 β , em macrófagos peritoneais isolados de camundongos *Swiss*, a partir da concentração de $1\mu\text{M}$ de CBZ. Esse efeito foi considerado pelos autores um potencial mecanismo imunossupressor, por meio do qual esse IA inibe a função pró-inflamatória dos macrófagos (Helali et al., 2016).

A partir desses dados, verifica-se que uma possível imunotoxicidade associada ao CBZ, indicada pelos estudos da literatura, ocorreria somente em níveis de dose superiores àqueles responsáveis pela toxicidade para órgão-alvo (detalhada nos itens 3. e 4.). Alterações em parâmetros hematológicos, como redução de leucócitos e linfócitos, parecem ocorrer em doses inferiores, mas ainda cobertas pelos valores estabelecidos para toxicidade para órgão-alvo.

7. CONCLUSÃO

Com base nas informações apresentadas no relatório da FT e de outras agências reguladoras de agrotóxicos, bem como nos estudos obtidos na busca sistemática, conclui-se que:

- O CBZ sofre rápida absorção pelo TGI (biodisponibilidade de 85% após dose única via oral) e rápida distribuição para o fígado e os rins (dez minutos após administração oral), além de outros órgãos, porém com baixo potencial de acumulação tecidual. Embora os testículos sejam um órgão-alvo do CBZ, não houve detecção de resíduos nesse órgão. O principal metabólito é o 5-HBC (5,6-di-hidroxi-carbendazim e 2-AB, em menor escala). Não foram observadas diferenças significativas entre ratos e camundongos com relação ao metabolismo, mas o conteúdo residual no fígado foi menor em ratos, o que indica uma saturação da capacidade de detoxificação em camundongos mais rapidamente que em ratos. A excreção ocorre predominantemente pela urina (em baixas doses) e fezes (com aumento da dose), com taxa de eliminação superior a 98% em 72 horas, após administração de dose única. A excreção ocorre de forma bifásica, semelhante em machos e fêmeas e de modo dose-dependente.
- Estudos de dose única indicaram baixa toxicidade aguda pelas vias oral, cutânea e inalatória, além de ausência de potencial para irritação cutânea/ocular ou sensibilização cutânea.
- O CBZ se enquadra na Categoria 1 em função da toxicidade para órgão-alvo específico por exposição única, em razão da toxicidade testicular observada em doses ≥ 50 mg/kg p.c..

- Não foram verificados efeitos neurotóxicos agudos, tampouco neurotoxicidade tardia após exposição aguda, associados à exposição ao CBZ. Entretanto, foram relatadas evidências relevantes de DNT, cuja discussão é objeto do parecer de toxicidade para o desenvolvimento (Parecer SEI nº [1505782](#)).
- Nenhuma agência internacional relatou a ocorrência de imunotoxicidade, mas a USEPA discutiu um estudo não regulatório, no qual foram verificados efeitos adversos no timo e na contagem de linfócitos e leucócitos, porém em um nível de dose superior àquele associado à toxicidade para órgão-alvo após exposição repetida (toxicidade hepática com NOAEL de 7,5 mg/kg p.c./dia para cães e de 15 mg/kg p.c./dia para ratos).
- Após exposição repetida, foram relatadas alterações relevantes no fígado, rins, tireoide e testículos, em roedores e cães. A discussão de toxicidade testicular será aprofundada no parecer específico de toxicidade reprodutiva, por se tratar de um desfecho proibitivo de registro.
- O CBZ se enquadra na Categoria 2, em função da toxicidade para órgão-alvo específico por exposição repetida, com base na toxicidade hepática evidenciada nos estudos em ratos de 90 dias pela via oral, com menor LOAEL de 16 mg/kg p.c./dia.

8. ENCAMINHAMENTO

- Incluir na monografia a classificação do CBZ na Categoria 1 em função da toxicidade para órgão-alvo específico após exposição única, conforme o Anexo IV, Quadro 2, da RDC nº 294/2019, e a indicação da seguinte frase de perigo “Provoca danos aos testículos”, conforme o Anexo III da RDC nº 296/2019.
- Incluir na monografia do IA a classificação do CBZ na Categoria 2 em função da toxicidade para órgão-alvo específico após exposição repetida, conforme o Anexo IV, Quadro 3, da RDC nº 294/2019, e a indicação da seguinte frase de perigo “Pode provocar danos ao fígado por exposição repetida ou prolongada”, conforme o Anexo III da RDC nº 296/2019.

9. REFERÊNCIAS

Abolaji A.O., Awogbindin I.O., Adedara I.A., Farombi E.O.. **Insecticide chlorpyrifos and fungicide carbendazim, common food contaminants mixture, induce hepatic, renal, and splenic oxidative damage in female rats.** Hum Exp Toxicol. 36(5):483-493. doi: 10.1177/0960327116652459. Epub 2016 Jun 6. PMID: 27268782. 2017.

Akbarsha, M.A., Vijendrakumar, S., Kadalmani, B., Girija, R., Faridha, A. **Curative property of Withania somnifera Dunal root in the context of carbendazim-induced histopathological changes in the liver and kidney of rat.** Phytomedicine, Volume 7, Issue 6, 2000, Pages 499-507, [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(00\)80036-7](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(00)80036-7).

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Monografia C-24, do ingrediente ativo Carbendazim.** 2019. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/c24.pdf/a019eb91-b52d-492d-8140-ae82f54d5698>. Acessado em 26/09/2019.

APMVA, 2009. Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. Australia Chemical Review Program. **Human Health Risk Assessment of Carbendazim.**

Barlas, N., Selmanoglu, G., Kockaya, A., Songür, S. **Effects of carbendazim on rat thyroid, parathyroid, pituitary and adrenal glands and their hormones.** Human & Experimental Toxicology. 2002;21(4):217-221. doi:10.1191/0960327102ht187oa

Breslin WJ, Paulman A, Sun-Lin D, Goldstein KM, Derr A. **The inhibin B (InhB) response to the testicular toxicants mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP), 1,3 dinitrobenzene (DNB), or carbendazim (CBZ)**

following short-term repeat dosing in the male rat. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol. Feb;98(1):72-81. doi: 10.1002/bdrb.21043. Epub 2013 Jan 24. PMID: 23348955. 2013.

Dere, E., Wilson, S., Anderson, L., Boekelheide, K. **Sperm Molecular Biomarkers Are Sensitive Indicators of Testicular Injury Following Subchronic Model Toxicant Exposure.** Toxicological Sciences. 153. kfw137. 10.1093/toxsci/kfw137. 2016.

Dikić, D.; Landeka, I.; Knežević, F.; Mojsović-Čuić, A.; Benkovic, V.; Horvat, K.A.; Lončar, G.; Teparic, R.; Rogic, D. **Carbendazim Impends Hepatic Necrosis when Combined with Imazalil or Cypermethrin.** Basic & clinical pharmacology & toxicology. 110. 433-40. 10.1111/j.1742-7843.2011.00831.x. 2011.

EFSA. **Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance carbendazim.** 2010.

Evenson DP, Janca FC, Jost LK. **Effects of the fungicide methyl-benzimidazol-2-yl carbamate (MBC) on mouse germ cells as determined by flow cytometry.** J Toxicol Environ Health. 20(4):387-99. doi: 10.1080/15287398709530992. PMID: 3560261. 1987.

GHS. Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals. ST/SG/AC.10/30/Rev.7. United Nations, 2017.

Goldenthal, E.I. (1978) **Neurotoxicity in hens.** Unpublished report from International Research and Development Corporation, Mattawan, Michigan, USA. Submitted to WHO by E.I. DuPont de Nemours and Co., Inc.

Gray LE Jr, Ostby J, Ferrell J, Sigmon R, Cooper R, Linder R, Rehnberg G, Goldman J, Laskey J. **Correlation of sperm and endocrine measures with reproductive success in rodents.** Prog Clin Biol Res. 302:193-206; discussion 206-9. PMID: 2666989. 1989.

Helali I, Ferchichi S, Maaouia A, Aouni M, Harizi H. **Modulation of macrophage functionality induced in vitro by chlorpyrifos and carbendazim pesticides.** J Immunotoxicol. (5):745-50. doi: 10.1080/1547691X.2016.1181124. Epub 2016 Jul 18. PMID: 27429139. 2016.

IPCS, 1993. International programme on chemical safety. Environmental health criteria 149. **Carbendazim.**

Janardhan, A., Rao, A.B. & Sisodia, P. **Sub-chronic toxicity of methyl benzimidazole carbamate in rats.** Bull. Environ. Contam. Toxicol. 38, 890–898 (1987). <https://doi.org/10.1007/BF01616717>

Janardhan, A., Bhaskar Rao, A. & Sisodia, P. **Short-term toxicity of methyl benzimidazole carbamate in dogs.** Bull. Environ. Contam. Toxicol. 41, 704–711 (1988). <https://doi.org/10.1007/BF02021022>

Jin Y, Zeng Z, Wu Y, Zhang S, Fu Z. **Oral Exposure of Mice to Carbendazim Induces Hepatic Lipid Metabolism Disorder and Gut Microbiota Dysbiosis.** Toxicological Sciences: an Official Journal of the Society of Toxicology. 147(1):116-126. DOI: 10.1093/toxsci/kfv115. 2015.

Jin C, Zeng Z, Wang C, Luo T, Wang S, Zhou J, Ni Y, Fu Z, Jin Y. **Insights into a Possible Mechanism Underlying the Connection of Carbendazim-Induced Lipid Metabolism Disorder and Gut Microbiota Dysbiosis in Mice.** Toxicol Sci. 1;166(2):382-393. doi: 10.1093/toxsci/kfy205. PMID: 30496565. 2018.

Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (JMPR). **Pesticide residues in food - 1998.** Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group. Part I, residues, volume I.

Krechaniak, J. & Klosowska, B. (1986) **The fate of ¹⁴C-carbendazim in the rat.** Xenobiotica, 16: 809-815.

Lee, J., Wang, Y. Mark, G., Steve, D. **Carbendazim: Disposition, Cellular Permeability, Metabolite Identification, and Pharmacokinetic Comparison with Its Nanoparticle.** Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. 92, no. 1, january 2003

Li, H., Zhang, P., Zhao, Y., Zhang, H.. **Low doses of carbendazim and chlorothalonil synergized to impair mouse spermatogenesis through epigenetic pathways.** Ecotoxicology and Environmental Safety, Volume 188, 109908, ISSN 0147-6513, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109908>. 2020.

Liu J, Zhang P, Zhao Y, Zhang H. **Low dose carbendazim disrupts mouse spermatogenesis might Be through estrogen receptor related histone and DNA methylation.** Ecotoxicol Environ Saf. 176:242-249. doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.03.103. Epub 2019 Mar 30. PMID: 30939404. 2019.

Matsuo, F., Nakai, M. & Nasu, T. (1999) **The fungicide carbendazim induces meiotic micronuclei in the spermatids of the rat testis.** J. Vet. Med. Sci 61: 573-576.

Moffit, J., Her, L., Mineo, A., Knight, B., Phillips, J., Thibodeau, M.. **Assessment of Inhibin B as a Biomarker of Testicular Injury Following Administration of Carbendazim, Cetorelix, or 1,2-Dibromo-3-Chloropropane in Wistar Han Rats.** Birth defects research. Part B, Developmental and reproductive toxicology. 98. 10.1002/bdrb.21045. 2013.

Nakai, M. et al (1992). **Acute and long-term effects of a single dose of the fungicide carbendazim (methyl 2-benzimidazole carbamate) on the male reproductive system in the rat.** J. Androl., 13: 507–518.

Pacheco SE, Anderson LM, Sandrof MA, Vantangoli MM, Hall SJ, Boekelheide K. **Sperm mRNA transcripts are indicators of sub-chronic low dose testicular injury in the Fischer 344 rat.** PLoS One. 7(8):e44280. doi: 10.1371/journal.pone.0044280. Epub 2012 Aug 31. PMID: 22952946; PMCID: PMC3432073. 2012.

PMRA, 2011. Health Canada Pest Management Regulatory Agency. **Proposed Registration Decision PRD2011-04.** Carbendazim

PMRA. Health Canada Pest Management Regulatory Agency. **Proposed Registration Decision. Thiophanate-Methyl and Its Associated End-use Products.** PRVD2019-07. 28 June 2019.

Rajeswary, S., Kumaran, B., Ilangoan, R., Yuvaraj, S., Sridhar, M., Venkataraman, P., Srinivasan, N., Aruldas, M.M.. **Modulation of antioxidant defense system by the environmental fungicide carbendazim in Leydig cells of rats.** Reproductive Toxicology, Volume 24, Issues 3–4, Pages 371-380, ISSN 0890-6238, <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.03.010>. 2007.

Sakr SA, Shalaby SY. **Carbendazim-induced testicular damage and oxidative stress in albino rats: ameliorative effect of licorice aqueous extract.** Toxicology and Industrial Health. 30(3):259-267. doi:10.1177/0748233712456059. 2014.

Salihu M, Ajayi BO, Adedara IA, Farombi EO. **6-Gingerol-Rich Fraction from Zingiber officinale Prevents Hematotoxicity and Oxidative Damage in Kidney and Liver of Rats Exposed to Carbendazim.** J Diet Suppl. 13(4):433-48. doi: 10.3109/19390211.2015.1107802. Epub 2015 Dec 16. PMID: 26673969. 2016.

Salihu M, Ajayi BO, Adedara IA, de Souza D, Rocha JBT, Farombi EO. **6-Gingerol-rich fraction from Zingiber officinale ameliorates carbendazim-induced endocrine disruption and toxicity in testes and epididymis of rats.** Andrologia. Jun;49(5). doi: 10.1111/and.12658. Epub 2016 Aug 22. PMID: 27546232. 2017b.

Selmanoğlu, G., Barlas, N., Songür, S., Koçskaya, E.A.. **Carbendazim-induced haematological, biochemical and histopathological changes to the liver and kidney of male rats.** Human & Experimental Toxicology. 2001;20(12):625-630. doi:10.1191/096032701718890603

Songür, S.H., Koçkaya, E., Selmanoğlu, G. and Barlas, N. (2005), **Dose-dependent effects of carbendazim on rat thymus.** Cell Biochem. Funct., 23: 457-460. doi:[10.1002/cbf.1181](https://doi.org/10.1002/cbf.1181)

USEPA. United States Environmental Protection Agency. **Thiophanate-methyl and Carbendazim (MBC). Human health assessment scoping document in support of registration review.** 2014.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. **Thiophanate-Methyl and Carbendazim: Draft Human Health Risk Assessment.** Memorandum Decision No. 452566. DP D452566. March 2020.

Yu G, Guo Q, Xie L, Liu Y, Wang X. **Effects of subchronic exposure to carbendazim on spermatogenesis and fertility in male rats.** Toxicol Ind Health. 25(1):41-7. doi: 10.1177/0748233709103033. PMID: 19318503. 2009.

Zari TA, Al-Attar AM. **Therapeutic effects of olive leaves extract on rats treated with a sublethal concentration of carbendazim.** European Review for Medical and Pharmacological Sciences. 15(4):413-426. 2011.



Documento assinado eletronicamente por **Larissa Muratori Aguiar, Especialista em Regulação e Vigilância Sanitária**, em 09/07/2021, às 20:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020

http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/D10543.htm.



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Roberto Coradi de Freitas, Coordenador(a) de Reavaliação**, em 15/07/2021, às 19:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020

http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/D10543.htm.



Documento assinado eletronicamente por **Juliana Machado Braz, Especialista em Regulação e Vigilância Sanitária**, em 27/07/2021, às 10:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020

http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/D10543.htm.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.anvisa.gov.br/autenticidade>, informando o código verificador **1463526** e o código CRC **5FBE6E49**.

Referência: Processo nº 25351.945793/2019-57

SEI nº 1463526

Criado por [larissa.aguiar](#), versão 32 por [larissa.aguiar](#) em 09/07/2021 20:32:17.

PARECER Nº 1/2021/SEI/CREAV /GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA

Processo nº 25351.945793/2019-57

Interessado: Coordenação de Reavaliação, Gerência de Monitoramento e Avaliação do Risco, GGTOX

Assunto: **Análise do potencial mutagênico do ingrediente ativo Carbendazim.**

Avalia os estudos científicos, o relatório da Força-tarefa do Carbendazim e os de outras agências reguladoras de agrotóxicos acerca do potencial mutagênico do Carbendazim, como parte da reavaliação toxicológica desse ingrediente ativo, conforme estabelecido na RDC nº 221, de 28 de março de 2018.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-AB: 2-aminobenzimidazol

AC: Aberração cromossômica

Anvisa: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AHP: Aminohidroxifenazina

APMVA: *Australian Pesticides and Veterinary Medicines*

Authority (Autoridade Australiana de Pesticidas e Medicina Veterinária).

CBZ: Carbendazim

CitoB: Citocalasina B

CHO: *Chinese hamster ovary* (ovário de hamster chinês)

CHL: *Chinese hamster lung* (pulmão de hamster chinês)

Creav: Coordenação de Reavaliação

DAP: Diaminofenazina

DG: Dia gestacional

DMT: Dose máxima tolerável

EFSA: *European Food Safety Authority* (Autoridade Europeia para Segurança dos Alimentos)

FAO: *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação)

FISH: Hibridação fluorescente *in situ*

FT: Força Tarefa do Carbendazim

IA: Ingrediente ativo

ip: Via intraperitoneal

it: Via intratesticular

LOAEL: *Lowest observed adverse effect level* (Dose mais baixa de efeito adverso observável)
MN: Micronúcleo
MO: Medula óssea
NOAEL: *No observed adverse effect level* (Dose sem efeito adverso observável)
NOEL: *No Observed Effect Level* (Nível sem Efeito Observável)
OECD: *Organization for Economic Co-operation and Development* (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico)
PMRA: *Health Canada's Pest Management Regulatory Agency* (Agência Reguladora de Controle de Pragas Canadense)
PT: Produto técnico;
SAC: *Spindle Assembly Checkpoint* (Ponto de checagem da formação de fuso)
sg: Significativo
USEPA: *United States Environmental Protection Agency* (Agência de Proteção Ambiental Americana)
WoE: *Weight of Evidence* (Peso da evidência)
vo: Via oral

RESUMO

O Carbendazim (CBZ) é um fungicida sistêmico de amplo espectro, pertencente à classe dos benzimidazóis, cuja ação pesticida decorre da inibição da polimerização de β -tubulina, o que impede a formação adequada do fuso acromático e, conseqüentemente, prejudica o processo de divisão celular. Na avaliação do potencial de mutagenicidade do CBZ, foram considerados estudos regulatórios apresentados pela FT, estudos da literatura científica obtidos mediante revisão sistemática e relatórios das principais agências reguladoras internacionais. A partir deles, verificou-se que o CBZ não provoca danos diretos ao DNA, tampouco mutações pontuais *in vitro* em células bacterianas (teste de Ames) e em células de mamíferos, exceto na presença de impurezas com relevância toxicológica, para as quais ficou estabelecido como limite as concentrações de 0,0006 g/kg (DAP) e 0,0005 g/kg (AHP) para os produtos registrados no Brasil. Verificou-se ainda, nos estudos *in vitro* em células de mamíferos, que o CBZ não induz aberrações estruturais, mas causa aberrações numéricas em concentrações $\geq 0,2 \mu\text{g/mL}$ (NOEL = $0,1 \mu\text{g/mL}$). Os dados *in vivo* foram consistentes com os obtidos *in vitro* (ausência de mutações pontuais e clastogênese, com ocorrência de micronúcleo, poliploidia e aneuploidia), o que confere maior força ao peso da evidência quanto ao potencial de aneugenicidade do CBZ. Por fim, estudos *in vivo* em células germinativas de mamíferos (espermatozoides e ovócitos) também indicaram indução de aneuploidia, em doses $\geq 50 \text{ mg/kg/dia}$. Assim,

considerou-se que essa dose não pode ser utilizada como um limiar adequado para derivar doses seguras para proteger a saúde de humanos, uma vez que: I) esse valor corresponde ao LOAEL, sendo desconhecida a dose sem efeito mutagênico para o CBZ (NOAEL); II) há evidências robustas demonstrando maior susceptibilidade dos ovócitos humanos à aneuploidia, em comparação aos espermatozoides e às células somáticas humanas e a roedores; III) espera-se agravamento decorrente do processo de envelhecimento característico desse tipo celular e polimorfismos de subpopulações. Ainda, cabe mencionar que os estudos *in vitro* e *in vivo* realizados com o CBZ, somados aos estudos mecanísticos avaliados, claramente indicam a indução do evento iniciador (ligação à tubulina) e de eventos-chave (despolimerização da tubulina, desorganização de fuso mitótico e indução de ovócitos aneuplóides) de uma Via de Efeito Adverso (AOP) já internacionalmente caracterizada - AOP 106 (ligação química à tubulina em ovócitos, levando a uma prole aneuplóide). Portanto, a referida AOP corrobora a classificação do CBZ como mutagênico para células germinativas. A descrição dessa AOP e de seus eventos-chaves aponta incertezas quantitativas que podem estar associadas a essa via e que interferem na escolha de um limiar adequado. A partir do conjunto de dados de mutagenicidade, associado aos estudos mecanísticos e de toxicidade reprodutiva também analisados, conclui-se que o CBZ é um agente aneugênico e que não há evidência que permita estimar adequadamente uma dose *in vivo* em que não se espera a ocorrência desses danos cromossômicos às células germinativas em humanos. Isto é, não é possível definir um limiar de dose adequado, capaz de prevenir a ocorrência dos efeitos aneugênicos induzidos pelo CBZ. Portanto, com base na avaliação do peso das evidências disponíveis e considerando a legislação brasileira, conclui-se que o CBZ preenche os requisitos proibitivos de registro estabelecidos pela Lei nº 7.802, de julho de 1989 e pelo Decreto nº 4.074, de janeiro de 2002; devendo ser classificado na Categoria 1B em função da mutagenicidade, conforme estabelecido na Seção 4, Anexo IV da RDC nº 294, de 29 de julho de 2019. Em tais dispositivos legais, fica estabelecida a proibição do registro de agrotóxicos que apresentem características mutagênicas e para os quais não seja possível determinar um limiar de dose que permita proceder com as demais etapas da avaliação do risco.

1. INTRODUÇÃO

O presente parecer objetiva avaliar o potencial mutagênico do ingrediente ativo CBZ, a partir do conjunto de evidências – *in vitro* e *in vivo* – relevantes disponíveis, quais sejam: estudos de mutagenicidade (mutações gênicas e aberrações cromossômicas), outros estudos de genotoxicidade, estudos mecanísticos e de toxicidade reprodutiva. Foram também

considerados relevantes os estudos realizados com o ingrediente ativo Benomil, cujo principal produto de degradação é o Carbendazim. Todos os estudos aqui discutidos foram obtidos do relatório apresentado pela FT, dos relatórios das principais agências reguladoras internacionais e da revisão sistemática da literatura científica conduzida pela Coordenação de Reavaliação (CREAV).

Então, como parte do processo de reavaliação desse IA, foi conduzida uma busca sistemática da literatura científica para identificar estudos que relatam toxicidade associada à exposição ao CBZ (Parecer nº 07/2021), a fim de integrar esses dados aos estudos regulatórios disponibilizados pelas empresas registrantes, por meio de uma análise de peso da evidência (WoE).

A análise do potencial mutagênico do CBZ foi efetuada com a utilização da abordagem de WoE, seguindo critérios também adotados por diversas autoridades regulatórias internacionais, para fins de tomada de decisão, conforme será detalhado a seguir.

2. ANÁLISE

2.1 Estudos *in vitro*

2.1.1 Mutação pontual em bactérias

A FT avaliou 26 estudos de mutagenicidade em células procariotas com diferentes linhagens de *Salmonella typhimurium* e um estudo que empregou também uma linhagem de *Escherichia coli* (Innvitro, 2020). Desse total, 24 estudos foram conduzidos para os produtos das empresas registrantes, todos eles negativos para mutação em procariotos. Ainda, a FT também incluiu em sua análise dois outros estudos regulatórios de mutagenicidade com base em relatórios de outras agências, ambos com CBZ de pureza elevada, os quais também apresentaram resultados negativos para mutagenicidade em diferentes linhagens de *S. typhimurium* e uma linhagem de *E. coli* (Ranzini et al., 2001; Ming et al., 2001 apud Innvitro, 2001). Esses estudos foram adequadamente analisados pela APVMA (2009) e por isso não foram descritos em detalhes neste parecer. Embora todos os resultados tenham sido negativos, destacou-se no relatório entregue que o CBZ possui duas impurezas consideradas relevantes do ponto de vista toxicológico: 3-Amino-2-hydroxyphenazine (AHP) e 2,3-Diamino-phenazine (DAP), ambas com resultados positivo para mutagênese pelo teste de Ames.

Dos 24 estudos conduzidos para os produtos das empresas registrantes, considerou-se apenas seis como relevantes para a reavaliação toxicológica do CBZ, pois foram realizados com o produto técnico. As análises desses estudos foram incluídas no Quadro 1 (Vargas, 1995; Moura, 200; Miyaji, 2005; Miyaji, 2008; Miyaji, 2009; Miyaji, 2012). Ainda, foi analisado

mais um estudo com produto técnico, protocolado pela empresa Bayer S.A., que não faz parte da FT (Stammberger, 1992). Todos esses estudos foram negativos para mutação pontual.

Outras autoridades reguladoras internacionais também avaliaram uma grande quantidade de estudos de mutação pontual em bactérias. A agência australiana avaliou cinco estudos de Ames (Ranzini et al., 2001a, 2001b; Yang et al., 1997; Ming et al., 2001; Adams et al. 1996 apud APVMA, 2009) e considerou os resultados consistentemente negativos (APVMA, 2009). Já a USEPA (2014; 2020) verificou um estudo regulatório positivo e cinco estudos regulatórios negativos.

A EFSA (2009a), por sua vez, após um maior aprofundamento das análises com utilização de mais estudos, também concluiu que os resultados dos estudos regulatórios com CBZ puro foram consistentemente negativos (Gericke, 1977; Gericke, 1979; Reynolds, 1989; Stammberger, 1992; Zdzienicka, 1983; Arce et al., 1983; Arce e Sarraf, 1983; Donovan e Irr, 198; Russel et al., 1983; Donovan et al., 1983; Gelbke e Engelhardt 1983; Gelbke e Engelhardt, 1984; Reynolds e Sarraf, 1993 apud EFSA, 2009a). Entretanto, a agência europeia verificou ensaios de Ames positivos para mutações de janela de leitura com *S. Typhimurium* (Donovan et al., 1983; Gelbke e Engelhardt, 1983; Gelbke e Engelhard, 1984; Jung e Weigand, 1983; Reynolds e Sarraf, 1993 apud EFSA, 2009a). Investigações subsequentes compararam diferentes bateladas de CBZ com diferentes concentrações de impurezas e indicaram que esses efeitos positivos, provavelmente, foram decorrentes das impurezas DAP e AHP. Diante disso, a EFSA (2009a) estabeleceu limites para essas impurezas com base nos resultados dos estudos de Ames, nos quais não se observou aumento de colônias revertentes para concentrações de 0,004 g/kg de AHP e de 0,0006 g/kg de DAP. Logo, para a DAP, foi estabelecido como aceitável o valor máximo de 0,6 ppm nos produtos técnicos. Para a AHP, embora os estudos de Ames não tenha sido positivo para concentrações acima de 0,004 g/kg, a EFSA optou por manter a proposição da FAO de 0,0005 g/kg como limite máximo para esta impureza.

A agência canadense também avaliou uma grande quantidade de ensaios de mutação reversa em bactérias, sendo mais da metade deles com resposta positiva (15 estudos), geralmente após ativação metabólica (PMRA, 2011). Entretanto, os estudos com o CBZ de elevado grau de pureza apresentaram resultados geralmente negativos (14 estudos). Isso também levou à PMRA (2011) a concluir que os resultados positivos para mutagenicidade nesses ensaios decorrem da presença de impurezas. Amostras de CBZ contendo aminofenazinas foram mutagênicas em 8 estudos. Adicionalmente, um metabólito de menor importância em ratos, 2-amino-benzimidazole (2-AB), também foi positivo em ensaio de Ames. Por

outro lado, o CBZ puro (99,5%) e seu principal metabólito (5-OH Carbendazim) não apresentaram mutagenicidade. A partir da avaliação em conjunto de todos esses resultados, a PMRA (2011), assim como a EFSA, concluiu que há evidência de que os resultados positivos nos ensaios de Ames decorrem da presença de DAP e a AHP.

A partir das análises dos estudos protocolados pelas empresas registrantes, dos estudos da literatura científica e dos estudos avaliados por autoridades regulatórias internacionais, conclui-se que o CBZ não provoca mutações pontuais em células bacterianas, exceto quando há a presença das impurezas toxicologicamente relevantes DAP e AHP. Embora os estudos positivos com essas impurezas não tenham sido entregues à Anvisa, as discussões internacionais a respeito de seus potenciais mutagênicos são consistentes. Portanto, com base nos estudos de Ames e nas avaliações internacionais, deve-se limitar a concentração dessas impurezas nos produtos registrados no Brasil a 0,0006 g/kg (DAP) e 0,0005 g/kg (AHP).

Quadro 1. Avaliação da mutagenicidade do ingrediente ativo CBZ <i>in vitro</i> em células procariotas (teste de Ames).				
Referência (Patrocinador)	Protocolo	Resultados segundo autor	Limitações, inconsistências e considerações relevantes	Conclusão
Vargas, 1995 Adama	Pureza: 95% Linhagem: S. <i>Typhimurium</i> TA97a, TA98, TA100, TA1535. Delineamento: 1, 10, 100, 1000 e 5000 µg/placa; S9 ⁺ e S9 ⁻ .	Não houve aumento sg nem dose- dependente de revertentes ou alteração da RM.	Ausência de citotoxicidade na maior dose testada.	NEGATIVO
Miyaji, 2005 UPL	Pureza: PT (%NI) Linhagem: S. <i>Typhimurium</i> TA97a, TA98, TA100, TA102, TA1535. Delineamento: 0,001; 0,01; 0,1; 1; 5 mg/placa; S9 ⁺ e S9 ⁻ .	↑ sg revertentes apenas na dose de 0,1 mg/placa para TA97a, sem resposta dose- dependente ou aumento na RM.	Ausência de citotoxicidade na maior dose testada.	NEGATIVO
Miyaji, 2008 Ourofino	Pureza: PT (%NI) Linhagem: S. <i>Typhimurium</i> TA97a, TA98, TA100, TA102, TA1535. Delineamento: 0,001; 0,01; 0,1; 1; 5 mg/placa; S9 ⁺ e S9 ⁻ .	Não houve aumento sg nem dose dependente de revertentes ou alteração da RM.	Ausência de citotoxicidade na maior dose testada para algumas linhagens.	NEGATIVO
Miyaji, 2009 UPL	Pureza: PT (%NI)	Não houve aumento sg nem	Ausência de citotoxicidade na	NEGATIVO

	Linhagem: <i>S. Typhimurium</i> TA97a, TA98, TA100, TA102, TA1535. Delineamento: 0,001; 0,01; 0,1; 1; 5 mg/placa; S9 ⁺ e S9 ⁻ .	dose dependente de revertentes ou alteração da RM.	maior dose testada para algumas linhagens.	
Miyaji, 2012 Nortox	Pureza: PT (%NI) Linhagem: <i>S. Typhimurium</i> TA97a, TA98, TA100, TA102, TA1535 Delineamento: 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3 ; 5 mg/placa; S9 ⁺ e S9 ⁻ .	Não houve aumento sg nem dose dependente de revertentes ou alteração da RM.	Ausência de citotoxicidade na maior dose testada para algumas linhagens.	NEGATIVO
Stammberger, 1992 Bayer	Pureza: 97,7% Linhagem: <i>S. Typhimurium</i> TA98, TA100, TA1535, TA1537 e TA1538 e <i>E. coli</i> WP2uvrA. Delineamento: 4, 20, 100, 500, 2500, 5000 µg/placa; S9 ⁺ e S9 ⁻ .	Não houve aumento sg nem dose dependente de revertentes ou alteração da RM.	Ausência de citotoxicidade na maior dose testada.	NEGATIVO
Moura, 2000 Sumimoto	Pureza: PT (%NI) Linhagem: <i>S. Typhimurium</i> TA98, TA100, TA1535 e TA1538. Delineamento: 648, 1080, 3000, 5000 µg/placa; S9 ⁺ e S9 ⁻ .	Não houve aumento sg nem dose dependente de revertentes ou alteração da RM.	Ausência de citotoxicidade na maior dose testada para algumas linhagens.	NEGATIVO
S9 ⁺ : com ativação metabólica; S9 ⁻ : sem ativação metabólica; RM: razão de mutagenicidade; sg: significativo; PT: produto técnico; NI: não informada.				

2.1.2 Mutação pontual em células de mamíferos

A FT apresentou apenas um estudo regulatório para mutação gênica em células de mamífero (células L5178Y), o qual foi considerado negativo (Adams, 1996). A APVMA (2009) também avaliou somente esse estudo em relação ao potencial de mutação gênica para células de mamíferos. No Quadro 2, há um detalhamento da análise desse estudo pela Anvisa. Adicionalmente, também foi incluída a análise de um artigo na literatura científica (Ermler et al., 2013), identificado na revisão sistemática.

Outros estudos regulatórios foram avaliados pelas demais agências internacionais. A USEPA (2020) verificou resultados positivos em dois estudos regulatórios de mutação gênica com linfócitos de camundongos e um negativo em células de ovário de hamster chinês. Já a PMRA (2011)

concluiu que o CBZ foi negativo em três dos ensaios *in vitro* em células de mamíferos (dois deles utilizaram CBZ com alta pureza); e foi positivo em outros três estudos, dos quais um foi efetuado com CBZ de pureza desconhecida e outro foi conduzido em concentração extremamente tóxica.

A EFSA (2009a) considerou que os estudos *in vitro* para avaliação do potencial de indução de mutações pontuais em células de mamíferos foram consistentemente negativos em diferentes tipos celulares (McCooey et al., 1983, Cifone & Brusick, 1983; Adams & Sacammel, 1996 apud EFSA, 2009a). Somente em um estudo (McCooey et al., 1983 apud EFSA, 2009a) se verificou aumento estatisticamente significativo na frequência de mutações em células de linfoma de camundongos. Entretanto, a EFSA (2009a) contestou a sua relevância biológica, uma vez que ficou constatada alta citotoxicidade (redução do crescimento relativo a um valor $\leq 10\%$), além do grau de pureza questionável do CBZ utilizado. Por outro lado, numa amostra de CBZ com elevada pureza (< 5ppm e 3ppm de impurezas DAP e AHP, respectivamente) verificou-se resultado claramente negativo nesse mesmo tipo de ensaio (EFSA, 2009a).

A partir das análises dos estudos protocolados pelas empresas registrantes, dos estudos da literatura científica e dos estudos avaliados por autoridades regulatórias internacionais, conclui-se que o CBZ não induz mutações pontuais em células de mamíferos *in vitro*, exceto quando há a presença das impurezas toxicologicamente relevantes (DAP e AHP). Embora os estudos positivos com essas impurezas não tenham sido entregues à Anvisa, as discussões internacionais a respeito de seus potenciais mutagênicos são consistentes e, conforme abordado no item 2.1.1, deve-se limitar a concentração dessas impurezas nos produtos registrados no Brasil.

Quadro 2. Avaliação da mutagenicidade do ingrediente ativo CBZ *in vitro* em células de mamíferos (mutação pontual).

Referência	Protocolo	Resultados segundo autor	Limitações, inconsistências e considerações relevantes	Conclusão
Adams, 1996	Pureza: 99,5%; Linhagem: células de linfoma murino (L5178Y); Delineamento: 1, 5, 10, 25, 50, 100 mg/mL (teste 1) e 5, 10, 20, 30, 40, 50 mg/mL (teste 2); S9 ⁺ e S9 ⁻ por 3 horas; 48 horas para expressão	- Não houve aumento significativo na frequência de mutação. - Citotoxicidade celular excessiva a partir de 50 mg/mL.	2x10⁵ células tratadas (RD OECD 476: 6x10⁶ células); - Eficiência de clonagem <65% no teste 1. Por isso, no teste 2, a dose máxima foi 50 mg/mL.	NEGATIVO

	fenotípica (Ensaio HPRT).			
S9 ⁺ : com ativação metabólica; S9 ⁻ : sem ativação metabólica; RD OECD: Recomendação da diretriz OECD.				

2.1.3 Aberração cromossômica em células de mamíferos

A FT incluiu em sua avaliação oito estudos *in vitro* de aberrações cromossômicas em células de mamíferos, provenientes da literatura científica, sendo 7 deles em células somáticas e somente um em células germinativas. Esses estudos foram detalhados no Quadro 3, com exceção de um estudo mecanístico (Can & Albertini, 1997) que foi incluído no item 2.4, Quadro 7. A FT concluiu que os estudos analisados foram negativos para clastogenicidade e positivos para aneugênese (indução de micronúcleos), sendo os efeitos positivos observados em doses $\geq 0,2 \mu\text{g/mL}$ (limiar para atividade aneugênica *in vitro*). Houve divergência entre a análise da Anvisa e da FT para um estudo (Van Hummelen et al., 1995), considerado positivo pela FT e inconclusivo pela Anvisa, devido à grande quantidade de limitações.

As demais autoridades regulatórias internacionais avaliaram uma menor quantidade de estudos. Essa diferença decorreu principalmente do enfoque dado aos estudos regulatórios ou da ausência de inclusão de estudos mais recentes da literatura científica. A USEPA (2014), por exemplo, avaliou apenas um estudo *in vitro* com célula de ovário de hamster chinês, no qual o CBZ foi negativo para aberração. Já a CREAV realizou uma revisão sistemática, incluindo quatorze estudos científicos na análise (Quadro 3). Um desses estudos, Takeshita e colaboradores (2016), foi considerado não relevante para avaliação do peso da evidência sobre mutagenicidade, pois avaliou apenas edema nuclear após exposição ao CBZ.

A EFSA (2009a) avaliou três ensaios *in vitro* em células de mamíferos. O estudo de Bandhun (1985) com linfócitos humanos foi negativo para aberração cromossômica e para troca de cromátides-irmãs. Já o estudo de Kitching (1996b), embora também negativo para aberrações cromossômicas *in vitro* em linfócitos humanos, evidenciou um aumento na incidência de poliploidia nas células expostas ao CBZ. Ainda, segundo a EFSA, o estudo de Myhr e Galloway (1984) corroborou o resultado negativo *in vitro* para troca de cromátides-irmãs em células de ovário de hamster chinês (CHO), porém evidenciou tetraploidia. Diante desses resultados nos ensaios citogenéticos *in vitro* com células de mamíferos, a EFSA (2009a) concluiu que o CBZ não induziu aberrações cromossômicas estruturais e nem troca de cromátides irmãs. Entretanto, foram verificados cromossomos contraídos após exposição ao CBZ, efeito característico de inibidores do fuso mitótico. Logo, a agência europeia concluiu que esse IA causou arranjos

desorganizados de cromossomos hipercontraídos, poliploidias e micronúcleos, como consequência da perturbação do fuso mitótico. Ou seja, ele apresentou atividade aneugênica *in vitro* em células de mamíferos (EFSA, 2009a).

A EFSA (2009a) discutiu ainda que, para agentes aneugênicos desse tipo, seria possível determinar um limiar para mutagenicidade. Assim, com base nos dados disponíveis e considerando a não-disjunção cromossômica como o efeito mais sensível, essa agência estimou um limiar *in vitro* de 0,2 - 0,6 µg/mL para a atividade aneugênica do CBZ em linfócitos humanos (Elhajouji et al, 1997; Marshall, 1996).

A APVMA (2009) também avaliou ensaios *in vitro* em células de mamíferos. Dois estudos de Kitching e colaboradores (1996a, 1996b) – com culturas de CHL (células pulmonares de hamster chinês) e linfócitos humanos, respectivamente – apresentaram resultados negativos para atividade clastogênica e positivos para poliploidia (em todas as doses testadas). Outros quatro estudos em culturas de linfócitos humanos investigaram a atividade aneugênica associada ao CBZ (Marshall et al., 1996; Bentley et al., 2000; Elhajouji et al., 1995, 1997). A partir desses estudos, a agência australiana também considerou que o CBZ causa aneugênese nas concentrações ≥ 0,2 µg/mL (Elhajouji et al., 1995, 1997).

A PMRA (2011) concordou com essa avaliação e concluiu que o CBZ induziu aneuploidia, poliploidia e aumento de formação de micronúcleos em cultura de linfócitos humanos e de células de camundongos, após avaliação de nove ensaios *in vitro* com células de mamíferos, os quais foram predominantemente positivos para aneuploidia. A JMPR/ FAO (2005) avaliou quatro ensaios *in vitro* em células de mamíferos, referentes à indução de aneuploidia em linfócitos humanos (Marshall et al., 1996; Bentley et al., 2000; Elhajouji et al., 1995, 1997), e obteve a mesma conclusão quanto ao potencial aneugênico e limiar de dose *in vitro* para o CBZ .

A partir das análises dos estudos da literatura científica e dos estudos avaliados por autoridades regulatórias internacionais, conclui-se que o CBZ não provoca aberrações estruturais *in vitro* em células de mamíferos, mas induziu aberrações numéricas em concentrações ≥ 0,2 µg/mL (NOEL de 0,1 µg/mL). Portanto, o CBZ é considerado uma substância aneugênica.

Quadro 3. Avaliação da mutagenicidade do ingrediente ativo CBZ *in vitro* em células de mamíferos (aberração cromossômica).

Referência	Protocolo	Resultados segundo autor	Limitações, inconsistências e considerações relevantes	Conclusão

Lamb et al., 1980	Pureza: Não informada. Linhagem: Cultura de linfócitos humanos de sangue periférico; Delineamento: Teste de aberração cromossômica. Exposição das células ao CBZ (0,5 mg/mL), S9⁻, em 4h após adição do agente mitógeno, até amostragem, após 44h de incubação.	Observação de aberrações cromossômicas do tipo cromatídica, sem aumento significativo na frequência, em relação ao grupo controle.	- Ausência de controle positivo; - Apenas uma alta concentração testada; - Ausência de análise de citotoxicidade; - Somente uma condição experimental testada (não foram efetuadas as exposições de curto prazo (3-6 horas), S9⁺ e S9⁻; - Análise de 100 metáfases (RD OECD 473: ≥ 300); - Impossibilidade de análise cega: intensa condensação de cromossomos no grupo tratado.	INCONCLUSIVO
Banduhn et al., 1985	Pureza: Alta (%NI) Linhagem: Cultura de linfócitos humanos isolados de sangue periférico; Delineamento: Exposição das células	- Ausência aberrações estruturais S9⁺ e S9⁻; - Indução de C-mitose (metáfase com	Ausência de informações sobre os doadores da amostra de sangue;	POSITIVO Aneugênese ($\geq 0,2\mu\text{g/ml}$ NOEL=0,1 $\mu\text{g/ml}$)

	ao CBZ, S9⁺ e S9⁻. 1) análise de aberrações cromossômicas (10^{-7}; 10^{-6}; 10^{-5}; $2,5 \times 10^{-5}$; 5×10^{-5}; $7,5 \times 10^{-5}$; 10^{-4} M); 2) teste de MN sem citoB, com coloração para heterocromatina centromérica (5×10^{-7}; 10^{-6}; 5×10^{-6}; 10^{-5}; 5×10^{-5} M).	morfologia idêntica à induzida pelo controle positivo – colcemid), poliploidia e MN (presença de centrômero – aneugêneses e em concentrações $\geq 1 \times 10^{-6}$ M); • Indução de danos de longa duração ao fuso, resultando em elevada frequência de poliploidias nas mitoses subsequentes.	• Aberração estrutural e numérica (2n, 4n e 8n) avaliadas em 100 e 200 metáfases, respectivamente (RD OECD 473: ≥ 300); • Análise de MN em 1000 células (RD OECD 487: ≥ 2000); • No teste de aberração cromossômica, não foi efetuada S9⁻; • No teste de MN, o período de exposição não foi informado; • Avaliação da citotoxicidade pelo IM.	
Van Hummelen et al., 1995a	Pureza: Alta (%NI) Linhagem: cultura de linfócitos humanos isolados de sangue periférico e cultura de sangue total; Delineamento: Teste de MN com FISH: Exposição das células ao CBZ, S9⁻, em 24h pós-estimulação, até o término da	• ↑sg dose-dependente e na frequência de linfócitos binucleados com MN: em linfócitos isolados (10 e $15 \mu\text{M}$); e no sangue	• RD OECD 487: início da exposição em 44-48h pós-estimulação; • Análise de 1000 linfócitos binucleados (RD OECD 487: ≥ 2000)	POSITIVO Aneugênese ($\geq 1 \mu\text{g/ml}$)

	incubação (72h); adição de citocalasina B 44h pós-estimulação. I) para linfócitos isolados: 10, 15 e 20µM; II) para sangue total: 5, 10, 15, 20 e 25µM.	total (5-20µM); • ↑ frequência de MN com centrômero: 79% (5µM) e 89% (10µM), • Indica efeito aneugênico.	células, mas o estudo já obteve resultado sg com 1000); • Avaliação da citotoxicidade pelo IR; • Na cultura de linfócitos isolados (20µM), baixo rendimento de linfócitos binucleados, impossibilitando análise de MN; • Ausência de controle positivo.	
Van Hummelen et al., 1995b	Pureza: Alta (%NI) Linhagem: cultura de linfócitos humanos isolados de sangue periférico; Delineamento: Teste de MN. Exposição das células a raios γ (agente clastogênico) e ao CBZ (2µg/ml), S9⁻, em 24h pós-estimulação, até o término da incubação (72h). Dois protocolos: (I) Cultura sem citoB: separação das	• Para os dois protocolos : conteúdo de DNA dos MN nas células G2 foram 2x maior do que G1. • MN em células G1 com ↑sg no conteúdo de DNA, área absoluta e relativa à célula total (P<0,0001)	• Ausência de controle positivo; • RD OECD 487: início da exposição em 44-48h pós-estimulação; • Número total de células analisadas inferior ao RD OECD 487 (2000 células	INCONCLUSIVO

	frações celulares em G1 e G2 (citometria de fluxo); II) Cultura com citoB (44h pós-estimulação). Para ambos: análise de imagem quanto ao conteúdo e área do DNA (macro e micronúcleos).	- comparado à indução por raios γ (em cultura com citoB); $\uparrow$sg no conteúdo de DNA entre macronúcleos de linfócitos tratados com CBZ com (P < 0,0001) ou sem (P = 0,03) MN, em comparação ao controle.	binucleadas); - Não foi relatada comparação entre nº MN nas células expostas e controle; - Não foi relatada avaliação da citotoxicidade; - Utilização de somente uma concentração de CBZ.	
Kithcching et al., 1996a ¹ apud APVMA (2009)	Pureza: 99,5%. Linhagem: CHL. Delineamento: Teste de MN, S9 ⁺ e S9 ⁻ (0,78-100µg/ml).	Indução de poliploidia em todas as doses testadas, mas sem efeito clastogênico.	-	POSITIVO Aneugênese (≥0,78µg/ml)
Kithcching et al., 1996b ¹ apud APVMA (2009) e EFSA (2009a)	Pureza: 99,5%. Linhagem: Culturas de linfócitos humanos. Delineamento: Teste de MN, S9 ⁺ e S9 ⁻ (0,78-100µg/ml).	Indução de poliploidia, em todas as doses testadas, mas sem efeito clastogênico.	-	POSITIVO Aneugênese (≥0,78µg/ml)
Elhajouji et al., 1995, 1997 ¹ apud APVMA (2009); JMPR/FAO (2005) ¹	Pureza: 99,5%. Linhagem: Culturas de linfócitos humanos. Delineamento: Teste de MN. Exposição ao CBZ (0-2 µg/ml), S9 ⁺ e S9 ⁻ . I) Análise de não-disjunção em linfócitos binucleados	1ª concentração na qual ocorreu um $\uparrow$sg foi superior para a perda cromossômica, quando comparada	Limiar modelado.	POSITIVO Aneugênese (≥0,2 µg/ml) NOEL = 0,1µg/ml)

	bloqueados em citocinese (sondas centroméricas para cromossomos 1 e 17). II) Análise de perda cromossômica pela identificação de MN com centrômeros (sonda pan-centromérica).	• à não-disjunção; • Indução de aneuploidia em concentrações $\geq 0,2$ $\mu\text{g/ml}$.		
Marshall et al., 1996 apud ¹ APVMA (2009); JMPR/FAO (2005); EFSA	Pureza: 99,7%. Linhagem: Culturas de linfócitos humanos. Delineamento: Teste de MN. Exposição de linfócitos humanos ao CBZ (0-5 $\mu\text{g/ml}$), S9⁺ e S9⁻. Análise de linfócitos humanos binucleados com bloqueio da citocinese, com uso de FISH e marcação de centrômeros/cinetócoros.	• Desfecho de não-disjunção ocorreu com maior frequência e, geralmente, em concentrações inferiores àquelas associadas à perda e ao ganho cromossômico, sendo o evento aneugênico o mais sensível para a determinação de limiar. • Formato quase idêntico das dose-resposta para os seis cromossomos para os diferentes desfechos	• Lâminas hibridizadas com sondas de DNA centroméricas específicas para seis cromossomos humanos: 1 e 8 (trisomias associadas a vários tipos de tumor), 11 (associado ao tumor de Wilm), 17 (associado ao gene p53 e predisposição ao câncer de mama) e X e 18 (frequentemente associados a aneuploidias). • Análise de 1000 células, em	POSITIVO Aneugênese ($\geq 0,6$ $\mu\text{g/ml}$) NOEL = 0,5 $\mu\text{g/ml}$)

		investigados; • Limiares para não-disjunção: 600 ng/ml – cromossomos 17 e X; 700 ng/ml – cromossomo 1; e 800 ng/ml – cromossomos 8, 11 e 18.	duplicata, com classificação das anormalidades numéricas em: perda ou ganho cromossômico, não-disjunção ou poliploidia.	
Vigreux et al., 1998	Pureza: >99% Linhagem: CHO-K1. Delineamento: Aberração cromossômica (estrutural e numérica). Exposição de células CHO ao CBZ (0, 25, 50 e 100 µM) por 4h, com posterior incubação por 18h até a amostragem. Uso de controle positivo (Etoposida) e negativo.	• Ausência de aberrações estruturais (cromossomos/cromátides); • Presença de poliploidias: ↑sg em todas as doses testadas, com ausência de citotoxicidade.	• Análise de 100 metáfases (RD OECD 473: ≥300), mas pode ser reduzido pelo grande nº de células com aberração; • Aberrações estruturais: tipo cromossômica e cromatídica (quebras e trocas). • Autores relatam aberrações numéricas (poliploidia); • Citotoxicidade avaliada pelo método XTT, em 2d pós-	POSITIVO Aneugênese (≥5 µg/ml)

			tratamento (RD OECD 473 cita métodos RPD e RICC); • Citotoxicidade < 50% na maior dose; • Dose mais alta de 250 µM, por insolubilidade em DMSO.	
Elhajouji et al., 1998	Pureza: Alta (%NI) Linhagem: Cultura de linfócitos humanos de sangue periférico; Delineamento: Ensaio de MN. Exposição das células ao CBZ (0,03-2,0 µg/ml), S9, 24h após a estimulação mitógena (PHA), com duração de 48h; adição de cito B em 44h e amostragem em 72h de incubação.	• ↑ dose-dependente e na frequência de MN em células mononucleadas, com ↑sg nas maiores concentrações; • Maior frequência de MN em células binucleadas (dados de Elhajouji et al., 1995), do que em mononucleadas: MN encontrados nos mononucleados contêm essencialmente cromossomos perdidos, ao invés de	• Estudo não relata método para avaliação da citotoxicidade; • Ausência de comparação com o controle negativo; • Ensaio em duplicata e análise de 1000 linfócitos mononucleados; • Autores discutiram que o ↑MN em mononucleados ocorre mais tardiamente, em comparação aos binucleados	INCONCLUSIVO

		fragmentos acêntricos característicos de clastogenicidade; • Não-disjunção é o desfecho mais sensível para aneuploidia induzida por CBZ.	s. Logo, esse desfecho não pode ser usado como marcador precoce. Entretanto, a análise de simultânea permite discriminar MN recém-formados (em binucleados) daqueles persistentes a efeitos iniciais dos compostos (em mononucleados).	
Bentley et al., 2000¹ apud APVMA (2009); JMPR/FAO (2005)	Pureza: Benomil (95%) e CBZ (97%). Linhagem: Cultura de linfócitos humanos. Delineamento: Teste de MN. Exposição de linfócitos humanos ao Benomil e ao CBZ (0-500 µM), S9. Análise de linfócitos humanos binucleados com bloqueio da citocinese, com uso de FISH e marcação de centrômeros/cinetócoros. Investigação de 6 cromossomos humanos (pares 1 e 8; 11 e 18; X e 17).	• Não-disjunção foi o desfecho mais sensível para detecção de aneuploidia, com limiares de dose consistentes entre os seis cromossomos analisados; • Indução de aneuploidia (inibição do fuso mitótico) por ambos	• Em meio aquoso, a meia-vida do Benomil foi relatada como sendo ~2h. Portanto, presumiu-se que, nas condições do estudo, o Benomil se dissociou em CBZ e n-butilisocianato; • Anormalidades classificadas como perda ou	POSITIVO Aneugênese (≥0,6 µg/ml NOEL= 0,5 µg/ml)

		os compostos testados, com dose-resposta e faixa de limiar de dose quase equimolar: 3,2 – 4,3 e 3,8 – 4,1 μ M para CBZ e Benomil, respectivamente.	ganho de cromossomo, não disjunção ou poliploidia.	
De Stoppelaar et al., 2000.	Pureza: Alta (%NI) Linhagem: Fibroblastos da pele de ratos wistar σ; Delineamento: Teste de MN <i>in vitro</i> com GPA: após 72h da indução da bolsa de granuloma (n=10) – coleta de fibroblastos, exposição ao CBZ, incubação na presença (CBZ 0; 0,5; 1; 2,5; 5 μg/ml) e ausência de citoB (CBZ 0; 1; 2,5; 5; 10; 20 μg/ml). Preparo das lâminas e análise por FISH (sonda centromérica geral e combinações de sondas para cromossomos específicos (19p + 19q, 4q + Yq) – verificação de não disjunção, poliploidia, perda cromossômica.	• Ausência de clastogênese; • $\uparrow$sg aneuploidia, sendo não-disjunção o erro prevalente; • $\uparrow$sg e dose-dependente e na frequência MN em células binucleadas ($\geq 2,5$ mg/mL); • $\uparrow$sg perda cromossômica (1 e 2,5 μg/ml) e $\uparrow$ não-disjunção (2,5 μg/ml), em células binucleadas; • $\downarrow$sg poliploidia no ensaio	• CBZ usado como modelo; • GPA usado no ensaio de MN: injeção subcutânea de ar estéril nas costas dos ratos, com formação de bolsa na qual ocorre proliferação transitória de fibroblastos; injeção de CBZ na bolsa; coleta de fibroblastos e avaliação de aneuploidia; • Análise de 1000 células binucleadas	POSITIVO ($\geq 2,5$ mg/ml)

		com citob e ↑sg dose-dependent e no ensaio sem cito b ($\geq 2,5$ $\mu\text{g/ml}$ - para células mono e binucleadas), indicando que citob interfere na indução de poliploidia pelo CBZ.	s (ensaios <i>in vitro</i>); Foi observado ↑MN e toxicidade (↓% células binucleadas) em 5$\mu\text{g/ml}$. Por isso, efetuou-se avaliação apenas na faixa de dose 0-2,5 $\mu\text{g/ml}$.	
Ermler et al., 2013	Pureza: Alta (%NI) Linhagem: CHO-K1. Delineamento: Teste de MN. Benzimidazóis (inclusive CBZ) testados individualmente e em mistura para avaliar efeito aditivo. Testadas 8 concentrações de cada IA, com bloqueio de citocinese. Contagem de MN automatizada. Citotoxicidade avaliada por ensaio de MTT.	↑ dose-dependent e de MN para CBZ e outros IA, com limiar. Mistura com efeito aditivo (proporcional à concentração); - Limiar modelado CBZ: $1,81 \times 10^{-6}\text{M}$ (IC: $1,4 - 2,34 \times 10^{-6}\text{M}$).	- Ausência de controle positivo; - Nº de células contabilizadas >1000 (RD OECD: ≥ 2000); - Sistema automatizado do subestímulo a contagem de MN (avaliação conservadora para reduzir contagem de falsos-positivos); - Doses não claramente relatadas;	POSITIVO (NOEL=0,27 $\mu\text{g/ml}$)

S9⁺: com ativação metabólica; S9⁻: sem ativação metabólica; CBZ: Carbendazim; MN: micronúcleo; CHO: células de ovário de hamster chinês; CHL: células de pulmão de hamster chinês; sg: significativo; RD OECD: Recomendação Diretriz OECD; NOEL: Nível sem Efeito

Observável (*No Observed Effect Level*); IR: Índice de replicação; citoB: citocalasina b; IM: Índice mitótico; PHA: fito-hemaglutinina; RICC: Aumento relativo na contagem de células; FISH: hibridação fluorescente *in situ*; GPA: Ensaio de bolsa de granuloma (*granuloma pouch assay*); MTT: ensaio de redução de tetrazolium; NI: não informada.

¹ As abordagens utilizadas pelas principais agências reguladoras internacionais foram similares e alinhadas ao racional seguido pela Anvisa, sem haver necessidade de avaliação direta do estudo original.

2.2 Estudos *in vivo*

2.2.1 Mutação pontual em células somáticas de mamíferos

Foram identificados apenas três estudos regulatórios de mutação pontual *in vivo* em células somáticas no relatório da EFSA (2009a) e PMRA (2011). Nesses estudos, o CBZ não induziu recombinação somática, mutações pontuais, quebra ou perda de cromossomos em *Drosophila melanogaster* (Mollet, 1976; Lamb e Lilly, 1980 apud EFSA, 2009a e PMRA, 2011). A EFSA concluiu ainda que a esterilidade observada nas ninhadas é compatível com o efeito do CBZ de inibição dos fusos mitóticos. Em um ensaio de mancha em camundongo (Fahring & Seiler, 1978 apud EFSA, 2009a), observou-se fraca atividade mutagênica. Porém, devido à ausência de reprodutibilidade desse efeito e à incerteza quanto à pureza da amostra, a EFSA (2009a) considerou duvidosa a relevância biológica dessa evidência.

Embora os estudos disponíveis *in vivo* para mutação pontual não sejam tão adequados, por não terem sido realizados em mamíferos ou pela quantidade de limitações, não há qualquer evidência de que o CBZ seja capaz de induzir mutações gênicas, o que é corroborado pelos resultados consistentemente negativos *in vitro*, tanto nos ensaios de Ames quanto em células de mamíferos (itens 2.1 e 2.2).

2.2.2 Aberração cromossômica em células somáticas de mamíferos

A FT avaliou 31 estudos *in vivo* em roedores que investigaram o potencial de dano cromossômico do CBZ em células somáticas, por meio do ensaio de MN. Entretanto, foram incluídos estudos conduzidos com produtos formulados, os quais não são objeto desta reavaliação e, por isso, não foram abordados nesse parecer. Ainda, a FT adicionou 9 estudos da literatura científica e concluiu que 5 deles evidenciaram a indução de MN após exposição oral ao CBZ, indicando como LOAEL o valor de 62,5 mg/kg p.c..

No Quadro 4, foram detalhados os estudos relevantes mencionados pela FT (conduzidos com produtos técnicos), como também aqueles selecionados na busca sistemática realizada pela CREAMV. Houve divergência na análise de alguns estudos (Costa, 2001; Costa, 2009; Bastelli, 2012), considerados negativos pela FT, porém classificados como

inconclusivos pela CREAV, devido às limitações encontradas. Vale ressaltar que foi verificado nesses estudos um aumento na frequência de MN, o qual, embora não significativo pela análise estatística empregada no próprio estudo, ocorreu acima do controle histórico, foi duas vezes superior ao controle concorrente ou compatível com os valores observados no estudo regulatório positivo de Bentley (1992). Os estudos regulatórios mencionados pela FT (Meyer et al., 1980, Muller, 1990; Ashby & Tinwell, 2001; Yu, 1997) não foram analisados pela CREAV, pois não fazem parte dos documentos das empresas registrantes no Brasil. Porém, foram incluídos nas análises das demais autoridades internacionais discutidas neste parecer. As abordagens utilizadas pelas principais agências reguladoras internacionais foram similares e alinhadas ao racional seguido pela Anvisa.

Após a análise de todos os estudos do Quadro 4, bem como dos relatórios das agências internacionais, resta claro que o CBZ induz aberrações cromossômicas *in vivo* (micronúcleo) em mamíferos. Vários estudos investigaram a indução de MN, após administração oral de CBZ, que é a via mais relevante para humanos, utilizando diferentes tipos celulares. Observou-se consistentemente aumento na frequência de MN em eritrócitos do sangue periférico (200 mg/kg p.c.), além de células epiteliais (500 mg/kg p.c.), hepáticas (62,5 mg/kg p.c.) e duodenais (500 mg/kg p.c.). Os estudos de Bentley et al. (1992) e Sarraf et al. (1994) – conduzidos com CBZ e Benomil, respectivamente – mostram ainda que esse aumento na frequência de MN decorre, predominantemente, da indução de aneuploidia e não de aberrações cromossômicas estruturais.

Com uma análise semelhante, mas avaliando outros estudos regulatórios, a APVMA (2009), a JMPR/ FAO (2005) e a EFSA (2009a) concluíram que houve indução de MN em eritrócitos policromáticos da medula óssea de camundongos e ratos expostos a doses superiores a 50 mg/kg p.c. pela via oral (Mayer & Kramer, 1980; Mayer et al., 1980; Seiler, 1976; Seiler, 1980; Bentley, 1992 apud EFSA, 2009a; Ashby & Tinwell, 2001 apud APVMA, 2009). Ainda, um estudo de MN em células epiteliais do cólon de camundongos (Vanhauwaert et al., 2001), com dose única via oral (gavagem), também constatou a formação de MN, em doses ≥ 500 mg/kg p.c.. Por outro lado, três estudos de MN na medula óssea de camundongo, após dose única via gavagem, apresentaram resultados negativos (Yu, 1997a, 1997b; Mueller, 1990 apud APVMA, 2009 e FAO, 2005). O estudo de Muller (1990) foi considerado inadequado pela EFSA (2009a) devido às suas limitações. Ainda, os estudos de Bentley et al. (1992), Sarraf et al. (1994) e Ashby & Tinwell (2001) confirmaram a indução de aneuploidia nas células somáticas de roedores (APVMA, 2009; JMPR/ FAO, 2005; EFSA, 2009a).

Adicionalmente, a EFSA (2009a) concluiu que esses resultados *in vivo* foram consistentes com aqueles obtidos *in vitro*, nos quais

também foram observados MN, poliploidia e aneuploidia, o que confere maior força ao peso da evidência sobre o potencial do CBZ de causar aberrações cromossômicas numéricas.

Segundo a EFSA (2009a), os dados experimentais *in vivo* indicaram uma dose oral bem superior àquela obtida *in vitro* para se atingir concentrações teciduais ou sanguíneas efetivas, já que uma única exposição oral de 50 mg/kg p.c. não aumentou a frequência de eritrócitos micronucleados na medula óssea. Na discussão da USEPA (2014; 2020), há um alinhamento quanto à indução de MN em doses superiores a 100 mg/kg p.c. (ausência de efeitos na dose de 50 mg/kg p.c. em estudo de MN na medula óssea de mamífero), como também ao fato de que esses efeitos decorrem de aneuploidia. Similarmente, a PMRA (2011) considerou o CBZ como um agente aneugênico, com base em evidências obtidas em sete estudos de MN *in vivo*. Por outro lado, o seu potencial clastogênico foi excluído a partir dos resultados negativos obtidos nos oito estudos *in vivo* avaliados.

A partir da análise dos estudos regulatórios, da literatura científica e das discussões feitas pelas autoridades regulatórias internacionais, verifica-se que há evidência suficiente de que o CBZ é um agente aneugênico, capaz de induzir aberrações cromossômicas numéricas não apenas *in vitro*, em células de mamíferos, mas também *in vivo* em mamíferos, em doses superiores a 50 mg/kg p.c. nos protocolos experimentais utilizados.

Quadro 4. Avaliação da mutagenicidade do ingrediente ativo CBZ <i>in vivo</i> em células somáticas de mamíferos (aberração cromossômica).				
Referência	Protocolo	Resultados segundo autor	Limitações, inconsistências e considerações relevantes	Conclusão
Bentley, 1992 (Bayer)	Pureza: PT (%NI) Linhagem: camundongos B6D2F1/Cr-1BR; Delineamento: Administração vo (66, 1646 e 3293 mg/kg p.c.); n = 5♀ e 5♂/grupo. Amostragem em 48h após última dose (coleta de células da medula óssea). Teste de MN com	↑sg e dose-dependente de MN e de MN com cinetócitos em 1646 e 3293 mg/kg em fêmeas e em 3293 mg/kg em machos. - Indução de MN predominantemente com cinetócito,	- Maior dose: toxicidade e à medula óssea (redução da proporção de PCE/1000 eritrócitos); - Contagem de 1000 PCE (RD	POSITIVO Aneugênese (LOAEL = 1646 mg/kg p.c.)

	imunofluorescência para cinetocoro.	indicando presença de cromossomos intactos - indução de aneuploidia.	OECD 474: 4000); Dados do controle concorrente dentro do controle histórico;	
Barale et al., 1993	Pureza: Benomil 99% e CBZ 95%; Linhagem: Camundongos <i>Swiss</i> ; Delineamento: Administração (1000 mg/kg p.c.); n = 4 ou mais animais/grupo. Amostragem em 6 – 48h pós-tratamento (coleta de células da medula óssea). Teste de MN.	↑sg MN, aneuploidia, hiperdiploidia e poliploidia, principalmente em 30, 38 e 40h. - Indução menos evidente de quebras cromossômicas e lacunas.	- Ausência de controle positivo; - Dose única; 3000 PCE contabilizados (RD OECD 474 : 4000); - Nº animais abaixo do RD OECD 474 (5).	POSITIVO Micronúcleo (LOAEL = 1000 mg/kg p.c.)
Sarrif et al., 1994 ¹ Apud JMP R/FAO (2005)	Pureza: Benomil 99,3%. Linhagem: Camundongos B6D2F1/Cr-1BR ♂ e ♀; Delineamento: Teste de MN. Administração em dose única (gavagem; 66, 1646 ou 3293 mg/kg p.c.). Eutanásia após 48h; análise de MN em PCE da medula óssea, com marcação de anticorpos imunofluorescentes anti-cinetocoro.	↑sg com dose-resposta de MN-PCE totais e MN-PCE com cinetócoro, em fêmeas (1646 e 3293 mg/kg p.c.) e em machos (3293 mg/kg p.c.); - MNPCE c/ cinetócoro >80%; ↑sg MN-PCEs/ cinetócoro em fêmeas (3293 mg / kg p.c.) não considerado evidência de clastogenicidade	- Ciclofosfamida e sulfato de vincristina usados como controles clastogênicos e aneugênicos positivos, respectivamente; - Seleção de doses: estudo preliminar com toxicidade da medula óssea (↓PCE/1000	POSITIVO Aneugênese (LOAEL=1646 mg/kg p.c.)

		ade (↑similar ao controle positivo aneugênico); • ↓sg proporção de PCE/1000 eritrócitos em fêmeas (1646 e 3293 mg/kg p.c.).	eritrócitos nos maiores níveis de dose);	
Vargas, 1995 (Adama)	Pureza: PT (95%); Linhagem: Camundongos Swiss ♀ e ♂; Delineamento: Teste de MN. Administração ip (390, 780 e 1170 mg/kg p.c.); 2 aplicações com intervalo de 24 horas; 5♀ e 5♂/grupo. Amostragem em 24h após última dose (coleta de células da medula óssea).	• Sem ↑sg de MN nas doses testadas.	• Maior dose: 75% da dose letal; • Contagem de 1000 PCE (RD OECD 474: 4000); • Sem dados de controle histórico.	INCONCLUSIVO
Costa, 2001 (UPL)	Pureza: PT (98%). Linhagem: camundongos Swiss ♀ e ♂. Delineamento: Administração ip (1000, 2000 e 3000 mg/kg p.c.); 2 aplicações com intervalo de 24h; 5♀ e 5♂/grupo. Amostragem em 24h após última dose (coleta de células da MO). Teste de MN.	• Sem ↑sg de MN. • Porém, ↑ aparentemente dose-dependente e maior do que o dobro do controle negativo.	• Maior dose: 75% da dose letal; • Contagem de 1000 PCE (RD OECD 474: 4000); • Sem dados de controle histórico; • Não foi feito teste de tendência.	INCONCLUSIVO

Vanhouw et al., 2001¹ Apud APVMA (2009); JMPR/FAO (2005)	Pureza: 97%. Linhagem: Camundongos Swiss. Delineamento: Administração em dose única (vo; 500 ou 1000 mg/kg p.c.). Eutanásia em 24 ou 48h. Análise de MN em amostras de células epiteliais intestinais e de medula óssea.	• ↑sg MN em ambas as doses e intervalos de amostragem (em células epiteliais), sem efeito dose-dependente; • Apesar de o estudo ter relatado ausência de ↑sg MN na MO, os dados apresentados mostram ↑ de 5x e 3x de MN em PCE, em 24h, nas doses de 500 e 1000 mg/kg p.c., respectivamente.	• Análise de 1000 células epiteliais intestinais. Tipo de célula não previsto na RD OECD 474.	POSITIVO Micronúcleo em células epiteliais (LOAEL=500 mg/kg p.c.)
Igarashi et al., 2007	Pureza: Alta; Linhagem: Camundongos ddY ♂; Delineamento: Teste de MN. Administração única vo (125, 250, 500 e 1000 mg/kg) 1 dia antes ou depois de HP, com amostragem de hepatócitos no dia 6. Avaliação da incidência de hepatócitos micronucleados, número de núcleos, índice de proliferação hepatócitos (HPI) e pesos relativos do fígado.	• Efeitos sg somente com administração após HP; • ↑sg MN (todas as doses); ↑sg células binucleadas (1000 mg/kg) e multinucleadas (250, 500 e 100 mg/kg); ↑ HPI; • Indução de fragmentação nuclear (apoptose) nas doses de 250 (0,3%), 500 (11,8%)	• Ausência de controle positivo; • Grupos de 3-5 machos (RD OECD 474 : 5); • Avaliação de 2000 hepatócitos intactos (tipo de célula não previsto na RD OECD 474); • Cálculo do HPI pela	POSITIVO Micronúcleo em hepatócitos (LOAEL = 125 mg/kg p.c.)

		e 1000 mg/kg (0,7%).	mesma fórmula do Índice de Proliferação de Bloqueio de Citocines e;	
Costa, 2008 (Ourofino)	Pureza: PT (98%); Linhagem: Camundongos Swiss ♀ e ♂. Delineamento: Teste de MN. Administração ip (125, 250 e 500 mg/kg p.c.), 2 aplicações com intervalo de 24 horas; 5♀ e 5♂/ grupo. Amostragem em 24h após última dose (coleta de células da medula óssea).	Sem ↑sg de MN nas doses testadas.	- Contagem de 2000 PCE (RD OECD 474: 4000); - Dados dentro do controle histórico.	NEGATIVO
Costa, 2009 (UPL)	Pureza: PT (>98%); Linhagem: Camundongos Swiss ♀ e ♂; Delineamento: Teste de MN. Administração ip (2000 mg/kg p.c.), 2 aplicações com intervalo de 24 horas; 5♀ e 5♂/ grupo. Amostragem em 24h após última dose (coleta de células da medula óssea).	Sem ↑sg de MN, mas houve ↑ maior do que o dobro do controle negativo, acima do controle histórico.	- Contagem de 2000 PCE (RD OECD 474: 4000); - Uma única dose testada.	INCONCLUSIVO
Coffing et al., 2011	Pureza: Alta (%NI) Linhagem: Ratos <i>Sprague Dawley</i> ; Delineamento: Modificação do protocolo de MN para avaliação da mutagenicidade em células do cólon e duodeno de ratos.	↑sg PCE no ensaio com células da medula óssea, indicando ocorrência de toxicidade, com ↑sg	Nº animais abaixo do recomendado pela RD	POSITIVO Micronúcleo; eritrócitos (ip - LOAEL=2000 mg/kg p.c.) TGI (vo - LOAEL=500 mg/kg p.c.)

	Administração diária (2 dias – 500, 1000 e 2000 mg/kg; vo e ip, n=4). Coleta de células da medula óssea, duodeno e cólon.	MN na maior dose; - No cólon, não houve alteração sg em nenhuma dose. No duodeno, observou-se ↑sg MN em todas as doses. - Diferenças na formação de MN nos diferentes tecidos.	OECD 474 (5); Protocolo proposto mostrou que uso de células do TGI pode ser uma alternativa para a avaliação de MN.	
Bowen et al., 2011	Pureza: Alta (%NI) Linhagem: Ratos ♂ Han-Wistar; Delineamento: Ensaio de MN em eritrócitos de medula óssea e reticulócitos. Administração repetida vo (gavagem – 1000, 1500 e 2000 mg/kg p.c.) em 0, 24h e 45h. Amostragem: I) Grupo principal (n = 6): coleta em 24h após 2ª dose (T₄₈); II) Grupo satélite (n = 5): coletas em 24h (T₆₉) e 44h (T₈₉) após 3ª dose.	- Ausência de mortalidade, sinais clínicos de toxicidade ou ↓ ganho de peso; 1500 e 2000 mg/kg p.c.: citotoxicidade e na medula óssea (↓sg PCE) e sangue periférico (↓sg reticulócitos); ↑sg e dose-dependente MN em reticulócitos (2x maior que controle, acima do intervalo de confiança de 95% do controle histórico); ↑sg MN-PCE, nas 3 doses testadas.	- Maior dose: DMT; - Ausência de controle positivo; - Registro diário de peso corporal e sinais clínicos; - Citometria de fluxo para separação de reticulócitos no sangue periférico; - Análise de 2000 PCE (RD OECD 474: 4000) e de MN em reticulócitos em 20000	POSITIVO Micronúcleo em eritrócitos de MO e reticulócitos (LOAEL = 1000 mg/kg p.c.)

			reticulócitos/ amostra.	
Bastelli, 2012 (Nortox)	Pureza: PT (99%); Linhagem: Camundongos Swiss ♀ e ♂; Delineamento: Teste de MN. Administração ip (2000 mg/kg p.c.), 2 aplicações com intervalo de 24h; 5♀ e 5♂/ grupo. Amostragem em 24h após última dose (coleta de células da medula óssea).	Sem ↑sg MN, mas houve ↑ maior do que o dobro do controle negativo para machos, acima do controle histórico.	- Contagem de 2000 PCE (RD OECD 474: 4000); - Uma única dose testada.	INCONCLUSIVO
Itoh et al., 2012a	Pureza: Alta (%NI) Linhagem: Ratos F344/ DuCrIcrlj ♀ e ♂; Delineamento: Teste de MN em hepatócitos. Administração única vo (gavagem – 62,5 e 125 mg/kg; n = 4) logo após hepatectomia parcial (D ₁), com eutanásia e coleta de hepatócitos no D ₄ ; análise de HMN por microscopia de fluorescência. Controle positivo: colchicina.	↑sg dose-dependente HMN (nas duas doses), com maior incidência em ♂ que em ♀; - Sem alteração no peso relativo do fígado, na frequência de células mono e multinucleadas, bem como de células em metáfase e com fragmentos nucleares; ↑ células binucleadas, nos dois níveis de dose, apenas em machos.	2 níveis de dose utilizados ao invés de 3; - Análise de 2000 hepatócitos; - Registro do nº células metafásicas e com fragmentos nucleares.	POSITIVO Micronúcleo em hepatócitos (LOAEL = 62,5mg/kg)
Itoh et al., 2012b	Pureza: Alta (%NI) Linhagem: Ratos ♂ F344;	CBZ não induziu MN quando administrado	CBZ usado como modelo para	POSITIVO Micronúcleo em hepatócitos

	Delineamento: Teste de MN em hepatócitos. Administração vo (gavagem – 62,5; 125; 250 mg/kg, n = 4) no dia anterior ou posterior à HP, com eutanásia e coleta de hepatócitos no D₄.	antes da HP, mas houve ↑sg MN na menor dose para exposição após HP. (resultado semelhante à Colchicina). Demonstrou-se que, em ratos, assim como camundongos (estudo prévio), é necessária a dosagem após HP para detecção de MN.	validação do ensaio.; Pequeno grupo amostral (4 animais/grupo).	(LOAEL = 62,5 mg/kg)
Itoh et al., 2015a	Pureza: Alta (%NI) Linhagem: Ratos ♂ F344; Delineamento: Teste de MN em hepatócitos. Administração vo (gavagem - 0; 62,5; 125; 250 mg/kg; n = 4, 5, 5, 4 animais, respectivamente) nos dias anterior e posterior à HP, com eutanásia e coleta de hepatócitos em 3 dias após a 2ª dose, ou seja, no D₄. Grupo controle positivo: colchicina (0; 0,5; 1; 2 mg/kg; n = 5). 1ª dose no D₁, com HP no D₂; 2ª dose no D₃; remoção do fígado em regeneração no D₆.	- CBZ e Colchicina: ↑ sg e dose-dependente de MN nos hepatócitos, a partir da menor dose testada, sem ↑ no peso relativo do fígado; - Incidência de células binucleadas em 125 e 250 mg/kg CBZ foi maior do que no controle, sugerindo a inibição da regeneração hepática; - Ocorreu incidência relativamente alta de	2000 hepatócitos analisados; - Anteriormente, mostraram que, no ensaio de MN em hepatócitos, as substâncias clastogênicas precisam ser administradas antes da HP e as aneugênicas após a HP; - Nesse estudo,	POSITIVO Micronúcleo em hepatócitos (LOAEL = 62,5 mg/kg p.c.)

		células em metáfase, células multinucleadas e fragmentos nucleares na maior dose de CBZ, respostas típicas de indutores de aberrações cromossômicas numéricas; • A exposição anteriormente e posteriormente à hepatectomia produz resultados semelhantes a quando o composto é administrado antes ou depois da hepatectomia (Itoh et al., 2012b).	foi demonstrado que substâncias clastogênicas e aneugênicas podem ser avaliadas num mesmo ensaio e com o mesmo regime de dose; • Pequeno grupo amostral (CBZ teve perda de animal no controle, por erro na HP; e de dados de um animal na menor dose, por falha na perfusão) ; • CBZ usado como modelo.	
Itoh et al., 2015b	Pureza: Alta (%NI) Linhagem: Ratos F344/ DuCrI CrIj ♂; Delineamento: Teste de MN em hepatócitos (n = 4), adaptado de estudo prévio (Itoh et al., 2012), com objetivo de avaliar o impacto da administração concomitante de	• Sem alteração significativa no peso corporal; • Administração concomitante de CBZ e buprenorfina (duas doses testadas)	• Somente um nível de dose utilizado; • Contagem de 2000 hepatócitos; • A conclusão como positivo	NÃO RELEVANTE

	CBZ com analgésico buprenorfina. Administração única de CBZ vo (gavagem - 125 mg/kg) pós-HP (D₁); administração concomitante de buprenorfina (15 e 30 µg/kg; 2x dia por 2d pós-HP). Eutanásia e coleta de hepatócitos no D₄; análise de HMN por microscopia de fluorescência.	induziu ↑sg na frequência de HMN, em comparação ao tratamento com CBZ isoladamente; bem como induziu ↑ na toxicidade geral; • Conclusão do estudo: Administração de buprenorfina (destinada à redução da dor provocada pela HP) é contraindicada para esse tipo de ensaio.	se refere ao resultado já descrito no estudo prévio (Itoh et al., 2012): ↑sg frequência de HMN na dose de 125 mg/kg em comparação ao veículo), uma vez que não foram relatados, no presente estudo, análises estatísticas referentes à exposição somente ao CBZ.	
Hashem et al., 2017	Pureza: 98%. Linhagem: ratos <i>Sprague-Dawley</i> ♀. Delineamento: Administração vo (gavagem – 200 mg/kg p.c., n=8) por 2 semanas. Amostragem em 0 e 15d após a última dosagem; I) Teste de MN: n=8, triplicata, contagem de 1000 eritrócitos micronucleados;	• ↑sg MN, fragmentação de DNA e aberração cromossômica (deleção, quebras, lacunas, associação, fragmentação, formação de anéis; haploidia; poliploidia; monossomia);	• Somente um nível de dose utilizado; • Citotoxicidade não relatada; • CBZ usado como modelo; • Análise de MN em número inferior de células (RD OECD 474: 4000)	POSITIVO Micronúcleo em eritrócitos do sangue periférico; aberração cromossômica na MO (LOAEL = 200 mg/kg/p.c.)

	II) aberração cromossômica em medula óssea: n=5, análise de 200 metáfases/ animal; III) Fragmentação de DNA: n = 8, extração de tecido hepático, eletroforese e análise.	Retorno aos níveis próximos ao basal em 15 dias após tratamento (somente para aberração cromossômica).	PCE/animal); Análise de aberração cromossômica com amostragem divergente da RD OECD 475: coleta da medula óssea 12-18h após tratamento e 24h após primeira amostragem.	
De Stoppelaar et al., 2000.	Pureza: Alta (%NI) Linhagem: Fibroblastos da pele de ratos wistar ♂; Delineamento: Teste de MN <i>in vivo</i> com GPA (n=6): após 48h da indução da bolsa de granuloma (injeção subcutânea de ar estéril para proliferação de fibroblastos) – injeção simultânea de CBZ (0; 2,5; 5,0; 10 mg/bolsa) e citoB na bolsa, com coleta de fibroblastos em 48h pós-tratamento. Preparo das lâminas e análise por FISH (sonda centromérica geral e combinações de sondas para cromossomos específicos (19p + 19q, 4q + Yq) –	- Ausência de clastogênese ; ↑sg aneuploidia, sendo a não-disjunção o erro prevalente; ↑sg e dose-dependente na frequência MN em células binucleadas (≥ 2,5 mg/mL); ↑sg perda cromossômica; ↑dose-dependente de não-disjunção cromossômica;	- CBZ usado como modelo; - Análise do maior nº possível de células binucleadas em 2-3 três lâminas, em vez das 1000 células habituais (devido à baixa frequência de células binucleadas nas lâminas).	POSITIVO ≥ 2,5 mg/bolsa (equivalente a ~12 mg/kg p.c.)

	verificação de não disjunção, poliploidia, perda cromossômica.	• ↓ frequência de poliploidia (dados <i>in vitro</i> indicaram que citob interfere na indução de poliploidia pelo CBZ).		

PT: produto técnico; TGI: Trato gastrointestinal; vo: via oral (gavagem); MN: micronúcleo; sg: Significativo; PCE: Eritrócitos policromáticos; MN-PCE: Eritrócitos policromáticos com micronúcleo; LOAEL: Dose mais baixa de efeito adverso observável: (*Lowest observed adverse effect level*); ip: intraperitoneal; HP: hepatectomia parcial; HMN: Hepatócitos com micronúcleo; DMT: máxima dose tolerável; RD OECD: Recomendação Diretriz OECD; NI: não informada.

¹ As abordagens utilizadas pelas principais agências reguladoras internacionais foram similares e alinhadas ao racional seguido pela Anvisa, sem haver necessidade de avaliação direta do estudo original.

2.2.3 Mutagenicidade em células germinativas de mamíferos

A FT apresentou quatro estudos *in vivo* com células germinativas. Embora dois não tenham sido analisados diretamente pela CREAV (Hofman e Peh, 1973; Costa et al., 2001), suas análises foram efetuadas por outras agências reguladoras e incluídas na discussão deste parecer. Os estudos *in vivo* com células germinativas, tanto regulatórios quanto da literatura científica, avaliados pela CREAV, foram incluídos no Quadro 5.

A PMRA (2011) teve acesso a uma maior quantidade de estudos regulatórios (quatro ensaios de dominante letal em ratos e camundongos), sendo todos eles considerados negativos. Em um estudo com administração oral de CBZ (gavagem – doses de até 500 mg/kg p.c.) a camundongos machos, não foi observado efeito aneugênico em espermatozoides. Por outro lado, em dois outros estudos *in vivo* foram observadas aberrações cromossômicas em espermatozoides de rato, sendo um deles na dose única de 100 mg/kg p.c.. Ainda, a PMRA (2011) concluiu que houve aumento de aneuploidia em ovócitos de hamsters, a partir da análise de um outro estudo, no qual também foi evidenciado que altas doses agudas, administradas durante a meiose I (maturação do ovócito) ou meiose II (fertilização), podem ter acarretado perda embrionária precoce.

A APVMA (2009) relatou um aumento estatisticamente significativo de aneuploidia em espermátides de ratos, após administração única via oral de CBZ, somente no nível de dose intermediária (100 mg/kg p.c.) (Matsuo et al., 1999). Além disso, também foi relatada indução de

aneuploidia em oócito de hamster sírio, após dose única via gavagem (1.000 mg/kg p.c.) (Costa et al., 2001). Ainda, no estudo de De Stopplaar e colaboradores (1999), verificou-se indução de espermatozoides diplóides em ratos pela exposição ao CBZ, na maior dose testada (800 mg/ kg p.c). Embora não tenha sido constatado aumento na frequência de MN em eritrócitos periféricos, a APVMA (2009) ressalta que a análise de amostras de sangue periférico de ratos para verificação de MN foi provavelmente prejudicada pelo tempo de amostragem selecionado, pois eritrócitos micronucleados podem ter sido removidos pelo baço.

Segundo a EFSA (2009a), aberrações cromossômicas ou mutações letais não foram induzidas pelo CBZ ou pelo Benomil, em células germinativas de roedores (Sarrif, 1991; Hoffman e Peh, 1973; Hofmann e Peh, 1974). Ainda, Mailhes & Aardema (1992) não observaram indução de aberrações estruturais após a exposição de camundongos ao Benomil, contudo houve atraso meiótico e aneuploidia em oócitos. A EFSA (2009a) discutiu ainda que o estudo de Matsuo e colaboradores (1999) corrobora a dose estimada como limiar *in vivo* em células somáticas para camundongos, uma vez que nele foi demonstrado o aumento na frequência de MN em espermátides de ratos, em doses a partir de 50 mg/kg p.c., valor que poderia ser escolhido como NOEL.

A JMPR/ FAO (2005) incluiu em sua análise esses mesmos estudos, alcançando conclusões similares sobre os seus resultados: ausência de evidência de anormalidades estruturais induzidas pelo CBZ, mas presença de resultados positivos indicativos da ocorrência de aneuploidia em células germinativas (Matsuo et al., 1999; Jeffay et al., 1996; de Stoppelaar et al., 1999). Por fim, a USEPA (2014; 2020) foi a única agência internacional consultada que não discutiu os resultados de estudos *in vivo* em células germinativas de mamíferos.

Verifica-se, a partir da análise dos estudos regulatórios e da literatura científica, que há evidência de indução de dano cromossômico (aneuploidia em células germinativas de mamíferos – espermatozoides e ovócitos) após exposição ao CBZ. Embora em alguns estudos os animais tenham sido previamente estimulados para superovulação (Mailhes & Aardde, 1992; Zuelke & Perreault, 1995), o que diminui sua força como evidência, os resultados são consistentes com a ação do CBZ relatada em outros estudos *in vivo* e, desse modo, não devem ser completamente descartados. Ainda, considera-se que a dose de 50 mg/kg p.c., obtida no estudo de Matsuo (1999), não possa ser considerada um limiar para aneuploidia induzida pelo CBZ, tendo em vista que essa dose já induziu um sutil aumento na frequência de MN em espermátides e, portanto, deve corresponder ao LOAEL. Embora não significativo, tal aumento não pode ter sua significância biológica completamente descartada. Pacchiierotti e

colaboradores (2019) enfatizam a necessidade de não considerar apenas diferenças estatísticas nos estudos citogenéticos, pois isso pode subestimar o potencial aneugênico verdadeiro da substância. A APVMA, ao avaliar esse mesmo estudo, também considerou que os efeitos genotóxicos (MN) já ocorreram em 50 mg/kg p.c.. Em decorrência disso, esse valor foi definido como LOAEL pela agência australiana, sem o estabelecimento de NOAEL, já que essa foi a menor dose testada (APVMA, 2009). A ausência de limiar para este desfecho será detalhadamente discutida no item 4 deste parecer.

A evidência de indução de aneuploidia *in vivo* em células germinativas para o CBZ está em consonância com os resultados obtidos *in vitro*, com células de mamíferos, e *in vivo*, com células somáticas. Portanto, conclui-se que o CBZ é capaz de causar mutações do tipo aberrações cromossômicas numéricas em células germinativas de mamíferos.

Quadro 5. Avaliação da mutagenicidade do ingrediente ativo CBZ <i>in vivo</i> em células germinativas de mamíferos.				
Referência	Protocolo	Resultados segundo autor	Limitações, inconsistências e considerações relevantes	Conclusão
Tates, 1979	Pureza: Não informada. Linhagem: Roedor <i>Microtus oeconomus</i>. Delineamento: Administração vo (gavagem, 250 mg/kg), 2x, intervalo de 24h. Amostragem após 1, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 dias: eutanásia, coleta de túbulos seminíferos e preparo de lâminas. Avaliação de não-disjunção cromossômica e espermatídes diplóides.	• ↑sg frequência de não-disjunção cromossômica em espermatócitos primários jovens no dia 10; • Sem evidência de indução de espermatídes diploides; • Autor relata que são dados iniciais, obtidos em um n° reduzido de animais, sem análise	• Análise de 2000 núcleos esféricos de espermatídes precoces/animal para não-disjunção cromossômica (n+1) e diploidia (2n); • Não informa n° animais; • Somente um nível de dose utilizado; • Ausência de controle positivo e negativo concorrent	INCONCLUSIVO

		em duplicata.	e; adoção de controle negativo não-concorrent e (exposição à radiação).	
Zuelke & Perreault, 1995	Pureza: 95%. Linhagem: Hamsters sírios. Delineamento: Exposição durante a fertilização <i>in vitro</i> (6 µg/mL) e <i>in vivo</i> (1000 mg/kg p.c., gavagem, n=6). Imunofluorescência de microtúbulos, cultura de zigotos e avaliação microscópica dos zigotos e embriões.	- Fertilização <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>: ↑sg anormalidades morfológicas na cromatina materna de zigotos (6-8h; múltiplos corpos polares secundários, múltiplos pronúcleos e arrasto meiótico), e de embriões (26h; blastômeros micronucleados, múltiplos corpos polares secundários e arrasto na metáfase). ↓sg embriões que progrediram para 2 células; - Imunofluorescência	- Indução de superovulação não detalhada; - Pequeno grupo amostral; - Perda precoce na prenhez pode ser explicada por dois mecanismos: arrasto na meiose, sem clivagem do zigoto; ou indução de aneuploidia no zigoto, com subsequente arrasto no desenvolvimento.	POSITIVO CBZ alcança ovário e causa dano aos fusos mitóticos, aneuploidia nos ovócitos e perda pré-implantação (1000 mg/kg)

		confirmou danos aos fusos na fertilização <i>in vitro</i>; • Dose única de CBZ, na fertilização <i>in vivo</i>, induziu aneuploidia no zigoto.		
Jeffay et al., 1996	Pureza: 95%. Linhagem: Hamsters sírios fêmeas. Delineamento: Administração única vo (gavagem, 1000 mg/kg p.c.; n=10). Eutanásia após a ovulação (D₁ pós-tratamento) para amostragem de oócitos e avaliação de aneuploidia; ou entre os dias gestacionais 1-5 (DG 1-5), para avaliar a fertilização e o desenvolvimento do embrião pré-implantação, bem como enumerar sítios de implantação precoces.	• ↑sg ovócitos aneuplóides (37,2% CBZ x 13,5% controle), sem anormalidades estruturais; • Sem alteração na taxa de fertilização e no nº ovócitos recuperados; ↓sg nº médio de sítios de implantação; • Atraso/interrupção no desenvolvimento embrionário pré-implantação: ↑sg embriões com menos de oito células (DG3) e embriões	• CBZ usado como modelo; • Estudo anterior indicou que CBZ induziu perda gestacional precoce quando administrado na tarde do proestro ou no início da manhã do estro, mas não quando administrado após a fertilização; • No presente estudo, CBZ foi administrado na tarde do proestro, coincidindo com a maturação meiótica	POSITIVO CBZ alcança ovário e induz aneuploidia em oócitos, atraso/interrupção no desenvolvimento embrionário pré-implantação e redução nos sítios de implantação. (1000 mg/kg p.c.)

		que não atingiram o estágio de blastocisto (DG4); ↓ implantação; Dados indicam maior sensibilidade do oócito aos efeitos induzidos por CBZ durante a formação do fuso (maturação do ovócito) do que após esse processo.	dos oócitos; 121 e 52 oócitos analisados, nos grupos CBZ e controle, respectivamente.	
Matsuo et al., 1999	Pureza: Não informada; Linhagem: Rato <i>Sprague-Dawley</i>; Delineamento: Administração (gavagem – 0, 50, 100 e 400 mg/kg; n=6). Teste de MN em espermátides, com imunocitoquímica (diferenciar aberrações numéricas e estruturais).	50 mg/kg: leve ↑MN, sem significância estatística; 100 mg/kg: ↑sg espermátides redondas com MN nos estágios I e V, nos dias 1 e 4,5 pós-exposição. Cinetócoros em 68% dos MN; 400 mg/kg: leve ↑MN, sem significância estatística;	- Contagem de 1500 espermátides na fase 1; - É possível que em 400 mg/kg ocorra formação de MN nas espermátides, porém elas não sobrevivem (↓sg espermátides na fase 1 um dia após o tratamento – dados não apresentados).	POSITIVO Micronúcleo em espermátides; aneugênese (≥50 mg/kg)

		• Indução de aberrações cromossômicas numéricas em espermátides, com alta incidência de aneuploidia.		
De Stoppelaar et al., 1999 ¹ Apud APVMA (2009) e JMPR/FAO (2005)	Pureza: Não informada; Linhagem: Ratos <i>Wistar</i>; Delineamento: Administração dose única vo (gavagem – 50, 150, 450 ou 800 mg/kg p.c.; n=3-5). I) Amostragem de espermatozoides epididimários em 31d pós- tratamento (alterações cromossômicas numéricas por FISH - sondas cromossomos 4 e Y); II) Amostragem de eritrócitos periféricos em 48h pós-tratamento (ensaio de MN). Análise adicional subsequente (n=3): Administração CBZ (2,5 a 800 mg/kg p.c.) com análise por FISH (sondas cromossomos 4, 19 e Y).	• Indução de espermatozoides diplóides (800 mg/kg p.c); e ↑ espermatozoides hiperhaplóides em doses ≥ 150 mg/kg p.c. (maioria de espermatozoides diploides); • Sem ↑MN em eritrócitos periféricos. Autores sugeriram que indução de diploidia em espermatozoides poderia ocorrer em doses inferiores àquelas necessárias para a indução de MN em eritrócitos	• Análise de, no mínimo, 10000 espermatozoides/ animal, com categorização adicional de espermatozoides hiperhaplóides (44Y, 4YY, 44) por tamanho nuclear, a fim de se avaliar quais espermatozoides foram realmente diploides; • Análise de 2000 eritrócitos periféricos / animal.	POSITIVO Aneugênese (LOAEL = 150 mg/kg p.c.)

		periféricos. Entretanto, ensaio de MN no sangue periférico provavelmente foi prejudicado pelo tempo de amostragem selecionado (eritrócitos com MN podem ter sido removidos pelo baço).		
Adler et al., 2001, 2002 Apud JMPR /FAO (2005)	Pureza: 99,1%. Linhagem: camundongos C3H ♂ Delineamento: Administração dose única vo (gavagem – 0, 20, 50, 150 ou 500 mg/kg p.c.). Amostragem de espermatozoides epididimários em 22D (controle negativo e tratado) e 24D (controle positivo) pós-tratamento. Análise de alterações cromossômicas numéricas: FISH (sondas cromossomos X, Y e 8).	• Incidência de diploidia relatada como tendo sido induzida em um experimento anterior: 0, 3, 4, 2 e 4 (em aproximadamente 50.000 espermatozoides analisados) nas doses de 0, 20, 50, 150 e 500 mg/kg p.c., respectivamente; • Comparação das incidências agrupadas de espermatozoides	• Grupo controle positivo (colchicina); • Análise de, no mínimo, 10000 espermatozoides/animal, com determinação dos seguintes fenótipos: haplóide normal (X8 ou Y8), hipohaplóide (08, X0 ou Y0), hiperhaplóide (XX8, YY8, XY8, X88 ou Y88) e diploide (XY88, XX88 ou	NEGATIVO

		anormais de todos os animais dentro de um grupo tratado com o grupo controle, resultando em significância estatística. Na reanálise (considerando o animal como unidade experimental), não houve significância estatística, nem dose-resposta.	YY88), de acordo com a combinação de sinais fluorescentes em cada núcleo.	
vo: via oral; CBZ: carbendazim; MN: micronúcleo; LOAEL: <i>Lowest observed adverse effect level</i> (Dose mais baixa de efeito adverso observável); D: dia; DG: dia gestacional; FISH: hibridação fluorescente <i>in situ</i> ; NI: não informada.				

2.3 Outros estudos de genotoxicidade

Foram avaliados alguns ensaios cometas identificados na revisão sistemática, os quais, de forma geral, apresentaram resultados negativos (Quadro 6). Outros estudos de genotoxicidade, como ensaios de troca de cromátides irmãs e de síntese não programada de DNA foram analisados pelas demais agências internacionais. A USEPA (2020) concluiu que o CBZ não induziu a troca de cromátides-irmãs *in vitro* em células de ovário de hamster chinês, porém, nesse mesmo estudo, verificou-se alta incidência de tetraploidia (57-100%). Ainda, a partir da análise de três estudos, verificou-se que o CBZ não induziu a síntese não programada de DNA em hepatócitos primários de ratos (USEPA, 2014). A EFSA (2009a) mencionou ainda o estudo de Tong (1981), que avaliou a ocorrência de síntese não programada de DNA em cultura primária de hepatócitos de rato e camundongo, para concentrações de CBZ de 0,0125 a 125 µg/mL; e o estudo

de Stammberger (1992), que avaliou a síntese não programada de DNA em células humanas, em concentrações de 0,1 a 300 µg/mL. Ambos os estudos foram negativos. Já o resultado do estudo de Greim e Andreae (1981), para síntese não programada de DNA em cultura primária de hepatócitos de ratos, foi considerado equívoco e sem relevância biológica (limitada validade científica devido à descrição incompleta da metodologia e resultados, além da seleção inadequada de doses). Verifica-se que esses outros estudos de genotoxicidade avaliados pela CREAM e pelas agências internacionais, descritos no presente item, corroboram a ausência de evidência suficiente para considerar que o CBZ provoca mutação pontual em células de mamíferos.

Quadro 6. Avaliação de outros ensaios de genotoxicidade (ensaio cometa) com o ingrediente ativo Carbendazim.

Referência	Protocolo	Resultados segundo autor	Limitações, inconsistências e considerações relevantes	Conclusão
Lebailly et al., 1997	Pureza: >99%; Linhagem: Linfócitos humanos de sangue periférico; Delineamento: Ensaio cometa – 1h de incubação com CBZ (25 a 500 mM). Avaliação de dano ao DNA imediatamente ou 24h pós-exposição. Uso de Etoposida como controle positivo.	• CBZ não foi citotóxico (viabilidade >90%) e não induziu danos ao DNA, tanto imediatamente quanto em 24h pós-exposição.	• Análise de poucas células por imagem (25). • Sem controle negativo.	INCONCLUSIVO
Đikić et al. 2012b	Pureza: 95%; Linhagem: Camundongos <i>Swiss</i> ♀/♂; Delineamento: Ensaio cometa – administração vo (20 mg/kg/dia) 1x dia por 28 dias (n=10, 5♀ e 5♂). Análise: pesagem corporal; coleta e pesagem do fígado, com preparo tecidual para ensaio cometa (comprimento, intensidade de cauda e cálculo do momento de cauda); e dosagens	• ↓sg ganho de peso corporal, sem impacto significativo no peso corporal; sem alteração no peso do fígado; • ↑sg proteína total no	• 2 lâminas/animal; • Análise de 100 cometas/animal (RD OECD 489: 150) • Nº núcleos de cauda longa foi contado como um nº células no percentil	NEGATIVO

	bioquímicas (ALT, AST, ALP, LDH-P).	fígado, atividade de AST, ALT; ↓sg atividade de ALP; • ↑sg comprimento de cauda s/ diferença sg no momento e intensidade da cauda (tratados x controle, com inclusão de ♀ e ♂); • ↑sg intensidade e momento de cauda em ♂ (tratados x controle); • Autores discutem que, embora a intensidade da cauda tenha sido semelhante ao controle, os fragmentos devem ter sido mais curtos e percorreram uma distância	95 do comprimento da cauda do cometa/grupo/sexo; • Ausência de controle positivo concorrente; • Dose única (RD OECD 489: 3 doses) • Não foi informado intervalo de amostragem (RD OECD 489: coleta em 2-6h).	

		maior que em animais controle.		
Bowen et al., 2011	Pureza: Alta (%NI) Linhagem: Ratos Han-Wistar ♂; Delineamento: Ensaio cometa – administração repetida de CBZ vo (gavagem; 1000, 1500 e 2000 mg/kg/dia; n= 6), em 0, 24h e 45h. Amostragem: coleta de fígado, sangue periférico (leucócitos) e estômago em 3h após 3ª dose (T₄₈).	• Ausência de mortalidade, sinais clínicos de toxicidade ou redução no ganho de peso; • Níveis aceitáveis de citotoxicidade para o grupo controle (%<i>hedghog</i> não superior a 30% e % células difusas não superior a 24%); • Sem diferença sg na intensidade de cauda (em relação ao controle) em todos os tecidos avaliados, exceto estômago, onde foi observado ↑sg apenas na maior dose, mas c/ citotoxicid	• Maior dose: DMT; • Eletroforese com 3 lâminas/ animal/ tecido; • Ausência de controle positivo concorrente; • Ausência de controle histórico para sangue periférico; • Análise de 100 células/ animal; 50 células/ gel (RD OECD 489: 150 células/ tecido/ animal); • Citotoxicidade: frequência de "<i>hedghog</i>" em 100 células/ lâmina (RD 489: 150 células/ amostra).	NEGATIVO

		ade (% <i>hedgehog</i> > 70% em relação ao controle).		
Vigreux et al., 1998	Pureza: >99%; Linhagem: CHO; Delineamento: Ensaio cometa, incubação por 1h, S9⁻, controle negativo e positivo (Etoposida); Análise de 15 lâminas (25 células/ lâmina).	- Sem citotoxicidade na concentração limite de 250 µM; - Ausência de danos ao DNA (proporção de células danificadas foi baixa em todas as concentrações testadas; s/ ↑sg do momento de cauda).	- Citotoxicidade avaliada pelo método XTT (2 dias após tratamento) ; - Limite de dose mais alta testada (250 µM), por insolubilidade do CBZ.	NEGATIVO
Rai & Mercurio, 2020	Pureza: Alta (%NI) Linhagem: Camundongo <i>Swiss</i>; Delineamento: Ensaio cometa – exposição vo (água; 20 µM; n = 5) com 2 protocolos: Grupo 1 (90d exposição); Grupo 2 (90d exposição + 45d s/ dosagem); coleta de linfócitos de sangue periférico. Controle positivo: Etoposida em células de linhagem comercial. Controle negativo: linfócitos de camundongos não expostos e linhagem comercial.	- Sem diferença de dano ao DNA entre controle negativo com linfócitos de camundongo não-expostos e com linhagem comercial; - Grupo 1 e 2: verificação de maior dano ao	- A concentração usada é inferior à concentração encontrada em água superficial (apud Rajput et al., 2018); - Uma única dose testada.	POSITIVO

		DNA, em comparaç ão aos controles negativos, e em níveis semelhan tes ao do controle positivo (30%); • Sem alteração no consumo de água/ alimento ou ganho de peso corporal.		
CBZ: Carbendazim; vo: via oral (gavagem); sg: significativo; ALT: Alanina aminotransferase; AST: Aspartato aminotransferase; MTT: ensaio de redução de tetrazolium; ALP: fosfatase alcalina; LDH-P: lactato desidrogenase plasmática; S9: sem ativação metabólica; SP: sangue periférico; “hedgehog”: nuvens, células-fantasma; RD OECD: Recomendação Diretriz OECD, DMT: dose máxima tolerada, XTT: ensaio de redução de tetrazolium; NI: não informada.				

2.4 Estudos mecanísticos

A FT incluiu no relatório de genotoxicidade um estudo mecanístico (Can et al., 1997), no qual foi constatado que o CBZ provoca a interrupção do ciclo celular por meio da indução de instabilidade dos microtúbulos e comprometimento da integridade dos fusos meióticos. Além desse, foram também incluídos no Quadro 7 outros estudos mostrando a ação desse IA na polimerização de microtúbulos, com consequente dano à divisão celular. Esses efeitos tóxicos estão claramente interligados à indução de aneuploidia pelo CBZ, conforme discutido nos tópicos anteriores. Assim, existe evidência suficiente para caracterizar o seguinte mecanismo de ação do CBZ: interação com a tubulina, o que compromete a polimerização dos microtúbulos e culmina em erros de segregação cromossômica durante a divisão celular. As demais autoridades regulatórias internacionais concordaram com essa avaliação e também concluíram que o CBZ deve ser considerado uma substância aneugênica, em decorrência do seu mecanismo de ação (EFSA, 2009; PMRA, 2011; APVMA, 2009; JMPR/FAO, 2005).

Quadro 7. Avaliação de ensaios sobre mecanismos de genotoxicidade com o ingrediente ativo CBZ.

Referência	Protocolo	Resultados segundo autor	Limitações, inconsistências e considerações relevantes	Conclusão
Can e Albertini, 1997	Pureza: 99,7%; Linhagem: Culturas primárias de células da granulosa humanas; Delineamento: Culturas de células (dia 3) expostas ao CBZ (0,06; 2; 6µg/mL) por 3, 6, 9, 12 e 15h, com posterior fixação, marcação imunofluorescente (avaliação da organização de MT, centrossomas, proteínas associadas ao fuso e DNA) e análise quantitativa.	Efeito na proliferação celular: • ↑sg índice mitótico em todas as concentrações entre os dias 2-9. • >95% células com metáfase anormais (desorganização cromossômica com fusos bi, tri e multipolares); ausência de anáfase e/ou telófase (CBZ atua na transição metáfase-anáfase). Efeito sobre MT/ organização do fuso mitótico (exposição ≥9h): • Alteração na forma, simetria e nº polos do fuso (afeta integridade do centrossomo); • Ação seletiva em células na metáfase; • Alteração na composição de MT, com despolimerização de MT não acetilados.	• CBZ atua como agente mitostático por meio de interferência seletiva na organização de MT e centrossomo; • Embora os distúrbios do fuso sejam detectáveis, a progressão do ciclo celular é prejudicada devido aos efeitos seletivos na dinâmica dos MT, ao invés de despolimerização dos MT.	CBZ induziu efeitos na divisão celular e despolimerização de microtúbulos (≥ 0,2 µg/mL)

Lim et al., 1997b	Pureza: Benomil (>95%; contaminação 10% CBZ); CBZ (alta pureza, %NI); Linhagem: Ratos <i>Sprague-Dawley</i> ♂; Delineamento: <u>Estudo in vivo</u>: parecer de toxicidade reprodutiva. <u>Estudo in vitro</u>: Purificação de tubulina testicular (n=8) e análise da inibição da montagem de MT após incubação com Benomil (10, 50 e 100 µM) e CBZ (5 e 10µM – como contaminante do Benomil).	- Identificação de subunidades α e β-tubulina; - Inibição concentração-dependente na montagem de MT (n=3): IC50 de 75µM (Benomil) e 5µM (CBZ), indicando que o efeito da exposição ao Benomil foi quase que completamente decorrente do CBZ como contaminante.	Autores informaram que, apesar dos desfechos verificados <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>, tal estudo não comprova relação direta entre a inibição <i>in vitro</i> da polimerização dos MT e a descamação de células germinativas <i>in vivo</i>.	POSITIVO CBZ induziu inibição da montagem de MT <i>in vitro</i> em níveis substancialmente inferiores ($\geq 5 \mu\text{M}$) àqueles que induziram danos testiculares <i>in vivo</i> (164 mg/kg ip e 262µg it)
Correa et al., 2001	Pureza: Alta (%NI) Linhagem: Cultura primária de células de túbulos seminíferos de ratos <i>Sprague-Dawley</i>; Delineamento: Coleta e incubação de células de túbulos seminíferos de ratos não-tratados.	- Indução da despolimerização de MT nos túbulos seminíferos isolados: ↑sg % tubulina solúvel e ↓sg % tubulina polimerizada (30 e 60 min); sem perda sg total de tubulina quantificada. - Sem alteração no nível ou distribuição de	Cada amostra de túbulo seminífero, utilizada para gerar as culturas controle, veículo e tratada, foi obtida a partir	CBZ induziu despolimerização de MT, que parece estar associada à redução da tirosinação de tubulina, ao invés de perda de tubulina. (100 µM)

	Exposição a CBZ (100µM). Análises: isolamento, quantificação (ELISA) e determinação da composição (<i>western blot</i>) de tubulina solúvel e polimerizada no epitélio seminífero.	proteínas α e β-tubulina acetiladas (frações solúvel e polimerizada). • $\downarrow$ nível α-tubulina na fração de tubulina polimerizada, indicando que CBZ induziu $\uparrow$ tubulina solúvel via despolimerização; • CBZ não induziu $\downarrow$ ATP, (manutenção fisiologia normal dos túbulos seminíferos).	do testículo de um rato; não foi relatado o número total de animais utilizados; • Ensaio de ELISA com n = 3-4.	
Winder et al., 2001	Pureza: Alta (%NI) Linhagem: ratos <i>Sprague-Dawley</i> (100-103 dias). Delineamento: Obtenção de tubulina c/ e s/ proteínas associadas a microtúbulos (MAP) de cérebro e testículos. 1) Ensaio de associação de tubulina: c/ e s/ MAP, pré ou co-incubação com CBZ (100 µM). Avaliação por espectrofotometria. 2) Ligação de GTP à tubulina: incubação com CBZ por 20 min antes da adição	• Ensaio de tubulina s/ MAP: bastante sensível à inibição da polimerização pelo CBZ. Ensaio c/ MAP cerebral mais sensível à inibição da polimerização, que a MAP testicular. • Adição de albumina não alterou ação inibitória do CBZ (redução da inibição é específica para MAP). • CBZ afetou a iniciação da polimerização dos MT, mas não os MT já formados.	• Maioria dos resultados sem diferença estatística.	CBZ interfere nos eventos iniciais de polimerização dos microtúbulos. (100 µM)

	de GTP. Avaliação por filtração. 3) Efeito de CBZ na hidrólise de GTP: CBZ adicionado após tubulina incubada com GTP. Avaliação por HPLC.	• CBZ preveniu a associação de GTP à tubulina dose-dependente. Adição de GTP ↓ a inibição da polimerização pelo CBZ. • Não houve diferença na formação de GDP com ou sem CBZ. • CBZ interferiu nos eventos iniciais da polimerização de MT, especificamente e na ligação de GTP à tubulina. As MAPs moderam esse efeito e reduzem a inibição por CBZ.		
Markel ewicz, 2004	Pureza: Alta (%NI) Delineamento: <i>In vivo</i>: parecer de toxicidade reprodutiva. <i>Ex vivo</i>: Hexanodiona (HD) incubada com tubulina purificada por 16 horas. Inclusão de replicatas com adição de CBZ (70 e 140 µM).	• HD ↓ tempo e ↑ velocidade máxima de formação de MT; • Normalização pela exposição concomitante de CBZ.	• CBZ usado como agente inibidor da polimerização de MT para avaliação da resposta de HD.	Tubulina+HD é resistente aos efeitos inibitórios do CBZ (70 µM)
Lim and Miller, 1997a	Pureza: > 97%; Linhagem: Ratos <i>Sprague-Dawley</i> pré- (23-28 dias) e pós-puberais (83-90 dias);	• Inibição da associação de MT pelo CBZ foi similar para tubulina de ratos pré (IC₅₀ = 4,6 µM) e	• Comparação da inibição pelo CBZ da associação de	CBZ inibiu a polimerização de tubulina de ratos pré e pós-puberais de forma similar (4,6 µM)

	Delineamento: <i>In vivo</i>: incluído no parecer de toxicidade reprodutiva. <i>In vitro</i>: Obtenção de tubulina testicular de ratos pós (n=5) e pré-puberais (n=10) para avaliação da montagem de MT (CBZ 5 e 10 μM pré-incubado com tubulina por 20 minutos).	pós-puberais (IC50 = 4,9 μ M).	tubulinas de ratos pré e pós-puberais.	
Zuelke e Perreault, 1995	Pureza: 95%; Linhagem: Hamsters sírios. Delineamento: Exposição durante a fertilização <i>in vitro</i> (6 μg/mL) e <i>in vivo</i> (1000 mg/kg p.c.; gavagem, n=6). Imunofluorescência de MT, cultura de zigotos e microscopia dos zigotos e embriões.	Imunofluorescência confirmou danos aos fusos meióticos durante a fertilização <i>in vitro</i>.	- Pequeno grupo amostral; - Descrição completa desse estudo no Quadro 5.	CBZ induziu dano aos fusos mitóticos (6 μ g/mL)
Warr et al., 1982	Pureza: Não informada. Linhagem: linhagem mutante CRM₇₉₅ de células CHO. Delineamento: investigação da viabilidade celular da linhagem mutante: plaqueamento de 5×10^6 em CBZ 10^{-5}M (dobro da concentração tóxica para	Linhagem CRM₇₉₅ é 2x mais resistente a CBZ, quando comparada à linhagem selvagem, o que sugere que uma alteração na proteína microtubular pode alterar esse nível de resistência e indica que o CBZ induz inibição do crescimento em	- Descrição incompleta da metodologia; - Análise em triplicata; - Colônias com mais de 50 células foram	INCONCLUSIVO

	linhagem selvagem).	células de mamíferos por meio de um efeito nos microtúbulos.	contabilizadas; • Desvio padrão da triplicata <15. • Cada experimento feito em duplicata.	
Tollstadius et al., 2019	Pureza: 97%; Linhagem: Células alveolares A549; Delineamento: 4, 9 a 1046 μ M por 24h: 1) monocamada celular (citotoxicidade por MTT e progressão do ciclo celular; EROs, atividade mitocondrial e caspase por citometria de fluxo); 2) sistema de cultura celular (3D) em interface ar-líquido (AIL) (citotoxicidade por MTT; citoqueratina, CD44, MUC-1, caspase, α -tubulina, Nrf2, E-caderina, EROs, atividade mitocondrial por fluorescência).	• Monocamada exposta a concentrações não citotóxicas mostrou apenas arrasto na fase G2/M. • Sistema 3D AIL: $\uparrow$sg expressão de Caspase 3, α-tubulina e EROs; $\downarrow$sg atividade mitocondrial. • CBZ é citotóxico para células pulmonares.	• Avaliações feitas para dose que causou pouco impacto na viabilidade celular, ou seja com baixa citotoxicidade (12,5 μM).	Arrasto na mitose e aumento da expressão de α-tubulina (12,5 μ M)

MT: microtúbulos; CBZ: Carbendazim; sg: significativo; IC50: concentração que inibe a montagem do MT em 50%; MTT: ensaio de redução de tetrazolium; MAP: proteínas associadas a microtúbulos; NI: não informada.

2.5 Estudos de toxicidade aos órgãos reprodutivos e às células germinativas

Conforme avaliação dos estudos de toxicidade reprodutiva (Quadro x, parecer REPROTOX), o dano testicular causado pelo CBZ decorre da inibição da associação de microtúbulos, o que acarreta falha na segregação cromossômica durante a meiose espermática, necrose dos espermatócitos meióticos, descamação de espermátides imaturas, atrofia do túbulo seminífero, anormalidades nas espermátides longas e alongadas (inclusive no acrossoma), com formação de magaespermátides e simplastos. Verifica-se que esse conjunto de efeitos adversos está associado à capacidade de interação do CBZ com elementos do citoesqueleto, como os microtúbulos, o que leva a aberrações cromossômicas numéricas, conforme já discutido neste parecer. Assim, pode-se concluir que, além de o CBZ ser um mutágeno aneugênico que provoca danos cromossômicos nas células somáticas (item 2.2.2), também há evidência suficiente indicativa do seu potencial mutagênico para as células germinativas (item 2.2.3), inclusive com comprometimento da viabilidade embrionária dos animais expostos.

3. VIA DE EFEITO ADVERSO (AOP)

Uma via de efeito adverso (AOP) já foi caracterizada especificamente para explicar efeitos aneugênicos na prole decorrentes da ligação de químicos à tubulina (Marchetti et al., 2016), conforme pode ser observado na Figura 1 – AOP 106 (<https://aopwiki.org/aops/106>). O peso da evidência para esse AOP é considerado forte.

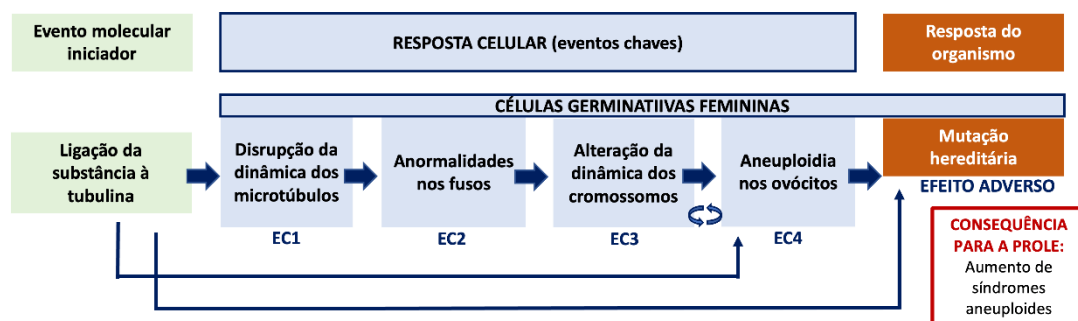


Figura 1. Via de Efeito Adverso para efeitos aneugênicos na prole decorrentes do evento molecular indicador (ligação de substâncias químicas à tubulina). Setas azuis representam a relação entre os eventos-chaves (EC).

Essa relação pode ser adjacente (um evento-chave desencadeia a ocorrência do evento seguinte) ou não-adjacente (um evento-chave desencadeia outros eventos-chaves paralelamente à via principal).

Adaptado de: <https://aopwiki.org/aops/106>

O aumento de aneuploidia pode afetar qualquer cromossomo e dados em roedores sugerem que aumento de aneuploidia em células germinativas leva a aumento de aneuploidia na prenhez. Nessa AOP, a ligação da substância à tubulina induz a sua despolimerização, com posterior desorganização do fuso mitótico, alteração da dinâmica cromossomal e, consequentemente, geração de ovócitos aneuplóides. Ovócitos aneuplóides podem ser fertilizados e gerar conceitos aneuploides. Vale ressaltar que a aneuploidia durante a meiose de células germinativas é a principal causa de abortos espontâneos em humanos e é a anormalidade cromossômica mais observada no nascimento (Pacchierotti et al., 2019).

O efeito molecular iniciador, ligação à tubulina (Evento denominado 718 na AOP), foi devidamente investigado para diversas substâncias, inclusive para o CBZ, que foi incluído na descrição da AOP 106 como exemplo de substância capaz de desencadear esse evento. O CBZ também foi identificado como capaz de promover outro evento-chave dessa AOP: alteração do número de cromossomos (aneuploidia) em ovócitos de hamsters (Evento 723). A janela de sensibilidade para a indução de aneuploidia é o período próximo à ovulação e, dependendo da dose e do tempo de exposição, a indução de aneuploidia pode alcançar quase 100%. Ou seja, a dinâmica dos fusos em células germinativas femininas é bastante sensível a sutis alterações e pode ocorrer tanto na meiose I quanto na meiose II. Vale ressaltar que não foram desenvolvidos modelos quantitativos para a relação entre os eventos dessa AOP. Entretanto, estudos *in vivo* mostram que o período de exposição antes da divisão deve ser cuidadosamente considerado caso esse tipo de avaliação seja feita, já que as substâncias possuem diferentes meias-vidas de ligação à tubulina. De modo geral, sabe-se que substâncias que interferem na montagem de microtúbulos já em baixas concentrações *in vitro* tendem a ser fortes aneugênicos *in vivo*, entretanto, não foi determinada uma relação quantitativa especificamente para essa comparação (Marchetti et al., 2016).

Os estudos *in vitro* e *in vivo* com o CBZ neste parecer, somados aos estudos mecanísticos avaliados, claramente indicam a ocorrência do evento iniciador (ligação à tubulina) e de eventos-chave (despolimerização da tubulina, desorganização de fuso mitótico e indução de ovócitos aneuplóides) da AOP 106. Além disso, existe clara evidência da ocorrência

do efeito adverso (mutação hereditária na célula germinativa, levando a formação de conceitos aneuploides). Portanto, a referida AOP corrobora a classificação do CBZ como mutagênico para células germinativas (Marchetti et al., 2016). Ainda, a descrição dessa AOP e de seus eventos-chaves aponta incertezas quantitativas que podem estar associadas a essa via, interferindo na escolha de um limiar adequado. Marchetti e colaboradores (2016), ao utilizarem o CBZ para exemplificar essa AOP, também levantaram preocupação com relação à exposição humana a esse ingrediente ativo de agrotóxico, pois identificaram preocupante exposição humana ocupacional e pela dieta.

4. CLASSIFICAÇÃO DO CARBENDAZIM QUANTO À MUTAGENICIDADE

A RDC nº 294/2019 estabelece a classificação toxicológica dos ingredientes ativos de agrotóxicos, em função da mutagenicidade, nas Categorias 1A, 1B ou 2 (Seção 4 do Anexo IV), de acordo com a avaliação baseada no peso da evidência.

A FT, com base nos documentos das agências reguladoras internacionais (EFSA, 2010; APVMA, 2009; EC, 2007; EU, 2007; JMPR, 2005; USEPA, 2005), concluiu que o mecanismo de ação genotóxica do CBZ é bem conhecido e consensual entre essas agências. Com uma literatura extensa, os estudos de genotoxicidade *in vivo* e *in vitro* mostram que o fungicida promove alterações cromossômicas numéricas (aneugênese) ao interferir na tubulina e comprometer a montagem dos microtúbulos que formam o fuso mitótico, prejudicando assim a divisão celular.

Embora não existam estudos epidemiológicos especificamente para humanos com o CBZ, a partir da análise das evidências atualmente disponíveis, conclui-se que o CBZ é uma substância aneugênica para células somáticas e germinativas, tanto *in vitro* quanto *in vivo* em mamíferos. Portanto, quanto à mutagenicidade, esse ingrediente ativo se enquadra na Categoria 1B: Produto que presumidamente induz mutações em células germinativas de seres humanos; sendo essa classificação baseada nos resultados positivos de estudos de mutagenicidade *in vivo* em células germinativas de mamíferos. Essa mesma classificação foi adotada pela EFSA (2010).

5. DETERMINAÇÃO DE LIMIAR PARA EFEITO ANEUGÊNICO EM CÉLULAS GERMINATIVAS HUMANAS

Conforme determinado pela Lei nº 7.802, de julho de 1989; pelo Decreto nº 4.074, de janeiro de 2002; e regulamentado pela RDC nº

294, de julho de 2019, é proibido o registro de ingredientes ativos de agrotóxicos categorizados como conhecidos ou presumidamente mutagênicos e não for possível determinar um limiar de dose para esse desfecho que permita proceder com as demais etapas da avaliação do risco.

É importante esclarecer que limiares de dose geralmente não são determinados para efeitos mutagênicos (USEPA, 2005; ECHA, 2017). Contudo, para o CBZ, a APVMA (2009) optou pela determinação de um limiar especificamente para o seu efeito aneugênico. A EFSA (2010) também sugeriu um limiar para este efeito; porém, posteriormente, o Carbendazim foi proibido na União Europeia, sendo um dos motivos de proibição, o seu potencial mutagênico. A PMRA (2011) e a USEPA (2020) não determinaram limiar específico para a aneugênese, já que essas agências utilizam os dados de mutagenicidade apenas como evidências mecanísticas associadas a outros desfechos toxicológicos mais preocupantes, como a carcinogenicidade e toxicidade reprodutiva. Assim, essas duas agências utilizaram as evidências de aneugenicidade do CBZ para a avaliação de risco de carcinogenicidade desse IA.

A FT discutiu que, de maneira geral, diferentes concentrações de CBZ eliminam completamente a formação do fuso mitótico em células de mamíferos, o que resulta em fusos mitóticos imperfeitos, falha na segregação cromossômica e, conseqüentemente, na produção de células descendentes aneuplóides, isto é, com números reduzidos ou aumentados de cromossomos (por exemplo, monossomia ou trissomia). Além disso, a própria FT menciona que, embora os alvos celulares do CBZ sejam essencialmente os mesmos para mitose e meiose, não existem evidências que provem conclusivamente que as concentrações de CBZ capazes de modificar a mitose e a meiose são idênticas, conforme discutido pela APVMA (2009). Ainda, a FT relata que a EFSA (2010) estipulou como limiar para atividade aneugênica *in vitro* o valor de 0,2 a 0,6 µg/mL e um NOAEL *in vivo* de 50 mg/kg p.c. para efeitos aneugênicos em espermatozoides. Já a APVMA (2009) utilizou o valor de 50 mg/kg p.c. como LOAEL e, por isso, para a avaliação de risco deste ingrediente ativo calculou um limiar humano com um fator de segurança extra de 10 vezes para considerar a extrapolação de LOAEL para NOAEL, obtendo um limiar (0,05 mg/kg p.c.) para humanos desse desfecho dez vezes menor do que a EFSA.

A partir dos aspectos levantados pelas demais agências regulatórias e pela FT, optou-se por uma discussão mais aprofundada sobre a determinação de um limiar seguro *in vivo* para células germinativas humanas expostas ao CBZ, mesmo este não sendo um desfecho usualmente discutido quanto à ocorrência de limiar. Para tanto, faz-se necessária a divisão da discussão em dois principais aspectos: 1) Escolha do valor de 50

mg/kg p.c. como NOAEL/LOAEL para efeitos aneugênicos em espermátides de ratos; e 2) Determinação de limiar para efeitos aneugênicos em células germinativas humanas.

5.1 Uso de 50 mg/kg p.c como NOAEL/LOAEL para efeitos aneugênicos em espermátides de ratos

Conforme discutido no item 2.2.3, considera-se inadequado utilizar o valor de 50 mg/kg p.c. como NOAEL para os efeitos aneugênicos do CBZ, pois, no estudo de Matsuo e colaboradores (1999), foi demonstrado um leve aumento na frequência de MN em espermátides já na dose de 50 mg/kg p.c.. Tal aumento, embora sem significância estatística, não pode ter sua significância biológica desconsiderada, principalmente quando avaliado conjuntamente às evidências de toxicidade reprodutiva decorrentes da atividade aneugênica do CBZ. Pacchiierotti e colaboradores (2019) também enfatizaram a necessidade de não considerar apenas diferenças estatísticas nos estudos citogenéticos, pois isso pode subestimar o real potencial aneugênico da substância. A APVMA (2009), alinhada a esse posicionamento, concluiu que o valor de 50 mg/kg p.c. obtido no estudo corresponde ao LOAEL. Entretanto, a APVMA (2009) utilizou o LOAEL com um fator extra de segurança (10 vezes) para determinação da dose de referência humana.

A RDC nº 294/2019 é clara ao estabelecer que o registro de agrotóxicos que se enquadrem em proibitivos de registro apenas pode ocorrer quando é possível determinar um limiar adequado para prosseguir com as demais etapas da avaliação de risco. Aqui, cabe esclarecer que o LOAEL não pode ser considerado um limiar adequado. Pelo contrário, esse valor corresponde à menor dose em que o efeito adverso, no caso aneuploidia, foi observado. Logo, é desconhecida a dose sem efeito mutagênico para o CBZ. Para reduzir o risco dessa incerteza, a APVMA (2009) optou por adicionar um fator extra de segurança, estipulando um AOEL de 5 mg/kg p.c.. Porém, este valor não é baseado em dados de estudos específicos com CBZ, tratando-se de um valor arbitrado pela Agência.

Portanto, a CREA conclui que a dose de 50 mg/kg p.c. (Matsuo et al., 1999) não pode ser utilizada como um limiar adequado para derivar doses de referência suficientemente protetivas para a saúde da população humana, conforme requerido pela RDC nº 294/2019. Vale ressaltar ainda que uma série de estudos evidenciou a ocorrência de efeitos reprodutivos em doses inferiores ao suposto limiar de 50 mg/kg p.c.. Breslin e colaboradores (2013) relataram vários danos histopatológicos

testiculares e epididimários em ratos, causados pela administração oral de 20 mg/kg por 2 ou 7 dias. Essas alterações, com incidência e gravidade progressivas em relação à dose/duração, incluíram: nos testículos – dilatação e degeneração tubular, esfoliação de células germinativas, vacuolização de células de Sertoli; e nos epidídimos – edema, presença de detritos celulares e redução de espermatozoides intratubulares. Pacheco e colaboradores (2012) também relataram alterações morfológicas em espermátides de ratos, após exposição a doses subcrônicas (50 mg/kg p.c./dia) de CBZ. Rajeswary e colaboradores (2007) relataram redução significativa no peso testicular, no nível de testosterona sérica e na atividade das enzimas esteroidogênicas e antioxidantes, após administração de CBZ via gavagem (25 mg/kg p.c./dia) por 48 dias. Esse estudo demonstrou que baixas doses diárias subcrônicas de CBZ causam toxicidade direta às células de Leydig e que esses efeitos devem decorrer da ação tóxica direta desse IA no testículo (redução no número de células, na síntese/secreção, na responsividade ao LH ou inibição da esteroidogênese). Já no estudo de Dere e colaboradores (2016), foram demonstradas alterações histopatológicas testiculares (dano ao epitélio seminífero, vacuolização de células de Sertoli, retenção da cabeça de espermátides) em ratos, após exposição subcrônica via oral a baixas doses (30 e 50 mg/kg p.c./dia), nas quais, apesar da ausência de significância estatística, foi observado um efeito dose-dependente. Adicionalmente, foram evidenciadas alterações nos parâmetros espermáticos e interrupção da espermatogênese, após exposição oral de camundongos a baixas doses (0,1 a 10 mg/kg p.c./dia) por 5 semanas (Liu et al., 2019 e 2020). Ou seja, esse conjunto de estudos indica que o CBZ afeta a espermatogênese em baixos níveis de dose, inferiores a 50 mg/kg p.c..

Adicionalmente, Nakai e colaboradores publicaram uma série de estudos investigando os mecanismos subjacentes à toxicidade reprodutiva induzida por CBZ (1993, 1994, 1995, 1997a, 1997b, 1998a, 1998b, 2002). Segundo o grupo, após doses baixas a moderadas, o efeito primário do CBZ é no testículo, onde ocorre descamação de células germinativas dependente do estágio da espermatogênese. Tal descamação é causada pela interferência do CBZ nos microtúbulos e filamentos intermediários das células de Sertoli, mecanismo também relacionado ao seu potencial aneugênico nos espermatócitos. Adicionalmente, também foram observados efeitos adversos nas células germinativas, com desenvolvimento anormal da cabeça de espermátides.

Conforme discutido acima, a ocorrência de alguns efeitos adversos depende do estágio da espermatogênese no qual o CBZ é administrado. A alfa-tubulina e os filamentos intermediários são afetados nos mesmos estágios em que ocorre a descamação, com redução de alfa-

tubulina e colapso dos filamentos intermediários, o que leva à perda de ancoragem das células germinativas e consequente descamação. O CBZ também afetou o processo espermatogênico, causando necrose de células em divisão celular (tanto meiose quanto mitose) e impedindo os espermátocitos de completar a segunda divisão meiótica, demonstrando claramente seu potencial aneugênico. Também foi relatada a ocorrência de megaspermátides (células diplóides resultantes de divisões meióticas anormais), cuja formação está associada à indução de aneuploidia pelo CBZ (Hess & Nakai, 2000).

Outros estudos avaliados, apesar de terem empregado doses mais altas, contribuíram para o entendimento do mecanismo de indução da toxicidade reprodutiva associada à exposição ao CBZ, o qual está sabidamente relacionado à atividade aneugênica desse composto. No estudo de Jeffay e colaboradores (1996), por exemplo, demonstrou-se que o CBZ, administrado a fêmeas de hamster sírio em dose única via gavagem (1.000 mg/kg), induziu aneuploidia em ovócitos durante sua maturação; além de uma série de efeitos que, segundo os autores, foram decorrentes de toxicidade direta aos ovócitos, e não de alteração endócrina na ovulação, uma vez que o número de ovócitos ovulados foi semelhante entre animais tratados e controle. Similarmente, o CBZ não afetou a taxa de fertilização de ovócitos e, portanto, não promoveu danos na função espermática ou na fertilização em si. Os efeitos observados foram atraso/interrupção no desenvolvimento embrionário pré-implantação e redução nos sítios de implantação, além de uma série de alterações morfológicas nos óvulos após a fertilização, as quais foram consideradas resultantes do mecanismo de ação do CBZ no processo de montagem dos microtúbulos. Assim, os autores concluíram, a partir desse conjunto de dados, que os ovócitos parecem ser mais sensíveis aos efeitos induzidos por CBZ durante a formação do fuso (proestro), quando ocorre sua maturação meiótica (Jeffay, 1996).

Cabe mencionar que Marchetti e colaboradores (2016) não apresentaram um detalhamento aprofundado sobre limiar para este AOP, já que não há modelos computacionais preditivos do risco de aneuploidia na prole. Foi sugerida a hipótese de ocorrência de limiar em camundongos para uma das substâncias aneugênicas estudadas, a Colchicina. Entretanto, no referido estudo foi encontrada uma dose sem efeito adverso (0,1 mg/kg) bem inferior ao valor dos estudos com o CBZ (50 mg/kg). Marchetti e colaboradores (2016) não discutiram a possibilidade de determinar uma dose segura para humanos, mas relataram preocupação com relação à maior susceptibilidade humana à aneuploidia.

Desse modo, verifica-se que há evidências suficientes de que o CBZ é um composto aneugênico, mas, não há evidência que permita estimar

uma dose segura em que não se espera dano cromossômico às células germinativas em humanos. Isto é, não é possível derivar um limiar de dose adequado, capaz de impedir a ocorrência dos efeitos aneugênicos induzidos pelo CBZ.

5.2 Determinação de limiar para efeitos aneugênicos em células germinativas humanas

Pacchierotti e colaboradores (2019), em documento reunindo evidências científicas e considerações de vários especialistas sobre a avaliação do risco de substâncias aneugênicas para a saúde humana, enaltecem a importância de proteger a população humana da exposição a químicos que induzem aneuploidia em células germinativas e que são diretamente associados a desfechos reprodutivos. Houve consenso unânime quanto ao fato de os aneugênicos afetarem as células germinativas, seu mecanismo de ação e seu papel nas doenças hereditárias. Foram verificadas 24 substâncias com fortes e suficientes evidências de aneugenicidade em células germinativas. Dentre essas substâncias, foram incluídos o CBZ e o Benomil, considerados substâncias com suficiente evidência de causar aneuploidia e interação com microtúbulos, inclusive em ovócitos.

A exposição de células germinativas a substâncias aneugênicas leva à concepção aneuplóide, com a frequência de aneuploidia sendo similar em células germinativas e zigotos (Pacchierotti et al., 2019).

Embora seja evidente que o CBZ cause aneuploidia por inibir a formação de fuso mitótico, tanto em célula somática quanto germinativa, não está caracterizada a diferença na sensibilidade entre esses dois tipos celulares (Kirsch-Volders et al. 2003). A caracterização do dano às células germinativas é especialmente preocupante, pois já se verifica dano relevante nessas células (espermátides) em doses inferiores às aquelas observadas nos estudos de mutagenicidade com células de medula óssea (Matsuo et al., 1999), mesmo com baixas concentrações testiculares de CBZ (EFSA, 2009; USEPA, 2020). Ainda, estudos demonstraram a ação deletéria do CBZ, com perdas precoces de embriões (Zuelke & Perreault, 1995; Jeffay et al., 1996; Parecer REPROTOX). Ou seja, Kirsch-Volders e colaboradores (2003) levantam a preocupação de que as células germinativas possam ser mais susceptíveis aos efeitos do CBZ do que as células somáticas.

Além disso, as evidências em animais indicam que os oócitos são ainda mais susceptíveis às substâncias aneugênicas, quando comparados aos espermatozoides e às células somáticas, pois essas células possuem mecanismos distintos de formação e organização do fuso durante

a divisão meiótica (Kirsch-Volders et al., 2003; Pacchierotti et al., 2019). Ainda, há diferenças entre esses dois tipos celulares no ponto de checagem da formação do fuso, com os mecanismos de verificação do não-alinhamento de cromossomos pela célula sendo menos efetivos na oogênese do que na espermatogênese ou na mitose (Kirsch-Volders et al. 2003; Pacchierotti et al., 2019). Isso, em conjunto com outros aspectos únicos da oogênese, pode contribuir para uma maior susceptibilidade a erros de segregação cromossômica na meiose, o que explica a alta taxa de aneuploidia em ovócitos humanos e embriões pré-implantados e o maior risco para falhas de implantação, abortos espontâneos e trissomias (Kirsch-Volders et al. 2003).

5.2.1 Ovócitos possuem mecanismos específicos de formação de fuso mitótico

Em células somáticas e espermatozoides, a formação do fuso meiótico é controlada por um par de centrossomos (centríolos e proteínas) que replicam de forma coordenada com o ciclo celular. Após a duplicação do centrossomo, eles se movem para polos opostos do núcleo e controlam a formação do fuso mitótico (Mogessie et al. 2018; Pacchierotti et al., 2019).

Contudo, nos ovócitos de várias espécies, inclusive camundongos e humanos, os centríolos são eliminados antes da fertilização, não havendo centrossomos para a divisão celular (Mogessie et al. 2018). Então, nesses casos, a formação do fuso meiótico é controlada pelos centros de organização de microtúbulos, que não possuem centríolos (Pacchierotti et al., 2019). Esses centros de organização, presentes em camundongos, servem como o principal sítio de nucleação dos microtúbulos, em substituição aos centrossomos (Mogessie et al. 2018), e passam por processos de polimerização e despolimerização dos microtúbulos quando da ruptura do envelope nuclear. Eles são fragmentados e distribuídos em pequenos centros, até que gradualmente se agregam nos dois polos opostos, transformando a estrutura intermediária multipolar em bipolar (Mogessie et al. 2018). Assim, durante as fases iniciais de formação dos fusos, mais de 80 centros são formados e, progressivamente, eles se associam em poucos centros ao redor dos cromossomos, controlando a formação dos fusos. Esses processos de coalescência de pequenos centros com maiores centros é dinâmico e ocorre em ondas de descondensação e fragmentação, o que contribui para uma distribuição igualitária entre os dois polos (Pacchierotti et al., 2019).

Entretanto, humanos não possuem esses centros e a nucleação dos microtúbulos é dependente dos cromossomos, ou seja, os próprios cromossomos têm um papel importante na formação do fuso meiótico (Mogessie et al. 2018). A formação dos fusos em humanos é, então, distinta, mais longa (15 horas) e com maior instabilidade no fuso (Pacchierotti et al., 2019). Na divisão celular, primeiramente os cromossomos são agregados e, muitas horas depois, os microtúbulos começam a nucleação de dentro desse agregado, a partir dos cinetócoros, continuando a se expandir por várias horas (Mogessie et al. 2018). À medida que o fuso se forma, ele passa por reorganização, fragmentando-se em fusos intermediários multipolares instáveis que, então, se fundem em dois polos, alinhando os cromossomos em posição central (Mogessie et al. 2018). Durante esse processo, a actina se associa de forma constante à tubulina nos polos do fuso, indicando comunicação direta com os microtúbulos e participação na formação de fusos bipolares funcionais (Roeles & Tsiavaliari, 2019). Há, portanto, interdependência entre esses dois sistemas.

Essa instabilidade nos fusos mitóticos de ovócitos humanos é corroborada pela fragmentação do fuso em multipolos, induzida pelo Nocodazol, uma substância aneugênica. Isso ocorre porque a desestabilização dos microtúbulos pelo Nocodazol causa gradual redução da actina no fuso, levando à perda da sua organização bipolar. Desse modo, os microtúbulos ditam a organização espaço-temporal da actina, pois o comprometimento da sua estrutura afeta a função da actina de organização do fuso e, conseqüentemente, uma correta segregação cromossômica.

Durante esse processo de formação e organização do fuso, frequentemente, os cromossomos são incorretamente ligados aos polos dos fusos. Em muitas espécies, os cinetócoros são fundidos, facilitando a ligação aos fusos de um mesmo polo. Porém, em humanos, os cinetócoros das cromátides-irmãs são divididos e interagem com os microtúbulos como unidades separadas, o que prejudica essa interação. Ainda, cabe destacar que o grau de separação dos cinetócoros em humanos aumenta com o envelhecimento (Mogessie et al. 2018).

Essa interação microtúbulo-cinetócoro mais frágil, somada à instabilidade da fase multipolar, resulta em ovócitos humanos com uma susceptibilidade muito aumentada em relação a ovócitos murinos, quanto à incidência de aneuploidias (Mogessie et al., 2018; Pacchierotti et al., 2019).

Um estudo feito com Benzo(a)pireno, outra substância aneugênica, mostrou claramente a indução de anormalidades na organização do fuso e o mal alinhamento dos cromossomos, levando ao comprometimento da interação entre microtúbulo e cinetócoro, com indução de aneuploidia nos ovócitos durante a sua maturação (Zhang et al.,

2018). A segregação correta dos cromossomos depende do estabelecimento das interações físicas e bioquímicas entre os microtúbulos e os cinetócoros e utiliza a energia da polimerização/ despolimerização dos microtúbulos para a separação (Zhang et al., 2018).

Tendo em vista que os microtúbulos são os principais componentes do fuso, a manutenção de uma dinâmica adequada dessas estruturas é essencial para a correta formação e funcionamento do fuso mitótico. Logo, substâncias que interferem com esses processos, como o CBZ, podem ter um impacto negativo relevante na segregação cromossômica, especialmente em ovócitos, sendo, portanto, as mais comuns e potentes indutoras de aneuploidia em células germinativas (Pacchierotti et al., 2019).

5.2.2 Ovócitos possuem uma menor sensibilidade no ponto de checagem de formação de fuso

Em células somáticas, o ponto de checagem da formação de fuso (SAC) monitora a associação correta dos cromossomos aos fusos mitóticos (Pacchierotti et al., 2019). É um mecanismo de vigilância que suspende a divisão celular na metáfase na ocorrência de cromossomos não ligados e de acúmulo de componentes de sinalização, como a proteína Mad2, no cinetócoro. Esse sistema de checagem ocorre tanto em espermatócitos quanto em ovócitos, mas existem diferenças específicas entre essas células capazes de promover respostas diferenciadas a aneugênicos (Vogt et al., 2008).

Verificou-se que altas concentrações de Etoposida, uma substância aneugênica, inibem o progresso da divisão celular em ovócitos. Porém, em baixas concentrações, o mesmo efeito não é observado e a célula não entra em arrasto para o correto reparo. Ou seja, há uma resposta inadequada ao dano no DNA, em razão dessa menor sensibilidade dos ovócitos a danos, com ativação do sistema de reparo apenas acima de determinada concentração de aneugênico (Marangos and Carroll, 2012). Então, o SAC meiótico, especialmente em ovócitos, é incapaz de prevenir a transição para a anáfase na presença de poucos erros cromossômicos.

Essa diferença na resposta dos ovócitos pode ser decorrente do seu maior volume, o que requer vários cromossomos bivalentes mal alinhados para desencadear um sinal suficientemente forte, capaz de manter a checagem ativa e provocar arrasto na meiose (Pacchierotti et al., 2019).

Outros estudos também esclareceram a sensibilidade dos ovócitos aos danos de DNA. Embora camundongos sejam responsivos a quebras duplas de DNA, eles parecem ser insensíveis a ligação cruzada causada pela Mitomicina C, também aneugênica (Yeen et al., 2012). Os ovócitos tratados com Mitomicina C podem entrar em meiose e progredir na divisão, levando a embriões severamente comprometidos. Ou seja, nesse caso não há sistema de reparo específico para esse tipo de dano. Os erros não reparados podem passar para o embrião mesmo quando se observa certo arrasto celular, dando origem a embriões com pro-núcleo ou múltiplos micronúcleos (Ma et al., 2013).

Também foi evidenciado que a heterozigose em algumas das proteínas do SAC (Mad2 e Bub1) é suficiente para aumentar a incidência de aneuploidia em ovócitos, mas não em espermátócitos. Logo, a redução da expressão gênica de componentes do SAC pode agir sinergicamente com a disfunção do fuso e de outras organelas, e com a perda de coesão entre as cromátides-irmãs, predispondo ainda mais os ovócitos a erros de segregação e afetando consideravelmente a relação dose-resposta.

Como os componentes do SAC precisam ser recrutados para os fusos e cinetócoros dos cromossomos em meiose, o tempo necessário para esse recrutamento, em quantidades suficientes, é crítico. Logo, a perda de componentes na organização celular, bem como a polarização e a despolimerização transitórias de microtúbulos do fuso, decorrentes da exposição a aneugênicos, é um problema. Um descompasso também resultará em uma maior taxa de erro meiótico em ovócitos dos que em espermátócitos, já que estes são menores e conectados por pontes citoplasmáticas (Vogt et al., 2008). Ainda, a formação de interações estáveis cinetócoro-microtúbulo em ovócitos é estabelecida apenas na meiose I tardia. Ou seja, há uma perda de sensibilidade na resposta dos ovócitos, o que contribui para a alta taxa de erros na meiose I em fêmeas (Vogt et al., 2008). Portanto, esse conjunto de características dos ovócitos torna a ação de substâncias aneugênicas ainda mais preocupante em fêmeas.

5.2.3 Ovócitos são mais susceptíveis ao envelhecimento

Ovócitos de mamíferos são particularmente expostos a danos de DNA. Antes da sua maturação, durante o período de dormência, podem ser acumulados danos ao DNA, com prejuízo da função do ovócito e da integridade genética (Coticchio et al, 2015). Ainda, a redução na expressão de proteínas do SAC, a disfunção na formação e organização dos fusos meióticos e a perda de coesão entre cromátides são eventos sabidamente

prejudicados com o envelhecimento dos ovócitos, o que resulta no aumento de erros de segregação cromossômica em mulheres (Vogt et al., 2008).

Anormalidades nos fusos mitóticos também são aumentadas com o envelhecimento materno, o que não é tão proeminente em ovócitos de espécies com curto período reprodutivo, como camundongos (Vogt et al., 2008). Distúrbios na função do fuso devem agir sinergicamente com defeitos no SAC para geração dos erros meióticos, particularmente quando a exposição a aneugênicos interfere nesse processo. Então, com o processo de envelhecimento e o consequente comprometimento do SAC, baixas concentrações de substâncias aneugênicas já podem aumentar as não-disjunções, pois, nessas condições, o SAC não poderia prevenir a progressão para anáfase, o que resultaria em efeitos mais severos. Comparativamente, isso não seria esperado em espermatozoides, já que a meiose não é interrompida e não há envelhecimento dessas células. Aproximadamente 20% das concepções em humanos possuem anormalidade cromossômica e a maior parte dos erros são de origem materna. Mesmo em camundongos, a taxa de erro também é substancialmente maior na ovogênese do que na espermatogênese e depende da idade materna. Em humanos, são principalmente erros na meiose I que levam às aneuploidias (Vogt et al., 2008).

5.2.4 Conclusão sobre a determinação de limiar para substâncias aneugênicas em células germinativas

A discussão feita até o momento esclarece que as diferenças na susceptibilidade da espécie, da meiose, do sexo e da expressão gênica são fatores relevantes capazes de influenciar a dose em que o CBZ desencadeia mutações do tipo aberrações cromossômicas numéricas em humanos. Há evidência suficiente mostrando que doses obtidas de estudos com células somáticas ou células germinativas masculinas não podem ser extrapoladas para ovócitos, que podem ser muito mais susceptíveis à aneugênese. Ainda, embora os mecanismos de indução de aneuploidia sejam bastante conservados em mamíferos, há diferenças importantes entre humanos e roedores que resultam na clara observação de uma maior incidência de aneuploidia espontânea e de uma maior susceptibilidade com o aumento da idade em humanos (Pacchierotti et al., 2019). Diante da tendência da população humana de reprodução em idades mais avançadas, é relevante considerar as consequências do envelhecimento na susceptibilidade dos ovócitos humanos à indução de erros meióticos por aneugênicos (Vogt et al., 2008). Também não se pode desconsiderar polimorfismos na população em genes que participam da dinâmica de divisão celular dos ovócitos. Ou seja, dada a alta susceptibilidade a

aneuploidia, característica de ovócitos, e os inúmeros fatores que podem aumentar ainda mais essa susceptibilidade, a CREA não considera adequada e segura a determinação de limiares de doses para substâncias aneugênicas.

Pacchierotti e colaboradores (2019) apresentam dados bastante preocupantes sobre a consequência da aneugênese em humanos: a aneuploidia durante a meiose de células germinativas é a principal causa de abortos espontâneos e é a anormalidade cromossômica mais observada no nascimento. Cerca de 0,3% dos neonatos são aneuplóides e se estima que 10-30% de todas as concepções e mais do que 50% das pré-implantações possuam anormalidades numéricas.

A aneuploidia em célula germinativa, por si só, pode ser considerada um efeito adverso, pois a fertilização de um gameta aneuplóide leva a um conceito aneuplóide, além de causar infertilidade e perda embrionária pré- e pós-implantação. Ainda, é associada a malformações congênitas, retardo mental, morbidade e mortalidade da prole. Os dados disponíveis atualmente mostram que é baixa ou inexistente a seleção contra gametas aneuplóides durante a fertilização. Portanto, espera-se um aumento de conceitos aneuplóides quando há indução de gametas aneuplóides (Pacchierotti et al., 2019). Na maioria das vezes, haverá morte do conceito no útero. Apenas aneuploidia e trissomias específicas são compatíveis com a vida, as quais têm muita gravidade em humanos, como: Síndrome de Down (trissomia 21), Síndrome de Patau (trissomia 13), Síndrome de Klinefelter (47, XXY), Síndrome de Edward (trissomia 18) e Síndrome de Turner (45, X0). Ou seja, toda aneuploidia viável resulta em substancial dano ao desenvolvimento neurológico ou reprodutivo, com significativo impacto emocional, social, financeiro e à saúde.

6. CONCLUSÃO

Com base na avaliação do peso das evidências disponíveis – estudos regulatórios apresentados pela FT, estudos da literatura científica selecionados na revisão sistemática e relatórios das principais agências reguladoras internacionais – conclui-se que: 1) o CBZ não provoca danos diretos ao DNA ou mutações pontuais, exceto na presença de impurezas com relevância toxicológica, as quais devem ter suas concentrações limitadas a 0,0006 g/kg (DAP) e 0,0005 g/kg (AHP) nos produtos registrados no Brasil; 2) o CBZ não causa aberrações estruturais, mas induz aberrações cromossômicas numéricas em células somáticas e germinativas de mamíferos, sendo considerado um agente aneugênico; 3) o CBZ se enquadra quanto à mutagenicidade na Categoria 1B: Produto que

presumidamente induz mutações em células germinativas de seres humanos. Ainda, a partir do conjunto de dados de mutagenicidade, associado aos estudos mecanísticos e de toxicidade reprodutiva também analisados, conclui-se que não há evidência que permita estimar uma dose segura *in vivo* em que não se espera a ocorrência desses danos cromossômicos às células germinativas em humanos. Isto é, não é possível definir um limiar de dose adequado, capaz de impedir a ocorrência dos efeitos aneugênicos induzidos pelo CBZ.

Cabe ressaltar que a conclusão de que o Carbendazim é uma substância aneugênica está alinhada à conclusão de todas as autoridades regulatórias consultadas, conforme pode ser observado no Quadro 8.

Quadro 8. Conclusões das principais autoridades internacionais sobre a mutagenicidade do Carbendazim.

Autoridade Regulatória	Conclusão	Resultados Experimentais	Dose de referência humana
EFSA (2010)	Aneugênico	NOAEL: 50 mg/kg	0,50 mg/kg
JMPR (2005)	Aneugênico	NOAEL: 50 mg/kg	0,50 mg/kg
USEPA (2020)	Aneugênico	NOAEL: 50 mg/kg	Não definida para aneugênese (avaliação de risco de carcinogenicidade não foi por limiar e sim linear, pois considerou que outro mecanismo pode estar agindo para a formação de tumores).
PMRA (2011)	Aneugênico	NOAEL: 50 mg/kg	Não definida para aneugênese (avaliação de risco de carcinogenicidade não foi por limiar e sim linear, pois considerou que outro mecanismo pode estar agindo para a formação de tumores).
APVMA (2009)	Aneugênico	LOAEL: 50 mg/kg	0,05 mg/kg (limiar não experimental, com adoção de fator de extrapolação extra de 10x para cálculo da dose de referência humana).
ANVISA	Aneugênico	LOAEL: 50 mg/kg	Não há dose experimental sem efeito aneugênico que possa ser considerado limiar adequado de acordo com a RDC nº 294/2019. Além disso, há evidências robustas que demonstram maior susceptibilidade dos ovócitos humanos à aneuploidia, em comparação aos espermatozoides e às células somáticas humanas e de roedores. Ainda, espera-se

			agravamento decorrente do processo de envelhecimento característico desse tipo celular e polimorfismos de subpopulações.

Portanto, considerando a legislação brasileira e com base no acima exposto, conclui-se que o CBZ preenche os requisitos proibitivos de registro estabelecidos pela Lei nº 7.802, de julho de 1989 e pelo Decreto nº 4.074, de janeiro de 2002; devendo ser classificado na Categoria 1B em função da mutagenicidade, conforme estabelecido na Seção 4, Anexo IV da RDC nº 294, de 29 de julho de 2019. Em tais dispositivos legais, fica estabelecida a proibição do registro de agrotóxicos que apresentem características mutagênicas e para os quais não seja possível determinar um limiar de dose que permita proceder com as demais etapas da avaliação do risco.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, K. (Huntingdon Life Sciences). Patrocinador: Sumimoto. Carbendazim mammalian cell mutation assay. Estudo n. SNG 76/963243. SEI 1212651. 1996.

Adler, I., Schmid, T.E., Baumgartner, A. Induction of aneuploidy in male mouse germ cells detected by the sperm-FISH assay: a review of the present data base, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Volume 504, Issues 1-2, Pages 173-182, ISSN 0027-5107, [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(02\)00090-8](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(02)00090-8). 2002.

Akbarsha MA, Kadalmani B, Girija R, Faridha A, Hamid KS. Spermatotoxic effect of carbendazim. Indian J Exp Biol. Sep;39(9):921-4. PMID: 11831377. 2001.

APMVA (2009). Human health risk assessment of Carbendazim. Volume 2. Office of Chemical Safety and Environmental Health Office of Health Protection.

Barale R., Scapoli C., Meli C., Casini D, Minunni M., Marrazzini A., Loprieno N., Barrai I. Cytogenetic effects of benzimidazoles in mouse bone marrow. Mutation Research, v. 300, p. 15-28. 1993.

Bastelli, K.F.C. (Bioagri). Patrocinador: Nortox. Avaliação do potencial mutagênico da substância teste Carbendazim Technical através do teste de micronúcleo em camundongos. Estudo n. 7848.402.037.12. SEI 1213365. 2012.

Bentley, K.S. (DuPont). Patrocinador: Bayer. Classification of DPX-E965-299 (Carbendazim, MBC)-induced micronuclei in mouse bone marrow erythrocytes using immunofluorescent antikenetochore antibodies. SEI 1215319. 1992.

Bentley KS, Kirkland D, Murphy M, Marshall R. Evaluation of thresholds for benomyl- and carbendazim-induced aneuploidy in cultured human lymphocytes using fluorescence in situ hybridization. *Mutat Res.* 3;464(1):41-51. doi: 10.1016/s1383-5718(99)00165-5. PMID: 10633176. 2000.

Banduhn N, Obe G. Mutagenicity of methyl 2-benzimidazolecarbamate, diethylstilbestrol and estradiol: structural chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges, C-mitoses, polyploidies and micronuclei. *Mutat Res. Jun*;156(3):199-218. doi: 10.1016/0165-1218(85)90065-5. PMID: 4000178. 1985.

Bowen DE, Whitwell JH, Lillford L, Henderson D, Kidd D, Mc Garry S, Pearce G, Beevers C, Kirkland DJ; Work conducted at Covance Laboratories Ltd., Harrogate. Evaluation of a multi-endpoint assay in rats, combining the bone-marrow micronucleus test, the Comet assay and the flow-cytometric peripheral blood micronucleus test. *Mutat Res.* 722(1):7-19. doi: 10.1016/j.mrgentox.2011.02.009. Epub 2011 Feb 25. PMID: 21356328. 2011.

Breslin WJ, Paulman A, Sun-Lin D, Goldstein KM, Derr A. The inhibin B (InhB) response to the testicular toxicants mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP), 1,3 dinitrobenzene (DNB), or carbendazim (CBZ) following short-term repeat dosing in the male rat. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* Feb;98(1):72-81. doi: 10.1002/bdrb.21043. Epub 2013 Jan 24. PMID: 23348955. 2013.

Can A, Albertini DF. M-phase specific centrosome-microtubule alterations induced by the fungicide MBC in human granulosa cells. *Mutat Res. Jan* 3;373(1):139-51. doi: 10.1016/s0027-5107(96)00184-4. PMID: 9015162. 1997a.

Can A, Albertini DF. Stage specific effects of carbendazim (MBC) on meiotic cell cycle progression in mouse oocytes. *Mol Reprod Dev.* 46(3):351-62. doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(199703)46:3<351::AID-MRD14>3.0.CO;2-1. PMID: 9041138. 1997b.

Coffing S., Engel M., Dickinson D., Thiffeault C., Spellman R., Shutsky T., Schuler M. The Rat Gut Micronucleus Assay: A Good Choice for Alternative In Vivo Genetic Toxicology Testing Strategies. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 52, p. 269-279. 2011.

Correa LM, Miller MG. Microtubule depolymerization in rat seminiferous epithelium is associated with diminished tyrosination of alpha-tubulin. *Biol Reprod.* 64(6):1644-52. doi: 10.1095/biolreprod64.6.1644. PMID: 11369590. 2001.

Correa, L., Nakai, M., Strandgaard, C., Hess, R., Miller, M.. Microtubules of the mouse testis exhibit differential sensitivity to the microtubule disruptors Carbendazim and colchicine. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 69. 175-82. 10.1093/toxsci/69.1.175. 2002.

Costa, K C. (Bioagri). Patrocinador: UPL. Evaluation of the Mutagenic Potential of the Test Substance CARBENDAZIM TÉCNICO by Micronucleus Assay in Mice. Estudo n. 0860.402.053.01. SEI 1148274. 2001.

Costa, K. C. (Bioagri). Patrocinador: Ourofino. Avaliação do potencial mutagênico da substância teste Carbendazim Técnico Ouro Fino através do teste de micronúcleo em camundongos. Estudo n. 6695.402.510.08. SEI 1212712. 2008.

Costa, K. C. (Bioagri). Patrocinador: UPL. Avaliação do potencial mutagênico da substância teste Carbendazim Técnico Biorisk (BK009) através do teste de micronúcleo em camundongos. Estudo n. 5504.402.537.08. SEI 1148278. 2009.

Coticchio G., Dal Canto M.B., Renzini M.M., Guglielmo M.C., Brambillasca F., Turchi D., Novara P.V., Fadini R. Oocyte maturation: gamete-somatic cells interactions, meiotic resumption, cytoskeletal dynamics and cytoplasmic reorganization. *Human Reproductive Update*, V. o, N. 0, p. 1-28. 2015.

de Stoppelaar, J.M., Kuil, T., Bedaf, M., Verharen, H.W., Slob, W., Mohn, G.R., Hoebee, B., Benthem, J.. Increased frequencies of diploid sperm detected by multicolour FISH after treatment of rats with carbendazim without micronucleus induction in peripheral blood erythrocytes, *Mutagenesis*, Volume 14, Issue 6, November, Pages 621–632, <https://doi.org/10.1093/mutage/14.6.621>. 1999.

de Stoppelaar JM, van de Kuil T, Verharen HW, Hokse H, Opperhuizen A, Mohn GR, van Benthem J, Hoebee B. In vivo cytokinesis blocked micronucleus assay with carbendazim in rat fibroblasts and comparison with in vitro assays. *Mutagenesis*. 15(2):155-64. doi: 10.1093/mutage/15.2.155. PMID: 10719042. 2000.

Đikić D, Mojsović-Cuić A, Cupor I, Benković V, Horvat-Knezević A, Lisicić D, Orsolić N. Carbendazim combined with imazalil or cypermethrin potentiate DNA damage in hepatocytes of mice. *Hum Exp Toxicol*. May;31(5):492-505. doi: 10.1177/0960327111417910. Epub 2011 Aug 25. PMID: 21868589. 2012.

ECHA. European Chemicals Agency. Guidance for Human Health Risk Assessment for Biocidal Active Substances and Biocidal Products. Guidance on the BPR: Volume III Assessment & Evaluation (Parts B+C) Version 2.1. ECHA-13-G-18-EN. February, 2017.

EFSA. European Food Safety Authority. Draft Re-Assessment Report. Carbendazim. Volume 1. 2009a.

EFSA. European Food Safety Authority. Conclusion on Pesticide Peer Review. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance carbendazim. EFSA Journal 2010; 8(5):1598. 2010.

Elhajouji, A., Van Hummelen, P., Kirsch-Volders, M.. Indications for a threshold of chemically-induced aneuploidy in vitro in human lymphocytes. Environ Mol Mutagen. 26(4):292-304. doi: 10.1002/em.2850260405. PMID: 8575418. 1995.

Elhajouji, A., Tibaldi, F., Kirsch-Volders, M.. Indication for thresholds of chromosome non-disjunction versus chromosome lagging induced by spindle inhibitors in vitro in human lymphocytes, Mutagenesis, Volume 12, Issue 3, Pages 133–140, <https://doi.org/10.1093/mutage/12.3.133>. 1997.

Elhajouji A., Monica C., Micheline K., Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay, Mutagenesis, Volume 13, Issue 2, Pages 193–198, <https://doi.org/10.1093/mutage/13.2.193>. 1998.

Ermler S., Scholze M., Kortenkamp A. Seven benzimidazole pesticides combined at sub-threshold levels induce micronuclei *in vitro*. Mutagenesis, vol. 28, n. 4, p. 417-426. 2013.

Evenson DP, Janca FC, Jost LK. Effects of the fungicide methyl-benzimidazol-2-yl carbamate (MBC) on mouse germ cells as determined by flow cytometry. J Toxicol Environ Health. 20(4):387-99. doi: 10.1080/15287398709530992. PMID: 3560261. 1987.

Hashem MA, Mohamed WAM, Attia ESM. Assessment of protective potential of Nigella sativa oil against carbendazim- and/or mancozeb-induced hematotoxicity, hepatotoxicity, and genotoxicity. Environ Sci Pollut Res Int. 2018 Jan;25(2):1270-1282. doi: 10.1007/s11356-017-0542-9. PMID: 29086361. 2017.

Hess R.A.; Nakai M. Histopathology of the male reproductive system induced by the fungicide benomyl. Histology and Histopathology, v. 15, p. 207-224. 2000.

Igarashi M, Setoguchi M, Takada S, Itoh S., Furuhashi K. Optimum conditions for detecting hepatic micronuclei caused by numerical chromosome aberration inducers in mice. Mutation Research, v. 632, p. 89-98. 2007.

Innvitro. Relatório de Reavaliação do Ingrediente Ativo Carbendazim – Genotoxicidade. 2020. SEI n. 1211884.

Itoh S., Hattori C., Nagata M., Takasaki, W. Gender differences in the liver micronucleus test in rats with partial hepatectomy, *Toxicology Letters*, Volume 214, Issue 3, Pages 296-300, ISSN 0378-4274, <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.09.003>. 2012a.

Itoh S., Hattori C., Nagata M., Sanbuissho, A. Structural and numerical chromosome aberration inducers in liver micronucleus test in rats with partial hepatectomy. *Environmental Mutagenesis*, v. 747, p. 98-103. 2012b.

Itoh S., Igarashi, M., Nagata M., Hattori C. Assessment of a twice dosing regimen both before and after partial hepatectomy in the rat liver micronucleus test. *Mutation Research*, v. 782, p.18-23. 2015a.

Itoh S, Nagata M, Hattori C, Takasaki W. Effect of buprenorphine on genotoxicity evaluation of chemicals by the rat liver micronucleus test with partial hepatectomy. *J Toxicol Sci*. 2015 Feb;40(1):109-14. doi: 10.2131/jts.40.109. PMID: 25743750. 2015b.

Jeffay, S.C., Libbus, B.L., Barbee, R.R., Perreault, S.D. Acute exposure of female hamsters to carbendazim (MBC) during meiosis results in aneuploid oocytes with subsequent arrest of embryonic cleavage and implantation, *Reproductive Toxicology*, Volume 10, Issue 3, Pages 183-189, ISSN 0890-6238, [https://doi.org/10.1016/0890-6238\(96\)00020-2](https://doi.org/10.1016/0890-6238(96)00020-2). 1996.

JPMR/FAO (2005). CARBENDAZIM 87–106 JMPR 2005.

Kirsch-Volders M., Vanhauwaerta A., Eichenlaub-Ritter U., Decordier I. Indirect mechanisms of genotoxicity. *Toxicology Letters*, v. 140-141, p. 63-74. 2003.

Lebailly P., Vigreux C., Godard T., Sichel F., Bar E., LeTalaer J.Y., Henry-Amar M., Gauduchon P. Assessment of DNA damage induced in vitro by etoposide and two fungicides (Carbendazim and chlorothalonil) in human lymphocytes with the comet assay. *Mutation Research*, v. 375, p. 205-217. 1997.

Lim J., Miller M.G. Role of testis Exposure Levels in the Insensitivity of Prepubertal Rats to Carbendazim-Induced Testicular Toxicity. *Fundamental and Applied Toxicology*, v. 37, p. 158-167. 1997a.

Lim J., Miller MG. The Role of the Benomyl Metabolite Carbendazim in Benomyl-Induced Testicular Toxicity, *Toxicology and Applied Pharmacology*, Volume 142, Issue 2, Pages 401-410, ISSN 0041-008X, <https://doi.org/10.1006/taap.1996.8042>. 1997b.

Liu J, Zhang P, Zhao Y, Zhang H. Low dose carbendazim disrupts mouse spermatogenesis might Be through estrogen receptor related histone and

DNA methylation. *Ecotoxicol Environ Saf.* 176:242-249. doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.03.103. Epub 2019 Mar 30. PMID: 30939404. 2019.

Marchetti F., Massarottii A., Yauk C.L., Pacchierotti F., Russo A. The Adverse Outcome Pathway (AOP) for Chemical Binding to Tubulin in Oocytes Leading to Aneuploid Offspring. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 57, p. 87-113. 2016.

Marshall, R.R., Murphy, M., Kirkland, D.J., Bentley, K.S.. Fluorescence in situ hybridisation with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Volume 372, Issue 2, Pages 233-245, ISSN 0027-5107, [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(96\)00143-1](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(96)00143-1). 1996.

Markelewicz R.J. Jr., Hall S.J, Boekelheide K. 2,5-Hexanedione and Carbendazim Coexposure Synergistically Disrupts Rat Spermatogenesis Despite Opposing Molecular Effects on Microtubules. *Toxicological Sciences*, v. 80, p. 92–100. 2004.

Marion J, L., Lorna J., L. An investigation of some genetic toxicological effects of the fungicide benomyl, *Toxicology*, Volume 17, Issue 1, Pages 83-95, ISSN 0300-483X, [https://doi.org/10.1016/0300-483X\(80\)90030-X](https://doi.org/10.1016/0300-483X(80)90030-X). 1980.

Masaaki, N., Rex A, H.. Morphological changes in the rat sertoli cell induced by the microtubule poison carbendazim, *Tissue and Cell*, Volume 26, Issue 6, Pages 917-927, ISSN 0040-8166, [https://doi.org/10.1016/0040-8166\(94\)90041-8](https://doi.org/10.1016/0040-8166(94)90041-8). 1994.

Matsuo F., Masaaki N., Nasu T. The Fungicide Carbendazim Induces Meiotic Micronuclei in the Spermatids of the Rat Testis. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 61, n.5, p. 573-576. 1999.

McCarroll N.E.; Protzel A., Ioannou Y., Stack H.F., Jackson M.A., Waters M.DD., Dearfield K.L. A survey of EPA/OPP and open literature on selected pesticide chemicals III. Mutagenicity and carcinogenicity of benomyl and carbendazim. *Reviews in Mutation Research*, v. 512, p.1-35. 2002.

Miyaji, C.K. (Bioagri). Patrocinador: UPL. Evaluation of the mutagenic potential of the test substance CARBENDAZIM TÉCNICO by reverse mutation assay in *Salmonella typhimurium* (Ames Test). Estudo n. RF-0861.401.013.00. SEI 1148276. 2005.

Miyaji, C.K. (Bioagri). Patrocinador: Ourofino. Avaliação do potencial mutagênico da substância teste Carbendazim Técnico Ouro Fino através do teste de mutação gênica reversa em *Salmonella Typhimurium* (Teste de Ames). Estudo n. 6695.401.501.08. SEI 1212710. 2008.

Miyaji, C. K. (Bioagri). Patrocinador: UPL. Avaliação do potencial mutagênico da substância teste BK 009 (Carbendazim Técnico Biorisk) através do teste de mutação gênica reversa em *Salmonella Typhimurium* (Teste de Ames). Estudo n. 5504.401.532.08. SEI 1148277. 2009.

Miyaji, C.K. (Bioagri). Patrocinador: Nortox. Avaliação do potencial mutagênico da substância teste CARBENDAZIM TECHNICAL através do teste de mutação gênica reversa em *Salmonella enterica serovar Typhimurium* (Teste de Ames). Estudo n. 7848.401.026.12. SEI 1213364. 2012.

Miyuki, I., Mayumi, S., Sanae, T., Satoru, I., Kazuhisa, F.. Optimum conditions for detecting hepatic micronuclei caused by numerical chromosome aberration inducers in mice, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Volume 632, Issues 1–2, 2007,

Moffit, J., Her, L., Mineo, A., Knight, B., Phillips, J., Thibodeau, M.. Assessment of Inhibin B as a Biomarker of Testicular Injury Following Administration of Carbendazim, Cetrorelix, or 1,2-Dibromo-3-Chloropropane in Wistar Han Rats. Birth defects research. Part B, Developmental and reproductive toxicology. 98. 10.1002/bdrb.21045. 2013.

Mogessie B., Scheffler K., Schuh M. Assembly and Positioning of the Oocyte Meiotic Spindle. Annual Review of Cell and Developmental Biology, v. 11, n.9, p. 6.1-6.23. 2018.

Moura, J.W. (Tecam). Patrocinador: Sumimoto. Teste de amesara o produto Carbendazim Agripec Técnico. Estudo n. T07115-00. SEI 1212650. 2000.

Nakai, M., B. Moore and R. Hess. Epithelial reorganization and irregular growth following carbendazim-induced injury of the efferent ductules of the rat testis. The Anatomical Record 235: n. pag. 1993.

Nakai M, Hess RA, Netsu J, Nasu T. Deformation of the rat Sertoli cell by oral administration of carbendazim (methyl 2-benzimidazole carbamate). J Androl. 16(5):410-6. PMID: 8575980. 1995.

Nakai, M., Hess, R.A., Matsuo, F., Gotoh, Y., Nasu, T. Further observations on carbendazim-induced abnormalities of spermatid morphology in rats, Tissue and Cell, Volume 29, Issue 4, Pages 477-485, ISSN 0040-8166, [https://doi.org/10.1016/S0040-8166\(97\)80033-X](https://doi.org/10.1016/S0040-8166(97)80033-X). 1997a.

Nakai M, Toshimori K, Yoshinaga K, Nasu T, Hess RA. Spermatids of prepubertal male rats are susceptible to carbendazim during early spermiogenesis. Arch Histol Cytol. (5):433-7. doi: 10.1679/aohc.61.433. PMID: 9990427. 1998a.

Nakai, M., Toshimori, K., Yoshinaga, K. et al. Carbendazim-induced abnormal development of the acrosome during early phases of spermiogenesis in the rat testis. *Cell Tissue Res* 294, 145–152. <https://doi.org/10.1007/s004410051164>. 1998b.

Pacchierotti F, Masumura K, Eastmond D, Elhajouji A, Froetschl R, Kirsch-Volders M, Lynch A, Schuler M, Tweats D, Marchetti F. Chemically induced aneuploidy in germ cells. Part II of the report of the 2017 IWGT workgroup on assessing the risk of aneugens for carcinogenesis and hereditary diseases. *Mutation Research*, 2019.

Pisani C, Voisin S, Arafah K, Durand P, Perrard MH, Guichaoua MR, Bulet P, Prat O. Ex vivo assessment of testicular toxicity induced by carbendazim and iprodione, alone or in a mixture. *ALTEX*. 2016;33(4):393-413. doi: 10.14573/altex.1601253. PMID: 27155993. 2016.

PMRA. Health Canada Pest Management Regulatory Agency. Proposed Registration Decision. Carbendazim. PRD2011-04. 2011.

Rai B., Mercurio S.D. Environmentally relevant exposures of male mice to carbendazim and thiram cause persistent genotoxicity in male mice. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 10, p. 10629-10641. 2020.

Roeles J., Tsiavaliari G. Actin-microtubule interplay coordinates spindle assembly in human oocytes. *Nature Communications*, v. 10, p 4651. 2019.

Sarrif, A.M., Bentley, K.S., Fu, L., Neil, R.M., Reynolds, V.L., Stahl, R.G.. Evaluation of benomyl and carbendazim in the vivo aneuploidy/micronucleus assay in BDF1 mouse bone marrow, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Volume 310, Issue 1, Pages 143-149, ISSN 0027-5107, [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(94\)90018-3](https://doi.org/10.1016/0027-5107(94)90018-3). 1994.

Stammberger, I. (Hoechst). Patrocinador: Bayer. Study of the mutagenic potential in strains of *Salmonella typhimurium* (Ames Test) and *Escherichia coli*. Estudo n. 910785. SEI 1215318. 1992.

Takeshita, K., Ogawa, H.I. & Maeda, T. Structural chromosome aberrations cause swelling of the nucleus. *Genes and Environ* 38, 22. <https://doi.org/10.1186/s41021-016-0047-7>. 2016.

Tates AD. *Microtus oeconomus* (Rodentia), a useful mammal for studying the induction of sex-chromosome nondisjunction and diploid gametes in male germ cells. *Environ Health Perspect.* 31:151-159. doi:10.1289/ehp.7931151. 1979.

Tollstadius B.F., da Silva A.C.G., Pedralli B.C.O., Valadares M.C. Carbendazim induces death in alveolar epithelial cells: A comparison between submerged

and at the air-liquid interface cell culture. *Toxicology in Vitro*, v. 58, p. 78-85. 2019.

USEPA. United States Environmental Protection Agency, *Guidelines for Carcinogen Risk Assessment*. EPA/630/P-03/001F, Risk Assessment Forum, Washington, DC, 2005.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. Thiophanate-Methyl and Carbendazim (MBC): Human Health Assessment Scoping Document in Support of Registration Review.. Memorandum Decision No. 4800779. DP D413079. March 2014.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. Thiophanate-Methyl and Carbendazim: Draft Human Health Risk Assessment. Memorandum Decision No. 452566. DP D452566. March 2020.

Vanhouwaert, A., Vanparys, P., Kirsch-Volders, M.. The in vivo gut micronucleus test detects clastogens and aneugens given by gavage, *Mutagenesis*, Volume 16, Issue 1, Pages 39–50, <https://doi.org/10.1093/mutage/16.1.39>. 2001.

Van Hummelen, P., Elhajouji, A., Kirsch-Volders, M. Clastogenic and aneugenic effects of three benzimidazole derivatives in the in vitro micronucleus test using human lymphocytes, *Mutagenesis*, Volume 10, Issue 1, Pages 23–29, <https://doi.org/10.1093/mutage/10.1.23>. 1995a

Van Hummelen P, Nüsse M, Castelain P, Kirsch-Volders M. Aneugen-induced micronuclei (MN) in human lymphocytes may be discerned using image analysis techniques when cell-cycle stage is taken into account. *Environ Mol Mutagen*. 25(4):269-78. doi: 10.1002/em.2850250402. PMID: 7541751. 1995b

Vargas, M.A.T. (Bioplan). Patrocinador: Adama. The *Salmonella Typhimurium* reverse mutation by Carbendazim Técnico Herbitécnica 950. Estudo n. G1.1.1-234/95. SEI 1213037. 1995.

Vargas, M. (Bioplan). Patrocinador: Adama. A micronucleus study in mice for the product Carbendazin Técnico Herbitécnica 950. Estudo n. G124-49/95. SEI. 123038. 1995.

Vigreux C, Poul JM, Deslandes E, Lebailly P, Godard T, Sichel F, Henry-Amar M, Gauduchon P. DNA damaging effects of pesticides measured by the single cell gel electrophoresis assay (comet assay) and the chromosomal aberration test, in CHOK1 cells. *Mutat Res*. 419(1-3):79-90. doi: 10.1016/s1383-5718(98)00126-0. PMID: 9804902. 1998.

Vogt E., Kirsch-Volders M., Parry J., Eichenlaub-Ritter U. Spindle formation, chromosome segregation and the spindle checkpoint in mammalian oocytes

and susceptibility to meiotic error. Mutation Research, v. 651, p.14-29. 2008.

Winder B.S., Strandgaard C.S., Miller M.G. The Role of GTP Binding and Microtubule-Associated Proteins in the Inhibition of Microtubule Assembly by Carbendazim. Toxicological Sciences, v. 59, p. 138-146. 2001.

Yamada T., Sumida K., Saito K., Ueda S., Yabushita S., Sukata T., Kawamura S., Okuno Y., Seki T. Functional genomics may allow accurate categorization of the benzimidazole fungicide Benomyl: lack of ability to act via steroid-receptor-mediated mechanisms. Toxicology and Applied Pharmacology, v. 205, p. 11–30. 2005.

Warr JR, Flanagan DJ, Anderson M. Mutants of Chinese hamster ovary cells with altered sensitivity to taxol and benzimidazole carbamates. Cell Biol Int Rep. 6(5):455-60. doi: 10.1016/0309-1651(82)90117-5. PMID: 6124319. 1982.

Zhang M, Miao M, Chen Q, Cai M, Dong W, Dai X, Lu Y, Zhou C, Cui Z, Xiong B. BaP exposure causes oocyte meiotic arrest and fertilization failure to weaken female fertility. The FASEB Journal, v. 32. 2018.

Zuelke K.A.; Perreault, S.D. Carbendazim (MBC) Disrupts Oocyte Spindle Function and Induces Aneuploidy in Hamsters Exposed During Fertilization (Meiosis 11). Molecular Reproduction and Development, v. 42, p. 200-209. 1995.



Documento assinado eletronicamente por **Larissa Muratori**

Aguiar, Especialista em Regulação e Vigilância Sanitária, em 09/07/2021, às 20:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/D10543.htm.



Documento assinado eletronicamente por **Camila Queiroz**

Moreira, Especialista em Regulação e Vigilância Sanitária, em 12/07/2021, às 16:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/D10543.htm.



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Roberto Coradi de**

Freitas, Coordenador(a) de Reavaliação, em 15/07/2021, às 19:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de

2020 http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/D10543.htm.



Documento assinado eletronicamente por **Juliana Machado Braz, Especialista em Regulação e Vigilância Sanitária**, em 27/07/2021, às 10:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/D10543.htm.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.anvisa.gov.br/autenticidade>, informando o código verificador **1309909** e o código CRC **4A1099B1**.

Referência: Processo nº 25351.945793/2019-57

SEI nº 1309909

Criado por larissa.aguiar, versão 80 por larissa.aguiar em 06/07/2021 19:12:26.

PARECER Nº 5/2021/SEI/CREAV /GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA

Processo nº 25351.945793/2019-57

Interessado: Coordenação de Reavaliação, Gerência de Monitoramento e Avaliação do Risco, Gerência-Geral de Toxicologia

Assunto: **Análise do potencial carcinogênico do ingrediente ativo Carbendazim.**

Avalia o potencial de carcinogenicidade do Carbendazim para os seres humanos, como parte da reavaliação toxicológica desse ingrediente ativo, conforme RDC nº 221, de 28 de março de 2018.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anvisa: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APMVA: *Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority* (Autoridade Australiana de Pesticidas e Medicina Veterinária).

CBZ: Carbendazim

CREAV: Coordenação de Reavaliação

EChA: *European Chemicals Agency* (Agência Europeia de Químicos)

EFSA: *European Food Safety Authority* (Autoridade Europeia para Segurança dos Alimentos)

FAO: *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação).

FSCJ: *Food Safety Commission of Japan* (Comissão para Segurança dos Alimentos do Japão)

FT: Força Tarefa do Carbendazim

IA: Ingrediente ativo.

IARC: *International Agency for Research on Cancer* (Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer).

ICAMA: *Institute for the Control of Agrochemicals, P.R. China* (Instituto para o Controle de Agrotóxicos da República Popular da China).

LOAEL: *Lowest Observed Adverse Effect Level* (Nível mais Baixo de Efeito Adverso Observado).

NOAEL: *No Observed Adverse Effect Level* (Nível de Efeito Adverso não Observado).

PMRA: *Health Canada's Pest Management Regulatory Agency* (Agência Reguladora de Controle de Pragas Canadense).

PoD: *Point of Departure* (Ponto de partida).

USEPA: *United States Environmental Protection Agency* (Agência de Proteção Ambiental Americana).

WoE: *Weight of evidence* (peso da evidência).

Resumo

Para avaliação do potencial carcinogênico do Carbendazim (CBZ), foram avaliados 14 estudos que foram enviados pelas empresas registrantes, foram obtidos por uma busca sistematizada de estudos científicos ou foram apresentados nos documentos das agências internacionais

envolvidas na regulação de agrotóxicos. Verificou-se que o CBZ está associado ao desenvolvimento de tumores hepáticos em camundongos das linhagens CD-1 e Swiss em doses $\geq 22,5$ mg/kg p.c./dia. Não foi possível estabelecer um NOAEL, pois nas menores doses utilizadas nos estudos foram observados efeitos pré-neoplásicos (22,5 mg/kg p.c./dia) e carcinoma (75 mg/kg p.c./dia). Os estudos com ratos e cães foram negativos para a carcinogenicidade. O modo de ação (MoA) foi estabelecido tendo como evento chave a interação do CBZ com a beta-tubulina, impedindo a polimerização com alfa-tubulina e, consequentemente, a formação dos microtúbulos. Os microtúbulos estão envolvidos em vários processos metabólicos das células. A deficiência na formação dos microtúbulos nos hepatócitos pode levar à citotoxicidade para as células em intérfase e à aneugênese de células filhas, ocasionando reposição celular crônica e o surgimento de alterações cromossomais. Essas duas condições são mecanismos de carcinogenicidade reconhecidos. A menor capacidade de detoxificação do CBZ pelos camundongos, aliada a uma maior susceptibilidade natural das linhagens com resultados positivos ao desenvolvimento de câncer hepático, comparadas com ratos e cães, pode explicar a ocorrência de tumores apenas nesta espécie. Por outro lado, o MoA do CBZ ocorre em células humanas, não sendo possível descartar a sua ocorrência em humanos. A avaliação do peso das evidências concluiu que há evidência suficiente de carcinogenicidade em animais experimentais sem evidência de carcinogenicidade em seres humanos. Essa conclusão classifica o CBZ como produto que presumidamente possui potencial carcinogênico para seres humanos (categoria 1B). Com isso, é necessário o estabelecimento de um limiar de dose para o desfecho carcinogenicidade. A aneugênese é conhecidamente um mecanismo que apresenta limiar de dose para células somáticas. O LOAEL de 22,5 mg/kg p.c./dia obtido de estudo crônico e de carcinogenicidade em camundongo pela observação de alterações celulares pré-neoplásicas foi escolhido como ponto de partida para a derivação de uma dose de referência humana para carcinogenicidade (limiar de dose). Após aplicação de fator de incerteza de 1000 vezes (foi utilizado um fator adicional de 10x pelo uso do LOAEL), foi definido um limiar de dose de 0,0225 mg/kg p.c./dia. Este valor de limiar é suficientemente baixo para o mecanismo de aneugênese do CBZ, pois baseia-se na observação de efeitos ainda não considerados carcinogênicos e o LOAEL encontrado para efeito aneugênico em células somáticas foi de 62,5 mg/kg p.c em estudo com ratos.

1. RELATÓRIO

O presente parecer objetiva avaliar o potencial carcinogênico do ingrediente ativo Carbendazim (CBZ), a partir do conjunto de evidências – *in vitro* e *in vivo* – relevantes disponíveis, quais sejam: estudos de carcinogenicidade e estudos mecanísticos. Foram também considerados relevantes os estudos realizados com o ingrediente ativo Benomil, cujo principal produto de degradação é o CBZ. Todos os estudos aqui discutidos foram obtidos do relatório apresentado pela Força Tarefa (FT) do Carbendazim, dos relatórios das principais agências reguladoras internacionais e da busca sistematizada da literatura científica conduzida pela Coordenação de Reavaliação (CREAV).

A metodologia para obtenção dos estudos e artigos científicos está apresentada no PARECER nº 7/2021/SEI/CREAV /GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA ([1451178](#))

2. AVALIAÇÃO

2.1. Avaliação do potencial de carcinogenicidade do CBZ pelas agências reguladoras de agrotóxicos ou órgãos afins internacionais.

2.1.1. APVMA

A agência australiana avaliou um total de sete estudos de longa duração, sendo dois estudos regulatórios em ratos (Sherman, 1972; Til *et al*, 1976), três em camundongos (Beens *et al*, 1976; Wood *et al*, 1982; Donaubauer *et al*, 1982) e outros dois em cães (Sherman, 1972; Reuzel *et al*, 1976). Os detalhes de cada um dos estudos estão apresentados no Quadro 1. A APVMA concluiu que o CBZ induz a proliferação de células hepáticas levando a adenomas hepatocelulares em camundongos. Porém, avaliou que as linhagens desta espécie que tiveram resultado positivo não são consideradas um modelo adequado para a avaliação da formação de tumores hepáticos em humanos. Além disso, não foram identificadas evidências de interação direta do CBZ com o DNA nos testes de genotoxicidade. Logo, a reavaliação do CBZ pela APVMA (2009 e 2012) concluiu que não há evidências de que este IA seja carcinogênico.

2.1.2. EFSA

A EFSA (2009) avaliou os mesmos estudos de longa duração que a APVMA [dois estudos em ratos (Sherman, 1972; Til *et al*, 19796), três em camundongos (Beens *et al*, 1976; Wood *et al*, 1982; Donaubauer *et al*, 1982) e outros dois em cães (Sherman, 1972; Reuzel *et al*, 1976)] e concluiu que os animais apresentaram tumor no fígado (detalhes no Quadro 2) em dois estudos com camundongos das linhagens CD-1 e Swiss. Porém, por estes animais serem altamente sensíveis a tumor hepático induzido por substâncias exógenas, a EFSA considerou que estes achados não são relevantes para humanos. Assim, concluiu que o CBZ não é carcinogênico para humanos.

2.1.3. Força Tarefa do Carbendazim

A FT do CBZ avaliou sete estudos de exposição crônica ou carcinogenicidade sendo dois estudos em ratos (Sherman, 1972; Til *et al*, 19796), três em camundongos (Beens *et al*, 1976; Wood *et al*, 1982; Donaubauer *et al*, 1982) e outros dois em cães (Sherman, 1972; Reuzel *et al*, 1976). A Força Tarefa concluiu que, embora CBZ possua claro efeito genotóxico, não possui evidências de mecanismo de ação carcinogênico com relevância para humanos. A FT afirmou que foi evidenciado claro efeito hepatotóxico do CBZ nos animais estudados, sendo possível definir um limiar de segurança para este efeito. Sugere que uma ingestão diária aceitável de 0,025 mg/kg/dia pode ser considerada segura para a hepatotoxicidade.

2.1.4. JMPR

A JMPR não avaliou o potencial carcinogênico para o CBZ, descrevendo apenas estudos de toxicidade reprodutiva e mutagenicidade (Pfeil e Dellarco, 2005).

2.1.5. PMRA

A PMRA (2011) concluiu que a exposição ao CBZ produziu tumores no fígado e ovários em camundongos que receberam doses diárias ao longo de sua vida. Os estudos foram negativos em ratos e cães (PMRA, 2011). A PMRA avaliou os seguintes estudos: ratos – Til *et al*, 1976; cães – Sherman, 1972; Reuzel *et al*, 1976; camundongos – Beems *et al*, 1976; Wood *et al*, 1982; Donaubauer *et al*, 1982.

2.1.6. USEPA

A USEPA (USEPA, 2014; USEPA, 2020) avaliou seis estudos, sendo um em ratos (Sherman, 1972), dois em cães (Sherman, 1972; USEPA ID nº 00164304, 1986) e três camundongos (Beens *et al*, 1976; Wood *et al*, 1982; Donaubauer *et al*, 1982). Porém, para camundongos, o estudo de Beens *et al* (1976) foi desconsiderado pela Agência pela grande quantidade de limitações metodológicas. A USEPA classificou o CBZ no grupo C – possível carcinogênico para humanos, com base na presença de adenoma e carcinoma hepatocelular em camundongos CD-1 (Wood *et al*, 1982) e no potencial aneugênico observado em estudos de genotoxicidade.

2.2. Análise do estudo *in vitro*

O estudo de Peyre *et al* (2014), avaliou o papel do CBZ em três fenômenos pro-carcinogênicos: apoptose, desregulação do ciclo celular e transição de células epiteliais para mesenquimais.

Apoptose é a morte celular programada e ocorre, por exemplo, quando células são infectadas, quando há danos irreparáveis ao DNA e quando a célula está sofrendo transformação maligna.

Desregulação do ciclo celular refere-se ao fenômeno relacionado ao descontrole do processo de mitose da célula, característico de células tumorais.

A transição de células epiteliais para mesenquimais é caracterizada pela mudança (ou transição) do fenótipo epitelial para o mesenquimal. Uma mudança para o estado mesenquimal modifica as moléculas de adesão expressas pela célula, permitindo-lhe adotar um comportamento migratório e invasivo. Células tumorais com essa característica promovem a metástase do câncer.

Os autores demonstraram que dois desses três fenômenos foram afetados pelo CBZ e podem estar associados a indução de câncer em células hepáticas.

Primeiramente, o CBZ promoveu a desregulação da via do TGF-por meio da ativação de proteínas Smads e possível ativação da -catenina. Esses dois eventos juntos induzem a transição de células epiteliais para mesenquimais e manutenção da sobrevivência das células tumorais.

Uma segunda observação é que o CBZ promoveu a fosforilação de STAT-3 e de AKT o que evidencia resistência à apoptose. Ainda, o CBZ induziu a atividade da caspase e modulou a expressão de proteínas apoptóticas (XIAP, Bcl-xl, Bax), o que pode estar associado à promoção de apoptose celular. Portanto, os autores afirmam que há fortes evidências bioquímicas *in vitro* para a ocorrência de efeitos celulares pró-carcinogênicos após exposição crônica ao CBZ.

2.3. Análise dos estudos *in vivo*

Nesta análise foram avaliados 13 estudos com animais de laboratório. O Quadro 1 apresenta o resultado da avaliação da Anvisa para cada um desses estudos. Na maior parte dos estudos com estes animais, o fígado foi o órgão-alvo para os efeitos tóxicos da exposição crônica ao CBZ.

Nos estudos com ratos e cães, a Anvisa concluiu que não há evidência de carcinogenicidade.

Três estudos com camundongos foram considerados adequados para inclusão na avaliação do peso das evidências: Beens *et al*, 1976; Wood *et al*, 1982; Donaubauer *et al*, 1982. No estudo de Beens *et al* (1976), doses a partir de 22,5 mg/kg p.c./dia foram capazes de induzir aumento na incidência de alterações celulares pré-neoplásicas (focos celulares em ambos os

sexos), apesar de não haver significância estatística nas menores doses, apenas na maior dose (750 mg/kg p.c./dia). Ainda, o CBZ induziu tumores malignos em machos (hepatoblastoma) e nódulos neoplásicos em fêmeas desde a menor dose, mas com significância estatística apenas na maior dose. O hepatoblastoma é um tumor muito raro que, em humanos, acomete recém-nascidos e crianças. A PMRA (2011) também concluiu que em doses $\geq 22,5$ mg/kg p.c./dia causaram lesões pré-neoplásicas e que os tumores malignos apareceram somente na maior dose (750 mg/kg p.c./dia). A EFSA (2009) considerou que a indução de lesões pré-neoplásicas ocorreu em doses ≥ 45 mg/kg p.c./dia e que os tumores surgiram apenas na maior dose. A USEPA (2014) considerou o estudo inadequado por causa limitações metodológicas como ausência de dados históricos, dados microscópicos e dados brutos nos relatórios de patologia para animais individuais, e não havia no estudo a garantia de que as dietas eram analisadas quanto à homogeneidade do composto e estabilidade. Além disso, não houve hematologia ou análise química clínica, nem urinálise e apenas órgãos ou lesões suspeitas de apresentar tumores e fígados (2 seções) foram examinados histologicamente. A FT não encontrou evidências de carcinogenicidade neste estudo. A Anvisa reconhece a limitação deste estudo como evidência para atribuir propriedades carcinogênicas ao CBZ. No entanto, quando os dados deste estudo são avaliados em conjunto com o estudo de Wood *et al* (1982), descrito abaixo, os resultados devem ser considerados no peso das evidências.

Em Wood *et al* (1982), as agências reguladoras internacionais APVMA, EFSA, PMRA e USEPA relataram aumento do peso relativo do fígado nas doses ≥ 225 mg/kg p.c./dia e presença de carcinoma hepatocelular em doses ≥ 75 mg/kg p.c./dia ($p < 0,05$) nas fêmeas. O teste de tendência apontou clara relação dose-resposta na incidência de carcinoma e neoplasma primário hepatocelular. Nos machos, observou-se hepatotoxicidade a partir de 225 mg/kg p.c./dia e presença de carcinoma hepatocelular na dose de 225 mg/kg p.c./dia ($p = 0,0066$). A dose de 1.125 mg/kg p.c./dia não pode ser testada devido à alta mortalidade no grupo. As agências reguladoras internacionais APVMA, EFSA, PMRA e USEPA concluíram pela presença de efeitos carcinogênicos do CBZ para este estudo (APVMA, 2009; EFSA, 2009; PMRA, 2011; USEPA, 2014; USEPA, 2020). A FT concluiu que apenas na maior dose foi observada a presença de carcinoma hepatocelular. A Anvisa considera que a exposição ao CBZ está associada a ocorrência de carcinoma hepático em machos e fêmeas, indicando potencial carcinogênico.

Para o estudo de Donaubauer *et al* (1982) as agências reguladoras internacionais APVMA (2009), EFSA (2009), PMRA (2011) e USEPA (2014) relataram aumento do peso relativo e hepatotoxicidade em ambos os sexos na maior dose. A EFSA destacou ainda a hipertrofia de hepatócitos centrolobulares e intermediários, com abundante necrose de células isoladas e aumento secundário da atividade mitótica (compensatória), bem como aumento do armazenamento de pigmento nas células de Kupffer. A PMRA observou aumento da incidência (não significativa) de células tumorais granulosas e luteomas nos ovários somente na dose de 34,4/41,9 mg/kg p.c./dia. A APVMA, a EFSA, a USEPA e a FT concluíram pela ausência de sinais de carcinogenicidade. A PMRA concluiu que o estudo apresenta evidências de carcinogenicidade pela exposição ao CBZ. Vale ressaltar que a EFSA e a USEPA consideraram este estudo como evidência limitada e inadequada, respectivamente. A Anvisa considerou este estudo adequado e concluiu pela ausência de efeitos carcinogênicos.

No estudo de Til *et al* (1976), a Anvisa considera que não foram encontradas evidências de carcinogenicidade. APVMA (2009), EFSA (2009) e PMRA (2011) também chegaram à mesma conclusão. Os documentos da USEPA (2014 e 2020) não descrevem a avaliação deste estudo.

Considerando as avaliações de outras agências internacionais de regulação de agrotóxicos e as análises dos estudos regulatórios, a conclusão da avaliação do conjunto dos estudos in vivo é que o CBZ está associado ao desenvolvimento de câncer hepático em camundongos. Nos estudos com ratos e cães não foi observado o desenvolvimento de câncer. O fígado foi o órgão alvo com maior toxicidade em todos os animais estudados.

Quadro 1. Avaliação dos estudos crônicos e de carcinogenicidade em animais para o ingrediente ativo Carbendazim.

ID	Espécie, linhagem e número de animais	Período e via de exposição	Pureza (%)	Doses (mg/kg pc/dia)	Resultados relevantes	NOAEL (mg/kg p.c./dia)	Limitações	Referência	Avaliação Agências internacionais	Conclusão
1	Ratos SD ou Charles River N=288 (36/sexo/dose)	728 dias Oral (dieta)	50-70	0,5;25;125/250/500 (dose de 125 foi aumentada para 250 ou 500 após a 20ª semana)	Ausência de sinais de carcinogenicidade; 500 mg/kg p.c./dia: redução de ganho de peso, redução da contagem de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito; atrofia testicular difusa; prostatite.	-	Produto formulado	Sherman, 1972*	APVMA, EFSA, Força Tarefa e USEPA: nenhum efeito carcinogênico;	Inadequado, pois usou produto formulado.
2	Cães beagle N=32 (4/sexo/dose)	728 dias Oral (dieta)	53 e 72,2	2,5; 12,5; 63	Ausência de sinais de carcinogenicidade; 12,4 mg/kg p.c/dia: aumento da ALAT e SAP; um animal apresentou células hepáticas inchadas e vacuoladas e proliferação marginal das triades portais com infiltração celular; 63 mg/kg p.c/dia Redução no ganho de peso; anorexia, mortalidade; aumento da ALAT e SAP e cirrose	-	- Produto formulado; - Número de animais é pequeno para se avaliar o desfecho câncer; - Métodos estatísticos não foram descritos.	Sherman, 1972*	- APVMA, EFSA, Força Tarefa, PMRA e USEPA: nenhum efeito carcinogênico; - EFSA: considerou evidência limitada.	Inadequado, pois usou produto formulado
3	Camundongos Swiss n=166 sendo assim distribuídos: Grupos tratados: A=10 fêmeas + NaNO2 B=10 prenhes +NaNO2 C=machos + NaNO2 D=fêmeas Grupos controle: E= 10 fêmeas + NaNO2 F=78 fêmeas e 38 machos	728 dias, Fêmeas prenhes: apenas durante a prenhez, 2x por semana; Demais grupos ♀/♂: durante a vida, 2x por semana. Oral (gavagem)	Alta	250	- Linfosarcoma: ♀ prenhes: 2/10 ♀ (tratamento +NaNO2): 6/10 ♂: 2/10 - Adenoma pulmonar ♀ (tratamento +NaNO2): 1/10	-	- Uma única dose testada. - Lesões avaliadas apenas no sistema linfático. - Partículas virais presentes nas células tumorais. - Não comparado com controle histórico.	Börzsönyi & Csik, 1975.	Não avaliado	Inadequado
4	Camundongos Swiss n = 100 fêmeas prenhes10 em cada grupo de tratamento e 40 no grupo controle	Durante a prenhez, por 5 dias consecutivos Oral (gavagem)	Alta	500	Linfosarcoma na prole: 9/27 tratamento na 1ª semana gestacional 8/15 tratamento na 2ª semana gestacional 7/18 tratamento na 3ª semana gestacional 7/10 tratamento durante toda a	-	- Uma única dose testada. - Tumor avaliado apenas no sistema linfático; - Partículas virais presentes nas células tumorais. Tumor foi	Börzsönyi <i>et al</i> , 1976.	Não avaliado	Inadequado

					gestação 1/256 no controle negativo		transferido após filtração em filtros “cell free”.			
							Não comparado com controle histórico.			
5	Camundongos Swiss N=400 (50/sexo/dose)	560 dias Oral (dieta)	99%	22,5; 45 ou 750	≥ 22,5 mg/kg p.c./dia Fígado - lesões pré-neoplásicas: aumento de focos celulares em ambos os sexos com significância estatística apenas na maior dose. 750 mg/kg p.c./dia Fígado - lesões neoplásicas: aumento significativo na incidência de hepatoblastoma nos machos e de nódulos neoplásicos nas fêmeas. Aumento significativo do peso relativo.	< 22,5 por observação de alterações celulares pré-neoplásicas (focos celulares)	- Espaçamento grande entre a dose intermediária e a maior dose - ausência de dados históricos; - não há informação sobre a comprovação da estabilidade e homogeneidade do composto na dieta - foram avaliados histologicamente apenas os órgãos suspeitos de apresentarem tumor.	Beems <i>et al</i> , 1976.	- APVMA e Força Tarefa: nenhum efeito carcinogênico; - PMRA: evidência de carcinogenicidade dose dependente em ambos os sexos no fígado; - EFSA: presença células tumorais, mas considerou a evidência limitada. - USEPA: inadequado pelas limitações metodológicas.	Foram observados aumento de alterações pré-neoplásicas nas doses ≥ 22,5 mg/kg p.c./dia e de tumores hepáticos na dose de 750 mg/kg p.c./dia, indicando potencial carcinogênico.
6	Ratos Wistar N= 480 (60/sexo/dose)	728 dias Oral (dieta)	99%	7,5; 15; 500	Ausência de sinais de carcinogenicidade; 500 mg/kg p.c./dia Redução da hemoglobina em fêmeas; Redução da AST nos machos; aumento do peso na maior dose;	-	Espaçamento grande entre a dose intermediária e a maior dose.	Til <i>et al</i> , 1976	- APVMA, EFSA, Força Tarefa e PMRA: nenhum efeito carcinogênico - USEPA: não avaliado	Nenhum efeito carcinogênico.
7	Cães beagle N=32 (4/sexo/dose)	728 dias Oral (dieta)	99	3,8; 7,5; 50/125 (aumento da dose de 50 para 125 após a semana 33)	Ausência de sinais de carcinogenicidade; 125 mg/kg p.c./dia Redução do peso corporal - aumento da atividade da ALP e aumento do peso relativo; prostatite, sendo que um animal apresentou infiltrados de células inflamatórias mononucleares intersticiais e atrofia dos túbulos; aumento de peso relativo;	-	Não foram apresentados dados analíticos sobre a concentração de CBZ na dieta ou a estabilidade ou homogeneidade das preparações.	Reuzel <i>et al</i> , 1976*	- APVMA, EFSA, Força Tarefa e PMRA: nenhum efeito carcinogênico - EFSA: considerou evidência limitada - USEPA: não avaliado	Nenhum efeito carcinogênico.
8	Camundongos CD-1 N=640 (80/sexo/dose)	728 dias Oral (dieta)	99%	75;225;1125 (última dose reduzida para 563 após a semana 66 por causa da alta mortalidade)	≥ 75 mg/kg p.c./dia Fígado: necrose, hipertrofia hepatocelular e carcinoma hepatocelular (p<0,05) Teste de tendência apontou clara relação dose-resposta na incidência de carcinoma e neoplasma primário hepatocelular nas fêmeas.	< 75 (observação de carcinoma hepatocelular)	Poucos animais foram avaliados na maior dose devido a alta mortalidade,	Wood <i>et al</i> , 1982*	- APVMA: carcinoma hepatocelular; - EFSA: efeitos tumorigênicos no fígado - Força Tarefa: adenoma hepatocelular	Ocorrência de carcinoma hepático em machos e fêmeas, indicando potencial carcinogênico

					• ≥ 225 mg/kg p.c./dia Fígado: ♀ aumento peso relativo; ♂ hepatotoxicidade carcinoma hepatocelular (p=0,0066). • A dose de 1.125 mg/kg p.c./dia para carcinogenicidade devido a alta mortalidade.				• PMRA: evidência de carcinogenicidade • USEPA: tumores hepáticos (carcinoma hepatocelular e adenomas)	
9	Camundongos NMRKf N=1.080 (100-120*/sexo/dose). *120 animais no grupo controle e na maior dose.	672 dias	99	7,5; 22,5; 45; 750	• ≥ 45 mg/kg p.c./dia • aumento não significativo na incidência de células tumorais granulosas e luteoma • 750 mg/kg p.c./dia: aumento do peso relativo e hepatotoxicidade em ambos os sexos; hipertrofia de hepatócitos centrolobulares e intermediários com abundante necrose de células isoladas e aumento secundário da atividade mitótica (compensatória), bem como aumento do armazenamento de pigmento nas células de Kupffer.	-	• Não há relato da situação de saúde dos animais antes de iniciar o experimento • Histopalogia limitada a fígado, pulmão e órgãos com achados patológicos	Donaubauer <i>et al</i> (1982)*	• APVMA, EFSA e USEPA: sem evidência de carcinogenicidade • PMRA: evidência de carcinogenicidade • EFSA: evidência limitada • USEPA: evidência inadequada.	Nenhum efeito carcinogênico.
10	Rato Wistar n=80 (10 animais/sexo/dose)	90 dias Oral (dieta?)	98%	16, 32 e 64	• Ausência de sinais de carcinogenicidade; • ≥ 16 mg/kg p.c./dia Aumento peso relativo do pulmão, próstata, útero, bexiga e cérebro. • ≥ 32 mg/kg p.c./dia Leucopenia, aumento da bilirrubina sérica	-	• Histologia realizada apenas no fígado e rins; • Estudo subcrônico (90 dias de observação não é adequado para avaliação de carcinogenicidade).	Janardhan <i>et al</i> , 1987	Não avaliado	Inadequado para avaliação de carcinogenicidade
11	Cães n=24 (3 animais/sexo/dose)	90 dias Oral (dieta?)	98%	20, 40 e 80	• Ausência de sinais de carcinogenicidade; • 20 mg/kg p.c./dia: infiltrado celular e lipídico, extensa congestão, inflamação e alterações degenerativas. Hepatotoxicidade grave; fibrose e congestão vascular	-	• Histologia realizada apenas no fígado e rins; • Estudo subcrônico (90 dias de observação não é adequado para avaliação de carcinogenicidade).	Janardhan <i>et al</i> , 1988	Não avaliado	Inadequado para avaliação de carcinogenicidade
12	Ratos Wistar Swiss n=50 (10 por grupo – somente machos) Um grupo exposto apenas ao diluente.	105 dias Oral (dieta?)	98%	150, 300 e 600	• Ausência de sinais de carcinogenicidade; • 150 mg/kg p.c./dia congestão, infiltrado de células mononucleares e degeneração hidrópica;	-	• Histologia realizada apenas no fígado e rins; • Estudo subcrônico (105 dias de observação não é adequado para	Selmanoglu <i>et al</i> , 2001	Não avaliado	Inadequado para avaliação de carcinogenicidade

					• Rins:degeneração tubular, fibrose, congestão e infiltração de células mononucleares		avaliação de carcinogenicidade).			
13	Ratos Wistar Swiss N=50 (10 por grupo – somente machos) Um grupo exposto apenas ao diluente	105 dias Oral (dieta?)	98%	150, 300 e 600	• Ausência de sinais de carcinogenicidade; • 150 mg/kg p.c./dia: fibrose e edema causado pelo aumento na densidade de fibronectina	-	• Histologia realizada apenas no timo; • Estudo subcrônico (105 dias de observação não é adequado para avaliação de carcinogenicidade).	Songür <i>et al</i> , 2005.	Não avaliado	Inadequado para avaliação de carcinogenicidade

2.4. Avaliação dos estudos epidemiológicos

Não foram encontrados estudos epidemiológicos com desenho de estudo analítico para compor esta avaliação.

2.5. Mecanismos de carcinogenicidade relacionados ao CBZ

A IARC (2019) lista dez características chave de substâncias carcinogênicas que podem atuar no desenvolvimento do câncer, a saber:

1. É eletrofílica ou pode ser ativada metabolicamente para substância eletrofílica;
2. É genotóxica;
3. Altera o reparo do DNA ou causa instabilidade genômica;
4. Induz alterações epigenéticas;
5. Induz estresse oxidativo;
6. Induz inflamação crônica;
7. É imunossupressiva;
8. Modula efeitos mediados por receptor;
9. Causa imortalização;
10. Altera a proliferação celular, morte celular ou fornecimento de nutrientes;

O CBZ tem comprovadamente uma ação aneugênica devido a sua propriedade de inibir a formação dos microtúbulos. O mecanismo de ação (MoA) pelo qual o CBZ inibe a formação de microtúbulos nos fungos é a sua propriedade de impedir a ligação da GTP à beta-tubulina (McCarroll et al., 2002). O CBZ parece se ligar na beta-tubulina em um sítio próximo ao sítio de ligação da GTP. Isso faz com que a beta-tubulina sofra uma mudança conformacional que impede que a GTP se ligue ao seu sítio de ligação natural na beta-tubulina (Vela-Corcía, 2018). Sem a ligação da beta-tubulina com a GTP, as tubulinas não vão polimerizar, não havendo, portanto, a formação dos microtúbulos ou a sua formação é interrompida. Esse mecanismo de formação dos microtúbulos é semelhante em toda a cadeia evolutiva dos eucariotos. Portanto, o CBZ atua da mesma maneira nas células dos fungos e dos mamíferos.

Três consequências podem ocorrer nas células somáticas que tem a formação dos microtúbulos prejudicada: 1) as células em intérfase sofrem apoptose, pois sem a adequada formação dos microtúbulos, sua sobrevivência é inviabilizada; 2) as células em mitose darão origem a células filhas com aberrações cromossômicas (efeito aneugênico) que sofrem apoptose (Thomas et al., 2009); 3) as células em mitose darão origem a células filhas com aberrações cromossômicas (efeito aneugênico) capazes de levar à progressão tumoral.

O CBZ é capaz de induzir a formação de micronúcleos em células somáticas de camundongos. O parecer Nº 1/2021/SEI/CREAV/GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA (SEI nº 1309909), que avalia o potencial mutagênico do CBZ, avaliou estudos que demonstraram a formação de micronúcleos em hepatócitos de camundongos (após tratamento com CBZ em doses a partir de e 62,5 mg/

A EFSA (2009) concluiu que o desenvolvimento de tumores hepáticos nos camundongos é derivado das consequências 1 e 2 descritas acima: o CBZ leva a uma toxicidade celular que resulta na morte da célula. A morte celular crônica e intensa leva à proliferação celular crônica para repor as perdas celulares por apoptose, o que aumenta a probabilidade de surgimento de células tumorais (mecanismo nº 10 da IARC). McCarroll *et al* (2002) apontam como uma das

etapas precursoras para a formação de tumor de fígado induzida por CBZ em camundongos a inibição de polimerização da tubulina, interrupção da formação do fuso, segregação imprecisa de cromossomos e atraso e/ou perda de cromossomos nas células do fígado (aneuploidia). A formação do tumor segue como resultado do aumento da hipertrofia celular, proliferação celular e aumento do peso do fígado (mecanismo nº 10). Este mecanismo de progressão tumoral é reafirmado pela PMRA (2011). Porém, este mecanismo, segundo McCarroll *et al* (2002), não explica a ausência de tumores em ratos e cães, que são as outras duas espécies de animais envolvidas em estudos crônicos com o CBZ. A EFSA (2009) argumenta que as linhagens de camundongos CD-1 e Swiss, nas quais os estudos crônicos foram positivos para carcinogenicidade, são muito susceptíveis ao surgimento de tumores hepáticos espontâneos. Portanto, o CBZ induziu o aumento da incidência de tumores hepáticos nas linhagens mais susceptíveis porque causou hepatotoxicidade crônica, com ocorrência de morte celular que levou a um processo degenerativo, cuja regeneração é realizada pelo aumento de proliferação celular. O aumento da taxa de proliferação celular é um mecanismo de carcinogenicidade conhecido (mecanismo nº 10 da IARC). De fato, mesmo em baixas doses, é possível verificar a presença de lesões microscópicas indicativas de hepatotoxicidade e lesões pré-neoplásicas em camundongos das linhagens mais susceptíveis nos estudos com exposição crônica (Beems *et al*, 1976; Wood *et al*, 1982 apud EFSA, 2009). Nos camundongos da linhagem resistente (NMRKf), a hepatotoxicidade está presente macro e microscopicamente, mas apenas na dose mais alta de 750 mg/kg p.c./dia (Donaubauer *et al*, 1982 apud EFSA, 2009). A hepatotoxicidade também foi um efeito relatado em cães (Sherman, 1972 apud EFSA 2009; Reuzel *et al*, 1976 apud EFSA 2009) e ratos (Janardhan *et al*, 1988; Selmanoglu *et al*, 2001; Til *et al*, 1976).

No PARECER Nº 10/2021/SEI/CREAV /GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA ([1463526](#)) que versa sobre a toxicocinética do CBZ e outros efeitos tóxicos, verificou-se que, em relação aos parâmetros toxicocinéticos, esse ingrediente ativo (IA) possui rápida absorção pelo trato gastrointestinal (TGI), com elevada biodisponibilidade (85% após dose única via oral). É extensamente metabolizado pelo sistema microsomal hepático, formando como principal metabólito o 5-hidroxi-carbendazim (5-HBC). Em menor escala (2-4%), ocorre a formação de 2-aminobenzimidazol (2-AB), no plasma sanguíneo e outros órgãos. Não há relato de acumulação tecidual do CBZ – ou de seus metabólitos. Maiores níveis foram observados no fígado. Não foi relatada diferença mensurável quanto ao perfil de metabólitos do CBZ em ratos e camundongos, embora tenha ocorrido a saturação do mecanismo de desintoxicação hepática de forma mais pronunciada em camundongos, quando tratados com altas doses (300 mg/kg p.c./dia) por 29 dias, o que acarretou sinais de hepatotoxicidade. Em ratos, por outro lado, observou-se um aumento dessa capacidade de detoxificação com a exposição repetida, com maior taxa de eliminação. A etapa de excreção ocorre de forma rápida, predominantemente pela urina; e pelas fezes com o aumento da dose.

Esses achados toxicocinéticos de maior capacidade dos ratos para a detoxificação hepática do CBZ em comparação aos camundongos, aliados a maior susceptibilidade das linhagens CD-1 e Swiss ao desenvolvimento de tumores hepáticos reforça a possibilidade de que o desenvolvimento de tumores em camundongos esteja relacionado às circunstâncias 1 e 2.

Em relação a circunstância 3, a USEPA (2014) concorda que os efeitos aneugênicos do CBZ podem ser considerados como um mecanismo de carcinogenicidade no fígado de camundongos. McCarroll *et al* (2002) afirma que o desenvolvimento do câncer é um processo multiestágio e que a aneuploidia tem sido considerada como um mecanismo chave em certos processos neoplásicos. A Anvisa constatou que aneuploidia ocorre em células hepáticas de animais

expostos ao CBZ (parecer Nº 1/2021/SEI/CREAV/GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA - SEI nº 1309909). Portanto, a propriedade do CBZ de induzir aneuploidia não pode ser descartada como um MoA para a indução de tumores hepáticos (mecanismo nº 2 da IARC).

Por fim, o CBZ induziu nas células hepáticas, *in vitro*, a desregulação molecular em caminhos que levam a indução da transição de células epiteliais para mesenquimais, um passo relevante para que uma célula se torne invasiva. Interferiu também em processos metabólicos celulares que conferem resistência à apoptose, que pode levar a imortalidade das células (Peyre *et al*, 2014). Substâncias com essas características são indutoras de câncer e o CBZ poderia também atuar como carcinógeno pelo mecanismo nº 9.

Em resumo, o MoA do CBZ para o desenvolvimento de câncer hepático em camundongos está relacionado a sua propriedade de interferir no correto funcionamento dos microtúbulos, levando à citotoxicidade (hipótese mais provável) e aneuploidia de células filhas.

3. ANÁLISE DO PESO DAS EVIDÊNCIAS

A evidência da associação da exposição ao CBZ e a ocorrência de câncer em humanos é considerada inadequada pela ausência de estudos epidemiológicos.

Em animais, cinco estudos foram considerados adequados para a avaliação do potencial carcinogênico do CBZ, sendo um com cães, um com ratos e três com camundongos. Dois estudos com camundongos foram positivos para a exposição ao CBZ e o desenvolvimento de tumores. Nesses dois estudos, lesões pré-neoplásicas e/ou tumores foram observados desde as doses mais baixas. Em um dos estudos, foi observada a ocorrência de um tumor raro (hepatoblastoma). Embora este estudo possua limitações metodológicas relevantes, ele foi considerado relevante para a caracterização da carcinogenicidade do CBZ, conforme discutido no item 2.3. O outro estudo, no qual se observou carcinomas hepatocelulares, não apresenta limitações metodológicas.

O MoA caracterizado para o CBZ é compatível com as mecanismos-chaves de desenvolvimento de tumores descritos pela IARC (2019): genotoxicidade (efeito aneugênico observado *in vivo*), e alteração a proliferação celular, morte celular ou fornecimento de nutrientes (efeito observado *in vivo* e indiretamente *in vitro*). Ainda, há indícios de que o CBZ pode promover imortalização (efeito indiretamente observado *in vitro*).

Os camundongos das duas linhagens com resultados positivos para carcinogenicidade são considerados espécies que naturalmente apresentam maior sensibilidade ao surgimento de tumores hepáticos e o aumento da sua incidência pode ter sido influenciado pela menor capacidade de detoxificação de altas doses de CBZ por essa espécie. Isso, somado às limitações metodológicas observadas em um dos estudos com resultados positivos, leva à conclusão de que a evidência de carcinogenicidade em animais nos estudos crônicos é limitada.

Por outro lado, os mecanismos associados à carcinogenicidade para esse ingrediente ativo foram bem caracterizados experimentalmente e podem explicar os tumores observados em camundongos. Ainda, apesar da maior sensibilidade de camundongos, também se espera a ocorrência desses mesmos mecanismos em humanos. O PARECER Nº 1/2021/SEI/CREAV/GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA apresenta diversos estudos com resultados positivos para aneugênese em linfócitos humanos obtidos por cultura primária e incubados com o CBZ.

Logo, os dados mecanísticos explicam o aparecimento de tumores e conferem maior força às evidências de desenvolvimento de tumores em camundongos e, por isso, conclui-se que **há evidência suficiente de carcinogenicidade em animais experimentais**. Assim, considerando o peso das evidências, o CBZ deve ser classificado como **presumidamente carcinogênico para humanos (Categoria 1B)**, conforme critérios dispostos na RDC nº 294/2019. Essa classificação é baseada em evidência suficiente de carcinogenicidade em animais experimentais sem evidência de carcinogenicidade em seres humanos.

4. DERIVAÇÃO DA DOSE DE REFERÊNCIA PARA CÂNCER

A RDC nº 294/2019, no seu artigo 33, determina que a avaliação de risco apenas será conduzida quando as etapas de identificação do perigo e de avaliação dose-resposta indicarem evidências suficientes para os produtos serem categorizados como conhecidos ou presumidamente carcinogênicos e for possível determinar um limiar de dose que permita proceder com as demais etapas da avaliação do risco.

O CBZ deve ser classificado na categoria 1B para carcinogenicidade, sendo necessário avaliar se é possível determinar um limiar de dose para o desfecho câncer.

A USEPA e a PMRA consideraram o CBZ carcinogênico, porém não determinaram limiar e sim optaram por fazer uma extrapolação linear para baixas doses com base na incidência de adenoma hepatocelular/carcinoma em camundongos machos. Essas agências utilizam a abordagem linear como padrão, assumindo-se um crescimento dose-resposta linear a partir da dose/efeito zero. Essa abordagem é utilizada na ausência ou na insuficiência de informações sobre o MoA ou, ainda, quando o MoA indica uma dose-resposta linear. Esse não é o caso do CBZ, que neste parecer teve o seu MoA com dose-resposta não-linear caracterizado para células somáticas.

A aneuploidia é o resultado de mecanismos indiretos de genotoxicidade. Em contraste com os mutagênicos de ligação ao DNA, para as substâncias genotóxicas que induzem seus efeitos por meio de mecanismos de não ligação ao DNA, espera-se que apresente uma curva dose-resposta sigmoideal (curva de concentração-efeito sublinear) e atuam por meio de um valor limite ou limiar de dose (em inglês *threshold limit value -TLV*). Isso significa que para substâncias aneugênicas, experimentos com baixas dosagens, em geral, nenhum efeito será induzido e/ou visto por causa da multiplicidade dos alvos envolvidos no processo de divisão. Conforme as doses do aneugênico aumentam, o aparelho de divisão celular torna-se mais comprometido, resultando em células com desequilíbrios cromossômicos e o potencial para os efeitos da aneuploidia podem ser detectados. Em doses mais altas, os distúrbios podem ser tão graves que afetam a sobrevivência ou propagação celular (Lynch *et al*, 2019).

Portanto, a aneugênese causada pelo CBZ é um mecanismo que ocorre por limiar de dose em células somáticas, pois depende de suficiente concentração de CBZ para interação com a tubulina em um nível capaz de inibir sua polimerização e promover erros de segregação durante a mitose ou efeitos citotóxicos.

Corroborando essa constatação, observa-se que os estudos com cães e ratos não mostraram evidências de carcinogenicidade, apesar da ocorrência de hepatotoxicidade. Isso indica que o CBZ, mesmo em altas doses, não leva ao surgimento de tumores nestas espécies. Uma explicação para essa observação seria a maior capacidade de detoxificação do CBZ pelos ratos, aliada à maior susceptibilidade natural dos camundongos das linhagens Swiss e CD-1 à incidência de câncer. Portanto, conclui-se que é possível estabelecer um limiar conservador para

o CBZ para humanos ao utilizar os resultados de estudos com camundongos, que, além de mais sensíveis para esse desfecho, resultaram em limiar inferior ao do próprio mecanismo de aneugênese quando o desfecho escolhido ainda não são considerados neoplásicos.

Os dois estudos com resultados positivos em camundongos para o desfecho câncer não encontraram um NOAEL. Para Beems *et al* (1976), o LOAEL foi de 22,5 mg/kg p.c./dia para a presença de lesões pré-neoplásicas (focos celulares) e para Wood *et al* (1982) apud EFSA (2009), o LOAEL foi de 75 mg/kg p.c./dia para a presença de carcinoma. O LOAEL de 22,5 mg/kg p.c./dia será utilizado para o cálculo do limiar. Considerando que o menor LOAEL encontrado para o MoA do CBZ para o desfecho câncer, que é o efeito aneugênico, foi de 62,5 mg/kg p.c. (teste de micronúcleo em hepatócitos de ratos – Itoh, 2015a,b - citado no PARECER Nº 1/2021/SEI/CREAV/GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA), o LOAEL de 22,5 mg/kg p.c./dia é considerado suficientemente baixo para prevenir esse evento-chave inicial. Pelo uso do LOAEL ao invés de um NOAEL, deve-se adicionar um fator de incerteza adicional de 10 vezes, o que resulta na utilização de um fator total de incerteza de 1.000 vezes para a derivação de uma dose de referência humana. Logo, obteve-se um limiar de dose para a carcinogenicidade do CBZ de 0,0225 mg/kg p.c./dia. Este valor é 2,7 vezes menor que o valor obtido para o evento chave aneugênese em células hepáticas (0,0625 mg/kg p.c.).

5. CONCLUSÕES

5.1. Classificação do CBZ quanto ao potencial carcinogênico.

O CBZ deve ser classificado na Categoria 1B – Produto que presumidamente possui potencial carcinogênico para seres humanos por causar câncer em camundongos e possuir propriedade aneugênica.

5.2. Definição da dose de referência humana para o desfecho carcinogenicidade

O limiar de dose de exposição humana ao CBZ para o desfecho câncer é de 0,0225 mg/kg p.c./dia.

Quadro comparativo da classificação do CBZ pela Anvisa e pelas autoridades reguladoras de agrotóxicos e órgãos afins internacionais quanto a carcinogenicidade.

Conclusões das principais autoridades internacionais sobre a carcinogenicidade do Carbendazim.			
Autoridade Regulatória	Conclusão	Resultados Experimentais	Limiar humano
APVMA (2012)	Não é carcinogênico	-	-
EFSA (2009)	Não é carcinogênico para humanos	-	-
PMRA (2011)	Possivelmente carcinogênico	Definição de um fator potencial de carcinogenicidade	Limiar não determinado. Extrapolação linear com base em efeitos aneugênicos.
USEPA (2020)	Possivelmente carcinogênico	Definição de um fator potencial de carcinogenicidade	Limiar não determinado. Extrapolação linear com base em efeitos aneugênicos.
ANVISA	Presumidamente carcinogênico para humanos	Definição de um limiar	0,0225 mg/kg p.c./dia (com base em efeitos mais sensíveis que efeitos aneugênicos)

6. RECOMENDAÇÕES

6.1. Alterações na monografia do Carbendazim:

Classificação como “Produto que presumidamente possui potencial carcinogênico para seres humanos (categoria 1B)”.

6.2. Alterações de rótulo e bula dos produtos formulados:

Inclusão da classificação do produto na classe de perigo carcinogenicidade, categoria 1B, pictograma específico, palavra de advertência “Perigo”, seguida da frase de perigo “Pode provocar câncer em doses acima de 0,0225 mg/kg p.c./dia”.

7. BIBLIOGRAFIA

APVMA. Human health risk assessment of Carbendazim. December 2009. Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. Disponível em <https://apvma.gov.au/sites/default/files/publication/14531-carbendazim-prf-vol2.pdf>.

APVMA. Carbendazim. review findings report. August 2012. Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. Disponível em: <https://apvma.gov.au/search/google/Carbendazim>

Beems R, Til H, Van der Heijden C. Carcinogenicity study with carbendazim in mice, Final report; report no. R4936, Unpublished report by Central Institute for Nutrition and Food Research, 1976.

Börzsönyi M, Pintér A, Surján A, Farkas I. Transplacental induction of lymphomas in Swiss mice by carbendazim and sodium nitrite. *Int J Cancer*. 1976 Jun 15;17(6):742-7. doi: 10.1002/ijc.2910170609. PMID: 988851.

Börzsönyi M & Csik M. Induction of malignant lymphomas in swiss mice by n-nitroso compounds formed *in vivo* *Int. J. Cancer*. (1975) 15:830-838. doi: 10.1002/ijc.2910150515.

Donaubauer *et al* (1982) apud EFSA. Draft Re-Assessment Report 16 July 2009. Carbendazim. Volume 3 (B6). Report and Proposed Decision. Rapporteur Member State: Germany. Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/search/site/CARBENDAZIM>

EFSA. Draft Re-Assessment Report 16 July 2009. Carbendazim. Volume 3 (B6). Report and Proposed Decision. Rapporteur Member State: Germany. Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/search/site/CARBENDAZIM> IARC. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, IARC Monographs on the Identification of Carcinogenic Hazards to Humans. Preamble, Lyon, France, 2019.

Igarashi M, Setoguchi M, Takada S, Itoh S., Furuhashi K. Optimum conditions for detecting hepatic micronuclei caused by numerical chromosome aberration inducers in mice. *Mutation Research*, v. 632, p. 89-98. 2007.

Lynch AM, Eastmond D, Elhajouji A *et al*. Targets and mechanisms of chemically induced aneuploidy. Part 1 of the report of the 2017 IWGT workgroup on assessing the risk of aneuploids

for carcinogenesis and hereditary diseases, *Mutat Res Gen Tox En*, 847, 2019. doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.02.006.

McCarroll NE, Protzel A, Ioannou Y, Frank Stack HF, Jackson MA, WatersMD, Dearfield KL. A survey of EPA/OPP and open literature on selected pesticide chemicals. III. Mutagenicity and carcinogenicity of benomyl and carbendazim. *Mutat Res*. 2002 Sep;512(1):1-35. doi: 10.1016/s1383-5742(02)00026-1. PMID:12220588.

Peyre L, Zucchini-Pascal N, de Sousa G, Luzy AP, Rahmani R. Potential involvement of chemicals in liver cancer progression: an alternative toxicological approach combining biomarkers and innovative technologies. *Toxicol In Vitro*. 2014 Dec;28(8):1507-20. doi: 10.1016/j.tiv.2014.06.009. Epub 2014 Jul 2. PMID: 24997295.

Pfeil R, Dellarco V. Carbendazim –1 JMPR 2005. Inventory of evaluations performed by the Joint Meeting on Pesticide Residues (JMPR). Disponível em: <https://apps.who.int/pesticide-residues-jmpr-database/pesticide?name=CARBENDAZIM>

PMRA. Carbendazim. Proposed Registration Decision. PRD2011-04. Health Canada Pest Management Regulatory Agency, 2011. Disponível em: <http://publications.gc.ca/site/eng/397259/publication.html>

PubChem. Carbendazim C₉H₉N₃O₂ – PubChem. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/25429>

Reuzel *et al* (1976) apud EFSA. Draft Re-Assessment Report 16 July 2009. Carbendazim. Volume 3 (B6). Report and Proposed Decision. Rapporteur Member State: Germany. Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/search/site/CARBENDAZIM>

Sherman (1972) apud EFSA. Draft Re-Assessment Report 16 July 2009. Carbendazim. Volume 3 (B6). Report and Proposed Decision. Rapporteur Member State: Germany. Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/search/site/CARBENDAZIM>

Til KP, Kollen C, van der Heijden CA. Combined chronic toxicity and carcinogenicity study with Carbendazim in rats. Report no R5133. Unpublished report by Central Institute for Nutrition and Food Research, 1976.

Thomas P, Holland N, Bolognesi C *et al*. Buccal micronucleus cytome assay. *Nature Protocols* 4(6):825-837, 2009. doi:10.1038/nprot.2009.53.

USEPA. Thiophanate Methyl and Carbendazim (MBC). Human Health Assessment Scoping Document in Support of Registration Review. United States Environmental Protection Agency. March 20, 2014. Disponível em: <https://iaspub.epa.gov/apex/pesticides/f?p=chemicalsearch:1>

USEPA. Thiophanate-Methyl and Carbendazim: Draft Human Health Risk Assessment for Registration Review. United States Environmental Protection Agency. March 24, 2020.

Vela-Corcía D, Romero D, de Vicente A *et al.* Analysis of β -tubulin-carbendazim interaction reveals that binding site for MBC fungicides does not include residues involved in fungicide resistance. Sci Rep 8, 7161 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25336-5>

Wood *et al* (1982) apud EFSA. Draft Re-Assessment Report 16 July 2009. Carbendazim. Volume 3 (B6). Report and Proposed Decision. Rapporteur Member State: Germany. Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/search/site/CARBENDAZIM>



Documento assinado eletronicamente por **Juliana Machado Braz, Especialista em Regulação e Vigilância Sanitária**, em 27/07/2021, às 10:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/D10543.htm.



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Roberto Coradi de Freitas, Coordenador(a) de Reavaliação**, em 03/08/2021, às 11:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/D10543.htm.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.anvisa.gov.br/autenticidade>, informando o código verificador **1433818** e o código CRC **3B341EE7**.

**PARECER Nº 11/2021/SEI/CREAV /GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA**

Processo nº 25351.945793/2019-57

Interessado: Coordenação de Reavaliação, Gerência de Monitoramento e Avaliação do Risco, Gerência-Geral de Toxicologia

Assunto: **Análise do potencial de toxicidade para o desenvolvimento embrionário e neonatal do ingrediente ativo Carbendazim.**

Avalia os estudos científicos, o relatório da Força-tarefa Carbendazim e os de outras agências reguladoras de agrotóxicos acerca do potencial de toxicidade para o desenvolvimento embrionário e neonatal do Carbendazim, como parte da reavaliação toxicológica desse ingrediente ativo, conforme RDC nº 221, de 28 de março de 2018.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anvisa: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOEL: *Acceptable Operator Exposure Level* (Nível Aceitável de Exposição Ocupacional)APMVA: *Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority* (Autoridade Australiana de Pesticidas e Medicamentos Veterinários)

CBZ: Carbendazim

Creav: Coordenação de Reavaliação

ctl: Controle

DG: Dia gestacional

DL: Dia lctacional

DPN: Dia pós-natal

DRfA: Dose de Referência Aguda

EFSA: *European Food Safety Authority* (Autoridade Europeia para Segurança dos Alimentos)EOGRS: *Extended One-Generation Reproductive Toxicity Study* (Estudo de toxicidade reprodutiva de uma geração estendida)FAO: *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação)

FT: Força Tarefa do Carbendazim

GHS: *Globally Harmonized System* (Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos)

IA: Ingrediente ativo

JMPPR: *Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues* (Comitê de Especialistas FAO/OMS sobre Resíduos de Agrotóxicos)

IDA: Ingestão Diária Aceitável

LOAEL: *Lowest Observed Adverse Effect Level* (Dose mais baixa de efeito adverso observável)

NI: não informado

NOAEL: *No Observed Adverse Effect Level* (Dose sem efeito adverso observável)

nsg: Não significativo estatisticamente

OECD: *Organization for Economic Cooperation and Development* (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico)

OMS: Organização Mundial da Saúde

PMRA: *Health Canada's Pest Management Regulatory Agency* (Agência Reguladora de Controle de Pragas Canadense)

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada da Anvisa

sg: Significativo estatisticamente

ST: Substância-teste

USEPA: *United States Environmental Protection Agency* (Agência de Proteção Ambiental Americana)**Resumo**

O Carbendazim (CBZ) é um fungicida sistêmico de amplo espectro, pertencente à classe dos benzimidazóis, cuja ação pesticida decorre da inibição da polimerização de β -tubulina, o que pode levar ao bloqueio mitótico, arrasto do ciclo celular, impactos no movimento subcelular, no tráfego de proteínas, no transporte de vesículas, na extensão axonal e até morte celular. Na avaliação do potencial de toxicidade para o desenvolvimento embrionário e neonatal do CBZ, foram considerados estudos regulatórios apresentados pela FT, estudos da literatura científica obtidos mediante revisão sistemática e relatórios das principais agências reguladoras internacionais. A partir deles, verificou-se que o CBZ induziu as quatro manifestações da toxicidade para o desenvolvimento: 1) mortes, representadas principalmente por perdas pós-implantação em todas as espécies avaliadas, bem como por perdas pré-implantação (apenas em coelhos); 2) anomalias estruturais, representadas por malformações encefálicas (como exencefalia, hidrocefalia, entre outras) e oculares (anofthalmia e microftalmia) incompatíveis com a vida pós-natal ou severamente impactantes ao indivíduo, além de malformações esqueléticas (vértebras e costelas), entre outras; 3) alterações no crescimento, representadas por reduções no peso corpóreo fetal e variações esqueléticas; e 4) déficits funcionais, que não foram investigados adequadamente nos estudos com o CBZ, mas podem ser deduzidos a partir das evidências de alterações histopatológicas quantitativas significativas em regiões do cérebro relacionadas ao controle motor, funções límbicas, cognitivas, sensorio-motoras e somatossensoriais. Mais do que isso, há indicativos de que exposições únicas de ratos, coelhos e hamsters em dias específicos do período de organogênese já podem causar perdas pós-implantação e malformações severas em doses similares às que causaram esses efeitos após administração durante todo o período de organogênese. Adicionalmente aos efeitos na gametogênese e no desenvolvimento do embrião em si, hoje sabe-se que a dinâmica dos microtúbulos regula também as funções celulares no endométrio cruciais durante a implantação embrionária, que o tornam receptivo ao embrião. Como a menor dose testada entre os diversos estudos, de 5 mg/kg p.c./dia em coelhos, obtida a partir de um estudo ao qual apenas a Anvisa teve acesso, já teve aumento significativo nas perdas pré-implantação, não foi possível estabelecer um NOAEL para os efeitos do CBZ no desenvolvimento, que foram identificados em doses bastante inferiores ao NOAEL definido para os efeitos aneugênicos em células somáticas (50 mg/kg). Isso indica que, além da maior susceptibilidade do organismo em desenvolvimento em relação a adultos, outros mecanismos relacionados à despolimerização dos microtúbulos (efeitos na migração e diferenciação celulares), e não somente seu efeito antimitótico, podem estar atuando. Foram observadas, ainda, diferenças relevantes entre as espécies, com doses 30 vezes inferiores em ratos do que em camundongos sendo suficientes para causar efeitos similares, quando o fator de segurança padrão para extrapolação interespecie é de 10 vezes. Ainda, os efeitos entre as espécies variaram, de forma que, com o conhecimento atualmente disponível, não é possível explicar o porquê dessas diferenças nos efeitos do CBZ entre as espécies e, principalmente, quais efeitos poderiam ser induzidos em seres humanos após exposição a esse IA. Conclui-se que o CBZ induz efeitos adversos sobre o desenvolvimento embrionário e neonatal e que não é possível definir um limiar de dose seguro, capaz de impedir a ocorrência destes efeitos. Portanto, com base na avaliação do peso das evidências disponíveis e considerando a legislação brasileira, o CBZ preenche os requisitos proibitivos de registro estabelecidos pela Lei nº 7.802, de julho de 1989 e pelo Decreto nº 4.074, de janeiro de 2002; devendo ser classificado na Categoria 1B em função da toxicidade para o desenvolvimento, conforme estabelecido na Seção 6, Anexo IV da RDC nº 294, de 29 de julho de 2019. Em tais

dispositivos legais, fica estabelecida a proibição do registro de agrotóxicos que apresentem efeitos adversos ao desenvolvimento embrionário e neonatal e para os quais não seja possível determinar um limiar de dose que permita proceder com as demais etapas da avaliação do risco.

1. INTRODUÇÃO

O presente parecer objetiva avaliar o potencial de toxicidade para o desenvolvimento embrionário e neonatal do ingrediente ativo (IA) CBZ, a partir do conjunto de evidências *in vivo* relevantes disponíveis, quais sejam: estudos de toxicidade para o desenvolvimento pré-natal em roedores e coelhos e estudos multigeracionais apresentados pela FT, disponíveis na literatura científica e/ ou discutidos nos relatórios das principais agências reguladoras de agrotóxicos ou autoridades internacionais (USEPA, PMRA, EFSA, APMVA, FAO).

Então, como parte do processo de reavaliação desse IA, foi conduzida uma busca sistemática da literatura científica para identificar estudos com evidências de toxicidade para o desenvolvimento embrionário e neonatal associada à exposição ao CBZ, a fim de integrar esses dados aos estudos regulatórios disponibilizados pelas empresas registrantes, por meio de uma análise de peso da evidência, seguindo critérios também adotados por diversas autoridades regulatórias internacionais, para fins de tomada de decisão. O detalhamento dessa busca sistemática consta no Parecer nº 7/2021/SEI/CREAV/GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA (SEI nº [1451178](#)).

2. SITUAÇÃO INTERNACIONAL

Todas as agências reguladoras internacionais de agrotóxicos consultadas (APVMA, 2009; EFSA, 2010; PMRA, 2019; USEPA, 2020) concluíram que o CBZ é tóxico ao desenvolvimento embrionário. Elas foram unânimes no NOAEL definido para esse IA para efeitos sobre o desenvolvimento embrionário, de 10 mg/kg p.c./dia, e no LOAEL, de 20 mg/kg p.c./dia, em que foram observados diminuição do peso fetal e aumento de variações esqueléticas. Foi ressaltada a maior susceptibilidade do organismo em desenvolvimento, dada a gravidade dos efeitos induzidos pelo CBZ na prole, na ausência de toxicidade materna.

3. ANÁLISE

Idealmente, nos estudos de toxicidade para o desenvolvimento pré-natal (Diretriz OECD 414), a substância-teste (ST) deve ser administrada a fêmeas prenhes durante todo o período de gestação (desde a fertilização, durante a organogênese e o período fetal) ou, no mínimo, pelo período que compreende a implantação até um ou dois dias antes da data prevista para o nascimento. Assim, essa diretriz não se destina a examinar apenas o período de organogênese (dias 5-15 em roedores e dias 6-18 em coelhos), mas também efeitos na pré-implantação e no período fetal.

Para o CBZ, os estudos regulatórios disponíveis que avaliaram os efeitos durante o desenvolvimento pré-natal de roedores e coelhos (Alvarez, 1987; Oliveira et al, 1999; Quintanilha et al, 1999; Christian, 1985; Koeter e De Groot, 1975a e 1975b; Hofmann e Peh, 1987a e 1987b; Varnagy e Somlyay, 1991) compreenderam a exposição apenas durante o período de organogênese. Da mesma forma, a maior parte dos estudos da literatura que avaliou os efeitos do CBZ durante a gestação limitou a exposição dos conceitos ao período da organogênese (Sitarek, 2001; Farag et al, 2011; Janardhan et al, 1984; Delatour e Richard, 1986).

No entanto, também foram identificados estudos da literatura que utilizaram protocolos específicos para avaliação dos efeitos do CBZ durante a gestação. Alguns deles avaliaram os efeitos da exposição apenas no início da gestação (DG₁₋₈; Cummings et al, 1990 e 1992), enquanto outros avaliaram os efeitos da administração única de CBZ em dias específicos do período de organogênese (Minta e Bernacki, 1982; Vergieva, 1975 e 1985). Apesar de suas inúmeras limitações, que muitas vezes tornam esses estudos inadequados para a emissão de conclusões assertivas, eles podem ser considerados informativos limitados e sugerir mecanismos relativos à embriofetotoxicidade do CBZ, pois incluem diferentes janelas críticas de sensibilidade.

Ainda, há estudos regulatórios multigeracionais que avaliaram os efeitos pós-natais da exposição dietética ao CBZ durante a gestação e lactação (Til et al, 1976; EOGRTS, 2014; Somlyay e Varnagy, 1992), além de um artigo da literatura com exposição via gavagem (Gray et al, 1990), os quais também possuem importantes limitações, mas acrescentam informações valiosas.

É relevante mencionar que não foram avaliados estudos conduzidos com produtos formulados à base de CBZ (Upadhyay et al, 2019).

3.1 EXPOSIÇÃO DURANTE O PERÍODO DE ORGANOGÊNESE

Esses tipos de estudo são preferencialmente realizados em duas espécies, ratos e coelhos, e pela via oral de administração, por gavagem, sendo possível utilizar também a incorporação da ST na dieta. Dessa forma, serão inicialmente discutidos os estudos por gavagem e, posteriormente, os pela dieta.

3.1.1 Gavagem

a. Roedores

Foram analisados sete estudos considerados adequados que administraram o CBZ a roedores por gavagem durante o período de organogênese: Alvarez (1987), Quintanilha et al (1999), Hofmann e Peh (1987a; 1987b), Varnagy e Somlyay (1991), Sitarek (2001) e Farag et al (2011). Além disso, foram analisados os estudos de Janardhan et al (1984) e de Delatour e Richard (1976), considerados apenas informativos limitados, pois possuem inúmeras limitações que impedem uma conclusão.

A análise detalhada desses estudos é apresentada no Quadro 1.

Dada a quantidade de informações e os inúmeros parâmetros afetados pelo CBZ, os diferentes efeitos identificados foram divididos nos seguintes tópicos: perdas pré-implantação, perdas pós-implantação, atraso no desenvolvimento fetal e variações e malformações externas, viscerais e esqueléticas.

Perdas pré-implantação

Não houve alteração das perdas pré-implantação em ratos e camundongos, considerando que nenhum estudo avaliado iniciou a exposição à ST antes da implantação, mas no DG₆, já durante o processo de implantação (DG₅₋₇).

Perdas pós-implantação

Foi verificado aumento significativo de perdas pós-implantação em todos os estudos após exposição de ratos por gavagem ao CBZ em doses iguais ou superiores a 30 mg/kg p.c./dia (Varnagy e Somlyay, 1991), sendo a maior dose testada sem alteração significativa de perdas pós-implantação em ratos a de 25 mg/kg p.c./dia (Quintanilha et al, 1999). Inclusive, em todas essas doses a partir de 30 mg/kg p.c./dia já pode ser observado número significativo de fêmeas com reabsorção completa da ninhada (45% das fêmeas em 30 mg/kg p.c./dia), que chegou a 100% das ninhadas em doses a partir de 160 mg/kg p.c./dia. Essas perdas consistiram principalmente em reabsorções precoces. É relevante mencionar que, apesar de nas menores doses que causaram embriofetotoxicidade já ter sido relatada diminuição do ganho de peso corpóreo materno, esse não é necessariamente um sinal de toxicidade materna, podendo ser consequência da própria embriofetotoxicidade e não de um efeito no organismo materno em si, pois esse parâmetro não estava alterado no único estudo que informou o peso materno corrigido (Quintanilha et al, 1999).

Esses resultados podem ser considerados condizentes com a ação conhecida do CBZ na inibição da polimerização de β -tubulina, que compõe os microtúbulos. Conforme estudos recentes, mutações nos genes da tubulina, especialmente nos isotipos da β -tubulina, têm sido associadas a diversas desordens do neurodesenvolvimento, que podem resultar em perda gestacional em diferentes semanas do desenvolvimento embrionário (Chakraborti et al, 2016).

Em camundongos (Farag et al, 2011), a administração de CBZ por gavagem causou aumento significativo, apesar de sutil (3%), de perdas pós-implantação na menor dose testada, de 150 mg/kg p.c./dia (sem toxicidade materna), devido especialmente ao maior número de mortes fetais. O aumento de reabsorções,

principalmente precoces, ocorreu apenas na dose seguinte utilizada no estudo, de 300 mg/kg p.c./dia. Esses dados sugerem que camundongos são menos sensíveis que ratos aos efeitos embriofetotóxicos do CBZ.

Atraso no desenvolvimento fetal

Foi verificado atraso significativo no desenvolvimento fetal de ratos em doses iguais ou superiores a 8 mg/kg p.c./dia de CBZ (Sitarek, 2001), na ausência de toxicidade materna. O atraso no desenvolvimento fetal foi caracterizado por redução significativa no peso fetal ou aumento significativo de variações esqueléticas. Esses parâmetros não estavam significativamente alterados em doses um pouco maiores (10 e 12,5 mg/kg p.c./dia) em outros estudos e, inclusive, a agência europeia (EFSA, 2009a) considerou a alteração significativa no peso fetal (-12% em relação ao controle) observada por (Varnagy e Somlyay, 1991) não relevante em 10 mg/kg p.c./dia. No entanto, é importante destacar que alterações desses parâmetros, mesmo que não significativas, já puderam ser observadas em outros estudos, como o de Quintanilha et al (1999), em que houve redução não significativa de 10% em relação ao controle do peso fetal em 12,5 mg/kg p.c./dia. Apesar de não significativas, essas alterações podem ser biologicamente relevantes, especialmente porque, para animais experimentais, uma alteração de 10% em relação à resposta de fundo (do controle) está próxima ao limite de sensibilidade da maioria dos ensaios toxicológicos (USEPA, 2012).

Em camundongos (Farag et al, 2011), foi observado atraso de desenvolvimento, caracterizado pela redução do peso fetal, apenas em doses iguais e superiores a 300 mg/kg p.c./dia, em que já puderam ser identificados sinais claros de toxicidade materna. Nesse caso, a redução no peso fetal pode ser em parte devida à toxicidade materna, pois a redução do ganho de peso materno foi observada antes da fase de crescimento marcante dos fetos. Esses dados sugerem que camundongos são menos sensíveis que ratos aos efeitos do CBZ no peso fetal.

Variações e malformações externas, viscerais e esqueléticas

Verificou-se aumento significativo de malformações externas e viscerais em ratos em doses iguais ou superiores a 25 mg/kg p.c./dia de CBZ (Quintanilha et al, 1999). Nesse estudo, houve aumento de malformações do encéfalo: exencefalia e dilatação do ventrículo cerebral. No caso da exencefalia, uma malformação incompatível com a vida pós-natal, enquanto o grupo controle não teve nenhum feto ou ninhada afetado, os grupos tratados com 12,5; 25 e 50 mg/kg p.c./dia apresentaram, respectivamente, 2,7%, 12% e 42% dos fetos e 15%, 30% e 69% das ninhadas afetadas, com apenas as duas maiores doses apresentando diferença estatisticamente significativa em relação ao controle. Apesar de na menor dose testada, de 12,5 mg/kg p.c./dia, a diferença não apresentar significância estatística, a ocorrência de exencefalia em 5 fetos de três ninhadas é indiscutivelmente relevante biologicamente, com base na comparação com controle histórico de 1989 a 2011 de malformações em ratos CD (SD) constante em Hood (2012), em que nenhum animal com exencefalia foi identificado após a análise externa de 5.404 fetos.

A ausência de verificação de diferença significativa para esse parâmetro pode ser devida ao baixo poder estatístico desses estudos para detectar malformações, principalmente pelo tamanho limitado da amostra (geralmente 20 ninhadas por dose), pela incidência basal e pela variabilidade da incidência das malformações. Em um estudo de toxicidade para o desenvolvimento pré-natal no qual são avaliadas 20 ninhadas por grupo de dose, com todos os fetos examinados, a alteração mínima detectável é a incidência aumentada de malformações de 5 a 12 vezes acima dos níveis de controle (OECD, 2008). Por isso, não se faz necessária a obtenção de significância estatística para validação de significância biológica de efeitos com baixa incidência, como malformações raras, caso da exencefalia (OECD, 2008), encontrada em 3 ninhadas nas doses $\geq 12,5$ mg/kg p.c./dia de CBZ. Malformações encefálicas como exencefalia, hidrocefalia e dilatação dos ventrículos cerebrais também foram observadas nos demais estudos realizados com o CBZ em ratos (Alvarez, 1987; Hofmann e Peh 1987a e 1987b; Sitarek, 2001; Delatour e Richard, 1976).

Em três estudos realizados com CBZ em ratos também foram observadas malformações oculares severamente prejudiciais na vida pós-natal do indivíduo, como microftalmia e anoftalmia (Alvarez, 1987; Bioagri, 1999b; Hofmann e Peh, 1987a). Em Alvarez (1987), por exemplo, 25% dos fetos e 67% das ninhadas na dose de 90 mg/kg p.c./dia de CBZ apresentaram anoftalmia.

Dada a indisponibilidade de dados brutos dos estudos, não foi possível verificar se as alterações cerebrais e oculares ocorreram em geral nos mesmos fetos. Esse tipo de informação seria pertinente para entender a patogênese das malformações induzidas pelo CBZ, já que defeitos múltiplos são geralmente observados no mesmo indivíduo, pois mecanismos iguais ou similares podem iniciar anomalias que atuam concomitantemente por vias patogênicas em diferentes órgãos. Alternativamente, a expressão de uma determinada via de dismorfogênese pode resultar secundariamente em um defeito em alguma outra estrutura do embrião/feto. Por exemplo, a falha no fechamento do tubo neural anterior resulta em exencefalia que, por sua vez, impede a formação adequada da calvária e de seus tecidos subjacentes (Hood, 2012).

É relevante mencionar que nos últimos anos, mutações nos genes da tubulina, especialmente nos isotipos da β -tubulina, têm sido associadas a diversas desordens do neurodesenvolvimento, incluindo malformações encefálicas como dilatação de ventrículos cerebrais, microcefalia, hipoplasia/dismorfia/agenesia de diversas regiões encefálicas, bem como malformações ópticas (Chakraborti et al, 2016). A verificação de malformações encefálicas e oculares poderia ser explicada pela origem embriológica comum do cérebro, crânio e cristalino, que derivam do ectoderma. Conforme a hierarquia das origens embrionárias dos tecidos e células de vertebrados, alterações no desenvolvimento embrionário do ectoderma podem resultar em alterações na placa neural, crista neural e epiderme, que formam esses diferentes tecidos (Hood, 2012).

Em relação à análise esquelética, houve aumento significativo da incidência total de malformações esqueléticas em ratos em doses ≥ 35 mg/kg p.c./dia (Sitarek, 2001), com 41% dos fetos e 50% das ninhadas afetados nessa dose, chegando a 54% dos fetos e 80% das ninhadas na dose de 90 mg/kg p.c./dia (Alvarez, 1987). As principais malformações esqueléticas identificadas nos diferentes estudos ocorreram em: costelas (fundidas), vértebras (arcos vertebrais fundidos) e esterno (esternébrios fundidos).

Portanto, considerada a relevância biológica da identificação de fetos de ratos com exencefalia em 12,5 mg/kg p.c./dia, a maior dose testada entre os estudos avaliados em que esse parâmetro não estava alterado foi a de 10 mg/kg p.c./dia (Alvarez, 1987; Hofmann e Peh, 1987a e 1987b; Varnagy e Somlyay, 1991).

Em camundongos (Farag et al, 2011), foi observado aumento significativo de ninhadas com variações e malformações esqueléticas em doses iguais e superiores a 300 mg/kg p.c./dia, em que já puderam ser identificados sinais claros de toxicidade materna, atingindo 100% das ninhadas. As principais malformações encontradas foram: costelas fundidas, onduladas, ausentes ou curtas, sacro ausente, encurtamento de ossos longos e ausência de metacarpos, metatarsos e falanges. Além disso, na maior dose testada, 600 mg/kg p.c./dia, também houve aumento significativo de malformações externas (10% dos fetos e 41% das ninhadas), como ectrodactilia, cauda encurtada e fenda palatina. Esses dados sugerem que camundongos são menos sensíveis que ratos aos efeitos do CBZ.

b. Coelhos

Foram analisados dois estudos considerados adequados que administraram o CBZ a coelhos por gavagem durante o período de organogênese: Christian (1985) e Oliveira et al (1999). Além desses, foi analisado o estudo de Janardhan et al (1984), considerado como informativo limitado, já que possui inúmeras limitações que impedem uma conclusão. A análise detalhada desses estudos é apresentada no Quadro 1.

Dada a quantidade de informações e os inúmeros parâmetros afetados pelo CBZ, os diferentes efeitos identificados foram divididos em tópicos no texto a seguir: perdas pré-implantação, perdas pós-implantação, atraso no desenvolvimento fetal e variações e malformações externas, viscerais e esqueléticas.

Perdas pré-implantação

Diferentemente do observado em ratos, a administração de CBZ por gavagem a coelhas prenhes durante o período de organogênese, a partir do DG₆ (implantação ocorre no DG_{7,5}), causou diminuição significativa da taxa de implantação/aumento significativo das taxas de perdas pré-implantação em doses iguais ou superiores a 5 mg/kg p.c./dia (Oliveira et al, 1999), sem toxicidade materna. Essa dose foi a menor testada entre todos os estudos realizados por gavagem em coelhos, sendo importante mencionar que na dose seguinte, de 10 mg/kg p.c./dia, essa alteração ocorreu, mas não foi estatisticamente significativa.

Como a taxa de perda pré-implantação representa o número de óvulos fecundados ou de zigotos não implantados, a alteração desse parâmetro geralmente não é atribuída a um efeito da ST quando sua administração só foi iniciada após a implantação do embrião, como ocorreu em ratos. Nesses casos, esse parâmetro é usualmente considerado apenas para medir a fertilidade da fêmea e para avaliar as condições experimentais a que cada grupo foi submetido. No entanto, em

coelhos o CBZ foi introduzido um pouco antes do início do processo de implantação, resultando na alteração da taxa de implantação em ambos os estudos por gavagem nessa espécie: no estudo de Oliveira et al (1999) houve aumento significativo de perdas pré-implantação nas doses de 5 e 80 mg/kg, mas não na dose intermediária de 20 mg/kg; enquanto no estudo de Christian (1985) observou-se diminuição significativa da taxa de implantação nas doses de 20 e 125 mg/kg, as duas maiores doses utilizadas no estudo.

Além de a exposição ter começado um pouco antes do início do processo de implantação, ao contrário de ratos e camundongos, que possuem implantação mais profunda na parede uterina (excêntrica) e extremamente rápida (com aposição, ligação e invaginação do epitélio uterino ocorrendo dentro de um período de 6 horas, o que inclusive os torna modelos animais inadequados para o entendimento dos mecanismos iniciais de implantação), a implantação de coelhos é mais superficial (implantação cêntrica, em que o blastocisto se encontra essencialmente no lúmen uterino, com a adesão apenas aos ápices das células epiteliais) e mais lenta, com sítios de implantação sendo identificados na parede uterina no dia gestacional 7 e a implantação placentária ocorrendo até o dia gestacional 9 (Hood, 2012; Lee, 2014 e Nishimura, 2001). Por isso, coelhos foram expostos por mais tempo antes e durante o processo de implantação, o que permitiu a identificação da alteração desse parâmetro, diferentemente do que ocorreu em ratos.

Esses efeitos podem ser explicados pela ação já conhecida do CBZ, a inibição da polimerização de β -tubulina, que compõe os microtúbulos, cuja instabilidade dinâmica pode levar ao bloqueio mitótico, arrasto do ciclo celular, impactos no movimento subcelular, no tráfego de proteínas, no transporte de vesículas, na extensão axonal e até morte celular. Os microtúbulos também estão envolvidos no transporte e secreção de progesterona (Shukla et al, 2019).

Já existem evidências da importância da polimerização de microtúbulos no complexo mecanismo de implantação embrionária. Conforme descrito por Shukla et al (2019), estudos mostram que os níveis de tubulina uterina aumentam rapidamente no endométrio e miométrio durante o período de pré-implantação em coelhos. Esses autores realizaram o tratamento intrauterino de camundongos BALB/c com o agente despolimerizante nocodazol na fase de pré-implantação embrionária e demonstraram que a despolimerização de microtúbulos em células epiteliais endometriais inibiu a fixação e adesão do blastocisto. Eles concluíram que a falha de fixação do embrião no útero de camundongo tratado com nocodazol foi devida à estrutura celular alterada e à falha na remodelação das células do epitélio luminal uterino, levando a um estado que não é receptivo para implantação embrionária. A capacidade do citoesqueleto de se deformar e reformar é crítica para a diferenciação celular do endométrio uterino no momento da invasão do embrião (Shukla et al, 2019). Portanto, além do já conhecido papel da dinâmica dos microtúbulos na gametogênese e no desenvolvimento inicial do embrião, hoje sabe-se que ela também regula funções celulares cruciais no endométrio durante a implantação embrionária, que o tornam receptivo ao embrião. Assim, para uma gravidez bem-sucedida, um blastocisto competente para implantação precisa estar sincronizado com a proliferação e diferenciação de tipos específicos de células uterinas, sob a influência de esteroides (estradiol e progesterona). A implantação de embriões prejudicados e/ou as aberrações decíduais são consideradas responsáveis por infertilidade e abortos recorrentes (Shukla et al, 2019).

Essas informações são corroboradas por dados obtidos em estudos *in vivo* em ratos, nos quais foram observados efeitos do CBZ na decídua, a camada mais interna do útero gravídico. Spencer et al (1996) verificaram que o CBZ administrado em altas doses a ratas com pseudogestação produziu reduções no peso decidual uterino e no conteúdo de proteína uterina. Além disso, Cummings et al (1990) avaliaram o impacto da administração do CBZ nos DG₁₋₈ na competência uterina (avaliação no DG₉) em ratas com indução de pseudogestação e verificaram que a dose de 400 mg/kg p.c./dia, a maior testada no estudo, causou inibição parcial da resposta das células da decídua (redução de 40% do peso uterino em relação ao controle), que é uma medida do crescimento decidual uterino durante a pseudogestação. Nos dois estudos esses efeitos ocorreram sem alteração de outros parâmetros, como peso corpóreo, peso ovariano e níveis séricos de progesterona e estradiol, o que indica que o CBZ agiu diretamente no crescimento uterino (mesmo que apenas de forma parcial) e não via mediação ovariana ou hipofisária.

No mesmo sentido, Zhou et al (2015) avaliaram os efeitos da exposição *in vitro* de trofoblasto placentário humano ao CBZ e verificaram diminuição da viabilidade celular, alteração do ciclo celular, indução de apoptose, inibição da invasão e migração celular, e alteração na expressão de sistemas de protease e moléculas de adesão.

Assim, é possível que as perdas pré-implantação causadas pelo CBZ em coelhos sejam, em parte, resultado de efeitos no útero materno.

Perdas pós-implantação

Em coelhos, houve aumento significativo de perdas pós-implantação apenas na maior dose de CBZ testada, 125 mg/kg p.c./dia (Christian, 1985), na qual foram observados também sinais de toxicidade materna, como diminuição do ganho de peso corporal materno durante o período de exposição. Nessa dose de 125 mg/kg p.c./dia, além de duas outras ninhadas que já haviam abortado nos DG_{22 e 25}, foi observada reabsorção completa de sete das 18 ninhadas disponíveis ao final do estudo.

Assim, a maior dose testada sem alteração significativa de perdas pós-implantação em coelhos foi a de 80 mg/kg p.c./dia (Oliveira et al, 1999).

Atraso no desenvolvimento fetal (peso fetal)

Em ambos os estudos analisados foi identificada discreta redução não significativa no peso fetal médio de coelhos conforme houve aumento das doses de CBZ.

Variações e malformações externas, viscerais e esqueléticas

Nas maiores doses utilizadas nos estudos analisados, de 80 mg/kg p.c./dia (Oliveira et al, 1999) e de 125 mg/kg p.c./dia (Christian, 1985), foi identificado aumento da porcentagem de fetos com malformações esqueléticas por ninhada.

No estudo de Oliveira et al (1999) havia dados mais detalhados para análise, que mostraram aumento significativo de alterações esqueléticas em 80 mg/kg p.c./dia, sem sinais de toxicidade materna. Entre as variações encontradas estavam acrômio reduzido e vértebras mal posicionadas e entre as malformações estavam costelas fundidas e arcos vertebrais fundidos.

Para o estudo de Christian (1985), os dados disponíveis para análise se limitaram ao número de fetos e de ninhadas afetados e à citação das malformações identificadas, não sendo obtidas informações sobre o número total de fetos disponíveis para análise em cada dose nem as malformações específicas encontradas ou a porcentagem de cada tipo de malformação específica por grupo, o que dificulta a melhor análise desses dados. Foi relatado apenas aumento não significativo de variações/malformações esqueléticas na dose de 125 mg/kg p.c./dia (54% de fetos com malformações por ninhada na maior dose, com aproximadamente 19% no controle e demais doses): malformações de vértebras cervicais e malformações interrelacionadas das costelas e vértebras torácicas próximas. É relevante mencionar que nessa dose de 125 mg/kg p.c./dia apenas metade das fêmeas prenhes (9 de 18) tinham ninhadas disponíveis para análise fetal, já que as outras nove ou abortaram ou foram completamente reabsorvidas. Nessa dose também foi observada toxicidade materna, com diminuição significativa do ganho de peso corpóreo materno apenas durante parte do período de exposição.

Assim, a maior dose testada sem alteração significativa de malformações em coelhos foi a de 20 mg/kg p.c./dia (Oliveira et al, 1999).

Quadro 1. Avaliação do potencial embriofetotóxico do ingrediente ativo Carbendazim em roedores (ratos e camundongos) e coelhos após exposição por gavagem durante o período de organogênese e dos efeitos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> do Carbendazim sobre a placenta ou o útero.				
Referência	Protocolo	Resultados	Limitações e considerações relevantes	Conclusão
Roedores				
Alvarez, 1987	Pureza: 98,8% CBZ	<u>Toxicidade materna:</u>	Dados brutos não disponibilizados para análise, que foi baseada nas descrições do estudo nos relatórios das agências regulatórias. Assim, não é possível saber se um mesmo feto teve múltiplas malformações.	<u>Materno</u> NOAEL = 20 mg/kg p.c./dia (LOAEL =90 mg/kg p.c./dia: ↑ ninhadas com reabsorção completa)
Estudo regulatório não protocolado na Anvisa. Nossa análise foi baseada nas descrições do estudo pela APVMA (2009),	Espécie/linhagem: Ratos Crl:CD BR	=90 mg/kg p.c./dia: ↓ ganho de peso corporal (nsg do DG ₆₋₁₆ : -10% do ctl; * do DG ₁₆₋₂₁ : -31% do ctl; não calculado o ganho de peso corrigido).		
	n= 19 a 24♀ prenhes/grupo	<u>Toxicidade desenvolvimento:</u>		
	Via: oral (gavagem)	≥ 20 mg/kg p.c./dia: ↓ *peso fetal (- 5% e - 26% do ctl); ↑ * variações fetais, especialmente		

EFSA (2009a) e USEPA (2020).	Doses: 0, 5, 10, 20 ou 90 mg/kg p.c./dia Veículo: solução aquosa 0,5% de carboximetilcelulose Período de exposição: DG₆₋₁₅ Eutanásia e análise de parâmetros maternos e embrionários: DG₂₁	esqueléticas, atribuídas ao atraso no desenvolvimento causado pela exposição (23%, 25%, 20%, 42%* e 52%* dos fetos nos respectivos grupos). =90 mg/kg p.c./dia: ↑* perdas pós-implantação, principalmente reabsorções precoces (0,3; 0,2; 0,9; 0,5; 3,5* nos respectivos grupos, ou seja, +12x do ctl; 3/18 ♀ com reabsorção completa da ninhada); ↓* tamanho da ninhada viva (-24% do ctl), especialmente de ♀; ↓* índice de gestação, que estava dentro da variação biológica normal e foi considerada não relacionado ao tratamento. ↑* incidência de malformações congênitas (1,3%, 0,3%, 4,2%, 1,0% e 70%* dos fetos/ninhadas afetados). Malformações externas: fetos com alterações cranianas como exencefalia (11% dos fetos e 13% das ninhadas; 0 nos demais grupos), crânio abobadado (6% de fetos e 27% das ninhadas; 0 nos demais grupos) e com diminuição (3% dos fetos e 13% das ninhadas) ou ausência (8% dos fetos e 40% das ninhadas) da protuberância ocular. Malformações viscerais: fetos com malformações cerebrais, como hidrocefalia (28% dos fetos e 67% das ninhadas; 0 nos demais grupos) e distensão do ventrículo lateral (5% de fetos e 27% das ninhadas, com 1% fetos e 4% ninhadas em 10 mg/kg e 0% nos demais grupos) e oculares como anoftalmia (25% dos fetos e 67% das ninhadas, com 1% dos fetos e 8% das ninhadas no controle e 0% nos demais grupos) e microftalmia (0,7% dos fetos e 4,5% ninhadas e 4,8% fetos e 20% ninhadas nas duas maiores doses). Malformações esqueléticas: fetos com malformações esqueléticas (54% dos fetos e 80% das ninhadas; com 0,7% dos fetos e 9,1% das ninhadas em 20 mg/kg p.c./dia), principalmente nas vértebras (fundidas, hemivértebra, hipoplasia ou agenesia), nas costelas (fundidas, hipoplasia etc), no esterno (esternóbrios fundidos, partidos etc) e na escápula (malformada).	Intervalo entre as doses média e alta (4,5x) superior ao recomendado desde a primeira revisão da OECD 414 (2001), de 2 a 4x. Exposição apenas na organogênese#. Fetos/ninhadas disponíveis para avaliação nos respectivos grupos: - Externa e esquelética= 312/24; 310/24; 281/24; 288/22; 149/15. - Visceral= 164/24; 162/23; 148/ 4; 147/22; 84/15.	<u>Desenvolvimento</u> NOAEL = 10 mg/kg p.c./dia (LOAEL= 20 mg/kg/dia: ↓ peso fetal, ↑ variações fetais. Malformações em 90 mg/kg)
Quintanilha et al, 1999 Estudo regulatório realizado no Brasil e protocolado na Anvisa.	Pureza: 98,57% CBZ Linhagem: Ratos Wistar n=20♀ prenhes/grupo Doses: 0; 12,5; 25 e 50 mg/kg p.c./dia Veículo: propilenoglicol Período de exposição: DG₆₋₁₅ Eutanásia e análise de parâmetros maternos e embrionários: DG₂₀	<u>Toxicidade materna:</u> =50 mg/kg p.c./dia: ↓* ganho de peso corporal total, sem alteração do ganho de peso corrigido. <u>Toxicidade desenvolvimento:</u> =50 mg/kg p.c./dia: ↑* perdas pós-implantação (12%; 6%; 10% e 42%* nos respectivos grupos; 6/20 ♀ da maior dose tiveram reabsorção completa da ninhada); ↓* nº fetos vivos (154, 187, 170, 96* fetos vivos nos respectivos grupos, com média de fetos/ninhada de 7,7; 9,3; 8,5; 4,8*). ≥ 25 mg/kg p.c./dia: ↓* peso fetal médio (3,24; 2,91; 2,65* e 2,39* nos respectivos grupos; ou seja, -10%, -18%* e -26%* do ctl). Malformações externas: ↑* exencefalia (0/54f:0/20n; 5/187f:3/20n; 21/170f*:6/20n*; 40/96f*:9/14n* nos respectivos grupos; ou seja, 0f:0%n; 2,7%f:15%n; 12%f*:30%n*; 42%f*:69%n*). Outras malformações externas que tiveram baixa incidência, sem diferença significativa: microftalmia+anoftalmia (1/82f:1/20n; 1/96:1/20; 7/89:2/20; 2/50:2/14), hipoplasia cerebral (1/50f:1/14n da maior dose). Malformações viscerais: ↑* dilatação do ventrículo cerebral (1/82f:1/20n; 2/96f:1/20n; 11/89f*:6/20n*; 20/50f*:7/14n* nos respectivos grupos; ou seja, 1%f:5%n; 2%f:5%n; 12%f*:30%n*; 40%f*:50%n*). =50 mg/kg p.c./dia: Malformações esqueléticas: ↑* costelas fundidas (17% dos fetos e 28% das ninhadas). Variações esqueléticas: ↓* centros de ossificação totais e especificamente das falanges anteriores, dos metacarpos e das vértebras caudais.	Dados brutos não disponibilizados para análise, mas apenas o relatório do estudo. Assim, não é possível saber se um mesmo feto teve múltiplas malformações. Exposição apenas na organogênese#. Fetos/ninhadas disponíveis para avaliação nos respectivos grupos: - Externa= 154/20; 187/20; 170/20; 96/14. - Visceral= 82/20; 96/20; 89/20; 50/14. - Esquelética= 82/20; 96/20; 89/20; 50/14.	<u>Materno</u> NOAEL= 25 mg/kg/dia (LOAEL=50mg/kg p.c./dia: ↓ ganho de peso corporal) <u>Desenvolvimento</u> NOAEL= ND (LOAEL= 12,5 mg/kg/dia: ↑ biologicamente relevante exencefalia)
Hofmann e Peh, 1987a	Pureza: NI (produto técnico) Linhagem: Ratos Sprague- Dawley	<u>Toxicidade materna:</u>	Análise baseada na descrição do estudo nos relatórios das agências regulatórias e da	<u>Materno</u>

Estudo regulatório não protocolado na Anvisa. Nossa análise foi baseada nas descrições do estudo pela APVMA (2009), EFSA (2009ª) e JMPR (2005).	n= 15-51 ♀ prenhes/grupo Via: oral (gavagem) Doses: 0 (controle não tratado), 0 (controle veículo), 10, 30, 60, 100, 300, 1000 ou 3000 mg/kg p.c./dia Veículo: solução aquosa 0,5% de carboximetilcelulose Período: DG₆₋₁₅ Eutanásia e análise de parâmetros maternos e embrionários: DG₂₀	≥ 60 mg/kg p.c./dia: ↓* dose-dependente no ganho de peso corporal (em 300 mg/kg p.c./dia sem ganho de peso e em 1000 e 3000 mg/kg p.c./dia houve perda de peso), ↑ abortos (2/23 em 60 mg/kg p.c./dia; 3/15 em 100 mg/kg p.c./dia), ↑ mortalidade (1/23 ♀ em 60 mg/kg p.c./dia; na maior dose 13/16 ♀ prenhes morreram entre os DG₁₀₋₁₇) e sinais de toxicidade como tremor, respiração ofegante após estimulação tátil, diarreia, marcha atáxica, apatia. ≥ 300 mg/kg p.c./dia: alterações histopatológicas como coloração marrom escura do fígado e rins; severa dilatação do duodeno e jejuno; hiperplasia dos linfonodos mesentéricos e perda completa do tecido adiposo perirenal. <u>Toxicidade desenvolvimento:</u> ≥ 30 mg/kg p.c./dia: ↑ perdas pós-implantação (especialmente reabsorções precoces e intermediárias; 5%, 4%, 4%, 6%, 51%*, 85%*, 100%*, 100%*, 100%* nos respectivos grupos; significativa apenas a partir de 60 mg/kg p.c./dia); ↓* peso fetal; ↑ dose-dependente % fetos e ninhadas com malformações (1%; 2%; 0,5%; 42%; 90%; 100% dos fetos nos respectivos grupos), variações e atraso no desenvolvimento. Malformações externas e viscerais: exencefalia, hidrocefalia interna, meningocele, anasarca, microftalmia, cauda encurtada, malformações do coração e pulmões. Malformações esqueléticas das costelas, vértebras e esterno. ≥ 300 mg/kg p.c./dia: sem fetos para avaliação.	JMPR, sem dados brutos e sem detalhamento de parâmetros como incidência de cada tipo de malformação nos grupos. Exposição apenas na organogênese#. Não foi avaliado o consumo alimentar. 2/3 fetos para análise esquelética; com apenas 1/3 para análise visceral. ♀ prenhes nos respectivos grupos: 27; 51, 23, 21, 23, 15, 26, 25, 16.	NOAEL= 30 mg/kg/dia (LOAEL=60mg/kg p.c./dia: ↓ ganho de peso corporal, abortos, mortes e sinais clínicos) <u>Desenvolvimento</u> NOAEL= 10 mg/kg p.c./dia (LOAEL= 30 mg/kg/dia: ↑ perdas pós-implantação, ↓ peso fetal, ↑ malformações)
Hofmann e Peh, 1987b	Pureza: NI (produto técnico) Linagem: Ratos Sprague- Dawley n= 20-30 ♀ prenhes/grupo Via: oral (gavagem) Doses: 0 (controle não tratado), 0 (controle veículo), 10, ou 30 mg/kg p.c./dia Veículo: solução aquosa 0,5% de carboximetilcelulose Período: DG₆₋₁₅ Eutanásia e análise de parâmetros maternos e embrionários: DG₂₀	<u>Toxicidade materna:</u> Sem evidência de toxicidade materna. <u>Toxicidade desenvolvimento:</u> Sem alterações significativas na % perdas-pós-implantação. = 30 mg/kg p.c./dia: ↓ peso fetal; ↑ % fetos e ninhadas com malformações (1,5%; 1,7%; 0,6%; 23% dos fetos nos respectivos grupos), variações e atraso no desenvolvimento. Malformações da cabeça (hidrocefalia interna em 2f/20n, 0f/20n, 1f/29n e 17f/30n nos respectivos grupos), vértebras (torácicas ou lombares partidas) e costelas (pequenas ou onduladas). Variações e retardos: principalmente aplasia ou deslocamento de esternóbrios e dilatação dos ventrículos cerebrais.	Estudo realizado para melhor investigação dos efeitos observados no estudo anterior (Hofmann e Peh, 1987a) e definir um NOAEL para as malformações, especialmente a hidrocefalia interna. Análise baseada na descrição do estudo nos relatórios das agências regulatórias e da JMPR, sem dados brutos e sem detalhamento de alguns parâmetros. Descrição da incidência de cada tipo de malformação no texto incoerente com os dados da tabela da JMPR (2005). Exposição apenas na organogênese#. Não foi avaliado o consumo alimentar. 2/3 fetos para análise esquelética; com apenas 1/3 para análise visceral. Análise visceral incluiu mais secções dos fetos, especialmente na cabeça, já que o objetivo do estudo era avaliar a incidência de hidrocefalia interna.	<u>Materno</u> NOAEL= 30 mg/kg/dia (maior dose testada) (LOAEL=ND) <u>Desenvolvimento</u> NOAEL= 10 mg/kg p.c./dia (LOAEL= 30 mg/kg/dia: ↓ peso fetal, ↑ malformações)
Varnagy e Somlyay, 1991	Pureza: >98% CBZ Linagem: Ratos Wistar n= 21-22 ♀ prenhes/grupo Via: oral (gavagem) Doses: 0, 10, 30 ou 60 mg/kg p.c./dia	<u>Toxicidade materna:</u> ≥60 mg/kg p.c./dia: ↓* dose-dependente do ganho de p.c. e do p.c. materno, resultante principalmente da embriofetalidade (-4%; -36%* e -41%* nos respectivos grupos em relação ao ctl; período pós-tratamento; na dose intermediária foi considerado como resultante apenas da embriofetalidade); ↓* peso da placenta.	Análise baseada na descrição resumida do estudo no relatório da agência regulatória, sem detalhamento de diversos parâmetros e sem dados brutos. Estudo apenas informativo limitado. Exposição apenas na organogênese#.	<u>Materno</u> NOAEL= 30 mg/kg/dia (LOAEL=60 mg/kg/dia: ↓ peso corpóreo) <u>Desenvolvimento</u> NOAEL= ND

	Veículo: solução aquosa de Tween Período: DG₆₋₁₅ Eutanásia e análise de parâmetros maternos e embrionários: DG₂₀	=60 mg/kg p.c./dia: ↓ nsg nº de corpos lúteos e das taxas de implantação (números NI). <u>Toxicidade desenvolvimento:</u> ≥10 mg/kg p.c./dia: ↓* dose-dependente do peso fetal (-12%*; -32%* e -37%* em relação ao ctl); ↑ variações esqueléticas (10 mg/kg p.c./dia: centros vertebrais não ossificados; 30 mg/kg p.c./dia: 13ª costela rudimentar). ≥30 mg/kg p.c./dia: ↑* reabsorções (precoces e tardias; nº médio/ninhada: 0,6; 0,8; 6,9* e 7,7* nos respectivos grupos; 45% e 81% das ♀ com reabsorção completa das ninhadas), com consequente ↓ nº de fetos. Sem alteração na incidência de malformações, mas apenas 18 fetos, de 4 ninhadas, estavam disponíveis para avaliação na maior dose. =60 mg/kg p.c./dia: 5 fetos, de 1 ninhada, com hérnia cerebral.	Análise semanal do consumo alimentar e a cada 4 ou 7 dias do peso corpóreo (adequado à versão de 1981; mas desde 2001 é prevista a cada 3 dias durante o período de exposição).	(LOAEL= 10 mg/kg/dia: ↓ peso fetal; ↑ variações fetais)
Sitarek, 2001 Artigo da literatura.	Pureza: 98% CBZ Linhagem: Ratos Imp:Lodz (colônia própria) n= 18-20 ♀ prenhes/grupo Via: oral (gavagem) Doses: 0, 8, 35 ou 160 mg/kg p.c./dia Veículo: solução aquosa de Tween Período: DG₆₋₁₅ Eutanásia e análise de parâmetros maternos e embrionários: DG₂₀	<u>Toxicidade materna:</u> ≥35 mg/kg p.c./dia: ↓* dose-dependente do ganho de p.c. materno (média de 93,4g; 87,2g; 53,2g* e 39,3g* nos respectivos grupos, ou seja, -6,6%; -43%* e -58%* do ctl; não calculado o ganho de peso corrigido); ↓* peso absoluto e relativo do fígado (peso relativo: 3,8g%, 3,7g%, 3,5g% e 3,4%* nos respectivos grupos), ↑* peso relativo dos rins e adrenais. =160 mg/kg p.c./dia: ↓* peso absoluto ovário e ↑* peso relativo do baço. <u>Toxicidade desenvolvimento:</u> ≥35 mg/kg p.c./dia: ↑* % perda pós-implantação (1,2%; 2,0%; 7,8%* e 10,0%* nos respectivos grupos); ↑* ninhadas com reabsorção total (0/19, 1/18, 8/19* e 20/20* nos respectivos grupos – reabsorção completa de todas as ninhadas da maior dose), ↑* ninhadas com reabsorções precoces (12/19, 15/19, 18/19* e 20/20* ninhadas nos respectivos grupos) e tardias (1/19, 1/18, 8/19* e 16/20* ninhadas nos respectivos grupos), com ↓ correspondente na média de nº fetos vivos por ninhada (9,8; 8,8; 3,6* e 0 nos respectivos grupos), sem alteração significativa no nº fetos mortos por ninhada. ↓* p.c. (-18% que o ctl) e comprimento fetal (-10% que o controle) e peso da placenta (-20% que o ctl). Sem fetos disponíveis na dose de 160 mg/kg p.c./dia para avaliações externa, visceral e esquelética. ≥8 mg/kg p.c./dia: ↑* incidência total de fetos/ninhadas com ossificação retardada (11/100f:7/19n; 21/84f*:10/17n; 25/34f*:10/10n* nos respectivos grupos), e especificamente de esternébrios (10/100f:6/19n; 16/84f:8/17n; 24/34f*:10/10n* nos respectivos grupos) e vértebras (5/34f*:3/10n*, com 0 no controle e menor dose). Atraso de ossificação no crânio verificado em todos os grupos, mas sem significância estatística (2/100f:2/19n; 5/84f:4/17n; 3/34f:3/10n). =35 mg/kg p.c./dia: baixa incidência de malformações externas, não significativa estatisticamente: encefalocele (0/189f:0/19n; 0/159f:0/17n; 1/69f:1/11n nos respectivos grupos), hérnia umbilical (0/189f:0/19n; 0/159f:0/17n; 1/69f:1/11n nos respectivos grupos) e cauda ausente/encurtada (0/189f:0/19n; 0/159f:0/17n; 3/69f:2/11n nos respectivos grupos). ↑* incidência de malformações viscerais: ventrículos cerebrais aumentados (14% dos fetos e 45% das ninhadas) e hidrocefalia interna (14% dos	Sem alteração significativa na taxa de perdas pré-implantação; na aparência geral, no comportamento, na taxa de mortalidade, na concentração de hemoglobina e nos valores de hematócrito das fêmeas prenhes. Exposição apenas na organogênese#. Parâmetros maternos adicionais medidos pelos autores, não previstos na diretriz OECD 414: concentração de hemoglobina, hematócrito e pesos relativos e absolutos de fígado, rim, adrenal, ovário e baço. Análise semanal do p.c. e do consumo alimentar (adequado à versão de 1981; mas desde 2001 é prevista a cada 3 dias durante o período de exposição).	<u>Materno</u> NOAEL= 8 mg/kg/dia (LOAEL=35mg/kg p.c./dia: ↓ ganho de peso corporal; alterações significativas pesos de fígado, rins e adrenais) <u>Desenvolvimento</u> NOAEL= ND (LOAEL= 8 mg/kg/dia: ↑ variações esqueléticas)

		fetos e 36% das ninhadas); hidronefroze (2/35f/2:11n - nsg). ↑* incidência total de malformações esqueléticas (41% dos fetos e 50% das ninhadas; 0% demais grupos) e específica de costelas fundidas (38%* dos fetos e 50%* das ninhadas; 0% demais grupos) e de arcos vertebrais torácicos fundidos (15%* dos fetos e 30%* das ninhadas; 0% demais grupos). Outras malformações encontradas em 35 mg/kg/dia e não nos demais grupos, mas sem significância estatística: ausência de uma costela torácica (2/34f:2/10n), ausência de arco vertebral torácico (2/34f:2/10n) ou de vértebra cervical (1/34f:1/10n).		
Janardhan et al., 1984 Artigo da literatura.	Pureza: 98% CBZ Linhagem: Ratos Wistar Delineamento: Via: oral (gavagem) Doses: 0, 20, 40 ou 80 mg/kg p.c./dia Veículo: solução aquosa 4% de goma arábica Exposição: DG ₆₋₁₅ ou ₅₋₁₅ Protocolo 1: Cesárea programada= DG ₂₁ n= 8, 8, 10 e 8 ♀ prenhes nos respectivos grupos Protocolo 2: Parto normal n= 6, 5, 14 e 4 ♀ prenhes nos respectivos grupos	Protocolo 1 - Cesárea programada: ≥ 40 e 80 mg/kg p.c./dia: ↑* n° de reabsorções e/ou fetos mortos (29%, 48%, 73% e 64% nos respectivos grupos). Protocolo 2 - Parto normal: Sem ocorrência de anormalidades visíveis ou malformações viscerais/ esqueléticas; s/ alteração no peso fetal médio (ao nascer e no desmame).	Estudo informativo limitado. Informação inconsistente sobre o período de exposição: no texto cita DG ₆₋₁₅ , mas nas tabelas DG ₅₋₁₅ . Utilização de número e insuficiente de fêmeas prenhes/grupo, o que resultou em um número de fetos muito baixo para análise (total: 54, 24, 21 e 19 nos respectivos grupos; com 50% dos fetos para análise visceral e 50% para a esquelética). Exposição apenas na organogênese#. Outras inúmeras limitações como: ausência de dados de toxicidade materna (impossibilidade de estabelecimento de um NOAEL materno), de perdas pré-implantação etc.	ND
Delatour e Richard 1976 Artigo não encontrado (francês). Análise foi baseada na descrição da EFSA (2009a).	Pureza: NI Linhagem: Ratos (linhagem não especificada) n= NI Via: oral (gavagem) Doses: 0, 10, 19, demais não informadas mg/kg p.c./dia Veículo: NI Período: DG ₈₋₁₅ Eutanásia e análise de parâmetros maternos e embrionários: NI	≥10 mg/kg p.c./dia: sem efeitos adversos. ≥19 mg/kg p.c./dia: ↑ drástico na embriofetividade e na incidência de malformações (principalmente exencefalia); ↓ peso fetal.	Análise baseada na descrição muito resumida do estudo no relatório da agência regulatória, sem detalhamento de diversos parâmetros essenciais e sem dados brutos. Estudo apenas informativo limitado. Sem informações como pureza do Carbendazim, linhagem dos ratos, número de fêmeas prenhes utilizadas, doses superiores a 19 mg/kg p.c./dia testadas; racional para a escolha do período de exposição (a partir do DG ₈ e não DG ₆), dia da eutanásia, número de fetos/filhotes disponíveis para as análises, identificação dos parâmetros avaliados, incidência dos efeitos, sinais de toxicidade materna etc.	ND
Farag et al., 2011 Artigo da literatura.	Pureza: 98% CBZ Linhagem: Camundongos ICR CD-1 n = 25 a 28 ♀ prenhes/grupo Via: oral (gavagem) Doses: 0, 150, 300, 600 mg/kg p.c./dia Veículo: óleo de milho Período de exposição: DG ₆₋₁₅	<u>Toxicidade materna:</u> ≥ 300 mg/kg p.c./dia: sinais clínicos de toxicidade materna como hiperatividade e sangramento vaginal (em 50% e 80% das ♀ prenhes, com início nos DG ₁₂ e ₉ , respectivamente); ↓* peso e ganho p.c. (DG ₆₋₁₈ , aproximadamente 50% do ctl); ↓* consumo alimentar (DG ₉₋₁₇); ↑* níveis maternos de colesterol (+31% e +43% do ctl), triglicerídeos (+9% e +17% do ctl), glicose (+18% e +28% do ctl), proteínas (+36% e +44% do ctl) e creatinina (+44% e +50% do ctl); ↓* níveis de estradiol (-56% e -78% do ctl) e progesterona (-58% e -67% do ctl). <u>Toxicidade desenvolvimento:</u>	Parâmetros adicionais medidos: bioquímica clínica e análise hormonal; peso de órgãos. Fetos/ninhadas disponíveis para avaliação nos respectivos grupos: - Externa= 292/28; 259/25; 249/27; 203/25. - Visceral= 146/28; 130/25; 125/27; 102/25. - Esquelética= 146/28; 129/25; 124/27; 101/25.	<u>Materno</u> NOAEL= 150 mg/kg/dia (LOAEL=300 mg/kg p.c./dia: diversos sinais de toxicidade materna) <u>Desenvolvimento</u> NOAEL=ND (LOAEL= 150 mg/kg/dia: ↑ perdas pós implantação)

	Eutanásia e observação de parâmetros maternos e embrionários: DG ₁₈	≥150 mg/kg p.c./dia: ↑* perda pós-implantação (0%, 3%, 11% e 28%), devido ao ↑* de fetos mortos/ninhada (0%; 3%, 8% e 11%). ≥ 300 mg/kg p.c./dia: ↑* reabsorções (% de reabsorções precoces/ninhada, 4% e 14%; e de ninhadas com reabsorção, 26% e 44%; reabsorções tardias só na maior dose, 3%; 2/27 ninhadas com reabsorção completa na maior dose, 0% nos demais); com consequente ↓* n° fetos vivos por ninhada (-11% e -28%); ↓* peso fetal (-30% e -40% em relação ao ctl). = 600 mg/kg p.c./dia: ↑* malformações externas (10% dos fetos e 41% das ninhadas), especificamente ectrodactilia (3% fetos), cauda encurtada (4% fetos; com 0,3% no ctl e 3% nsg na dose de 300 mg/kg p.c./dia) e fenda palatina (3% fetos). ↑* variações viscerais (3% dos fetos e 11% das ninhadas): hemorragia subcutânea. ≥ 300 mg/kg p.c./dia: ↑* variações e malformações esqueléticas (11%, 2%, 100% e 100% das ninhadas afetadas). Malformações: costelas fundidas, onduladas, ausentes ou curtas (4 a 10% e 10 a 18% nas respectivas doses); sacro ausente (8% e 15%); encurtamento de ossos longos (5% e 10%) e ausência de metatarsos, metacarpos ou falanges (8 a 15% e 20 a 28%). Variações: parietal pobremente ossificado (7% e 12%), centro torácico pobremente ossificado (7% e 18%); retardo craniano (10% e 16%) e ossificação completa de fetos (1% e 5%).		
Coelhos				
Christian, N., 1985	Pureza: 98,7% CBZ Linhagem: Coelhos brancos da Nova Zelândia [Hra: (NZW) SPF] Delineamento: n = 20 ♀ prenhes Via: oral (gavagem) Doses: 0, 10, 20 ou 125 mg/kg p.c./dia Veículo: solução aquosa de carboximetilcelulose 0,5% Período: DG₇₋₁₉ Eutanásia e análise de parâmetros maternos e embrionários: DG₂₉	<u>Toxicidade materna:</u> =125 mg/kg p.c./dia: ↓ ganho de p.c. materno durante o período de exposição (com ↑ após término da exposição, relacionado ao ↑ do consumo alimentar; sem redução sgn no p.c. absoluto); ↓ leve n° corpos lúteos (-17% em relação ao ctl); ↑ abortos (2 ♀ abortaram, nos DG₂₂ e 25). <u>Toxicidade desenvolvimento:</u> ≥ 20 mg/kg p.c./dia: ↓* taxa implantação (7,7; 7,4; 6,0* e 5,9* nos respectivos grupos, ou seja, -22% nas duas maiores doses, excluindo-se as ♀ que abortaram); ↓* tamanho da ninhada viva (n° médio de fetos vivos/ninhada: -15%, -24% e -28% em relação ao ctl). =125 mg/kg p.c./dia: ↑* reabsorções (completas: 0/16, 0/17, 1/17 e 7/18* das ninhadas dos respectivos grupos; n° médio reabsorções/ninhada: 0,2; 1,0; 0,6 e 2,9* nos respectivos grupos, excluindo-se as ♀ que abortaram); ↓ nsg peso fetal médio (43,32; 44,10; 42,15 e 40,83g nos respectivos grupos; ou seja, +2%; -2,5% e -6% em relação ao ctl). =125 mg/kg p.c./dia: ↑ nsg (porém acima do controle histórico) da % fetos com malformações/ninhada: 19%; 18%; 18% e 54%). Malformações informadas: vértebras cervicais malformadas (hemivértebra, centros/arcsos vertebrais fundidos e vértebras assimétricas, bífidas, ossificadas unilateralmente ou não ossificadas) e malformações interrelacionadas das costelas e vértebras torácicas próximas.	Dados brutos não disponibilizados para análise, que foi baseada nas descrições do estudo nos relatórios das agências regulatórias. Intervalo muito grande (6,25x) entre as doses média e alta (ideal= 2 a 4x). Exposição apenas na organogênese# (mas do DG₇₋₁₉, em vez do DG₆₋₁₈). Análise semanal p.c. e consumo alimentar. Número de fetos disponíveis para análise em cada dose não foi informado e nem a % de cada tipo de malformação específica por grupo.	<u>Materno</u> NOAEL= 20 mg/kg/dia (LOAEL= 125 mg/kg/dia: ↑ abortos e ↓ ganho de peso corporal materno) <u>Desenvolvimento</u> NOAEL= 10 mg/kg/dia (LOAEL= 20 mg/kg/dia: ↓ implantação, ↑ reabsorção, ↓ tamanho da ninhada viva; Malformações em 125mg/kg/dia)
Oliveira et al, 1999 (G2104C-414/98)	Pureza: 98,57% CBZ Linhagem: Coelhos brancos da Nova Zelândia (4 meses de idade) Delineamento: n = 12 ♀ prenhes/grupo Via: oral (gavagem)	<u>Toxicidade materna:</u> Sem efeitos no peso corporal e consumo alimentar. <u>Toxicidade desenvolvimento:</u> = 5 e 80 mg/kg/dia: ↑* perdas pré-implantação (0%; 5,83%; 2,59% e 6,78% nos respectivos grupos); ↓ nsg peso fetal médio (-2,7%; -4,5% e -11% em relação ao ctl).	Dados brutos não disponibilizados para análise, mas apenas o relatório do estudo (por isso não é possível dizer se os fetos que tiveram malformações externas foram os mesmos que tiveram malformações viscerais e esqueléticas etc).	<u>Materno</u> NOAEL ≥ 80 mg/kg/dia (LOAEL= ND; maior dose testada sem efeitos) <u>Desenvolvimento</u> NOAEL= ND

	Doses: 0, 5, 20 ou 80 mg/kg p.c./dia Veículo: propilenoglicol Período: DG₆₋₁₈ Eutanásia e análise de parâmetros maternos e embrionários: DG₂₉	= 80 mg/kg/dia Malformações externas: ↑nsg fetos com dígito ausente (6% dos fetos e 16,7% das ninhadas; 0% nos demais grupos). Malformações esqueléticas: ↑* costelas fundidas (7%* dos fetos e 33%* das ninhadas; 0% nos demais grupos); ↑* arcos vertebrais fundidos (5%* dos fetos e 25% das ninhadas; 0% nos demais grupos). Variações esqueléticas: ↑* acrómio reduzido (respectivamente 12%f/33%n; 8%f/25%n; 20%f:50%n; 28%*f:83%*n nos respectivos grupos); ↑* vértebra malposicionada (5%f/33%n; 3%f:17%n; 8%f/:25%n; 15%*f:42%n).	Exposição apenas na organogênese#. Número de fêmeas prenhes adequado à versão da diretriz da época (n=12), mas inferior ao exigido desde 2001 (n=20). Análise semanal p.c. e consumo alimentar. 100% fetos para análise visceral e esquelética (83f/12n; 95f:12n; 86f:12n; 99f:12n) Sem alteração no número de fetos vivos e % de perdas pós-implantação. Sem malformações viscerais relevantes.	(LOAEL= 5 mg/kg/dia: ↑ perdas pré-implantação)
Janardhan et al., 1984 Artigo da literatura.	Pureza: 98% CBZ Coelhos albinos Delineamento: n = 4 ♀ prenhes/grupo Via: oral (gavagem) Doses: 0, 40, 80 e 160 mg/kg p.c./dia Veículo: solução aquosa 4% de goma arábica Exposição: DG₆₋₁₈ Eutanásia: DG₃₁	≥ 40 mg/kg p.c./dia: ↑nsg dose-dependente na % fetos mortos e reabsorvidos (0; 15%; 21,7% e 33,3% nos respectivos grupos), com consequente ↓ na % de fetos vivos. Não houve alteração no peso médio fetal e não foram detectadas malformações externas, viscerais e esqueléticas. Autores afirmaram que fetos foram afetados em níveis de dose que não produziram toxicidade materna detectável, porém nenhum dado referente à análise dos parâmetros maternos foi exibido.	Estudo apenas informativo limitado. Utilização de número muito baixo e insuficiente de coelhas prenhes/grupo, o que resultou em um número de fetos muito baixo para análise (total: 17, 17, 18 e 10 nos respectivos grupos; com 50% dos fetos para análise visceral e 50% para a esquelética). Exposição apenas na organogênese#. Outras inúmeras limitações como: ausência de dados de toxicidade materna (impossibilidade de estabelecimento de um NOAEL materno), de perdas pré-implantação, de comprimento e sexo fetal etc.	ND
Estudos <i>in vivo</i> em útero e <i>in vitro</i> em placenta				
Spencer et al., 1996 Artigo da literatura	Pureza: 98% CBZ Espécie/linhagem: Ratas <i>Sprague-Dawley</i> com pseudogestação induzida N= 5 ratas/grupo Via: oral (gavagem) Doses: 500 e 1000 mg/kg p.c./dia Veículo: óleo de milho Período de exposição: dias 5 a 9 de pseudogestação. Eutanásia: dia 10 de pseudogestação.	Objetivo do estudo: Avaliar a capacidade de crescimento decidual em ratas pseudogestantes e determinar se a atividade antimiotótica é mediada por mecanismos hormonais e moleculares. =500 e 1000 mg/kg p.c./dia: ↓ peso decidual uterino e conteúdo de proteína uterina. Sem alterações relevantes nos níveis séricos de estradiol e progesterona e nas capacidades de ligação dos receptores citosólicos desses hormônios.	Apenas 5 ratas/grupo.	Atividade anti-crescimento do CBZ no útero é direta e aparentemente não envolve mecanismos hormonais.
Zhou et al., 2015 Artigo da literatura	Pureza: NI (alta pureza) Estudo <i>in vitro</i> Linhagem: trofoblasto extravasoloso humano de primeiro trimestre (HTR-8) Concentração: 1; 2,5 e 5 mM. Veículo: DMSO 0,1% Período de incubação: 24 h	Objetivo do estudo: análise da viabilidade e do ciclo celular. = 1; 2,5 e 5 mM: ↑ apoptose e ↓ da invasão celular =2,5 e 5 mM: ↓ % células na fase G0/G1 e da migração celular =5 mM: ↓ viabilidade celular Alteração na expressão de sistemas de protease (MMPs/ TIPMs e uPA / PAI-1) e moléculas de adesão (integrina α5 e β1).	Pureza NI, mas foi mencionado que o CBZ foi obtido da Sigma Chemical, o que indica que é um produto técnico.	Efeitos deletérios do CBZ em trofoblasto placentário humano (inibição da viabilidade celular, alteração do ciclo celular e indução de apoptose, da invasão e migração celular, e alteração na expressão de sistemas de protease e moléculas de adesão).
Halwachs et al., 2016	Pureza: 99,2% CBZ Estudo <i>in vitro</i>	Objetivo do estudo: avaliação do transporte de CBZ mediado por ABCG2 da placenta de coelho.	Não distinguiu entre inibidor ou substrato.	Evidência inadequada.

16/05/2022 18:23

SEI/ANVISA - 1505782 - Parecer

	Linagem: Células MDCK II polarizadas que expressam o transportador ABCG2 da placenta de coelho Concentração: 0,01; 0,1; 1 e 10x LMR (LMR=10,5 M e 0,10M) Veículo= DMF Período de incubação: 4 h	CBZ interage com o trasportador ABCG2 da placenta de coelho e pode atuar como inibidor ou substrato.		
Legenda: * = alteração estatisticamente significativa; CBZ= Carbendazim; ctrl= controle; DG= dia gestacional; F= fetos; n= ninhadas; ND= não determinado; NI = não informado; nsg= alteração não significativa estatisticamente; p.c.= peso corpóreo. Observações: Limitações comuns a todos os estudos: #período de exposição compreende somente a organogênese, mas não o período fetal (exigência desde a versão de 2001) e nem o período pré-implantação (extensão opcional prevista desde a versão de 2001). Diversos parâmetros estão de acordo com a diretriz OECD 414 vigente à época dos estudos, mas em desacordo com as versões mais atualizadas (2001 ou 2018): ausência de análise de parâmetros maternos incluídos apenas recentemente como dosagem hormonal (T4, T3 e TSH) e peso e histopatologia da tireoide; ausência de análise de alguns parâmetros fetais como distância anogenital.				

3.1.2 Dieta

A via indicada para os estudos de desenvolvimento pré-natal nas diretrizes da OECD é a oral por gavagem, que permite um controle mais preciso da dose e do período de tratamento, no entanto foram identificados estudos de exposição ao CBZ via dieta.

a. Ratos

Foram analisados três estudos que administraram o CBZ a ratos via dieta durante o período de organogênese: Koeter e De Groot (1975a), Til et al (1976) e o estudo de uma geração estendida (EOGRTS, 2014; autor não informado) realizado mais recentemente e descrito por outras agências. A análise detalhada desses estudos é apresentada no Quadro 2.

A toxicidade pré-natal foi um dos itens abordados no estudo de Til et al (1976) e no EOGRTS (2014), estudos multigeracionais que avaliaram muitos outros parâmetros e períodos de exposição (o Quadro 2 apresenta apenas os dados dos estudos relevantes para avaliação pré-natal). Em ambos os estudos, a geração parental foi exposta ao CBZ por toda a vida, com as fêmeas prenhes continuando a exposição até o final da coorte pré-natal, no DG_{20/21}.

Desses três estudos apenas o de Koeter e De Groot (1975a) foi considerado adequado. Entre inúmeras limitações, o estudo de Til e colaboradores (1976) não registrou os dados de consumo alimentar dos animais, essencial em um estudo dietético para se estimar as doses a que eles foram efetivamente expostos. Quanto ao EOGRTS (2014), a análise da Anvisa foi baseada na descrição muito sucinta desse estudo nos relatórios da USEPA (2020) e PMRA (2019), sem detalhamento de diversos parâmetros e resultados. Ainda, as descrições dos resultados desse mesmo estudo pelas duas agências foram muito discrepantes, o que impossibilita qualquer conclusão definitiva com base apenas nessas informações.

Koeter e De Groot (1975a) identificaram aumento de reabsorções nas doses de 141,4 e 371,4 mg/kg p.c./dia (+30% e +54% acima do controle; não foi realizada análise estatística desses dados), com toxicidade materna apenas na maior dose, sendo 44,9 mg/kg p.c./dia a menor dose do estudo sem esse efeito. Atraso no desenvolvimento foi identificado em doses iguais e superiores a 44,9 mg/kg p.c./dia, a menor testada, sem evidência de toxicidade materna. O atraso no desenvolvimento foi caracterizado pelo aumento significativo de variações esqueléticas, como corpos vertebrais não ossificados (menor dose já teve +15% em relação ao controle), ossificação incompleta dos ossos do crânio e de falanges, entre outras. Houve também redução do peso fetal com o aumento das doses administradas, porém não foi realizada análise estatística desses dados e a EFSA (2009a) considerou um efeito da exposição apenas na maior dose.

No estudo de Til et al (1976) a única alteração estatisticamente significativa relatada foi o aumento de variações esqueléticas na maior dose testada, de 100 mg/kg p.c./dia, sendo relevante ressaltar que as análises visceral e esquelética dos fetos foram realizadas apenas nessa dose e no controle, e que havia um número muito reduzido de fetos para a análise esquelética (1/3 dos fetos, em vez dos 50% recomendados). Entre essas variações estavam ossificação incompleta ou ausência de ossificação de vértebras cervicais, de ossos do crânio e de metatarsos e falanges.

Não foi possível estabelecer um NOAEL para o atraso de desenvolvimento para os dois estudos acima, já que a menor dose testada e com avaliação de variações esqueléticas foi a de 44,9 mg/kg pc/dia (nas doses de 7,5 e 15 mg/kg p.c./dia do estudo de Til et al, 1976, os fetos não foram submetidos à análise esquelética).

Em relação ao EOGRTS (2014) há descrições discrepantes entre as duas agências que relataram esse estudo. Enquanto a USEPA (2020) concluiu pela ausência de qualquer alteração materna ou embrio-fetal, a PMRA (2019) informou a presença de diversas variações (esqueléticas como costelas rudimentares, ausência de ossificação incompleta dos arcos caudais e do processo xifoide) na presença de toxicidade materna, sem identificar as doses em que esses efeitos foram observados. Como a Anvisa não teve acesso a esses estudos, mas apenas às descrições das duas agências, não é possível tirar conclusões a partir desses dados.

b. Coelhos

O estudo de Koeter e De Groot (1975a) foi o único estudo identificado em coelhos em que a exposição ao CBZ durante a organogênese se deu pela incorporação na dieta. Nesse estudo foram testadas três doses de CBZ (23, 77 e 208 mg/kg p.c./dia), no entanto, os dados da dose intermediária foram descartados da análise pela Anvisa, pois nessa dose havia apenas três ninhadas para avaliação. Nos demais grupos o número de ninhadas também estava abaixo do mínimo exigido nas diretrizes da OECD, o que pode impactar nos resultados e conclusões sobre o estudo, sendo considerado pela Anvisa uma evidência limitada, inadequada para uma conclusão definitiva. Outra limitação importante desse estudo, além do número reduzido de ninhadas e fetos para avaliação de malformações, foi a análise visceral efetuada apenas dos fetos dos grupos controle e de maior dose.

Não foram identificadas malformações externas ou viscerais nesse estudo. Na menor dose testada, de 23 mg/kg p.c./dia, foi observado aumento significativo de variações esqueléticas, como ossificação incompleta dos ossos do crânio e das costelas supernumerárias, na ausência de toxicidade materna. É relevante observar que as porcentagens dessas variações foram similares entre a menor e a maior dose testada no estudo. Além disso, essa dose em que se observou variações esqueléticas nos coelhos foi similar à que causou variações esqueléticas pela administração por gavagem (Oliveira et al, 1999). Em Oliveira et al (1999), na dose de 20 mg/kg p.c./dia houve aumento na porcentagem de variações, mas sem diferença significativa, enquanto na dose de 80 mg/kg p.c./dia, que foi a dose seguinte testada, essas diferenças foram significativas.

Na dose 208 mg/kg p.c./dia foi identificado aumento significativo de variações esqueléticas adicionais, na presença de toxicidade materna, como presença de 13ª costela supranumerária bilateral; ausência de ossificação ou ossificação incompleta de metacarpos e falanges e de esternébrios. Além disso, foram encontradas algumas malformações esqueléticas em muito baixa incidência nessa dose, como ossos cranianos extra, esternébrios deformados e zigomático deformado (respectivamente 3 fetos/3 ninhadas, 2 fetos/2 ninhadas e 1 feto/1 ninhada).

Quadro 2. Avaliação do potencial embrio-fetotóxico do ingrediente ativo Carbendazim em ratos e coelhos após exposição pela dieta durante o período de organogênese.				
Referência	Protocolo	Resultados	Limitações e considerações relevantes	Conclusão
Ratos				
Koeter e De Groot, 1975a	Pureza: NI (produto técnico)	Toxicidade materna: =371 mg/kg p.c./dia: ↓ * ganho de peso p.c. materno (-32% do controle) e do	Apesar da pureza não ser informada, os dados indicam que se trata de produto técnico, já que a mesma identificação do produto (Hoe 17411) foi utilizada em muitos outros estudos	Materno NOAEL=141 mg/kg/dia
Estudo regulatório não protocolado na Anvisa.	Linagem: Ratos Wistar			
	Delineamento:			

Nossa análise foi baseada na descrição do estudo pela EFSA (2009a).	n = 18-22 ♀ prenhes Via: oral (incorporado na dieta) Doses: 0; 600; 2000 e 6000 ppm, correspondentes a 0; 44,9; 141,4 e 371,4 mg/kg p.c./dia. Período: DG₆₋₁₅ Eutanásia e análise de parâmetros maternos e embrionários: DG₂₁	consumo alimentar (- 20%) durante o período de exposição. <u>Toxicidade desenvolvimento:</u> =371,4 mg/kg p.c./dia: ↓ dose-dependente peso fetal médio (-3%, -5% e -11% do controle; não foi realizada análise estatística, mas foi considerado um efeito da exposição apenas na maior dose). ≥ 141,4 mg/kg p.c./dia: ↑ reabsorções (nº médio /ninhada: 0,5; 0,5; 0,65 e 0,77; +30 e +54% nas duas maiores doses; não foi realizada análise estatística). ≥ 44,9 mg/kg p.c./dia: ↑* dose-dependente variações esqueléticas, como corpos vertebrais cervicais não ossificados (23%; 38%*; 42%* e 52%* dos fetos afetados nos respectivos grupos). = 44,9 e 371,4 mg/kg p.c./dia (mas não na dose intermediária): ↑* incidência de variações esqueléticas, como ossificação incompleta das falanges dos membros posteriores (12%; 16%; 14% e 15%*), dos corpos vertebrais cervicais (23%; 34%*; 26% e 31%*) e dos ossos do crânio (0,7%; 2,1%*; 0,8% e 3,4%*). = 371,4 mg/kg p.c./dia: ↑ fetos com costela supranumerária (6/2, 5/4, 5/4 e 12/9* fetos/ninhadas), esternóbrios com ossificação incompleta (2%; 3%; 2% e 11%*) ou não ossificados (2,3%* na maior dose e 0 nos demais grupos) e não ossificação das falanges dos membros anteriores e posteriores e dos metatarsos.	crônicos regulatórios da mesma empresa registrante analisados pela EFSA e considerados aceitáveis. Dados brutos não disponibilizados para análise, que foi baseada na descrição do estudo no relatório da agência regulatória Estudo conduzido antes da existência de diretrizes regulatórias, mas foi considerado praticamente em conformidade com a diretriz OECD 414. Peso e consumo alimentar das fêmeas avaliados apenas nos dias 0, 6, 16 e 21 (recomendado a cada 3 dias). Não foram informados o número de fetos e ninhadas analisados em cada grupo. Apenas 1/3 dos fetos submetidos à análise esquelética (recomendado: ½).	(LOAEL = 371 mg/kg/dia: ↓ganho de p.c. e consumo alimentar) <u>Desenvolvimento</u> NOAEL=ND (LOAEL= 45 mg/kg/dia: ↑variações esqueléticas)
Til et al., 1976 Estudo regulatório protocolado na Anvisa.	Pureza: 99% CBZ Linhagem: Ratos Wistar Delineamento: Estudo de teratogenicidade desenvolvido dentro de um estudo de 3 gerações. n= 15 ♀/ grupo no início do estudo, a partir do acasalamento com 5 ♂ (1♂: 3♀). Apenas 9, 12, 12 e 11 ♀ prenhes para análise. Via: oral (dieta) Doses: 0, 150, 300 ou 2000 ppm, correspondentes a 0; 7,5, 15 ou 100 mg/kg p.c./dia. Período: animais da terceira geração exposta ao Carbendazim; expostos diretamente pela dieta do desmame ao DG₂₁ (acasalamento com 15 semanas). Eutanásia e análise de parâmetros maternos e embrionários: DG₂₁	Sem efeitos parentais relevantes (maternos e paternos). Sem alterações na prole como: óbitos, perdas pré- e pós-implantação, peso fetal e nem nas malformações externas e viscerais. =100 mg/kg p.c./dia: ↑* Variações esqueléticas (avaliadas apenas controle e maior dose), indicativas de atraso no desenvolvimento: ↑* incidência de corpos vertebrais cervicais não ossificados (0%; 5%*) ou com ossificação incompleta (%ossos completamente ossificados/total de avaliados: 43%; 32%*). ↑* incidência de ossos do crânio com ossificação incompleta (0,4%; 1,7%); ↑* ossificação incompleta ou ausente de metatarsos e falanges; ↑nsg incidência de corpos vertebrais torácicos reduzidos (3f/9n e 9f/7n).	Neste quadro está descrita apenas a parte do estudo relativa à avaliação pré-natal dos parâmetros de desenvolvimento. Dados brutos não disponibilizados para análise, mas apenas o relatório do estudo, que era bastante resumido, sem detalhamento de diversos parâmetros. Intervalo entre doses (6,7x) superior ao recomendado em estudos dietéticos (máximo 3x). Número insuficiente de fêmeas prenhes por grupo. Análise de malformações e variações somente na maior dose, com o seguinte número de fetos/ninhadas: - Externa: 97/9; 121/12; 129/12; 108/11 - Visceral= 66/9; 72/10. - Esquelética = 29/9; 34/11 (apenas1/3; recomendado1/2). Acasalamento com proporção de 1♂:3♀ (recomendado 1:1).	ND
Estudo de uma geração estendida (EOGRS; 2014) Estudo regulatório não protocolado na Anvisa. Nossa análise foi baseada nas descrições do estudo	Pureza: 99,5% CBZ Linhagem: Ratos Wistar Hannover [CrI:WI (HAN)] Delineamento:	Descrição USEPA: Ausência de alterações maternas: mortalidade; alterações clínicas, no p.c. ou ganho de p.c., no consumo alimentar, parâmetros	Neste quadro está descrita apenas a parte do estudo relativa à avaliação pré-natal dos parâmetros de desenvolvimento. Análise baseada na descrição muito resumida do estudo nos relatórios das	ND

pela USEPA (2020) e PMRA (2019).	Estudo de teratogenicidade desenvolvido dentro do estudo de uma geração estendida. n= 22 ♀/ grupo (F1) no início do estudo. Via: oral (dieta) Doses fêmeas prenhes: 0; 16,2; 67,6 ou 136,8 mg/kg p.c./dia. Período de exposição da geração parental (F1): exposição dos pais (geração P) antes do acasalamento, das mães durante a gestação, com administração dietética direta dos pais F1 desde o desmame (acasalamento no DPN₉₀) e da mãe F1 até o DG₂₀ da ninhada F2.	hematológicos, bioquímicos ou de urinalise. Ausência de alterações no tamanho da ninhada viva, no peso fetal e sem variações ou malformações externas, viscerais ou esqueléticas. Descrição PMRA: Presença de toxicidade materna (doses não informadas). Presença de variações somente na presença de toxicidade parental (arcos caudais e processo xifoide não ossificados ou com ossificação incompleta); ↑ incidência de costelas rudimentares e artéria umbilical posicionada do lado esquerdo (doses não informadas).	agências regulatórias, sem detalhamento de diversos parâmetros e sem dados brutos. As descrições do mesmo estudo foram conflitantes entre as agências americana e canadense, o que impossibilita qualquer conclusão da Anvisa com base apenas nessas informações.	
Coelhos				
Koeter e De Groot, 1975b Estudo regulatório não protocolado na Anvisa. Nossa análise foi baseada na descrição do estudo pela EFSA (2009^a).	Pureza: NI (produto técnico) Linhagem: Coelhos brancos da Nova Zelândia Delineamento: n = 9, 8, 3[♂] e 11 ♀ prenhes nos respectivos grupos Via: oral (incorporado na dieta) Doses: 0; 600; 2000[♂] e 6000 ppm, correspondentes a 0; 23; 77[♂] e 208 mg/kg p.c./dia. Período: DG₆₋₁₈ Eutanásia e análise de parâmetros maternos e embrionários: DG₂₉	<u>Toxicidade materna:</u> =208 mg/kg pc/dia: ↓ ganho de p.c. materno durante o período de exposição (-29% e -56%* do ctl na menor e maior dose, respectivamente); uma ♀ abortou no DG₂₆ e uma ♀ continha apenas um sítio de implantação, com uma reabsorção embrionária. <u>Toxicidade desenvolvimento:</u> =23 e 208 mg/kg p.c./dia: ↑* variações esqueléticas, como ossificação incompleta dos ossos do crânio (% de ossos com anomalias: 0,0; 1,3*; 1,5*) e das costelas supranumerárias (5,0; 15,9*; 14,3*). =208 mg/kg p.c./dia: ↑* variações esqueléticas como ↑* costela supranumerária bilateral; ↑* ausência de ossificação dos metacarpos e falanges do membro anterior; ↑* ossificação incompleta dos metacarpos do membro anterior, das falanges do membro posterior e de esternébrios. Nessa dose foram encontradas alterações (nsg) como ossos cranianos extra (3f/3n; na menor dose teve 1f/1n); esternébrios deformados (2f/2) e zigomático deformado (1f/1n).	Apesar da pureza não ser informada, os dados indicam que se trata de produto técnico, já que a mesma identificação do produto (Hoe 17411) foi utilizada em muitos outros estudos crônicos regulatórios da mesma empresa registrante analisados pela EFSA e considerados aceitáveis. Dados brutos não disponibilizados para análise, que foi baseada na descrição do estudo no relatório da agência regulatória. §Dados da dose intermediária foram completamente descartados na análise da Anvisa, pois havia apenas 3 fêmeas prenhes para análise. #Período de exposição compreende somente a organogênese. Número de fêmeas prenhes insuficiente, com consequente número insuficiente de fetos para análise. Apenas os fetos dos grupos controle e de maior dose foram examinados para malformações viscerais. Os níveis de CBZ na dieta não foram confirmados analiticamente.	<u>Materno</u> NOAEL=ND (< 208 mg/kg p.c./dia; pois dados dose intermediária não foram adequados para análise) (LOAEL= 208 mg/kg p.c./dia: ↓ ganho de p.c.) <u>Desenvolvimento</u> NOAEL=ND (alterações observadas mesmo na menor dose) (LOAEL= 23 mg/kg p.c./dia: ↑ alterações esqueléticas).
Legenda: * = alteração estatisticamente significativa; CBZ= Carbendazim; ctl= controle; DG= dia gestacional; f= fetos; n= ninhadas; ND= não determinado; NI = não informado; nsg= alteração não significativa estatisticamente; p.c.= peso corpóreo. Observações: Limitações comuns a todos os estudos: #período de exposição compreende somente a organogênese, mas não o período fetal (exigência desde a versão de 2001) e nem o período pré-implantação (extensão opcional prevista desde a versão de 2001). Diversos parâmetros estão de acordo com a diretiva OECD 414 vigente à época dos estudos, mas em desacordo com as versões mais atualizadas (2001 ou 2018): ausência de análise de parâmetros maternos incluídos apenas recentemente como dosagem hormonal (T4, T3 e TSH) e peso e histopatologia da tireoide; ausência de análise de alguns parâmetros fetais como distância anogenital.				

3.2 EXPOSIÇÃO DURANTE O INÍCIO DA GESTAÇÃO

Foram identificados dois artigos (Cummings et al 1990 e 1992) que testaram os efeitos da administração repetida de CBZ a ratos por gavagem no período inicial de gestação (DG₁₋₈; ou seja, da fertilização até poucos dias após a implantação), descritos no Quadro 3.

Esses estudos, apesar de consistirem em evidência limitada, por terem utilizado um número relativamente baixo de fêmeas prenhes, entre outras limitações, são relevantes porque dão indicativos dos impactos da administração de CBZ nesse período específico de susceptibilidade do conceito, não coberto pelos demais estudos realizados por gavagem com o CBZ, mas que acrescenta muito à discussão sobre os efeitos embriotóxicos desse ingrediente ativo.

Cummings et al (1992) administraram CBZ a ratas prenhes por gavagem nos primeiros oito dias de gestação e verificaram os efeitos dessa exposição por meio da análise de embriões no DG₁₁ e de fetos no DG₂₀. A avaliação no DG₁₁, apenas 3 dias após o final da exposição, mostrou diminuição significativa da sobrevivência embrionária em doses a partir de 200 mg/kg p.c./dia, o que foi confirmado na avaliação no DG₂₀, em que foi observada diminuição estatisticamente significativa da sobrevivência fetal desde a menor dose testada, de 100 mg/kg p.c./dia (redução relevante, de 54%, da viabilidade em relação ao controle), resultante do aumento de ninhadas com reabsorção completa. Essas doses são aproximadamente três a seis vezes superiores àquelas que causaram aumento de perdas pós-implantação na exposição durante todo o período de organogênese (30 mg/kg p.c./dia).

Além disso, em doses a partir de 200 mg/kg p.c./dia, na avaliação realizada no DG₁₁ foi possível identificar redução significativa do crescimento embrionário (avaliação de seis características embrionárias por um critério de pontuação), com aumento de anomalias de membros e de fechamento do tubo neural. Na avaliação do DG₂₀, as alterações no desenvolvimento foram caracterizadas pelo aumento significativo na incidência de variações esqueléticas em doses a partir de 100 mg/kg p.c./dia, com a detecção de malformações esqueléticas apenas na maior dose testada, de 600 mg/kg p.c./dia. É relevante mencionar que na avaliação realizada no DG₂₀ havia fetos insuficientes para análise estatística satisfatória, sendo observada uma baixa incidência de malformações externas,

viscerais e esqueléticas. Nas doses de 200 e 600 mg/kg p.c./dia, foram identificados fetos com microftalmia (em 400 mg/kg p.c./dia o número de fetos foi insuficiente para análise). Essas doses são mais de dez vezes superiores às aquelas que causaram atraso no desenvolvimento embrionário e aumento de malformações após exposição durante todo o período de organogênese (Alvarez, 1987; Quintanilha et al, 1999; Sitarek, 2001; Varnagy e Somlyay, 1991).

É importante destacar que os efeitos observados no fechamento do tubo neural são bastante relevantes, pois nenhum outro estudo com CBZ analisou os embriões em um estágio tão inicial de desenvolvimento (DG₁₁) e, conforme já citado anteriormente, a falha no fechamento do tubo neural anterior resulta em encefalia (Hood, 2012). Esses achados, portanto, reforçam as evidências de malformações encefálicas nos diversos estudos com CBZ que avaliaram os fetos ao final da gestação.

Esses resultados sugerem que a exposição ao CBZ apenas durante o início da gestação tem efeitos menos pronunciados no desenvolvimento embrionário de ratos que a exposição durante o período de organogênese.

Nesse mesmo artigo de Cummings et al (1992), foi realizada comparação dos impactos da administração de uma dose altíssima de CBZ (600 mg/kg p.c./dia via gavagem), nos DG₁₋₃ (pré-implantação) e DG₄₋₈ (pós-implantação) na sobrevivência fetal, avaliada no DG₂₀. A exposição das fêmeas prenhes nos DG₁₋₃ não alterou o número de fetos vivos ou reabsorções por ninhada, enquanto a exposição nos DG₄₋₈ causou significativa diminuição da sobrevivência fetal (-75% do controle) e aumento do número de reabsorções por ninhada (18x superior ao controle).

Os resultados do estudo de Cummings et al (1992) sugerem que, em ratos, a exposição ao CBZ não afeta o processo de implantação em si, tendo em vista que não houve alteração no número de implantações/ninhada nos protocolos 1 e 2 e que, no protocolo 3, o número de fetos vivos ou de reabsorções/ninhada foi afetado somente na exposição peri-implantação (DG₄₋₈). Por outro lado, conforme discutido anteriormente neste parecer, os dados dos estudos em coelhos indicaram uma ação do CBZ no processo de implantação, o que pode ser decorrente das particularidades da implantação nessa espécie – ocorrência de forma mais superficial e lenta, em comparação aos ratos.

Em conjunto, esses dados indicam que o aumento de mortes embrionárias/fetais após a administração de CBZ no período peri-implantação pode ocorrer, pelo menos em parte, devido aos efeitos desse IA no útero materno, os quais estão associados ao seu mecanismo de ação de inibição da polimerização de β -tubulina e interrupção da montagem de microtúbulos.

Quadro 3. Avaliação do potencial embriofetotóxico do ingrediente ativo Carbendazim em ratos após exposição via gavagem durante o período inicial de gestação.				
Referência	Protocolo	Resultados	Limitações e considerações relevantes	Conclusão
Cummings et al., 1990 Artigo da literatura (realizado pela USEPA).	Pureza: 95% CBZ Linhagem: Ratas Holtzman Delineamento: n= 7-8 ♀/grupo Via: oral (gavagem) Veículo: óleo de gergelim Período de exposição: DG ₁₋₈ Eutanásia e análise de parâmetros maternos e embrionários: DG ₉ - Protocolo 1: Doses: 0, 25, 50, 100, 200, 400 mg/kg p.c./dia - Protocolo 2: Doses: 0 e 1000 mg/kg p.c./dia - Protocolo 3: competência uterina Indução de pseudogestação e posterior indução bilateral da decídua uterina no DG ₄ . Doses: 0 e 400 mg/kg p.c./dia	<u>Protocolo 1:</u> ≥100 mg/kg p.c./dia: tendência de ↑ reabsorções (1,8; 1,6; 0,8; 3,9; 3,0 e 5,0) <u>Protocolo 2:</u> =1000 mg/kg p.c./dia: ↓ ganho de p.c. materno (-70% do ctl), ↑ sutil nº reabsorções (0; 0,3); ↓ peso médio dos sítios de implantação (-20% do ctl), ↑ estradiol e ↓ LH. Protocolo 3: competência uterina =400 mg/kg p.c./dia: inibição parcial da resposta das células da decídua (↓ peso uterino; -40% do ctl), que é uma medida do crescimento decidual uterino durante a pseudogestação. Sem alteração de outros parâmetros (peso corpóreo, peso ovariano, progesterona e estradiol séricos).	DG ₉ considerado inadequado para avaliação de parâmetros embrionários, por isso os autores realizaram um estudo posterior (Cummings et al, 1992), com avaliação no DG ₁₁ . Os resultados dos protocolos 1 e 2, portanto, devem ser interpretados com cautela. Avaliação da embriotoxicidade: nº de sítios de implantação e do diâmetro (protocolo 1) ou peso (protocolo 2) de cada sítio; sítios com extravasamento adjacente de sangue foram considerados reabsorções. Níveis de LH, prolactina, estradiol e progesterona. Competência uterina verificada pela resposta das células da decídua, técnica para avaliação da capacidade do útero do roedor de iniciar a implantação e manter o crescimento decidual. Utilizada para distinguir efeitos maternos dos embriotóxicos e para diferenciar entre falha gestacional precoce e perda embrionária tardia.	ND
Cummings et al., 1992 Artigo da literatura (realizado pela USEPA).	Pureza: 95% CBZ Linhagem: Ratas Holtzman Delineamento: Via: oral (gavagem) Veículo: óleo de gergelim à Protocolos 1 e 2 n= 10-11 ♀ prenhes/grupo Doses: 0, 100, 200, 400 ou 600 mg/kg p.c./dia Período de exposição: DG ₁₋₈ Eutanásia e análise de parâmetros maternos e embrionários: - Protocolo 1: no DG ₁₁ Avaliação da taxa de sobrevivência (no de implantações e de embriões vivos), de parâmetros de crescimento	Objetivo: avaliar efeitos do CBZ no início da gestação (primeira semana) <u>Protocolo 1 (avaliação no DG₁₁).</u> Sem alterações no ganho de p.c. materno entre DG ₁₋₈ . Sem alterações no número implantações/ninhada. ≥200 mg/kg p.c./dia: ↓* sobrevivência embrionária (% viáveis/ninhada: 87%, 62%, 18%*, 23%* e 21%* nos respectivos grupos), ↓* medida do comprimento fetal total e da cabeça; ↓* nº somitos; ↑* anomalias dos membros posteriores (% membros alterados/total avaliado: 4%; 17%; 41%*; 100%*; 61%*); ↓* crescimento embrionário (conforme sistema de pontuação morfológica: 0,83; 1,85; 2,73*; 4,25* e 6,92*). =200 e 400 mg/kg p.c./dia: ↑* % anormalidade no neuróporo posterior (% alterados/total avaliado: 1%; 15%; 29%*; 87%*; 22%). Sem alterações no neuróporo anterior. =400 mg/kg p.c./dia: ↑* anomalias dos membros anteriores (% membros alterados/total avaliado: 1%; 4%; 12%; 79%*; 5%). <u>Protocolo 2 (avaliação no DG₂₀).</u>	DG ₁₁ escolhido devido ao maior nº informações sobre o desenvolvimento embrionário, em comparação ao DG ₉ , utilizado no estudo anterior (Cummings, 1990). Parâmetros de crescimento embrionário - avaliação morfológica de seis características embrionárias por um sistema de pontuação e idades de desenvolvimento: presença de batimento cardíaco (DG _{9,5}) e de circulação no saco vitelino (DG _{10-10,5}), grau de desenvolvimento do saco vitelino (DG _{9,5}) e alantóide (DG ₁₀), grau de rotação axial, fechamento dos tubos neurais anterior e posterior (DG _{10,5-11,5} ; neuróporo anterior fecha antes, no DG _{10,5-10,75}) e presença de brotos dos membros (anteriores no DG ₁₁ ; posteriores no DG _{11,5-12}) e de órgãos sensoriais DG _{10,5-10,75}). Resultados que devem ser avaliados com cautela: alterações no fechamento dos tubos neurais (especialmente o	ND

embrionário, de anomalias e medida do comprimento fetal total e da cabeça.	≥100 mg/kg p.c./dia: ↓* p.c. materno (no DG ₂₀ : -9 a -21% doctl; sem alteração durante o período de exposição); ↓* sobrevivência fetal (viáveis: 89%, 35%, 26%, 7%; 15%); ↑* ninhadas com reabsorção completa (0/10; 4/11*; 7/11*; 9/11* e 6/10*); ↓* peso fetal médio. Sem alterações no número implantações/ninhada.	posterior) e presença de brotos dos membros (especialmente os posteriores), pois espera-se que esses marcos do desenvolvimento se desenvolvam perto ou a partir do DG ₁₁ , em que ocorreu a eutanásia dos animais no protocolo 1.
- Protocolo 2: no DG ₂₀ Avaliação padrão da toxicidade para o desenvolvimento.		
- Protocolo 3		
n= 5-6 ♀ prenhes/grupo	Malformações e variações - fetos insuficientes para análise estatística satisfatória, mas foram observados os seguintes resultados dignos de nota, com base nos demais estudos com CBZ:	Número insuficiente de embriões ou fetos/ninhadas disponíveis para avaliação nos respectivos grupos nas maiores doses:
Dose: 600 mg/kg p.c./dia	Baixa incidência de malformações externas, viscerais e esqueléticas, tendo sido identificados fetos com microftalmia nas doses de 200 mg/kg p.c./dia (3/19f:1/4n) e 600 mg/kg p.c./dia (1/8f:1/3n) (na dose 400 mg/kg p.c./dia havia apenas 4 fetos, de 2 ninhadas, para análise).	- no DG ₁₁ : 67/9; 54/10; 17/10; 24/10; 18/10. - no DG ₂₀ :
Eutanásia e análise de parâmetros embrionários: DG ₂₀ .		Análises externa e visceral: 54/10; 20/7; 19/4. Análise esquelética= 57/10; 24/7; 19/4; 5/2; 10/4.
Grupos divididos pelos períodos de exposição:		
a) Controle: DG ₁₋₈ (veículo)	≥100 mg/kg p.c./dia: ↑* incidência de variações esqueléticas (redução de esternébrios, vértebras caudais, falanges e metacarpos ossificados).	
b) Exposição pré-implantação: DG ₁₋₃ (e veículo do DG ₄₋₈)		
c) Exposição pós-implantação: DG ₄₋₈ (e veículo do DG ₁₋₃).	=600 mg/kg p.c./dia: ↑* malformações esqueléticas (esternébrios divididos/deslocados e centro vertebral bilobado).	
	<u>Protocolo 3 (grupos com diferentes períodos de exposição e avaliação no DG₂₀).</u>	
	Exposição DG ₁₋₃ : sem alteração do nº fetos vivos ou nº reabsorções/ninhada.	
	Exposição DG ₄₋₈ : ↓* sobrevivência fetal (-75% doctl) e ↑* nº reabsorções/ninhada (18xctl).	

Legenda: * = alteração estatisticamente significativa; CBZ= Carbendazim; ctl= controle; DG= dia gestacional; f= fetos; n= ninhadas; ND= não determinado; NI = não informado; nsg= alteração não significativa estatisticamente; p.c.= peso corpóreo.

3.3 EXPOSIÇÃO ÚNICA OU REPETIDA EM DIAS ESPECÍFICOS DO PERÍODO DE ORGANOGÊNESE

a. Ratos

Foram identificadas no relatório da agência europeia (EFSA, 2009a) descrições muito resumidas de estudos não encontrados pela Anvisa, com inúmeras limitações, mas que testaram os efeitos da administração única ou repetida de CBZ por gavagem em dias específicos do período de organogênese de ratos, hamsters e coelhos (Minta e Biernacki, 1982; Vergieva 1975; Vergieva 1985). Esses estudos, descritos no Quadro 4, apesar de consistirem em evidência limitada, são interessantes porque dão indicativos dos impactos de administrações únicas ou repetidas de CBZ em dias específicos de susceptibilidade do embrião durante o período de organogênese.

Perdas pós-implantação

O estudo de Minta e Biernacki (1982) sugere que a administração única de CBZ a ratas prenhes no DG₁₀ causou aumento de reabsorções e/ou fetos mortos e diminuição do peso fetal em doses a partir de 30 mg/kg p.c., com perda quase completa de fetos na dose de 300 mg/kg p.c. Em hamsters, a administração no DG₈ causou aumento significativo de reabsorções em doses iguais ou superiores a 75 mg/kg p.c., apesar de na dose de 30 mg/kg p.c. já ter sido observado aumento sutil, considerado equívoco.

No mesmo sentido, os dados obtidos por Vergieva (1975 e 1985) sugerem redução do número de fetos vivos em doses iguais e superiores a 31,2 mg/kg p.c., administradas por gavagem no DG₁₃, com ausência de fetos vivos na dose de 250 mg/kg p.c.

Esses resultados vão ao encontro daqueles verificados após administração de CBZ via gavagem durante todo o período de organogênese, que apresentaram aumento significativo de reabsorções em doses iguais ou superiores a 35 mg/kg p.c./dia (Sitarek, 2001), com a maior dose testada sem alteração desse parâmetro sendo a de 25 mg/kg p.c./dia (Quintanilha et al, 1999), e ausência de fetos vivos na dose de 160 mg/kg p.c./dia (Sitarek, 2001).

Malformações

Ainda, nos estudos de Minta e Biernacki (1982) e de Vergieva (1975 e 1985) também foram identificados, após exposição única de ratas a doses a partir de 30 mg/kg p.c., em diferentes dias do período de organogênese (DG₇, DG₈, DG₉, DG₁₀, DG₁₁, DG₁₂ ou DG₁₃), fetos com malformações encefálicas, como: exencefalia (1 feto na dose de 30 mg/kg p.c.; DG₁₀) e hidrocefalia (1 feto em 30mg/kg p.c. e 2 fetos em 60 mg/kg p.c. no DG₁₀; e 20% dos fetos em 62,5 mg/kg p.c. no DG₁₃), além de malformações não especificadas do encéfalo (doses a partir de 250 mg/kg p.c. no DG₁₃). Em hamsters, Minta e Biernacki (1982) também relataram a identificação de fetos com exencefalia em doses a partir de 75 mg/kg p.c./dia administradas no DG₈.

Esses resultados também corroboram aqueles verificados após administração de CBZ a ratos via gavagem durante todo o período de organogênese, em que foram identificados fetos com malformações encefálicas externas e viscerais em doses a partir de 12,5 mg/kg p.c./dia: exencefalia (≥ 12,5 mg/kg p.c./dia), hidrocefalia e dilatação do ventrículo cerebral (≥ 25 mg/kg p.c./dia) e crânio abobadado (90 mg/kg p.c./dia).

Conforme já discutido anteriormente, a exencefalia é uma malformação muito rara, como demonstra o controle histórico de 1989 a 2011 que avaliou 5.404 fetos de ratos CD (SD) e não encontrou nenhum com essa malformação (Hood, 2012). Da mesma forma, a hidrocefalia também é uma malformação rara, apresentando uma incidência de 0,02% por ninhada, conforme controle histórico de 165 estudos de toxicidade para o desenvolvimento em ratos, realizados entre 1998 e 2010, quando foram encontrados apenas 10 fetos com hidrocefalia dos 59.744 examinados (Hood, 2012).

Com base em todas essas informações, é possível inferir que administrações únicas de CBZ a ratos por gavagem em dias específicos do período de organogênese já poderiam ser responsáveis pelo aumento de perdas pós-implantação e da incidência de fetos com graves malformações (especialmente encefálicas), o que gera ainda mais preocupação quanto à exposição a esse IA durante a gestação.

b. Coelhos

Apenas o estudo de Minta e Biernacki (1982) testou os efeitos da administração única ou repetida de CBZ por gavagem em dias específicos do período de organogênese de coelhos (Quadro 4). No relatório da agência europeia (EFSA, 2009a), foi identificada a descrição muito resumida desse estudo, não encontrado pela Anvisa, com inúmeras limitações muito importantes.

Perdas pós-implantação

Os resultados de Minta e Biernacki (1982) sugerem aumento de reabsorções e/ou mortes fetais de coelhos após a administração no DG₉ de doses únicas de CBZ a partir de 150 mg/kg p.c. (aproximadamente 50% dos fetos mortos ou reabsorvidos, chegando a quase 100% na dose de 300 mg/kg p.c.) ou de três doses a partir de 60 mg/kg p.c. entre os dias DG₈₋₁₂ (com aproximadamente 100% dos fetos mortos ou reabsorvidos na dose de 150 mg/kg p.c.).

Esses resultados vão ao encontro daqueles verificados após administração de CBZ via gavagem a coelhos durante todo o período de organogênese, que mostraram aumento significativo de reabsorções na dose de 125 mg/kg p.c./dia (Christian, 1985), em que houve reabsorção completa de sete das 18 ninhadas disponíveis ao final do estudo.

Malformações

Minta e Biernacki (1982) relataram também aumento da incidência de costelas fundidas após a administração de três doses a partir de 60 mg/kg p.c. entre os dias DG₈₋₁₂, o que corrobora os resultados dos estudos com administração de CBZ a coelhos via gavagem durante todo o período de organogênese, em que foram identificados fetos com malformações esqueléticas, incluindo costelas fundidas, em doses a partir de 80 mg/kg p.c./dia (dose anterior sem malformação foi de 20 mg/kg p.c./dia).

Com base em todas essas informações, é possível supor que administrações únicas de CBZ a coelhos por gavagem em dias específicos do período de organogênese são responsáveis pelo aumento de perdas pós-implantação e da incidência de fetos com malformações esqueléticas.

Quadro 4. Avaliação do potencial embriofetotóxico do ingrediente ativo Carbendazim em roedores (ratos e hamsters) e coelhos após exposição única por gavagem em dias específicos do período de organogênese.				
Referência	Protocolo	Resultados	Limitações e considerações relevantes	Conclusão
Roedores				
Minta e Biernacki (1982) Artigo não encontrado. Análise foi baseada na descrição do estudo pela EFSA (2009a).	Pureza: 99% CBZ Linhagem: Ratos Wistar Delineamento: n = 7 a 13 ♀ prenhes/grupo Via: oral (gavagem) Doses: 0, 15, 30, 60, 150 ou 300 mg/kg p.c. Veículo: 10% goma arábica Período: administração única no DG ₁₀ Eutanásia e análise de parâmetros maternos e embrionários: DG ₂₀	Perdas pós-implantação: =30 e 60 mg/kg p.c.: ↑ leve da % de reabsorções e/ou fetos mortos. =150 mg/kg p.c./dia: ↑ reabsorções e/ou fetos mortos (aproximadamente 1/3), com consequente ↓ n° fetos vivos por ninhada. =300 mg/kg/dia: perda quase completa de fetos, o que impediu a análise dos demais parâmetros fetais nessa dose. Atraso no desenvolvimento fetal: =30 e 150 mg/kg p.c.: ↓ * peso médio fetal (mas não na dose de 60 mg/kg/dia). ≥30 mg/kg p.c.: ↑ % fetos pequenos, sem clara relação dose-resposta. Não houve aumento significativo ou dose-resposta na incidência de malformações, mas foi observada exencefalia em 1 feto na dose de 30mg/kg/dia e hidrocefalia em 1 feto na dose de 30mg/kg/dia e em 2 fetos na dose de 60mg/kg/dia.	Análise baseada na descrição muito resumida do estudo no relatório da agência regulatória, sem detalhamento de diversos parâmetros e sem dados brutos. Estudo apenas informativo limitado. Número insuficiente de fêmeas prenhes. Sem informações como racional para a escolha dos períodos específicos de exposição, número de fetos/filhotes disponíveis para as análises, identificação dos parâmetros avaliados, incidência dos efeitos, sinais de toxicidade materna etc.	ND
	Pureza: 99% CBZ Linhagem: Golden hamsters Delineamento: n= 8 a 16 ♀ prenhes/grupo Via: oral (gavagem) Doses: 0, 15, 30, 75 e 150 mg/kg p.c. Veículo: 10% goma arábica Período: Administração única no DG ₈ Eutanásia e análise de parâmetros maternos e embrionários: DG ₁₄	30 mg/kg p.c.: ↑ sutil e equívoco na % de reabsorções/fetos mortos. ≥75 mg/kg p.c.: ↑ * reabsorções (31% e 45%); ↑ * malformações, incluindo exencefalia.	Administração única em dias específicos da gestação que, apesar de não estar adequada à diretriz, auxilia no entendimento do impacto da exposição única à ST num período específico.	ND
Vergieva 1975 Estudo/artigo não encontrado. Análise foi baseada na descrição do estudo pela EFSA (2009a).	Pureza: NI Linhagem: ratos albinos sem identificação da linhagem n= NI Via: oral (gavagem) Protocolo 1 – Avaliação pré-natal:	Protocolo 1 – impacto no desenvolvimento pré-natal: ≥ 250 mg/kg p.c.; exposição única nos DG ₇ , DG ₉ , DG ₁₁ ou DG ₁₂ : marcantes perdas pré ou pós-implantação. Exposição única no DG ₁₁ : ausência de fetos vivos. ≥ 250 mg/kg p.c.; exposição única no DG ₁₃ : presença de fetos vivos, mas	Análise baseada na descrição muito resumida do estudo no relatório da agência regulatória, sem detalhamento de diversos parâmetros essenciais e sem dados brutos. Estudo apenas informativo limitado. Sem informações como pureza do Carbendazim, linhagem dos ratos, número de fêmeas prenhes utilizadas, racional para a escolha dos períodos de exposição, número de fetos/filhotes disponíveis para as análises, identificação dos parâmetros avaliados,	ND

	Doses: 250, 1000 e 5000 mg/kg p.c. Exposição: administração única nos DG₇, DG₉, DG₁₁, DG₁₂ ou DG₁₃ Protocolo 2 – Avaliação pós-natal: Doses: 15,6 a 125 mg/kg p.c. Exposição: administração única no DG₁₃	todos apresentavam anomalias, especialmente do encéfalo e membros. Protocolo 2 – impacto pós natal: >15,6 mg/kg p.c. até 125 mg/kg (doses não especificadas nesse intervalo); administração única no DG₁₃: ↑ natimortos e ocorrência de meningocele.	incidência dos efeitos, sinais de toxicidade materna etc. Administração única em dias específicos da gestação que, apesar de não estar adequada à diretriz, auxilia no entendimento do impacto da exposição única à substância-teste num período específico.	
Vergieva, 1985 Estudo/artigo não encontrado. Análise foi baseada na descrição do estudo pela EFSA (2009a).	Pureza: NI Linhagem: ratos albinos sem identificação da linhagem n= NI Via: oral (gavagem) Doses: 0; 15,6; 31,2 e 62,5 mg/kg p.c. Exposição: administração única no DG₁₃	Objetivo: analisar os possíveis efeitos teratogênicos comportamentais do Carbendazim. ≥31,2 mg/kg p.c.: ↓ n° fetos vivos. =62,5 mg/kg p.c.: 20 % dos fetos com hidrocefalia. ≥31,2 e 62,5 mg/kg p.c.: anormalidades comportamentais (não foram especificadas quais; dados equívocos em 15,6 mg/kg p.c.).		ND
Coelhos				
Minta e Biernacki, 1982 Artigo não encontrado. Análise foi baseada na descrição do estudo pela EFSA (2009a).	Pureza: 99% CBZ Linhagem: Coelhos brancos da Nova Zelândia Delineamento: n=3 a 9 ♀ prenhes/grupo Via: oral (gavagem) Veículo: 10% goma arábica Doses e períodos de exposição: a) 10mg/kg; DG₁₀+DG₁₃ +DG₁₈. b) 0; 10; 60; ou 150 mg/kg; DG₈+DG₁₀ +DG₁₂. c) 150 ou 300 mg/kg; DG₉. Eutanásia e análise de parâmetros maternos e embrionários: DG₂₈	=10 mg/kg p.c. (dosagem 3 dias: DG₁₀+DG₁₃ +DG₁₈): ↑ * % de fetos pequenos. ≥60 mg/kg p.c. (dosagem por 3 dias): ↑ incidência fetos mortos e reabsorvidos. =150 mg/kg p.c. (dose única): aproximadamente 50% dos fetos mortos ou reabsorvidos. =150 mg/kg p.c. (dosagem por 3 dias) e 300 mg/kg (dose única): aproximadamente 100% dos fetos mortos ou reabsorvidos. =60 e 150 mg/kg p.c.: ↑ incidência costelas fundidas (em 300 mg/kg não havia fetos para avaliação).	Análise baseada na descrição muito resumida do estudo no relatório da agência regulatória, sem detalhamento de diversos parâmetros e sem dados brutos. Estudo apenas informativo limitado. Número insuficiente fêmeas prenhes. Sem informações como racional para a escolha dos períodos específicos de exposição, número de fetos/filhotes disponíveis para as análises, identificação dos parâmetros avaliados, incidência dos efeitos, sinais de toxicidade materna etc. Administração única ou repetida em dias específicos da gestação que, apesar de não estar adequada à diretriz, auxilia no entendimento do impacto da exposição única à substância-teste num período específico.	ND
Legenda: * = alteração estatisticamente significativa; CBZ= Carbendazim; ctl= controle; DG= dia gestacional; f= fetos; n= ninhadas; ND= não determinado; NI = não informado; nsg= alteração não significativa estatisticamente; ST= substância-teste.				

3.4 EXPOSIÇÃO DURANTE OS PERÍODOS DE GESTAÇÃO E LACTAÇÃO

Foram analisados dois estudos que administraram o CBZ a ratos via dieta durante os períodos de gestação e lactação (com a geração parental tendo sido exposta antes do acasalamento), com avaliação do desenvolvimento pós-natal: Til et al (1976) e o estudo de uma geração estendida (EOGRS, 2014; autor não informado) realizado mais recentemente e descrito por outras agências. Além disso, há um estudo descrito muito resumidamente pela EFSA (Somlyay e Varnagy, 1992), que não apresenta informações suficientes para qualquer conclusão. Foi identificado também um artigo da literatura referente a um estudo de três gerações realizado via gavagem em ratos e em hamsters (Gray et al, 1990).

O período de exposição utilizado nesses estudos, que se estende da gestação até o desmame (período não coberto pelos estudos com administração apenas durante a organogênese), é relevante pois o desenvolvimento de vários órgãos, especialmente do cérebro, continua após o DG₁₅ (OECD, 2008).

Assim, alterações funcionais no sistema nervoso são melhor investigadas nesse tipo de estudo.

No entanto, nenhum desses estudos foi considerado adequado, conforme análise constante no Quadro 5.

O estudo de Til et al (1976) apresenta inúmeras limitações: não foram registrados os dados de consumo alimentar dos animais, essencial em um estudo dietético para se estimar as doses a que eles foram efetivamente expostos; não foi informada a incidência das malformações identificadas em fetos e ninhadas para cada grupo; além de não terem sido avaliados na prole parâmetros funcionais imprescindíveis para esse tipo de estudo, como atividade motora, função sensorial e ontogenia de reflexos.

Em relação ao EOGRS (2014), apesar de bem recente, há descrições discrepantes entre as duas agências que relataram esse estudo, ao qual a Anvisa não teve acesso. Além disso, diversos parâmetros e resultados não foram detalhados satisfatoriamente e outros parâmetros – como aprendizado, memória e ontogênese comportamental – não foram incluídos na análise.

Da mesma forma, o único estudo via gavagem durante esse período de exposição (Gray et al, 1990) não avaliou parâmetros funcionais. No entanto, a principal limitação desse estudo foi a não utilização da ninhada como unidade experimental, além do número insuficiente de animais parentais.

Perdas pós-implantação

Somente no estudo via gavagem, de Gray et al (1990), foi relatado aumento significativo de perdas pós-implantação na prole F1, na dose de 400 mg/kg p.c./dia.

Atraso no desenvolvimento

Quanto à toxicidade sistêmica, as duas agências que avaliaram o EOGRTS (2014) descreveram que, após exposição dietética, houve redução no peso corpóreo de filhotes machos F1 a partir do DPN₁₄ no grupo de maior dose (107 mg/kg p.c./dia). No entanto, a PMRA (2019) considerou que essa redução já ocorreu na dose intermediária, de 53 mg/kg p.c./dia, e que na maior dose ela persistiu até a idade adulta (DPN₇₀, quando os animais foram eutanasiados). Por outro lado, a PMRA (2019) descreveu que não foi observado efeito no peso corporal dos filhotes na segunda geração, enquanto a USEPA (2020) considerou que houve redução significativa do peso corporal das fêmeas da segunda geração dos DPN₂₄₋₂₈.

No estudo via gavagem (Gray et al,1990), foi relatada redução do peso corpóreo da prole F1 no DPN₁ na dose de 200 mg/kg p.c./dia.

Malformações

Gray et al (1990) relataram aumento de ninhadas com malformações como hidrocefalia e cauda retorcida em doses iguais ou superiores a 100 mg/kg p.c./dia, sem informar o número de filhotes e ninhadas com cada tipo de malformação.

Neurotoxicidade para o desenvolvimento

O resultado mais relevante do EOGRTS (2014) foi o relativo à avaliação da neurotoxicidade para o desenvolvimento. A USEPA (2020) e a PMRA (2019) descreveram que não houve alterações nos parâmetros da bateria de observação funcional, atividade motora e locomotora e reflexo de sobressalto auditivo.

No entanto, em relação à análise morfométrica cerebral, a PMRA (2019) considerou que houve alterações na prole F1 avaliada na idade adulta (DPN₇₀) na dose de 107 mg/kg p.c./dia: redução significativa na espessura do núcleo caudado e do putâmen em machos e redução significativa do córtex parietal e do peso cerebral em fêmeas. Já a USEPA (2020) considerou que as diferenças estatisticamente significativas identificadas na análise morfométrica (não detalhou quais) foram de pequena magnitude e não mostraram dose-resposta e, por isso, foram consideradas não relacionadas ao tratamento. Esse foi o único estudo multigeracional que realizou análise morfométrica cerebral.

Ainda, devido à ausência de testes para avaliação de aprendizagem e memória, a PMRA (2019) considerou que esse estudo possui incertezas relacionadas à potencial sensibilidade do organismo em desenvolvimento e, no cálculo dos parâmetros de referência para avaliação do risco dietético agudo e crônico de mulheres em idade reprodutiva, utilizou fator de extrapolação adicional de 10 vezes para compensar essas incertezas. Em contrapartida, a USEPA (2020) considerou o estudo sem limitações e como suficientemente protetor dos efeitos para o desenvolvimento verificados nos estudos via gavagem em ratos, porque nenhum efeito de desenvolvimento foi observado com a exposição dietética.

No entanto, é importante destacar que avaliações histopatológicas quantitativas (isto é, dados de morfometria) são desfechos sensíveis de efeito neurotoxicológico que não podem ser previstos por alterações na histopatologia qualitativa, peso cerebral ou peso corporal (OECD, 2008). E, neste estudo com o CBZ, já puderam ser observadas alterações morfométricas estatisticamente significativas em mais de uma região cerebral.

Assim, não é possível descartar a relevância desses achados morfométricos, especialmente porque o CBZ teve efeitos adversos evidentes no desenvolvimento do sistema nervoso central de ratos, quando administrado por gavagem durante todo o período de organogênese ou mesmo por apenas um dia dentro desse período. Esses efeitos foram caracterizados por malformações do encéfalo, como exencefalia e hidrocefalia/dilatação de ventrículos cerebrais, que foram observadas em inúmeros estudos, em doses a partir de 12,5 mg/kg p.c./dia. Também foram observadas alterações esqueléticas, como crânio abobadado e ossificação incompleta dos ossos do crânio, conforme descrito anteriormente neste parecer.

Esses efeitos podem ser explicados pela ação já conhecida do CBZ, a inibição da polimerização de β -tubulina, que compõe os microtúbulos, estruturas altamente dinâmicas do citoesqueleto que desempenham funções diversas e importantes para as células. No desenvolvimento do sistema nervoso central, a tubulina é expressa principalmente nos neurônios pós-mitóticos durante o desenvolvimento cortical, com um padrão de expressão espacial e temporal específico (Romaniello et al, 2015). Sabe-se que os microtúbulos estão envolvidos em vários processos relacionados ao adequado funcionamento neuronal, incluindo polarização, plasticidade sináptica, formação de circuitos, transporte intracelular, sinalização, migração e diferenciação de neurônios (Pagnamenta et al, 2019). Eles formam arranjos paralelos densos (feixes) e atuam no crescimento e manutenção dos neuritos, protrusões citoplasmáticas alongadas e fechadas, formadas por neurônios durante o desenvolvimento do sistema nervoso do embrião. Os neuritos crescem em direção a outras regiões do sistema nervoso ou outras estruturas (como glândulas ou músculos) com as quais os neurônios formarão sinapses. A maioria dos neuritos acaba se tornando axônios funcionais e, portanto, a formação de neuritos é um processo crucial no estabelecimento das conexões físicas, por meio das quais os impulsos nervosos são transmitidos durante o desenvolvimento inicial do cérebro (APVMA, 2009).

Além disso, os microtúbulos são essenciais na função sináptica (Conde, 2009), tendo sido demonstrado que os eventos de polimerização transitória dos microtúbulos localizados em espinhas dendríticas, por exemplo, estão envolvidos na plasticidade sináptica em culturas de neurônios (Dent, 2017). Dent (2017) cita a existência de estudos recentes *in vitro* e *in vivo* que relacionam o comportamento dinâmico dos microtúbulos ao desempenho de importantes funções cerebrais. Alterações na dinâmica dos microtúbulos são capazes de afetar processos celulares relacionados à memória e ao aprendizado, como a potenciação de longo prazo (longterm potentiation - LTP), um protocolo *ex vivo* de estimulação que mimetiza a formação da memória. Demonstrou-se que a inibição da polimerização de microtúbulos com baixas concentrações de nocodazol anula a potenciação de longo prazo, o que sugere que os microtúbulos podem desempenhar um papel fundamental na formação ou retenção da memória. Isso também foi demonstrado *in vivo*, com o uso de camundongos geneticamente modificados, nos quais a desativação da proteína *stathmin* – cuja ligação à tubulina inibe a polimerização de microtúbulos – resultou em déficits na potenciação de longo prazo, além das reações inatas e aprendidas de medo (Dent, 2017).

Nesse sentido, nos últimos anos, mutações nos genes da tubulina, especialmente nos isótipos da β -tubulina, têm sido associadas a diversas desordens do neurodesenvolvimento e neurodegenerativas (Chakraborti et al, 2016). Entre as malformações cerebrais estão dilatação de ventrículos cerebrais, displasia/dismorfia dos gânglios da base (Chakraborti et al, 2016), lissencefalia (células não migram para o córtex do cérebro em desenvolvimento), fusão dos núcleos da base (caudado e putâmen), entre outras (Romaniello et al, 2015). A depender do subtipo de tubulina com a mutação, os desfechos incluíram perda gestacional (em diferentes semanas do desenvolvimento), atraso no desenvolvimento, autismo, incapacidade intelectual, convulsões, alterações oculares etc. Além dos efeitos no desenvolvimento, mutações nos genes da tubulina têm sido associadas a desordens neurodegenerativas, que são difíceis de avaliar em modelos roedores (Chakraborti et al, 2016).

Desta forma, as alterações morfométricas observadas no núcleo caudado, no putâmen e no córtex parietal no EOGRTS podem ser consideradas condizentes com as funções já conhecidas da tubulina no neurodesenvolvimento.

O núcleo caudado e o putâmen são dois núcleos da base que formam o estriado e que participam, em conjunto com o córtex, por meio uma rede complexa de gânglios corticobasais, do desenvolvimento e realização de comportamentos complexos (Haber, 2016). Todas as regiões do córtex cerebral projetam topograficamente para o estriado e conexões corticoestriatais desempenham um papel central no desenvolvimento de comportamentos direcionados a objetivos apropriados, incluindo motivação e cognição para desenvolver ações para obter um resultado específico. Regiões distintas do estriado foram associadas a diferentes funções: o estriado ventral com recompensa; o núcleo caudado com cognição; e o putâmen com controle motor. No entanto, as conexões corticoestriatais são mais complexas, e as interações entre territórios funcionais são extensas (Haber, 2016). Regiões dentro de cada um dos núcleos dos gânglios da base estão relacionadas não apenas a funções sensoriais motoras, mas também límbicas e cognitivas. O estriado recebe ainda projeções sobrepostas de áreas parietais associadas à função somatossensorial (Haber, 2016). Doenças dos gânglios da base não estão apenas ligadas a distúrbios neurológicos, mas também a doenças psiquiátricas, incluindo esquizofrenia, farmacodependência, depressão e transtorno obsessivo-compulsivo (Haber, 2016). Assim, considerando as inúmeras funções reguladas por essas estruturas cerebrais e a ausência de testes para avaliar a ontogênese comportamental e a aprendizagem e memória nos estudos realizados com o CBZ, não é possível descartar os efeitos na morfometria cerebral observados após a exposição a esse IA. Ainda, existe uma compreensão apenas limitada da neuroquímica ou dos locais neuroanatômicos de controle dos diferentes tipos de comportamentos complexos que podem ser afetados por agentes neurotóxicos. E isso é ainda mais preocupante quando se sabe que, apesar do neurodesenvolvimento de roedores e seres humanos ser similar, o neurodesenvolvimento humano é mais demorado e complicado. Em humanos, o neocórtex representa 90% da superfície cortical, sendo a região cerebral que sofreu a maior expansão evolucionária em comparação a roedores e primatas (Prem et al,

2020). Enquanto atenção, desenvolvimento da linguagem ou dificuldades de aprendizagem, como dificuldades de leitura, são parâmetros sensíveis para avaliação de crianças expostas a eventos adversos pré-natais, comportamentos análogos de roedores não são facilmente mensuráveis, e os sistemas de controle subjacentes não estão bem compreendidos e são muito provavelmente bastante difusos. E, embora esses efeitos possam ser mais sutis do que malformações morfológicas acentuadas, eles podem ser tão ou mais devastadores para a criança. Por exemplo, a exposição a drogas psicoativas no início da vida pode produzir alterações de longo prazo no comportamento de um indivíduo, resultantes de mudanças sutis na ultraestrutura do sistema nervoso, mesmo na ausência de malformações estruturais acentuadas (Riley e Vorhees, 1986).

Quadro 5. Avaliação do desenvolvimento pós-natal de ratos ou hamsters após administração via gavagem ou dietética de Carbendazim à geração parental (antes do acasalamento, durante o acasalamento e às mães durante a gestação e lactação) e à prole (via placenta durante a gestação e via leite durante a lactação).				
Referência	Protocolo	Resultados	Limitações e considerações relevantes	Conclusão
Gavagem				
Gray et al., 1990 Artigo da literatura.	Pureza: ≥95% CBZ Linhagem: Ratos Long-Evans Via: oral (gavagem) Veículo: óleo de milho Delineamento: estudo de 3 gerações Geração parental (P0): n = 7-11/sexo/dose acasalados Doses: 0, 50, 100, 200 ou 400 mg/kg p.c./dia Período de exposição: desde o desmame (DL₂₁), durante o acasalamento e a gestação. Gerações Filiais (F1) Doses: 0 e 100 mg/kg p.c./dia Período de exposição: durante a gestação e lactação (via placenta e leite). F1: n= 15-16/sexo/grupo (mas havia apenas 7 ninhadas com filhotes na geração P). Quatro acasalamentos sucessivos para gerar as proles F2A, F2B, F2C e F2D.	<u>Parental</u> ≥ 200 mg/kg p.c./dia: ↓ dose-dependente de ganho p.c. materno, ↓ * n° ♀ prenhes (11/11, 8/8, 8/8, 3/7* e 4/7* nos respectivos grupos), resultante do acasalamento com machos com severa atrofia dos testículos induzida pelo CBZ. Demais parâmetros (ex: peso de órgãos e desenvolvimento sexual) discutidos no parecer de toxicidade reprodutiva. <u>Prole F1</u> = 200 mg/kg p.c./dia: ↓ * tamanho ninhada; ↓ * peso corpóreo no DPN₁. =400 mg/kg p.c./dia: ↑ * perdas pós-implantação (reabsorção completa de todas as ninhadas: 4/4). ≥100 mg/kg p.c./dia: ↑ ninhadas com malformações (0/9, 0/8, 2/7, 1/3; na dose de 400 mg/kg p.c./dia sem ninhadas para avaliação), como hidrocefalia e cauda retorcida. <u>Prole F2</u> Sem alterações significativas.	Neste quadro está descrita apenas a parte do estudo e os parâmetros relevantes para a avaliação pós-natal. Limitações importantes: Número muito pequeno de fêmeas prenhes da geração P0 para avaliação (3 a 11). Na geração F1 parece terem sido utilizados mais de uma fêmea e macho por ninhada para acasalamento e geração da prole F2 (ninhada não foi utilizado como unidade experimental). Ausência de informações essenciais como descrição do número de filhotes e ninhadas com cada tipo de malformação. Parâmetros da prole F1: pesagem apenas em DL₁, 15 e 21 (recomendado: DL₀, 4, 7, 14 e 21). Parâmetros das proles F2: contados no DPN₁. Ausência de análise de parâmetros funcionais imprescindíveis, previstos na diretriz deste tipo de teste: atividade motora, função sensorial e ontogenia de reflexos.	ND
	Pureza: 98,1% CBZ Linhagem: hamsters sírios Delineamento: n = 12-15/sexo Via: oral (gavagem) Doses: 0 ou 400 mg/kg p.c./dia Veículo: óleo de milho Período de exposição: Geração parental (P0): do desmame (DL₂₂) ao acasalamento (♂) ou parto (♀). Geração filial (F1): Período: durante a gestação e lactação (via placenta e leite). Eutanásia: na idade adulta.	<u>Parental</u> Sem sinais de toxicidade materna. Demais parâmetros (ex: peso de órgãos e desenvolvimento sexual) discutidos no parecer de toxicidade reprodutiva. <u>Prole</u> = 400 mg/kg p.c./dia: ↓ * peso corpóreo no DPN₁ e DPN₅ (-15% em relação ao ctl). Demais parâmetros (ex: peso de órgãos e desenvolvimento sexual) discutidos no parecer de toxicidade reprodutiva.	Neste quadro está descrita apenas a parte do estudo e os parâmetros relevantes para a avaliação pós-natal. Apenas uma dose testada. Prole contada e pesada apenas nos DPN₁, 5 e 21. Não informado se a prole foi avaliada ao nascimento para a presença de malformações. Ausência de análise de parâmetros funcionais imprescindíveis, previstos na diretriz deste tipo de teste: atividade motora, função sensorial e ontogenia de reflexos.	ND
Dieta				
Til et al., 1976	Pureza: 99% CBZ	<u>Parental</u>	Neste quadro está descrita apenas a parte do estudo relativa à avaliação pós-	ND

Estudo regulatório protocolado na Anvisa.	Linhagem: Ratos Wistar albinos; Delineamento: Estudo de 3 gerações. Via: oral (dieta) Doses: 0, 150, 300 ou 2000 ppm; correspondentes a 0, 7,5, 15 ou 100 mg/kg p.c./dia (estimadas). Gerações parentais P, F1b e F2b: n = 10♂ e 20♀/grupo Parâmetros avaliados: sinais clínicos, mortalidade, peso corpóreo e fertilidade. Gerações filiais F1 (a; b), F2 (a; b) e F3 (a; b): n = 5♂ e 10♀/grupo em cada coorte Parâmetros avaliados: tamanho da ninhada no nascimento, razão sexual, peso corpóreo (DL₁, 10 e 20), mortalidade (ao nascer, no DL₁₀ e 20), malformações ao nascer e coeficiente de reabsorção.	Ausência de toxicidade materna. Na maior dose houve morte de 1♀ prenhe na geração P e 2♀ prenhes na geração F1. <u>Prole</u> - ↑*% mortalidade ao nascer em 7,5 mg/kg p.c./dia (F3a e F3b) e em 15 mg/kg p.c./dia (F2a e F2b); e no DL₁₀ em 15 mg/kg p.c./dia (F1a) e F1b. Considerados não relacionados à exposição. - Sem alterações no peso ao nascer e com alterações não relevantes nos DL₁₀ e 20. - Sem diferença estatística na % de malformações e no coeficiente de absorção. - Malformações externas na prole: relatados 10 casos de sindactilia e 8 de hidrocefalia ao nascimento, com um maior número observado no grupo controle (sem informações sobre o nº de fetos e ninhadas afetados em cada dose e geração).	natal dos parâmetros de desenvolvimento. Dados brutos não disponibilizados para análise, mas apenas o relatório do estudo, que era bastante resumido, sem detalhamento de diversos parâmetros. Diversas limitações importantes, que impedem uma conclusão sobre o estudo: Intervalo entre doses (6,7x) superior ao recomendado em estudos dietéticos (máximo 3x). Não foram registrados dados de consumo alimentar (exceto na geração F3b), com a ingestão de CBZ em mg/kg p.c. /dia sendo calculada por meio de um fator de 0,05 (200 g p.c./10 g consumo alimentar/dia); sem dados analíticos disponíveis sobre a confirmação dos níveis dietéticos de CBZ. Por isso as doses em mg/kg estimadas em cada grupo e cada geração podem estar incorretas na prática. Registro quinzenal do p.c. dos animais parentais a partir da 2ª semana, quando o recomendado é o registro semanal durante todo o período de exposição. Pesagem da prole nos DPN₁, 10 e 20 quando o recomendado é nos DPN₀, 4, 7, 14, 21. Ausência de informações essenciais como descrição do nº de filhotes e ninhadas com cada tipo de malformação. Ausência de análise de parâmetros funcionais imprescindíveis, previstos na diretriz: atividade motora, função sensorial e ontogenia de reflexos.	
Estudo de uma geração estendida (EOGRS; 2014) Estudo regulatório não protocolado na Anvisa. Nossa análise foi baseada nas descrições do estudo pela USEPA (2020) e PMRA (2019).	Pureza: 99,5% CBZ Linhagem: Ratos Wistar Hannover [CrI:WI (HAN)] Delineamento: Estudo de uma geração estendida. Via: oral (dieta) Doses: 0, 250, 1000 ou 2000 ppm; correspondentes a: ♂= 0; 13,9; 53,2 ou 106,7 mg/kg p.c./dia ♀= 0; 16,2; 67,6 ou 136,8 mg/kg p.c./dia Geração P: n = 30/ sexo/grupo Exposição: ♀ e ♂ por 4 semanas antes do acasalamento e por 14 dias de acasalamento, com as fêmeas prenhes expostas até o desmame da prole F1 no DL₂₂ (♀). Geração F1: exposição durante a gestação via placenta e via leite materno até o DPN₂₁, quando os animais foram designados a diferentes coortes para avaliação de parâmetros específicos,	<u>Toxicidade parental (P e F1 adultos).</u> Descrição USEPA (2020): Ausência de mortalidade, alterações clínicas, no p.c. ou ganho de p.c., no consumo alimentar, macroscopia e parâmetros hematológicos, bioquímicos ou de urinalise. ≥53,2/67,6 mg/kg p.c./dia: alterações em níveis hormonais, peso e histopatologia de alguns órgãos (tireoide e testículos), descritas no parecer de toxicidade reprodutiva. Descrição PRMA (2019): ≥53,2/67,6 mg/kg p.c./dia: evidências de toxicidade sistêmica (não especificadas). <u>Prole - avaliação da toxicidade sistêmica</u> Descrição USEPA (2020): =106,7/136,8 mg/kg p.c./dia: - ↑ nº ninhadas F1 com filhotes mortos (22% das ninhadas, com apenas 3% no controle); durante o período de lactação 15 filhotes F1 foram encontrados mortos (10 deles de uma mesma ninhada, que teve perda completa), com apenas 1 no grupo controle. Na geração F2 não foi observado aumento de filhotes mortos. No entanto, a USEPA concluiu que não houve alterações no tamanho da ninhada viva e na viabilidade dos filhotes, pois considerou o aumento de ninhadas com filhotes mortos incidental, uma vez que a maioria dos filhotes mortos eram de uma ninhada e um aumento de filhotes mortos não foi observado na geração F2. - filhotes F1 ♂: ↓* ganho de p.c. do DPN₄₋₁₈ (10%), com correspondente ↓* p.c. do DPN₁₄₋₂₈ (6 a 10% do controle). - filhotes F2 ♀: ↓* p.c. do DPN₂₄₋₂₈ (8 a 11% do controle). Descrição PRMA (2019): ≥53,2/67,6 mg/kg p.c./dia: - filhotes F1 ♂: ↓ peso corpóreo do DPN₁₄ em diante, que foi mais pronunciada logo após o desmame. Em 106,7/136,8 mg/kg p.c./dia a redução do p.c. persistiu até o final do estudo (DPN₇₀).	Neste quadro está descrita apenas a parte do estudo relativa à avaliação pós-natal dos parâmetros de desenvolvimento. Análise baseada na descrição muito resumida do estudo nos relatórios das agências regulatórias, sem detalhamento de diversos parâmetros e resultados e sem dados brutos. Ainda, as descrições dos resultados desse mesmo estudo foram conflitantes entre as agências americana e canadense, o que impossibilita qualquer conclusão definitiva da Anvisa com base apenas nessas informações. Não foram feitos ajustes de dose na dieta durante nenhuma fase de vida no curso do estudo. Doses em mg/kg baseadas na dose média diária pré-acasalamento na geração P. Na análise da toxicidade para o neurodesenvolvimento não foi incluída análise de parâmetros de aprendizado e memória (DPN₂₅₊₂ e idade adulta), nem ontogênese comportamental; o teste de sobressalto auditivo foi feito somente no animal adulto, quando deveria também ser realizado na puberdade.	ND

	conforme descrição abaixo. Todas as coortes: avaliação de parâmetros da ninhada e peso de filhotes até o desmame. a. Coorte para avaliação da neurotoxicidade para o desenvolvimento da prole na idade adulta: n=10/sexo/dose DPN₅₂₋₆₆: análise comportamental (bateria de observação funcional, atividade motora e resposta de sobressalto acústico). DPN₇₀: perfusão para análise neuropatológica do sistema nervoso central e periférico e da morfometria cerebral. b. Coorte para avaliação da neurotoxicidade para o desenvolvimento da prole no desmame: n=12/sexo/dose DPN₂₁: medições cerebrais, perfusão para análise neuropatológica do sistema nervoso central e periférico e da morfometria cerebral. Geração F2: avaliação apenas de parâmetros da ninhada e peso de filhotes até o desmame.	Não foi observado efeito no peso corporal dos filhotes na segunda geração. <u>Prole – avaliação da neurotoxicidade para o desenvolvimento</u> Descrição USEPA (2020): Sem alterações nos sinais clínicos, análise oftalmológica, parâmetros da bateria de observação funcional, atividade motora e locomotora, reflexo de sobressalto auditivo, medições cerebrais macroscópicas e microscópicas, análise neuropatológica. Considerou que as diferenças estatisticamente significativas identificadas na análise morfométrica (não detalhou quais) foram de pequena magnitude e não mostraram dose-resposta e, por isso, foram consideradas não relacionadas ao tratamento. USEPA concluiu que não houve evidência de neurotoxicidade para o desenvolvimento nesse estudo. Descrição PRMA (2019): =106,7/136,8 mg/kg p.c./dia: Alterações na morfometria cerebral (F1 no DPN₇₀): ↓* espessura dos núcleos caudado e putâmen em ♂; ↓* córtex parietal e peso cerebral em ♀. PMRA considerou que esse estudo possui incertezas relacionadas à potencial sensibilidade do organismo em desenvolvimento devido à ausência de testes para avaliação de aprendizagem e memória. Assim, no cálculo dos parâmetros de referência para avaliação do risco dietético agudo e crônico de mulheres em idade reprodutiva, utilizou fator de extrapolação adicional de 10x para compensar essas incertezas.		
Somlyay e Varnagy, 1992 Estudo regulatório não protocolado na Anvisa. Nossa análise foi baseada na descrição pela EFSA (2009^a).	Pureza: NI (produto técnico) Linhagem: Ratos Wistar n= NI Delineamento: Estudo de duas gerações. Via: oral (dieta) Doses: 0, 50, 200 ou 600 ppm; correspondentes a: Geração P = 0; 2,3; 9 ou 27,4 mg/kg p.c./dia Geração F = 0; 2,8; 10,7 ou 31,2 mg/kg p.c./dia Período de exposição e eutanásia: NI	<u>Parental</u> Sem sinais de toxicidade. <u>Prole</u> Sem sinais de toxicidade ou teratogenicidade.	Análise baseada na descrição muito resumida do estudo no relatório da agência regulatória, sem detalhamento de diversos parâmetros essenciais e sem dados brutos. Estudo apenas sugestivo, que fornece evidência muitíssimo limitada. Sem informações como pureza do Carbendazim, número de fêmeas prenhes utilizadas, dia da eutanásia, número de filhotes disponíveis para as análises, identificação dos parâmetros avaliados, incidência dos efeitos etc.	ND
Legenda: * = alteração estatisticamente significativa; CBZ= Carbendazim; ctl= controle; DG= dia gestacional; f= fetos; n= ninhadas; ND= não determinado; NI = não informado; nsg= alteração não significativa estatisticamente; p.c.= peso corpóreo.				

4. DISCUSSÃO

4.1 Comparação dos efeitos do CBZ em diferentes espécies e por diferentes vias de administração

Diferenças de efeitos entre as espécies

Foram verificadas diferenças entre os efeitos observados e as doses em que eles ocorreram em cada espécie, após exposição via gavagem ao CBZ. Em ratos e camundongos, os efeitos envolveram: perdas pós-implantação, atraso no desenvolvimento (alteração no peso fetal e variações esqueléticas) e malformações externas, viscerais e esqueléticas. No entanto, os efeitos foram muito mais pronunciados em ratos, sendo necessárias doses mais de dez (perdas pós-implantação; malformações) ou 30 (atraso no desenvolvimento) vezes superiores para causar efeitos similares em camundongos. Ainda, é importante ressaltar que todos os efeitos em camundongos ocorreram em doses materno-tóxicas.

Em coelhos, além das perdas pós-implantação e variações/malformações esqueléticas, foram observados efeitos nas perdas pré-implantação, mas não nas malformações externas ou viscerais e nem no peso fetal. As doses em que esses efeitos ocorreram foram de quatro a seis vezes superiores às que causaram efeitos similares em ratos, sendo relevante mencionar que a dose em que ocorreram perdas pré-implantação foram inferiores àquelas em que foram observados quaisquer efeitos em ratos.

Com o conhecimento atualmente disponível não é possível compreender exatamente o porquê dessas diferenças inter-espécies nos efeitos do CBZ e, principalmente, quais efeitos poderiam ser induzidos em seres humanos após exposição a esse IA.

Diferenças de efeitos entre as vias de administração

Pelo fato de terem sido evidenciadas diferenças após exposição via dieta ou gavagem, tanto nos efeitos observados (como, por exemplo, malformações sendo identificadas em ratos e coelhos nos estudos via gavagem, mas não nos estudos pela dieta), como nos valores de NOAEL obtidos para cada efeito (geralmente superiores nos estudos dietéticos), muitas agências discutiram que isso poderia ser resultado de diferenças na toxicocinética do CBZ. A EFSA discutiu que, em decorrência do seu mecanismo de ação bem definido de interferência na polimerização da tubulina e impedimento de formação do aparato do fuso mitótico, o CBZ pode afetar temporariamente tecidos proliferativos, incluindo células-alvo durante o desenvolvimento, quando excedido um limiar específico no órgão-alvo. Afirmou também que, devido à sua rápida absorção, metabolização e excreção, o nível plasmático extraordinariamente alto necessário para induzir os efeitos adversos só pode ser alcançado após a administração de CBZ via gavagem, mas provavelmente não via administração dietética. Com base nisso, a EFSA concluiu que, caso não ocorram exposições com pico plasmático extremo, e considerando que a degradação e a excreção ocorrem muito rapidamente, provavelmente nenhum efeito tóxico é induzido, mesmo em níveis de dose absoluta dietética muito mais elevados (EFSA, 2009a).

No entanto, é importante lembrar que o CBZ não interfere apenas na formação do fuso mitótico, mas também em outras inúmeras funções celulares dependentes de microtúbulos, inclusive em questões funcionais, que muitas vezes não são facilmente detectadas em animais experimentais.

Adicionalmente, nas menores doses de CBZ testadas via dieta, as quais foram relativamente próximas em ratos e coelhos (diferença de cerca de 2x), já houve aumento na incidência de variações esqueléticas: 23 mg/kg p.c./dia em coelhos e 44,9 mg/kg p.c./dia em ratos. Em coelhos, esse valor é compatível com aqueles observados nos estudos via gavagem, em que a dose de 20 mg/kg p.c./dia não mostrou aumento de variações esqueléticas, sendo que na dose seguinte (80 mg/kg p.c./dia) esse efeito já foi observado. Apesar de esse efeito ter ocorrido, aparentemente, em doses menores em coelhos expostos pela dieta (23 mg/kg p.c./dia) isso pode decorrer da escolha das doses testadas nos diferentes estudos (não foram testadas doses entre 20 e 80 mg/kg p.c./dia). Em ratos, a menor dose via gavagem que mostrou aumento estatisticamente significativo de variações esqueléticas foi 8 mg/kg p.c./dia. Na dieta, a menor dose testada, de 44,9 mg/kg p.c./dia, já aumentou a incidência desse efeito, não sendo possível identificar um NOAEL para tentar comparar com os estudos via gavagem.

Portanto, com base nesses dados, não é possível presumir que os efeitos tóxicos somente ocorrem quando atingido um pico plasmático extremo – característico de administração via gavagem – e descartar os efeitos observados após exposição por essa via. Isso porque não há dados suficientes para se alcançar essa conclusão, uma vez que a comparação entre essas vias de exposição não é inteiramente possível pela ausência de estudos em outros níveis de doses.

4.2 Classificação toxicológica do CBZ em função dos efeitos sobre o desenvolvimento embriofetal ou neonatal

Não há estudos epidemiológicos que tenham avaliado os efeitos do CBZ em seres humanos.

Com base em todo o disposto neste parecer, conclui-se que o CBZ possui evidência suficiente de dano ao desenvolvimento embriofetal e neonatal e de teratogenicidade em animais experimentais, sendo classificado na Categoria 1B de toxicidade reprodutiva, ou seja, como um produto que presumidamente possui o potencial de causar toxicidade reprodutiva em seres humanos (RDC nº 294, de 2019).

Essa classificação do CBZ foi corroborada pelas demais agências internacionais (APVMA, 2009; EFSA, 2010; PMRA, 2019; USEPA, 2020), bem como pela FT (Innvitro, 2020), conforme melhor detalhado no Quadro 6.

O Art. 33 da RDC nº 294, de 2019 prevê que o pedido de avaliação toxicológica será indeferido quando as etapas de identificação do perigo e de avaliação dose-resposta indicarem evidências suficientes para os produtos serem categorizados como presumidamente teratogênicos e causadores de efeitos adversos ao desenvolvimento embriofetal ou neonatal, e não for possível determinar um limiar de dose para algum desses desfechos que permita proceder com as demais etapas da avaliação do risco.

Por isso, é necessário discutir a possibilidade de determinação de um limiar de dose para os efeitos do CBZ sobre o desenvolvimento.

4.3 Determinação de limiar para efeitos do CBZ sobre o desenvolvimento embriofetal ou neonatal

Em geral, assume-se que há limiar para a curva dose-resposta de substâncias que causam toxicidade para o desenvolvimento. Essa presunção se baseia na conhecida capacidade do organismo em desenvolvimento compensar ou reparar certa quantidade de dano nas células, tecidos ou órgãos. Além disso, devido à multipotência das células em certos estágios do desenvolvimento, podem ser necessários múltiplos insultos no nível molecular ou celular para produzir um efeito no organismo como um todo (USEPA, 1991).

A avaliação das relações dose-resposta inclui a identificação de níveis de dose com efeitos, bem como doses que não estão associadas a um aumento da incidência de efeitos adversos quando comparadas aos controles. Grande parte do foco está na identificação dos efeitos críticos e do LOAEL e NOAEL associados a esse efeito, que no caso da toxicidade para o desenvolvimento pode ser qualquer uma das seguintes manifestações: morte, anomalia estrutural, alteração no crescimento e déficit funcional (USEPA, 1991).

Para a derivação de uma dose segura para humanos, a abordagem tradicional de utilização de um valor de NOAEL/LOAEL obtido a partir de um estudo experimental apresenta uma série de limitações, quais sejam: 1) enfoque apenas na dose, desconsiderando a inclinação da curva dose-resposta, bem como variabilidade e incerteza dos dados obtidos; 2) elevada dependência da seleção de doses, uma vez que o valor de NOAEL/LOAEL corresponde a uma das doses selecionadas no estudo; 3) elevada dependência do tamanho da amostra, o que acarreta na elevação do NOAEL com a diminuição do número de animais por grupo de dose; 4) impossibilidade de comparações entre estudos/substâncias químicas/desfechos, uma vez que o valor de NOAEL/LOAEL não corresponde a um nível de resposta consistente; 5) impossibilidade em estabelecer que os níveis de exposição inferiores necessariamente não apresentam risco, pois o NOAEL/LOAEL não representa um limiar biológico (USEPA, 1996, 2012). Assim, embora um limiar seja assumido para efeitos sobre o desenvolvimento, a existência de um NOAEL em um estudo animal não prova ou refuta a existência ou o nível de um limiar biológico, mas apenas define o nível mais alto de exposição nas condições do estudo que não está associado a um aumento significativo dos efeitos adversos (USEPA, 1991).

A exposição ao CBZ induziu as quatro manifestações da toxicidade para o desenvolvimento: 1) mortes, representadas principalmente por perdas pós-implantação (especialmente reabsorções precoces; mas também reabsorções tardias e mortes fetais), bem como por perdas pré-implantação (apenas em coelhos), além de alguns indicativos de mortes ao nascer e durante a lactação; 2) anomalias estruturais, representadas por malformações encefálicas (exencefalia, hidrocefalia, entre outras) e oculares (anoftalmia, microftalmia) incompatíveis com a vida pós-natal ou severamente impactantes ao indivíduo, além de malformações esqueléticas (vértebras e costelas), entre outras; 3) alterações no crescimento, representadas por reduções no peso corpóreo fetal e variações esqueléticas (principalmente atrasos na ossificação); e 4) déficits funcionais, que não foram investigados adequadamente nos estudos com o CBZ, mas podem ser deduzidos a partir das evidências de alterações histopatológicas quantitativas significativas em regiões do cérebro relacionadas ao controle motor, funções límbicas, cognitivas, sensorio-motoras e somatossensoriais. Mais do que isso, há indicativos de que exposições únicas de ratos, coelhos e hamsters em dias específicos do período de organogênese já podem causar perdas pós-implantação e malformações severas em doses similares às que causaram esses efeitos após administração durante todo o período de organogênese. Adicionalmente aos efeitos na fertilização e no desenvolvimento do embrião em si, hoje sabe-se que a dinâmica dos microtúbulos regula também as funções celulares no endométrio cruciais durante a implantação embrionária, que o tornam receptivo ao embrião.

As agências reguladoras que avaliaram o CBZ, bem como a própria FT, foram unânimes no NOAEL definido para esse IA para efeitos sobre o desenvolvimento, de 10 mg/kg p.c./dia, utilizando diferentes fatores de segurança (de até 1000x) para determinar doses de referência para humanos, conforme disposto no Quadro 6. Fatores adicionais além do padrão de 100 vezes foram incluídos principalmente pela gravidade dos efeitos observados na prole, na ausência de toxicidade materna, ressaltando-se que tanto no Canadá quanto nos Estados Unidos não é autorizado o uso de CBZ em culturas alimentares, na Comunidade Europeia qualquer uso é proibido e é permitido na Austrália.

No entanto, no presente parecer, foram observados efeitos significativos em doses inferiores a 10 mg/kg p.c./dia, com malformações severas aparecendo na dose de 12,5 mg/kg p.c./dia. Como na menor dose testada entre os diversos estudos (5 mg/kg p.c./dia em coelhos – Quintanilha et al, 1999), já foi observado aumento significativo nas perdas pré-implantação, não foi possível estabelecer um NOAEL para os efeitos do CBZ no desenvolvimento. Destaca-se

que este estudo com a dose de 5 mg/kg p.c./dia em coelhos apenas a Anvisa teve acesso, não tendo sido analisado pelas demais agências reguladoras internacionais.

Efeitos do CBZ sobre o desenvolvimento foram identificados em dose 10 vezes inferior ao NOAEL definido para os efeitos aneugênicos em células somáticas (50 mg/kg - Parecer nº 1/2021/SEI/CREAV/GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA – SEI [1309909](#)). Isso indica que, além da maior susceptibilidade do organismo em desenvolvimento em relação a adultos, outros mecanismos relacionados à despolimerização dos microtúbulos, e não somente seu efeito antimitótico, podem estar atuando. De fato, o desenvolvimento embrionário é dividido em três fases: 1) a primeira fase é de crescimento, que envolve divisão celular e elaboração de produtos celulares; 2) a segunda é a morfogênese, que envolve movimentos de massas de células, um processo em que ocorrem muitas interações complexas, em uma sequência ordenada; e 3) a terceira fase é a da diferenciação, que resulta na organização das células em um padrão preciso de tecidos e órgãos capazes de executar funções especializadas (Moore et al, 2016). Portanto, considerando a importância crucial dos microtúbulos em todos esses processos, não se pode associar os diversos efeitos do CBZ apenas às perturbações da divisão mitótica, pois eles provavelmente decorrem da interferência em um conjunto de processos celulares. Por isso, a alteração na dinâmica dos microtúbulos pode causar muitos outros efeitos mais sutis antes que efeitos acentuados como malformações estruturais aconteçam, os quais são mais dificilmente detectáveis em estudos em animais, mas podem impactar severamente a vida de seres humanos. Como exemplo, apesar de, nas últimas décadas, novos estudos terem contribuído para um avanço na compreensão da complexa remodelagem e reorganização de microtúbulos durante o desenvolvimento neuronal e os processos de plasticidade, muitos dos mecanismos moleculares relativos à montagem e à manutenção de estruturas baseadas em microtúbulos nos neurônios permanecem desconhecidos. Isso impossibilita um maior entendimento do real impacto da exposição ao CBZ sobre esses processos neurobiológicos mediados por microtúbulos no sistema nervoso central, o que é ainda agravado pelas lacunas de dados nos estudos em animais atualmente disponíveis (ausência de testes de memória e aprendizado), além da limitada capacidade dos modelos animais em replicar comportamentos e/ou funções cognitivas complexas observadas em seres humanos.

Foram observadas, ainda, diferenças relevantes entre as espécies, com doses 30 vezes inferiores em ratos do que em camundongos sendo suficientes para causar efeitos similares, quando o fator de segurança padrão para extrapolação interespecie é de 10 vezes. Ainda, os efeitos entre as espécies variaram, de forma que, com o conhecimento atualmente disponível, não é possível explicar o porquê dessas diferenças nos efeitos do CBZ entre as espécies e, principalmente, quais efeitos poderiam ser induzidos em seres humanos após exposição a esse IA.

Ressalta-se que em nenhum documento das agências internacionais avaliado pela Anvisa se discutiu detalhadamente os efeitos da exposição ao CBZ em diferentes momentos do desenvolvimento embrionário, e nem os impactos de alterações na tubulina no neurodesenvolvimento, resumindo-se em geral a discutir os possíveis efeitos do CBZ na mitose.

Na ausência de informações sobre os modos de ação de uma substância, são adotados posicionamentos mais protetivos em relação à interpretação dos dados obtidos em animais, considerando que os testes disponíveis para desfechos reprodutivos ainda possuem sensibilidade limitada, devido a questões como a existência de janelas críticas de sensibilidade (concepção, gestação, período neonatal, puberdade e adolescência), a severidade e irreversibilidade dos efeitos e possível existência de efeitos tardios (EC, 2017).

Em resumo, não se conhece todas as vias de efeito adverso e nem as diferenças inter-espécie relacionadas à toxicidade para o desenvolvimento que poderiam ser afetadas pela ação do CBZ na inibição da polimerização dos microtúbulos, de modo que o LOAEL de 5 mg/kg p.c./dia para perdas pré-implantação identificado no estudo em coelhos não pode ser considerado uma dose segura para extrapolação de um nível aceitável de exposição para humanos. Assim, com os dados disponíveis, não é possível se assumir que a curva-dose resposta dos efeitos do CBZ sobre o desenvolvimento embrionário e neonatal não é linear, o que impossibilita a determinação de um limiar de dose seguro para seres humanos.

5. CONCLUSÃO

Com base em todas essas discussões e em cumprimento ao determinado pela Lei nº 7.802, de julho de 1989; pelo Decreto nº 4.074, de janeiro de 2002; e regulamentado pela RDC nº 294, de julho de 2019, conclui-se que não é possível definir um limiar de dose seguro, capaz de impedir a ocorrência dos efeitos induzidos pelo Carbendazim sobre o desenvolvimento embrionário e neonatal, o que impede que se possa proceder com as demais etapas da avaliação do risco.

Quadro 6. Conclusões das principais autoridades reguladoras de agrotóxicos acerca do potencial de toxicidade para o desenvolvimento do Carbendazim, bem como proposta da força tarefa de reavaliação.				
Agência reguladora	Conclusão	NOAEL/ LOAEL desenvolvimento	Doses de referência para avaliação do risco de humanos	Observações
APMVA (2009)	Tóxico para o desenvolvimento. Mensagem de alerta: “Contém carbendazim, que causa defeitos congênitos em animais de laboratório. Mulheres em idade fértil devem evitar o contato com carbendazim”.	NOAEL: 10 mg/kg p.c./dia LOAEL: 20 mg/kg p.c./dia	IDA=0,03 mg/kg p.c./dia, baseada no estudo crônico de toxicidade em cães, em que foi observada hepatite crônica (NOAEL = 2,5 mg/kg p.c./dia; LOAEL= 12,5 mg/kg p.c./dia), considerado suficientemente protetivo dos efeitos no desenvolvimento. Aplicação de fator de segurança padrão de 100x. DRfA= 0,05 mg/kg p.c./dia, baseada no estudo de toxicidade testicular em ratos (LOAEL= 50 mg/kg p.c./dia). Aplicação de fator de segurança de 1000x (padrão de 100 x 10 para a extrapolação de LOAEL para NOAEL), que resultou em uma DRfA inferior do que se fosse utilizado o estudo de toxicidade para o desenvolvimento (0,1).	CBZ permitido em culturas alimentares.
EFSA (2010)	Tóxico para o desenvolvimento classificado na categoria 1B de toxicidade reprodutiva (GHS). Declarações de perigo (GHS): H360FD – Pode prejudicar o feto.	NOAEL: 10 mg/kg p.c./dia LOAEL: 20 mg/kg p.c./dia	IDA, DRfA e AOEL= 0,02 mg/kg p.c./dia, baseados em estudos de toxicidade para o desenvolvimento em ratos e coelhos (NOAEL = 10 mg/kg p.c./dia). Aplicação de fator de segurança de 500x, pelo fato dos efeitos terem sido observados na ausência de toxicidade materna.	Em 2010 foi proposta pela EFSA a manutenção do CBZ. No entanto, a legislação europeia mudou e passou a prever a proibição de produtos classificados na categoria 1B, de forma que o CBZ está proibido na Comunidade Europeia.
PMRA (2011; 2019)	Tóxico para o desenvolvimento	NOAEL: 10 mg/kg p.c./dia LOAEL: 20 mg/kg p.c./dia	Não estabeleceu IDA nem DRfA pois não há uso de CBZ aprovado em culturas alimentares no Canadá. Para cenários ocupacionais e residenciais usou um fator de segurança de 1000x (100 padrão x 10 adicional) por conta da gravidade dos efeitos para o desenvolvimento, observados na ausência de toxicidade materna.	Permitido apenas em plantas ornamentais e como preservativo industrial.
USEPA (2020)	Tóxico para o desenvolvimento	NOAEL: 10 mg/kg p.c./dia LOAEL: 20 mg/kg p.c./dia	IDA=0,14 mg/kg p.c./dia, com base nos efeitos do estudo de uma geração estendida em ratos (NOAEL= 14 mg/kg p.c./dia; LOAEL=53 mg/kg p.c./dia). Aplicação de fator de segurança padrão de 100x. DRfA para mulheres em idade reprodutiva= 0,10 mg/kg p.c./dia, com base nos efeitos do estudo de toxicidade para o desenvolvimento em ratos (NOAEL= 10 mg/kg p.c./dia; LOAEL=20 mg/kg p.c./dia). Aplicação de fator	Permitido apenas em plantas ornamentais e como preservativo industrial. No entanto, é um metabólito do fungicida Tiofanato metílico, que tem uso em culturas alimentares.

			de segurança padrão de 100x (considerou que não há necessidade de um fator adicional para bebês e crianças pequenas, pois a base de dados para o CBZ é completa e não há incertezas residuais).	
Proposta da FT carbendazim (Innvitro, 2020)	Tóxico para a reprodução categoria 1B	NOAEL: 10 mg/kg p.c./dia LOAEL: 20 mg/kg p.c./dia	IDA= 0,02 mg/kg/dia, com base nos estudos de toxicidade para o desenvolvimento (NOAEL= 10 mg/kg p.c./dia). Aplicação de fator de segurança de 500x (padrão de 100 x 5 devido à toxicidade fetal na ausência de toxicidade materna).	
Anvisa	Tóxico para o desenvolvimento classificado na categoria 1B de toxicidade reprodutiva (GHS; RDC 294/2019).	NOAEL: ND LOAEL: 5 mg/kg p.c./dia	Não é possível estabelecer uma dose experimental que possa ser considerada um limiar seguro para os efeitos do Carbendazim sobre o desenvolvimento.	A não definição de um limiar de dose seguro impede que se possa proceder com as demais etapas da avaliação do risco, conforme previsto na RDC nº 294/2019.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarez, L. Teratogenicity study of INE-965 (carbendazim) in rats. Unpublished report No MR- 7976-001 HLR 281-87 from E.I. DuPont de Nemours and Co., Haskell Laboratory, Newark, Delaware, USA. Previously submitted to WHO by E.I. du Pont de Nemours and Company, Wilmington, Delaware, USA. 1987. Apud APVMA 2009; EFSA 2009a e USEPA 2020.
- APVMA. Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. Office of Chemical Safety and Environmental Health Office of Health Protection. Chemical Review Program. Human health risk assessment of Carbendazim. Volume 2. December 2009.
- Chakraborti, S., Natarajan, K., Curiel, J., Janke, C., & Liu, J. The emerging role of the tubulin code: From the tubulin molecule to neuronal function and disease. Cytoskeleton, 73(10), 521–550. 2016.
- Christian, Hoberman, Feussner. Developmental toxicity study of H-15647 administered via gavage to New Zealand White rabbits. DuPont Report no. HLO 515-85. 1985. Apud APVMA 2009; EFSA 2009a e USEPA 2020.
- Conde, C.; Cáceres, A. Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. Nature Reviews Neuroscience, 10(5), 319–332. 2009.
- Cummings, A. M., Harris, S. T., & Rehnberg, G. L. Effects of methyl benzimidazolecarbamate during early pregnancy in the rat. Toxicological Sciences, 15(3), 528–535. 1990.
- Cummings, A. M., Ebron-mccoy, M. T., Rogers, J. M., Barbee, B. D., & Harris, S. T. Developmental effects of methyl benzimidazolecarbamate following exposure during early pregnancy. Toxicological Sciences, 18(2), 288–293. 1992.
- Delatour, P., Richard, Y. Propriétés embryotoxiques et antimitotiques en série benzimidazole. Therapie, 31, 505-515, 1976. Apud EFSA 2009a.
- Dent, E. W. Of microtubules and memory: Implications for microtubule dynamics in dendrites and spines. Molecular Biology of the Cell, 28(1), 1–8. 2017.
- EFSA. European Food Safety Authority. Draft Re-Assessment Report. Carbendazim. Volume 3. Annex B-6- Toxicology and Metabolism. 16 July 2009a.
- EFSA. European Food Safety Authority. Conclusion on Pesticide Peer Review. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance carbendazim. EFSA Journal 2010; 8(5):1598. 2010.
- EOGRS. An F1-Extended Two-Generation Reproductive Toxicity Study with Carbendazim in the Wistar Rat. DACO 4.8. 2014. Apud USEPA (2020; MRID49547201) e PMRA (2019; PMRA#2490664).
- Farag, A., Ebrahim, H., Elmazoudy, R., & Kadous, E. Developmental toxicity of fungicide carbendazim in female mice. Birth Defects Research Part B - Developmental and Reproductive Toxicology, 92(2), 122–130. 2011.
- Gray, L.E. et al. Carbendazim-induced alterations of reproductive development and function in the rats and hamster. Fund. Appl. Toxicol 15: 281-297, 1990.
- Haber SN. Corticostriatal circuitry. Dialogues Clin Neurosci. 18(1):721, 2016.
- Hofmann, H.T.; Peh, J. Report on the study of methyl benzimidazole-2-carbamate (MBC) in rats. Unpublished report No. 87/091, Doc. No. A52506 from BASF AG, Ludwigshafen, Germany. 1987a. Apud APVMA 2009, EFSA 2009a e JMPR (2005).
- Hofmann, H.T.; Peh, J. Report on the study of methyl benzimidazole-2-carbamate (MBC) in rats. Unpublished report No. 87/092, Doc. No. A52505 from BASF AG, Ludwigshafen, Germany; 1987b. Apud APVMA 2009, EFSA 2009a e JMPR (2005).
- Hood, Ronald D. Developmental and reproductive toxicology a practical approach: a practical approach. 3. ed. London: Informa Healthcare, 2012.
- InnVitro Pesquisa & Desenvolvimento S/S Ltda (Vilella et al). P16/20-4 - Relatório de Reavaliação do Ingrediente Ativo Carbendazim. Reprodução e Desenvolvimento. Contratante: FT Carbendazim. Revisão 1, 28p., 09/10/2020.
- Janardhan, A.; Sattur, P.B.; Sisodia, P. Teratogenicity of methyl benzimidazole carbamate in rats and rabbits. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 33, 257–263. 1984.
- JMPR/FAO (2005). Carbendazim 87–106, 2005.
- Koeter, H.B.W.M., De Groot, A.P. Effect of Hoe 17411 F (= BAS 3460 F) on pregnancy of the rat. Rapport R 4726. 1975a. Apud EFSA 2009a.
- Koeter, H.B.W.M., De Groot, A.P. Effect of Hoe 17411 F (= BAS 3460 F) on pregnancy of the New Zealand White rabbit. Report R 4881. 1975b. Apud EFSA 2009a.
- Lee, K. Y., & DeMayo, F. J. Animal models of implantation. Reproduction, 128(6), 679–695. 2004.

Minta, M; Biernacki, B. Embryotoxicity of carbendazim in hamsters, rats and rabbits. Bull. Vet. Inst. Pulawy, 2, 1-4, 42-52. 1982. Apud EFSA 2009^a.

Moore, K.L.; Persaud, T.V.N.; Torchia, M.G. Embriologia Clínica. 10ª edição. Elsevier, 2016.

Nishimura, M. Timing of implantation in New Zealand White rabbits. Congenital Anomalies, 41(3), 198–203. 2001.

OECD. Guidance document on mammalian reproductive toxicity testing and assessment. ENV/JM/MONO(2008)16. Series on testing and assessment. Number 43. 2008.

Oliveira, M.S.; Lessa, S.C.; Farah, E.; Vargas, M.A.T. G2104C-414/98 - Toxicidade pré-natal em coelhos New Zealand após administração oral por gavagem do carbendazim técnico. Bioagri Laboratórios Ltda. Contratante: Milênia AgroCiências S/A. 1999.

Pagnamenta, A. T., Heemeryck, P., Martin, H. C., Bosc, C., Peris, L., Uszynski, I., Gory-Fauré, S., Couly, S., Deshpande, C., Siddiqui, A., Elmonairy, A. A., Jayawant, S., Murthy, S., Walker, I., Loong, L., Bauer, P., Vossier, F., Denarier, E., Maurice, T., ... Moutin, M. J. Defective tubulin detyrosination causes structural brain abnormalities with cognitive deficiency in humans and mice. Human Molecular Genetics, 28(20), 3391–3405. 2019.

PMRA. Health Canada Pest Management Regulatory Agency. Proposed Registration Decision. Thiophanate-Methyl and Its Associated End-use Products. PRVD2019-07. 28 June 2019.

Prem S, Millionig JH, DiCicco-Bloom E. Dysregulation of Neurite Outgrowth and Cell Migration in Autism and Other Neurodevelopmental Disorders. Adv Neurobiol. 25:109-153. 2020.

Quintanilha, L.C.; Lessa, S.C.; Farah, E.; Vargas, M.A.T. G2104R-414/98 - Toxicidade pré-natal em ratos Wistar após administração oral por gavagem do carbendazim técnico. Bioagri Laboratórios Ltda. Contratante: Milênia AgroCiências S/A. 1999.

Riley, E. P., & Vorhees, C. V. (Eds.). Handbook of behavioral teratology. Plenum Press. 1986.

Romaniello R, Arrigoni F, Bassi MT, Borgatti R. Mutations in α - and β -tubulin encoding genes: implications in brain malformations. Brain Dev; 37(3):273-80; 2015.

Shukla V, Kaushal JB, Kumar R, Popli P, Agnihotri PK, Mitra K, Dwivedi A. Microtubule depolymerization attenuates WNT4/CaMKII α signaling in mouse uterus and leads to implantation failure. Reproduction. 2019 Jul;158(1):47-59.

Sitarek, K. Embryo-lethal and teratogenic effects of carbendazim in rats. Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis, 21(5), 335–340. 2001.

Somlyay, I., Varnagy, L. carbendazim 2-generation reproduction study on rats. Report NR.: 64., AGC (AgriChem B.V.) 1992. Apud EFSA 2009^a.

Spencer, F., Chi, L.; Zhu, M. X.. Effect of benomyl and carbendazim on steroid and molecular mechanisms in uterine decidual growth in rats. Journal of Applied Toxicology, 16(3), 211–214; 1996.

Til, Koeter, van der Heijden. Multi-generation Study with Carbendazim in Rats; Doc. No.: A10295; Report no.: R5024; 1976.

Upadhyay, J., Rana, M., Bisht, S. S., Rana, A., Durgapal, S., & Juyal, V. Biomarker responses (Serum biochemistry) in pregnant female wistar rats and histopathology of their neonates exposed prenatally to pesticides. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 55, 1–9. 2019.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment. In Risk Assessment Forum. Vol. 56, Issue EPA/600/FR-91/001. 1991.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. Guidelines for Reproductive toxicity risk assessment. EPA/630/R-96/009. Federal Register 61(212), 56274–56322. 1996.

USEPA. United States Environmental Protection Agency, Benchmark Dose Technical Guidance. EPA/100/R-12/001, Risk Assessment Forum, Washington, DC, 2012.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. Memorandum. Thiophanate-Methyl and Carbendazim: Amended Draft Human Health Risk Assessment for Registration Review. Decision no 551693. DP D458977. 27 August 2020.

Varnagy, L.; Somlyay, I. Carbendazim teratogenicity study in the rat. Report no: 45/91, 1991. Apud EFSA 2009^a.

Vergieva, T. Karbendazim - Teratogene Aktivität auf Ratten, 1975. Apud EFSA 2009^a.

Vergieva, T. Behavioral teratology - Results achieved and perspectives of development. Journal of Hygiene Epidemiology Microbiology and Immunology, 28, 2, 121-127, 1985. Apud EFSA 2009^a.

Zhou, J., Xiong, K., Yang, Y., Ye, X., Liu, J., & Li, F. Deleterious effects of benomyl and carbendazim on human placental trophoblast cells. Reproductive Toxicology, 51, 64–71. 2015.



Documento assinado eletronicamente por **Camila Queiroz Moreira, Especialista em Regulação e Vigilância Sanitária**, em 12/07/2021, às 16:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/D10543.htm.



Documento assinado eletronicamente por **Larissa Muratori Aguiar, Especialista em Regulação e Vigilância Sanitária**, em 12/07/2021, às 20:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/D10543.htm.



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Roberto Coradi de Freitas, Coordenador(a) de Reavaliação**, em 15/07/2021, às 19:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/D10543.htm.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.anvisa.gov.br/autenticidade>, informando o código verificador **1505782** e o código CRC **92D4B022**.



Referência: Processo nº 25351.945793/2019-57

SEI nº 1505782

Criado por [camila.qmoreira](#), versão 42 por [camila.qmoreira](#) em 12/07/2021 16:24:43.

PARECER Nº 12/2021/SEI/CREAV /GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA

Processo nº 25351.945793/2019-57

Interessado: Coordenação de Reavaliação, Gerência de Monitoramento e Avaliação do Risco, GGTOX

Assunto: **Análise do potencial de toxicidade para a fisiologia reprodutiva do ingrediente ativo Carbendazim.**

Avalia os estudos científicos, o relatório da Força-Tarefa Carbendazim e os de outras agências reguladoras de agrotóxicos acerca do potencial de toxicidade para a fisiologia reprodutiva do Carbendazim, como parte da reavaliação toxicológica desse ingrediente ativo, conforme RDC nº 221, de 28 de março de 2018.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anvisa: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APMVA: *Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority* (Autoridade Australiana de Pesticidas e Medicamentos Veterinários).

CBZ: Carbendazim

CDPR: *California Department of Pesticide Regulation* (Departamento de regulação de pesticidas da Califórnia)

Creav: Coordenação de Reavaliação

DAG: Distância anogenital

DG: Dia gestacional

DMT: Dose máxima tolerável

EFSA: *European Food Safety Authority* (Autoridade Europeia para Segurança dos Alimentos)

EOGRTS: *Extended One-Generation Reproductive Toxicity Study* (Estudo de toxicidade reprodutiva de uma geração estendida)

FAO: *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação)

FT: Força Tarefa do Carbendazim

IA: Ingrediente ativo

ip: Via intraperitoneal

it: Via intratesticular

LOAEL: *Lowest observed adverse effect level* (Dose mais baixa de efeito adverso observável)

MN: Micronúcleo

MT: Microtúbulo

NOAEL: *No observed adverse effect level* (Dose sem efeito adverso observável)

NOAEL: *No Observed Adverse Effect Level* (Nível sem Efeito Adverso Observável)

OECD: *Organization for Economic Co-operation and Development* (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico)

PMRA: *Health Canada's Pest Management Regulatory Agency* (Agência Reguladora de Controle de Pragas Canadense)

sg: Significativo

TR: Toxicidade reprodutiva

USEPA: *United States Environmental Protection Agency* (Agência de Proteção Ambiental Americana)

WoE: *Weight of Evidence* (Peso da evidência)

vo: Via oral

RESUMO

O Carbendazim (CBZ) é um fungicida sistêmico de amplo espectro, pertencente à classe dos benzimidazóis, cuja ação pesticida decorre da inibição da polimerização de β -tubulina, o que impede a formação adequada do fuso acromático e, conseqüentemente, prejudica o processo de divisão celular. Na avaliação do potencial de toxicidade reprodutiva (TR) do CBZ, foram considerados estudos regulatórios apresentados pela Força-Tarefa, estudos da literatura científica obtidos mediante revisão sistemática e relatórios das principais agências reguladoras internacionais. A partir deles, verificou-se que, quanto aos efeitos sobre a fisiologia reprodutiva, o CBZ acarreta efeitos adversos na função sexual ou capacidade reprodutiva masculina e feminina. No sexo masculino, verificou-se que o testículo é um órgão-alvo, em roedores e cães, após exposição única ou repetida ao CBZ, com ocorrência de vários efeitos adversos de curto e longo prazo, inclusive irreversíveis. Dentre esses efeitos, estão: 1) resposta testicular reversível, induzida principalmente por dosagens baixas a moderadas (50 - 100 mg/kg), causando danos diretos ao epitélio seminífero, com conseqüente descamação de células germinativas imaturas, necrose de células em divisão e alterações na formação do núcleo de espermátides; e 2) oclusão irreversível dos ductos eferentes, induzida por doses moderadas a altas (100 - 800 mg/kg), com acúmulo de fluido, estase de espermatozoides, aumento do peso testicular, dano epitelial, resposta inflamatória, fibrose tecidual, formação de ductos anormais, atrofia do epitélio seminífero e do testículo, seguida de infertilidade permanente. Não foi possível a definição de um NOAEL para a TR no sexo masculino, posto que, já na menor dose testada (0,1 mg/kg p.c./kg), foram verificados efeitos adversos. Com relação aos efeitos no sexo feminino, foram relatados redução no ganho de peso corporal materno, no tamanho da ninhada e na viabilidade fetal, atraso/interrupção no desenvolvimento embrionário pré-implantação, redução nos sítios de implantação, além de alterações morfológicas nos óvulos após a fertilização. A extensão da perda gestacional e da aneuploidia em zigotos foi maior com a administração de CBZ no proestro, o que indica que o oócito parece ser mais sensível aos efeitos induzidos pelo CBZ durante a formação do fuso (maturação do oócito) do que após ele ter sido formado. O mecanismo de ação subjacente

aos efeitos relatados em ambos os sexos é a interrupção da polimerização dos microtúbulos pela ligação do CBZ à β -tubulina, inclusive com AOP já caracterizado (AOP 106) para a geração de oócitos aneuplóides após exposição ao CBZ. Tais oócitos, quando fertilizados, vão gerar descendentes aneuplóides, com incidência aumentada de síndromes na prole, o que corresponde ao evento adverso observável. Também não foi possível o estabelecimento de um NOAEL para os efeitos do CBZ no sexo feminino, pois as doses testadas em todos os estudos disponíveis foram muito altas, e em todas foram observados efeitos adversos (≥ 250 mg/kg p.c.). Diante desses resultados, conclui-se o CBZ deve ser classificado na Categoria 1B e que não é possível o estabelecimento de limiar para a ocorrência dos efeitos adversos sobre a reprodução, em ambos os sexos.

INTRODUÇÃO

O presente parecer objetiva avaliar o potencial de toxicidade reprodutiva (TR) do ingrediente ativo (IA) Carbendazim (CBZ), a partir do conjunto de evidências relevantes disponíveis, quais sejam: estudos regulatórios multigeracionais e de toxicidade para o desenvolvimento pré-natal em ratos e coelhos e estudos de reprodução/desenvolvimento disponíveis na literatura científica, apresentados pela Força-Tarefa Carbendazim ou ainda obtidos dos relatórios das principais agências reguladoras de agrotóxicos internacionais (USEPA, PMRA, EFSA, APMVA, FAO).

Então, como parte do processo de reavaliação desse IA, foi conduzida uma busca sistemática da literatura científica para identificar estudos com evidências de TR associada à exposição ao CBZ, a fim de integrar esses dados aos estudos regulatórios disponibilizados pelas empresas registrantes, por meio de uma análise de peso da evidência (WoE), seguindo critérios também adotados por diversas autoridades regulatórias internacionais, para fins de tomada de decisão. O detalhamento dessa busca sistemática consta no Parecer nº 7/2021/SEI/CREAV /GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA (SEI nº [1451178](#)). É relevante mencionar que não foram avaliados estudos conduzidos com produtos formulados à base de CBZ (Upadhyay et al, 2019; Akbarsha et al., 2000; Akbarsha et al., 2001).

ANÁLISE

Efeitos adversos na função sexual ou capacidade reprodutiva masculina e feminina

Com base nos relatórios de todas as agências reguladoras consultadas e no próprio relatório da FT, não há dúvida quanto ao potencial do CBZ em induzir efeitos na função sexual ou na capacidade reprodutiva masculina e feminina em animais. Contraditoriamente ao grande número de estudos da literatura com evidências de TR, nenhum efeito adverso sobre a reprodução foi identificado no estudo multigeracional de Til et al (1976) apresentado pela FT (Quadro 1). Entretanto, assim como discutido pela EFSA (2009) e pela PMRA (2011), a CREAV considerou que esse estudo possui várias limitações em relação ao protocolo previsto na Diretriz OECD 416, principalmente com relação à ausência de análise ou de fornecimento de dados de vários parâmetros importantes de reprodução/desenvolvimento, tais como: ciclo estral, parâmetros espermáticos (contagem, morfologia e motilidade de espermatozoides); dosagem de níveis hormonais (LH, FSH, testosterona, estrogênio,

progesterona, prolactina), medição da distância anogenital (DAG), registro de marcos de desenvolvimento (idade de abertura vaginal e separação prepucial) e parâmetros funcionais na prole (atividade motora, função sensorial, ontogenia de reflexos); histopatologia de órgãos reprodutivos (ovários e testículos) e da hipófise. Além disso, não foram disponibilizados dados analíticos sobre a confirmação dos níveis dietéticos de CBZ, o que impossibilita uma determinação precisa da dose a qual os animais foram efetivamente expostos. Outro estudo multigeracional mais recente (uma geração estendida – EOGRTS, 2014), segundo avaliação da USEPA (2020) e da PMRA (2019), indicou ausência de efeito degenerativo significativo nos testículos ou alterações espermáticas após exposição dietética ao CBZ, em oposição aos dados fornecidos pelos estudos da literatura, com administração via gavagem, nos quais foram relatados efeitos adversos após exposição única em níveis de doses comparáveis (≥ 100 mg/kg p.c.) e após exposição repetida a doses inferiores (20 mg/kg p.c./dia), por 2 ou 7 dias (Breslin et al., 2013). Esse estudo regulatório também foi incluído no Quadro 1, porém com informações muito resumidas (ausência de detalhamento de diversos parâmetros e de dados brutos), obtidas somente dos relatórios da USEPA (2020) e PMRA (2019), uma vez que a Anvisa não teve acesso ao estudo. Ainda, houve divergências entre essas duas agências com relação às descrições de alguns resultados: a USEPA relatou ausência de qualquer efeito adverso reprodutivo, considerando um NOAEL de 2.000 ppm (maior dose testada); enquanto a PMRA relatou alterações significativas em alguns parâmetros (redução no peso testicular, atrofia testicular, aumento da motilidade espermática) nesse nível de dose, considerando a dose de 1.000 ppm como NOAEL. Esse conjunto de fatores impossibilita qualquer conclusão da Anvisa com base apenas nas informações fornecidas por esses relatórios.

Quadro 1. Avaliação dos potenciais efeitos na função sexual ou capacidade reprodutiva masculina e feminina em ratos após exposição dietética ao ingrediente ativo Carbendazim nos estudos multigeracionais.

Referência	Protocolo	Resultados segundo autor	Limitações, inconsistências e considerações relevantes	Conclusão
Til et al., 1976 Estudo regulatório protocolado na Anvisa. Também avaliado por APVMA, 2009 EFSA, 2009 PMRA, 2011	Pureza: 99%; Linhagem: Ratos <i>Wistar</i> albinos; Delineamento: <u>Estudo de 3 gerações:</u> Geração F₀: n = 10♂ e 20♀/grupo): Administração dietética de CBZ (0, 150, 300 ou 2000 ppm; 0, 7,5, 15 ou 100 mg/kg p.c./dia). Acasalamento: 5♂ e 10♀/grupo; 2 ninhadas sucessivas (F1a e F1b). Eutanásia de F1a no desmame; Acasalamento de F1b (10♂ e 20♀/grupo): 2 ninhadas sucessivas (F2a e F2b). Eutanásia de F2a no desmame; Acasalamento de F2b (10♂ e 20♀/grupo): 2 ninhadas sucessivas (F3a e F3b). <u>Estudo dietético de 4 semanas:</u> Prole F3b (10♂ e 10♀ - mesmas doses que F₀) – análise histopatológica	<u>Estudo de reprodução:</u> Parental: - S/ anormalidades nas condições ou comportamento (F₀, F1b e F2b); - Mortalidade na maior dose (2000ppm) - F₀ (1♀) e F1 (2♀); - ↑* p.c. nos animais F₀ (♀ - 150 e 300ppm), F1 e F2 (♀ e ♂ - 3 níveis de dose), que foi (considerado sem significado toxicológico, uma vez que não existe tendência dose-resposta ou evidência histopatológica ou explicação relatada para embasar um efeito relacionado ao tratamento; - S/ ↓ fertilidade (% fêmeas com ninhadas); s/ diferenças na razão entre sexos; - Pequenas alterações no tamanho da ninhada (sem relação com tratamento); <u>Estudo dietético de 4 semanas:</u> - S/ óbitos ou anormalidades de condição ou comportamento; - ↑* p.c. (♀ - 150 e 300ppm) – s/ relação dose-resposta; - ↑ ingestão alimentos (♂ - todos os grupos) – s/ relação com tratamento; - ↑* peso relativo do fígado e ↓* peso relativo do baço (♀ - 2000ppm); - ↓* pesos relativos dos ovários (todos as doses), mas s/ relação com o nível de CBZ na dieta (inversamente proporcional à dose); - Histopatologia: evidências comuns na linhagem usada nesse estudo, quase igualmente distribuídas entre o grupo tratado e controle.	- A parte deste estudo relativa à avaliação pré-natal (teratogenicidade) ou pós-natal de parâmetros exclusivos do desenvolvimento está descrita no Parecer SEI nº 1505782. - Desvios em relação à Diretriz OECD 416: não foram registrados dados de consumo alimentar (exceto para o estudo com prole F3b), então a ingestão de CBZ (mg/kg p.c./dia) foi calculada por meio de um fator de 0,05 (200 g p.c./ 10 g consumo alimentar/ dia) (RD OECD: registro semanal); ausência de dados sobre o estado de saúde e a idade inicial dos animais (RD OECD: 5-9 semanas); observações gerais realizadas “regularmente” (RD OECD: avaliação diária); registro quinzenal do p.c., a partir da 2ª semana (RD OECD: registro semanal), a partir do 1º d de adm.; acasalamento com proporção de 5:10 (macho/ fêmea) (RD OECD: 1:1); não foram analisados todos os parâmetros previstos na diretriz (ciclo estral, parâmetros espermáticos; níveis hormonais; não há dados analíticos disponíveis sobre a confirmação dos níveis dietéticos de CBZ; não foram fornecidos dados de histopatologia de órgãos reprodutivos (ovários e testículos) ou da hipófise, nem dados individuais no relatório original. - RD OECD 416: em estudos dietéticos, o intervalo de doses não deve exceder 3x	NEGATIVO (reprodução / fertilidade) NOAEL = 100 mg/kg p.c./dia (maior dose testada) (Conclusão alinhada a EFSA e PMRA)

Quadro 1. Avaliação dos potenciais efeitos na função sexual ou capacidade reprodutiva masculina e feminina em ratos após exposição dietética ao ingrediente ativo Carbendazim nos estudos multigeracionais.

Referência	Protocolo	Resultados segundo autor	Limitações, inconsistências e considerações relevantes	Conclusão		
	somente da maior dose (2000 ppm).		(não foi apresentado racional para seleção de doses).			
Estudo de uma geração estendida (EOGRTS, 2014) Estudo regulatório não protocolado na Anvisa. Nossa análise foi baseada nas descrições efetuadas pela USEPA (2020) e PMRA (2019).	Pureza: 99,5%; Linhagem: Ratos <i>Wistar Hannover</i> [Crl:WI (HAN)] Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> de uma geração estendida. Geração P: Administração dietética de CBZ (n = 30/ sexo/ dose; 0, 250, 1000 ou 2000 ppm (equivalente à dose média diária pré-acasalamento na geração P de 0; 13,9; 53,2 ou 106,7 mg/kg p.c./dia em ♂ e 0; 16,2; 67,6 ou 136,8 mg/kg p.c./dia em ♀) por 4 semanas antes do acasalamento, por 14 dias de acasalamento e até DPN₈₅ (♂) ou até o desmame da prole F1 no DL₂₂ (♀); Geração F1: Administração dietética do desmame ao término do estudo. <table><tr><td>Coorte 1a (22/sexo/ dose)</td><td>TR e sistêmica</td></tr></table>	Coorte 1a (22/sexo/ dose)	TR e sistêmica	Toxicidade parental (P e F1 adultos): - Ausência de mortalidade; s/ alterações clínicas, no p.c. ou ganho de p.c., no consumo de alimentos, parâmetros hematológicos, bioquímicos ou de uroanálise. ≥1000ppm: ↓* triglicerídeos em ♀ F1 e ♀P (não considerado adverso pois não teve evidência de alteração histológica relacionada); ↓sutil testosterona plasmática em ♂P; 2000ppm: ↓monócitos em ♂P (dentro do controle histórico); ↑* contagem de leucócitos, linfócitos e neutrófilos segmentados em ♀ F1 coorte 1b (dentro do controle histórico); ↓sutil peso testicular (4% abaixo do controle) e leve atrofia testicular (3/30) em ♂P (não considerado adverso devido à alteração marginal e ausência de efeitos reprodutivos); Toxicidade reprodutiva: - S/ alterações nos índices reprodutivos, intervalos pré-acasalamento, duração da gestação, desenvolvimento sexual, ciclo estral, contagem de folículos ovarianos, parâmetros espermáticos, parto, lactação ou tecidos e órgãos do sistema reprodutivo (USEPA). 2000ppm: ↓peso testículos (P e F1 desmame e adulto), ↑atrofia testicular (somente em P), ↑motilidade espermática; ↓testosterona (não adversa, somente em P1) (PMRA). Prole (toxicidade sistêmica e marcos do desenvolvimento):	- A parte deste estudo relativa à avaliação pré-natal (teratogenicidade) ou pós-natal de parâmetros exclusivos do desenvolvimento está descrita no Parecer SEI nº 1505782. - A parte deste estudo relativa à avaliação dos parâmetros tireoidianos (coorte 3) está descrita no Parecer SEI nº 1463526. - Estudo não satisfaz totalmente a RD OECD 443, a qual foi modificada para testar a toxicidade para reprodução, tireoide e DNT, sendo adequada para avaliar esses parâmetros. A coorte 3 não foi empregada para imunotoxicidade, mas para a avaliação de efeitos tireoidianos. No entanto, o estudo, conforme conduzido, não mostra evidências de potencial imunotóxico do CBZ com base na ausência de efeitos observados na hematologia, peso do órgão ou histopatologia. - Não foram feitos ajustes de dose na dieta durante o curso do estudo. Como resultado, a ingestão da ST em ♀ durante a lactação foi até 2 vezes superior que em outros grupos de dose.	ND
Coorte 1a (22/sexo/ dose)	TR e sistêmica					

Quadro 1. Avaliação dos potenciais efeitos na função sexual ou capacidade reprodutiva masculina e feminina em ratos após exposição dietética ao ingrediente ativo Carbendazim nos estudos multigeracionais.

Referência	Protocolo		Resultados segundo autor	Limitações, inconsistências e considerações relevantes	Conclusão
	Acasalamento no DPN₉₀; eutanásia no DPN₁₄₈ (♂). Coorte 1b (20/sexo/ dose) TR Acasalamento no DPN₉₀; eutanásia no DPN₁₇₅ (♂) e no DL₂₀ (♀); eutanásia da prole F2 no DPN₂₃ (n = 12/sexo/dose – dosagem de hormônio tireoidiano, necropsia e patologia do órgão-alvo) e no DPN₄₅ (20♀/dose - abertura vaginal e dosagem de hormônio tireoidiano). Coorte 3 (12/sexo/ dose) Tox.sistê mica/ tireoide Dosagem do hormônio tireoidiano, necropsia e patologia do órgão-alvo no DPN₂₃.		- S/ alterações na DAG, consumo de alimentos ou histopatologia dos filhotes F1 e F2; ≥1000ppm: ↑ peso fígado (♀/♂ - PMRA); ↓ p.c. e ganho de p.c. (F1♂); 2000ppm: atraso na abertura vaginal (F1 e F2) (PMRA).		

Quadro 1. Avaliação dos potenciais efeitos na função sexual ou capacidade reprodutiva masculina e feminina em ratos após exposição dietética ao ingrediente ativo Carbendazim nos estudos multigeracionais.

Referência	Protocolo	Resultados segundo autor	Limitações, inconsistências e considerações relevantes	Conclusão
Legenda: *= alteração estatisticamente significativa; CBZ= Carbendazim; ST= substância teste; ctl= controle; DG= dia gestacional; DPN= dia pós-natal; DAG= distância anogenital; DNT= neurotoxicidade para o desenvolvimento; ND= não determinado; NI = não informado; p.c.= peso corpóreo.				

Conforme discutido pelas agências reguladoras (EFSA, 2010; PMRA, 2011; USEPA, 2020; APMVA, 2009), essa diferença na ocorrência de efeitos adversos entre os estudos regulatórios e os da literatura pode ser decorrente da via de administração – dietética ou por gavagem. Nos estudos dietéticos, os valores de NOAEL/LOAEL foram superiores e os efeitos adversos foram menos acentuados ou severos. Um perfil semelhante foi observado nos estudos conduzidos com Benomil. Essa diferença também interfere nos efeitos para o desenvolvimento e parece decorrer de mudanças no perfil toxicocinético quanto a essas duas formas de administração. Entretanto, considerando que as diretrizes OECD 416 e 414 preveem a administração da ST via gavagem; e considerando ainda que, com relação aos estudos dietéticos, um deles apresenta várias limitações (Til et al., 1976), como falado anteriormente, e o outro foi somente avaliado pela USEPA (2020) e PMRA (2019), de modo que a Anvisa não teve acesso diretamente ao estudo para análise dos dados; os estudos conduzidos via gavagem, provenientes da literatura científica, foram considerados na avaliação do potencial de TR pela Anvisa, a despeito dessa diferença levantada pelas agências reguladoras.

Então, a seguir serão discutidas as evidências de TR fornecidas pelos estudos da literatura e pelos relatórios das agências reguladoras, quanto aos efeitos observados no sexo masculino (Quadros 2 e 3) e feminino (Quadro 4).

Ainda, na busca sistemática foi identificado um estudo epidemiológico transversal (Petrelli et al, 2003), o qual buscou avaliar o risco de aborto espontâneo em casais com registro de exposição ocupacional ou doméstica nos meses antecedentes à primeira gravidez (Quadro 5). No entanto, por ser apenas descritivo e apresentar inúmeras limitações inerentes ao desenho desse tipo de estudo, não foi possível tirar qualquer conclusão de seus resultados, sendo essa evidência descartada da análise do WoE.

Efeitos observados no sexo masculino

Conforme discutido no Parecer nº 10/2021/SEI/CREAV/GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA (SEI nº 1463526), que trata da toxicocinética, toxicidade aguda, neurotoxicidade, imunotoxicidade e outros efeitos à saúde relacionados ao Carbendazim, o testículo é um órgão-alvo, em roedores e cães, após exposição única ou repetida ao CBZ, com ocorrência de vários efeitos adversos de curto e longo prazo, inclusive irreversíveis. Uma série de estudos investigou os efeitos reprodutivos masculinos, dose e tempo-dependentes, induzidos após administração única de CBZ via oral em ratos (Nakai et al., 1992, 1993, 1994, 1995, 1997a, 1997b, 1998a, 1998b, 2002; Hess & Nakai, 2000; Moffit et al., 2007; Markelewicz, 2004, Kadalmani et al., 2002; Kawata et al., 2020). A partir desse conjunto de dados, verificou-se que a exposição ao CBZ produz dois efeitos patológicos diferentes no sistema reprodutor masculino: 1) resposta testicular, com efeitos diretos no epitélio seminífero que causam descamação de células germinativas imaturas, necrose de células em divisão e alterações na formação do núcleo de espermátides; e 2) oclusão dos ductos eferentes.

Os primeiros efeitos foram reversíveis e induzidos principalmente por dosagens baixas a moderadas (50 - 100 mg/kg p.c/dia). Eles incluíram: a) inibição da formação de

microtúbulos (MT) na região do corpo das células de Sertoli, com consequente descamação do epitélio seminífero apical e liberação rápida e massiva de células germinativas imaturas, levando à redução na contagem de espermatozoides testiculares (em 2-4h), evento associado ao aumento significativo no peso testicular (início em 8h); b) alterações morfológicas de espermátides (núcleo, acrossomo e manchete) e indução de assincronia do desenvolvimento de espermátides nas fases iniciais da espermiogênese; c) interrupção do processo de espermatogênese ao causar necrose das células em divisão, durante a mitose ou meiose, e impedir espermátocitos em paquíteno de completar a segunda divisão meiótica; d) indução da formação de megaespermátides (estruturalmente normais, mas 30% maiores que o tamanho normal). O peso testicular permaneceu elevado até 96h pós-exposição, com posterior redução rápida.

O segundo grupo de efeitos ocorreu em níveis de dose moderada a alta (100 - 800 mg/kg) e foram irreversíveis. A oclusão dos ductos eferentes foi verificada rapidamente após a exposição (75% em 12h e 85% em 24h), alinhada ao aumento do peso testicular observado em 8h pós-tratamento. Essa oclusão, a qual parece ocorrer por ação direta do CBZ nos ductos eferentes, é completa em 6-8h, seguida por acúmulo de fluido, estase de espermatozoides e aumento do peso testicular. Isso gera dano epitelial, uma consequente resposta inflamatória mediada por neutrófilos (em 2-4h pós-oclusão), fibrose tecidual com formação de múltiplos ductos anormais (microcanais), indicando uma tentativa de recanalização em 16 dias pós-tratamento. Análises efetuadas em 70 dias pós-exposição indicaram azoospermia associada à formação desses ductos anormais. Os últimos eventos relatados foram atrofia do epitélio seminífero e do testículo, seguida de infertilidade permanente.

Ainda, demonstrou-se que a oclusão dos ductos eferentes pode ter relação com os efeitos deletérios nos túbulos seminíferos, posto que o número de túbulos atroficos foi bem maior nos testículos com total oclusão desses ductos. Com isso, os autores concluíram que a capacidade dos testículos em resistir aos efeitos deletérios de longo prazo do CBZ depende da permeabilidade dos ductos eferentes (Gotoh et. al., 1999).

Já a exposição oral repetida por 10 dias, a 400 mg/kg p.c./dia, resultou em um percentual de 21% de testículos com atrofia total de túbulos seminíferos em 70 dias pós-tratamento e de 50% após 245 dias. Isso sugere que a regressão tubular seminífera continua por um longo período após o término da exposição ou que as doses adicionais contribuíram para um espalhamento dos danos a um maior número de ductos eferentes. Nesse estudo, também foi relatada infertilidade em aproximadamente 50% dos animais na primeira semana, com agravamento até a 5ª semana (70%). Houve recuperação da fertilidade em 25% dos animais entre 5 - 11 semanas. O restante deles permaneceu infértil até o término das 32 semanas de análise e seu exame histopatológico revelou atrofia em mais de 85% dos túbulos seminíferos. Nos machos com fertilidade recuperada, houve grande variação no número de túbulos seminíferos atroficos, variando de 13 a 85% (Carter et al., 1987).

Em outros estudos de exposição repetida, com duração entre 2 a 90 dias, foram evidenciadas tanto as alterações histopatológicas já descritas, quanto efeitos nos parâmetros espermáticos e hormonais, em doses inferiores àquelas empregadas nos estudos de exposição única ($\leq 50\text{mg/kg p.c./dia}$) (Dere et al., 2016; Salihi et al., 2017a; 2017b; Breslin et al., 2013). Breslin et al (2013) relataram vários danos histopatológicos testiculares e epididimários em ratos, causados pela administração oral de 20 mg/kg p.c./dia, por 2 ou 7 dias. Essas alterações,

com incidência e gravidade progressivas em relação à dose/duração, incluíram: nos testículos – dilatação e degeneração tubular, esfoliação de células germinativas, vacuolização de células de Sertoli; e nos epidídimos – edema, presença de detritos celulares e redução de espermatozoides intratubulares. Similarmente, no estudo de Dere et al (2016), também foram demonstradas alterações histopatológicas testiculares (dano ao epitélio seminífero, vacuolização de células de Sertoli, retenção da cabeça de espermátides) em ratos, após exposição subcrônica via oral a baixas doses (≥ 30 mg/kg/dia – sem significância estatística na menor dose, mas com indicação de efeito dose-dependente). Salihu et al relataram os seguintes efeitos adversos em ratos expostos a 50 mg/kg p.c./dia via gavagem por 14 dias: I) alterações na morfometria – redução significativa da altura do epitélio dos túbulos seminíferos e do epidídimo, além de redução significativa do comprimento tubular total por testículo e do comprimento tubular por grama de testículo, efeitos relacionados principalmente à descamação das células germinativas localizadas no epitélio seminífero; II) alterações de marcadores enzimáticos de metabolismo energético e função testicular – fosfatase ácida testicular, fosfatase alcalina, glicose-6-fosfato desidrogenase, lactato desidrogenase, ALT e AST; essenciais para a ocorrência de espermatogênese e maturação espermática; e III) alterações no espermograma – redução na motilidade espermática e na contagem de espermatozoides testiculares e epididimários. Similarmente, também foram evidenciadas alterações nos parâmetros espermáticos após exposição oral de camundongos a baixas doses (0,1 a 10 mg/kg/dia) por 5 semanas (Liu et al., 2019; Li et al., 2020). Ou seja, esse conjunto de estudos indica que o CBZ afeta a espermatogênese em baixos níveis de dose, bastante inferiores a 50 mg/kg p.c./dia (500 vezes).

Gray et al (1989, 1990) correlacionaram parâmetros endócrinos e espermáticos com a performance reprodutiva em ratos expostos durante todo o ciclo espermatogênico (do desmame ao acasalamento). Nesse estudo, verificou-se que a maturação/ comportamento sexual, o acasalamento e o parto não foram afetados pela exposição ao CBZ. Entretanto, em ratos machos, foram verificadas alterações na histopatologia testicular e na morfologia dos espermatozoides, além de redução na contagem espermática do epidídimo caudal, nas doses de 50 e 100 mg/kg p.c./dia, as quais são inferiores àquelas associadas à redução de fertilidade. Nos maiores níveis de dose (200 e 400 mg/kg p.c./dia), relatou-se diminuição significativa do potencial reprodutivo, atribuído aos efeitos nos machos, com agrupamento dos animais em duas categorias: I) manutenção da fertilidade: redução em 77% de reservas de espermatozoides caudais e em 50% no nº de espermatozoides testiculares, redução na motilidade espermática e em 25% no peso testicular, aumento de detritos nas amostras de espermatozoides caudais, sem alteração em hormônios sexuais e hipofisários; II) infertilidade: redução a 1% nas reservas de espermatozoides caudais e em 90% no número de espermatozoides testiculares, redução em 50% no peso testicular, presença de atrofia testicular moderada/ severa em 5-6 de 8 animais; aumento nos níveis de FSH séricos e de proteína de ligação de androgênio. Nesse mesmo estudo, dados obtidos em hamsters submetidos ao mesmo protocolo de exposição (somente na dose de 400 mg/kg p.c./dia), indicaram que essa espécie apresenta uma menor sensibilidade aos efeitos tóxicos do CBZ para a reprodução, em comparação aos ratos tratados com a mesma dose. Verificou-se um menor impacto sobre o desempenho reprodutivo de hamsters, sem perda da fertilidade. Esse conjunto de evidências indica que o CBZ induz infertilidade por meio de um mecanismo direto de toxicidade testicular, sendo necessária uma redução severa na contagem espermática para que isso ocorra em roedores.

Yu et al (2009) relataram uma redução dose-dependente significativa do índice de fertilidade, do peso absoluto e relativo dos testículos, e da contagem e motilidade espermáticas, além de várias alterações histopatológicas, após administração de doses $\geq 100\text{mg/kg p.c./dia}$ por 80 dias em ratos (verificação de tendência na menor dose de 20 mg/kg p.c./dia). Essas evidências foram associadas a dados de citometria de fluxo, os quais indicaram que a exposição ao CBZ interfere na espermatogênese ao inibir a transformação meiótica de espermatogônia para espermátócito primário.

Um estudo comparativo relatou uma sensibilidade diferenciada entre ratos e camundongos, com evidências de que o CBZ, após administração intraperitoneal, alcançou o testículo e não causou danos teciduais aparentes ao epitélio seminífero do camundongo, mesmo quando administrado em dose superior a 10 vezes àquela associada à descamação maciça em testículos de ratos (Correa et al., 2002). Similarmente, a administração de CBZ em camundongos via gavagem por 5 dias não causou efeitos adversos na menor dose testada ($250\text{ mg/kg p.c./dia}$) (Evenson et al., 1987). Por outro lado, nos estudos de Liu e colaboradores (2019) e de Li e colaboradores (2020), também conduzidos em camundongos, foram encontradas alterações nos parâmetros espermáticos, inclusive com redução na motilidade espermática em doses $\geq 0,1\text{ mg/kg p.c./dia}$ (menor dose testada). A divergência observada entre os resultados obtidos pelos dois primeiros e pelos dois últimos estudos citados pode ser decorrente não de uma sensibilidade diferenciada entre ratos e camundongos, mas de alguns fatores relativos ao desenho experimental destes estudos: um período de exposição mais prolongado (5 semanas), um maior grupo amostral (30 animais/grupo, o que confere um maior poder estatístico) e a mensuração de parâmetros bastante sensíveis para a avaliação da toxicidade no aparelho reprodutor masculino, como a motilidade espermática (não avaliada nos estudos de Correia et. al., 2002 e Evenson et. al., 1987).

Além dos estudos *in vivo* acima discutidos, dois estudos *ex vivo* (Durand et al., 2017; Pisani et al., 2016), efetuados em culturas de túbulos seminíferos de ratos incubadas com CBZ, relataram efeitos adversos na espermatogênese como: redução de espermátides redondas - precursores dos espermatozóides; alteração na migração de células germinativas pelo epitélio seminífero, interferência hormonal (estrógenos/ andrógenos) e interrupção da meiose.

Com relação aos efeitos hormonais, os dados da literatura mostraram que a exposição ao CBZ promoveu alterações nos níveis séricos de vários hormônios (testosterona, LH, FSH, GnRH, T_3 , T_4 , TSH) em associação aos efeitos adversos sobre a fisiologia reprodutiva acima discutidos. Entretanto, alguns dados foram divergentes entre os diferentes estudos. Os níveis séricos de LH e testosterona, por exemplo, permaneceram inalterados em alguns estudos e sofreram redução em outros. Essas discrepâncias podem ser atribuídas a diferentes protocolos experimentais, bem como ao complexo controle do eixo hipotálamo-hipófise-gônada (Rama et al., 2014).

A PMRA (2011) considerou que as alterações relatadas em alguns estudos da literatura (Goldman et al., 1989; Rehnberg et al., 1989) foram secundárias aos efeitos tóxicos diretos do CBZ sobre as gônadas, de forma compensatória na regulação hipotalâmica e hipofisária do testículo. Isto é, os efeitos hormonais pareceram ocorrer indiretamente, como resultado de dano testicular induzido por CBZ, e não por interferência hormonal direta.

Yamada et al (2005) relataram ausência de efeito androgênico/antiandrogênico e estrogênico associado ao Benomil e discutiram que a alteração observada no peso dos órgãos deve estar associada a mecanismos que não são mediados por receptor de esteroide, mas sim à interferência na montagem de microtúbulos. Similarmente, Rama et al. (2014) também relataram ausência de efeito estrogênico, antiestrogênico e antiandrogênico. Além disso, como mencionado anteriormente, o controle do eixo hipotálamo-hipófise-gônada é bastante complexo e pode ser modulado diferencialmente, dependendo dos níveis plasmáticos de compostos químicos com um modo de ação endócrino.

Adicionalmente, verificou-se que o CBZ afetou negativamente a esteroidogênese testicular: uma única dose (200 mg/kg p.c./dia via gavagem) reduziu a expressão da proteína reguladora aguda esteroidogênica (StAR) e da proteína de ligação a andrógenos (ABP), com redução concomitante da atividade das enzimas esteroidogênicas (Adedara et al., 2013). Em oposição, após exposição repetida por 85 dias via gavagem, verificou-se aumento no nível testicular e sérico de ABP e no nível de testosterona testicular, sem alteração no seu nível sérico, em doses ≥ 200 mg/kg p.c./dia (Rehnberg et al., 1989).

Goldman et al (1989) relataram infertilidade associada ao aumento nos níveis de FSH sérico (somente nos animais inférteis), em ratos expostos a doses ≥ 200 mg/kg p.c./dia, a partir do desmame por 85 dias, sem alteração nas dosagens de prolactina, TSH e testosterona. Adicionalmente, esse estudo relatou aumento de LH hipofisário sem alteração no nível sérico (somente na maior dose e sem distinção entre férteis e inférteis) e aumento de GnRH hipotalâmico (somente na menor dose). Esses resultados foram atribuídos tanto aos sinais de *feedback* entre a célula de Sertoli-hipófise (redução na produção de inibina-B pela célula de Sertoli induz liberação de FSH pela hipófise) quanto aos efeitos diretos do CBZ no sistema nervoso central (LH e GnRH).

Gray et al (1990) discutiram que o CBZ não parece atuar diretamente no eixo hipotálamo-hipófise, mas sim por meio de efeitos diretos na célula de Sertoli, posto que não foram verificadas alterações no desenvolvimento puberal, indicando maturação normal do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. Além disso, o perfil de alterações endócrinas relatado nos machos foi característico de compostos que afetam a espermatogênese e induzem a “síndrome de células de Sertoli” (aplasia germinativa), na qual se verifica níveis normais de LH e testosterona séricos, com redução nos níveis de inibina-B e consequente aumento no FSH sérico. Alguns estudos também indicaram perfil hormonal semelhante (Pacheco et al., 2012; Erdos et al., 2013; Breslin et al, 2013), enquanto outros indicaram redução de testosterona sérica (Salihu et al., 2017b; Rajeswary et al., 2007) e ausência de alteração nos níveis séricos de FSH (Yu et al., 2009; Moffit, et al., 2013).

Rajeswary et al (2007) relataram que o CBZ não alterou LH e prolactina, mas reduziu testosterona e estradiol séricos, além de induzir redução significativa na atividade das enzimas esteroidogênicas e antioxidantes nas células de Leydig, após administração de CBZ via gavagem (25 mg/kg p.c./dia) por 48 dias. Esse estudo demonstrou que a exposição crônica a baixas doses de CBZ é capaz de induzir TR por meio de um efeito direto nos testículos, com indução de estresse oxidativo nas células de Leydig. Essas alterações foram transitórias, com retorno ao estado basal em 48 dias sem exposição. Similarmente, Salihu et al (2017b) também relataram que as dosagens de LH e prolactina não foram afetadas após exposição via gavagem a 50 mg/kg p.c./dia por 14 dias. Porém, descreveram um aumento nos níveis plasmáticos de FSH e redução de testosterona.

Mecanismos de toxicidade no sexo masculino

O maior número de evidências atribui a TR induzida pelo CBZ a sua capacidade de interação à β -tubulina, com consequente impedimento da montagem de MT. Então, sabe-se que o CBZ afeta a espermatogênese, inclusive a etapa de espermiogênese, sendo esses efeitos observados em diferentes tipos celulares: nas células da linhagem espermatogênica e nas células de Sertoli. Os principais eventos-chave afetados pela interação de CBZ com β -tubulina, e suas consequências em cada estágio da espermatogênese, são: 1) formação inadequada do fuso acromático durante a mitose das espermatogônias e durante as meiose I e II de espermátocitos, resultando em gametas masculinos aneuplóides (conforme já discutido no Parecer nº 1/2021/SEI/CREAV /GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA - SEI nº 1309909); 2) problemas durante a diferenciação das espermátides (alterações no núcleo, acrossomo e manchete) e redução da motilidade durante a espermiogênese, as quais podem ser resultantes de anormalidades morfológicas decorrentes da aneuploidia induzida nos espermatozoides, bem como por efeito direto sobre os MT presentes no flagelo; 3) descamação precoce de células germinativas imaturas e de fragmentos de células de Sertoli no lúmen dos túbulos seminíferos, levando a um aumento do diâmetro do túbulo e atrofia (Rama et al., 2014; Pisani, 2016). Quanto ao item 2, o CBZ afeta a estrutura das manchetas, anéis de MT responsáveis pela diferenciação celular de espermátides redondas para alongadas. Estudos demonstraram anomalias no formato do núcleo e na morfologia dos acrossomas nas espermátides, resultando em acrossomas descontínuos, multivesiculares ou ausentes, sendo essa configuração anormal decorrente da estrutura irregular das manchetas (Nakai et al., 1997a, Nakai et al., 1998b). Ainda com relação ao item 3, Nakai & Hess (1994) relataram que, após exposição ao CBZ, o número de MT é reduzido na porção basal das células de Sertoli e aumentado na região apical. Consequentemente, as células germinativas perdem aderência ao túbulo e sofrem descamação juntamente com o citoplasma apical das células de Sertoli, sendo, portanto, esse efeito também dependente dos MT.

Além disso, o CBZ afeta tanto os ductos intratesticulares, como os ductos eferentes, quanto os ductos extratesticulares, como o ducto epididimário. O conjunto de evidências indica que, em poucas horas após exposição, ocorre oclusão dos ductos pela presença de células germinativas imaturas descamadas e espermatozoides, o que acarreta um processo inflamatório. Posteriormente, observa-se distensão dos ductos por conteúdo luminal altamente compactado, severa desorganização epitelial e presença de células inflamatórias. Por fim, ocorre proliferação epitelial e formação de microcanais (ductos pequenos anormais) ao redor do lúmen original, o qual é preenchido por tecido conjuntivo fibrótico (Nakai, 1993). Essas alterações podem ser secundárias aos efeitos nos testículos.

Adicionalmente, alguns estudos mecanísticos indicaram que os efeitos de TR atribuídos ao CBZ podem estar associados à indução de estresse oxidativo, com redução de várias enzimas antioxidantes e aumento de marcadores de peroxidação lipídica (Adedara, 2013; Rajeswary et al., 2007; Sakr e Shalaby, 2014), como também à indução de apoptose de células germinativas masculinas (Adedara, 2013) pelo CBZ. Entretanto, esses efeitos podem ser secundários ao dano testicular causado pelo mecanismo de ação discutido nos parágrafos acima e já bem estabelecido para o CBZ. Outros estudos ainda investigaram um potencial mecanismo de ação endócrino para a indução desses efeitos, conforme discutido no item anterior. Porém, essas evidências sugerem que os efeitos hormonais parecem ocorrer

indiretamente, em resposta ao dano testicular induzido por CBZ, e não por interferência hormonal direta.

Limiar para os efeitos no sexo masculino

Na avaliação quantitativa da dose-resposta associada aos desfechos de TR, presume-se a ocorrência de um padrão não linear (existência de limiar), a menos que dados mecanísticos indiquem o contrário (USEPA, 1996). Essa abordagem se fundamenta na existência de mecanismos homeostáticos, compensatórios ou adaptativos que acontecem em etapas anteriores à manifestação do efeito tóxico e são utilizados pelas células e órgãos do sistema reprodutivo. Nessa abordagem não-linear, os valores de referência são derivados por meio da aplicação de fatores de incerteza adequados a um ponto de partida (PoD) – NOAEL, LOAEL ou BMD (*benchmark dose*), de modo a se obter um nível mínimo de exposição no qual a probabilidade de ocorrência do desfecho seja baixa (USEPA, 1996).

Entretanto, a partir dos dados disponíveis, não é possível a determinação de um limiar para a ocorrência dos efeitos adversos sobre a fisiologia reprodutiva masculina. A princípio porque, considerando os efeitos de TR nas células germinativas que são consequência da ação aneugênica do CBZ e, conforme discutido no Parecer nº 1/2021/SEI/CREAV/GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA (SEI nº 1309909), não há evidência disponível que permita estimar uma dose segura *in vivo* na qual não se espere a ocorrência desses danos cromossômicos às células germinativas em humanos, posto que foi verificada aneuploidia em espermátides de ratos já na menor dose testada, com definição de um valor de LOAEL igual a 50 mg/kg p.c..

Essa conclusão alcançada para o potencial mutagênico já seria suficiente para, em alinhamento, se optar pela impossibilidade de determinação de um limiar de dose seguro para o CBZ capaz de impedir a ocorrência dos efeitos de TR aqui detalhados. Porém, em acréscimo, também cabe mencionar que não é possível a definição de um NOAEL para os efeitos de TR no sexo masculino porque estes já foram relatados nas menores doses testadas em todos os estudos analisados. Isto é, foram encontradas alterações histopatológicas no testículo e epidídimo de ratos em doses ≥ 20 mg/kg p.c./dia, administrada por gavagem por 2 ou 7 dias (Breslin et al., 2013); e, em doses ainda menores em camundongos (0,1 a 10 mg/kg p.c./kg, via gavagem por 5 semanas) foram verificadas alterações em parâmetros mais sutis de dano testicular, com redução na motilidade espermática inclusive na dose de 0,1 mg/kg p.c./dia (Liu et al, 2019; Li et al., 2020). A motilidade espermática pode ser um dos primeiros e mais sensíveis parâmetros para avaliação da toxicidade no aparelho reprodutor masculino (Hood, 2012). Portanto, a menor dose testada dentre todos os estudos realizados com roedores (0,1 mg/kg p.c./kg) já foi capaz de causar efeitos adversos no aparelho reprodutor masculino, sendo esta 500 vezes inferior ao LOAEL definido para aneugenicidade em células germinativas (50 mg/kg p.c.).

Isso reforça que outros mecanismos relacionados à despolimerização dos microtúbulos, e não somente seu efeito antimitótico, podem estar atuando. De fato, conforme evidenciado nos estudos mecanísticos já discutidos, o CBZ interfere em outras funções além da divisão celular, como na diferenciação das espermátides em espermatozoides (espermio gênese) e na estrutura das células de Sertoli, em cujas reentrâncias as células da linhagem espermatogênica se alojam e que ainda realizam as funções de produção de fluido

e fagocitose de corpos residuais das espermatídes. Esses efeitos são também decorrentes da interação do CBZ com a β -tubulina, pois, além da formação adequada do fuso acromático, os MT desempenham diversas e importantes funções nas células, quais sejam: localização do centro da célula e posicionamento de diferentes organelas (aparelho de Golgi, retículo endoplasmático, mitocôndrias, dentre outras) no interior da célula; manutenção do formato e migração celular, transporte de carga dentro das células etc (Alberts et al, 2017). Então, todos esses efeitos, que ocorrem em conjunto, dificultam ainda mais a definição de um limiar de dose seguro para o CBZ.

Quadro 2: Avaliação dos potenciais efeitos na função sexual ou capacidade reprodutiva masculina após exposição única ao CBZ.

Referência	Protocolo	Resultados segundo autor	Limitações, inconsistências e considerações relevantes	Conclusão
Nakai et al., 1998a	Pureza: Não informada. Linhagem: Ratos <i>Wistar</i> ♂. Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> – CBZ administrado em dose única (100 mg/kg p.c.; via gavagem) a animais de 25 a 30 dias de idade (n= 18). Eutanásia em D₃ (n=5), D_{4,5} (n=6) e D_{7,5} (n=7) pós-tratamento. Grupo ctl (n=3): 25 e 26 dias de idade; eutanásia em D₃ e D_{7,5}. Análise histopatológica.	• ↑* incidência de espermátides redondas mega e binucleadas, em animais pré-púberes expostos ao CBZ, com o seguinte detalhamento quanto aos estágios de túbulos seminíferos e intervalos pós-tratamento: • D₃: ↑* em todos os estágios (~ 85% no grupo II-III); • D_{4,5}: ↑* nos estágios IV-V e VI-VII (~ 72% no grupo IV-V); • D_{7,5}: ↑* no grupo VI-VII (~ 66%); ↓* no II-III; e ↓ no IV-V, indicando que essas alterações parecem ser limitadas às primeiras gerações de espermátides; • Dados indicam que, provavelmente, o CBZ atua sobre espermatócitos imediatamente antes e durante a divisão meiótica (estágio XIV), bem como em espermátides de etapa 1-5, em testículos pré-púberes.	• Sem informações quanto à toxicidade sistêmica. • Impossibilidade de avaliar efeito dose-dependente, pois somente um nível de dose foi utilizado. • Número reduzido de animais para análise. • Classificação dos túbulos seminíferos em grupos representativos de três estágios (II-III, IV-V e VI-VII); avaliação quanto à presença de uma ou mais espermátides mega (núcleo aumentado) e/ou binucleadas, com registro do % túbulos apresentando essas anormalidades.	POSITIVO LOAEL = 100 mg/kg p.c./dia (única dose testada)
Nakai et al., 1997a	Pureza: Não informada; Linhagem: Ratos <i>Sprague-Dawley</i> ♂; Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> – CBZ administrado em dose única (100 mg/kg p.c.; via gavagem; n= 5-6/ grupo); eutanásia, coleta e preparo histológico nos D_{7,5}; D_{9,5}; D₁₀ e D_{10,5} pós-tratamento; grupo controle: D_{7,5}. Análise tecidual por microscopia óptica e eletrônica de transmissão.	• Anormalidades no núcleo: I) distorções nucleares em espermátides alongadas (estágios X-XI nos D₁₀ e D_{10,5}): núcleos com contorno ondulado ou irregular, circundados por agregados densos de manchete de MT; distorção nuclear também observada em células binucleadas. II) diferentes tipos de invaginações nucleares: em espermátides mono, binucleadas e deficientes em acrossomo (estágios IX-XI nos intervalos a partir D_{9,5}); III) alteração no envoltório nuclear. • Anormalidades no acrossomo: I) fragmentação/descontinuidade: D_{7,5} (espermátide redonda no estágio VII); D₁₀ e D_{10,5} (espermátide alongada nos estágios X-XI); retardo na espermiogênese (estágio XI no D_{10,5}), observado em núcleos de	• Sem informações quanto à toxicidade sistêmica. • Impossibilidade de avaliar efeito dose-dependente, pois somente um nível de dose foi utilizado. • Algumas alterações foram específicas para o tratamento com CBZ – células com múltiplas cavidades nucleares e envelope nuclear modificado; acrossomo com aparência granular – enquanto as demais relatadas foram comuns a demais compostos que também induzem	POSITIVO LOAEL = 100 mg/kg p.c./dia (única dose testada)

		megaspermátides redondas com acrossomos fragmentados; II) ausência de acrossomo em espermátides (estágios VII-X nos D_{7,5}-D₁₀); Anormalidades na manchete: posicionamento irregular das manchetes de MT (estágios IX-XI a partir de D_{9,5}), resultando em invaginações nucleares.	anormalidades espermáticas (colchicina, taxol, dentre outros).	
Nakai et al., 1995	Pureza: Não informada; Linhagem: Ratos <i>Sprague-Dawley</i> ♂; Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> – grupo exposto (n=8) a dose única (400 mg/kg p.c.; via gavagem); grupo ctl (n=7); em 3h pós-tratamento: eutanásia, coleta e preparo histológico dos testículos, análise tecidual por microscopia óptica e reconstrução computacional tridimensional.	- CBZ induziu ↑* nº túbulos seminíferos com descamação de espermátides imaturas alongadas; - Alteração no perfil nuclear das células de Sertoli: I) nos casos de descamação: ↓* nº de núcleos com posicionamento paralelo e perpendicular; ↑* nº núcleos com formato circular (predominantes), em relação ao controle; II) nos casos sem descamação: ↑* nº núcleos com posicionamento perpendicular e ↓* nº de núcleos com posicionamento paralelo (em relação ao controle e ao grupo com descamação); - Alteração no formato do corpo das células de Sertoli: nos casos de descamação, ↓* nº células com formato colunar alto e predominância de células com formato cônico, sugerindo um deslocamento do citoplasma em direção à porção basal, o que resulta em clivagem na região apical e liberação de espermátides imaturas para o lúmen do túbulo seminífero.	- Sem informações quanto à toxicidade sistêmica. - Impossibilidade de avaliar efeito dose-dependente, pois somente um nível de dose foi utilizado. - Alteração no formato nuclear das células de Sertoli mesmo na ausência de descamação induzida pelo CBZ (dados não discutidos satisfatoriamente).	POSITIVO LOAEL = 400 mg/kg p.c./dia (única dose testada)
Nakai et al., 1992 Apud APMVA, 2009; PMRA, 2011, EFSA, 2009; USEPA, 2020	Pureza: Não informada; Linhagem: Ratos <i>Sprague-Dawley</i> ♂; Delineamento: Estudo <i>in vivo</i>: CBZ administrado em dose única, via gavagem. <u>Protocolo 1:</u> Tempo-resposta (n = 8/ tempo): eutanásia em 2, 4, 8 ou 24 horas e 4, 8, 16 ou 32 dias pós-exposição (0 e 400 mg/kg p.c.);	<u>Protocolo 1:</u> - Em 8h pós-exposição; 400 mg/kg p.c.: ↑peso dos testículos e posterior ↓nº espermátides e na % espermatozoides caudais morfologicamente normais, com duração desses efeitos pelos 32 dias de análise. <u>Protocolo 2:</u> 2d pós-exposição: 50mg/kg - liberação de células germinativas imaturas (espermátides redondas de estágio I e II; espermátides alongadas de estágio VII); ≥ 100mg/kg - ↑dose-dependente no peso testicular, de oclusões nos ductos eferentes	Nenhum NOAEL foi estabelecido devido à toxicidade testicular observada na menor dose (liberação prematura de células germinativas imaturas em 2d pós-exposição, atrofia dos túbulos seminíferos e oclusão dos dutos eferentes). Esses efeitos persistiram por pelo menos 70 dias.	POSITIVO LOAEL = 50mg /kg p.c. (alinhada com APMVA e PMRA) (EFSA considerou NOAEL = 50

	<u>Protocolo 2:</u> Dose-resposta: eutanásia em 2d (n = 8/dose) e 70d (n=12/dose) pós-exposição (0, 50, 100, 200, 400 ou 800 mg/kg).	(severa inflamação e desorganização do epitélio; ≥50% ductos ocluídos), causadas por conteúdo luminal compactado, granulomas espermáticos, mineralização e obliteração do lúmen original por tecido conjuntivo fibrótico; ausência de células germinativas; ≥ 200mg/kg - ausência de células germinativas na maioria dos estágios de túbulos seminíferos; ≥ 400mg/kg - ↑ diâmetro médio dos túbulos seminíferos; 70d pós-exposição: ↓ dose-dependente no peso testicular e no diâmetro dos túbulos seminíferos, com efeitos mínimos associados à menor dose testada. Atrofia de túbulos seminíferos (contendo principalmente células de Sertoli e poucas espermatogônias e circundados por membrana basal espessa) parece ser decorrente do processo de oclusão associado à exposição às maiores doses (≥ 100mg/kg).		mg/kg; alterações mínimas observadas nessa dose foram consideradas de relevância toxicológica equívoca)
Nakai et al., 1998b	Pureza: Não informada; Linhagem: Ratos <i>Sprague-Dawley</i> ♂; Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> – CBZ administrado em dose única (100 mg/kg p.c.; gavagem). Eutanásia, coleta e preparo histológico pós-tratamento (n = 4 - 5): D_{1,5}; D₃, D_{4,5} e D_{7,5}. Grupo ctl: amostragem em D_{7,5}. Análise tecidual por microscopia eletrônica e Imunocitoquímica (ICQ).	Anormalidades no desenvolvimento acrossômico de espermátides observadas nos três intervalos estudados: D₃: a) túbulos em estágio III – espermátides de etapa 1 apresentando vesículas proacrossômicas com grânulos, sem a presença de vesícula acrossômica evidente; espermátides de etapa 3 apresentando núcleo com recuo de vesículas acrossômicas; b) túbulos em estágio V – espermátides de etapa 5 apresentando conexões diretas entre a face trans das pilhas de Golgi e a membrana acrossomal externa; D_{4,5}: a) túbulos em estágios IV e V – espermátides com acrossomos menos desenvolvidos (etapas 1 e 3) e com múltiplas vesículas acrossômicas; b) túbulos em estágio V e VII – espermátides de etapa 5 e 7, respectivamente, apresentando conexões diretas entre a face trans das pilhas de Golgi e a membrana acrossomal externa; D_{7,5}: túbulos em estágio VII – espermátides sem formação de acrossomo, bem como nas etapas 3-5 de	- Pequeno grupo amostral; - Utilização de somente 2-3 animais na análise ICQ para detecção da proteína MN7 (associada ao processo de desenvolvimento acrossômico); - Classificação da espermatogênese de testículos de rato em 14 estágios, com base nas associações de células germinativas dentro dos túbulos seminíferos; espermátides em cada um desses estágios mostram um desenvolvimento sincronizado de acrossomo.	POSITIVO LOAEL = 100 mg/kg (única dose testada)

		desenvolvimento; espermátides de etapa 7 apresentando conexões diretas entre a face trans das pilhas de Golgi e a membrana acrossomal externa; Padrão anormal de imunomarcção (mMN7) em espermátides expostas ao CBZ: ocorre perturbação do suprimento de material do complexo de Golgi para os acrossomos, possivelmente causando desenvolvimento anormal durante a fase precoce da espermiogênese.		
Nakai et al., 1994	Pureza: Não informada; Linhagem: Ratos <i>Sprague-Dawley</i> ♂; Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> – CBZ administrado em dose única (gavagem; 400 mg/kg p.c.; n = 5); grupo ctl (n = 4); em 3h pós-tratamento: eutanásia, coleta e preparo histológico dos testículos, análise tecidual por microscopia óptica e eletrônica.	• Descamação de espermátides maduras (maioria); e de células germinativas imaturas (espermátides arredondadas e espermatócitos) junto com o citoplasma apical das células de Sertoli (com manutenção do formato original e dos MT), em todos os estágios da espermatogênese, exceto nos III-V; • Alteração na distribuição de mitocôndrias, corpos densos e RE – ao invés de estarem ao longo dos microtúbulos, foram encontrados em agregados; • Mecanismo: Redução no nº de MT na região do corpo das células de Sertoli, sem alteração nos MT presentes nas regiões apicais, o que causou clivagem pela retração de organelas citoplasmáticas na região basal e inchaço do RE.	• Pequeno grupo amostral; • Impossibilidade de observar efeito dose-dependente, pois somente um nível de dose foi utilizado. • Alta dose aguda. • Não foi relatado racional para escolha da dose ou dados de outros efeitos adversos observados, para possibilitar conclusão quanto à toxicidade sistêmica.	POSITIVO LOAEL = 400 mg/kg (única dose testada)
Nakai et al., 2002	Pureza: Não informada; Linhagem: Ratos Sprague - Dawley (10-13 semanas); Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> – CBZ administrado em dose única (gavagem; 400 mg/kg p.c.); Intervalos de avaliação: 45 min (n=2), 60 min (n=6), 90 min (n=4), 120 min (n=8), 150 min (n=2) e 180 min (n=3) pós-tratamento. Análise histopatológica de 100 túbulos seminíferos/ testículo.	• 90 min: Lacunas entre espermátides alongadas e redondas no final do estágio VI até início de VII (indica pré-descamação); ↓ tubulina em túbulos seminíferos com pré-descamação e nível normal em túbulos sem alterações. Microscopia eletrônica (ME) indicou presença de alguns microtúbulos intactos. • 120 e 150 min: descamação no final do estágio VI até início do VII e do XIII-XIV; ↓ tubulina em túbulos seminíferos com descamação; ME indicou poucos microtúbulos. • 180 min: descamação no estágio I, final do estágio VI até início do VII, estágios IX-XI e do XIII-XIV; • Desfecho é dependente da susceptibilidade dos microtúbulos no estágio específico de	• Pequeno grupo amostral em determinados tempos de exposição; • Avaliação semiquantitativa (frequência)/ qualitativa. Imunocitoquímica não quantitativa. • Alta dose aguda.	POSITIVO LOAEL = 400 mg/kg (única dose testada)

		espermatogênese. Hipóteses: 1) ação sobre as proteínas associadas aos MT (promovem estabilização do MT e competem com o CBZ pela ligação à tubulina) e 2) modificação da tubulina, levando à despolimerização de MT.		
Correa et al., 2002	Pureza: Não informada; Linhagem: Camundongos <i>Swiss Webster</i> e ratos <i>Sprague-Dawley</i> ♂; Delineamento: <u>Grupo 1 (n = 4; camundongos):</u> CBZ administrado (2000 mg/kg p.c. - via i.p.) em dose única. Eutanásia em 2, 3 ou 6h pós-tratamento para análise microscópica (100 seções de túbulo seminífero/ testículo) e IHQ (α- e β-tubulina); eutanásia em 5, 15, 30, 60, 90 e 120 min pós-tratamento para determinação dos níveis testiculares de CBZ. <u>Grupo 2 (n = 3; ratos):</u> CBZ administrado (164 mg/kg p.c.; via i.p.) em dose única, com coleta de testículos em 15 min pós-tratamento.	- Ausência de diferença na histopatologia e marcação imunohistoquímica, na comparação entre camundongos controle e tratados (em todos os tempos de análise), indicando que CBZ não induz descamação de células germinativas ou perda da estrutura dos MT no testículo de camundongos; - Controle positivo (grupo 2): testículos de ratos apresentaram descamação maciça, com diferença significativa em relação ao grupo controle correspondente; - Tempo para concentração máxima foi de 5min pós-tratamento, em camundongos, e de 15min pós-tratamento, em ratos; com perfis ao longo do tempo muito semelhantes entre as espécies animais.	- Pequeno grupo amostral; - Impossibilidade de observar efeito dose-dependente, pois somente um nível de dose foi utilizado; - Dose aguda muito alta via i.p. para camundongos; - Autores relataram que ainda é desconhecido o mecanismo subjacente à sensibilidade diferenciada entre ratos e camundongos, tendo em vista as evidências de que o CBZ está presente no testículo do camundongo em concentrações maiores ou iguais àquelas verificadas no testículo de ratos.	NEGATIVO NOAEL = 2000 mg/kg (única dose testada)
Nakai et al., 1993	Pureza: Não informada; Linhagem: Ratos <i>Sprague-Dawley</i> ♂; Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> – CBZ administrado (gavagem; 0, 100, 200, 400 ou 800mg/kg p.c.); eutanásia no D₂ (n = 8) e D₇₀ (n = 12) pós-tratamento; grupo adicional (n = 4): CBZ administrado (400 mg/kg p.c.) com eutanásia no D₄, D₈, D₁₆ e D₃₂ pós-tratamento. Análise tecidual por	- D₂: obstrução e distensão dos ductos eferentes por células germinativas imaturas descamadas e espermatozoides, com sinais de inflamação; - D₄ e D₈: distensão dos ductos por conteúdo luminal altamente compactado, com severa desorganização epitelial e presença de células inflamatórias; - D₁₆: proliferação epitelial e presença de microcanais (ductos pequenos anormais) ao redor do lúmen original; - D₃₂ e D₇₀: preenchimento do lúmen ocluído por tecido conjuntivo fibrótico, circundado por ductos anormais;	- Pequeno grupo amostral em alguns grupos; - Doses altas; - Não foram relatados dados de outros efeitos adversos observados, para possibilitar conclusão quanto à toxicidade sistêmica.	POSITIVO NOAEL / LOAEL = ND (estudo não detalha a dose em que se observou cada efeito)

	microscopia óptica e eletrônica (epidídimo e ducto eferente).	Ductos eferentes ocluídos foram capazes de formar novos ductos, os quais, entretanto, são anormais e ainda exibem azoospermia no D₇₀.		
Nakai e Hess, 1997b	Pureza: Não informada; Linhagem: Ratos <i>Sprague-Dawley</i> (90 a 100 dias); Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> – CBZ administrado (gavagem; 100 mg/kg p.c.; n = 5-6) em dose única. Histopatologia dos testículos em 8 horas e 1,5; 4,5; 7,5; 10,5 e 20 dias pós-tratamento.	8 horas: descamação de espermatídes alongadas; necrose de espermatócitos em divisão nos túbulos estágio XIV; 1,5 dias: espaços vazios nos túbulos de estágio I (ausência de espermatídes imaturas); 4,5 e 7,5 dias: ausência de espermatídes redondas e alongadas normais, presença de megaspermátides (núcleo 33% maior do que o normal) e espermatídes binucleadas; 10,5 dias: ausência de espermatídes alongadas, espermatídes de diferentes estágios na mesma seção de túbulo, espermatídes binucleadas, alongadas com forma anormal, com cabeça distorcida e invaginação nuclear com agregados de microtúbulos; 20 dias: espaços vazios com ausência de espermatócitos; - Efeito direto na meiose de espermatócitos e efeitos latentes nas espermatídes, levando a anormalidades e falha da espermiogênese. Os efeitos foram observados independentemente da ocorrência de oclusões nos ductos deferentes.	- Pequeno grupo amostral. - Impossibilidade de observar efeito dose-dependente, pois somente um nível de dose foi utilizado.	POSITIVO LOAEL = 100 mg/kg (única dose testada)
Moffit et al., 2007	Pureza: Alta pureza; Linhagem: Ratos <i>Fischer</i> ♂ adultos; Delineamento: Estudo <i>in vivo</i>: CBZ administrado (n = 6-10/ grupo; gavagem – 40, 67, 100 ou 200 mg/kg p.c.) em dose única. Eutanásia em 24h pós-tratamento; análise histopatológica e da indução de apoptose.	↑* dose-depedente no peso testicular, na indução de apoptose de células germinativas, no diâmetro de túbulos seminíferos e na % túbulos com descamação do epitélio seminífero (≥67 mg/kg); ↑ %túbulos com > 3 cabeças de espermatídes retidas (≥200 mg/kg); - Indução de toxicidade para células de Sertoli: ↑vacuolização (≥67 mg/kg).	OBS: Análise de 50 túbulos seminíferos/ testículo – registro de descamação, presença de vacúolos e retenção da cabeça de espermatídes (% túbulos totais afetados).	POSITIVO NOAEL = 40 mg/kg
Kadalmani et al., 2002	Pureza: Alta pureza; Linhagem: Ratos Wistar;	Perda de espermatócitos em paquíteno nos túbulos de estágio II a V;	Sem informações quanto à toxicidade sistêmica;	POSITIVO

	Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> – CBZ administrado em dose única (gavagem, 400 mg/kg p.c., n=10). Eutanásia e histopatologia em 48h pós-tratamento.	• Perda de espermátides alongadas em túbulos do estágio XIV; • Assincronia da espermatogênese, com células meióticas do estágio XIV e espermatócitos em diplóteno com nucléolo proeminente, característico de estágio XIII; • Descamação de células germinativas e fibrose em alguns túbulos seminíferos.	• Impossibilidade de avaliar efeito dose-dependente, pois somente um nível de dose foi utilizado.	LOAEL = 400mg/kg (única dose testada)
Markelewicz, 2004	Pureza: Alta pureza; Linhagem: Ratos Fischer; Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> – CBZ administrado em dose única (gavagem; 200 mg/kg, n = 7-9). Eutanásia e avaliação do testículo em 24h pós-tratamento.	• ↑* vacuolização e descamação; • ↓* diâmetro túbulos seminíferos.	• Impossibilidade de avaliar efeito dose-dependente, pois somente um nível de dose foi utilizado; • Pequeno grupo amostral.	POSITIVO LOAEL = 200 mg/kg (única dose testada)
Kawata et al., 2020	Pureza: Alta pureza; Linhagem: Ratos machos <i>Sprague-Dawley</i>; Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> – CBZ administrado via gavagem (400 mg/kg p.c.; n = 3-5 animais/grupo) em dose única. Avaliação de parâmetros séricos (ALT, BUN, CPK, creatina), histopatologia e de miRNA em 24 horas pós-exposição.	• Histopatologia: degeneração de espermatócitos, vacuolização de células de Sertoli, dilatação de túbulos seminíferos; • Parâmetros séricos: Sem diferença estatística; • miRNA: seleção de candidatos como biomarcadores para dano testicular que precisarão ser avaliados em ensaios clínicos.	• Pequeno grupo amostral. • Impossibilidade de avaliar efeito dose-dependente, pois somente um nível de dose foi utilizado. • Alta dose.	POSITIVO LOAEL = 400 mg/kg (única dose testada)
Gotoh et al., 1999	Pureza: Não informado; Linhagem: Ratos <i>Sprague-Dawley</i> ♂ (90-100 dias de idade); Delineamento: Estudo <i>in vivo</i>: 1) CBZ administrado via gavagem (dose única de 100 mg/kg p.c.) com análise em 8,	• ↑* peso médio dos testículos com ductos eferentes (DE) parcialmente permeáveis; ↓* peso médio dos testículos com DE totalmente ocluídos; • Histopatologia: a maior parte dos túbulos seminíferos dos testículos com DE intactos foram normais, enquanto os testículos com DE parcialmente permeáveis continham túbulos seminíferos normais, degenerativos e atróficos em	• 100 túbulos seminíferos foram examinados quanto à presença de anormalidades; • Estudo objetivou demonstrar como o dano testicular de longo prazo depende da permeabilidade de ductos eferentes (DE).	POSITIVO LOAEL = 100 mg/kg p.c. (única dose testada)

	16, 32 e 70d pós-tratamento (n = 5-6/ grupo); controle analisado em 8d (n = 3) e em 70d (n = 3) pós-tratamento. Coleta e análise de testículos e epidídimos.	várias frequências, dependendo do número de DE permeáveis; ↑nº DE permeáveis com ↑nº túbulos seminíferos normais, em qualquer intervalo de análise; nº túbulos seminíferos normais aumentou progressivamente à medida que o intervalo pós-tratamento aumentou, independentemente da permeabilidade dos DE. Nos testículos com total oclusão dos DE, túbulos seminíferos atróficos foram os mais numerosos.		
Lim and Miller, 1997a	Pureza: > 97%; Linhagem: Ratos <i>Sprague-Dawley</i> pré-puberai (23-28 dias) e pós (83-90 dias); Delineamento: Administração de CBZ (via i.p.; 164 mg/kg p.c.) em dose única a ratos pós e pré-puberai. Coleta de sangue (5, 15, 30, 60 e 120 min, n = 4). Nível testicular (5, 15, 30, 60 e 120 min; n = 3). Obtenção de tubulina testicular de ratos pós (n=5) e pré-puberai (n=10) para avaliação da montagem de MT (CBZ 5 e 10 µM pré-incubado com tubulina por 20 minutos).	• Pré-puberai: dano testicular leve; • Pós-puberai: descamação do epitélio seminífero, vacuolização e isg de túbulos seminíferos. Aumento de severidade dose dependente; • A inibição da associação de MT pelo CBZ foi similar para tubulina de ratos pré e pós puberai; • Os níveis sanguíneos de CBZ nos ratos pré-puberai atingiram valores menores mais rapidamente do que nos pós-puberai. Animais mais jovens eliminaram o CBZ mais rapidamente; • Maior concentração de CBZ foi encontrada no testículo de animais adultos (210, 52 x 67,77 nmol/g); • Quando o CBZ foi administrado diretamente nos testículos, animais mais jovens também apresentaram mais danos testiculares, porém sem descamação (não esperada, já que os animais jovens não possuem espermatídes alongadas).	• Exposição intraperitoneal e intratesticular; • Pequeno grupo amostral; • Diferenças nos resultados podem decorrer apenas da farmacocinética diferencial entre jovens e adultos e da ausência de espermatídes alongadas.	POSITIVO LOAEL = 164 mg/kg p.c. (única dose testada)
Lim et al., 1997b	Pureza: Benomil (>95%; contaminação 10% CBZ); CBZ (não informado); Linhagem: Ratos <i>Sprague-Dawley</i> ♂; Delineamento: <u>Estudo <i>in vivo</i>:</u> Adm. de benomil (250 mg/kg ip; 400µg intratesticular) e CBZ (164 mg/kg ip; 262µg intratesticular); eutanásia (1-2h pós-tratamento) com coleta de testículo	<i>In vivo:</i> <u>Histopatologia (n=4)</u> • ↓* % túbulos normais; ↑* % túbulos com vacuolização e descolamento do epitélio seminífero, seguido de descamação de células germinativas imaturas (em 1 e 2h pós-tratamento ip e it); • Severidade do dano aumentou com concentração testicular de CBZ e com intervalo pós-tratamento; <u>Dosagem nos testículos (n=3):</u>	• Grupo amostral pequeno; • Foram investigados desfechos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>; efetuada correlação da resposta com os níveis testiculares reais de benomil e CBZ; • Histopatologia: análise de 100-150 secções de túbulo seminífero/ animal; • Autores informaram que, apesar dos desfechos verificados <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>, tal estudo não pode	POSITIVO LOAEL = 164 mg/kg p.c. (única dose testada)

	para histopatologia, dosagem de benomil, CBZ e outros metabólitos (medição em 5, 15, 30, 60, 90 e 120min pós-tratamento); <u>Estudo <i>in vitro</i>:</u> Purificação de tubulina testicular (n = 8 ratos) e análise da inibição da montagem de MT após incubação com benomil (10, 50 e 100 µM) e CBZ (5 e 10µM – como contaminante do benomil).	• Após injeção ip de benomil: detecção de CBZ nos testículos em menos de 5min, com pico inferior (99,1 nmol/g) ao verificado após administração do próprio CBZ (281,3 nmol/g); • Após injeção intratesticular de benomil: detecção rápida de CBZ, indicando que testículos têm capacidade de metabolização; pico de CBZ inferior (123,7 nmol/g) ao verificado após administração do próprio CBZ (390,4 nmol/g); ↓ mais rápida de CBZ em comparação à via ip; • Correlação linear entre % descamação e concentração testicular de CBZ; <i>In vitro:</i> • Identificação de subunidades α e β-tubulina; • Inibição concentração-dependente na montagem de MT (n=3): IC50 de 75µM (Benomil) e 5µM (CBZ), indicando que o efeito da exposição ao benomil foi quase que completamente decorrente do CBZ.	concluir que existe uma relação direta entre a inibição <i>in vitro</i> da polimerização dos MT testiculares por CBZ e a descamação de células germinativas observada <i>in vivo</i>; • Somente os resultados referentes ao CBZ foram detalhados aqui, os quais evidenciaram toxicidade testicular muito mais severa, em comparação à exposição ao benomil.	
Adedara et al., 2013	Pureza: 97%; Linhagem: Ratos <i>Wistar</i> ♂ (70 dias de idade); Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> – CBZ administrado (gavagem; 200 mg/kg p.c./dia) em dose única. Eutanásia em 24h pós-tratamento.	• ↓* atividades da superóxido dismutase e catalase; ↑* concentração de ácido siálico e peroxidação lipídica nos testículos; • ↓ expressão da proteína reguladora aguda de esteroides (StAR) e da proteína de ligação a andrógenos (ABP), com ↓concomitante nas atividades de enzimas esteroideogênicas; • Indução de apoptose de células germinativas (confirmada pelo ensaio TUNEL).	• CBZ usado como modelo de TR. • CBZ induziu supressão da esteroideogênese, indução de estresse oxidativo e apoptose (envolvendo vias mediadas por mitocôndrias e FasL).	POSITIVO ≥ 200 mg/kg p.c./dia (única dose testada)
Campion et al., 2012	Pureza: NI; Linhagem: Ratos <i>Fischer</i> 344; Delineamento: Avaliação da exposição concomitante de hexadiona (HD) e CBZ na transcrição e expressão gênica (n=4). Exposição via oral a HD (0,33 ou 1%) por 18 dias, seguida de CBZ no 17º dia por gavagem (67 ou 200 mg/kg). Amostras testiculares coletadas após 3h ou 24	• Não foi verificada diferença significativa nos níveis de RNAm ou expressão gênica para o CBZ. Houve alteração mais perceptível para a exposição combinada de CBZ e HD; • CBZ e a HD interagem de forma agonista ou sinérgica em relação à expressão gênica, com expressão proteica (imunohistoquímica) refletindo as alterações gênicas (microarray e qRT-PCR).	• Grupo amostral pequeno; • Exposição aguda (dose única); • Estudo conduzido para identificar marcadores gênicos de dano testicular. • CBZ usado como modelo de dano testicular.	ND (Evidência inadequada para análise de desfechos reprodutivos induzidos pelo CBZ)

	horas. Ainda, foi avaliado grupo sem tratamento e grupos expostos apenas a HD ou CBZ.			

Legenda: *= alteração estatisticamente significativa; sg= significativa; CBZ= Carbendazim; ST= substância teste; ctl= controle; D= dia; DG= dia gestacional; DPN= dia pós-natal; DAG= distância anogenital; ip= intraperitoneal; it= intratesticular; vo= via oral; ND= não determinado; NI= não informado; IHQ= imunohistoquímica; MT= mictotúbulo; p.c.= peso corpóreo; ERO= espécies reativas de oxigênio; TR= toxicidade reprodutiva.

Quadro 3: Avaliação dos potenciais efeitos na função sexual ou capacidade reprodutiva masculina após exposição repetida ao CBZ.

Referência	Protocolo	Resultados segundo autor	Limitações, inconsistências e considerações relevantes	Conclusão
Dere et al., 2016	Pureza: >97%; Linhagem: Ratos <i>Fischer</i> 344 ♂ (63 - 69 dias); Delineamento: Estudo <i>in vivo</i>: CBZ administrado (gavagem; 30, 50 ou 70 mg/kg p.c./dia; n = 12/grupo) por 3 meses. Análise histopatológica, da expressão de RNAm e de marcadores de metilação no DNA.	↓* peso testicular e epididimal (≥ 70 mg/ kg p.c./dia); - Histopatologia: alterações sg dose-dependentes ≥ 50 mg/ kg p.c./dia – dano ao epitélio seminífero, vacuolização de células de Sertoli, retenção da cabeça de espermátides (relatada em 2/6 animais na menor dose, s/ sg estatística); - Alterações nos níveis de RNAm - 6 marcadores considerados indicadores sensíveis de dano testicular após exposição a baixas doses de CBZ.	- Estudo conduzido para identificar possíveis marcadores gênicos de dano testicular; - Avaliação histopatológica em somente 6 animais/grupo; - CBZ usado como modelo de toxicidade testicular.	POSITIVO LOAEL = 30 mg/kg p.c./dia (menor dose testada)
Salihu et al., 2017a	Pureza: 97%; Linhagem: Ratos <i>Wistar</i> ♂ adultos (10 semanas de idade); Delineamento: Estudo <i>in vivo</i>: CBZ administrado (n = 10/ grupo; gavagem – 50mg/kg p.c./dia) por 14 dias. Eutanásia em 24h pós-tratamento; análise histopatológica, bioquímica e morfométrica do testículo e epidídimo.	↑* índice organo-somático dos testículos e diâmetro tubular seminífero; ↓* da altura do epitélio dos túbulos seminíferos e do epidídimo; ↓* do comprimento tubular total/ testículo e do comprimento tubular/ grama de testículo; ↑* atividade da fosfatase ácida testicular e ↓* atividade testicular da fosfatase alcalina, glicose-6-fosfato desidrogenase e lactato desidrogenase; ↓* ALT e AST nos testículos e epidídimo; ↓* contagem de espermatozoides testiculares e epididimários e motilidade espermática; - Degeneração do epitélio seminífero, do lúmen de alguns túbulos e dos vasos intersticiais; epidídimo com degeneração de forma e poucos espermatozoides.	- Impossibilidade de avaliar efeito dose-dependente, pois somente um nível de dose foi utilizado; - CBZ usado como modelo de toxicidade testicular; - Cálculo do índice organo-somático dos testículos ou epidídimo: $100 \times \text{peso das gônadas (g)} / \text{peso corporal (g)}$.	POSITIVO LOAEL = 50mg/kg p.c./dia (única dose testada)

Salihu et al., 2017b	Pureza: 97%; Linhagem: Ratos <i>Wistar</i> ♂ adultos (10 semanas de idade); Delineamento: Estudo <i>in vivo</i>: CBZ administrado (gavagem – 50mg/kg p.c./dia; n = 10) por 14 dias. Eutanásia em 24h pós-tratamento; análise histopatológica e status antioxidante (testículo e epidídimo), dosagens hormonal (TSH, T₃, T₄, prolactina, testosterona, LH, FSH) e bioquímica.	• ↑* pesos absoluto e relativo dos testículos; sem efeitos no ganho de peso corporal e nos pesos absoluto e relativo do epidídimo, vesícula seminal e próstata; • ↓* motilidade, contagem de espermatozoides testiculares e epididimais, alterações morfológicas (cabeças sem cauda, peças intermediárias curvadas e dobradas); • Redução da capacidade antioxidante com indução de estresse oxidativo e peroxidação lipídica (↓* catalase, GST e GSH e ↑* H₂O₂, ↑* MDA) nos testículos e epidídimo; • ↓* dos níveis plasmáticos de testosterona, TSH, T₃, T₄; ↑* FSH sem afetar LH e prolactina; • Alterações histopatológicas: epitélio seminífero degenerado com poucos espermatozoides, presença de células espermatogênicas descamadas no lúmen de alguns túbulos; congestão severa dos vasos intersticiais; epidídimo com formato irregular e poucos espermatozoides.	• Impossibilidade de avaliar efeito dose-dependente, pois somente um nível de dose foi utilizado; • CBZ usado como modelo de toxicidade testicular; • Análise morfológica de 400 espermatozoides/animal;	POSITIVO LOAEL = 50mg/kg p.c./dia (única dose testada)
Breslin et al., 2013	Pureza: 97%; Linhagem: ratos <i>Sprague-Dawley</i> ♂; Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> (n=10): CBZ 1x dia via gavagem (20 e 400 mg/ kg/ dia) por 2 ou 7 dias. Análise: observação clínica diária; pesagem corporal (D₅) e consumo alimentar (D₁₋₅); coleta de amostras para dosagem hormonal (Inibina-B, LH, FSH, testosterona); necropsia, coleta, pesagem e preparo tecidual (testículos, epidídimos e outros órgãos) para histopatologia pós-eutanásia.	• ↓* peso corporal (somente grupo de 400 mg/ kg/dia por 7d); • ↑* peso testicular absoluto (somente grupo de 400 mg/ kg/dia por 2d); • ↓* nível Inibina B e ↑* nível FSH (somente grupo de 400 mg/ kg/dia por 7d); • Histopatologia: ○ Testicular: incidência e gravidade progressivas em relação à dose/ duração (≥ 20 mg/kg p.c./dia). Dilatação tubular, vacuolização de células de Sertoli, presença de espermátides gigantes multinucleadas. Com o aumento da duração/ dose, houve progressão dessas alterações - degeneração/ atrofia tubular, com degeneração de células germinativas; ○ Epididimal: detritos celulares intratubulares, edema intersticial, redução de espermatozoides e degeneração epitelial, sem relação clara entre severidade e dose/ duração.	• Doses selecionadas a partir de estudos prévios de toxicidade testicular induzida por exposição de curto prazo ao CBZ; • Somente eventos de toxicidade severa, associada à perda significativa de epitélio espermatogênico (400 mg/kg/dia), foram correlacionados com ↓* nível Inibina B.	POSITIVO LOAEL = 20mg/kg p.c./dia (menor dose testada)
Liu et al., 2019	Pureza: Não informada; Linhagem: Camundongos ICR ♂; Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> – administração diária de CBZ	• ↓ motilidade espermática (todas as doses testadas) e ↓ contagem espermática (maior nível de dose - 10 mg/kg p.c.); • ↓ peso corporal (10 mg/kg p.c.); • ↓ proteínas de regulação da espermatogênese (VASA, B-myb, PGK2, CREM) e ↓ marcadores espermáticos (acrosina e PNA), nas doses 1 e 10 mg/kg p.c.;	• Ausência de controle positivo; • Nos métodos, foi incluída análise de morfologia espermática, mas esses	POSITIVO LOAEL = 0,1 mg/kg p.c./dia

	(gavagem - 0; 0,1; 1,0 e 10 mg/kg p.c./dia; n=30) por 5 semanas. Avaliação de parâmetros espermáticos; dosagem de hormônios esteroidais e de ALT e AST plasmáticas; IMF para proteínas testiculares.	• ↓ nº células de Leydig positivas para ERα e ↓ proteínas de produção de hormônios esteroides, nas doses 1 e 10 mg/kg p.c.; • Alteração nos níveis testiculares de marcadores de metilação de histonas e de DNA, indicando que o CBZ afetou adversamente esses marcadores epigenéticos, acarretando distúrbio na espermatogênese; • Dados indicaram que CBZ causou inibição da espermatogênese por meio da via ERα.	dados não foram descritos nos resultados/ discussão.	(menor dose testada)
Yu et al., 2009	Pureza: >98%; Linhagem: Ratos Wistar ♂ (30 - 35 dias); Delineamento: Estudo <i>in vivo</i>: CBZ administrado (gavagem; 0, 20, 100 e 200 mg/kg p.c./dia, n = 24-25/ grupo) por 80 dias a ♂; acasalamento por 5d com ♀ não exposta. Eutanásia das ♀ no DG₁₉ (16 a 23 acasalamentos).	• Sem óbitos ou outros sinais de toxicidade sistêmica; sem alteração no p.c. e no ganho de p.c.; • ↑ índice de acasalamento, ↓ dose-dependente do índice de fertilidade; ↓ peso absoluto e relativo dos testículos; ↓ contagem de espermatozoide e motilidade (tendência na menor dose; alterações sg ≥ 100 mg/kg p.c./dia); • Níveis de LH com tendência de redução (sg apenas em 200 mg/kg p.c./dia). Sem alteração nos níveis de FSH e testosterona; • Histopatologia: túbulos seminíferos atróficos, ↓ células germinativas, ↑ descamação das células germinativas; • Citometria de fluxo: inibição da transformação meiótica e interferência na espermatogênese (tendência na menor dose; alterações sg ≥ 100 mg/kg p.c./dia); • As alterações na espermatogênese resultam na redução de fertilidade em machos em doses sem sinais de toxicidade sistêmica.	• Não foi feita análise estatística de tendência.	POSITIVO NOAEL=20mg/kg p.c./dia
Evenson et al., 1987	Pureza: 98,1%; Linhagem: Camundongos C57BL/6J x C3H/HeJ F1 ♂; Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> – CBZ administrado via gavagem (250, 500 e 1000 mg/kg p.c.) por 5d; subgrupo de 4 animais/ dose: eutanásia, pesagem, coleta e preparo histológico (testículos e epidídimo caudal) em 7d, 24d e 39d pós-	• Redução em cerca de 25% no peso testicular, na maior dose testada (1000 mg / kg), em 7 e 24d, com recuperação observada em 39d pós-tratamento; • Medidas de citometria de fluxo em células testiculares mostraram diferenças, em relação ao controle, no % relativo de espermátides redondas (↑), em alongamento e alongadas (↓), em 7 e 24d, com retorno aos níveis basais em 39d pós-tratamento; • ↑ % médio de anormalidades morfológicas (cabeça) de espermatozoides do epidídimo caudal e ↑ na susceptibilidade de desnaturação do DNA nuclear, em 7, 24 (1000 mg/kg) e 39d pós-tratamento (500 e 1000 mg/kg), provavelmente associadas	• Pequeno grupo amostral; • Análise morfológica da cabeça de 350 espermatozoides intactos/animal (4 animais/ dose/ intervalo) (RD = 200 - 400 células). • 200 células avaliadas por citometria de fluxo; • Determinação do nível de desnaturação do DNA por citometria de fluxo:	POSITIVO NOAEL = 250mg/kg p.c./dia

	tratamento; Análise por microscopia óptica e citometria de fluxo.	a alterações na estrutura da cromatina espermática induzidas pelo CBZ; Dados sugerem uma maior susceptibilidade das células ao CBZ em determinados períodos da espermatogênese (diacinese entre meiose I e II durante 2-5d de exposição ao CBZ).	mudança metacromática da fluorescência verde (DNA original) para vermelho (DNA de fita simples); Autores exibiram um diagrama com representação dos estágios espermatogoniais durante 5d de exposição ao CBZ, os quais originaram espermátides arredondadas, em alongamento, alongadas e espermatozoides do epidídimo caudal observados em 7, 24 e 39d pós-tratamento.	
Lu et al., 2004	Pureza: 99%; Linhagem: Ratos <i>Sprague-Dawley</i> ♀/♂ (3-4 semanas de idade); Delineamento: Estudo <i>in vivo</i>: 1) <u>Reprodução</u>: CBZ (675 mg/kg p.c./dia) administrado a ratos (n=5/grupo) ♂ via gavagem por 28 dias; 2) <u>Desenvolvimento</u>: CBZ (200 mg/kg p.c./dia) administrado a ♀/♂ (n = 5/ sexo/grupo) via gavagem por 28 dias antes do acasalamento; Observação de parâmetros gestacionais e da prole até 6 semanas de idade. 3) <u>Indução receptor de andrógeno (por 5α-DHT)</u>: CBZ (25, 50, 100, 200, 400 e 800 mg/kg p.c./dia) administrado a ratos ♂ via gavagem por 56 dias.	1) <u>Reprodução</u> (675 mg/kg p.c./dia): ↓ peso absoluto do testículo, sem alteração do peso do epidídimo; alterações histopatológicas testiculares (atrofia de túbulos seminíferos, ↓ de células espermáticas e ↑ células gigantes multinucleares) e epididimais (↓ concentração de espermatozoides ou azoospermia nos ductos eferentes); 2) <u>Desenvolvimento</u> (200 mg/kg p.c./dia): - Sem alteração testicular ou epididimária da prole masculina (27 ♂ de 5 ninhadas); - Os autores relataram terem encontrado alterações nos órgãos reprodutivos das fêmeas (vagina, corto uterino, uretra), mas a incidência foi esporádica, além do número de animais avaliados ser muito baixo para qualquer conclusão. 3) <u>Indução receptor de andrógeno</u>: ↑* dose-dependente nas concentrações de receptor de andrógeno nos testículos e epidídimo (≥25 mg/kg p.c./dia), sugestivas de ação do CBZ como desregulador endócrino.	- Falta de diversas informações relevantes na descrição dos materiais e métodos do estudo (nº animais utilizados no estudo de indução de receptor, DPN em que foram observadas as malformações na prole feminina, se houve acompanhamento do dia de abertura do canal vaginal e verificação do dia do ciclo estral nas fêmeas que já estavam com o canal aberto); - Apenas uma dose avaliada nos estudo de reprodução e de desenvolvimento; - Dose muito alta para o estudo de reprodução; - Nº animais insuficiente para análise da toxicidade para o	POSITIVO LOAEL reprodução = 675 mg/kg p.c./dia (única dose testada) LOAEL desenvolvimento = 200 mg/kg p.c./dia

			desenvolvimento (apenas 5 ninhadas/ grupo), o que torna os resultados muito limitados; • Reversão da toxicidade reprodutiva/ desenvolvimento induzida por CBZ nos grupos de cotratamento com flutamida, antagonista de receptor androgênico; • Autores sugerem que mecanismos dependentes de andrógenos e de receptores de andrógenos estão possivelmente envolvidos na toxicidade reprodutiva induzida por CBZ.	
Pacheco et al., 2012	Pureza: $\geq 97\%$; Linhagem: Ratos <i>Fischer</i> 344 (63-69 dias); Delineamento: Exposição a CBZ por gavagem (50 mg/kg p.c./dia, n = 6) por 3 meses. Avaliação da transcrição gênica, retenção da cabeça da espermátide e níveis séricos de inibina B.	• Não houve alteração no peso corporal, testicular ou do epidídimo; • $\uparrow^*$ espermátides com retenção de cabeça e $\downarrow^*$ inibina B. • Alteração significativa na expressão de oito transcritos - RNAm espermáticos podem ser utilizados como indicadores de dano testicular.	• Grupo amostral pequeno; • Somente uma dose testada; • Estudo conduzido para identificar possíveis marcadores gênicos de dano testicular; • CBZ usado como modelo de dano testicular; • 50 mg/kg/dia foi considerada baixa dose (mínimos efeitos testiculares).	POSITIVO LOAEL = 50 mg/kg p.c./dia (única dose testada)
Erdoş et al., 2013	Pureza: 97%; Linhagem: Ratos <i>Wistar-Han</i> (10 semanas); Delineamento: Exposição a CBZ (gavagem; n = 8; 100 ou 400 mg/kg	• Histopatologia: Degeneração dos túbulos seminíferos; • Níveis inibina B: inalterados; • Degeneração dos túbulos seminíferos e de células intersticiais, vacuolização dos túbulos seminíferos e aspermatogênese. Correlação entre a redução dos níveis de inibina B com a toxicidade às células de Sertoli para a maioria dos ensaios.	• Grupo amostral pequeno; • CBZ usado como modelo de toxicidade testicular; • Estudo conduzido para caracterizar a inibina B como marcador de dano testicular.	POSITIVO LOAEL = 100 mg/kg p.c./dia

	p.c./dia) por 2 dias. Coleta de plasma por 24 horas; correlação entre alterações plasmáticas da inibina B e avaliação da toxicidade para a célula de Sertoli.			(menor dose testada)
Sakr e Shalaby, 2014	Pureza: NI (aparentemente grau técnico). Linhagem: Ratos albinos <i>Wistar</i> sexualmente maduros. Delineamento: Exposição ao CBZ (gavagem; n = 25; 100 mg/kg p.c./dia) 3x/semana por 8 semanas.	• ↓* peso testicular e diâmetro/altura do epitélio seminífero; • Degeneração dos túbulos seminíferos, perda espermatogênica e apoptose; • Lúmen tubular com células gigantes multinucleadas, o que pode indicar falha em completar a citocinese durante a divisão mitótica ou meiótica das espermatogônias; • ↑* peroxidação lipídica (malondialdeído) e ↓* de atividades de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase e a catalase.	• Não foi feito controle negativo apenas com veículo por gavagem; • CBZ usado como modelo de dano testicular; • Somente uma dose utilizada.	POSITIVO LOAEL = 100 mg/kg p.c./dia (única dose testada)
Moffit et al., 2013	Pureza: ≥ 97%; Linhagem: Ratos <i>Wistar Han IGS</i> ♂; Delineamento: Estudo <i>in vivo</i>: CBZ 1x dia via gavagem (200 mg/kg p.c./dia). Esquema de dosagem e análise (n = 10/ grupo): 4 semanas de exposição (D₁ – D₂₉), seguida de 4 semanas de recuperação (D₃₀ – D₅₈). Análise (em D₈, D₂₉ e D₅₈): pesagem corporal e testicular; dosagem sérica de Inibina B, FSH e LH; análise histopatológica dos testículos.	• Nenhuma alteração no peso corporal e testicular, nem nos níveis de Inibina B, LH e FSH, nos 3 intervalos de análise; • Alterações histopatológicas: a) dilatação no túbulo seminífero, com adelgaçamento do epitélio seminífero e maturação espermatogênica aparentemente normal (D₈ e D₂₉); b) degeneração de células germinativas, com espermatócitos redondos destacados e hiper cromáticos (D₈ e D₂₉); c) necrose tubular associada à perda do epitélio tubular, evidenciada por detritos celulares necróticos descamados preenchendo o lúmen do túbulo seminífero (todos os intervalos).	• Esquema de dosagem semelhante a um estudo de ensaio clínico de Fase I em roedores, com fase pré-tratamento adicional; • Autores discutiram que o início precoce da disfunção testicular pode ter modulado as respostas da Inibina B antes do primeiro intervalo de análise (D₈).	POSITIVO LOAEL = 200 mg/kg p.c./dia (única dose testada)
Gray et al., 1989, 1990 Também avaliado por APMVA, 2009; EFSA, 2010; e	Pureza: ≥95%; Linhagem: Ratos <i>Long-Evans</i> e Hamsters Sírios; Delineamento: Estudo <i>in vivo</i>: <u>1) Ratos:</u>	Estudo 1 - Ratos Geração P : • Sem alteração nos marcos de desenvolvimento (♀/♂); no peso e histologia dos ovários e demais órgãos (não-reprodutivos) analisados; • ≥ 50 mg/kg p.c./dia: ↓ dose-dependente na contagem de espermatozoides do epidídimo caudal (sg ≥100 mg/kg p.c./dia); atrofia testicular leve em 2-3 de 8 animais; ↑* alterações na	• Estudo de 1989 corresponde a um artigo de revisão com descrição breve dos dados posteriormente apresentados no artigo de 1990;	POSITIVO LOAEL reprodutivo / parental = 50 mg/kg p.c./dia;

PMRA, 2011 (considerado suplementar)	Geração P) grupo ctl: n = 12/ sexo; grupos tratados: 8/ sexo/ dose; CBZ administrado (gavagem – 0, 50, 100 200 ou 400 mg/kg p.c./dia) do desmame (D₂₁) ao DPN₂₀ (♀) ou até a necropsia (♂ - 104 a 106d). Prole F₁) Monitoramento da reprodução: 20 pares ctl e 22 pares expostos apenas durante gestação e lactação (via placenta e leite) (100 mg/kg p.c./dia). <u>2) Hamsters:</u> CBZ (0, 400 mg/kg p.c./dia) administrado via gavagem (n = 12 a 15/sexo) do desmame (D₂₂) ao parto (♀) ou até a necropsia (♂).	morfologia espermática; s/ alteração nos hormônios testiculares e hipofisários. Manutenção da fertilidade nas duas menores doses; • ≥ 200 mg/kg p.c./dia: ↓* e dose-dependente de ganho p.c. materno; ↓* tamanho ninhada e viabilidade fetal; ↓* peso prole no D₁; ↓* potencial reprodutivo atribuído aos efeitos nos ♂, com agrupamento em duas categorias: I) férteis: ↓* em 77% de reservas de espermatozoides caudais e em 50% no nº espermatozoides testiculares, ↓* motilidade espermática, ↓* em 25% no peso testicular, ↑ detritos nas amostras de espermatozoides caudais; s/ alteração em hormônios sexuais e hipofisários; II) inférteis: ↓ a 1% de reservas de espermatozoides caudais e em 90% no nº espermatozoides testiculares, ↓ em 50% no peso testicular, ↑ FSH séricos; atrofia testicular moderada/ severa em 5-6 de 8 animais; • 400 mg/kg p.c./dia: ↑* perda pós-implantação (sem ninhadas viáveis, reabsorção de todos os fetos), atribuída ao acasalamento com machos com severa atrofia testicular. Prole F1: • Crescimento, viabilidade e desempenho reprodutivo não foram afetados em 100 mg/kg p.c./dia; • Malformação fetal (hidrocefalia e cauda retorcida) em 2/7 ninhadas (100 mg/kg p.c./dia) e 1/3 ninhadas (200 mg/kg p.c./dia); Estudo 2 - Hamsters Geração P: • Nenhuma alteração nas ♀; Em ♂, desempenho reprodutivo bem menos afetado, em comparação a ratos no mesmo nível de dose: ↓* na contagem de espermatozoides no testículo e epidídimo caudal, alterações na morfologia espermática (4/ 12 animais), mas sem redução da fertilidade. Prole F1: • ↓* peso de testículos e de vesículas seminais, de contagem espermatozoides no epidídimo caudal; ↓* peso prole no D₁ e D₅.	• Número insuficiente de animais parentais/ grupo; • Não utilizaram a ninhada como unidade experimental, formando mais de um par de acasalamento dentro do mesmo nível de dose; • Protocolo de exposição diferente da RD 416: exposição da prole F1 apenas via placenta e leite, sem administração da ST após esse período; • ♂ férteis: no mínimo, 65 milhões espermatozoides/ testículo e 20 milhões de espermatozoides de reserva caudal; ♂ inférteis: 2,7 a 43,6 milhões espermatozoides/ testículo e 0 a 6 milhões de espermatozoides de reserva caudal.	LOAEL prole = 100 mg/kg p.c./dia (menor dose testada) (PMRA não estabeleceu valores de NOAEL – estudo considerado suplementar)
Carter et al., 1987	Pureza: 98%;	• ↓ fertilidade masculina (↓ nº fêmeas prenhes), com agravamento entre a 1ª (10/24 ♂ inférteis) e a 5ª (16/23 ♂ inférteis) semana; recuperação da fertilidade em apenas 4/ 16	• Técnica de reprodução em série usada para avaliar a fertilidade dos machos;	POSITIVO

apud APMVA, 2009; e PMRA, 2011 (considerado suplementar); EFSA, 2009.	Linhagem: Ratos <i>Sprague-Dawley</i> ♂; Delineamento: Estudo <i>in vivo</i>: CBZ administrado (gavagem; 0 ou 400 mg/kg p.c./dia; n = 24) por 10 dias consecutivos. Acasalamento de cada macho com uma nova fêmea: em 3d após início do tratamento e por até 32 semanas após o último dia de tratamento; avaliação das fêmeas, em 12 dias pós-acasalamento (período gestacional médio); e dos machos, em 35 semanas pós-tratamento.	♂ após 5-11 períodos consecutivos de reprodução, mas os 12 animais restantes permaneceram inférteis durante o restante do período (32 semanas pós-tratamento); Histopatologia: atrofia severa de túbulos seminíferos (> 85%), com epitélio contendo apenas células de Sertoli, redução de espermatogônias e membrana basal espessa; menos de 2% dos túbulos continha espermatozoides; nos animais com recuperação da fertilidade, 13-85% dos túbulos permaneceram atróficos, em 245 dias pós-tratamento.	Impossibilidade de avaliar efeito dose-dependente, pois somente um nível de dose foi utilizado.	LOAEL = 400 mg/kg p.c./dia (única dose testada)
Durand et al., 2017	Pureza: NI; Linhagem: Ratos <i>Sprague-Dawley</i> – cultura de túbulo seminífero Delineamento: Estudo <i>ex vivo</i>: cultura de túbulos seminíferos incubada com CBZ (50nM) por 3 semanas.	↑ RNAm TP1 e TP2 dependentes de andrógeno e ↓ RNAm ERα, ERβ; - Alteração na espermatogênese - ↓ espermátides redondas (precursores dos espermatozoides).		POSITIVO >50nM (estudo <i>ex vivo</i>)
Pisani et al., 2016	Pureza: 99,2%; Linhagem: Ratos <i>Sprague-Dawley</i> - cultura de túbulos seminíferos; Delineamento: Estudo <i>ex vivo</i>: eutanásia de ratos (23 dias de idade) não tratados, coleta de túbulos seminíferos e semeadura (D₀), originando culturas ctl e expostas ao CBZ (50nM ou 500nM) (n=3). Intervalos de coleta: D₇; D₁₄ e D₂₁; análise transcriptômica (com microarranjo) e citogenética	- Análise transcriptômica: verificação de resposta tempo-dependente; D₁₄: ↑* transcritos up-regulados (50nM); D₂₁: ↑* transcritos down-regulados (50nM e 500nM); - Análise citogenética: - Alteração na cronologia da prófase I (50nM): ↓* zigóteno (D₇) e diplóteno (D₇ e D₁₄); - Anormalidades observadas no complexo sinaptonemal de espermatócitos (50nM; D₇ e D₁₄): asinapse (ausência de pareamento cromossômico) e fragmentação bivalente; - Análise proteômica: - D₇: maior nº proteínas diferencialmente expressas, em relação à cultura controle; - D₁₄: ↓* proteínas CLUS e FUCO (relacionadas à disfunção testicular);	- A fim de contrabalançar a variação interanimal, agrupou-se testículos de 8 ratos/ cultura; utilizou-se a mesma população para semeadura em culturas controle e tratadas; - Período de análise por 3 semanas corresponde ao desenvolvimento da espermatogênese e, em particular, mimetiza a puberdade;	POSITIVO >50nM (estudo <i>ex vivo</i>)

	(marcação imunocitológica do complexo sinaptonemal), em células de Sertoli e germinativas; análise proteômica (espectrometria de massa) nas porções apical e basal do meio de cultura.	Autores concluíram que CBZ inibe a espermatogênese ao atuar nos seguintes eventos moleculares: 1) sinalização de resposta de fase aguda (D₁₄ e D₂₁); 2) alteração da migração de células germinativas pelo epitélio seminífero (D₁₄ e D₂₁); 3) desregulação endócrina pela alteração da esteroidogênese (D₁₄ e D₂₁); 4) interrupção da meiose na prófase I (D₇; D₁₄ e D₂₁); 5) comprometimento dos futuros espermatozoides, com motilidade espermática (D₁₄ e D₂₁).	- Análise em triplicata, para cada dose e intervalo de análise; - Análise imunocitológica em 100-200 núcleos de espermatoócitos: quantificação do % de núcleos em cada estágio da prófase (leptóteno, zigóteno, paquíteno, diplóteno) e de núcleos com anormalidades no complexo sinaptonemal.	
Goldman et al., 1989	Pureza: 98,1%; Linhagem: Ratos <i>Long-Evans</i> ♂; Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> – administração de CBZ (n = 7 - 8; gavagem; 50, 100, 200 ou 400 mg/kg p.c./dia) a partir do desmame (21º dia), por 85 dias, com posterior acasalamento com ♀ não expostas por 20 dias para avaliação da fertilidade. Grupo ctl (n = 12). Eutanásia em 24h pós-tratamento para dosagens hormonais e análise da hipófise e hipotálamo.	50mg/kg p.c./dia: ↑GnRH hipotálamo anterior somente na menor dose; ≥ 100mg/kg p.c./dia: ↑LH hipófise anterior ≥ 200mg/kg p.c./dia: infertilidade em 4/8 animais com ↑* FSH sérico nos animais inférteis; ↑ LH sérico (somente em 200 mg/kg); ≥ 400 mg/kg p.c./dia: ↑* LH hipofisário (sem distinção entre férteis e inférteis); - S/ alteração na prolactina, TSH e testosterona; - Sem alteração no peso da hipófise.	Estudo buscou investigar se influências endócrinas extragonadais contribuem para a TR induzida por CBZ, com enfoque nos componentes do hipotálamo e hipófise do eixo reprodutivo masculino.	POSITIVO LOAEL = 50 mg/kg p.c./dia (menor dose testada)
Yamada et al. 2005	Pureza: 98,9% (CBZ) e >98% (Benomil); Linhagem: Ratos <i>Crj:CD(SD)IGS</i> ♀ (13 dias) e ♂ (4-5 semanas); Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> – Administração de benomil (gavagem; 100, 300 ou	Estudo <i>in vivo</i> - Benomil não apresentou atividade androgênica, mas induziu atenuação sg dos aumentos induzidos por testosterona nos pesos da próstata ventral e vesículas seminais (≥ 100mg/kg p.c./dia); - Benomil não apresentou efeito estrogênico (ao invés de aumento no peso, induziu ↓* peso útero na maior dose; tendência de redução nas demais doses); - Benomil não alterou os níveis de andrógenos séricos.		NEGATIVO (Ausência de efeito estrogênico e androgênico).

	1000 mg/kg p.c./dia n = 6) por 3 ou 10 dias, para avaliação da estrogenicidade (ensaio uterotrófico) e da androgenicidade e antiandrogenicidade (ensaio de Hershberger), respectivamente. Perfil de expressão gênica da próstata. <u>Estudo <i>in vitro</i></u> – Transativação dos receptores de estrógeno e andrógeno (antagonistas e agonistas) (Benomil e CBZ: 10, 100, 500 e 1000 nM).	- Alteração no padrão de expressão gênica, mas bem distinta de flutamida e dicloroetileno; - Autores discutem que a redução nos pesos de órgãos induzida por Benomil não está relacionada a sua ação sobre receptor estrogênico/androgênico. Estudo <i>in vitro</i> - CBZ e Benomil s/ atividade agonista ou antagonista de receptores androgênicos e estrogênicos.		
Rama et al, 2014	Pureza: 97%; Linhagem: Ratos <i>Wistar</i> ♂/♀; Delineamento: Estudo <i>in vivo</i>: 1) Ensaio uterotrófico – ratos DPN₁₈; n = 5-7: administração de CBZ isolado (200, 400, 800 mg/kg p.c./dia) ou associado ao estradiol (0,3 mg/kg p.c./dia) via gavagem por 3 dias; 2) Ensaio de Hershberger – ratos DPN₄₉; n = 5-6: administração de CBZ isolado (100, 200, 400 mg/kg p.c./dia) ou associado a testosterona (0,4 mg/kg p.c./dia) via gavagem por 10 dias.	1) Ensaio de Hershberger: - Efeito androgênico: ↑* peso próstata (somente em 100 mg/kg p.c./dia), sem alterar o peso de outros tecidos dependentes de testosterona; - Ausência de efeito antiandrogênico; 2) Ensaio uterotrófico: - Sem evidência de efeito estrogênico ou antiestrogênico.	- Condução de dois ensaios: uterotrófico – avaliação da estrogenicidade/ antiestrogenicidade; e Hershberger – avaliação da androgenicidade/ antiandrogenicidade; - Ensaios conduzidos conforme Diretrizes OPPTS 890.1400 e OPPTS 890.1600 (USEPA, 2009); - Exclusão do grupo de maior dose (800 mg/kg p.c./dia) no ensaio uterotrófico por acentuada toxicidade sistêmica.	POSITIVO (Evidência de efeito androgênico somente na menor dose; Ausência de efeito estrogênico e antiestrogênico)
Rajeswary et al., 2007	Pureza: 99%; Linhagem: Ratos <i>Wistar</i> ♂ (90 dias); Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> – CBZ administrado via gavagem (n = 10/ grupo). Grupo 1: ctl; Grupo 2: 25 mg/kg p.c./dia (48 dias); Grupo 3:	Grupo 2: Nenhuma alteração no peso corporal, LH e prolactina; ↓* peso testicular; ↓* testosterona e estradiol séricos; ↓* atividade enzimas esteroideogênicas e antioxidantes; ↓* antioxidantes não enzimáticos; ↑* peroxidação lipídica e EROs. Grupo 3: Nenhuma alteração.	- Apenas uma dose testada; - Pouco tempo de avaliação para verificar alteração de LH.	POSITIVO LOAEL = 25 mg/kg p.c./dia (única dose testada)

	25 mg/kg p.c./dia (48 dias + 48 dias s/ dosagem). Dosagem de hormônios séricos, enzimas esteroidogênicas antioxidantes, antioxidantes não enzimáticos, peroxidação lipídica e ERO em células de Leydig.	Exposição crônica de baixa dose induziu toxicidade reprodutiva transitória (retorno aos níveis basais em 48 dias sem exposição), por meio de estresse oxidativo, com aumento de EROs e de peroxidação lipídica e danos às enzimas esteroidogênicas e à defesa celular antioxidante nas células de Leydig.		
Li et al., 2020	Pureza: NI; Linhagem: espermatozoides de javali (<i>in vitro</i>) e camundongos ICR ♂ (<i>in vivo</i>); Delineamento: <i>In vitro</i>: espermatozoides incubados com CBZ (1, 10 ou 100 uM) por 24h. <i>In vivo</i>: CBZ administrado via gavagem (0,1, 1 ou 10 mg/kg p.c./dia; n = 30) por 5 semanas;	<u><i>In vitro</i>:</u> • Não afetou a motilidade espermática ou a integridade acrossômica; • ↑ sutil no nível de EROs e de caspase 8 (marcador apoptose) em 100 µM; <u><i>In vivo</i>:</u> • ≥ 0,1 mg/kg p.c./dia: ↓* motilidade espermática e dos níveis de proteínas espermáticas VASA e A-myb; • ≥ 1 mg/kg p.c./dia: ↓* marcadores espermáticos PNA e acrosina e de células de Leydig positivas para 5-metilcitosina (marcador de metilação no DNA relevante na espermatogênese); ↓* células de Leydig positivas para receptor de estrógeno α. • 10 mg/kg p.c./dia: ↓* concentração de espermatozoide.	• Ausência de controle positivo para estudo <i>in vitro</i>; • Resultados indicam que baixas doses de CBZ inibem a espermatogênese em camundongos, possivelmente envolvendo as vias de receptores estrogênicos e metilação de DNA.	POSITIVO LOAEL = 0,1 mg/kg p.c./dia (menor dose testada)
Zari e Al-Attar, 2011	Pureza: Alta pureza; Linhagem: Ratos (NI); Delineamento: CBZ administrado via gavagem (200 mg/kg p.c./dia; n = 10) por um mês.	• Ausência de espermátócitos, espermátides e espermatozoides e perdas do processo espermatogênico;	• CBZ usado como modelo de dano testicular; • Exposição subaguda	POSITIVO LOAEL = 200 mg/kg p.c./dia (única dose testada)
Legenda: *= alteração estatisticamente significativa; sg= significativa; CBZ= Carbendazim; ST= substância teste; ctl= controle; D= dia; DG= dia gestacional; DPN= dia pós-natal; DAG= distância anogenital; ip= intraperitoneal; it= intratesticular; vo= via oral; ND= não determinado; NI = não informado; IHQ= imunohistoquímica; MT= mictotúbulo; p.c.= peso corpóreo; ERO= espécies reativas de oxigênio.				

Efeitos observados no sexo feminino

Há um menor número de estudos disponíveis com investigação de parâmetros reprodutivos no sexo feminino. No estudo de Gray et al (1990), descrito no item anterior, verificou-se somente uma redução significativa e dose-dependente no ganho de peso corporal materno, além de redução no tamanho da ninhada e da viabilidade fetal, a partir da dose de 200 mg/kg p.c./dia. O desenvolvimento puberal e a ciclicidade estral não foram alterados, o que indica que o CBZ não afetou adversamente a função endócrina hipotálamo-hipófise-gonadal. A ausência de efeito sobre o peso ovariano, em comparação com o testículo, pode ser decorrente, em parte, das diferenças sexuais no desenvolvimento e função gonadal. Primeiramente, o epitélio germinativo com seus elementos espermatogênicos compreende a maior parte dos testículos, enquanto no ovário os oócitos são um componente menor em relação ao peso da gônada. Por esse motivo, pode ocorrer uma redução no número de oócitos sem afetar imediatamente o peso ovariano. Em segundo lugar, no sexo feminino, a ovogênese se inicia durante o desenvolvimento intrauterino, sendo interrompida em meiose I antes do nascimento, a qual se completa somente na fase puberal, com maturação em ovócito II e ovulação. Em contraste, no rato adulto macho, as células-tronco estão continuamente produzindo espermatogônias.

Outros estudos investigaram, em fêmeas de hamsters sírios, a janela crítica de exposição ao CBZ associada à indução de perda gestacional precoce. Perreault et al (1992) verificaram que a exposição anterior ao acasalamento, na tarde do proestro – correspondente à maturação do oócito (condensação cromossômica, formação do fuso e conclusão da meiose I) – ou no início da manhã do estro, após o acasalamento noturno – quando a presença de espermatozoides induz a segunda divisão meiótica, resultam em perda gestacional precoce (no menor nível de dose testada - 250 mg/kg p.c.), decorrente das perdas pré-implantação e pós-implantação precoce. Entretanto, esse efeito adverso não ocorreu quando o CBZ foi administrado um pouco depois (08:00 ou 09:00 h), após a ocorrência dos eventos de fertilização dependentes de microtúbulos.

Zuelke & Perreault (1995) também demonstraram que a exposição *in vivo* ou *in vitro* de oócitos de hamster a CBZ durante o período de fertilização pode levar à perda gestacional decorrente de aneuploidia zigótica ou de arrasto na meiose. Ainda, Jeffay et al (1996) administraram CBZ em dose única via gavagem (1.000 mg/kg p.c.), na tarde do proestro, e relataram atraso/ interrupção no desenvolvimento embrionário pré-implantação e redução nos sítios de implantação, além de alterações morfológicas nos óvulos após a fertilização – aparecimento de múltiplos pronúcleos e múltiplos corpos polares secundários em um pequeno, mas significativo, número de zigotos. Essas anormalidades morfológicas, também observadas em zigotos após a exposição *in vitro* ao CBZ de oócitos na metáfase II (Zuelke & Perreault, 1995), foram consideradas resultantes do mecanismo de ação do CBZ no processo de montagem dos microtúbulos, posto que também se verificou indução de aneuploidia em ovócitos de metáfase II, durante a sua maturação. Isso constitui uma evidência indireta de que o CBZ alcançou os ovários e causou danos à formação do fuso meiótico, conforme discussão apresentada no Parecer nº 1/2021/SEI/CREAV/GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA (SEI nº 1309909). O conjunto de dados indicou que os efeitos observados foram decorrentes de toxicidade direta aos ovócitos,

descartando alterações endócrinas na ovulação, uma vez que o número de ovócitos ovulados foi semelhante entre animais tratados e controle. Ademais, verificou-se que não houve impacto sobre a taxa de fertilização de ovócitos, o que indica que, aparentemente, o CBZ não afetou a fertilização em si (Jeffay et al., 1996).

Ou seja, o mesmo tratamento agudo com CBZ, mas programado para coincidir com a fertilização (exposição durante a meiose II), também resultou numa redução no número de fetos, com perda pré e pós-implantação (Perreault et al., 1992), e produziu um aumento significativo de zigotos aneuplóides avaliados na metáfase da primeira divisão de clivagem (Zuelke & Perreault, 1995). No entanto, a extensão da perda gestacional e da aneuploidia em zigotos foi maior com a administração de CBZ no proestro, o que indica que o oócito parece ser mais sensível aos efeitos induzidos pelo CBZ durante a formação do fuso (maturação do oócito) do que após ele ter sido formado, com interrupção do oócito em metáfase II (Jeffay et al., 1996).

Por fim, a PMRA (2019) relatou atraso na abertura vaginal de fêmeas F1 e F2 na maior dose testada no estudo de uma geração estendida (EOGRTS, 2014) (Quadro 1), o único que avaliou esse parâmetro. Entre as causas de aumento da idade de abertura vaginal podem estar o antagonismo estrogênico ou a inibição da esteroidogênese. No entanto, a USEPA (2020) não relatou esse resultado para o mesmo estudo, concluindo que não houve efeitos relacionados à exposição nos marcos de desenvolvimento. Como a CREAV não teve acesso ao estudo, que foi descrito muito resumidamente por essas duas agências, não é possível se tirar uma conclusão assertiva com base nesse resultado.

Mecanismos de toxicidade no sexo feminino

Estudos mecanísticos *in vitro* corroboram a ocorrência de danos ao fuso induzidos por CBZ, por meio de marcação imunofluorescente de α -tubulina durante a maturação de oócitos em camundongos (Can & Albertini, 1997) e a fertilização *in vitro* em hamsters (Zuelke & Perreault, 1995). Tais resultados indicam que o CBZ afeta adversamente a montagem do fuso durante a maturação de oócitos e a integridade do fuso em oócitos em metáfase II. Como resultado, a meiose pode ser interrompida ou pode dar origem a zigotos com anormalidades, como as descritas acima.

Essa relação entre a exposição a compostos que se ligam à tubulina, como o CBZ, e a indução de aneuploidia na prole, já foi bem caracterizada na AOP 106 (<https://aopwiki.org/aops/106> - Figura 1), onde a ligação química à tubulina consiste no evento molecular iniciador (EMI) e os eventos-chave (EC) são: despolimerização dos microtúbulos, desorganização do fuso meiótico, alteração do alinhamento e da segregação cromossômica, com geração de oócitos aneuplóides. Tais oócitos, por sua vez, podem ser fertilizados e gerar descendentes aneuplóides, com incidência aumentada de síndromes na prole, o que corresponde ao evento adverso observável (*adverse outcome* - AO).

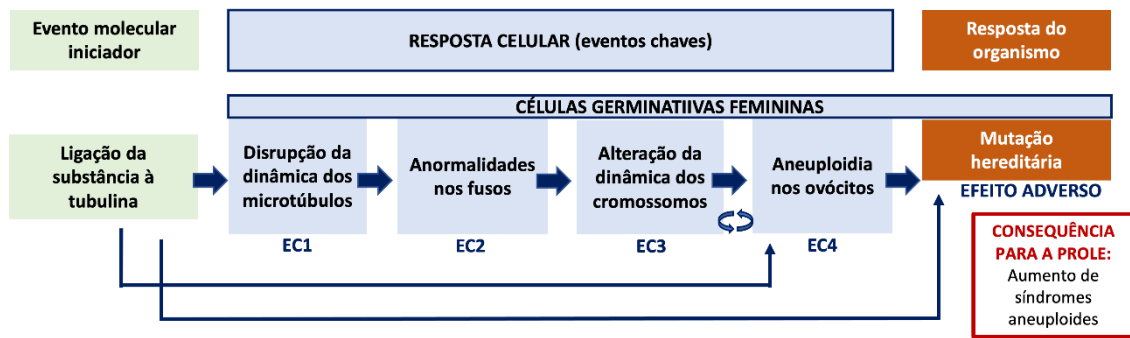


Figura 1. Via de Efeito Adverso para efeitos aneugênicos na prole decorrentes do evento molecular indicador (ligação de substâncias químicas à tubulina). Setas azuis representam a relação entre os eventos-chaves (EC). Essa relação pode ser adjacente (um evento-chave desencadeia a ocorrência do evento seguinte) ou não-adjacente (um evento-chave desencadeia outros eventos-chaves paralelamente à via principal).

Adaptado de: <https://aopwiki.org/aops/106>

O EMI foi devidamente investigado para o CBZ, incluído na AOP como exemplo de substância capaz de desencadeá-lo. Além disso, esse IA também foi associado ao EC de indução de aneuploidia em ovócitos de hamsters, conforme exposto nos parágrafos anteriores. Nessa AOP, estabeleceu-se como janela de sensibilidade para a indução de aneuploidia a exposição no período próximo à ovulação. Relatou-se ainda que, a depender da dose e do tempo de exposição, os compostos inibidores do fuso podem induzir aneuploidia em quase 100% dos oócitos. Então, os dados corroboram que a interrupção na dinâmica dos fusos é um alvo bastante sensível nas células germinativas femininas e que pode ocorrer tanto na meiose I quanto na meiose II.

Há ampla evidência que embasa essa AOP e o peso geral da evidência é forte. A etiologia da aneuploidia humana ainda não é bem compreendida, embora existam fortes evidências de uma ocorrência preferencial durante a meiose feminina I e uma correlação positiva com a idade materna. As semelhanças na oogênese entre roedores e humanos sugerem que o EMI e EC são conservados e ocorreriam em oócitos humanos também. Além disso, a sequência temporal dos eventos, desde as interações bioquímicas iniciais (EMI), que ocorrem dentro de segundos a minutos de exposição; passando pela ocorrência de danos ao fuso (EC2) e falha no alinhamento e segregação cromossômica na meiose (EC3), o que ocorre nas horas seguintes; até a formação e ovulação de um oócito aneuploide (EC4) e sua possível fertilização, que ocorreria posteriormente; é totalmente coerente e consistente com a linha do tempo de desenvolvimento e fertilização do oócito (Marchetti et al., 2016).

Na maioria dos casos, a condição aneuploide resultará na morte do conceito em diferentes estágios do desenvolvimento embriofetal, dependendo do cromossomo envolvido na aneuploidia, com ocorrência de aborto espontâneo precoce após alteração de cromossomos maiores ou que possuem mais genes, por exemplo. Quando os fetos aneuploides sobrevivem ao nascimento, eles manifestam diferentes síndromes, caracterizadas por sintomas variáveis, os quais também dependem do cromossomo específico envolvido (Marchetti et al., 2016).

Essa condição aneuploide que surge durante a meiose em células germinativas representa a anormalidade cromossômica mais comum no nascimento e é a principal causa de perda gestacional em humanos. É amplamente aceito que oócitos humanos são particularmente suscetíveis à indução de aneuploidia. Em humanos, a maioria dos embriões aneuploides sobrevivem até o estágio de blastocisto e são perdidos na época da implantação. Os dados de sobrevivência de aneuploidias em humanos geralmente correspondem aos de camundongos: aneuploidias dos cromossomos sexuais são viáveis e todas as monossomias autossômicas e a maioria das trissomias morrem antes do nascimento, com exceção das trissomias 13, 18 e 21 que, em alguns casos, sobrevivem algum tempo após o nascimento ou por um maior período (como no caso da síndrome de Down). Mesmo no caso da trissomia do 21, a mais viável das trissomias humanas, estima-se que aproximadamente 80% dos fetos têm morte intrauterina. Embora compatíveis com a vida, tais condições aneuplóides apresentam uma gama de efeitos adversos à saúde, desde infertilidade (por exemplo, síndrome de Klinefelter devido ao cariótipo XXY) à grave deficiência mental e física e redução da expectativa de vida (por exemplo, síndrome de Edwards devido à trissomia 18) (Marchetti et al., 2016).

Limiar para os efeitos no sexo feminino

Não foi possível estabelecer um NOAEL para os efeitos do CBZ no sexo feminino (≥ 250 mg/kg), pois as doses testadas em todos os estudos disponíveis foram muito altas, e em todas foram observados efeitos adversos.

Os estudos discutem que certo nível de dano ao fuso é necessário para prejudicar a sua função, com relato de que em doses mais altas a severidade do efeito aneugênico aumenta, com mais oócitos contendo não um, mas vários cromossomos supranumerários. No entanto, é importante destacar que não foram desenvolvidos modelos quantitativos para a relação entre os eventos dessa AOP. De modo geral, sabe-se que substâncias que interferem na montagem de microtúbulos já em baixas concentrações *in vitro* tendem a ser fortes aneugênicos *in vivo*, entretanto, não foi determinada uma relação quantitativa especificamente para essa comparação (Marchetti et al., 2016).

Então, com base na AOP acima descrita, conclui-se que a indução de aneugênese nos oócitos é o mecanismo por meio do qual o CBZ acarreta TR; e, conforme já discutido minuciosamente no Parecer Nº 1/2021/SEI/CREAV /GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA (SEI nº [1309909](#), que avaliou o potencial de mutagenicidade do CBZ, há evidências robustas que demonstram uma maior susceptibilidade dos ovócitos à aneuploidia, em relação aos espermatozoides e às células somáticas, ainda com agravamento decorrente do processo de envelhecimento. Por essa razão, as doses obtidas de estudos com células somáticas ou germinativas masculinas não podem ser extrapoladas para ovócitos, não sendo possível, portanto, o estabelecimento adequado de um limiar de dose para a ocorrência desse efeito.

Quadro 4: Avaliação dos potenciais efeitos na função sexual ou capacidade reprodutiva feminina após exposição única ao CBZ.

Referência	Protocolo	Resultados segundo autor	Limitações, inconsistências e considerações relevantes	Conclusão
Jeffay et al., 1996	Pureza: 95%; Linhagem: Hamsters sírios ♀; Delineamento: Estudo <i>in vivo</i>: CBZ administrado em dose única (gavagem, 1000 mg/kg p.c.; n = 10), na tarde do proestro (maturação meiótica dos oócitos). Eutanásia após a ovulação (D₁ pós-tratamento) para amostragem de oócitos e avaliação de aneuploidia; ou entre os DG₁₋₅, para avaliar a fertilização e o desenvolvimento do embrião pré-implantação, bem como enumerar sítios de implantação precoces.	• ↑* ovócitos aneuploides (37,2% CBZ x 13,5% controle), sem anormalidades estruturais; • Sem alteração na taxa de fertilização e no n° ovócitos recuperados; ↓* n° médio de sítios de implantação; • Atraso/ interrupção no desenvolvimento embrionário pré-implantação: ↑* embriões com menos de oito células (DG₃) e embriões que não atingiram o estágio de blastocisto (DG₄); • Dados indicam maior sensibilidade do oócito aos efeitos induzidos por CBZ durante a formação do fuso (maturação do ovócito) do que após esse processo.	• CBZ usado como modelo de TR; • Dose muito alta; • O estudo de Perreault (1992) indicou que CBZ induziu perda gestacional precoce quando administrado na tarde do proestro ou no início da manhã do estro, mas não quando administrado após a fertilização; • 121 e 52 oócitos analisados, nos grupos CBZ e ctl, respectivamente.	POSITIVO LOAEL = 1000 mg/kg p.c. (única dose testada)
Perreault et al., 1992 Também avaliado por PMRA, 2011	Pureza: 95%; Linhagem: Hamsters sírios (90 dias de idade); Delineamento: Estudo <i>in vivo</i>: CBZ administrado em dose única via gavagem durante a meiose I (n = 10; 0, 250, 500, 750 ou 1000 mg/kg p.c. – tarde do proestro – maturação do oócito) antes	• Durante a meiose I: ↓* % animais prenhes (≥750 mg/kg); ↓* n° médio de filhotes vivos (≥250 mg/kg), efeito atribuível às perdas pré e pós-implantação. • Durante meiose II: ↓ n° médio de filhotes vivos (s/ alteração no % fêmeas prenhes). Este efeito desapareceu com a administração de CBZ um pouco depois (08:00 ou 09:00 h), após a ocorrência dos eventos de	• Doses altas. • CBZ usado como modelo de TR: alteração de eventos dependentes de microtúbulos que ocorrem no oócito durante a maturação meiótica e fertilização;	POSITIVO LOAEL = 250 mg/kg p.c. (menor dose testada)

	do acasalamento ou durante a meiose II (n = 5-6; 0 ou 1000 mg/kg p.c. – manhã do estro – fertilização) após o acasalamento noturno. Avaliação do resultado da gestação no dia 15 (na tarde antes do parto).	- fertilização dependentes de microtúbulos. - Exposição única a CBZ em momentos críticos, coincidente com eventos meióticos dependentes de microtúbulo, pode resultar em perda gestacional precoce.		
Zuelke & Perreault, 1995	Pureza: 95%; Linhagem: Hamsters sírios; Delineamento: CBZ administrado durante a fertilização <i>in vitro</i> (6 µg/mL) e <i>in vivo</i> (1000 mg/kg p.c., gavagem, n=6). Imunofluorescência de microtúbulos, cultura de zigotos e avaliação microscópica dos zigotos e embriões.	- Fertilização <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>: ↑* anormalidades morfológicas na cromatina materna de zigotos (6-8h; múltiplos corpos polares secundários, múltiplos pronúcleos e arrasto meiótico) e de embriões (26h; blastômeros micronucleados, múltiplos corpos polares secundários e arrasto na metáfase); ↓* embriões que progrediram para 2 células; - Imunofluorescência confirmou danos aos fusos meióticos na fertilização <i>in vitro</i>; - Dose única de CBZ, na fertilização <i>in vivo</i>, induziu aneuploidia no zigoto.	- Dose alta. - Pequeno grupo amostral. - Indução de superovulação não detalhada; - Perda precoce na prenhez pode ser explicada por dois mecanismos: arrasto na meiose, sem clivagem do zigoto; ou indução de aneuploidia no zigoto, com subsequente arrasto no desenvolvimento.	POSITIVO LOAEL = 1000 mg/kg p.c. (única dose testada)
Kawaratani et al., 2015	Pureza: Benomil e CBZ (pureza não informada); Linhagem: Células MCF-7; Delineamento: Estudo <i>in vitro</i>: incubação com Benomil ou CBZ (1, 10, 25, 50 e 100 µM) por 72 h. Análise do ciclo celular e imunofluorescência.	- Inibição de histona desacetilase (HDAC) 1 e acúmulo de histona H3 acetilada em células MCF-7; ↑ proteína e RNAm aromatase, embora em altas concentrações; - É provável tenha ocorrido aumento da atividade do promotor do gene da aromatase via acetilação da histona H3.		ND (Evidência inadequada para análise de desfechos reprodutivos induzidos pelo CBZ)
Legenda: *= alteração estatisticamente significativa; sg= significativa; CBZ= Carbendazim; ST= substância teste; ctl= controle; D= dia; DG= dia gestacional; DPN= dia pós-natal; ND= não determinado; NI = não informado; p.c.= peso corpóreo; TR= toxicidade reprodutiva.				

Quadro 5. Estudo epidemiológico da literatura que avaliou o risco de exposição ao Carbendazim.

Referência	Delineamento	Resultados segundo o autor	Limitações, inconsistências e considerações relevantes
Petrelli et al. 2003	Pureza: Não se aplica. Linhagem: Estudo em humanos; Delineamento: Estudo epidemiológico transversal. Entrevista de 184 trabalhadores de estufas (Itália, ano 2000), casados e com filhos. Registro de relato de exposição ocupacional dos homens e de exposições ocupacionais e domésticas de suas esposas durante a gravidez e nos meses antecedentes (primeira gravidez de cada casal para obtenção de observações independentes). Avaliação do risco de aborto espontâneo.	• 48 trabalhadores expostos x 136 não-expostos: 30/48 foram expostos ao Benomil e 6/48 ao CBZ; ocorrência de 5 abortos espontâneos (13,9%); • ↑sg taxa de aborto espontâneo entre os cônjuges de trabalhadores expostos. O modelo de regressão logística confirmou o risco aumentado de aborto espontâneo (OR* = 11,8; IC 95% 2,3–59,6). * valor ajustado com base em todas as variáveis que podem ser fatores de confusão para o aborto espontâneo: idade, hábito de fumar, nível educacional de ambos os parceiros, tipo de trabalho do cônjuge e o tempo entre o resultado da gravidez e a entrevista.	• Estudo apenas descritivo, com limitações inerentes a estudos transversais: determinação da exposição e de dentro do mesmo intervalo de tempo, viés de memória, tamanho da amostra (reduz a precisão do risco estimado), análise detalhada quanto ao período de exposição e específicos do CBZ. Permitem apenas o levantamento sem a possibilidade de testá-las, por isso esse tipo de para a tomada de decisão. • Risco de aborto espontâneo foi avaliado por meio de regressão logística. • Grupo controle: trabalhadores que não relataram uso compostos listados.

CLASSIFICAÇÃO TOXICOLÓGICA DO CARBENDAZIM EM FUNÇÃO DE EFEITOS ADVERSOS À FISIOLOGIA REPRODUTIVA

Não há estudos epidemiológicos satisfatórios que tenham avaliado os efeitos do CBZ em seres humanos.

Com base nos dados apresentados neste parecer, conclui-se que o CBZ possui evidência suficiente de efeitos tóxicos na fisiologia reprodutiva em animais experimentais, devendo ser classificado na Categoria 1B em função da toxicidade reprodutiva, ou seja, como um produto que presumidamente possui o potencial de causar toxicidade reprodutiva em seres humanos (RDC nº 294/2019). Essa classificação do CBZ foi corroborada pelas demais agências internacionais (APVMA, 2009; EFSA, 2010; PMRA, 2019; USEPA, 2020), bem como pela FT (Innvitro, 2020), conforme detalhado no Quadro 6.

O Art. 33 da RDC nº 294/2019 prevê que o pedido de avaliação toxicológica será indeferido quando as etapas de identificação do perigo e de avaliação dose-resposta indicarem evidências suficientes para os produtos serem categorizados como presumidamente causadores de danos ao aparelho reprodutor, e não for possível determinar um limiar de dose para algum desses desfechos que permita proceder com as demais etapas da avaliação do risco. Assim, conforme discutido nos itens 2.1.1 e 2.1.2, não é possível determinar um limiar de dose capaz de impedir a ocorrência dos efeitos induzidos pelo CBZ sobre a fisiologia reprodutiva, o que impede que se possa proceder com as demais etapas da avaliação do risco.

CONCLUSÃO

As evidências fornecidas pelos estudos da literatura científica, pelos documentos das principais agências reguladoras internacionais e pelo relatório da FT indicam que o CBZ induz TR, com efeitos adversos sobre a fisiologia reprodutiva. No sexo masculino, os principais efeitos são alterações no peso testicular, aumento do diâmetro e atrofia dos túbulos seminíferos (contendo espermatogônias e fragmentos de células de Sertoli), obstrução de dutos eferentes, descamação de células germinativas, anormalidades morfológicas de espermátides e de espermatozoides, diminuições na contagem e na motilidade espermáticas e inibição da espermatogênese, culminando em infertilidade irreversível. No sexo feminino, os efeitos descritos foram geração de oócitos aneuplóides; atraso/interrupção no desenvolvimento embrionário pré-implantação e redução nos sítios de implantação; alterações morfológicas nos óvulos após a fertilização; perda gestacional precoce decorrente de perda embrionária pré e pós-implantação; aumento significativo de zigotos aneuplóides, com incidência aumentada de síndromes na prole.

Esse conjunto de efeitos adversos foi associado à interação do CBZ à β -tubulina, com impedimento da montagem adequada dos fusos acromáticos nos processos de mitose e meiose ocorridos durante a espermatogênese/ovogênese, resultando em falha na segregação cromossômica e, consequentemente, aneuploidia nas células germinativas masculinas/femininas. Na ovogênese, especificamente, há um AOP bem caracterizado (AOP 106 - <https://aopwiki.org/aops/106>) para a relação entre a exposição a compostos que se ligam à tubulina, como o CBZ, e a indução de aneuploidia na prole. Entretanto, não foram desenvolvidos modelos quantitativos para a relação entre os eventos dessa AOP, o que impede o estabelecimento de limiar de dose seguro associado à ocorrência desses efeitos.

Além desse efeito antimitótico, outros mecanismos relacionados à despolimerização dos microtúbulos devem estar envolvidos na geração dos efeitos adversos relatados no sexo masculino, pois, além da formação adequada do fuso acromático, os MT desempenham diversas e importantes funções nas células, quais sejam: localização do centro da célula e posicionamento de diferentes organelas (aparelho de Golgi, retículo endoplasmático, mitocôndrias, dentre outras) no interior da célula; manutenção do formato e migração celular, transporte de carga dentro das células etc.

Desse modo, considerando que o CBZ é um agente aneugênico, conforme já discutido no Parecer nº 1/2021/SEI/CREAV/GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA (SEI nº [1309909](#)), e que induz os efeitos de TR descritos no presente parecer por meio desse mecanismo de aneuploidia nos oócitos e espermatozoides, além de outros efeitos testiculares diretos decorrentes da inibição da polimerização dos microtúbulos; considerando ainda que não há evidências que permitam estimar uma dose segura *in vivo* em que não se espera a ocorrência desses danos cromossômicos às células germinativas em humanos; e, principalmente, que não há evidências que permitam estimar uma dose segura *in vivo* em que não se espera a ocorrência desses efeitos sobre a fisiologia reprodutiva, os quais já foram verificados na menor dose testada (0,1 mg/kg p.c./dia), a qual é 500 vezes inferior ao LOAEL definido para aneugenicidade em células germinativas; conclui-se que não é possível definir um limiar de dose capaz de impedir a ocorrência dos efeitos sobre a fisiologia reprodutiva induzidos pelo CBZ (Quadro 6). Portanto, com base na avaliação do peso das evidências disponíveis e considerando a legislação brasileira, conclui-se que o CBZ preenche os requisitos proibitivos de registro estabelecidos pela Lei nº 7.802, de julho de 1989 e pelo Decreto nº 4.074, de janeiro de 2002; devendo ser classificado na Categoria 1B em função da toxicidade reprodutiva, conforme estabelecido na Seção 6, Anexo IV da RDC nº 294, de 29 de julho de 2019. Em tais dispositivos legais, fica estabelecida a proibição do registro de agrotóxicos categorizados como conhecidos ou presumidamente causadores de dano ao aparelho reprodutor, e para os quais não seja possível determinar um limiar de dose que permita proceder com as demais etapas da avaliação do risco.

Quadro 6. Conclusões das principais autoridades reguladoras de agrotóxicos acerca do potencial de toxicidade para a reprodução do CBZ, bem como proposta da FT e conclusão da Anvisa.

Agência reguladora	Conclusão	NOAEL/ LOAEL reprodução	Doses de referência para avaliação do risco de humanos	Observações
APMVA (2009)	Tóxico para a reprodução	LOAEL: 50 mg/kg p.c	- IDA = 0,03 mg/kg p.c./dia - NOAEL de 2,5 mg/kg p.c./dia (estudo crônico de toxicidade em cães) com fator de incerteza padrão (100x). Considerado suficientemente protetivo dos efeitos para a reprodução. - DRfA = 0,05 mg/kg p.c./dia - LOAEL de 50 mg/kg p.c./dia (toxicidade	CBZ permitido em culturas alimentares.

			testicular em ratos) com fator de incerteza de padrão (100x) e fator adicional de 10x para a extrapolação de LOAEL para NOAEL.	
EFSA (2010)	Tóxico para a reprodução - classificado na categoria 1B de toxicidade reprodutiva (GHS).	NOAEL: 100 mg/kg p.c.	• IDA, DrfA e AOEL = 0,02 mg/kg p.c./dia - NOAEL de 10 mg/kg p.c./dia (toxicidade para o desenvolvimento em ratos e coelhos) com fator de incerteza padrão (100x) e fator adicional de 5x, devido aos efeitos terem sido observados na ausência de toxicidade materna.	Em 2010, foi proposta pela EFSA a manutenção do CBZ. No entanto, a legislação europeia mudou e passou a prever a proibição de produtos classificados na categoria 1B, de forma que o CBZ está proibido na Comunidade Europeia.
PMRA (2011, 2019)	Tóxico para a reprodução	LOAEL: 50 mg/kg p.c (toxicidade testicular)	• DRfA/IDA mulheres em idade reprodutiva = 0,01 mg/kg p.c. - NOAEL de 10 mg/kg p.c. (toxicidade para o desenvolvimento em ratos e coelhos) com fator de incerteza padrão (100x) e fator adicional de 10x devido às incertezas residuais quanto à sensibilidade potencial dos jovens. • DRfA homens acima de 13 anos = 0,16 mg/kg p.c. - LOAEL de 50 mg/kg p.c. (toxicidade testicular), com fator de incerteza padrão (100x) e fator adicional de 3x devido à falta de dados de aprendizagem e memória no EOGRTS e incertezas residuais quanto à sensibilidade potencial dos jovens. • IDA geral = 0,03 mg/kg p.c./dia - NOAEL de 9 mg/kg p.c./dia (toxicidade crônica em cães) com fator de incerteza padrão (100x) e fator adicional de 3x devido às incertezas residuais	Permitido apenas em plantas ornamentais e como preservativo industrial. Definição de doses de referência e AR em razão de ser um metabólito do TM, que tem uso em culturas alimentares.

			quanto à sensibilidade potencial dos jovens.	
USEPA (2020)	Tóxico para a reprodução	NOAEL: 14 mg/kg p.c./dia (EOGRTS: alterações histopatológicas e nos hormônios tireoidianos na dose de 53 mg/kg p.c./dia - considerado protetivo dos efeitos testiculares observados nos estudos via gavagem)	• IDA = 0,14 mg/kg p.c./dia – NOAEL de 14 mg/kg p.c./dia (EOGRTS) com fator de incerteza padrão (100x); • DRfA mulheres em idade reprodutiva = 0,10 mg/kg p.c./dia – NOAEL de 10 mg/kg p.c./dia (toxicidade para o desenvolvimento em ratos) com fator de incerteza padrão (100x) (considerou-se que não há necessidade de um fator adicional para bebês e crianças pequenas, pois a base de dados para o CBZ é completa e não há incertezas residuais).	Permitido apenas em plantas ornamentais e como preservativo industrial. Definição de doses de referência e AR em razão de ser um metabólito do TM, que tem uso em culturas alimentares.
JMPR (2005)	Tóxico para a reprodução	NOAEL: 50 mg/kg p.c. (estudo de toxicidade para o sistema reprodutor masculino em ratos; apoiado pelos estudos de indução de aneuploidia <i>in vivo</i>)	• IDA = 0,03 mg/kg p.c./dia - NOAEL de 2,5 mg/kg p.c./dia (toxicidade crônica em cães) com fator de segurança padrão (100x). • DRfA mulheres em idade fértil = 0,1 mg/kg p.c. - NOAEL de 10 mg/kg p.c./dia (toxicidade para o desenvolvimento em ratos e coelhos) com fator de segurança padrão (100x). • DRfA geral = 0,5 mg/kg p.c. - NOAEL de 50 mg/kg p.c. (toxicidade testicular e indução de aneuploidia <i>in vivo</i>) com fator de segurança padrão (100x).	Para a população geral, inclusive crianças, efetuou-se a aplicação de fator de incerteza padrão (100x).
Proposta da FT (Innvitro, 2020)	Tóxico para a reprodução - classificado na categoria 1B de toxicidade reprodutiva	NOAEL: 7,5 mg/kg p.c./dia (toxicidade crônica em cães)	• IDA = 0,075 mg/kg p.c./dia – NOAEL de 7,5 mg/kg p.c./dia com fator de incerteza padrão (100x)	

Anvisa	Tóxico para a reprodução - classificado na categoria 1B de toxicidade reprodutiva (GHS; RDC 294/2019).	NOAEL: ND LOAEL: 0,1 mg/kg p.c. (redução da motilidade espermática)	Não há dose experimental sem efeito adverso para a reprodução que possa ser considerado um limiar de acordo com a RDC nº 294/2019. Além disso, o mecanismo de ação subjacente a alguns efeitos adversos para a reprodução envolve a indução de aneuploidia em células germinativas pelo CBZ, para o qual também não foi definido limiar.	A não definição de um limiar de dose seguro impede que se possa proceder com as demais etapas da avaliação do risco, conforme previsto na RDC nº 294/2019.

REFERÊNCIAS

Adedara IA, Vaithinathan S, Jubendradass R, Mathur PP, Farombi EO. **Kolaviron prevents carbendazim-induced steroidogenic dysfunction and apoptosis in testes of rats.** Environ Toxicol Pharmacol. May;35(3):444-53. doi: 10.1016/j.etap.2013.01.010. Epub 2013 Feb 9. PMID: 23474402. 2013.

Akbarsha, M.A., Vijendrakumar, S., Kadalmani, B., Girija, R., Faridha, A. **Curative property of Withania somnifera Dunal root in the context of carbendazim-induced histopathological changes in the liver and kidney of rat.** Phytomedicine, Volume 7, Issue 6, 2000, Pages 499-507, [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(00\)80036-7](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(00)80036-7).

Akbarsha MA, Kadalmani B, Girija R, Faridha A, Hamid KS. **Spermatotoxic effect of carbendazim.** Indian J Exp Biol. 2001 Sep;39(9):921-4. PMID: 11831377.

APMVA. Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. Office of Chemical Safety and Environmental Health Office of Health Protection. Chemical Review Program. **Human health risk assessment of Carbendazim.** Volume 2. December 2009.

Breslin WJ, Paulman A, Sun-Lin D, Goldstein KM, Derr A. **The inhibin B (InhB) response to the testicular toxicants mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP), 1,3 dinitrobenzene (DNB), or carbendazim (CBZ) following short-term repeat dosing in the male rat.** Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol. Feb;98(1):72-81. doi: 10.1002/bdrb.21043. Epub 2013 Jan 24. PMID: 23348955. 2013.

Campion S.N., Catlina N., Housemanb E.A., Hensleyc J., Suib Y., Gaidoc K.W., Wub Z., Boekelheide K. **Molecular alterations underlying the enhanced disruption of spermatogenesis by 2,5-hexanedione and carbendazim co-exposure.** Reproductive Toxicology, v. 33, p. 382–389. 2012.

Carter SD, Hess RA, Laskey JW. **The fungicide methyl 2-benzimidazole carbamate causes infertility in male Sprague-Dawley rats.** Biol Reprod. Oct;37(3):709-17. doi: 10.1095/biolreprod37.3.709. PMID: 3676414. 1987.

Correa LM, Nakai M, Strandgaard CS, Hess RA, Miller MG. **Microtubules of the mouse testis exhibit differential sensitivity to the microtubule disruptors Carbendazim and colchicine.** Toxicol Sci. 2002 Sep;69(1):175-82. doi: 10.1093/toxsci/69.1.175. PMID: 12215672.

Dere, E., Wilson, S., Anderson, L., Boekelheide, K. **Sperm Molecular Biomarkers Are Sensitive Indicators of Testicular Injury Following Subchronic Model Toxicant Exposure.** Toxicological Sciences. 153. kfw137. 10.1093/toxsci/kfw137. 2016.

Durand P, Martin G, Blondet A, Gilleron J, Carette D, Janczarski S, Christin E, Pointis G, Perrard MH. **Effects of low doses of carbendazim or iprodione either separately or in mixture on the pubertal rat seminiferous epithelium: An ex vivo study.** Toxicol In Vitro. 2017 Dec;45(Pt 3):366-373. doi: 10.1016/j.tiv.2017.05.022. Epub May 30. PMID: 28576679. 2017.

EFSA. European Food Safety Authority. **Draft Re-Assessment Report. Carbendazim.** Volume 3. Annex B-6- Toxicology and Metabolism. 16 July 2009a.

EFSA. European Food Safety Authority. **Conclusion on Pesticide Peer Review. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance carbendazim.** EFSA Journal 2010; 8(5):1598. 2010.

EOGRTS. **An F1-Extended Two-Generation Reproductive Toxicity Study with Carbendazim in the Wistar Rat.** DACO 4.8. 2014. Apud USEPA (2020; MRID49547201) e PMRA (2019; PMRA#2490664).

Erdos Z, Pearson K, Goedken M, Menzel K, Sistare FD, Glaab WE, Saldutti LP. **Inhibin B response to testicular toxicants hexachlorophene, ethane dimethane sulfonate, di-(n-butyl)-phthalate, nitrofurazone, DL-ethionine, 17-alpha ethinylestradiol, 2,5-hexanedione, or carbendazim following short-term dosing in male rats.** Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol. Feb;98(1):41-53. doi: 10.1002/bdrb.21035. Epub 2013 Jan 24. PMID: 23348767. 2013.

Evenson DP, Janca FC, Jost LK. **Effects of the fungicide methyl-benzimidazol-2-yl carbamate (MBC) on mouse germ cells as determined by flow cytometry.** J Toxicol Environ Health. 20(4):387-99. doi: 10.1080/15287398709530992. PMID: 3560261. 1987.

Goldman JM, Rehnberg GL, Cooper RL, Gray LE Jr, Hein JF, McElroy WK. **Effects of the benomyl metabolite, carbendazim, on the hypothalamic-pituitary reproductive axis in the male rat.** Toxicology. Jul 17;57(2):173-82. doi: 10.1016/0300-483x(89)90163-7. PMID: 2501910. 1989.

Gotoh Y, Netsu J, Nakai M, Nasu T. **Testicular damage after exposure to carbendazim depends on the number of patent efferent ductules.** J Vet Med Sci. Jul;61(7):755-60. doi: 10.1292/jvms.61.755. PMID: 10458097. 1999.

Gray LE Jr, Ostby J, Linder R, Goldman J, Rehnberg G, Cooper R. **Carbendazim-induced alterations of reproductive development and function in the rat and hamster.** Fundam Appl Toxicol. Aug;15(2):281-97. doi: 10.1016/0272-0590(90)90055-o. PMID: 2227156. 1990.

Hess R.A.; Nakai M. **Histopathology of the male reproductive system induced by the fungicide benomyl.** Histology and Histopathology, v. 15, p. 207-224. 2000.

Hood, Ronald D. **Developmental and reproductive toxicology a practical approach: a practical approach.** 3. ed. London: Informa Healthcare, 2012.

Innvitro Pesquisa & Desenvolvimento S/S Ltda (Vilella et al). P16/20-4 - **Relatório de Reavaliação do Ingrediente Ativo Carbendazim. Reprodução e Desenvolvimento.** Contratante: FT Carbendazim. Revisão 1, 28p., 09/10/2020.

Jeffay SC, Libbus BL, Barbee RR, Perreault SD. **Acute exposure of female hamsters to carbendazim (MBC) during meiosis results in aneuploid oocytes with subsequent arrest of embryonic cleavage and implantation.** Reprod Toxicol. May-Jun;10(3):183-9. doi: 10.1016/0890-6238(96)00020-2. PMID: 8738554. 1996.

JPMR/FAO (2005). **Carbendazim 87–106**, 2005.

Kadalmani B, Girija R, Faridha A, Akbarsha MA. **Male reproductive toxic effects of carbendazim: hitherto unreported targets in testis.** Indian J Exp Biol. Jan;40(1):40-4. PMID: 12561966. 2002.

Kawaratani Y, Matsuoka T, Hirata Y, Fukata N, Nagaoka Y, Uesato S. **Influence of the carbamate fungicide benomyl on the gene expression and activity of aromatase in the human breast carcinoma cell line MCF-7.** Environ Toxicol Pharmacol. 2015 Jan;39(1):292-9. doi: 10.1016/j.etap.2014.11.032. Epub 2014 Dec 10. PMID: 25543211.

Kawata R, Kagawa T, Koya Y, Kajiyama H, Oda S, Yokoi T. **Exploration of small RNA biomarkers for testicular injury in the serum exosomes of rats,** Toxicology, Volume 440, 2020.

Li H., Zhangb P., Zhao Y., Zhangc H. **Low doses of carbendazim and chlorothalonil synergized to impair mouse T spermatogenesis through epigenetic pathways.** Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 188, p. 1-10. 2020.

Lim J., Miller M.G. **Role of testis Exposure Levels in the Insensitivity of Prepubertal Rats to Carbendazim-Induced Testicular Toxicity.** Fundamental and Applied Toxicology, v. 37, p. 158-167. 1997a.

Lim J., Miller MG. **The Role of the Benomyl Metabolite Carbendazim in Benomyl-Induced Testicular Toxicity,** Toxicology and Applied Pharmacology, Volume 142, Issue 2, Pages 401-410, ISSN 0041-008X, <https://doi.org/10.1006/taap.1996.8042>. 1997b.

Liu J, Zhang P, Zhao Y, Zhang H. **Low dose carbendazim disrupts mouse spermatogenesis might Be through estrogen receptor related histone and DNA methylation.** Ecotoxicol Environ Saf. 176:242-249. doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.03.103. Epub 2019 Mar 30. PMID: 30939404. 2019.

Lu SY, Liao JW, Kuo ML, Wang SC, Hwang JS, Ueng TH. **Endocrine-disrupting activity in carbendazim-induced reproductive and developmental toxicity in rats.** J Toxicol Environ Health A. Oct 8;67(19):1501-15. doi: 10.1080/15287390490486833. PMID: 15371226. 2004.

Marchetti F, Massarotti A, Yauk CL, Pacchierotti F, Russo A. **The adverse outcome pathway (AOP) for chemical binding to tubulin in oocytes leading to aneuploid offspring.** Environ Mol Mutagen. 2016 Mar;57(2):87-113. doi: 10.1002/em.21986. Epub 2015 Nov 19. PMID: 26581746. 2016.

Markelwicz R.J. Jr., Hall S.J, Boekelheide K. **2,5-Hexanedione and Carbendazim Coexposure Synergistically Disrupts Rat Spermatogenesis Despite Opposing Molecular Effects on Microtubules.** Toxicological Sciences, v. 80, p. 92–100. 2004.

- Moffit JS, Bryant BH, Hall SJ, Boekelheide K. **Dose-dependent effects of sertoli cell toxicants 2,5-hexanedione, carbendazim, and mono-(2-ethylhexyl) phthalate in adult rat testis.** Toxicol Pathol. Aug;35(5):719-27. doi: 10.1080/01926230701481931. PMID: 17763286. 2007.
- Moffit, J., Her, L., Mineo, A., Knight, B., Phillips, J., Thibodeau, M.. **Assessment of Inhibin B as a Biomarker of Testicular Injury Following Administration of Carbendazim, Cetrorelix, or 1,2-Dibromo-3-Chloropropane in Wistar Han Rats.** Birth defects research. Part B, Developmental and reproductive toxicology. 98. 10.1002/bdrb.21045. 2013.
- Nakai M, Hess RA, Moore BJ, Guttroff RF, Strader LF, Linder RE. **Acute and long-term effects of a single dose of the fungicide carbendazim (methyl 2-benzimidazole carbamate) on the male reproductive system in the rat.** J Androl. 1992 Nov-Dec;13(6):507-18. PMID: 1293130.
- Nakai, M., B. Moore and R. Hess. **Epithelial reorganization and irregular growth following carbendazim-induced injury of the efferent ductules of the rat testis.** The Anatomical Record 235: n. pag. 1993.
- Nakai M, Hess RA. **Morphological changes in the rat Sertoli cell induced by the microtubule poison carbendazim.** Tissue Cell. 1994 Dec;26(6):917-27. doi: 10.1016/0040-8166(94)90041-8. PMID: 7886678.
- Nakai M, Hess RA, Netsu J, Nasu T. **Deformation of the rat Sertoli cell by oral administration of carbendazim (methyl 2-benzimidazole carbamate).** J Androl. 16(5):410-6. PMID: 8575980. 1995.
- Nakai, M., Hess, R.A., Matsuo, F., Gotoh, Y., Nasu, T. **Further observations on carbendazim-induced abnormalities of spermatid morphology in rats,** Tissue and Cell, Volume 29, Issue 4, Pages 477-485, ISSN 0040-8166, [https://doi.org/10.1016/S0040-8166\(97\)80033-X](https://doi.org/10.1016/S0040-8166(97)80033-X). 1997a.
- Nakai M, Hess RA. **Effects of carbendazim (methyl 2-benzimidazole carbamate; MBC) on meiotic spermatocytes and subsequent spermiogenesis in the rat testis.** Anat Rec. 1997 Mar;247(3):379-87. doi: 10.1002/(SICI)1097-0185(199703)247:3<379::AID-AR9>3.0.CO;2-P. PMID: 9066915. 1997b.
- Nakai M, Toshimori K, Yoshinaga K, Nasu T, Hess RA. **Spermatids of prepubertal male rats are susceptible to carbendazim during early spermiogenesis.** Arch Histol Cytol. (5):433-7. doi: 10.1679/aohc.61.433. PMID: 9990427. 1998a.
- Nakai, M., Toshimori, K., Yoshinaga, K. et al. **Carbendazim-induced abnormal development of the acrosome during early phases of spermiogenesis in the rat testis.** Cell Tissue Res 294, 145–152. <https://doi.org/10.1007/s004410051164>. 1998b.
- Nakai M, Miller MG, Carnes K, Hess RA. **Stage-specific effects of the fungicide carbendazim on Sertoli cell microtubules in rat testis.** Tissue Cell. 2002 Apr;34(2):73-80. doi: 10.1016/s0040-8166(02)00006-x. PMID: 12165241.
- OECD. Revised Guidance Document 150 on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption, OECD Series on Testing and Assessment, OECD Publishing, Paris; 2018.
- Pacheco SE, Anderson LM, Sandrof MA, Vantangoli MM, Hall SJ, Boekelheide K. **Sperm mRNA transcripts are indicators of sub-chronic low dose testicular injury in the Fischer 344 rat.** PLoS One. 7(8):e44280. doi: 10.1371/journal.pone.0044280. Epub 2012 Aug 31. PMID: 22952946; PMCID: PMC3432073. 2012.

Petrelli G, Figà-Talamanca I, Lauria L, Mantovani A. **Spontaneous abortion in spouses of greenhouse workers exposed to pesticides**. Environ Health Prev Med. Jul;8(3):77-81. doi: 10.1007/BF02897919. PMID: 21432103; PMCID: PMC2723369. 2003.

Perreault SD, Jeffay S, Poss P, Laskey JW. **Use of the fungicide carbendazim as a model compound to determine the impact of acute chemical exposure during oocyte maturation and fertilization on pregnancy outcome in the hamster**. Toxicol Appl Pharmacol. Jun;114(2):225-31. doi: 10.1016/0041-008x(92)90072-z. PMID: 1609414. 1992.

Pisani C, Voisin S, Arafah K, Durand P, Perrard MH, Guichaoua MR, Bulet P, Prat O. **Ex vivo assessment of testicular toxicity induced by carbendazim and iprodione, alone or in a mixture**. ALTEX. 2016;33(4):393-413. doi: 10.14573/altex.1601253. PMID: 27155993. 2016.

PMRA. Health Canada Pest Management Regulatory Agency. **Proposed Registration Decision. Carbendazim**. PRD2011-04. 2011.

PMRA. Health Canada Pest Management Regulatory Agency. **Proposed Registration Decision. Thiophanate-Methyl and Its Associated End-use Products**. PRVD2019-07. 28 June 2019.

Rama EM, Bortolan S, Vieira ML, Gerardin DC, Moreira EG. **Reproductive and possible hormonal effects of carbendazim**. Regul Toxicol Pharmacol. 2014 Aug;69(3):476-86. doi: 10.1016/j.yrtph.2014.05.016. Epub May 24. PMID: 24863245. 2014.

Rajeswary S, Kumaran B, Ilangovan R, Yuvaraj S, Sridhar M, Venkataraman P, Srinivasan N, Aruldas MM. **Modulation of antioxidant defense system by the environmental fungicide carbendazim in Leydig cells of rats**. Reproductive Toxicology, Volume 24, Issues 3–4, 2007.

Salihu M, Ajayi BO, Adedara IA, Farombi EO. **6-Gingerol-rich fraction prevents disruption of histomorphometry and marker enzymes of testicular function in carbendazim-treated rats**. Andrologia. Dec;49(10). doi: 10.1111/and.12782. Epub 2017 Jan 19. PMID: 28102023. 2017a

Salihu M, Ajayi BO, Adedara IA, de Souza D, Rocha JBT, Farombi EO. **6-Gingerol-rich fraction from Zingiber officinale ameliorates carbendazim-induced endocrine disruption and toxicity in testes and epididymis of rats**. Andrologia. Jun;49(5). doi: 10.1111/and.12658. Epub 2016 Aug 22. PMID: 27546232. 2017b.

Sakr SA, Shalaby SY. **Carbendazim-induced testicular damage and oxidative stress in albino rats: ameliorative effect of licorice aqueous extract**. Toxicology and Industrial Health;30(3):259-267. 2014.

Upadhyay, J., Rana, M., Bisht, S. S., Rana, A., Durgapal, S., & Juyal, V. **Biomarker responses (Serum biochemistry) in pregnant female wistar rats and histopathology of their neonates exposed prenatally to pesticides**. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 55, 1–9. 2019.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. **Guidelines for Reproductive toxicity risk assessment**. EPA/630/R-96/009. Federal Register 61(212), 56274–56322. 1996.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. Memorandum. **Thiophanate-Methyl and Carbendazim: Amended Draft Human Health Risk Assessment for Registration Review**. Decision no 551693. DP D458977. 27 August 2020.

Yamada T., Sumida K., Saito K., Ueda S., Yabushita S., Sukata T., Kawamura S., Okuno Y., Seki T. **Functional genomics may allow accurate categorization of the benzimidazole fungicide**

Benomyl: lack of ability to act via steroid-receptor-mediated mechanisms. Toxicology and Applied Pharmacology, v. 205, p. 11–30. 2005.

Yu G, Guo Q, Xie L, Liu Y, Wang X. **Effects of subchronic exposure to carbendazim on spermatogenesis and fertility in male rats.** Toxicol Ind Health. Feb;25(1):41-7. doi: 10.1177/0748233709103033. PMID: 19318503. 2009.

Zari T.A., Al-Attar A.M. **Therapeutic effects of olive leaves extract on rats treated with a sublethal concentration of carbendazim.** European Review for Medical and Pharmacological Sciences, v. 15, p. 413-426. 2011.

Zuelke K.A.; Perreault, S.D. **Carbendazim (MBC) Disrupts Oocyte Spindle Function and Induces Aneuploidy in Hamsters Exposed During Fertilization (Meiosis 11).** Molecular Reproduction and Development, v. 42, p. 200-209. 1995.



Documento assinado eletronicamente por **Larissa Muratori Aguiar, Especialista em Regulação e Vigilância Sanitária**, em 13/07/2021, às 17:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/D10543.htm.



Documento assinado eletronicamente por **Camila Queiroz Moreira, Especialista em Regulação e Vigilância Sanitária**, em 13/07/2021, às 17:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/D10543.htm.



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Roberto Coradi de Freitas, Coordenador(a) de Reavaliação**, em 15/07/2021, às 19:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/D10543.htm.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.anvisa.gov.br/autenticidade>, informando o código verificador **1517596** e o código CRC **737B14E5**.

**PARECER Nº 26/2021/SEI/CREAV /GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA**

Processo nº 25351.945793/2019-57

Interessado: Coordenação de Reavaliação, Gerência de Monitoramento e Avaliação do Risco, GGTOX

Assunto: Analisa os dados do Sisagua em complemento ao PARECER Nº 3/2021/SEI/CREAV /GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA

Avalia a exposição dietética da população brasileira ao Carbendazim pelo consumo de água por meio da análise dos dados do Sisagua no período de 2014 a 2019, em complemento ao PARECER Nº 3/2021/SEI/CREAV /GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA.

Resumo

Em complemento ao PARECER Nº 3/2021/SEI/CREAV /GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA, o Sisagua foi analisado detalhadamente para os anos de 2014 a 2019 em relação à detecção de Carbendazim (CBZ). Os bancos de dados foram obtidos do portal de dados abertos do governo federal e, após exclusão dos registros com inconsistências, uma análise descritiva foi realizada. Foram obtidos 68.941 registros e 5.624 (8,2%) foram excluídos por apresentarem inconsistências. Foram analisados 63.317 registros de amostras e destas, 15,45% (9.784/63.310) apresentaram detecção de CBZ, com mediana da concentração em 2 µ/L (mínimo 0,01 e máximo de 662,0). Duas amostras apresentaram valores acima do valor máximo permitido (VMP). Nas amostras coletadas nos sistemas de abastecimento de água (SAA), 16,44% (6.413/39.008) detectaram CBZ, sendo que 13,12% (3.761/28.660) das amostras coletadas na saída do tratamento e 28,58% (1.041/3.519) das amostras coletadas no sistema de distribuição, foram amostras com detecção de CBZ. Entre as amostras coletadas nas soluções alternativas coletivas (SAC), 10,33% (2.383/23.060) foram amostras com detecção de CBZ. Nas SAC, entre as amostras coletadas no ponto de consumo, 22,5% (198/898) foram amostras com detecção de CBZ. Das amostras obtidas dos SAI, 79,10% (988/1.249). Conclui-se que a exposição dietética ao CBZ na água de abastecimento humano no Brasil é relevante e os métodos de tratamento não foram capazes de eliminar os resíduos de CBZ antes de chegar aos consumidores da água.

1. INTRODUÇÃO

A CREAV elaborou o PARECER Nº 3/2021/SEI/CREAV /GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA (SEI 1392941) que incluiu a análise dos dados do Sisagua. As primeiras análises do Parecer nº 3 suscitaram a necessidade de detalhar os dados de detecção do Carbendazim (CBZ) no âmbito do Sisagua. Neste sentido, para melhor compreender como se dá a interpretação dos dados do Sisagua no âmbito da Coordenação-Geral de Vigilância em Saúde Ambiental (CGVAM), responsável pela gestão do Sisagua, a GEMAR oficiou a CGVAM solicitando esclarecimentos quanto a interpretação do campo "resultados" (Ofício 4 – SEI 1604051). A CGVAM respondeu com os esclarecimentos necessários para a elaboração deste Parecer.

O presente Parecer descreve os dados de detecção do CBZ nas amostras analisadas no âmbito do Sisagua de 2014 a 2019.

2. MÉTODO

Os bancos de dados foram obtidos, em 09 de março de 2021, do portal de dados abertos do governo federal (<https://dados.gov.br/>), buscando-se a palavra Sisagua. A busca retornou 11 possibilidades. Os bancos selecionados foram o "SISAGUA - Vigilância (demais parâmetros): Dados do monitoramento da qualidade da água realizado pelo setor saúde conforme planos de monitoramento específicos, contemplando os resultados de análises de qualidade da água de alta complexidade." e o "SISAGUA - Controle Semestral: Dados do monitoramento da qualidade da água realizado pelo prestador de serviço em frequência superior à mensal, contemplando os resultados das análises de qualidade da água de alta complexidade".

Os bancos de dados foram unificados e foram selecionados os registros que apresentavam o campo "Parâmetro" preenchido com o texto 'Carbendazim + benomil - VMP: 120,0 µg/L'. A seguir, os registros inconsistentes foram excluídos. Foram considerados inconsistentes, conforme orientação do Ofício 75/2021/CGVAM/DSASTE/SVS/MS (SEI 1634236), os registros que apresentaram qualquer uma das seguintes condições:

- registros com resultado 'menor que LQ', sem o valor de LQ;
- registros com resultado 'menor que LD', sem o valor de LD;
- registros com valor de LD ou LQ igual a 0;
- registros com valor de LD superior ou igual ao valor de LQ;
- registros com resultado quantificado, igual a 0 (zero);
- registros com resultado quantificado, inferior ao LQ;
- registros com valor de resultado quantificado, igual ou inferior ao LD;
- registros com valor de resultado deixado em branco.

Para os registros restantes, aqueles com valor de resultado quantificado foram considerados "amostras com detecção de CBZ". Os registros que apresentavam o campo 'resultado' preenchido com 'menor que LD' ou 'menor que LQ' foram consideradas neste parecer como "amostras sem detecção do CBZ".

Os dados foram analisados no software Epiinfo 7.2.4.0.

3. RESULTADOS

O Sisagua registrou, de 2014 a 2019, 68.941 amostras nas quais o parâmetro 'Carbendazim + benomil - VMP: 120,0 µg/L' foi analisado. Foram considerados inconsistentes 5.624 (8,2%) registros, restando 63.317 registros válidos. As análises descritivas a seguir se referem a estes 63.317 registros.

A tabela 1 apresenta a distribuição das amostras segundo a UF. Observa-se, como já destacado no Parecer nº 3, uma representatividade inadequada por localidade em relação a coleta das amostras para análise do parâmetro 'Carbendazim + benomil - VMP: 120,0 µg/L'. Devido a esta representatividade inadequada, optou-se por não avaliar os dados em nível estadual ou municipal.

Tabela 1. Distribuição das coletas de amostras de água para análise do parâmetro 'Carbendazim + benomil' segundo a UF, Siságua 2014 a 2019.

UF	Total	%
AC	0	0,00
AL	3	0,00
AM	75	0,11
AP	0	0,00
BA	639	0,93
CE	792	1,15
DF	193	0,28
ES	1.305	1,89
GO	212	0,31
MA	2	0,00
MG	4.276	6,20
MS	2.331	3,38
MT	1.055	1,53
PA	53	0,08
PE	0	0,00
PB	141	0,20
PI	22	0,03
PR	8.127	11,79
RJ	710	1,03
RN	0	0,00
RO	0	0,00
RR	0	0,00
RS	1.388	2,01
SC	3.866	5,61
SE	302	0,44
SP	41.947	60,84
TO	1.502	2,18
TOTAL	68.941	100,00

Entre 2014 e 2019, 15,45% (9.784/63.317) das amostras foram consideradas amostras com detecção de CBZ. A mediana da concentração de CBZ foi de 2 µ/L (mínimo 0,01 e máximo de 662,0). Duas amostras (0,003%) apresentaram detecção de CBZ acima do VMP de 120,0 µg/L.

Em relação ao responsável pela coleta e análises, as empresas prestadoras de serviço coletaram 94,98% das amostras (60.139/63.317) amostras e o setor saúde coletou 5,02% (3.178/63.317).

Em relação ao tipo de sistema de abastecimento, 61,61% (39.008/63.317) das amostras foram coletadas em sistema de abastecimento de água (SAA), 36,42% (23.060/63.317) das amostras foram obtidas de solução alternativa coletiva (SAC) e 1,97% (1.249/63.317) das amostras foram obtidas de solução alternativa individual (SAI). A tabela 2 apresenta a distribuição das faixas de resultados em função do tipo de sistema de abastecimento.

Tabela 2. Distribuição dos resultados das amostras coletadas para detecção do parâmetro 'Carbendazim + benomil' segundo o tipo de sistema de abastecimento, Sisagua 2014 – 2019.

	Amostras com detecção n (%)				Amostras sem detecção n (%)		Total (n)
	<=1	>1-60	>60-120	>120*	MENOR_LD	MENOR_LQ	
	Total n (%)				Total n (%)		
SAA	2.553 (6,54)	3.345 (8,58)	514 (1,32)	1 (0,003)	4.080 (10,46)	28.515 (73,10)	39.008
	6.413 (16,44)				32.595 (83,56)		
SAC	1.104 (4,79)	1.152 (5,00)	126 (0,55)	1 (0,004)	1.103 (4,78)	19.574 (84,88)	23.060
	2.383 (10,33)				20.677 (89,67)		
SAI	258 (20,66)	730 (58,45)	0 (0,00)	0 (0,00)	19 (1,52)	242 (19,38)	1.249
	988 (79,10)				261 (20,90)		
TOTAL	3.915 (6,18)	5.227 (8,26)	640 (1,01)	2 (0,003)	5.202 (8,22)	48.331 (76,34)	63.317**
	9.784 (15,45)				53.533 (84,55)		

SAC – solução alternativa coletiva; SAA – Sistema de abastecimento de água; Vigilância – amostras coletadas pelo setor saúde;

* Resultado maior que o valor máximo permitido. ** Inconsistências excluídas da análise.

Entre as amostras coletadas nos SAA, as amostras com detecção de CBZ representaram 16,44% (6.413/39.008). Para as amostras coletadas na saída do tratamento, 13,12% (3.761/28.660) foram amostras com detecção de CBZ. Para as amostras coletadas no sistema de distribuição, 24,60% (1.062/4.317) foram amostras com detecção de CBZ.

Das amostras coletadas nas SAC, 10,33% (2.383/23.060) foram amostras com detecção de CBZ. Destaca-se que 22,5% (198/898) das amostras coletadas no ponto de consumo foram amostras com detecção de CBZ.

Para as amostras coletadas nas SAI, foi detectado CBZ em 79,10% (988/1.249) das amostras.

4. CONCLUSÃO

Apesar do baixo percentual de amostras com detecção de CBZ acima do VMP, a exposição dietética ao CBZ pelo consumo de água no Brasil é relevante em função da conclusão da avaliação toxicológica de que não há limiar seguro para exposição a este ingrediente ativo.

Houve detecção de CBZ em amostras de água coletadas após o sistema de tratamento utilizado, ou seja, na água pronta para o consumo humano. Portanto, os métodos de tratamento da água utilizados não foram capazes de eliminar o CBZ.



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Roberto Coradi de Freitas, Coordenador(a) de Reavaliação**, em 10/12/2021, às 17:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/D10543.htm.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.anvisa.gov.br/autenticidade>, informando o código verificador **1705915** e o código CRC **619DEBC8**.

PARECER Nº 11/2022/SEI/CREAV /GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA

Processo nº 25351.945793/2019-57

Interessado: Coordenação de Reavaliação, Gerência de Monitoramento e Avaliação do Risco, GGTOX

Assunto: **Análise das diligências direcionadas ao MAPA, Embrapa, Ibama e Ministério da Saúde sobre a descontinuação dos produtos à base do ingrediente ativo Carbendazim.**

Consolidação e análise das respostas às diligências enviadas pela Anvisa ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (Ibama) e ao Ministério da Saúde em atendimento à deliberação da Dicol (voto nº 59/2022/SEI/DIRE 5/ANVISA), como parte da reavaliação do Carbendazim no que diz respeito à complementação das medidas de descontinuação do Relatório de AIR.

1. Relatório

Em 27 de abril de 2022, a Dicol decidiu que a GGTOX deveria complementar a Avaliação de Impacto Regulatório (AIR), mediante realização de Tomada Pública de Subsídios (TPS) e de diligências direcionadas ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama), à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) e ao Ministério da Saúde (MS). O objetivo das diligências foi a obtenção de informações necessárias para a complementação do Relatório de AIR da reavaliação toxicológica do ingrediente ativo de agrotóxico Carbendazim.

Em 04 de maio de 2022, a Dire3 enviou despacho à GGTOX solicitando que fosse dada continuidade ao processo e adoção das ações conforme voto aprovado na Dicol de 27 de abril. O voto aprovado por maioria da Dicol foi o voto da Dire5 (SEI 1842730) e incluiu uma complementação da Dire2, especificamente sobre as diligências. Esta complementação foi feita pela Dire2 como manifestação oral durante a reunião da Dicol. A discussão deste item foi acompanhada pelos gestores da área e a transcrição da manifestação da Dire2 não constava no processo. O extrato de deliberação da Dicol ROP nº 7/2022 (SEI nº 1884634) onde consta a informação completa sobre a decisão da Dicol, único documento com a complementação oral da Dire2 e com os prazos para a realização da TPS, foi inserido no processo no dia 11 de maio, 14 dias após a decisão da Dicol sobre o relatório da AIR de reavaliação do Carbendazim.

Considerando que a deliberação da Dicol resultou na necessidade de elaboração de diligências e uma TPS, que são instrumentos regulatórios não incluídos na RDC nº 221 de 28 de março de 2018, que dispõe sobre os critérios e os procedimentos para o processo de reavaliação toxicológica de ingredientes ativos de agrotóxicos no âmbito da Anvisa, houve necessidade de articulação com a Gerência Geral de Regulação (GGREG) para adequada elaboração desses instrumentos.

Assim, em 16 de maio de 2022, em apenas três dias úteis após a inserção do extrato da decisão da Dicol no processo, a Gemar encaminhou à Creav despacho dando prosseguimento ao processo de elaboração da TPS e das diligências de forma conjunta e com um prazo de 30 dias. A primeira reunião para elaboração das diligências e TPS foi realizada em 19 de maio. Em 26 de maio de 2022, as diligências foram enviadas aos respectivos órgãos por meio dos seguintes documentos:

- Diligência ao MS: Ofício nº 145/2022/SEI/GGTOX/DIRE3/ANVISA (SEI nº 1904774).
- Diligência à Embrapa: Ofício nº 146/2022/SEI/GGTOX/DIRE3/ANVISA (SEI nº 1904942).
- Diligência ao Ibama: Ofício nº 148/2022/SEI/GGTOX/DIRE3/ANVISA (SEI nº 19005174).
- Diligência ao MAPA: Ofício nº 149/2022/SEI/GGTOX/DIRE3/ANVISA (SEI nº 1905180).

Cabe ressaltar que as diligências foram elaboradas especificamente para cada órgão após aprofundada pesquisa sobre critérios de descontinuação utilizados por outros países e de forma complementar e concomitante à elaboração da TPS, já que esta também foi requerida pela Dicol. Estes estudos e elaboração dos documentos e instrumentos regulatórios foram elaborados em 15 dias corridos (ou 11 dias úteis) após a inserção do extrato da decisão da Dicol no processo de reavaliação. Este documento era essencial para a elaboração das diligências e TPS, pois apenas ele continha as informações detalhadas que permitiram a correta elaboração das diligências e da TPS.

Embora o voto da Dire2 nº 140, de 21 de maio de 2022 (1937591), que formou a decisão da Dicol, tenha revogado a realização da TPS e dispensado a realização da AIR, a Creav optou por manter a avaliação das respostas das diligências já realizadas a fim de fornecer subsídios à tomada de decisão pela Dicol acerca do procedimento de descontinuação e destinação dos produtos à base do ingrediente ativo Carbendazim.

As diligências enviadas ao Mapa e à Embrapa focaram em questionamentos relativos a possíveis alternativas de produtos para uso em substituição ao Carbendazim e nos possíveis impactos da descontinuação do uso do Carbendazim no setor agrícola brasileiro.

A diligência enviada ao Ibama teve como prioridade obter informações sobre o impacto da descontinuação do Carbendazim no meio ambiente, para compreender quais opções possuem menor impacto do ponto de vista ambiental.

A diligência enviada ao MS teve como objetivo o esclarecimento sobre a segurança do trabalhador e as ações de vigilância e gerenciamento de risco em relação à exposição ocupacional ao Carbendazim nas indústrias de tratamento de semente.

A consolidação das diligências e as conclusões da Creav sobre o procedimento de descontinuação mais adequado com base nas informações prestadas pelos órgãos consultados são apresentados a seguir.

2. Análise

2.1 Diligência junto ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA)

O Mapa encaminhou a Nota Técnica Nº 34/2022/CGAA/DSV/SDA/MAPA (SEI nº 1937494) com seu posicionamento sobre os questionamentos no dia 21 de junho de 2022 (SEI nº 1937497).

Ao ser questionado sobre alternativas de produtos não-químicos para o controle das pragas combatidas com o uso do Carbendazim, o Mapa elencou uma série de outras técnicas consideradas importantes dentro do manejo integrado de pragas (MIP), mas ressaltou que tais medidas não extinguem a necessidade de uso de fungicidas químicos para manutenção de “altas produtividades e viabilização da propriedade agrícola”. Informou ainda que, para algumas doenças nas culturas do milho, cevada, trigo e soja o Carbendazim é o único capaz de eliminar 100% dos patógenos e que este IA é de suma importância para controle de fungos de solo e necrotróficos.

Para a indicação de aplicação foliar, o Mapa informou que existe quantidade significativa de IAs de origem química e biológica como alternativa ao uso de Carbendazim nas culturas do algodão, cevada, citros, feijão, maçã, milho, soja e trigo. Para a cana-de-açúcar não foi informado nenhum IA alternativo, pois não havia no momento nenhum produto registrado a base de Carbendazim para uso nessa cultura.

No caso de tratamento de sementes, o Mapa informou que também não havia produtos registrados a base de Carbendazim para as culturas do arroz e do milho e, por isso, não foram indicados substitutos. Para tratamento de sementes de algodão e feijão, só não foram identificadas alternativas de produtos registrados para uma espécie de fungo específica (*Colletotrichum truncatum*), mas o Ministério indicou que existem produtos registrados para tratamento de *C. truncatum* em sementes de soja e que, para possibilitar a extensão de uso, deveriam ser analisados os estudos pertinentes. Para tratamento de sementes de soja, foram identificados produtos alternativos para todos os patógenos.

Para estimar as possíveis perdas de produtividade e de qualidade na produção agrícola com a descontinuação de uso do Carbensulfamida, o Mapa informou que seria necessária a condução de ensaios comparativos em rede que não estão sendo realizados em decorrência dos altos custos envolvidos. Sobre a eficácia dos produtos alternativos ao Carbensulfamida, o Ministério informou que normalmente um tratamento de semente satisfatório exige o uso de IAs com ação de contato combinados com IA de ação sistêmica, sendo este último geralmente pertencente ao grupo dos benzimidazóis, com destaque para o Carbensulfamida. Além disso, o controle do patógeno depende da quantidade inicial do patógeno na área de cultivo, susceptibilidade da cultura, das condições edafoclimáticas e tecnologia de tratamento de sementes empregada.

Com relação à maior ou menor fitotoxicidade dos produtos alternativos em relação ao Carbensulfamida, o Mapa informou que não foram encontrados na literatura estudos que avaliam esse aspecto, mas que para registro destes produtos as empresas devem apresentar ensaios que comprovem que o produto não possui ação fitotóxica e que por isso não seria uma questão relevante.

Apesar de não esperar desabastecimento de qualquer produto agrícola em decorrência da descontinuação do uso do Carbensulfamida, o Mapa indicou que pode haver um aumento nos custos do tratamento fitossanitário entre 4-10% (não se refere ao custo total da produção) e que esse valor deverá ser repassado aos consumidores. Para o cenário brasileiro o feijão seria o mais impactado, pois a produção é direcionada principalmente para o mercado doméstico, os outros cultivos são commodities direcionadas em grande parte para o mercado internacional.

Por fim, o Mapa ressalta a importância da manutenção de produtos do grupo dos benzimidazóis, principalmente Carbensulfamida e Tiofanato-metílico, para que o combate das doenças controladas por esses produtos seja efetiva e que não incorra em risco de gerar organismos resistentes.

Segundo o Mapa, para atender a demanda de sementes tratadas para o cultivo da safra verão em todo o Brasil, o tratamento industrial se inicia em julho. O Mapa disse entender que a utilização do Carbensulfamida para tratamento de sementes deveria ser mantida, alegando que as doses recomendadas para tratamento de sementes em comparação com a aplicação foliar são muito baixas. Contudo, a conclusão da Reavaliação Toxicológica do Carbensulfamida foi de que não é possível estabelecer uma dose em que a exposição da população possa ser considerada segura para os desfechos toxicológicos mutagenicidade e toxicidade para a fisiologia reprodutiva e para o desenvolvimento embrionário.

A alegação de que este tipo de produto é necessário para a manutenção de altas produtividades e viabilidade da propriedade agrícola somente leva em consideração os aspectos econômicos do empreendimento, desconsiderando externalidades negativas relevantes, custos que normalmente não são considerados na avaliação de viabilidade da atividade. A sustentabilidade do empreendimento agrícola depende também dos possíveis impactos sociais e ambientais. Argumenta-se que utilização de agrotóxicos reduz os custos da produção de alimentos, o que contribui para reduzir o risco de insegurança alimentar da população. Porém, a manutenção do Carbensulfamida no mercado, mesmo que as doses recomendadas sejam relativamente baixas, como solicitado pelo Mapa, possui risco inaceitável para a saúde da população e, como consequência, faria com que os custos para saúde pública e meio ambiente sejam absorvidos por toda a sociedade, em prol de um resultado econômico mais satisfatório para setores específicos.

Dessa forma, as contribuições do Mapa não podem ser utilizadas do ponto de vista toxicológico para refutar o enquadramento do Carbensulfamida nos aspectos proibitivos de registro relativos à saúde humana e o risco inaceitável que esses produtos representam para a população. Por outro lado, são contribuições que apresentam alta relevância para a realização de uma descontinuação progressiva, essencial para o gerenciamento do risco identificado para que sejam consideradas as culturas e usos mais impactados. Esse aspecto foi abordado nas conclusões deste documento, juntamente com as contribuições dos demais órgãos consultados.

2.2 Diligência junto à Empresa Brasileira de Agricultura e Agropecuária (Embrapa)

O posicionamento da Embrapa foi encaminhado por meio de Nota Técnica, nº SEI Embrapa 21148.007137/2022-12 de 21 de junho de 2022 (nº SEI Anvisa 1942258).

A Embrapa relatou que, por conta de indisponibilidade de informações e tempo exíguo para formulação da resposta, os questionamentos sobre alternativas não-químicas ao Carbendazim e sobre as alternativas químicas para aplicação foliar e tratamento de semente foram respondidas parcialmente. Além disso, a instituição disse entender que não possui atribuição para responder sobre os questionamentos sobre possíveis impactos econômicos e prazo para descontinuação do Carbendazim.

Sobre a importância do Carbendazim para a agricultura, informou que a invenção da substância foi considerada disruptiva devido sua alta eficácia no tratamento fitossanitário. Contudo, por ser um fungicida sítio-específico, com modo de ação igual ao de outros IAs que também integram o grupo dos benzimidazóis, é muito suscetível ao surgimento de resistência nos patógenos. Como consequência, já existem relatos de resistência em mais de 60 gêneros e mais de 115 espécies de fungos, sendo que na cultura da soja o controle dos principais patógenos já se tornou inviável com essa substância.

Relatou ainda que para manejo da resistência é importante fazer rotação de fungicidas com modos de ação diferentes, mas que a rotação de IAs só é efetiva se for feita antes do surgimento da resistência. Além disso, ao contrário do que era de se esperar, foi verificado que a resistência permaneceu estável em biótipos de fungos de áreas em que o Carbendazim deixou de ser usado por mais de 10 anos. Apesar das dificuldades geradas pelo desenvolvimento de resistência, a Embrapa considera que a proibição do Carbendazim reduziria as opções para manejo adequado dos patógenos.

Reforçando o que foi informado pelo Mapa, a Embrapa descreveu uma série de opções não-químicas para manejo dos alvos biológicos para os quais o Carbendazim é utilizado, mas que essas opções visam reduzir o volume de agrotóxicos utilizados, além de custos e possíveis impactos ambientais, não sendo possível dispensar completamente o seu uso.

Sobre possíveis IAs alternativos ao uso do Carbendazim para aplicações foliar e tratamento de semente, a Embrapa relatou que foi identificado pelo menos um IA para quase todos os alvos biológicos de todas as culturas, com poucas exceções, sendo o mais comum o Tiofanato-metílico, que é um composto que se degrada em Carbendazim, tendo este o mesmo modo de ação. Cabe ressaltar que o Tiofanato-metílico também está sendo submetido à reavaliação toxicológica pela Anvisa.

A Embrapa considerou ainda que não se espera redução de produtividade ou de qualidade da produção agrícola ao se substituir o Carbendazim pelas alternativas disponíveis. Quando não foi identificado produto alternativo registrado para algum alvo biológico, a Embrapa identificou outros produtos registrados para outros alvos ou outras culturas que potencialmente poderiam ser utilizados para a mesma finalidade, dependendo assim de futuras extensões de uso. Porém, relatou que os grupos de substâncias alternativas, como as estrubirulinas e triazóis, também possuem alto risco de gerar populações de patógenos resistentes. Com relação à diferença na fitotoxicidade, a Embrapa informou que é possível que IAs de grupos distintos atuem diferentemente na planta e assim podem gerar ação fitotóxica, mas que não é algo que se espera que ocorra de maneira relevante, pois as doses recomendadas em bulas são definidas também para evitar tais efeitos nos cultivos.

Por fim, a Embrapa reconhece que os possíveis impactos da proibição de um IA deve ser avaliado por diversas dimensões: agronômica, econômica, ambiental e de saúde pública. E que, do ponto de vista agrônomo, não se espera diferenças de eficiência no controle de pragas entre Carbendazim e os IA alternativos e nem maiores dificuldades no manejo da resistência, pois para cada cultura restará ao menos uma opção de IA com mesmo modo de ação que o do Carbendazim.

2.3 Diligência junto ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (Ibama)

O Ibama enviou respostas aos questionamentos da Anvisa por meio do Ofício 159/2022/DIQUA (SEI nº 1937517), que encaminhou a Informação Técnica nº 3/2002-CGasq/Diqua (SEI nº 1937524)

Conforme incluído na referida Informação Técnica encaminhada pelo Ibama, o Carbendazim é classificado como altamente tóxico para organismos aquáticos (microcrustáceos e peixe) e altamente persistente no meio ambiente. Ainda, foram apresentados dados de um projeto piloto de monitoramento de agrotóxicos em matrizes ambientais, no qual o Carbendazim foi detectado em 11 amostras e quantificado em 7 amostras (de um total de 304 amostras de água superficial). As concentrações nas águas superficiais variaram de 0,052 a 1,461 mg/L. Esses dados reforçam a preocupação dos achados da reavaliação sobre a contaminação da água por resíduos de Carbendazim, uma vez que, do ponto de vista da exposição

humana, qualquer concentração desse ingrediente ativo é bastante preocupante, conforme discutido no Parecer nº 3/2021/SEI/CREAV/GEMAR/GGTOX/DIRE3/ ANVISA (SEI nº 1392941).

O Ibama considera que a opção de menor impacto do ponto de vista ambiental para a destinação dos produtos formulados à base de Carbendazim seria o uso dos estoques até o seu completo esgotamento, uma vez que o descarte dos produtos exige a desativação por incineração, a qual, se não realizada de forma adequada, pode levar à liberação no meio ambiente de compostos tóxicos como dioxinas, furanos e produtos de combustão incompleta. Por meio da incineração, os resíduos são transformados em cinzas e os gases precisam ser purificados para eliminar o risco de emissão desses poluentes. Entretanto, foi ressaltado que essa desativação precisa ser feita em condições rigorosas de controle, por empresas legalmente registradas e licenciadas para tal procedimento. O Ibama informou ainda que não possui conhecimento sobre a capacidade instalada atualmente no Brasil de unidades de tratamento de resíduos habilitadas para esse tipo de tratamento.

O Ibama esclareceu que qualquer medida de gerenciamento de risco que leve em consideração os impactos ambientais de agrotóxicos exige complexa Avaliação de Risco Ambiental (ARA), metodologia ainda em desenvolvimento. Como o ingrediente ativo Carbendazim não foi submetido à avaliação de risco ambiental nas condições de uso aprovadas, o Ibama considera não ser possível estabelecer medidas de gerenciamento ou mitigação do risco ambiental. O Ibama reforçou que é recomendável que conclusões a respeito da viabilidade de medidas mitigatórias do ponto de vista ambiental respeitem o rito da ARA, pois sem caracterizar a exposição e realizar identificação e avaliação dos riscos associados, não há como enfrentar o mérito da mitigação de risco ambiental durante o período de descontinuação. Entretanto ressaltou que uma possível proibição total de uso leva a exclusão de qualquer hipótese de riscos ambientais possivelmente levantados, visto que se afasta de vez a potencial exposição autorizada.

Considerando: 1) os esclarecimentos Ibama sobre a complexidade, esforço e reduzida equipe técnica para se avaliar medidas de mitigação de riscos ambientais até a completa proibição dos produtos à base de Carbendazim, 2) a competência restrita da Anvisa em tratar sobre os aspectos regulatórios relacionados aos impactos à saúde humana e 3) que o Carbendazim foi colocado em reavaliação exclusivamente pelos riscos à saúde, verifica-se não ser adequado basear as medidas de descontinuação do uso desse agrotóxico em aspectos ambientais, exceto no que diz respeito à destinação mais adequada dos produtos formulados, uma vez que, para esse aspecto, o Ibama considera o esgotamento dos estoques como a opção de menor impacto ambiental.

2.4 Diligência junto ao Ministério da Saúde

O MS respondeu a diligência da Anvisa no dia 15/07/2022 por meio do OFÍCIO Nº 146/2022/CGSAT/DSAST/SVS/MS (SEI 1970471).

Foram feitas duas perguntas na diligência da Anvisa ao MS, a saber:

- a) O Carbendazim tem seu uso aprovado para o tratamento de sementes de algodão, arroz, feijão, milho e soja. Existe algum plano de específico de vigilância ou de gerenciamento de risco frente à exposição ocupacional ao referido IA nas indústrias de tratamento de sementes?
- b) Considerando as propriedades apontadas pela Coordenação de Reavaliação, é possível que nas indústrias de produção de sementes os trabalhadores estejam seguros quanto a exposição ao Carbendazim nas diversas atividades realizadas com o agrotóxico neste local?

O MS esclareceu que não há um plano específico para vigilância em saúde do trabalhador direcionada para ingredientes ativos específicos, mas pelo risco de exposição a substâncias nocivas à saúde e nos processos de trabalho que apresentem risco à saúde dos trabalhadores. Em resumo, a vigilância ocorre considerando as múltiplas exposições existentes nos ambientes de trabalho. O MS informou que as equipes de vigilância em saúde do trabalhador também atuam na inspeções sanitárias de locais de trabalho, incluindo nas indústrias de tratamento de sementes e, quando necessário, realizam intervenções nos ambientes e processos de trabalho. Porém, na resposta, não foi incluída informação específica sobre as ações nas indústrias de tratamento de sementes.

Sobre a segunda preocupação da diligência, o MS afirma que não há como garantir que os trabalhadores estejam seguros e não se exponham a produtos químicos durante a fabricação das sementes tratadas

com agrotóxicos. Destaca que as exposições podem ser minimizadas com a aplicação de Normas Regulamentadoras específicas emitidas pelo Ministério do Trabalho. Reforça que a exposição ao Carbendazim poderia ocorrer na indústria de produção de sementes mesmo com o uso adequado de EPI, pois estes equipamentos não eliminam totalmente o risco da exposição. O MS aponta medidas que poderiam garantir um ambiente de trabalho na indústria de produção de sementes seguro em relação à exposição ao Carbendazim: a) uso adequado do EPI, incluindo a paramentação adequada, a desparamentação e o descarte; b) capacitação dos trabalhadores para o reconhecimento de situações de risco para acidente; c) capacitação dos trabalhadores para reconhecer o adoecimento relacionado à exposição ao Carbendazim; d) monitoramento da situação de saúde dos trabalhadores com potencial de exposição ao Carbendazim; e) monitoramento ambiental para identificação de contaminação por Carbendazim dos locais onde ocorre a atividade de tratamento de sementes.

Considerando as informações aportadas pelo MS e as conclusões da reavaliação, entende-se que não há como garantir a ausência de exposição ao Carbendazim de forma que não ofereçam riscos aos trabalhadores na indústria de tratamento de sementes com agrotóxicos que, devido as propriedades do ingrediente ativo apontadas pela Creav, não apresentam limiar seguro de exposição.

3. Conclusão

A proibição de agrotóxicos pelas principais agências reguladoras internacionalmente reconhecidas geralmente se dá por meio de períodos de descontinuação de forma a reduzir os impactos econômicos, ambientais e na produção de alimentos de um banimento abrupto. É comum que a Anvisa estabeleça prazos de descontinuação para a proibição de ingredientes ativos de agrotóxicos, incluindo algumas atividades com proibições imediatas e outras escalonadas, como pode ser observado no quadro abaixo.

Quadro 1: Prazos de descontinuação e medidas de mitigação adotadas pela Anvisa para a proibição de ingredientes ativos de agrotóxicos após a sua reavaliação.

Ingrediente ativo	Motivo da proibição	Data da publicação da RDC	Prazo para descontinuação (em meses)	Medidas de mitigação durante o período de descontinuação
Cihexatina	Toxicidade aguda extremamente elevada; opacidade de córnea irreversível; toxicidade reprodutiva e para o desenvolvimento; teratogenicidade;	12/06/2009	28,5	Em até 28,5 meses: uso exclusivo na cultura de citrus e no estado de São Paulo.
Carbofurano	Potencial de causar efeitos graves à saúde humana	19/10/2017	6	Imediatamente: exclusão de culturas; proibição de aplicação costal, manual e aérea; Em até 3 meses: proibição da produção, importação e comercialização; Em até 6 meses: uso exclusivo em banana, café e cana-de-açúcar.
Endossulfam	Genotoxicidade, neurotoxicidade, imunotoxicidade, toxicidade endócrina ou hormonal e toxicidade reprodutiva e sobre o desenvolvimento embrionário fetal;	16/08/2010	36	Redução gradual da quantidade volume produzido; Em até 12 meses: proibição das importações; Em até 24 meses: proibição da produção; Em até 36 meses: proibição da comercialização e uso.
Forato	-	16/03/2015	0	Não houve
Lindano	Carcinogenicidade; neurotoxicidade; persistência no ambiente;	18/08/2006	12,5	Em até 9,5 meses: proibição da comercialização;

				Em até 12,5 meses: proibição do uso.
Metamidofós	Neurotoxicidade, imunotoxicidade; toxicidade sobre o sistema endócrino, reprodutor e desenvolvimento embrionário fetal	17/01/2011	44	Imediatamente: proibição do aumento da quantidade produzida; Em até 11,5 meses: proibição da comercialização; Em até 44 meses: proibição do uso.
Monocrotofós	Neurotoxicidade	23/04/2003	32,8	Não identificada
Paraquate	Mutagenicidade e neurotoxicidade	22/09/2017	47	Imediatamente: proibição de aplicação costal, manual, aérea e por trator de cabine aberta; exclusão de culturas; produção e importação de embalagens menores de cinco litros; Em até 36 meses: proibição da importação, produção e comercialização; Em até 47 meses: proibição gradual do uso segundo a cultura e a região geográfica.
Parationa metílica	-	14/12/2015	8,7	Em até 5,5 meses: proibição da comercialização; Em até 8,7 meses: proibição do uso.
Pentaclorofenol	Persistência ambiental; desregulador endócrino;	21/06/2006	10,4	Em até 3,4 meses: proibição da fabricação Em até 7,4 meses: proibição da comercialização; Em até 10,4 meses: proibição do uso.
Procloraz	-	03/02/2016	0	Não houve
Triclorfom	Genotoxicidade, imunotoxicidade, teratogenicidade, neurotoxicidade, neurotoxicidade, toxicidade para a reprodução e o sistema hormonal	18/08/2010	0	Não houve

Observa-se no Quadro 1 que, mesmo quando se adota medidas de descontinuação, do ponto de vista da saúde, é necessário garantir que usos com maior exposição da população sejam imediatamente proibidos.

Considerando tudo o que foi exposto neste parecer, os seguintes pontos são relevantes para a tomada de decisão quanto à descontinuação dos produtos à base de Carbendazim:

1. a descontinuação é, normalmente, a medida adotada nas decisões de banimento de agrotóxicos por agências regulatórias internacionais;
2. do ponto de vista do impacto ambiental, o Ibama conclui que a incineração é geralmente mais preocupante do que o esgotamento do estoque dos produtos;
3. do ponto de vista agrônomo, o Mapa e a Embrapa consideram que existem alternativas disponíveis; entretanto, principalmente para o tratamento de sementes, é importante a combinação de diversos agrotóxicos;

4. o Mapa apontou que o tratamento industrial de sementes para atender a safra de verão se inicia em julho. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (<http://www.conab.gov.br>), que monitora os ciclos de cultivo no Brasil o plantio das culturas de verão se encerram, de maneira geral, entre os meses de fevereiro e março;
5. do ponto de vista da produção de alimentos, o Mapa esclareceu que não se espera desabastecimento, mas deve ocorrer aumento de custos de produção com consequente aumento de preço dos alimentos (especialmente do feijão, cuja produção atende principalmente à demanda interna).

É importante mencionar que a Creav inicialmente sugeriu a proibição da produção, importação, exportação, comercialização e uso de agrotóxicos e produtos técnicos contendo Carbendazim sem incluir informação de prazos para descontinuação na Minuta de RDC (SEI 1617615), em especial, pela ausência de contribuição do Mapa à época da proposta. Porém, apontou claramente no Relatório de Avaliação de Impacto Regulatório (SEI 1723833), na seção **VIII. Comparação das alternativas**, que a o gerenciamento do risco poderia ser realizado:

“Para mitigação do impacto econômico e/ou ambiental que a proibição do Carbendazim pode gerar, é comum que a Anvisa determine um período de descontinuação de uso do produto. Porém, não há norma específica que defina os critérios e/ou métodos que devem ser utilizados para se estabelecer este período. Portanto, caso a autoridade superior opte pelo gerenciamento do risco e estabeleça um período gradual de descontinuação, o plano de gerenciamento do risco deve envolver a gestão estratégica da Agência, uma vez que será necessário abranger outros órgãos da Administração Pública Federal. O período de descontinuação de um produto não é baseado exclusivamente numa decisão técnico-científica relacionada à saúde. Porém, a Anvisa pode intermediar a discussão desses prazos com os atores envolvidos no tema, de forma a garantir que serão aplicados os menores prazos possíveis e para os usos realmente imprescindíveis do produto. Frisa-se, mais uma vez, que a missão da Anvisa é proteger e promover a saúde da população, mediante a intervenção nos riscos decorrentes da produção e do uso de produtos e serviços sujeitos à vigilância sanitária.”

Ainda, na seção **IX. Identificação e definição dos efeitos e riscos**, foi apontado o seguinte:

“Caso a Anvisa opte por fazer o gerenciamento do risco e estabeleça prazos para descontinuação de uso dos produtos à base de Carbendazim, recomenda-se que estes prazos sejam publicados e detalhados por meio de uma Instrução Normativa Conjunta (INC) da Anvisa, do Ibama e do MAPA. O prazo para publicação desta INC deve estar previsto na RDC de proibição do Carbendazim e não deve superar 30 dias. O período de descontinuação de uso não deve superar uma safra para cada cultura autorizada. A INC deve incluir, além dos prazos para descontinuação para cada cultura, as ações de cada órgão para garantir o seu cumprimento. O período de descontinuação de um produto não é baseado exclusivamente numa decisão técnico científica relacionada à saúde. O gerenciamento do risco com estabelecimento de prazo para descontinuação se insere no contexto de mitigação do impacto econômico e/ou ambiental. Como não há norma específica que defina os critérios e/ou métodos que devem ser utilizados para se estabelecer este período, a sugestão acima é meramente para garantir previsibilidade e minimizar o risco de desabastecimento e os impactos econômicos.”

Por outro lado, o regimento interno da Anvisa atribui à CREAV a obrigação de propor medidas mitigatórias decorrentes do processo de reavaliação. Portanto, uma proposta de RDC com aspectos do gerenciamento do risco deve ser apresentada pela CREAV. Para a elaboração da proposta de RDC de reavaliação do Carbendazim, foram observadas as seguintes circunstâncias:

considerando a atribuição da CREAV, segundo Art. 120, Inciso II-b do regimento Interno da Anvisa, de propor normas e regulamentos para medidas de proteção, prevenção e controle decorrentes da conclusão do processo de reavaliação;

considerando que as agências internacionais de regulação de agrotóxicos determinam períodos de descontinuação gradual quando ocorre proibição de agrotóxicos por motivos de saúde nos seus países;

considerando que não existem parâmetros objetivos e padronizados pela Anvisa com para se estabelecer prazos de descontinuação gradual de uso de agrotóxicos proibidos por fatores relacionados a saúde;

considerando a atuação consuetudinária da Anvisa no estabelecimento de períodos de descontinuação para agrotóxicos banidos por fatores relacionados à saúde (Quadro 1);

considerando que toda a análise do risco à saúde de ingredientes ativos submetidos a reavaliação é realizada pela equipe da CREAV e que o gerenciamento de risco à saúde, uma ação que não considera, exclusivamente, os impactos à saúde, deve ser realizada, normalmente, pelos tomadores de decisão;

considerando os encaminhamentos da reunião realizada com o Mapa na data de 14/06/2022 (Ata de reunião SEI 1931433);

considerando as informações enviadas após as diligências realizadas ao Mapa, Embrapa, Ibama e MS;

a CREAV adotará como padrão para proposição de RDC de reavaliação de ingredientes ativos, até que sejam adotados pela Anvisa critérios objetivos para o estabelecimento de descontinuação de uso de agrotóxicos que apresentem propriedades toxicológicas proibitivas para o registro, os seguintes prazos para descontinuação gradual do uso:

- a) Proibição imediata da importação e produção de produtos técnicos;
- b) Proibição imediata da importação de produtos formulados;
- c) Proibição, após três meses da data da vigência da RDC, da produção de produtos formulados;
- d) Proibição, após seis meses da data da vigência da RDC, da comercialização de produtos formulados;
- e) Proibição, após 12 meses da data da vigência da RDC, da exportação de produtos técnicos e de produtos formulados;
- f) Os produtos formulados adquiridos pelos usuários finais, pessoas físicas ou jurídicas, poderão ser usados até o seu esgotamento;
- g) Serão proibidas, imediatamente, as tecnologias de aplicação que apresentam maior potencial de exposição do trabalhador para os casos em que os ingredientes ativos apresentem desfechos toxicológicos proibitivos após exposição única.

4. ENCAMINHAMENTOS

Propõe-se a alteração da minuta de RDC colocada em Consulta Pública, que trata da proibição do ingrediente ativo Carbendazim em produtos agrotóxicos no País.

Destaca-se as principais modificações e ajustes em relação a proposta de RDC submetida à CP, as quais foram realizadas no capítulo das disposições transitórias:

1. Inclusão da restrição, no período de descontinuação, do uso das tecnologias de aplicação manual costal, semiestacionária, estacionária e por tratores de cabine aberta a partir da vigência da Resolução (**Art 4º, inciso II**). A restrição foi recomendada pela alta exposição nesses cenários associada aos potenciais danos à saúde após exposição única. Desse modo, é importante que a restrição seja imediata, pois é necessário reduzir ao máximo a exposição para a utilização do produto nesse período de descontinuação. Ressalta-se que a restrição de aplicação manual e costal já ocorre, pois haviam sido previstas na reavaliação anterior do CBZ ocorrida em 2002, mas não foram publicadas em RDC, somente em memória de reunião, que era o instrumento utilizado naquela época para concluir as reavaliações.
2. Ampliação do prazo de comercialização de três meses para seis meses (**Art 4º, inciso IV**). Tal proposta já havia sido encaminhada pela GGTOX e acordada com o Mapa em reunião realizada antes da CP, sendo que possui a lógica concatenada com a proibição da produção. Isto significa que deve ser permitido um período para comercialização do que foi produzido, de modo que a proibição da produção e da comercialização na mesma data pode resultar no acúmulo desnecessário de produtos que deverão ser destinados à incineração.

3. Inclusão de autorização de licenciamentos de importação registrados até a data de 21 de junho de 2022, a fim de tornar mais claro o procedimento a ser adotado nesses casos. Ressalta-se que esta proposta foi sugerida pelo Mapa, de maneira que a data proposta está alinhada a data de início da suspensão cautelar (**Art 4º, § 1º**)
4. Inclusão da obrigatoriedade às empresas de destinação adequada dos produtos em até 14 (catorze) meses a partir da data de vigência da RDC. O prazo de 14 meses se justifica, pois o último prazo, que é o de exportação, possui vigência de 12 meses. Desse modo, restariam dois meses a partir dessa data, para que as empresas possam realizar a destinação final de produtos eventualmente não exportados (**Art 4º, § 3º**).
4. Inclusão da obrigatoriedade às empresas de informar à Anvisa sobre o estoque remanescente e a destinação dos produtos técnicos e formulados em até 15 (quinze) meses contados da data de vigência desta Resolução, para que essa informação possa subsidiar eventual necessidade de acompanhamento sobre a destinação dos produtos por órgãos responsáveis (**Art 4º, § 4º**).
5. Correção do texto do artigo que trata das penalidades (atual **Art. 6º**), conforme contribuição recebida na CP.

Proposta de texto:

MINUTA DE RDC - REAVALIAÇÃO DO CARBEDAZIM

Dispõe sobre a proibição do ingrediente ativo Carbendazim em produtos agrotóxicos no país e sobre as medidas transitórias de mitigação de riscos.

A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, no uso das atribuições que lhe confere o art. 15, III e IV, aliado ao art. 7º, III e IV da Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999, e ao art. 187, III, § 1º do Regimento Interno aprovado pela Resolução de Diretoria Colegiada – RDC nº 585, de 10 de dezembro de 2021, resolve adotar a seguinte Resolução de Diretoria Colegiada, conforme deliberado em Reunião realizada em XX de XXX de 202X, e eu, Diretor-Presidente, determino a sua publicação.

CAPÍTULO I DO OBJETIVO E DO ÂMBITO DE APLICAÇÃO

Art. 1º Esta Resolução estabelece a proibição do ingrediente ativo Carbendazim em produtos agrotóxicos no País.

Parágrafo único. Esta Resolução se aplica a todos os produtos técnicos e formulados à base do ingrediente ativo Carbendazim atualmente registrados ou com pleito de registro no Brasil.

CAPÍTULO II DAS DISPOSIÇÕES GERAIS

Art. 2º Ficam definidas as seguintes alterações na Monografia do ingrediente ativo Carbendazim, Monografia C24, a partir da entrada em vigor desta Resolução:

I – Inclusão do limite de 0,0005 g/kg para a impureza aminohidroxifenazina (AHP) e de 0,0006 g/kg para a impureza diaminofenazina (DAP).

II – Classificação do ingrediente ativo Carbendazim para o desfecho toxicidade para órgão-alvo específico por exposição única na categoria 1: presumidamente produz toxicidade significativa em humanos após exposição única.

III – Classificação do ingrediente ativo Carbendazim para o desfecho toxicidade para órgão-alvo específico por exposição repetida na categoria 2: presumidamente possui potencial de produzir dano à saúde humana após exposição repetida.

IV – Classificação do ingrediente ativo Carbendazim para o desfecho mutagenicidade na categoria 1B: presumidamente induz mutações em células germinativas de seres humanos.

V – Classificação do ingrediente ativo Carbendazim para o desfecho toxicidade reprodutiva na categoria 1B: presumidamente possui potencial de causar toxicidade reprodutiva em seres humanos.

VI – Classificação do ingrediente ativo Carbendazim para o desfecho carcinogenicidade na categoria 1B: presumidamente possui potencial carcinogênico para seres humanos em doses acima de 0,0225 mg/kg p.c./dia.

Art. 3º Ficam encerrados, a partir da data de vigência desta Resolução, os pedidos de avaliação toxicológica em tramitação na Anvisa, para fins de registro e pós-registro de produtos técnicos e formulados à base do ingrediente ativo de agrotóxico Carbendazim.

CAPÍTULO III DAS DISPOSIÇÕES TRANSITÓRIAS

Art. 4º A proibição da importação, produção, comercialização e uso de produtos técnicos e formulados à base de Carbendazim será realizada de forma gradual e contínua, ficando proibidas:

I - a importação de produtos técnicos e formulados e a produção de produtos técnicos a partir da vigência desta Resolução;

II – a utilização de produtos formulados com tecnologias de aplicação manual costal, semiestacionária, estacionária e por tratores de cabine aberta a partir da vigência desta Resolução;

III – a produção de produtos formulados a partir de 3 (três) meses contados da data de vigência desta Resolução;

IV – a comercialização de produtos formulados a partir de 6 (seis) meses contados da data de vigência desta Resolução;

V – a exportação de produtos técnicos e formulados a partir de 12 (doze) meses contados da data de vigência desta Resolução;

§ 1º Excetuam-se dos efeitos relativos à importação de produtos técnicos e formulados da presente Resolução os licenciamentos de importação registrados até a data de 21 de junho de 2022.

§ 2º Os produtos adquiridos pelos agricultores, pessoas jurídicas ou físicas, e pelas indústrias de produção de sementes, destinados ao uso final, poderão ser utilizados até o seu esgotamento.

§ 3º As empresas que detenham estoques de produtos técnicos e formulados após o prazo previsto no inciso V do Art. 4º desta Resolução devem providenciar a destinação adequada desses produtos em até 14 (catorze) meses, contados da data de vigência desta Resolução.

§ 4º As empresas de que tratam o parágrafo terceiro devem informar à Anvisa sobre o estoque remanescente e a destinação dos produtos técnicos e formulados em até 15 (quinze) meses contados da data de vigência desta Resolução.

Art. 5º Mantém-se as informações sobre o uso agrícola do Carbendazim na monografia C24 até a data de 01 de dezembro de 2024 para fins de monitoramento de resíduos de agrotóxicos nos alimentos.

CAPÍTULO IV DAS DISPOSIÇÕES FINAIS

Art. 6º O descumprimento das disposições contidas nesta Resolução constitui infração nos termos da Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, sem prejuízo das penalidades civis e penais cabíveis.

Art. 7º Esta Resolução entra em vigor em 1º de [MÊS POR EXTENSO] de 2022.

DIRETOR PRESIDENTE

À consideração superior.



Documento assinado eletronicamente por **Larissa Muratori Aguiar, Especialista em Regulação e Vigilância Sanitária**, em 27/07/2022, às 18:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020
http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/D10543.htm.



Documento assinado eletronicamente por **Juliana Machado Braz, Especialista em Regulação e Vigilância Sanitária**, em 27/07/2022, às 18:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020
http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/D10543.htm.



Documento assinado eletronicamente por **Camila Queiroz Moreira, Especialista em Regulação e Vigilância Sanitária**, em 28/07/2022, às 09:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020
http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/D10543.htm.



Documento assinado eletronicamente por **Thiago Santana dos Santos, Técnico em Regulação e Vigilância Sanitária**, em 28/07/2022, às 10:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020
http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/D10543.htm.



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Roberto Coradi de Freitas, Coordenador(a) de Reavaliação**, em 28/07/2022, às 13:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020
http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/D10543.htm.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.anvisa.gov.br/autenticidade>, informando o código verificador **1977850** e o código CRC **4C07CCB4**.



NOTA TÉCNICA Nº 15/2018/SEI/DICOL/ANVISA

Proposição Legislativa: PL 6299/2002 - (Origem PLS 526/1999). Apensados: PL nos 713/1999, 1.388/1999, 2.495/2000, 3.125/2000, 5.852/2001, 5.884/2005, 6.189/2005, 7.564/2006, 1.567/2011, 1.779/2011, 3.063/2011, 4.166/2012, 4.412/2012, 2129/15, 49/2015, 371/2015, 461/2015, 958/2015, 1.687/2015, 3.200/2015, 3.649/2015, 4.933/2016, 5.218/2016, 5.131/2016, 6.042/2016, 7.710/2017, 8.026/2017, 8.892/2017, 9271/2017)	
Autor: Senador Blairo Maggi	
Ementa: Altera os arts 3º e 9º da Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências.	
Ministério: Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa	
Data da manifestação: 08/05/2018	
Posição:	☐ Favorável ☒ Contrária ☐ Fora de competência ☐ Favorável com sugestões/ressalvas ☐ Nada a opor ☐ Matéria prejudicada
Manifestação referente a(o):	☐ Texto original ☐ Emendas de _____ ☒ Substitutivo SBT 1 PL 6299/02 ☐ Outros _____

I - JUSTIFICATIVA:

- Trata-se de alteração da Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências.
- As alterações se referem às competências dos órgãos federais da saúde, meio ambiente e agricultura, e estabelecem novos conceitos, processos e atos administrativos, além de sistemas informatizados e eletrônicos. Há, ainda, a criação de taxa de avaliação única de registro, cuja arrecadação é destinada do Fundo Federal Agropecuário – FFAP.
- Cabe ressaltar que o substitutivo contém 68 artigos que alteram significativamente a Lei n. 7802, de 11 de julho de 1989.
- De uma forma geral a proposta:
 - Propõe a avaliação do risco para fins de registro de agrotóxicos que revelem características teratogênicas, carcinogênicas ou mutagênicas, que provoquem distúrbios hormonais ou danos ao aparelho reprodutor;
 - Altera e retira autonomia de decisão do setor de saúde e ambiente em detrimento dos setores produtivos;
 - Retira a competência do setor ambiental na avaliação de produtos agrotóxicos de uso doméstico;
 - Exclui o órgão federal da saúde das atribuições estabelecidas no § 5º do art. 4º da proposta do substitutivo, muitas delas relacionadas à saúde;
 - Cria uma hierarquia de submissão entre os órgãos federais responsáveis, mesmo submetidos a pastas diferentes de governo;
 - Propõe competências relacionadas à saúde ao órgão registrante que não estão dentro do escopo de sua atuação, seja ele regulador e normatizador de serviços vinculados à agricultura ou o meio-ambiente;
 - Retira a autonomia de decisão do Estado Brasileiro ao definir exigências de registro em função de acordos internacionais, vinculando a atuação a diretrizes internacionais, sem considerar as especificidades da nossa população. Diretrizes como GHS, Codex Alimentarius e Acordo SPS são instrumentos regulatórios que auxiliam na gestão dos riscos e redução de barreiras alfandegárias, mas não têm a função de definição de exigências;
 - Estabelece um prazo de 12 (doze) meses para a concessão do registro a partir do recebimento do pleito; mantém o mesmo prazo de registro de 12 (doze) meses para produtos de alta complexidade e média complexidade (produtos técnicos e formulados, respectivamente); estabelece prazo de registro de produto idêntico (baixíssima complexidade) de 60 (sessenta) dias e estabelece um prazo de 30 (trinta) e 180 (cento e oitenta) dias (média e baixa complexidade) para pós-registro. Tais prazos não se mostram compatíveis ao tempo necessário para tratamento adequado de alguns tipos de pleito e continuarão a subsidiar as demandas judiciais que prejudicam as prioridades estabelecidas.
 - Atribui competência ao órgão da agricultura para realizar reavaliação toxicológica e ambiental dos agrotóxicos. Tal competência, denominada “reanálise de risco”, acontecerá quando houver alertas de risco à saúde, à alimentação ou ao meio-ambiente – temas estes que estão fora do escopo de atuação da agricultura. Vejamos:

“§ 1º O órgão federal que atua na área da agricultura é o coordenador do processo de reanálise dos produtos fitossanitários e poderá solicitar informações dos órgãos de saúde e de meio ambiente para complementar sua análise.” (art. 28)

- Atribui às empresas registrantes a competência para análise do risco dos agrotóxicos, retirando, assim, a competência de fiscalização do setor de saúde, inclusive no que se refere a resíduos. No entanto, compete

ao Sistema Único de Saúde participar do controle e fiscalização de tais procedimentos e a supressão da competência do órgão regulador sanitário significa reduzir sua atividade a um papel meramente cartorial, uma vez que somente acataria, por meio de homologação, a análise realizada pelas empresas.

- Altera o termo “agrotóxico” para “produto fitossanitário”. Destaca-se, no entanto, que o termo agrotóxico é o utilizado na Constituição Federal-CF;
- Determina competências ao setor de agricultura que sobrepeçam as questões do agronegócio, em detrimento daquelas que se referem à saúde e meio-ambiente. E, aceita, ainda, riscos à saúde, cujas doenças e agravos serão custeados pelo Sistema Único de Saúde e não pela iniciativa privada; e
- Concede automaticamente o registro de produtos com base em dados de terceiros, sem se preocupar com a propriedade da informação ou direitos do administrado, contrariando a Lei n. 10.603, de 2002.

5. Ademais se faz necessários alguns comentários:

6. A Lei n. 7.802, de 1989, estabelece que os agrotóxicos somente podem ser utilizados no país se forem registrados em órgão federal competente, de acordo com as diretrizes e exigências dos órgãos responsáveis pelos setores da saúde, do meio ambiente e da agricultura. Tal obrigatoriedade, além de fundamental, visa à proteção da saúde, do meio ambiente e da própria agricultura, possibilitando uma ação preventiva do Estado ao se manifestar e autorizar a utilização desses produtos.

7. A Lei n. 7.802, de 1989, ao compartilhar a responsabilidade da regulação de agrotóxicos, garantiu de forma estratégica uma regulação mais qualificada, isonômica e equilibrada, que perfaz o âmbito das áreas de agricultura, do meio ambiente e da saúde. Esta Lei foi resultado de uma ampla discussão com a sociedade e de um debate que envolveu diversos segmentos afetados pela temática de agrotóxicos. Assim, ela traz um resultado consensual desta discussão e representa uma conquista regulatória importante, que está no nível dos países desenvolvidos.

8. A proposta do substitutivo quebra esse paradigma já estabelecido e desmerece o papel do setor de saúde e do meio ambiente na regulação, principalmente se considerarmos que o resultado dessa desregulamentação e inação recairá sobre a população e meio-ambiente, cujos interesses claramente não estão representados. O modelo proposto pelo PL não favorece a imparcialidade nos processos de tomada de decisão, podendo prejudicar a qualidade da avaliação técnico-científica, que é o pilar para a garantia da qualidade, eficiência e segurança do uso dos agrotóxicos.

9. A proposta do substitutivo é que não haja mais avaliação e classificação de produtos pela área de saúde e meio-ambiente, mas apenas uma “homologação” da avaliação realizada pelas empresas registrantes. Assim, entendemos que essa proposta claramente desconsidera a responsabilidade e dever do Estado em reduzir, por meio de políticas públicas, o potencial de dano à saúde oriundo da exposição a agrotóxicos e afins.

10. A ANVISA se responsabiliza pela análise toxicológica dos agrotóxicos que pleiteiam registro ou alterações pós-registro e também pela reavaliação dos agrotóxicos, à luz de novos conhecimentos e alertas. A reavaliação toxicológica é realizada quando surgem novas informações que indiquem a necessidade de uma revisão de condições de uso, as quais possam desaconselhar o uso dos produtos já registrados. A reavaliação também pode ser feita quando o país for alertado nesse sentido por organizações internacionais responsáveis pela saúde, alimentação ou meio ambiente.

11. A ANVISA tem, entre outras, a competência (juntamente com o MAPA, no âmbito de suas respectivas atuações) de monitorar os resíduos de agrotóxicos e afins em alimentos de origem vegetal. Com base na avaliação do risco dietético, a ANVISA estabelece o Limite Máximo de Resíduos (LMR) de agrotóxico para cada cultura agrícola. Esses limites são essenciais para garantir que os agrotóxicos estão sendo adequadamente utilizados, conforme as indicações em bula. Além disso, esses limites são utilizados como referência para garantir a segurança alimentar dos produtos importados que são internalizados no país.

12. Apesar do LMR ser um parâmetro agrônomo, ele é utilizado na avaliação do risco de forma a compor a avaliação da exposição pela via dietética e é um instrumento essencial na estratégia de monitoramento e fiscalização para garantir a segurança alimentar. Sendo assim, o LMR deve ser estabelecido por meio de uma visão abrangente que considera além do estabelecimento de um valor obtido nos estudos de campo, mas também que esteja relacionado à toxicidade, aguda ou crônica, do resíduo remanescente no alimento.

13. Para que o LMR seja estabelecido no país, é necessário realizar a avaliação do risco à saúde decorrente da ingestão dos resíduos de agrotóxicos eventualmente presentes nos alimentos. A Anvisa realiza a avaliação toxicológica da exposição crônica ao se registrar um novo ingrediente ativo ou na análise dos pleitos de inclusão de cultura ou alteração de LMR. Nessa avaliação, considera-se que os resíduos do Ingrediente Ativo (IA) do agrotóxico são ingeridos nas concentrações mais altas detectadas nos estudos supervisionados de campo durante toda a vida de um indivíduo. A metodologia adotada pela Anvisa para a estimativa da ingestão de resíduos é a determinística, recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e adotada no âmbito do Codex alimentarius. (WHO - World Health Organization - Joint FAO/WHO Consultation. Dietary Exposure Assessment of Chemicals in Food. Maryland, 2005. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241597470_eng.pdf>).

14. Internacionalmente, os LMRs são estabelecidos pelo Codex Alimentarius, da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), com a finalidade de nortear a segurança alimentar no âmbito do comércio de alimentos entre países. Os países membros do Codex e signatários do Acordo SPS devem considerar os LMR estabelecidos pelo Codex para efeitos de comércio internacional. Quando o país importador verifica que o LMR do Codex contribui para expor sua população a risco, pode impor restrições.

15. O Brasil, a exemplo de outros membros do Codex como Estados Unidos, Argentina, Canadá, Austrália, Europa, China, Japão, Rússia estabelece seus próprios LMR seguindo diretrizes internacionalmente reconhecidas e respaldada pela ciência, em conformidade com o Acordo sobre a Aplicação de Medidas Sanitárias e Fitossanitárias (SPS) da Organização Mundial do Comércio (OMC). Podem haver diferenças nos valores de LMR estabelecidos pelos diferentes países, uma vez que a adoção de distintas Boas Práticas Agrícolas (BPA) pode ser necessária para o controle eficaz do problema fitossanitário local. Isto posto, para garantir a segurança da população brasileira é essencial que toda essa estratégia mencionada acima seja mantida, não sendo salutar sua supressão como propõe o substitutivo.

16. O monitoramento é realizado pela Anvisa por meio da coordenação do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), além da fiscalização, ações de informação à sociedade e capacitação em Toxicologia. Com este conjunto de ações e competências, a ANVISA vem colaborando para organizar a utilização de agrotóxico na produção de alimentos, de modo a favorecer as ações para a proteção da saúde humana. No âmbito do monitoramento de resíduos em alimentos, um dos principais resultados do PARA é a evidência da necessidade de desenvolver um planejamento estratégico que possa reduzir os efeitos nocivos do uso inadequado dos agrotóxicos. Isso corrobora com a estratégia e necessidade do envolvimento da Agência Nacional de Vigilância Sanitária na regulação e controle de agrotóxicos.

17. O substitutivo apresentado desvaloriza todo o trabalho de monitoramento realizado pela Anvisa, impondo um papel secundário no monitoramento de resíduos, principalmente o realizado pelas Vigilâncias Sanitárias Estaduais e Municipais, que realizam as coletas de alimentos nas redes atacadistas e varejistas, locais onde o escopo de atuação da agricultura não alcança.

18. O Sistema Nacional de Vigilância Sanitária tem envidado esforços humanos e pecuniários para manter o programa de monitoramento de resíduos em alimentos. O PARA é exemplo para os países da América Latina e é comparável aos programas existentes nos países desenvolvidos, tanto em termos de metodologia quanto em termos de divulgação. A exclusão dessa competência será um retrocesso no processo regulatório de agrotóxicos e afins e um risco para a garantia da segurança alimentar.

19. O texto do substitutivo prevê a centralização de competências de registro, normatização e reavaliação de agrotóxicos no MAPA, destituindo os órgãos federais da saúde e meio ambiente desta função, prevista na atual Lei de Agrotóxicos. No entanto, o uso de agrotóxicos afeta não somente a agricultura, mas traz claros riscos para a saúde humana e para o meio ambiente, devendo esta competência ser exercida pelos órgãos de saúde e de meio ambiente. Desta forma, o PL delega ao MAPA uma série de ações que são competências estabelecidas atualmente para os setores de saúde e de meio ambiente.
20. O PL terceiriza, ainda, a responsabilidade pelas doenças e agravos à saúde do trabalhador e do consumidor; pelo monitoramento dos resíduos de agrotóxicos e do uso adequado; pelo acompanhamento sistemático das populações expostas e das intoxicações; e pelos planos de emergência nos casos de acidentes de trabalho, transporte e ambientais que possam advir da cadeia produtiva e logística do agrotóxico.
21. No cenário atual, em que há uma tentativa de fragilizar o importante papel da ANVISA, que é de proteção da saúde da população – exercido, principalmente, pela mitigação dos riscos decorrentes do consumo de produtos sujeitos a seu controle, é importante ressaltar que a avaliação toxicológica realizada pela Agência Sanitária, para fins de registro de um agrotóxico no Brasil, segue referências internacionais e a sua abordagem é semelhante ao arcabouço normativo utilizado na União Europeia.
22. Desde 1979 o setor de saúde faz parte da avaliação dos agrotóxicos e vem acumulando expertise no assunto, tornando os procedimentos de avaliação comparáveis aos países desenvolvidos.
23. A avaliação do risco dietético já é regulamentada e realizada pela Anvisa desde 1992, e estamos avançando para a regulamentação e implementação da avaliação do risco ocupacional. A normativa que trata deste tema está atualmente em processo de Consulta Pública, nº 485, de 2017 e em nada interfere no processo legislativo em andamento.
24. A proposta regulatória para avaliação do risco ocupacional será de implementação progressiva, se iniciando com o registro de novos ingredientes ativos, para os quais não tenham sido identificadas, na Etapa I da avaliação, as características de toxicidade quanto à mutagenicidade, carcinogenicidade, teratogenicidade, desregulação endócrina ou efeitos sobre a reprodução. Para esse cenário, já é feito um esforço de definição dos parâmetros de referência concorrente com a avaliação toxicológica e se pode estabelecer um nível de exposição seguro.
25. Quanto à avaliação do risco, a Lei n. 7.802/89 estabelece que, uma vez demonstradas características intrínsecas ao agrotóxico que sejam teratogênicas, carcinogênicas ou mutagênicas, ou que resultem em distúrbios hormonais, esse tem seu registro indeferido, ou no caso de uma reavaliação, tem seu registro proibido. O substitutivo, no entanto, veda a proibição de registro de agrotóxicos com as mencionadas características e obriga, ainda assim, a realização da análise do risco.
26. Existem vários aspectos que permeiam as entrelinhas dos procedimentos de avaliação do risco, evidenciando que o processo é de elevada complexidade. Há estratégias de possibilidade de avaliação do risco que não estão ainda internacionalmente pacificadas, o que demanda maturidade regulatória, necessidade de condução de estudos para quantificação da exposição no Brasil e técnicos especializados em número suficiente para o atendimento da demanda, o que não corresponde à realidade brasileira no momento.
27. Cabe acrescentar que a avaliação do risco desse tipo de produto é apresentada pelo legislativo como a resolução dos problemas do agronegócio, de forma a dar maior celeridade ao processo. De outra mão, esta ideia também favorece o pensamento de que a atual legislação (que impossibilita a avaliação do risco, e também registro, dos agrotóxicos com as mencionadas características proibitivas) está impedindo a inserção de tecnologia no campo.
28. De sorte, é de amplo conhecimento que o que garante o uso e permanência de uma tecnologia é a sua segurança à saúde e ao meio-ambiente. Os produtos agrotóxicos, assim como qualquer outra tecnologia, utilizados de forma não adequada ou controlada é ineficiente e pode causar prejuízos.
29. Esclarecemos que, com a implementação da avaliação do risco ocupacional, muitos dos agrotóxicos hoje permitidos, mesmo que não se enquadrem nas características proibitivas, poderão ter seu uso restringido a partir da avaliação dos cenários de exposição. Um outro ponto é que o tempo médio de análise técnica não reduzirá. Pelo contrário, será aumentado, tendo em vista que as empresas detentoras ou solicitantes de registros destes produtos deverão desenvolver e apresentar novos estudos. Soma-se a isto a inexistência de estudos e dados de exposição aos cenários de aplicação de agrotóxicos no Brasil, de forma a permitir a avaliação do risco.
30. Destaca-se que o referido PL propõe a avaliação do risco para fins de registro de agrotóxicos que revelem características teratogênicas, carcinogênicas ou mutagênicas, que provoquem distúrbios hormonais ou danos ao aparelho reprodutor, ou seja, exclui o § 6º do art. 3º da Lei n. 7.802/02, que transcrevemos:
- “Art. 3º Os agrotóxicos, seus componentes e afins, de acordo com definição do art. 2º desta Lei, só poderão ser produzidos, exportados, importados, comercializados e utilizados, se previamente registrados em órgão federal, de acordo com as diretrizes e exigências dos órgãos federais responsáveis pelos setores da saúde, do meio ambiente e da agricultura.*
- (...)*
- § 6º Fica proibido o registro de agrotóxicos, seus componentes e afins:*
- a) para os quais o Brasil não disponha de métodos para desativação de seus componentes, de modo a impedir que os seus resíduos remanescentes provoquem riscos ao meio ambiente e à saúde pública;*
- b) para os quais não haja antídoto ou tratamento eficaz no Brasil;*
- c) que revelem características teratogênicas, carcinogênicas ou mutagênicas, de acordo com os resultados atualizados de experiências da comunidade científica;*
- d) que provoquem distúrbios hormonais, danos ao aparelho reprodutor, de acordo com procedimentos e experiências atualizadas na comunidade científica;*
- e) que se revelem mais perigosos para o homem do que os testes de laboratório, com animais, tenham podido demonstrar, segundo critérios técnicos e científicos atualizados;*
- f) cujas características causem danos ao meio ambiente.”*
31. Na proposta este dispositivo da atual Lei seria substituído pelos seguintes parágrafos:
- “§ 3º Fica proibido o registro de produtos fitossanitários, de produtos de controle ambiental e afins que, nas condições recomendadas de uso, apresentem risco inaceitável para os seres humanos ou para o meio ambiente, ou seja, permanece inseguro mesmo com a implementação das medidas de gestão de risco.*
- § 4º A análise dos riscos é obrigatória para a concessão de registro de produto fitossanitário e produto de controle ambiental.”*
32. Ocorre que a estrutura estatal atual não se adequa ao modelo proposto no substitutivo. Hoje, não é possível assegurar a proteção à saúde, permitindo que agrotóxicos que revelem características teratogênicas, carcinogênicas ou mutagênicas, ou que provoquem distúrbios hormonais ou danos ao aparelho reprodutor possam ser registrados, após uma avaliação de risco segura. Os países que adotam tal modelo, a exemplo dos EUA, possuem um arcabouço legal de responsabilização privada pelo dano e promoção à saúde diferente do arcabouço brasileiro, que tem como premissa a universalidade (SUS).
33. Sendo assim, excluir este dispositivo legal significa um retrocesso no ordenamento jurídico brasileiro no que tange aos agrotóxicos. A sua aprovação poderá prejudicar a imagem brasileira no mercado internacional, tendo em vista a desregulação que o substitutivo propõe, sem nenhuma contrapartida de responsabilização do dano, da qualificação dos equipamentos de aplicação e de proteção individual e a formação adequada para os aplicadores.

34. A permissão do registro de agrotóxicos com estas características torna-se atualmente inviável considerando: o cenário nacional frente as condições precárias de uso das tecnologias de aplicação de agrotóxicos, a ausência de estudos que simulem a realidade de exposição aos agrotóxicos na condição agrícola do Brasil, o nível de desenvolvimento social dos trabalhadores rurais, o grau de complexidade da avaliação do risco, as questões de recursos humanos, a extensão do prazo de avaliação dos processos, as possíveis implicações regulatórias e a vulnerabilidade de determinados segmentos populacionais, como bebês, crianças, mulheres grávidas ou em idade fértil, idosos, além dos trabalhadores rurais e seus familiares.

35. Há de se considerar que o princípio que rege a avaliação sanitária de um agrotóxico é a segurança de uso pela exposição ocupacional (trabalhadores) e dietética (toda a população brasileira), não podendo outras questões superarem ou se igualarem às premissas básicas de proteção à saúde humana.

36. Quanto à reavaliação, os produtos que tiveram seu uso proibido (Tabela 1) não seriam passíveis de avaliação do risco, considerando que algumas das características que os produtos apresentaram não permitem a definição de limiar de dose, ou seja, o risco é sempre inaceitável. Isto posto, resta claro que o problema não é ausência da avaliação do risco. Todos os produtos proibidos pela Anvisa já são proibidos em diversos lugares do mundo.

Ingrediente ativo	Características que levaram a proibição	A avaliação do risco seria possível (um limiar de dose pode ser definido)?
Endossulfam (RDC n. 28/2010)	Genotóxicas, neutoróxicas, imunotóxicas, desregulador endócrino e tóxico à reprodução	Não, considerando as características de genotoxicidade e desregulação endócrina
Cihexatina (RDC n. 34/2009)	Toxicidade aguda elevada, opacidade ocular irreversível, toxicidade à reprodução e desenvolvimento	Sim, no entanto, o risco foi considerado inaceitável, conforme avaliação realizada pelos EUA, Canadá, União Européia, Austrália, Nova Zelândia e Japão.
Triclorfom (RDC n. 37/2010)	Genotóxicas, neutoróxicas imunotóxicas, desregulador endócrino e tóxico à reprodução. Danos neurológicos em humanos maiores do que os demonstrados em animais.	Não, considerando as características de genotoxicidade e desregulação endócrina.
Monocrotofós (RDC n. 215/2006)	Ausência de dossiê toxicológico que suporte o registro do produto e inclusão desse ingrediente ativo na Convenção de Roterdã.	Não, devido à insuficiência de dados.
Pentaclorofenol (RDC n. 164/2006)	Organoclorado de alta toxicidade, persistência no meio-ambiente, desregulador endócrino, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade, presença de dioxinas, cumprimento de acordos internacionais (poluentes orgânicos persistentes -POP) – Convenção de Estocolmo.	Não, devido a sua alta persistência no meio ambiente e desregulação endócrina e necessidade e atendimento à Convenção de Estocolmo.
Lindano (RDC n. 165/2006)	Organoclorado de alta toxicidade, persistência no meio-ambiente, toxicidade para organismos aquáticos, carcinogenicidade, hepatotoxicidade e neurotoxicidade, cumprimento de acordos internacionais (Poluentes Orgânicos Persistentes-POP) – Convenção de Estocolmo.	Não, devido a sua alta persistência no meio ambiente e necessidade e atendimento a Convenção de Estocolmo.
Metamidofós (RDC n.143 /2011)	Neutoróxicas, imunotóxicas, desregulador endócrino e tóxico à reprodução. Danos neurológicos em humanos maiores do que os demonstrados em animais.	Não, considerando as características de desregulação endócrina.
Parationa Metílica (RDC n. 56/2015)	Neutoróxicas, imunotóxicas, desregulador endócrino, mutagênicas e tóxico à reprodução. Danos neurológicos em	Não, considerando as características de mutagenicidade e desregulação endócrina.

	humanos maiores do que os demonstrados em animais.	
Procloraz (RDC n, 60/2015)	Provoca distúrbios hormonais e danos ao aparelho reprodutor	Não, considerando as características de desregulação endócrina

37. Em relação ao Relatório da Proposição Legislativa, é citado que:

“...a avaliação dos pesticidas e afins está desatualizada em relação ao cenário internacional, pois usa parâmetros em desacordo com as recomendações de tratados e acordo internacionais assinados pelo País, que são posteriores a atual Lei 7.802/1989: o Acordo sobre a Aplicação de Medidas Sanitárias e Fitossanitárias (SPS);...”

38. Em relação a este ponto, temos a informar que a Lei n. 7.802, de 1989, não estabelece procedimentos contrários ou contraditórios ao Acordo SPS, conforme ratificado no Parecer Cons. Nº 89/2015/PF-ANVISA/PGF/AGU, da Procuradoria-Federal junto à Anvisa, que concluiu pela compatibilidade entre a Lei n. 7.802, de 1989, e o Acordo Sobre a Aplicação de Medidas Sanitárias e Fitossanitárias celebrado pelo Brasil, no âmbito da Organização Mundial do Comércio (OMC), que transcrevo:

“56. O Acordo SPS, ao mesmo tempo em que exige de seus signatários avaliação de risco para tomada de decisões sobre medidas sanitárias, reconhece a cada país a prerrogativa de estabelecer um nível apropriado de proteção para seu território.

(...)

58. Assim, ao determinar que todos os produtos agrotóxicos, nacionais ou importados, que comprovadamente possuam os efeitos adversos à saúde humana listados nas alíneas do §6º, do artigo 3º, da Lei nº 7.802/89 sejam proibidos em seu território, o Estado brasileiro estabeleceu uma medida sanitária com fundamento científico, não discriminatória e baseada em um nível apropriado de proteção, atendendo aos ditames do Acordo SPS. Não se vislumbra, portanto, conflito ou incompatibilidade entre o dispositivo legal brasileiro e o Acordo SPS.”

39. Desta forma, não vislumbramos razão para emissão de ato normativo para harmonização da legislação vigente ao Acordo SPS. Apontamos a sensibilidade do tema, conforme já apresentado acima, e esclarecemos que o Brasil já realiza a avaliação do risco dietético, que é a medida sanitária tratada no âmbito do Acordo SPS, e agora está avançando para a implementação da avaliação do risco ocupacional.

40. O PL propõe ainda a retirada § 5º do art. 3º da Lei 7802/89:

“§ 5º O registro para novo produto agrotóxico, seus componentes e afins, será concedido se a sua ação tóxica sobre o ser humano e o meio ambiente for comprovadamente igual ou menor do que a daqueles já registrados, para o mesmo fim, segundo os parâmetros fixados na regulamentação desta Lei.”

41. Entendemos que a exclusão do parágrafo 5º, art. 3º, da Lei nº 7.802/1989 é um desestímulo às empresas a buscarem desenvolver formulações menos tóxicas para a saúde humana, uma vez que existe uma grande diversidade de componentes que podem impactar de forma significativa na toxicidade de um produto formulado.

42. No sentido de proporcionar maior previsibilidade, segurança regulatória, proteção à saúde e estimular o desenvolvimento de produtos de menor toxicidade aguda, a Anvisa propôs, por meio da CP 261/2016 e da CP 484/2018, a adoção do Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS). A motivação para a criação desse sistema foi a existência de divergências na classificação de perigos e na rotulagem de produtos químicos similares produzidos em diferentes países, o que aumenta o risco de acidentes durante o manuseio de produtos químicos, com efeitos negativos para a saúde humana e para o meio ambiente, situação que é agravada pelo crescente e intenso comércio internacional de produtos químicos. A implementação do GHS é possível independentemente da alteração da Lei, e a Anvisa propõe esta alteração, conforme se segue:

Figura 1. Categorias de classificação e rotulagem de agrotóxicos utilizando o GHS e proposto pelo Código Internacional de Gestão de Pesticidas da Organiza

GHS – Acute toxicity						
	Hazard category					
	Category 1	Category 2	Category 3	Category 4	Category 5	Not classified
Pictogram					No symbol	No symbol
Signal Word	Danger	Danger	Danger	Warning	Warning	No signal word
Hazard Statement						
- oral	Fatal if swallowed	Fatal if swallowed	Toxic if swallowed	Harmful if swallowed	May be harmful if swallowed	
- dermal	Fatal in contact with skin	Fatal in contact with skin	Toxic in contact with skin	Harmful in contact with skin	May be harmful in contact with skin	
- inhalation	Fatal if inhaled	Fatal if inhaled	Toxic if inhaled	Harmful if inhaled	May be harmful if inhaled	
Colour band	PMS red 199 C	PMS red 199 C	PMS Yellow C	PMS Blue 293 C	PMS Blue 293 C	PMS Green 347 C

Fonte: International Code of Conduct on Pesticide Management – FAO/WHO - Guidelines on Good Labelling Practice for Pesticides, publicado em Agosto de 2015.

43. A partir da classificação do GHS (Figura 1), foi proposta na CP 261/16 e agora na CP 484/ 2018, a regulamentação do parágrafo 5º do artigo 3º da Lei n.7.802/89, com a definição do mesmo fim e a comparação da ação mais tóxica entre produtos, levando em consideração a toxicidade aguda.

44. Para fins de comparação da ação de toxicidade aguda, foi proposto na CP 484/2018, a seguinte classificação:

“Seção II

Da comparação da ação tóxica de agrotóxicos e afins

Art. 54. Para fins de comparação da ação tóxica, são considerados três grupos: I- Grupo 1: agrotóxicos e afins classificados nas Categorias 1 ou 2 de toxicidade aguda;

II-Grupo 2: agrotóxicos e afins classificados na Categoria 3 de toxicidade aguda; e

III- Grupo 3: agrotóxicos e afins classificados nas Categorias 4 ou 5 de toxicidade aguda.

Parágrafo único. A comparação da ação tóxica dos produtos técnicos é realizada com base nos critérios de equivalência.

Art. 55. Para fins de verificação de maior ação tóxica, devem ser comparados os agrotóxicos e afins à base do (s) mesmo (s) ingrediente (s) ativo (s), com mesmo tipo de formulação e na mesma faixa de concentração do ingrediente ativo estabelecida na declaração de composição qualitativa e quantitativa. Parágrafo único. Para fins de comparação da mesma faixa de concentração, são utilizados os parâmetros definidos em legislação específica.

Art. 56. Será indeferido o pedido de avaliação toxicológica de registro ou pós-registro para um agrotóxico ou afim quando:

I- for enquadrado no Grupo 1, quando todos os agrotóxicos ou afins já registrados estiverem enquadrados no Grupo 2, 3 ou Não Classificado;

II- for enquadrado no Grupo 2, quando todos os agrotóxicos ou afins já registrados estiverem enquadrados no Grupo 3 ou Não Classificado; ou

III- for enquadramento no Grupo 1, 2 ou 3, quando todos os agrotóxicos ou afins já registrados estiverem enquadrados como Não Classificado.”

45. Importante esclarecer que a proposta de comparação da ação tóxica feita pela Anvisa está alinhada aos princípios de proteção, bem como de incentivo ao desenvolvimento de produtos com formulações menos tóxicas e, consequentemente, de menor risco à toxicidade aguda, seja pela exposição ocupacional ou acidental. Vale o registro de que houve boa aceitabilidade da proposta por parte da sociedade civil e setor regulado.
46. Para fins de avaliação toxicológica, a Anvisa propôs que a comparação seja feita para os produtos à base do(s) mesmo(s) ingrediente(s) ativos, com mesmo tipo de formulação e na mesma faixa de concentração.
47. O PL propõe ainda a retirada de competências das esferas estaduais de legislar sobre a produção e o consumo, de fiscalizar o consumo e o comércio, e de aplicar multas, limitando a autonomia dos estados, Distrito Federal e municípios e a possibilidade de maior restrição no seu âmbito. Ocorre que aos Estados, ao DF e aos Municípios é vedada explicitamente a possibilidade de restringir o alcance do registro federal, a menos que seja para atender uma particularidade regional ou local devidamente justificada. A participação dos órgãos estaduais e municipais se dá hoje de forma complementar e relevante para a proteção da saúde e do meio ambiente considerando as questões regionais.
48. As principais propostas do PL enfraquecerão o sistema regulatório de agrotóxicos, componentes e afins, prejudicando de forma significativa a qualidade, eficiência e efetividade do controle dos agrotóxicos e afins, tornando ineficiente a missão do Sistema Único de Saúde de proteger a saúde da população e intervir nos riscos decorrentes da produção e do uso de produtos sujeitos à vigilância sanitária.
49. A regulação de agrotóxicos pode e está sendo aprimorada com a utilização de normativas que têm convergência com as melhores práticas internacionais, com uma melhor articulação dos órgãos federais entre si e desses com os órgãos estaduais e municipais.
50. O aperfeiçoamento do arcabouço regulatório, a gestão, a informatização, a desburocratização, a utilização racional e segura de agrotóxicos devem ser o foco de política pública voltada para este tema. Tem sido uma demanda da sociedade o fortalecimento dos órgãos governamentais responsáveis pelo registro e fiscalização de agrotóxicos, por meio de reestruturações, de forma a proporcionar condições suficientes para que exerçam o seu trabalho.
51. A proposta extingue ainda o Comitê Técnico para Assessoramento de Agrotóxicos-CTA, que se trata de fórum consultivo para harmonização de entendimento entre os órgãos federais envolvidos no processo de registro de agrotóxicos. O CTA é a instância atualmente vigente que tem apresentado propostas de forma a desburocratizar o processo de registro de agrotóxico, considerando a proteção à saúde, ao meio ambiente e à agricultura. Sendo assim, o CTA de forma alguma reduz a autonomia do órgão registrante, mas tem como objetivo garantir a necessidade de intervenção nos riscos à saúde e meio-ambiente, por meio de diálogo democrático e conjunto.
52. Quanto à criação de uma taxa única, devem ser consultados os órgãos competentes para verificação dessa possibilidade de arrecadação. Outro ponto divergente do PL é quando se estabelece um valor de taxa de R\$ 80.000,00 para Produto Técnico Novo – PTN e de R\$ 100.000,00 para Produto Formulado Novo – PFN, sendo que a análise do PTN é mais complexa do ponto de vista toxicológico. Há de ressaltar também a destinação dos recursos recolhidos ao Fundo Federal Agropecuário – FFAP, que em nada está relacionado à proteção à saúde e ao meio ambiente, que serão os maiores prejudicados, caso esta proposta seja aprovada neste formato.
53. Ademais, somos contrários à autorização automática provisória, tendo em vista se tratar de produtos com impacto direto à saúde e ao meio ambiente. Ao conceder automaticamente o registro de produtos com base em dados de terceiros, poderá não ser respeitado o direito de propriedade da informação ou do administrado, conforme a Lei n. 10.603, de 2002 e colocar em risco a saúde da população brasileira.
54. O referido PL tem como objetivo alterar em profundidade a Lei nº 7.802, de 1989, considerada e reconhecida internacionalmente como uma das normas mais avançadas na proteção da saúde e do meio ambiente.
55. Diante dos fatos expostos, a Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, observada a manifestação técnica da Gerência Geral de Toxicologia - GGTOX desta Agência, posiciona-se **CONTRÁRIA** à proposta do substitutivo e consequente revogação da Lei n. 7.802, de 1989. Em adição, não identificamos que o presente PL contribua com melhoria, disponibilidade de alimentos mais seguros ou novas tecnologias para o agricultor e nem mesmo com o fortalecimento do sistema regulatório de agrotóxicos, não atendendo dessa forma quem deveria ser o foco da legislação: a população brasileira.

Atenciosamente,

JARBAS BARBOSA DA SILVA JR.

Diretor-Presidente

Anvisa



Documento assinado eletronicamente por **Jarbas Barbosa da Silva Jr., Diretor-Presidente**, em 09/05/2018, às 08:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015 http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2015-2018/2015/Decreto/D8539.htm.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.anvisa.gov.br/autenticidade>, informando o código verificador **0202694** e o código CRC **09C70B86**.



NOTA TÉCNICA Nº 31/2018/SEI/DICOL/ANVISA

Proposição Legislativa: PL 6299/2002 - (Origem PLS 526/1999). Apensados: PL nos 713/1999, 1.388/1999, 2.495/2000, 3.125/2000, 5.852/2001, 5.884/2005, 6.189/2005, 7.564/2006, 1.567/2011, 1.779/2011, 3.063/2011, 4.166/2012, 4.412/2012, 2129/15, 49/2015, 371/2015, 461/2015, 958/2015, 1.687/2015, 3.200/2015, 3.649/2015, 4.933/2016, 5.218/2016, 5.131/2016, 6.042/2016, 7.710/2017, 8.026/2017, 8.892/2017, 9271/2017)

Autor: Senador Blairo Maggi

Ementa: Altera os arts 3º e 9º da Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências.

Ministério: Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa

Data da manifestação: 20/07/2018

Posição:	☐ Favorável ☒ Contrária ☐ Fora de competência ☐ Favorável com sugestões/ressalvas ☐ Nada a opor ☐ Matéria prejudicada
Manifestação referente a(o):	☐ Texto original ☐ Emendas de _____ ☒ Substitutivo aprovado na Comissão Especial em 25/06/2018 ☐ Outros _____

I - JUSTIFICATIVA:

Trata-se da análise do substitutivo aprovado pela Comissão Especial referente ao projeto de Lei nº 6.299, de 2002 em 25/06/2018, informamos que, sob o aspecto da saúde, as alterações realizadas no substitutivo se restringem a quatro pontos a saber:

1. Alteração do termo "produto fitossanitário" para "pesticida": Importante destacar que o termo agrotóxico é o utilizado na Constituição Federal-CF;
2. Alteração do prazo de conclusão dos pleitos de registro de produto técnico novo e produto formulado novo de "12 meses" para "24 meses": A alteração de prazo de 12 para 24 meses para os produtos formulados novos e produtos técnicos novos é mais factível. No entanto, o PL mantém a autorização automática provisória, que somos contrários, tendo em vista se tratar de produtos com impacto direto à saúde e ao meio ambiente. Ao conceder automaticamente o registro de produtos com base em dados de terceiros, poderá não ser respeitado o direito de propriedade da informação ou do administrado, conforme a Lei n. 10.603, de 2002 e colocar em risco a saúde da população brasileira, tendo em vista que o tempo médio de análise de um ingrediente ativo novo pode variar de 1 a 3 anos;
3. Incluiu a expressão "considerando aspectos econômicos - fitossanitários e a possibilidade de uso de produtos substitutos" no § 14. do art. 3º: Com esta alteração, além de atribuir a competência de reavaliação toxicológica e ambiental dos agrotóxicos ao órgão da agricultura, denominada "reanálise de risco", temas estes que estão fora do escopo de atuação da agricultura, a a proposta coloca as questões econômicas em detrimentos da segurança do uso. A ANVISA se responsabiliza pela análise toxicológica dos agrotóxicos que pleiteiam registro ou alterações pós-registro e também pela reavaliação dos agrotóxicos, à luz de novos conhecimentos e alertas. A reavaliação toxicológica é realizada quando

surgem novas informações que indiquem a necessidade de uma revisão de condições de uso, as quais possam desaconselhar o uso dos produtos já registrados. A reavaliação também pode ser feita quando o país for alertado nesse sentido por organizações internacionais responsáveis pela saúde, alimentação ou meio ambiente. Há de se considerar que o princípio que rege a avaliação ou reavaliação sanitária de um agrotóxico é a segurança de uso pela exposição ocupacional (trabalhadores) e dietética (toda a população brasileira), não podendo outras questões superar ou se igualar as premissas básicas de proteção à saúde humana.

"§ 14. Quando organizações internacionais responsáveis pela saúde, alimentação ou meio ambiente, das quais o Brasil seja membro integrante ou signatário de acordos e convênios, alertarem para riscos ou desaconselharem o uso de pesticida, produto de controle ambiental, produto técnico e afins, deverá acabar à autoridade competente tomar providências de reanálise dos riscos considerando aspectos econômicos - fitossanitários e a possibilidade de uso de produtos substitutos.

4. Incluiu a expressão "analisar e quando couber,..." no inciso IV do art. 6º que estabelece as competências do órgão federal da saúde: Tal alteração mantém a figura de "homologação" pelo órgão federal da saúde. Atribui às empresas registrantes a competência para análise do risco dos agrotóxicos, retirando, assim, a competência de avaliação e classificação toxicológica do setor de saúde. No entanto, compete ao Sistema Único de Saúde participar do controle e fiscalização de tais procedimentos e a supressão da competência do órgão regulador sanitário significa reduzir sua atividade a um papel meramente cartorial, uma vez que somente acataria, por meio de homologação, a análise realizada pelas empresas. Assim, entendemos que essa proposta claramente desconsidera a responsabilidade e dever do Estado em reduzir, por meio de políticas públicas, o potencial de dano à saúde oriundo da exposição a agrotóxicos e afins.

"Art. 6º Cabe ao órgão federal responsável pelo setor da saúde:

(...)

IV - analisar e, quando couber, homologar a avaliação de risco toxicológico apresentada pelo requerente dos pesticidas e produtos de controle ambiental, produtos técnicos e afins, podendo solicitar complementação de informações;"

5. Incluiu a expressão "analisar e quando couber,..." no inciso IV do art. 6º que estabelece as competências do órgão federal da saúde: Tal alteração mantém a figura de "homologação" pelo órgão federal da saúde. Atribui às empresas registrantes a competência para análise do risco dos agrotóxicos, retirando, assim, a competência de avaliação e classificação toxicológica do setor de saúde. No entanto, compete ao Sistema Único de Saúde participar do controle e fiscalização de tais procedimentos e a supressão da competência do órgão regulador sanitário significa reduzir sua atividade a um papel meramente cartorial, uma vez que somente acataria, por meio de homologação, a análise realizada pelas empresas. Assim, entendemos que essa proposta claramente desconsidera a responsabilidade e dever do Estado em reduzir, por meio de políticas públicas, o potencial de dano à saúde oriundo da exposição a agrotóxicos e afins.

6. Diante dos fatos expostos, a Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, observada a manifestação técnica da Gerência Geral de Toxicologia - GGTOX desta Agência, posiciona-se **CONTRÁRIA** à proposta do substitutivo e consequente revogação da Lei n. 7.802, de 1989. Em adição, não identificamos que o presente PL contribua com melhoria, disponibilidade de alimentos mais seguros ou novas tecnologias para o agricultor e nem mesmo com o fortalecimento do sistema

regulatório de agrotóxicos, não atendendo dessa forma quem deveria ser o foco da legislação: a população brasileira.

Atenciosamente,

WILLIAM DIB

Diretor-Presidente

Anvisa



Documento assinado eletronicamente por **William Dib, Diretor-Presidente**, em 17/09/2019, às 11:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015 http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2015-2018/2015/Decreto/D8539.htm.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.anvisa.gov.br/autenticidade>, informando o código verificador **0398110** e o código CRC **5AA AFC62**.

**EXTRATO DE DELIBERAÇÃO DA DICOL****CIRCUITO DELIBERATIVO**

Conforme decisão da Diretoria Colegiada em reunião realizada por meio do Circuito Deliberativo – CD 193/2022 – Projeto de Lei, de 23/2/2022, informo:

Relatora: Cristiane Rose Jourdan Gomes

Processo SEI: 25351.680929/2015-11

Expediente: 0601964/22-5

Assunto: Projeto de Lei 6.299/2002

Ementa: Trata-se de manifestação quanto ao Substitutivo do Projeto de Lei 6299/2002, aprovado no Plenário da Câmara dos Deputados em 09/02/2022, que altera os artigos 3º e 9º da Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências, conforme solicitação do Ministério da Saúde encaminhada à Anvisa por meio do OFÍCIO Nº 458/2022/ASPAR/GM/MS SEI (1782555).

Posição da relatora: Contrária

Diretoria: Terceira Diretoria

Área: GGTOX

INFORMAÇÕES DA VOTAÇÃO

DIRETOR	VOTO
ANTONIO BARRA TORRES	SIM
MEIRUZE SOUSA FREITAS	SIM
CRISTIANE ROSE JOURDAN GOMES	SIM
ALEX MACHADO CAMPOS	SIM
RÔMISON RODRIGUES MOTA	SIM

O Diretor Alex Campos pontuou que as manifestações da Anvisa, em matérias legislativas, constituem contribuição técnico-sanitária ao debate parlamentar e são formuladas em respeito às discussões capitaneadas pelo Congresso Nacional.

A Diretora Meiruze Freitas destacou a importância de manter o diálogo junto ao Congresso Nacional e a oportunidade do aprimoramento do Projeto de Lei, com fulcro na proteção da saúde pública e na estratégia do fortalecimento da agricultura.

- A Diretoria Colegiada decidiu, por unanimidade, manifestar posição **CONTRÁRIA** frente ao Projeto de Lei nº 6.299/2002, nos termos do voto da relatora - Voto nº 50/2022/SEI/DIRE3/Anvisa (SEI 1788079).



Documento assinado eletronicamente por **Verangge Pereira Lopes Custodio, Secretário(a)-Geral da Diretoria Colegiada Substituto(a)**, em 03/03/2022, às 16:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/D10543.htm.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.anvisa.gov.br/autenticidade>, informando o código verificador **1794922** e o código CRC **7E56E900**.

Referência: Processo nº 25351.680929/2015-11

SEI nº 1794922

**VOTO Nº 50/2022/SEI/DIRE3/ANVISA**

Processo nº 25351.680929/2015-11

Expediente nº 0601964/22-5

Análise do Substitutivo do Projeto de Lei 6299/2002
aprovado no Plenário da Câmara dos Deputados.

Área responsável: Gerência-Geral de Toxicologia - GGTOX

Relator: Cristiane Rose Jourdan Gomes

1. Relatório e análise

Trata-se de manifestação quanto ao Substitutivo do Projeto de Lei 6299/2002, aprovado no Plenário da Câmara dos Deputados em 09/02/2022, que altera os artigos 3º e 9º da Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências, conforme solicitação do Ministério da Saúde encaminhada à Anvisa por meio do OFÍCIO Nº 458/2022/ASPAR/GM/MS SEI (1782555).

Destaco que a Anvisa já se manifestou publicamente, contrária ao projeto por meio das Notas técnicas nº 31/2018/SEI/DICOL/ANVISA e nº 15/2018/SEI/DICOL/ANVISA por reconhecer diversos pontos no Projeto de Lei que podem trazer riscos à saúde da população brasileira. No entanto, o PL aprovado em 09/02/2022 não considerou os apontamentos da Anvisa quanto aos riscos sanitários envolvidos.

Dessa forma, tendo como base a NOTA TÉCNICA Nº 2/2022/SEI/DIRE3/ANVISA (1782999), entre as principais preocupações apontadas pela Anvisa nas Notas Técnicas mencionadas anteriormente, existem pontos críticos no PL 6.299/2002 que precisam ser destacados, uma vez que, na prática, eliminam, anulam ou condicionam a outros órgãos, a atuação concernente à saúde no processo regulatório dos agrotóxicos.

Passo a chamar a atenção desses pontos por ordem de complexidade e prioridade para discussão.

Exclusão da Anvisa do processo de reanálise (reavaliação) de agrotóxicos já registrados.

Registre-se que uma das mudanças que possuem maior impacto negativo para a saúde da população, e que dificilmente poderá ser remediada por normas infralegais, é a retirada do órgão da saúde como responsável pelo processo de reavaliação toxicológica dos agrotóxicos que já estão em uso no Brasil. Atualmente, a reavaliação toxicológica é atribuição da Anvisa, sob responsabilidade da Coordenação de Reavaliação (CREAV/GEMAR/GGTOX/DIRE3).

Segundo o PL 6.299/2002, esta atividade de reavaliação (também chamada no PL de reanálise) passa a ser uma atribuição exclusiva do órgão registrante de agrotóxicos para uso na agricultura, que no PL 6.299/2002 é o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). O PL retira a reavaliação das competências da Anvisa e prevê que o MAPA **poderá** consultar a Anvisa para a tomada de decisão durante o processo de reavaliação, conforme trecho abaixo transcrito.

Art. 4º Fica estabelecido o órgão federal responsável pelo setor da agricultura como órgão registrante dos pesticidas, seus produtos técnicos e afins, assim como o órgão federal que atua na área de meio ambiente como o órgão registrante de produtos de controle ambiental, seus produtos técnicos e afins.

§ 5º Caberá aos órgãos registrantes:

X - estabelecer procedimentos para o registro, a autorização, as inclusões, as reavaliações e a fiscalização de produtos.

Art. 5º Compete ao órgão federal responsável pelo setor da agricultura:

*VI - **decidir** sobre os pedidos e critérios a serem adotados na **reanálise** dos riscos dos pesticidas.*

Seção II Da Reanálise dos Riscos

Art. 28...

*§ 1º O órgão federal que atua na área da agricultura é o coordenador do processo de reanálise dos pesticidas e **poderá solicitar informações dos órgãos de saúde** e de meio ambiente para complementar sua análise.*

Considerando que o registro de um agrotóxico não tem data de validade, a reavaliação é a única maneira definida no PL (e na legislação atual) que o Estado Brasileiro dispõe para revisar sua decisão de manter determinado ingrediente ativo mercado nacional, caso novos dados toxicológicos e epidemiológicos apontem que a substância representa um risco que não foi identificado no momento do seu registro. O PL indica que a reanálise de um agrotóxico deve ocorrer quando alertas de organismos internacionais apontarem riscos ou desaconselharem o uso de determinado agrotóxico. Então, se o risco é para a saúde humana, é mandatório que o órgão da saúde seja o responsável pela iniciativa, coordenação e execução de todo o processo de reavaliação.

Não situação similar encontrada em outros mercados como a prevista no PL em tela. Todos os países com atuação relevante na regulação de agrotóxicos atribuem a responsabilidade de reavaliação toxicológica de agrotóxicos a um órgão que tenha incluída na sua missão ou visão institucional a proteção da saúde da população do seu país. No Brasil, este órgão, indubitavelmente, é a Anvisa. Não é aceitável que o PL transfira para o MAPA esta responsabilidade. O MAPA possui alta relevância na atuação para a proteção das plantas de interesse econômico e se reconhece, segundo sua Carta de Serviços, como “órgão do governo federal responsável pela gestão das políticas públicas de estímulo à agropecuária, pelo fomento do agronegócio e pela regulação e normatização de serviços vinculados ao setor”.

A reavaliação toxicológica de um agrotóxico é um processo altamente complexo, que envolve no setor saúde o conhecimento avançado em fisiologia, toxicologia, epidemiologia, avaliação de riscos entre outros, além de profundo conhecimento sobre as inúmeras diretrizes internacionais, exigindo participação ativa nas discussões da comunidade científica e regulatória internacionais. É mandatório, pela experiência adquirida pela Anvisa nos últimos 10 anos, que os pareceres e conclusões sobre este processo devam ser elaborados por servidores públicos de carreira, estáveis, com liberdade para uma avaliação científica isenta de pressões políticas e econômicas. A Anvisa é o único órgão no Brasil, atualmente, que possui condições técnicas e experiência para realização deste trabalho. Cabe ressaltar que a Anvisa conduz a reavaliação com base em norma que representa a participação e o interesse da sociedade (RDC nº 221/2018), pois, foi elaborada recentemente por um processo com ampla participação da sociedade, inclusive do setor regulado, ministério público, pesquisadores e cidadãos. Na RDC nº 221/2018 são detalhados todos os critérios e procedimentos para a reavaliação toxicológica, com o objetivo de garantir transparência, eficiência e previsibilidade ao processo.

A Anvisa já concluiu a reavaliação de 19 ingredientes ativos e proibiu o uso de 12 deles no mercado brasileiro, por representarem risco inaceitável para a nossa população. Recentemente, a Anvisa publicou uma lista de sete substâncias que deverão ser reavaliadas nos próximos anos, as quais foram selecionadas com base em critérios de risco a saúde humana. Estas substâncias apresentaram um alto

potencial de exposição dietética (por meio da ingestão de água e alimentos com resíduos de agrotóxicos), exposição ocupacional, apresentaram evidências de causarem mutação em espermatozoides e óvulos, malformação em fetos, interferência nos processos reprodutivos, câncer, desregulação de hormônios, subdesenvolvimento neurológico em crianças entre outros. A maioria delas já foi proibida em diversos países. Portanto, a exclusão da Anvisa do processo de reavaliação significa a manutenção destes agrotóxicos no mercado brasileiro sem qualquer avaliação no risco à saúde humana, o que representa uma grave perda para a saúde pública no país.

Exclusão da Anvisa do processo de divulgação dos resultados do monitoramento de resíduos de agrotóxicos em produtos de origem vegetal

O Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, sob coordenação da Anvisa, possui um programa de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos com quase de 20 anos de atuação, o PARA. O PL 6.299/2002 limita a atuação da Anvisa e desestimula a existência do programa ao excluir a Anvisa da responsabilidade de divulgar os seus resultados e afirmar que é atribuição do MAPA esta divulgação.

Art. 5º Compete ao órgão federal responsável pelo setor da agricultura:

*IX - monitorar conjuntamente com o órgão federal de saúde os resíduos de pesticidas em produtos de origem vegetal, **sendo responsabilidade do órgão registrante a divulgação dos resultados do monitoramento.***

Assim, o PL vetou a participação da Anvisa na divulgação dos resultados deste monitoramento e submete aos interesses econômicos do setor agrícola a divulgação do diagnóstico sanitário da presença de resíduos de agrotóxicos nos alimentos. A presença de resíduos de agrotóxicos em alimentos é uma preocupação mundial para a saúde humana. A proteção da saúde humana é competência da Anvisa e a Lei de criação da Agência é explícita ao atribuir a competência da agência para o monitoramento e controle destes resíduos em alimentos.

Exclusão da Anvisa no processo de análise de propostas de edição e alteração de atos normativos sobre agrotóxicos.

O PL 6.299/2002 excluiu a Anvisa da competência de analisar propostas de normas que tratem de agrotóxicos, reservando esta competência apenas aos órgãos registrantes.

Art. 5º Compete ao órgão federal responsável pelo setor da agricultura:

I - analisar propostas de edição e alteração de atos normativos sobre as matérias tratadas nesta Lei e promover ajustes e adequações consideradas cabíveis quanto aos pesticidas;

Art. 7º Cabe ao órgão federal responsável pelo setor do meio ambiente:

V - analisar propostas de edição e alteração de atos normativos sobre as matérias tratadas nesta lei e promover ajustes e adequações consideradas cabíveis quanto aos produtos de controle ambiental;

Da forma proposta pelo Projeto de Lei, a Anvisa não terá a competência legal para atuar na análise de propostas de normas, podendo ser excluída da participação das consultas legislativas, da Casa Civil ou ministeriais que venham a tratar de toxicologia dos agrotóxicos.

Estabelecimento de prazos para análise de pleitos de registro em tempo exíguo para o atendimento devido a complexidade da análise toxicológica para fins de registro.

O Decreto 10.803/21, regulamentou adequadamente os prazos, aperfeiçoando o decreto 4074/2002 estabelecendo prazos para o registro de agrotóxicos no Brasil alinhados aos prazos praticados por órgãos internacionais de regulação de agrotóxicos.

Liberação de uso de agrotóxicos sem avaliação toxicológica adequada e dos riscos dietéticos para a saúde humana - criação do registro temporário e autorização temporária.

O PL 6.299/2002 cria o registro temporário e a autorização temporária e afirma que um agrotóxico pode ser utilizado no Brasil no caso de descumprimento dos prazos exíguos.

Os agrotóxicos registrados em outros países não podem ser automaticamente utilizados no Brasil sem qualquer avaliação dos órgãos da saúde, do meio ambiente e da agricultura. A avaliação para autorização de uso de um agrotóxico inclui a análise de dados sobre o comportamento desse produto nas condições de uso no Brasil. Os resíduos que estarão nos alimentos após a aplicação de um agrotóxico podem variar segundo as condições climáticas e as boas práticas agrícolas. Por isso, para a aprovação, o responsável pelo registro é necessário provar que os resíduos toxicologicamente relevantes daquele produto não estarão no alimento em doses que possam representar impacto na avaliação de risco dietético crônico ou agudo. Não há uma extrapolação automática de um país para outro para estas doses sem que seja realizada as avaliações de risco. Para este cálculo, a Anvisa considera todos os alimentos para os quais um determinado agrotóxico tem uso aprovado e o perfil de consumo de alimentos da população brasileira, incluindo avaliações regionais, por Unidade Federada. Portanto, não há qualquer alternativa cientificamente embasada que justifique a autorização automática de uso no Brasil de um agrotóxico aprovado em outro país sem que haja a avaliação da segurança realizada pela Anvisa.

Por todo exposto entendo que o PL 6.299/2002 enfraquece a regulação sanitária dos agrotóxicos no Brasil expondo a população brasileira ao risco sanitário e por esse motivo reitero a posicionamento contrário da Anvisa já manifestado anteriormente por duas vezes.

2. Voto

Diante de todo o exposto voto por aprovar a manifestação contrária ao Projeto de Lei 6299/2002 aprovado no Plenário da Câmara dos Deputados em 09/02/2022, acompanhando as principais considerações da NOTA TÉCNICA Nº 2/2022/SEI/DIRE3/ANVISA (1782999).

É esse o meu entendimento que encaminho para deliberação desta Diretoria Colegiada da Anvisa, por meio do Circuito Deliberativo.



Documento assinado eletronicamente por **Cristiane Rose Jourdan Gomes, Diretor**, em 23/02/2022, às 16:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/D10543.htm.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.anvisa.gov.br/autenticidade>, informando o código verificador **1788079** e o código CRC **4BD0FBBO**.