



PARECER TÉCNICO DE REAVALIAÇÃO Nº 07, de 2015/GGTOX/ANVISA

Reavalia os riscos à saúde humana do ingrediente ativo ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).

RESUMO

Este parecer trata da reavaliação dos riscos à saúde humana do ingrediente ativo de agrotóxico ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), instituída pela Resolução RDC nº 124, de 07 de julho de 2006, devido à suspeita de que esse ingrediente ativo poderia possuir efeitos tóxicos considerados impeditivos de registro de agrotóxicos no Brasil. O herbicida 2,4-D está disponível comercialmente há 70 anos e não é proibido em nenhum país. É o segundo ingrediente ativo de agrotóxico mais vendido no Brasil. A reavaliação do 2,4-D foi finalizada em novembro de 2015 pela Agência Europeia para a Segurança dos Alimentos, que aprovou o registro desse ingrediente ativo nos países membro da União Europeia até 31 de dezembro de 2030. O corpo técnico da Gerência Geral de Toxicologia da Anvisa realizou análise detalhada dos estudos conduzidos com produtos técnicos à base de 2,4-D e levantamento bibliográfico extenso da literatura científica publicada, incluindo as análises desse ingrediente ativo por instituições regulatórias internacionais. Foram considerados os resultados, a qualidade científica e o peso da evidência de todos os estudos avaliados. Com base na avaliação do perigo do 2,4-D realizada pela Anvisa e nas determinações da legislação brasileira, concluiu-se que os dados atualmente disponíveis não fornecem evidências consistentes de que esse ingrediente ativo de agrotóxico causa efeitos graves à saúde humana que impeçam seu registro e utilização no Brasil. Portanto, a Anvisa considera que o 2,4-D não se enquadra nas características proibitivas de registro de agrotóxicos no Brasil (§6 itens “c”, “d” e “e” do art. 3º da Lei 7.802, de 11 de julho de 1989), ou seja, ele não revela características teratogênicas, carcinogênicas ou mutagênicas nem provoca distúrbios hormonais ou danos ao aparelho reprodutor relevantes para seres humanos, conforme resultados de estudos científicos disponíveis até o momento. Desse modo, sugere-se a manutenção dos produtos à base do ingrediente ativo 2,4-D no Brasil. No entanto, a partir da reavaliação do 2,4-D foi verificada a necessidade de: (a) revisão da Monografia do 2,4-D; (b) realização das avaliações da exposição e do risco ocupacional ao 2,4-D, para verificar se são



necessárias alterações nas formulações, dose, métodos de aplicação ou culturas autorizadas para este ingrediente ativo (imediatamente após a finalização da consolidação das contribuições à Consulta Pública); (c) aprimoramento do monitoramento de 2,4-D em água e alimentos no Brasil; e (d) fomento à realização de estudos epidemiológicos no Brasil que avaliem a associação entre a exposição ao 2,4-D e a ocorrência de doenças. Ressalta-se que a Anvisa deverá manter-se atenta aos resultados de futuros estudos que tratem do 2,4-D e às avaliações de seus efeitos à saúde por outros organismos internacionais de forma a verificar possíveis alterações na percepção dos riscos à saúde humana que possam demandar nova reavaliação.

SUMÁRIO

<i>I - RELATÓRIO</i>	007
1 ASPECTOS LEGAIS DA REAVALIAÇÃO DE AGROTÓXICOS	007
2 MOTIVAÇÃO PARA A REAVALIAÇÃO DO 2,4-D	011
3 SITUAÇÃO REGULATÓRIA INTERNACIONAL DO 2,4-D	014
3.1 AUSTRÁLIA.....	015
3.2 CANADÁ.....	015
3.3 CHINA.....	016
3.4 ESTADOS UNIDOS.....	016
3.5 NORUEGA.....	017
3.6 SUÉCIA.....	017
3.7 UNIÃO EUROPEIA.....	017
3.8 AGÊNCIA INTERNACIONAL DE PESQUISAS SOBRE O CÂNCER.....	017
3.9 ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A ALIMENTAÇÃO E A AGRICULTURA.....	018
4 SITUAÇÃO NACIONAL DO 2,4-D	018
<i>II – ANÁLISE</i>	022
1 IDENTIDADE QUÍMICA E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO 2,4-D	022
2 IMPUREZAS, PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO E RESÍDUOS POTENCIALMENTE RELEVANTES DO 2,4-D	024



2.1 BASE LEGAL.....	024
2.2 IMPUREZAS DO PROCESSO DE SÍNTESE.....	024
2.3 METABÓLITOS DECORRENTES DA DEGRADAÇÃO.....	029
2.3.1 Durante o armazenamento.....	029
2.3.2 No Ambiente.....	029
2.3.3 Em Seres Humanos, Animais de Experimentação e de Produção.....	031
2.4 TOXICIDADE DAS IMPUREZAS POTENCIALMENTE RELEVANTES	031
2.4.1 Toxicidade do 2,4-DCP.....	031
2.4.2 Toxicidade das Dioxinas.....	032
2.5 CONCLUSÕES SOBRE O CONTROLE DE IMPUREZAS POTENCIALMENTE RELEVANTES DO 2,4-D.....	034
3 TOXICOCINÉTICA DO 2,4-D.....	035
3.1 DADOS DE ESTUDOS REALIZADOS EM ANIMAIS.....	035
3.2 COMPARAÇÕES TOXICOCINÉTICAS ENTRE AS ESPÉCIES.....	038
3.3 ETAPAS DA TOXICOCINÉTICA.....	038
3.3.1 Absorção.....	038
3.3.1.1 Pele e mucosas.....	038
3.3.1.2 Trato respiratório.....	039
3.3.1.3 Trato digestório.....	039
3.3.2 Distribuição.....	039
3.3.3 Metabolismo.....	040
3.3.4 Excreção.....	041
3.3.4.1 Diferenças na excreção do 2,4-D por cães.....	041
3.3.4.2 Diferenças sexuais na excreção do 2,4-D.....	042
4 TOXICIDADE AGUDA DO 2,4-D.....	043
5 TOXICIDADE SUBCRÔNICA E CRÔNICA DO 2,4-D.....	044
5.1 ESTUDOS SUBCRÔNICOS.....	044
5.1.1 Rins.....	044
5.1.2 Fígado.....	046
5.1.3 Tireoide.....	046
5.1.4 Testículos.....	047
5.1.5 Ovários.....	048



5.1.6 Olhos.....	048
5.1.7 Adrenais.....	048
5.1.8 Hipófise.....	048
5.1.9 Imunotoxicidade.....	049
5.2 ESTUDOS CRÔNICOS E DE CARCINOGENICIDADE.....	054
5.2.1 Rins.....	054
5.2.2 Fígado.....	055
5.2.3 Tireoide.....	055
5.2.4 Testículos.....	056
5.2.5 Ovários.....	056
5.2.6 Adrenais.....	057
5.2.7 Olhos.....	057
5.2.8 Encéfalo.....	057
5.2.9 Hipófise.....	057
5.2.10 Imunotoxicidade.....	058
5.3 CONCLUSÕES DOS ESTUDOS SUBCRÔNICOS E CRÔNICOS.....	062
6 GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DO 2,4-D.....	062
6.1 AVALIAÇÃO DAS EVIDÊNCIAS EXPERIMENTAIS DE MUTAGENICIDADE DO 2,4-D.....	066
6.1.1 Testes <i>in vitro</i> em células procariontas.....	066
6.1.2 Testes <i>in vitro</i> em leveduras.....	069
6.1.3 Testes <i>in vitro</i> em células de mamíferos.....	069
6.1.4 Testes <i>in vivo</i> para detectar mutações em <i>Drosophila melanogaster</i>	073
6.1.4.1 Testes <i>in vivo</i> em células somáticas de <i>Drosophila melanogaster</i>	073
6.1.4.2 Testes <i>in vivo</i> em células germinativas de <i>Drosophila melanogaster</i>	075
6.1.5 Testes <i>in vivo</i> em células somáticas e germinativas de mamíferos.....	077
6.1.6 Teste com células de humanos expostos ao 2,4-D.....	083
6.2 AVALIAÇÃO DAS EVIDÊNCIAS EXPERIMENTAIS DE GENOTOXICIDADE DO 2,4-D.....	085
6.3 AVALIAÇÃO DA MUTAGENICIDADE DO 2,4-D POR AGÊNCIAS REGULADORAS E ORGANISMOS INTERNACIONAIS.....	090
6.4 CONCLUSÃO SOBRE A GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE	092



DO 2,4-D.....	
7 TOXICIDADE DO 2,4-D PARA A REPRODUÇÃO E PARA O DESENVOLVIMENTO E ALGUNS PARÂMETROS ENDÓCRINOS.....	094
7.1 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EMBRIOFETOTÓXICO E TERATOGENICO DO 2,4-D EM ANIMAIS.....	095
7.2 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO 2,4-D EM ESTUDOS MULTIGERACIONAIS.....	099
7.2.1 Estudo de Duas Gerações.....	099
7.2.2 Estudo de Uma Geração Estendida.....	103
7.2.2.1 Parâmetros Tireoidianos.....	106
7.2.2.2. Demais parâmetros endócrinos e reprodutivos.....	108
7.2.2.3 Neurotoxicidade no Desenvolvimento.....	113
7.2.2.4 Imunotoxicidade no Desenvolvimento.....	115
7.2.2.5 Observações sobre o delineamento experimental do Estudo de Uma Geração Estendida.....	115
7.2.2.5.1 Período de tratamento pré-acasalamento.....	115
7.2.2.5.2 Decisão sobre a necessidade de se criar uma segunda geração.....	116
7.2.2.6 Conclusões do Estudo de Uma Geração Estendida	117
7.3 ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	118
7.3.1 Reprodução.....	118
7.3.2 Desenvolvimento.....	119
7.4 CONCLUSÕES SOBRE A TOXICIDADE DO 2,4-D NA REPRODUÇÃO E NO DESENVOLVIMENTO.....	119
8 TOXICIDADE DO 2,4-D NO SISTEMA ENDÓCRINO.....	120
8.1 ESTUDOS <i>IN VITRO</i>	121
8.2 ESTUDOS <i>IN VIVO</i>	126
8.3 ANÁLISE DA LITERATURA CIENTÍFICA SOBRE OS POSSÍVEIS EFEITOS ENDÓCRINOS E REPRODUTIVOS DO 2,4-D.....	128
8.3.1 Avaliação da Atividade Estrogênica.....	128
8.3.2 Avaliação da Atividade Androgênica.....	129
8.3.3 Avaliação da Esteroidogênese e da Atividade da Aromatase.....	130
8.3.3.1 Possível relação entre desregulação endócrina da esteroidogênese e a	



ocorrência de câncer.....	132
8.3.4 Avaliação dos Efeitos na Reprodução e em Hormônios Sexuais.....	135
8.3.5 Avaliação dos Efeitos Tireoidianos.....	138
8.3.5.1 Imprevisibilidade de alguns efeitos em testes tradicionais realizados em animais.....	142
8.4 ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS SOBRE OS EFEITOS TIREOIDIANOS DO 2,4-D.....	144
8.5 CONCLUSÕES SOBRE A TOXICIDADE TIREOIDIANA DO 2,4-D.....	144
9 NEUROTOXICIDADE DO 2,4-D.....	145
9.1 ESTUDOS DE NEUROTOXICIDADE REALIZADOS EM ANIMAIS.....	145
9.1.1 Neurotoxicidade Aguda.....	145
9.1.2 Neurotoxicidade Subcrônica e Crônica.....	146
9.1.3 Neurotoxicidade no Desenvolvimento.....	148
9.2 RELATOS DE CASOS E ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	148
9.2.1 Relatos de Caso de Neurotoxicidade em Humanos.....	148
9.2.2 Estudos Epidemiológicos.....	149
9.3. CONCLUSÕES SOBRE A NEUROTOXICIDADE DO 2,4-D.....	151
10 CARCINOGENICIDADE DO 2,4-D.....	152
10.1 AVALIAÇÃO DA CARCINOGENICIDADE DO 2,4-D POR ORGANISMOS INTERNACIONAIS.....	152
10.2 ANÁLISE DAS EVIDÊNCIAS EXPERIMENTAIS E EPIDEMIOLÓGICAS DE CARCINOGENICIDADE DO 2,4-D.....	154
10.2.1 Análise das Evidências Experimentais em Animais.....	154
10.2.2 Análise dos Estudos Epidemiológicos em Humanos.....	155
10.2.2.1 Limitações dos Estudos Epidemiológicos.....	160
10.3 CONCLUSÕES SOBRE A CARCINOGENICIDADE DO 2,4-D.....	162
11 INGESTÃO DIÁRIA ACEITÁVEL (IDA) DO 2,4-D.....	162
12 PRESENÇA DE RESÍDUOS DE 2,4-D NO SOLO, EM ALIMENTOS E NA ÁGUA.....	163
12.1 MONITORAMENTO DE 2,4-D EM ALIMENTOS.....	164
12.1.1 Literatura publicada sobre monitoramento de 2,4-D em alimentos.....	165
12.2 MONITORAMENTO DE 2,4-D NA ÁGUA PARA CONSUMO	



HUMANO.....	166
12.3 CONCLUSÃO SOBRE O MONITORAMENTO DO 2,4-D EM ALIMENTOS E EM ÁGUA.....	168
III – CONCLUSÃO.....	169
IV - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	171

I – RELATÓRIO:

Este parecer, que visa analisar os riscos à saúde humana do ingrediente ativo ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), refere-se ao processo de reavaliação nº 25351.519835/2014-21 e é composto pelas seguintes partes: relatório (I), análise (II), conclusão (III) e referências bibliográficas (IV).

Ele foi elaborado pelo corpo técnico da Anvisa, com apoio de pesquisadora de instituição estadual de ensino e pesquisa reconhecida técnica e cientificamente na área de toxicologia e que não apresenta conflito de interesses com o tema agrotóxico.

Foi realizada análise detalhada dos resultados dos estudos conduzidos com produtos técnicos à base de 2,4-D e levantamento bibliográfico extenso da literatura científica publicada, incluindo as análises desse ingrediente ativo por instituições regulatórias internacionais. Foram considerados os resultados, a qualidade científica e o peso da evidência de todos os estudos avaliados.

A conclusão deste parecer de reavaliação baseia-se nos aspectos científicos e regulatórios vigentes e irá subsidiar a consulta pública e a proposição de regulamento técnico referente ao ingrediente ativo 2,4-D.

1 ASPECTOS LEGAIS DA REAVALIAÇÃO DE AGROTÓXICOS

O registro de agrotóxicos no Brasil é regulamentado pela Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989 (Brasil, 1989). No §6º do art. 3º dessa Lei determina-se a proibição do 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 risco 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.*

A reavaliação de agrotóxicos está prevista no art.13 do Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002 (Brasil, 2002), que determina:

Os agrotóxicos, seus componentes e afins que apresentarem indícios de redução de sua eficiência agrônômica, alteração dos riscos à saúde humana ou ao meio ambiente poderão ser reavaliados a qualquer tempo e ter seus registros mantidos, alterados, suspensos ou cancelados.



A Portaria do Ministério da Saúde nº 03, de 16 de janeiro de 1992, regulamenta como devem ser realizadas as avaliações toxicológicas de produtos agrotóxicos no país e, por isso, também é essencial na reavaliação toxicológica. Ela determina que a avaliação toxicológica deve detectar possíveis efeitos graves para a saúde que possam impedir o registro e a utilização de um determinado agrotóxico. Portanto, no processo de reavaliação de um agrotóxico, após a análise de todos os dados e estudos, deve-se avaliar o peso das evidências obtidas, a relevância para os seres humanos e se os efeitos se enquadram nas características legais proibitivas de registro.

Conforme o art. 31 do Decreto 4.074, de 2002, e item 1.3 da Portaria nº 03, de 1992, são características proibitivas de registro para agrotóxicos, seus componentes e afins:

- Ausência de métodos para a desativação dos componentes, de modo a impedir que os seus resíduos remanescentes provoquem riscos à saúde pública (inciso I, do art. 31, do Decreto nº 4.074, de 2002).
- Ausência de antídoto ou tratamento eficaz (inciso II, do art. 31, do Decreto nº 4.074, de 2002).
- Evidências científicas, baseadas em dados validados, de teratogênese na espécie humana ou em estudos com pelo menos duas espécies de animais de experimentação, que devem incluir uma dose suficientemente alta para produzir toxicidade materna e uma dose baixa, sem efeito para o adulto ou para a ninhada (inciso III, do art. 31, do Decreto nº 4.074, de 2002, e item 1.3.4 da Portaria nº 03, de 1992).
- Evidências científicas de carcinogenicidade para o homem, baseadas em estudos epidemiológicos validados, efetuados com o rigor científico da Organização Mundial da Saúde (OMS), em órgãos Regionais e seus Centros especializados; ou evidências científicas de carcinogenicidade, baseadas em dados validados, para pelo menos duas espécies de animais de experimentação com incidência aumentada de tumores malignos: a) em determinado local do corpo

ou órgão, com tumores do mesmo tipo; b) em diversas provas, de preferência com diferentes vias de administração e com diversas doses; ou c) em grau não usual com referência à incidência, sítio, tipo de tumor ou idade de início, sendo que a evidência é reforçada quando há relação direta entre o número de animais positivos para tumores e o aumento das doses (inciso IV, do art. 31, do Decreto n° 4.074, de 2002, e item 1.3.2 da Portaria n° 03, de 1992).

- Evidências científicas de mutagenicidade baseadas em dados validados, com indução de mutações em, no mínimo, dois testes, um deles para detectar mutações gênicas (realizado com e sem ativação metabólica e com um controle positivo) e o outro para detectar mutações cromossômicas (inciso V, do art. 31, do Decreto n° 4.074, de 2002, e item 1.3.3 da Portaria n° 03, de 1992).
- Evidências científicas de desregulação endócrina, não existindo dose relevante sem efeito adverso nos experimentos com animais de experimentação ou no homem. As alterações devem ocorrer em todas as doses relevantes testadas e o efeito não deve ser reversível com a interrupção da administração da substância (inciso VI, do art. 31, do Decreto n° 4.074, de 2002, e item 1.3.5 da Portaria n° 03, de 1992).
- Evidências de danos relevantes ao aparelho reprodutor (inciso VI, do art. 31, do Decreto n° 4.074, de 2002).
- Evidências de que o ingrediente ativo é mais perigoso para o homem do que o demonstrado em testes de laboratório com animais (inciso VII, do art. 31 do Decreto n° 4.074, de 2002).

Mesmo que o ingrediente ativo não se enquadre nas características proibitivas, após as análises, pode-se concluir pela necessidade de alterações no registro, como exclusão de algum tipo de aplicação, revisão da Ingestão Diária Aceitável (IDA), exclusão de culturas e alteração do intervalo de segurança, dentre outras medidas.

Assim, conforme o estipulado pelo art. 19 do Decreto n° 4.074, de 2002, e a partir da avaliação de todos os aspectos toxicológicos relevantes na reavaliação,



pode-se concluir pela manutenção do registro do ingrediente ativo sem alterações; pela alteração da formulação, da dose ou do método de aplicação; pela restrição da produção, da importação, da comercialização ou do uso; pela proibição ou suspensão da produção, importação ou uso; ou pelo cancelamento do registro.

2 MOTIVAÇÃO PARA A REAVALIAÇÃO DO 2,4-D

O 2,4-D é um herbicida seletivo do grupo fenoxiacético disponível comercialmente há 70 anos. Ele ficou especialmente conhecido ser um dos ingredientes do Agente Laranja, uma mistura 1:1 de 2,4-D e ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T), que continha grandes quantidades de dioxinas contaminantes (Hardell, 2008) e que foi amplamente utilizada nos anos 1960 e 1970 para controlar ervas daninhas e como desfolhante durante a Guerra do Vietnã (IARC, 2012).

A reavaliação toxicológica dos produtos técnicos e formulados à base do ingrediente ativo 2,4-D teve Comissão Técnica instituída pela Resolução RDC nº 124, de 07 de julho de 2006, publicada no Diário Oficial da União nº 161, de 22 de agosto de 2006 (Seção 1 – pág 36). Pela RDC, o início da reavaliação foi previsto para o período de 17 a 21 de julho de 2006, com um prazo de 180 dias para a conclusão dos trabalhos.

Em 18 de julho de 2006, ocorreu a Reunião de Reavaliação Toxicológica do Ingrediente Ativo 2,4-D, a qual contou com representantes do Ministério da Saúde (Anvisa e Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz), do Ministério da Agricultura, da Pecuária e do Abastecimento - MAPA (Secretaria de Defesa Agropecuária), do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - Ibama e do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola – SINDAG (atualmente Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal – SINDIVEG).

Segundo a Memória da Reunião disponível no endereço eletrônico da Anvisa (Anvisa, 2006), os motivos apresentados para a reavaliação do 2,4-D foram os seguintes:

“1) Projeto de Lei tramitando na Câmara solicitando proibição do ingrediente ativo 2,4-D e existência de Ação Civil Pública no estado do



Paraná, também solicitando a proibição de uso desse IA;

2) Reavaliações internacionais do IA;

3) Risco ocupacional;

4) Necessidade de adequação de estudos agudos, de mutagenicidade, metabolismo, subagudos, subcrônicos e crônicos devido à ausência parcial ou total desses estudos em muitos dossiês e a impossibilidade de estabelecer correlação entre os estudos existentes para os produtos técnicos e as diferentes pré-misturas e formulações de 2,4-D. Além desses, há necessidade de adequação dos estudos de resíduos devido à ausência total ou parcial para algumas culturas e à impossibilidade de estabelecer correlação entre as indicações agrônomicas e os estudos de resíduos aportados.

5) Efeitos crônicos associados ao ácido 2,4-D, ao éster e aos sais de dimetilamina e trietalonamina, tais como:

- ação do 2,4-D sobre o sistema endócrino e imunológico;*
- teratogenicidade associada ao 2,4-D;*
- efeitos reprodutivos associados com interferência hormonal que devem ser esclarecidos;*
- carcinogenicidade do 2,4-D;*
- neurotoxicidade do 2,4-D; e*
- efeitos citotóxicos e hepatotóxicos do 2,4-D”.*

A reunião de reavaliação do 2,4-D levou a diversas decisões, entre elas a exigência de que fossem encaminhados “estudos sobre interferência endócrina em mamíferos, estudos de imuno e neurotoxicidade em mamífero, novos estudos sobre reprodução e prole que contemplem efeitos endócrinos em mamíferos e estudos de metabolismo também em mamíferos”.



Em atendimento às exigências decorrentes da reunião de reavaliação, as empresas registrantes de produtos à base de 2,4-D protocolaram um documento elaborado pela Força Tarefa 2,4-D- “Industry Task Force II on 2,4-D Research Data” informando que a Agência de Proteção Ambiental Americana (*United States Environmental Protection Agency - USEPA*) solicitou, no ano de 2006, um novo estudo de reprodução de duas gerações com o protocolo mais recente daquela agência e incluindo a avaliação da desregulação endócrina, da imunotoxicidade e da neurotoxicidade no desenvolvimento do 2,4-D. A Força Tarefa previu um prazo de 48 meses para finalização e entrega deste estudo, o qual foi protocolado na Anvisa em 03 de setembro de 2010.

Com a finalidade de unificar as discussões sobre a reavaliação toxicológica do ingrediente ativo 2,4-D no Brasil, em julho de 2006 foi criado um Grupo de Trabalho das diversas empresas que possuíam produtos à base desse ingrediente ativo registrados no país. A constituição desse Grupo de Trabalho foi formalizada apenas em fevereiro de 2015, por meio da assinatura de contrato de constituição de Força Tarefa com o SINDIVEG. Atualmente fazem parte da Força Tarefa de Reavaliação do 2,4-D no Brasil as seguintes empresas: Adama Brasil S/A, AllierBrasil Agronomia Ltda, ALTA - America Latina Tecnologia Agrícola Ltda, Ameribrás Indústria e Comércio Ltda, Atanor do Brasil Ltda, BRA Defensivos Agrícolas Ltda, CCAB Agro S.A., Cropchem Ltda, Dow Agrosiences Industrial Ltda, Genbra Distribuidora de Produtos Agrícolas Ltda, Helm do Brasil Mercantil Ltda, Nortox S.A., Nufarm Indústria Química e Farmacêutica Ltda, Ouro Fino Química Ltda, Prentiss Química Ltda, Rainbow Defensivos Agrícolas Ltda, Stockton-Agrimor do Brasil Ltda, UPL do Brasil Indústria e Comércio de Insumos Agropecuários S.A., Volcano Agrociência Indústria e Comércio de Defensivos Agrícolas Ltda. Além disso, há outras duas empresas que não compõem esta Força Tarefa, mas tem produtos técnicos à base de 2,4-D registrados no Brasil, conforme verificado no Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (Agrofit): Alamos do Brasil e Consagro Agroquímica.

Em 19 de dezembro de 2013, o Ministério Público Federal proferiu a Recomendação nº 59/2013/MPF/PR/DF, para a Anvisa finalizar a reavaliação toxicológica do herbicida 2,4-D num prazo de 180 dias a partir do recebimento da referida recomendação.



A reavaliação do ingrediente ativo 2,4-D foi retomada de fato pela Anvisa em 28 de abril de 2014. Vale ressaltar que a Anvisa recebeu dois documentos para auxiliar na fundamentação da reavaliação toxicológica do 2,4-D, os quais foram levados em consideração neste parecer: um do Núcleo de Estudos Agrários e Desenvolvimento Rural do Ministério do Desenvolvimento Agrário, de 24 de março de 2014 (Ferment, 2014) e um da Fiocruz, de 1º de agosto de 2014 (Friedrich, 2014).

3 SITUAÇÃO REGULATÓRIA INTERNACIONAL DO 2,4-D

O 2,4-D não está de fato proibido em nenhum país do mundo, mas passa atualmente por reavaliação na Austrália, China e Estados Unidos.

No Canadá, algumas formas de 2,4-D estão proibidas devido a riscos ao meio ambiente e à falta de dados para avaliação. Na Austrália, os ésteres altamente voláteis de 2,4-D tiveram seu registro cancelado em 2013 por apresentarem risco inaceitável para o meio ambiente. No quadro 1 segue resumo da situação internacional do 2,4-D e, logo a seguir, descrição mais detalhada da situação desse ingrediente ativo em alguns países.

Quadro 1. Resumo da situação internacional do 2,4-D.

País	Situação
Argentina	Permitido. O éster isobutílico de 2,4-D está proibido na Província de Santa Fé ¹ .
Austrália	Permitido. Os ésteres altamente voláteis de 2,4-D estão proibidos (risco ao meio ambiente).
Canadá	Permitido ² . Proibido somente na forma dietanolamina (DEA) de 2,4-D e para uso aquático. Em Quebec e Ontário é proibido o uso em gramados, jardins e parques. Reavaliação prevista.
China	Permitido. Em reavaliação.
Dinamarca	Restrito. Proibida a aplicação de mais de 100 g de ingrediente ativo/hectare/ano ³ .
Estados Unidos	Permitido. Em reavaliação.
Índia	Permitido.
Japão	Permitido.
Malásia	Permitido.
Noruega	Proibido, mas atualmente (julho de 2015) está em andamento avaliação de novo pedido de aprovação do 2,4-D.
Suécia	Proibido antes desse país se tornar membro da União Europeia. O uso de 2,4-D é autorizado na União Europeia, entretanto não há produtos à base desse ingrediente ativo aprovados na Suécia.
Suíça	Permitido.
União Europeia	Permitido. Reavaliação recentemente finalizada, registro válido até 2030.

Fontes:

¹Resolución MP 135/15, de 26/2/2015.

²<http://www.ontario.ca/environment-and-energy/pesticides-home-lawns-and-gardens>

<http://www.mddelcc.gouv.qc.ca/pesticides/permis-en/code-gestion-en/>

³<http://eng.mst.dk/topics/pesticides/pesticides/health-and-environmental-evaluation-of-active-substances-and-products/prohibited-products/>



3.1 AUSTRÁLIA

A Autoridade Australiana para Pesticidas e Medicamentos Veterinários (*Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority - APVMA*) convocou a população para indicar os ingredientes ativos e produtos químicos que deveriam ser reavaliados e, dentre os 600 indicados, 80 tiveram prioridade de reavaliação, sendo o 2,4-D um deles. A partir dessa seleção e considerando o risco potencial do 2,4-D à saúde pública, à saúde ocupacional e à segurança do meio ambiente, a APVMA iniciou a reavaliação desse ingrediente ativo em 2003. A APVMA se preocupava com o alto risco potencial de toxicidade crônica, com as suspeitas de efeitos teratogênicos, com o potencial de carcinogenicidade, com a grande lacuna nos dados disponíveis e com a atividade regulatória internacional em relação ao 2,4-D (APVMA, 2003).

Em abril de 2006, a APVMA publicou relatório preliminar de reavaliação do 2,4-D e identificou que as formas de éster altamente voláteis (*high volatile ester – HVE*: ésteres etílico, butílico e isobutílico) do 2,4-D proporcionavam risco inaceitável para o meio ambiente. Todos os produtos contendo 2,4-D HVE foram suspensos em outubro de 2006, tendo o seu uso aprovado apenas quando seguissem instruções específicas da APVMA. Em agosto de 2013, os registros dos produtos contendo 2,4-D HVE foram cancelados, sendo permitido o uso dos produtos comprados antes de 31 de agosto de 2014.

A reavaliação do 2,4-D pela APVMA ainda não foi concluída, porém essa agência informou que está satisfeita com as avaliações do risco à saúde humana realizadas por outras autoridades regulatórias internacionais e que, portanto, sua reavaliação será focada nos potenciais efeitos do 2,4-D no meio ambiente (<http://apvma.gov.au/node/12351>).

3.2 CANADÁ

Em 2008, a Agência Reguladora Canadense (*Health Canada Pest Management Regulatory Agency - PMRA*) emitiu um relatório sobre a reavaliação do 2,4-D e exigiu das empresas novos dados necessários para a reavaliação desse ingrediente ativo, relativos aos aspectos químicos, toxicológicos, ambientais e de



exposição (PMRA, 2008). Em 2013, a PMRA informou que os resultados dos novos estudos foram aceitáveis e que o 2,4-D foi aprovado pelos padrões de segurança do país e poderia ser comercializado (PMRA, 2013a), exceto a forma de dietanolamina (DEA), que teve sua comercialização descontinuada por exceder os padrões de risco ambientais ou para a saúde aceitáveis ou pela falta de dados para avaliação (PMRA, 2013b). A conclusão foi consistente com a situação regulatória dessa substância nos Estados Unidos, na Nova Zelândia e em países da União Europeia (PMRA, 2013b).

Na província de Quebec, o 2,4-D está proibido para uso na manutenção de gramados e na província de Ontário ele não pode ser utilizado para combater ervas daninhas e insetos em gramados, hortas, jardins ornamentais, pátios, calçadas, estacionamentos e jardins em área escolar.

O Canadá publicou em 2013 uma previsão de revisão especial do ingrediente ativo 2,4-D, com base na proibição desse ingrediente ativo na Noruega em 2001 (PMRA, 2013b).

3.3 CHINA

O 2,4-D passa por reavaliação na China. Em julho de 2014, o Instituto Chinês para o Controle de Agroquímicos do Ministério da Agricultura (*Institute for the Control of Agrochemicals, Ministry of Agricultural - ICAMA*) concluiu que o 2,4-D butílico e outros quatro ingredientes ativos deveriam ser alvo de uma avaliação de registro. Também ficou determinado por esse instituto que as empresas que desejarem manter o registro dos produtos devem suplementar os relatórios com estudos adicionais e melhorar as formulações ou o padrão de uso dos produtos.

3.4 ESTADOS UNIDOS

O 2,4-D está passando por uma revisão de registro nos Estados Unidos programada para ser concluída em 2017. O último relatório a respeito da reavaliação do 2,4-D foi publicado em 2005 e aprovou a comercialização dos produtos à base desse ingrediente ativo, inclusive em ambientes aquáticos. A USEPA aprovou recentemente o



uso de 2,4-D-colina em culturas de organismos geneticamente modificados (OGM) de milho e soja.

3.5 NORUEGA

O 2,4-D foi proibido na Noruega em 2001 devido às suspeitas de carcinogenicidade (David Suzuki Foundation, 2006). No entanto, conforme informações da Autoridade Norueguesa de Segurança Alimentar (julho de 2015), atualmente está em andamento nova avaliação do uso de 2,4-D naquele país (Abdellaue, 2015).

3.6 SUÉCIA

Conforme informações da Agência Sueca de Produtos Químicos, o 2,4-D foi proibido antes da Suécia se tornar membro da União Europeia. Atualmente, ele é autorizado na União Europeia, entretanto ainda não há produtos à base desse ingrediente ativo aprovados na Suécia (Swedish Chemicals Agency, 2015).

3.7 UNIÃO EUROPEIA

A reavaliação do 2,4-D foi recentemente (novembro de 2015) finalizada pela Agência Europeia para a Segurança dos Alimentos (*European Food Safety Authority* – EFSA), que concluiu pela aprovação do registro desse ingrediente ativo até 31 de dezembro de 2030 nos países membros da União Europeia: Alemanha, Áustria, Bélgica, Bulgária, Chipre, Croácia, Dinamarca, Eslováquia, Eslovênia, Espanha, Estônia, Finlândia, França, Grécia, Hungria, Irlanda, Itália, Letônia, Lituânia, Luxemburgo, Países Baixos, Polônia, Portugal, República Checa, Reino Unido, Romênia e Suécia.

3.8 AGÊNCIA INTERNACIONAL DE PESQUISAS SOBRE O CÂNCER

Em junho de 2015, foi realizado na Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (*International Agency for Research on Cancer* – IARC) um encontro em



que o 2,4-D foi classificado no grupo 2B, ou seja, possivelmente carcinogênico (Loomis *et al.*, 2015), com base em evidências inadequadas de carcinogenicidade para humanos e evidências limitadas de carcinogenicidade para animais. No Brasil, são considerados carcinogênicos os agrotóxicos que apresentem evidências suficientes nesse sentido, na espécie humana ou em animais de experimentação (art. 31 do Decreto 4.074, de 2002). A classificação do 2,4-D quanto à carcinogenicidade será discutida mais detalhadamente no item 10 da parte II deste parecer.

3.9 ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A ALIMENTAÇÃO E A AGRICULTURA

Em 1996, foi realizada a última avaliação dos aspectos toxicológicos do 2,4-D na Reunião Conjunta da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura/Organização Mundial da Saúde sobre Resíduos de Agrotóxicos (*Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO/World Health Organisation - WHO Meeting on Pesticides Residues – JMPR*), tendo sido concluído que o 2,4-D não causa toxicidade no desenvolvimento, não é genotóxico e possui resultados inconsistentes de carcinogenicidade em estudos epidemiológicos (JMPR, 1997). Nas avaliações do risco dietético realizadas em 1998 e 2001, o JMPR concluiu que é pouco provável que o consumo de resíduos de 2,4-D represente risco à saúde pública, pois atingiu apenas 3 a 10% da IDA em 1998 e 3 a 20% em 2001 (JMPR, 1999 e 2001).

4 SITUAÇÃO NACIONAL DO 2,4-D

No Brasil, há atualmente 30 produtos técnicos e 54 produtos formulados à base de 2,4-D registrados no MAPA, conforme informações do Agrofit resumidas nas tabelas 1 e 2.

Dos 54 produtos formulados à base de 2,4-D, há 23 à base de 2,4-D ácido; 2 de 2,4-D amina; 15 de 2,4-D dimetilamina; 11 de 2,4-D trietanolamina e 3 de 2,4-D triisopropanolamina. Ainda, 27 produtos formulados possuem uma associação do 2,4-D com outro ingrediente ativo: 26 com o picloram e 1 com o aminopiralde (tabela 2).



Tabela 1. Produtos técnicos à base de 2,4-D registrados no Brasil.

Marca Comercial	Titular do Registro	Registro
2,4-D Ácido Técnico BR	Adama Brasil S/A	6201
2,4-D Ácido Técnico Mil	Adama Brasil S/A	10708
2,4-D Ácido Técnico Milenia	Adama Brasil S/A	2703
2,4-D Acido Técnico Milenia Br	Adama Brasil S/A	16012
2,4-D Amina Técnica Milenia	Adama Brasil S/A	6494
2,4-D Amina Técnica Milenia BR	Adama Brasil S/A	1396
2,4 D Técnico Alamos	Alamos do Brasil	16312
2,4-D Técnico AL	Allier Brasil Agro Ltda	7314
2,4-D Técnico Alta	ALTA - America Latina Tecnologia	15512
Ácido 2,4-D Técnico Atanor	Atanor do Brasil Ltda	2302
2,4 D Técnico Atanor II	Atanor do Brasil Ltda	15612
2,4-D Técnico BRA	BRA Defensivos Agrícolas Ltda	16807
2,4-D Técnico RB-BRA	BRA Defensivos Agrícolas Ltda	15212
2,4-D Técnico TW-BRA	BRA Defensivos Agrícolas Ltda	8612
2,4D Ácido Técnico CCAB	CCAB Agro S.A.	13914
2,4 Technical	Consagro Agroquímica Ltda	15312
2,4-D Técnico SRCROPChem	Cropchem Ltda	14014
2,4 D Ácido Seco Técnico III	Dow Agrosiences Industrial Ltda	12211
2,4-D Ácido Seco Técnico	Dow Agrosiences Industrial Ltda	1638803
2,4-D Ácido Seco Técnico II	Dow Agrosiences Industrial Ltda	19207
2,4-D Ácido Técnico Genbra	Genbra Distribuidora de Produtos Agrícolas Ltda	13214
2,4-D Ácido 97 Técnico Helm	Helm do Brasil Mercantil Ltda	16908
2,4-D Técnico Nortox	Nortox S.A.	3208
2,4-D Ácido Técnico Nufarm	Nufarm Indústria Química e Farmacêutica S.A.	4901
2,4-D TC Técnico Prentiss	Prentiss Química Ltda	14012
2,4-D Técnico Prentiss	Prentiss Química Ltda	16707
2,4 D Técnico Rainbow	Rainbow Defensivos Agrícolas Ltda	15912
2,4 D Técnico	Stockton - Agrimor do Brasil Ltda	7607
2,4-D Técnico DVA	UPL do Brasil Ind. e Com. de Insumos Agropecuários S.A.	11208
2,4-D Ácido Técnico Volcano	Volcano Agrociência Ind. e Com. de Defensivos Agrícolas Ltda	1808

Fonte: Agrofit, 2015.



Tabela 2. Produtos formulados à base de 2,4-D registrados no Brasil.

2,4-D	Marca Comercial	Titular do Registro	Registro	IA associado
Ácido	Arena	Stockton - Agrimor do Brasil Ltda	16407	picloram
	Artys	Volcano Agrociência Ind. e Com. de Def. Agrícolas Ltda	13408	picloram
	Bratt	BRA Defensivos Agrícolas Ltda	6908	-
	Brion	BRA Defensivos Agrícolas Ltda	11708	-
	Capri	Adama Brasil S/A	1696	-
	Crater	Volcano Agrociência Ind. e Com. de Def. Agrícolas Ltda	13108	picloram
	Dez	UPL do Brasil Ind. e Com. de Insumos Agropecuários S.A.	5009	-
	Dontor	Dow Agrosiences Industrial Ltda	2028702	picloram
	Grant	BRA Defensivos Agrícolas Ltda	7508	-
	Intruder	Dow Agrosiences Industrial Ltda	7014	picloram
	Jacaré	Volcano Agrociência Ind. e Com. de Def. Agrícolas Ltda	13808	picloram
	Jaguar	Dow Agrosiences Industrial Ltda	13307	aminopiralde
	Jornada	Dow Agrosiences Industrial Ltda	7914	picloram
	Labrador	Helm Do Brasil Mercantil Ltda	4411	picloram
	Manejo	Dow Agrosiences Industrial Ltda	6398	picloram
	Navajo	Nufarm Indústria Química e Farmacêutica S.A.	1903	-
	Panoramic	Dow Agrosiences Industrial Ltda	8014	picloram
	Pooper	Nortox S.A.	3309	-
	Pren-D 806	Prentiss Química Ltda	15808	-
	Tento 867 SL	Dow Agrosiences Industrial Ltda	1795	-
	Turuna	Adama Brasil S/A	14207	picloram
	Viktor	Volcano Agrociência Ind. e Com. de Def. Agrícolas Ltda	13308	picloram
	2,4-D Nortox	Nortox S.A.	3009	-
Amina	Dinaxine	Rainbow Defensivos Agrícolas Ltda.	215	-
	Herbina	Rainbow Defensivos Agrícolas Ltda.	315	-
Dimetilamina	Aminamar	Dow Agrosiences Industrial Ltda	548804	-
	Aminol 806	Adama Brasil S/A	195	-
	Campeon	Stockton - Agrimor do Brasil Ltda	16607	-
	Disparo	Dow Agrosiences	2310	picloram
	DMA 806 BR	Dow Agrosiences	2108604	-
	Field	ALTA - America Latina Tecnologia	5614	-
	Herbi D-480	Adama Brasil S/A	1358490	-
	Pren-D	Prentiss Química Ltda.	3806	-
	U 46 BR	Nufarm Indústria Química e Farmacêutica S.A.	1803	-
	U 46 D-Fluid 2,4-D	Nufarm Indústria Química e Farmacêutica S.A.	4118103	-
	U 46 PRIME	Nufarm Indústria Química e Farmacêutica S.A.	2704	-
	2,4-D Amina 72	Atanor do Brasil Ltda	5002	-
	2,4-D DMA 806 Rainbow	Rainbow Defensivos Agrícolas Ltda	115	-
2,4-D Fersol	Ameribrás Indústria e Comércio Ltda	1228803	-	
2,4-D 806 RN	Rainbow Defensivos Agrícolas Ltda	1215	-	
Trietanolamina	Camp-D	Prentiss Química Ltda	10511	picloram
	Facca	BRA Defensivos Agrícolas Ltda	2612	picloram
	Famoso	UPL do Brasil Indústria e Comércio de Insumos Agropecuários S.A.	10213	picloram
	Galop M	Adama Brasil S/A	5914	picloram
	Norton	Nortox S.A.	11409	picloram - trietalonamina
	Pampa	BRA Defensivos Agrícolas Ltda	2512	picloram
	Pri-Mordial	Nortox S.A.	11509	picloram - trietalonamina
	Raio	Prentiss Química Ltda	10611	picloram
	Tordon	Dow Agrosiences Industrial Ltda	358709	picloram - trietalonamina
	Tractor	Nufarm Indústria Química e Farmacêutica S.A	2708	picloram
	Tucson	Nufarm Indústria Química e Farmacêutica S.A	18707	picloram
Triisopropanolamina	Flanker	Dow Agrosiences Industrial Ltda	8312	picloram
	Grazon BR	Dow Agrosiences Industrial Ltda	5404	-
	Palace	Dow Agrosiences Industrial Ltda	9707	picloram - triisopropanolamina

Fonte: Agrofitec, 2015; IA=ingrediente ativo.

De acordo com os dados mais recentes de comercialização do Ibama, o 2,4-D foi o segundo ingrediente ativo de agrotóxico mais vendido no Brasil em 2013, ficando atrás apenas do glifosato, outro herbicida (Ibama, 2013).

Os dados de comercialização enviados à Anvisa pelas empresas registrantes de produtos técnicos e formulados à base de 2,4-D para o ano de 2014 estão dispostos na tabela 3. Nota-se que praticamente todo o 2,4-D técnico utilizado no Brasil é importado, com a produção nacional representando menos de 0,4% do total. Por outro lado, a maior parte dos produtos formulados à base de 2,4-D utilizados no Brasil tem origem nacional (82%). Além disso, nota-se que não houve exportação de produtos técnicos ou formulados à base de 2,4-D em 2014.

Na tabela 4 estão relacionados os países de onde são importados os produtos técnicos à base de 2,4-D.

Tabela 3. Dados de comercialização dos produtos técnicos e formulados à base de 2,4-D para o ano de 2014.

Tipo de Produto	Quantidade Importada (kg)	Quantidade Exportada (kg)	Produção Nacional (kg)	Venda Nacional		
				Cliente (kg)	Indústria (kg)	Revenda (kg)
Técnico	13.924.138,82	0,00	55.272,00	3.360,00	14.348.117,76	1.313.456,64
Formulado	3.423.545,53	0,00	15.821.483,08	14.528.471,07	1.183.607,47	5.059.591,26
Total	17.347.684,35	0,00	15.876.755,08	14.531.831,07	15.531.725,24	6.373.047,90

Fonte: dados enviados à Anvisa pelas empresas registrantes.

Tabela 4. Origem dos produtos à base de 2,4-D importados pelo Brasil em 2014.

País	Quantidade (kg)
Áustria, Austrália	3.246.760,00
Polônia	2.135.680,00
Estados Unidos	1.528.321,07
China	1.271.056,28
Argentina	1.155.852,48
África do Sul	625.569,40
Índia	98.632,32
País não informado	7.285.812,80

Fonte: dados enviados à Anvisa pelas empresas registrantes.

Segundo a Monografia do 2,4 D na Anvisa, esse ingrediente ativo está autorizado para aplicação em pré e pós-emergência das plantas infestantes nas culturas de arroz, aveia, café, cana-de-açúcar, centeio, cevada, milho, pastagem, soja, sorgo e trigo. Até o momento estão formalmente permitidas as seguintes modalidades de aplicação de 2,4-D: aérea e terrestre (costal e tratorizada). Na Memória da Reunião da Reavaliação Toxicológica do Ingrediente Ativo 2,4-D, realizada em 18 de julho de 2006, consta que ficou decidido que a Anvisa excluiria a aplicação costal para as formulações de 2,4-D e que o SINDAG (hoje SINDIVEG) poderia apresentar uma avaliação de risco de

exposição ocupacional para demonstrar a segurança dessa modalidade de aplicação, não caracterizada como segura (Anvisa, 2006). No entanto, conforme verificado no Agrofít, atualmente ainda existem produtos à base de 2,4-D com aplicação costal autorizada, não havendo uniformidade dessa medida para todos os produtos à base desse ingrediente ativo registrados no Brasil. Esses aspectos e os demais definidos na Memória de Reavaliação de 2006 deverão ser revistos e detalhadamente abordados em momento posterior à Consulta Pública deste parecer de reavaliação, durante a avaliação do risco ocupacional do 2,4-D, de forma que as medidas decorrentes dessa análise sejam devidamente publicadas em Diário Oficial da União, conforme prevê o Decreto 4.074/2002.

Vale ressaltar que em 05 de março de 2015 a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) deferiu a liberação comercial de milho geneticamente modificado com tolerância ao herbicida 2,4-D (Brasil, 2015).

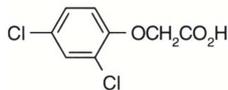
Conforme literatura publicada, há diversos substitutos disponíveis para o 2,4-D (Silveira e Antoniosi Filho, 2013). Entretanto, uma análise mais aprofundada dos possíveis substitutos do 2,4-D cabe ao MAPA.

II – ANÁLISE

1 IDENTIDADE QUÍMICA E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO 2,4-D

O 2,4-D é um herbicida cuja identidade química e propriedades físico-químicas estão descritas nos quadros 2 e 3, respectivamente.

Quadro 2. Identidade química do 2,4-D.

Características	Informações
Nome Comum ¹	2,4-D
Nome Químico ¹	ácido 2,4-diclorofenoxiacético
Grupo Químico ¹	ácido ariloxialcanóico
Número CAS ¹	94-75-7
Fórmula Molecular ¹	C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃
Peso Molecular ²	221,0 u
Fórmula Estrutural ¹	
Estado Físico ³	pó cristalino fino
Cor ³	Branca
Odor ³	sem odor

Fonte: 1. Monografia Anvisa D27; 2. PMRA, 2007; 3. EFSA, 2014b.

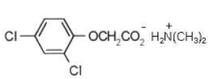
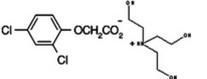
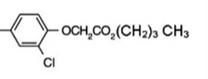
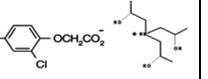
Quadro 3. Propriedades físico-químicas do 2,4-D.

Propriedade	Informações	Interpretação
Pressão de Vapor a 25°C	1,87x10 ⁻² mPa	Baixo potencial de volatilização.
Espectro Ultravioleta (UV) / Visível	Não mostra absorção UV significativa em 300 nm.	Baixo potencial de fototransformação.
Solubilidade em água a 25°C	569 mg/L	Bastante solúvel.
Coefficiente de partição octanol-água (log K _{ow}) a 25°C em pH 5	0,04-0,33	Bioacumulação improvável.
Constante de Dissociação (pKa)	2,8	Dissocia-se rapidamente a ânion em níveis de pH ambientais.

Fonte: PMRA, 2007.

Conforme especificado no quadro 4, além do 2,4-D ácido, há outras formas desse ingrediente ativo presentes na Monografia D27 da Anvisa: sais e ésteres. Vale ressaltar que, no momento, não há produtos registrados no Brasil à base de éster butílico do 2,4-D (2,4-DB). Todos os registros desta forma foram cancelados. Conforme citado anteriormente no item 3.1 da parte I deste parecer, suspeita-se que as formas de éster altamente voláteis do 2,4-D proporcionam risco inaceitável para o meio ambiente.

Quadro 4. Outras formas de 2,4-D presentes na monografia deste ingrediente ativo da Anvisa (D27).

Item da Monografia	D27.1	D27.2	D27.3	D27.4
Nome Comum	2,4-D-dimetilamina	2,4-D-trietanolamina	2,4-D-butílico	2,4-D-triisopropanolamina
Nome Químico	(2,4-diclorofenoxi) acetato de dimetilamônio	(2,4-diclorofenoxi) acetato de trietanolamina	(2,4-diclorofenoxi) acetato de butila	(2,4-diclorofenoxi) de triisopropanolamina
Número CAS	2008-39-1	2569-01-9	94-80-4	32341-80-3
Fórmula Molecular	C ₁₀ H ₁₃ Cl ₂ NO ₃	C ₁₄ H ₂₁ Cl ₂ NO ₆	C ₁₂ H ₁₄ Cl ₂ O ₃	C ₁₇ H ₂₇ Cl ₂ NO ₆
Fórmula Estrutural				
Sinonímia	2,4-D amina; sal de dimetilamina do 2,4-D	2,4-D-trolamina; sal de trietanolamina do 2,4-D	Éster butílico do 2,4-D; 2,4-DB	Sal de triisopropanolamina do 2,4-D

Sabe-se que após exposição humana a sais e ésteres de 2,4-D, esses sofrem rápida hidrólise ácida ou enzimática *in vivo* para produzir 2,4-D ácido e também que esses sais e ésteres de 2,4-D são hidrolisados a ácido em condições ambientais (IARC,



2015). Inclusive, o JMPR realizou amplas revisões do 2,4-D em 1996 e concluiu que a toxicidade dos sais e ésteres de 2,4-D era comparável àquela do ácido (APVMA, 2003). Por isso, este parecer de análise tratará especificamente da toxicidade do 2,4-D ácido.

2 IMPUREZAS, PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO E RESÍDUOS POTENCIALMENTE RELEVANTES DO 2,4-D

2.1 BASE LEGAL

Na Monografia do 2,4-D constam como contaminantes de importância toxicológica para esse ingrediente ativo as “dioxinas totais”, no limite máximo de 0,01 ppm.

A Instrução Normativa Conjunta (INC) nº 02, de 20 de junho de 2008, do MAPA (Secretaria de Defesa Agropecuária), da Anvisa e do Ibama, estabeleceu como impurezas toxicológica e ambientalmente relevantes dos produtos técnicos à base de 2,4-D a “2,3,7,8- tetraclorodibenzo-p-dioxina” (2,3,7,8 TCDD ou apenas TCDD) e os fenóis livres. Foram definidos os limites máximos toleráveis de 0,00001 g/kg (=0,01 ppm) de 2,3,7,8 TCDD e 3g/kg de fenóis livres, com base em valores estabelecidos internacionalmente pela FAO, Austrália e Holanda (BRASIL, 2008). Os fenóis livres são calculados como 2,4-diclorofenol (2,4-DCP). A 2,3,7,8 TCDD deve também ser controlada no pós-registro, em cada batelada ou lote produzido ou importado.

Verifica-se, portanto, que há inconsistências entre as impurezas definidas na Monografia do 2,4-D da Anvisa e na INC 02, de 2008, de forma que, mantendo-se o registro do 2,4-D no país, ambas deverão ser atualizadas, de forma a conter as mesmas informações. Essas questões serão descritas mais detalhadamente no subitem 2.5.

2.2 IMPUREZAS DO PROCESSO DE SÍNTESE

O 2,4-DCP é um intermediário chave na fabricação do 2,4-D e a sua pureza tem uma forte correlação com a pureza do 2,4-D produzido a partir dele (USEPA, 2005). Na fabricação de 2,4-DCP, múltiplas posições ao redor da estrutura do anel fenólico podem ser cloradas. Os carbonos 2 e 4 do anel fenólico são as posições alvo para cloração, mas a reação pode produzir pequenas quantidades de compostos clorados em

posições diferentes, incluindo, por exemplo, o 2,4,5-triclorofenol, que é precursor da 2,3,7,8-TCDD. A fabricação do intermediário 2,4-DCP foi otimizada pelo controle das condições do processo de síntese necessárias para a reação de cloração das posições 2 e 4 do carbono, de forma a limitar a formação de impurezas que possam levar à formação de dioxinas. O controle da temperatura e do tempo da reação de cloração, a adição programada do agente clorante e a eficiência da agitação no tanque de reação são fatores do processo que contribuem para a pureza do 2,4-DCP (USEPA, 2005). O controle da temperatura também previne a autocondensação de clorofenóis para a formação de dioxinas.

A TCDD não possui aplicações comerciais conhecidas; era um contaminante dos herbicidas clorofenóxi, incluindo o 2,4,5-T, que foram amplamente utilizados nos anos 1960 e 1970 para controlar ervas daninhas e como desfolhantes durante a Guerra do Vietnã (IARC, 2012). A conscientização pública da presença de dioxinas no Agente Laranja, uma mistura 1:1 de 2,4-D e 2,4,5-T, foi um fator importante que forçou o exército americano a parar de pulverizar o Vietnã com o Agente Laranja em 1970 (Hardell, 2008). A TCDD, além de ser contaminante dos herbicidas clorofenóxi, também pode ser produzida em processos térmicos como a incineração, no processamento de metais e no branqueamento da pasta de papel com cloro. Com exclusão das exposições ocupacionais ou acidentais, a principal exposição humana à TCDD resulta da ingestão de carne, leite, ovos, peixe e produtos relacionados, já que a TCDD é persistente no meio-ambiente e se acumula na gordura animal (IARC, 2012). A IARC esclarece que os níveis de TCDD em tecidos humanos diminuíram de 3 a 5 vezes desde o final dos anos 1970 e que, embora a fabricação e o uso de compostos clorados como clorofenóis e herbicidas clorofenóxi tenham sido importantes fontes de liberação de dibenzo-p-dioxinas policloradas (PCDDs) no meio ambiente no passado, a fabricação restrita de diversos desses compostos reduziu substancialmente sua contribuição para a poluição ambiental. Hoje se sabe que os processos de incineração (lixo municipal, lixo hospitalar, resíduo perigoso, lodo de esgoto) e combustão (fornos de cimento, combustão de lenha, veículos a diesel, crematórios) são as fontes mais importantes de liberação de PCDDs no meio ambiente (IARC, 2012).

Vale citar que, pelo fato das diversas dibenzo p-dioxinas policloradas, dibenzofuranos policlorados e bifenilas policloradas apresentarem diferentes níveis de



atividade, a exposição humana aos compostos de dioxina é geralmente calculada em termos de quocientes de equivalência tóxica (*Toxic Equivalence Quotient* - TEQ). Em cada amostra, os níveis de congêneres individuais detectados são multiplicados por um fator de equivalência tóxica (*Toxicity Equivalence Factor* - TEF) apropriado e esses valores normalizados são somados. Os TEFs foram estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde e são calculados em relação à 2,3,7,8-TCDD (van den Berg *et al.*, 2006).

Holt e colaboradores (2010) e Liu e colaboradores (2013) relatam a nítida ausência de informações públicas disponíveis sobre os níveis atuais de dibenzo p-dioxinas policloradas e dibenzofuranos policlorados (PCDD/Fs) em agrotóxicos, mesmo naqueles utilizados em grandes volumes, como o 2,4-D. Devido à ausência de dados analíticos mais recentes, a liberação de PCDD/Fs a partir do uso de 2,4-D não é estimada nos Estados Unidos desde 1995, mesmo a USEPA tendo julgado o 2,4-D como o único produto com potencial de liberação ambiental de PCDD/Fs por meio do uso agrícola e seu uso ter representado a segunda fonte mais importante de dioxinas no solo nos Estados Unidos em 1995 (Holt *et al.*, 2010).

Durante a produção de agrotóxicos, a formação de impurezas PCDD/F ocorre a partir de substâncias químicas precursoras, que se originam: (a) de materiais de partida usados na produção de agrotóxicos, (b) de intermediários de subprodutos formados durante o processo de produção ou (c) do próprio ingrediente ativo (Holt *et al.*, 2012). Entre os precursores de PCDD/F estão o pentaclorofenol, outros clorofenóis como o 2,4,6-triclorofenol (2,4,6-TCP) e representantes dos herbicidas fenóxi (2,4,5-T), clorobenzenos, fenoxifenóis policlorados e éteres difenílicos policlorados. A formação de PCDD/Fs na presença de tais precursores é geralmente favorecida em condições alcalinas, calor (150 – 600 °C), em temperaturas mais baixas na presença de catalisadores (como exemplo, cobre, ferro, sais de alumínio) ou radicais, bem como durante a irradiação com UV (Holt *et al.*, 2012).

Para agrotóxicos que sabidamente têm potencial de conter impurezas PCDD/Fs, como o 2,4-D, esperava-se que melhorias nas tecnologias e práticas de produção que ocorrem desde os anos 1990 minimizassem ou prevenissem a contaminação dos produtos atuais (Holt *et al.*; 2010), o que foi de fato verificado em um estudo japonês realizado por Masunaga e colaboradores (2001), que demonstrou uma diminuição dos

níveis de PCDD/Fs em agrotóxicos à base de 2,4-D ao longo dos anos. No entanto, na avaliação de diversas classes de produtos formulados e ingredientes ativos utilizados na Austrália, entre eles diferentes herbicidas fenóxi, Holt e colaboradores (2010) encontraram PCDD/Fs em todos os agrotóxicos atualmente em uso (entre eles o 2,4-D e o 2,4-DB), bem como nos agrotóxicos obsoletos analisados (o 2,4,5-T), variando de níveis relativamente baixos a altos. Conforme esperado, os maiores níveis de PCDD/Fs foram encontrados nas formulações obsoletas contendo 2,4,5-T/2,4-D, mas essas impurezas também foram encontrados em agrotóxicos atualmente utilizados que contêm o ingrediente ativo 2,4-D. Nas formulações de 2,4-D fabricadas em 2005 e 2006 foram observados níveis de PCDD/Fs comparáveis às daquelas fabricadas há 10-20 anos, o que indica que as medidas para evitar a presença de impurezas PCDD/F não foram adotadas de forma efetiva ou em todas as plantas de produção (Holt *et al.*, 2010). Apesar disso, os agrotóxicos à base de 2,4-D ocupam o 6º lugar em liberação de dioxinas entre os agrotóxicos atualmente em uso. Cabe ressaltar que os níveis de impurezas PCDD/Fs podem variar marcadamente entre os agrotóxicos, o que indica que as medidas para o controle da formação dessas impurezas durante a produção desses pode diferir entre plantas produtivas, anos, lotes e ingredientes ativos (Holt *et al.*, 2010).

Liu e colaboradores (2013) avaliaram duas amostras de 2,4-D ácido e encontraram concentrações totais de 2,3,7,8-PCDD/Fs similares às obtidas por Holt *et al.* (2010). A diferença significativa encontrada nas concentrações de PCDD/Fs entre as duas amostras de 2,4-D analisadas por Liu e colaboradores (2013) pode ser uma consequência dos diferentes processos de produção e matérias-primas utilizados. No processo de produção de 2,4-D ácido via 2,4-DCP, o fenol é primeiramente clorado a 2,4-DCP, processo que leva à formação de altas concentrações de 2,4-DCP e de outros policlorofenóis. Diferentemente, no processo de produção de 2,4-D ácido via ácido fenoxiacético, concentrações relativamente baixas de 2,4-DCP e de outros policlorofenóis são geradas. Assim, é possível minimizar a formação de PCDD/F durante a produção de agrotóxicos por meio do uso de componentes alternativos ou condições de produção estáveis e cuidadosamente controladas (Holt *et al.*, 2012).

Holt e colaboradores (2010) ressaltam que, embora seu estudo tenha se focado na Austrália, a maioria dos ingredientes ativos analisados era importada, o que os leva a acreditar que estes contribuam para a liberação do PCDD/Fs em outros países



também. Adicionalmente, alertam que os resultados de seu estudo mostram que não se deve esperar que as melhorias gerais nas tecnologias de produção de agrotóxicos previnam a contaminação dos produtos em todas as instalações de produção e em todos os anos, e nem que resultem em liberações insignificantes de PCDD/Fs, a menos que isso seja confirmado pelo monitoramento analítico frequente e continuado. Apesar disso, diversos países não possuem limites regulatórios para impurezas PCDD/Fs em agrotóxicos, e por isso o monitoramento regulatório não é realizado (Holt *et al.*, 2010). Os autores acreditam que grandes volumes de formulações contaminadas, ainda que com níveis relativamente baixos de PCDD/Fs, podem resultar na liberação significativa de PCDD/Fs no ambiente e que o monitoramento e o relato frequentes devem fornecer um melhor entendimento do significado global desta fonte negligenciada e facilitar a futura redução e eliminação de PCDD/Fs sob a Convenção de Estocolmo.

Conforme já mencionado anteriormente, no Brasil o limite máximo tolerável de 2,3,7,8-TCDD em produtos técnicos à base de 2,4-D definido pela INC 02, de 2008, e constante na monografia deste ingrediente ativo é de 0,00001 g/kg (ou seja, 0,01 mg/kg - ppm; ou 10 µg/kg - ppb ou 10.000 ng/kg). Esse valor é superior aos encontrados nos estudos recentes acima mencionados, o que gera menor preocupação em relação a esses contaminantes.

Ainda, a IARC relata que estudos ocupacionais de exposição mostraram que os maiores níveis de TCDD ocorreram em trabalhadores que fabricavam herbicidas fenóxi e clorofenóis no passado, enquanto a exposição de aplicadores desses compostos foi consideravelmente menor e aumentou apenas após diversos anos de aplicação desses produtos contaminados com TCDD, sendo improvável que a aplicação ocasional leve a aumentos mensuráveis nos níveis de TCDD (IARC, 2012).

Inclusive, após a publicação da INC 02, de 2008, que estabeleceu a necessidade de controle da impureza 2,3,7,8 TCDD no pós-registro, em cada batelada ou lote de produto técnico à base de 2,4-D produzido ou importado, as empresas registrantes de 2,4-D protocolaram junto ao MAPA uma proposta de controle pós-registro de impurezas toxicologicamente relevantes em 2,4-D. Elas solicitaram que, em vez do controle de 2,3,7,8 TCDD ser realizado em cada lote, os relatórios de impurezas fossem trimestrais, baseados em uma amostra única composta e representativa e entregues no trimestre subsequente (CTA, 2015).



Essa proposta foi avaliada pelo Grupo de Trabalho Interministerial (GT) de Impurezas Relevantes, composto por representantes da Anvisa, MAPA e Ibama. O GT concluiu que as informações técnicas das empresas sobre os controles do processo de produção não conseguiram comprovar a necessidade dos relatórios de impurezas dos produtos técnicos à base de 2,4-D serem trimestrais, baseados em uma amostra única composta e representativa, e entregues no trimestre subsequente. Essa conclusão foi apresentada ao Comitê Técnico de Assessoramento para Agrotóxicos (CTA) e aos representantes das empresas registrantes na 7ª Reunião Ordinária do CTA, realizada em 01 julho 2015 na sede da Anvisa. O CTA decidiu que as exigências da INC 02, de 2008, devriam ser mantidas (CTA, 2015).

2.3 METABÓLITOS DECORRENTES DA DEGRADAÇÃO

2.3.1 Durante o armazenamento

Os níveis de 2,4-DCP presentes em produtos técnicos à base de 2,4-D são muito baixos e posteriormente diluídos nos produtos formulados (PMRA, 2007). Segundo a agência canadense (PMRA, 2007), com base no conhecimento das reações químicas, é improvável que o 2,4-D se degrade em 2,4-DCP durante o armazenamento em temperatura ambiente.

2.3.2 No Ambiente

No solo, em condições aeróbicas, a degradação do 2,4-D resulta na formação de um metabólito principal, o 2,4-dicloroanisol (2,4-DCA), e do 2,4-DCP, metabólito secundário não-transitório, que possuem persistência baixa a moderada no solo (EFSA, 2014b). O 2,4-DCP pode ser adsorvido mais fortemente ao solo (Boivin *et al.*, 2005). Em condições anaeróbicas os dois principais metabólitos formados a partir do 2,4-D são o 2,4-DCP e o 4-clorofenol (4-CP) (EFSA, 2014b). O 2,4-DCP é um metabólito transitório em ambientes aquáticos (PMRA, 2007).

De acordo com Holt e colaboradores (2012), as condições que favorecem a formação de PCDD/Fs a partir de precursores durante a produção de agrotóxicos também

estão presentes no meio ambiente, como altas temperaturas durante incêndios, superfícies catalíticas ativas contendo ferro como barro/argila, solos alcalinos e, mais comumente, radiação UV. Isso significa que pode haver geração de PCDD/Fs a partir de precursores que não tenham reagido durante a produção de agrotóxicos e permaneceram no produto como impureza ou como o próprio ingrediente ativo (Holt *et al.*, 2012). Como exemplo, Holt e colaboradores (2012) expuseram três diferentes formulações contendo o ingrediente ativo 2,4-D que sabidamente continham impurezas PCDD/F à luz solar natural em tubos de quartzo selados e verificaram que as concentrações de PCDD/F aumentaram cerca de 3000% após 96 minutos; entretanto, não houve alterações nítidas nos níveis de equivalentes tóxicos em relação ao início do experimento e em relação aos controles escuros, devido à formação de PCDD/Fs não-2,3,7,8. O aumento na produção de PPCDD/Fs quando o 2,4-D foi exposto à luz solar foi amplamente influenciado pela formação de 2,4,6,8-TCDF, congênere também dominante na formulação de 2,4-D não exposta e que aumentou de 29% a 93% ao longo da duração da exposição à luz solar (Holt *et al.*, 2012).

Outros congêneres também aumentaram consideravelmente durante a exposição do 2,4-D à luz solar, incluindo 1,3,6,8-TCDD; 1,2,3,6,8-PnCDD e 1,3,6,8-TCDF; entretanto, a contribuição deles para as concentrações totais de PCDD/F foi relativamente baixa (<4%). Alguma degradação de PCDD/Fs também foi evidente durante a exposição do 2,4-D à luz solar. O 2,4,6,8-TCDF foi formado principalmente durante os primeiros 30 minutos da exposição à luz solar, mas, quando o experimento foi prolongado, não foi observado aumento adicional dessa impureza. Isso indica que os pré-furanos já estavam presentes na formulação como uma impureza do processo de produção e foram amplamente convertidos nos primeiros 30 minutos (Holt *et al.*, 2012) e não formados a partir do 2,4-D, já que este estava presente em abundância, o que levaria a um aumento contínuo do 2,4,6,8-TCDF durante todo o período de exposição do estudo (Holt *et al.*, 2012).

Outros congêneres incluindo 1,3,6,8-TCDD e 1,3,6,8-TCDF (o segundo maior produto de formação de PCDD/Fs observado) são formados durante a exposição do 2,4-D à luz solar em níveis continuamente aumentados ao longo do tempo, mas em menores níveis em comparação ao 2,4,6,8-TCDF (Holt *et al.*, 2012). Esses autores salientam que o solo e outras matrizes ambientais (sedimentos/vegetação/biota) em que

foram usados agrotóxicos, além dos locais de fabricação e de eliminação de seus resíduos, podem apresentar concentrações elevadas (ppm–ppb) de precursores de PCDD/Fs e, portanto, pode haver uma formação substancial de PCDD/Fs quando as formulações de agrotóxicos atualmente utilizadas (contendo precursores de PCDD/Fs) são expostas à luz solar.

2.3.3 Em Seres Humanos, Animais de Experimentação e de Produção

A PMRA (2007) concluiu que o 2,4-DCP não é um metabólito de humanos ou de ratos. No entanto, há autores que, após a administração de 2,4-D, encontraram o metabólito 2,4-DCP no rim de ratos (Aydin *et al.*, 2005), no fígado e leite de cabras e no fígado e ovos de galinhas (Barnekow *et al.*, 2001).

Além disso, Barnekow e colaboradores (2001) demonstraram que o destino do [14C]-2,4-D administrado por via oral a galinhas poedeiras e cabras leiteiras resultou na conjugação ou no metabolismo em [14C]-2,4-DCP, demonstrando que pode haver exposição de humanos por meio da alimentação.

Conforme já descrito anteriormente, a principal exposição humana à TCDD ocorre como resultado da ingestão de carne, leite, ovos, peixe e produtos relacionados, já que a TCDD é persistente no ambiente e acumula na gordura animal (IARC, 2012).

2.4 TOXICIDADE DAS IMPUREZAS POTENCIALMENTE RELEVANTES

2.4.1 Toxicidade do 2,4-DCP

A agência canadense considera que os dados de toxicidade do 2,4-DCP indicam que ele é menos tóxico que o 2,4-D (PMRA, 2007). Em 1999 a IARC concluiu que as evidências para o 2,4-DCP sugerem ausência de carcinogenicidade em animais de experimentação. A EFSA, em 2014, informou que, com base em alguns resultados positivos para a avaliação de genotoxicidade *in vitro* e em resultados ambíguos de carcinogenicidade em camundongos machos, não se pode concluir sobre os potenciais genotóxico e carcinogênico do 2,4-DCP.



Conforme avaliado pela EFSA (2014b), em ratos o 2,4-DCP causou embriotoxicidade (redução da sobrevivência intrauterina, do peso fetal e da ossificação), mas não teratogenicidade, apenas em doses materno tóxicas (mortalidade e redução no ganho de peso), tendo sido estabelecido um Nível de Efeito Adverso Não Observado (*No Observed Adverse Effect Level* – NOAEL) materno de 200 mg/kg/dia e um NOAEL para o desenvolvimento de 375 mg/kg/dia, bastante superiores aos do 2,4-D que, conforme mostra o quadro 19 (item 7.1 da parte II) deste parecer, são de 25 mg/kg/dia.

A agência canadense considera que, como a avaliação do risco humano é baseada no 2,4-D, ela é inerentemente protetora para metabólitos menos tóxicos, como o 2,4-DCP (PMRA, 2007).

2.4.2 Toxicidade das Dioxinas

Em 2012, a IARC considerou que existe evidência suficiente de carcinogenicidade em humanos e em animais de experimentação para a 2,3,7,8-TCDD (IARC, 2012). A evidência mais forte em humanos é para a combinação de todos os cânceres, mas também foi observada uma associação positiva entre a exposição à 2,3,7,8-TCDD e o sarcoma de partes moles, linfoma não-Hodgkin e câncer de pulmão. Em ratos e camundongos, a TCDD produziu tumores em ambos sexos e em múltiplos órgãos e tecidos, conforme descrito detalhadamente na monografia da IARC. A IARC considerou também que existe evidência suficiente em animais de experimentação sobre a carcinogenicidade do 2,3,4,7,8-PeCDF e da 3,3',4,4',5-PCB .

Existe forte evidência de que o mecanismo da carcinogênese associada à 2,3,7,8-TCDD em humanos é mediado por receptor: o mecanismo primário é a promoção do desenvolvimento tumoral por meio da modificação da replicação celular e apoptose e o mecanismo secundário está relacionado a aumentos do estresse oxidativo, causando dano ao DNA (IARC, 2012). O fato da expressão do receptor de hidrocarboneto aromático (Aryl Hydrocarbon Receptor - AhR) e das vias de sinalização e respostas relacionadas a ele ocorrerem em diferentes espécies, incluindo a humana, fornece peso adicional à ideia de que este mecanismo de ação é plausível em humanos. Existe forte evidência de que os mecanismos de carcinogênese associados ao 2,3,4,7,8-PeCDF e à 3,3',4,4',5-PCB em humanos também são mediados por receptor, com base na evidência

de carcinogenicidade em animais de experimentação e na vasta evidência que mostra atividade idêntica à da 2,3,7,8-TCDD para cada passo do mecanismo de carcinogênese associada à TCDD descrito em humanos, incluindo a ligação ao receptor, a expressão gênica, alterações na atividade de proteínas, replicação celular, estresse oxidativo, promoção em estudos de iniciação-promoção e carcinogênese completa em animais de laboratório. Desse modo, a IARC concluiu que a 2,3,7,8-TCDD, o 2,3,4,7,8-PeCDF e a 3,3',4,4',5-PCB são carcinogênicos para humanos (Grupo 1).

A TCDD não é diretamente genotóxica e sua atividade tumorigênica é provavelmente devida a uma meia-vida razoavelmente longa, principalmente em humanos, o que resulta na ativação contínua do AhR. A meia-vida da TCDD no corpo humano é estimada em 7,2 anos; ela também possui uma longa meia-vida no meio-ambiente e a capacidade de bioacumular na cadeia alimentar (IARC, 1997). A TCDD pode induzir estresse oxidativo prolongado e consequente dano ao DNA e mutações. A TCDD é um carcinógeno completo em diversas linhagens de ratos e camundongos e, portanto, pode tanto promover como iniciar a carcinogênese por mecanismos indiretos de estresse oxidativo, o que leva alguns a referirem-se à dioxina como um ativador da carcinogênese e adotarem modelos de iniciação-promoção para melhor explicar a toxicidade da TCDD e melhor se adequar aos dados pré-neoplásicos e neoplásicos.

As 17 dibenzodioxinas policloradas lateralmente substituídas (2,3,7,8-substituídos), as bifenilas policloradas coplanares e os 17 dibenzofuranos policlorados lateralmente substituídos são todos hidrocarbonetos aromáticos halogenados estrutural- e toxicologicamente inter-relacionados conhecidos como compostos de dioxina (IARC, 2012). Eles potencialmente induzem respostas pleiotrópicas em células muito similares às aquelas induzidas pela TCDD, já que são capazes de se ligar ao AhR. No entanto, a afinidade de ligação difere entre os compostos de dioxina, com alguns deles apresentando uma afinidade de ligação tão baixa que quase não existem informações sobre seu impacto biológico. A IARC foca-se em 28 compostos de dioxina que produzem respostas similares à TCDD em linhagens celulares humanas, em células primárias humanas e animais e em tecidos animais e humanos. Apenas esses 28 compostos, apresentados na tabela 5, possuem valores de TEF superiores a zero (IARC, 2012), conforme estabelecido pela OMS (van den Berg *et al.*, 2006).

Diferentemente da IARC, a EFSA, apesar de também se basear nos valores de TEF definidos pela OMS, considera como dioxinas apenas a soma de dibenzo p-dioxinas policloradas e dibenzofuranos policlorados (17 compostos), sem incluir as bifenilas policloradas (EU, 2015), conforme demonstrado na tabela 5.

Tabela 5. Compostos de dioxina e seus respectivos fatores de equivalência tóxica (TEF) definidos pela Organização Mundial da Saúde.

Composto	TEF (OMS, 2005)	IARC (2012)	EFSA (EU, 2015)
<i>Dibenzo p-dioxinas policloradas</i>			
2,3,7,8-TCDD	1	x	x
1,2,3,7,8-PeCDD	1	x	x
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	x	x
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	x	x
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	x	x
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	x	x
OCDD	0,0003	x	x
<i>Dibenzofuranos policlorados</i>			
2,3,7,8-TCDF	0,1	x	x
1,2,3,7,8-PeCDF	0,03	x	x
2,3,4,7,8-PeCDF	0,3	x	x
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	x	x
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	x	x
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	x	x
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	x	x
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	x	x
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01	x	x
OCDF	0,0003	x	x
<i>Bifenilas policloradas</i>			
PCB 77	0,0001	x	
PCB 81	0,0003	x	
PCB 126	0,1	x	
PCB 169	0,03	x	
PCB 105	0,0003	x	
PCB 114	0,0003	x	
PCB 118	0,0003	x	
PCB 123	0,0003	x	
PCB 156	0,0003	x	
PCB 157	0,0003	x	
PCB 167	0,0003	x	
PCB 189	0,0003	x	

2.5 CONCLUSÕES SOBRE O CONTROLE DE IMPUREZAS POTENCIALMENTE RELEVANTES DO 2,4-D

A Anvisa verificou que há algumas inconsistências na indicação das impurezas relevantes pela Monografia do 2,4-D e pela INC 02, de 2008. Na Monografia

do 2,4-D constam como contaminantes de importância toxicológica para este ingrediente ativo as dioxinas totais (limite máximo de 0,01 ppm), enquanto na INC 02, de 2008, constam a 2,3,7,8 TCDD (limite máximo de 0,01 ppm) e os fenóis livres (limite máximo de 3g/kg, calculados como 2,4-DCP). Portanto, mantendo-se o 2,4-D no país, será necessário atualizar sua Monografia de forma a incluir os fenóis livres, conforme determinado pela INC 02, de 2008, e também esclarecer a definição de “dioxinas totais”.

Conforme mencionado no item 2.2, pelo fato das diversas dibenzo p-dioxinas policloradas, dibenzofuranos policlorados e bifenilas policloradas apresentarem diferentes níveis de atividade, a exposição humana aos compostos de dioxina é atualmente calculada em termos de quocientes de equivalência tóxica (TEQs), estabelecidos pela OMS. Diferentemente da IARC, a EFSA, apesar de também se basear nos valores de TEF definidos pela OMS, considera como dioxinas apenas a soma de dibenzo p-dioxinas policloradas e dibenzofuranos policlorados (17 compostos), sem incluir as bifenilas policloradas (EU, 2015). Verifica-se, portanto, que essa questão deve ser discutida pelo CTA, de forma que a definição de “dioxinas totais” para o 2,4-D seja definida em conjunto pelo MAPA (Secretaria de Defesa Agropecuária), Anvisa e Ibama, os três órgãos envolvidos na regulamentação de agrotóxicos no Brasil.

Em relação à periodicidade dos relatórios de impurezas dos produtos técnicos à base de 2,4-D, o CTA para Agrotóxicos decidiu recentemente que seria mantido o controle de impurezas toxicologicamente relevantes no pós-registro de produtos técnicos à base de 2,4-D em cada batelada ou lote produzido ou importado. Os encaminhamentos relativos a essa discussão continuarão a ser tratados pelo CTA. Se as empresas registrantes conseguirem comprovar que não há risco na apresentação trimestral dos relatórios de impurezas, o CTA poderá, por exemplo, concluir pela necessidade de alteração da INC 02, de 2008.

3 TOXICOCINÉTICA DO 2,4-D

3.1 DADOS DE ESTUDOS REALIZADOS EM ANIMAIS



No quadro 5 foram incluídos os dados mais relevantes de dois estudos que avaliaram a toxicocinética do 2,4-D em ratos. Esses estudos, além de outros, também foram avaliados pela EFSA (2014b).

Resumidamente, Timchalk e colaboradores (1990) verificaram que o ^{14}C - 2,4-D foi rápida e quase que completamente absorvido e rapidamente excretado por ratos, principalmente pela urina e na forma inalterada. O pico plasmático foi atingido 4 horas após a dosagem e a maior parte da dose administrada foi excretada após 36 horas. As principais diferenças toxicocinéticas entre as duas doses utilizadas (1 e 100 mg/kg) foram a depuração plasmática e a excreção mais lentas do ^{14}C na maior dose. De qualquer forma, esses dados mostram que o 2,4-D não se acumula no organismo.

O estudo de Timchalk não demonstrou diferenças entre machos e fêmeas de ratos na toxicocinética do 2,4-D. No entanto, posteriormente, Marty e colaboradores (2010) verificaram que os níveis plasmáticos de 2,4-D em ratas foram muito superiores aos de machos que consumiram a mesma concentração de 2,4-D pela dieta. Além disso, nas fêmeas expostas às duas maiores doses e nos machos expostos à maior dose foram observados aumentos dos níveis plasmáticos de 2,4-D não proporcionais ao consumo do ingrediente ativo pelos animais. Esses resultados sugerem saturação da depuração renal e, portanto, comportamento toxicocinético não-linear a partir da dose aproximada de 20 mg/kg.



Quadro 5. Descrição de estudos toxicocinéticos relevantes em ratos realizados com o 2,4-D.

Animais	Doses, vias e períodos de exposição	Pureza	Resultados relevantes e que possam estar relacionadas ao tratamento	Referência																																																		
- Ratos (CDF Fischer 344) - 5/sexo/dose	Oral (gavagem; em óleo de milho): - 1 ou 100 mg/kg de ¹⁴ C -2,4-D: dose única - 1 mg/kg de 2,4-D sem radiomarcagem por 14 dias, seguido por dose única de ¹⁴ C-2,4-D no 15º dia Via intravenosa (veículo: salina): - 1 mg/kg de ¹⁴ C -2,4-D: dose única	99,5%	Vias oral e i.v.: - 85 a 94% excretados pela urina - 2 a 11% excretados pelas fezes - excreção rápida: maior parte em 36 horas Via oral: - ¹⁴ C -2,4-D rápida e quase completamente absorvido - pico plasmático (machos): 4h após a dosagem (1 ou 100 mg/kg) - meia-vida: aproximadamente 5h - 100 mg/kg: eliminação saturada durante as primeiras horas e, portanto, mais lenta em relação à dose de 1 mg/kg (toxicocinética não linear). - ¹⁴ C-2,4-D eliminado principalmente inalterado (> 97%) - 2 metabólitos identificados (possivelmente conjugados de 2,4-D, mais polares).	Timchalk <i>et al.</i> 1990																																																		
- Ratos CrI:CD (SD) - 5/sexo/dose	Dieta: - ♀ prenhes no DG 17: 100, 300 e 600 ppm (apenas uma amostra de sangue coletada às 9h da manhã) - Prole exposta desde a gestação e avaliada nos DPN 63 e 84: 100, 300 e 600 ppm (apenas ♀) ou 800 ppm (apenas ♂)	97,85% / 98,6%	Verificou-se que o aumento da dose sistêmica de 2,4-D não foi proporcional ao esperado com base no consumo do 2,4-D (vide texto destacado em cinza no quadro abaixo): <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th rowspan="2"></th> <th colspan="2">Dose</th> <th rowspan="2">Aumento da dose</th> <th>DG 17</th> <th>DPN 63</th> <th>DPN 84</th> </tr> <tr> <th>ppm</th> <th>mg/kg</th> <th colspan="3">Aumento da concentração plasmática</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="3">♀</td> <td>100</td> <td>7 a 8,4</td> <td>1X</td> <td>1X</td> <td>1X</td> <td>1X</td> </tr> <tr> <td>300</td> <td>21,3 a 26,1</td> <td>3X</td> <td>4X</td> <td>6X</td> <td>5X</td> </tr> <tr> <td>600</td> <td>42,6 a 49</td> <td>6X</td> <td>33X</td> <td>36X</td> <td>19X</td> </tr> <tr> <td rowspan="3">♂</td> <td>100</td> <td>5,9 a 7,8</td> <td>1</td> <td>-</td> <td>X</td> <td>1X</td> </tr> <tr> <td>300</td> <td>18,4 a 22,0</td> <td>3X</td> <td>-</td> <td>4X</td> <td>4X</td> </tr> <tr> <td>800</td> <td>49,4 a 59,6</td> <td>8X</td> <td>-</td> <td>16X</td> <td>15X</td> </tr> </tbody> </table> - 300 ppm (aproximadamente 20 mg/kg): dose no limite ou ligeiramente acima do limite da toxicocinética não-linear - ♀ apresentaram níveis plasmáticos de 2,4-D muito superiores aos dos machos que consumiram o mesmo nível de 2,4-D pela dieta		Dose		Aumento da dose	DG 17	DPN 63	DPN 84	ppm	mg/kg	Aumento da concentração plasmática			♀	100	7 a 8,4	1X	1X	1X	1X	300	21,3 a 26,1	3X	4X	6X	5X	600	42,6 a 49	6X	33X	36X	19X	♂	100	5,9 a 7,8	1	-	X	1X	300	18,4 a 22,0	3X	-	4X	4X	800	49,4 a 59,6	8X	-	16X	15X	Marty <i>et al.</i> , 2010
	Dose		Aumento da dose		DG 17	DPN 63		DPN 84																																														
	ppm	mg/kg		Aumento da concentração plasmática																																																		
♀	100	7 a 8,4	1X	1X	1X	1X																																																
	300	21,3 a 26,1	3X	4X	6X	5X																																																
	600	42,6 a 49	6X	33X	36X	19X																																																
♂	100	5,9 a 7,8	1	-	X	1X																																																
	300	18,4 a 22,0	3X	-	4X	4X																																																
	800	49,4 a 59,6	8X	-	16X	15X																																																

Legenda: DG= dia gestacional; DPN=dia pós-natal.

3.2 COMPARAÇÕES TOXICOCINÉTICAS ENTRE AS ESPÉCIES

A toxicocinética e o metabolismo do 2,4-D foram estudados em diversas espécies, incluindo camundongos, ratos, hamsters, coelhos, cães, porcos, gado, cabras, macacos e seres humanos, tendo sido demonstrado que a absorção, a distribuição e o metabolismo do 2,4-D e dos herbicidas fenóxi relacionados são razoavelmente consistentes entre as espécies: em geral, esses são rápida e quase que completamente absorvidos após administração oral e eliminados pela urina (Timchalk, 2004). O 2,4-D não se bioacumula e é rapidamente depurado do organismo (dentro de 48h), na sua forma inalterada (Burns *et al.*, 2001). Uma diferença importante dependente da espécie é a meia-vida plasmática mais longa observada em cães, que resulta de uma depuração renal mais lenta desses ácidos orgânicos e conseqüentemente em uma maior sensibilidade dessa espécie à toxicidade dos ácidos orgânicos (Timchalk, 2004), a qual será discutida mais detalhadamente no subitem 3.3.4.1 deste parecer de análise.

3.3 ETAPAS DA TOXICOCINÉTICA

A seguir serão descritos mais detalhadamente as etapas da toxicocinética do 2,4-D: absorção, distribuição, metabolismo ou biotransformação e excreção.

3.3.1 Absorção

3.3.1.1 Pele e mucosas

A absorção dérmica é considerada a principal via de exposição ocupacional a agrotóxicos (Moody *et al.*, 1990). Harris e Solomon (1992) observaram maiores níveis de exposição quando proprietários aplicaram o sal de dimetilamina do 2,4-D em seus gramados sem utilizar vestimenta de proteção, os quais foram associados a derramamentos do concentrado líquido ou contato excessivo das mãos e antebraços com a mistura diluída.

Conforme verificado por Moody e colaboradores (1990), a pele humana desprotegida da testa é bastante permeável aos herbicidas fenóxi ($58 \pm 22,6\%$ do 2,4-D amina dissolvido em água foi recuperado). Por outro lado, Feldman e Maibach (1974)

verificaram que, após a administração dérmica de 2,4-D ácido dissolvido em acetona no antebraço (pele lavada após 24 horas), apenas $5,8 \pm 2,4\%$ foram recuperados em 120h. Após aplicação no dorso da mão de homens voluntários (pele lavada após 6h), $4,46 \pm 0,84\%$ do 2,4-D ácido e $1,76 \pm 0,568\%$ do sal foram excretados (Harris e Solomon, 1992). Ross e colaboradores (2005), a partir de resultados de quatro estudos de absorção dérmica em humanos, encontraram um valor médio de absorção dérmica de 5,7% para o 2,4-D.

Esses dados mostram que o tipo de formulação usado, além da dose aplicada, podem afetar a penetração percutânea e resultar em diferentes meias-vidas de excreção do 2,4-D; o veículo também pode alterar a integridade da pele e influenciar a absorção (Harris e Solomon, 1992). Estudos experimentais em ratos e camundongos ou *in vitro* mostraram que a absorção do 2,4-D pela pele é aumentada pelo consumo de etanol e pela aplicação tópica de protetores solares e hidratantes (Brand *et al.*, 2007a; Brand *et al.*, 2007b; Pont *et al.*, 2003; Pont *et al.*; 2004).

3.3.1.2 Trato respiratório

Mustonen e colaboradores (1986) verificaram concentrações muito baixas de 2,4-D na zona respiratória de aplicadores de herbicidas fenóxi em comparação com as concentrações urinárias desses compostos, o que reforça que eles são absorvidos principalmente pela pele.

3.3.1.3 Trato digestório

Conforme demonstrado no estudo protocolado na Anvisa (Timchalk, 1990), na descrição de outros estudos pelas demais agências reguladoras (EFSA, 2014b) e em dados da literatura (Timchalk, 2004), o 2,4-D é rapidamente absorvido após administração oral a diversas espécies animais, inclusive a seres humanos voluntários.

3.3.2 Distribuição

Embora o 2,4-D seja bem distribuído pelo organismo, seu alto grau de ligação às proteínas plasmáticas (aproximadamente 97% da dose administrada) resulta

em um baixo volume aparente de distribuição (Timchalk, 2004). A distribuição do 2,4-D é similar entre as espécies, conforme verificado em estudos realizados com ratos e cabras (Timchalk, 2004).

Os principais órgãos alvo do 2,4-D são os olhos, a tireoide, os rins, as adrenais e os ovários/testículos (USEPA, 2005). Elo e Ylitalo (1977) verificaram um aumento da radioatividade no encéfalo e líquido cefalorraquidiano após a administração de [¹⁴C]-2,4-D, o que demonstra que o sistema nervoso central é também um importante alvo do 2,4-D.

3.3.3 Metabolismo

Em geral, o 2,4-D passa por metabolismo limitado, que envolve principalmente a conjugação de pequenas quantidades, excretadas pela urina (Timchalk, 2004). Griffin e colaboradores (1997) verificaram que em ratos, hamsters e camundongos, o 2,4-D foi o principal composto urinário eliminado. Também foram detectados, em menor quantidade, conjugados de glicina e taurina na urina de camundongos e hamsters, e de glicuronídeo em hamsters; não foram relatados metabólitos de 2,4-D no rato. Em cães que receberam 0,1 mg/kg, verificou-se que aproximadamente 80% da excreção urinária total foi de 2,4-D, com os 20% restantes de conjugados ácido-lábeis (Timchalk, 1994); enquanto que em cães que receberam uma dose mais alta (5 mg/kg), foram observados ao menos nove metabólitos do 2,4-D na urina, incluindo conjugados de taurina, serina, glicina, glicuronídeo, ácido glutâmico, sulfato e cisteína (Van Ravenzwaay *et al.*, 2003). Em humanos, aproximadamente 82% da dose foi depurada pela urina como 2,4-D, enquanto os conjugados representaram, aproximadamente, 13% da dose administrada (Sauerhoff *et al.*, 1977).

Após a administração de 2,4-D, o metabólito 2,4-DCP foi encontrado no rim de ratos (Aydin *et al.*, 2005), no fígado e leite de cabras e no fígado e ovos de galinhas (Barnekow *et al.*, 2001). Ainda, Mehmood e colaboradores (1996), em um estudo utilizando o citocromo P450 3A4 transfetado em leveduras, verificou o metabolismo de 2,4-D a 2,4-DCP; no entanto, essa biotransformação ainda não foi confirmada em seres humanos expostos ao 2,4-D.



3.3.4 Excreção

Algum tempo após a administração de 2,4-D, sua concentração renal supera os níveis plasmáticos, o que demonstra a importância dos rins como a via primária de eliminação desse ingrediente ativo (Timchalk, 2004). Timchalk (2004) cita que a meia-vida de eliminação plasmática do 2,4-D varia de 0,8 a 12 h em camundongos, ratos, porcos, gado e humanos, geralmente aumentando em função do peso corpóreo; sendo o cão uma exceção particularmente interessante, com uma meia-vida plasmática variando de 31 a 92–106 horas após doses orais de 1 ou 5 mg 2,4-D/kg de peso corpóreo, respectivamente. Após administração oral a seres humanos voluntários (homens) foi demonstrado que a ingestão oral de uma dose de 5 mg/kg de 2,4-D resultou em uma meia-vida variando de 1,7 a 4,2 h.

Sabe-se que a eliminação renal do 2,4-D é mediada por um transportador de ânions orgânicos saturável (*organic anion transporter* – OAT), o OAT1 (Saghir *et al.*, 2013); que está saturado em ratos após doses orais maiores ou iguais a 50 mg 2,4-D/kg de peso corpóreo, levando à toxicocinética não linear (Timchalk, 2004). Em um estudo mais recente realizado em ratos por Marty e colaboradores (2010), descrito anteriormente, foi evidenciado comportamento toxicocinético não-linear já na dose aproximada de 20 mg/kg de 2,4-D. Vale ressaltar que especialistas da USEPA, da academia, de indústrias e do Instituto Internacional de Ciências da Vida (*International Life Sciences Institute* – ILSI, uma organização não governamental) acreditam que, devido à saturação dos processos metabólicos, o uso de altas doses é irrelevante para a avaliação do risco (Carmichael *et al.*, 2006).

3.3.4.1 Diferenças na excreção do 2,4-D por cães

Três parâmetros de particular importância para a avaliação comparativa interespecie da toxicocinética do 2,4-D são o volume aparente de distribuição, a depuração renal e a meia-vida plasmática (Timchalk, 2004), no entanto, uma comparação dos valores absolutos desses parâmetros, sem considerar as diferenças fisiológicas entre as espécies, é limitada. Por isso, Timchalk (2004), em um trabalho financiado pela Força Tarefa 2,4-D, utilizou equações alométricas baseadas no peso corpóreo para fornecer uma avaliação mais significativa da toxicocinética comparativa

do 2,4-D e demonstrou que, embora os mecanismos de depuração renal de ácidos orgânicos sejam onipresentes em mamíferos, parece haver claras discrepâncias quantitativas entre as espécies. Uma diferença importante dependente da espécie é a meia-vida plasmática mais longa observada no cão, que resulta de uma depuração renal mais lenta desses ácidos orgânicos e leva a uma maior sensibilidade dessa espécie à toxicidade de ácidos orgânicos: o NOAEL/NOEL do cão após administração crônica desses herbicidas é de 5 a 26 vezes menor que o do rato.

A partir da verificação desta diferença de excreção nos cães em relação às demais espécies, Timchalk (2004) concluiu que as respostas toxicológicas observadas em cães são inapropriadas para extrapolação do risco para humanos, justificativa esta que já foi aceita pela USEPA e pela União Europeia. Portanto, a partir do estudo de Timchalk, essas agências alteraram o NOAEL utilizado para a avaliação do risco do 2,4-D do cão para o rato, uma espécie mais apropriada.

3.3.4.2 Diferenças sexuais na excreção do 2,4-D

O estudo mais antigo de Timchalk (1990) não havia demonstrado diferenças entre machos e fêmeas na toxicocinética do 2,4-D. No entanto, Griffin e colaboradores (1997) mostraram que existem significativas diferenças sexuais na depuração do 2,4-D por ratos e hamsters, consistentes com uma maior capacidade dos machos em depurar o 2,4-D em relação às fêmeas, o que sugere que em doses equivalentes, ratas são expostas a maiores concentrações de 2,4-D por um maior tempo que os machos e podem ser mais suscetíveis à toxicidade induzida pelo 2,4-D. Griffin e colaboradores (1997) verificaram que, em ratos, os níveis teciduais de 2,4-D são consistentemente mais altos em fêmeas do que em machos, resultado também observado por Marty e colaboradores (2010). Essa diferença entre os sexos não é devida ao metabolismo, já que ratos não excretam metabólitos de 2,4-D na urina ou nas fezes, e nem a diferenças na ligação do 2,4-D às proteínas plasmáticas ou na absorção, mas sim aos maiores níveis de expressão dos transportadores OAT1 por ratos machos adultos em relação às fêmeas adultas (Saghir *et al.*, 2013).

Além de ratos, Griffin e colaboradores (1997) também investigaram possível diferença de sexo na eliminação do 2,4-D em camundongos e hamsters e os resultados foram diferentes. Não foram observadas diferenças em camundongos e, em

hamsters, a depuração em machos foi mais lenta que em fêmeas. Esses resultados sugerem que o sexo pode influenciar a depuração do 2,4-D de maneira espécie-específica e, assim, existe uma possibilidade de que haja diferenças dependentes do sexo na depuração do 2,4-D por seres humanos. Atualmente há dados de toxicocinética disponíveis apenas para o sexo masculino (Griffin *et al.*, 1997).

A possibilidade de diferenças sexuais em humanos na eliminação do 2,4-D poderia trazer preocupações no momento da avaliação do risco deste ingrediente ativo para mulheres. No entanto, apesar de existir a possibilidade de haver diferenças dependentes do sexo na depuração do 2,4-D por seres humanos, Timchalk (2004) ressalta que seres humanos não apenas eliminam os fenóis mais rapidamente que os cães, mas também estão expostos ocupacionalmente a baixas doses deste ingrediente ativo (Munro *et al.*, 1992) e, por isso, a eliminação do 2,4-D em humanos está claramente dentro da faixa de toxicocinética linear.

4 TOXICIDADE AGUDA DO 2,4-D

O 2,4-D possui toxicidade mediana quando administrado de forma aguda por via oral, dérmica ou inalatória. Não apresenta potencial para causar irritação dérmica aguda ou sensibilidade cutânea. No entanto, produz severa irritação ocular aguda, o que o enquadra na classificação toxicológica I – Extremamente Tóxico, de acordo com a legislação vigente no Brasil (Brasil, 1992).

A classificação do 2,4-D está assim estabelecida:

- Toxicidade aguda oral (DL₅₀ oral): classe III (medianamente tóxico)
- Toxicidade aguda dérmica (DL₅₀ dérmica): classe III (medianamente tóxico)
- Toxicidade aguda inalatória (DL₅₀ inalatória): classe III (medianamente tóxico)
- Irritação ocular: classe I (extremamente tóxico)
- Irritação dérmica: classe IV (pouco tóxico)
- Sensibilização dérmica: não é sensibilizante dérmico

A exposição repetida ao 2,4-D em ratos produz eritema e descamação da epiderme nos estudos dérmicos e irritação do trato respiratório nos estudos inalatórios.

As agências americana, canadense e europeia (USEPA, 2005; PMRA, 2007; EFSA, 2014b) são consoantes quanto à toxicidade aguda baixa a moderada do 2,4-D.



5 TOXICIDADE SUBCRÔNICA E CRÔNICA DO 2,4-D

Foi realizada análise detalhada dos estudos subcrônicos e crônicos realizados com o 2,4-D em ratos, camundongos, cães e coelhos, cujos resultados mais relevantes ou que possam estar relacionados à exposição ao 2,4-D estão descritos sucintamente a seguir.

5.1 ESTUDOS SUBCRÔNICOS

No quadro 6 estão descritos os resultados dos estudos em que o 2,4-D foi administrado por via oral de forma subcrônica (13 semanas) em doses entre 1 e 300 mg/kg a ratos e camundongos (incorporado na dieta) e em doses entre 0,3 e 10 mg/kg a cães (cápsulas). Por último, foi incluído um estudo subcrônico de exposição dérmica subcrônica (21 dias) realizado em coelhos.

Conforme já descrito no item referente à toxicocinética, os principais órgãos alvo do 2,4-D são os olhos, tireoide, rins, adrenais e ovários/testículos; também sendo observada toxicidade hepática após a exposição ao 2,4-D. Dessa forma, os resultados serão descritos a seguir divididos por órgãos, sendo por fim incluídas outras alterações possivelmente relevantes ou relacionadas à exposição ao 2,4-D.

Não foi observada mortalidade associada ao tratamento subcrônico ou crônico com o 2,4-D em ratos e camundongos e os sinais clínicos restringiram-se à alopecia e postura encurvada nos ratos da dose de 300 mg/kg (mais alta). Por outro lado, a maior dose administrada a cães (10 mg/kg) causou a morte de alguns animais, o que confirma a maior sensibilidade dessa espécie, já discutida anteriormente.

Doses iguais e superiores a 100 mg/kg em roedores e a 3 mg/kg em cães levaram a reduções no ganho de peso e consumo alimentar.

5.1.1 Rins

Em 3 dos 4 estudos subcrônicos realizados com ratos, verificou-se aumento do peso relativo dos rins em doses iguais e superiores a 15 mg/kg, que a partir de 60 mg/kg estava associado a alterações macroscópicas (edema) e histopatológicas características da exposição ao 2,4-D (aumento da homogeneidade, alteração do padrão



de coloração e vacuolização citoplasmática epitelial dos túbulos contorcidos renais), muitas vezes de forma dose-dependente (Gorzinski, 1981a; Gorzinski, 1981b).

Entretanto, é importante observarmos que no único estudo que avaliou doses entre 1 e 15 mg/kg em ratos, foram observadas alterações histopatológicas a partir de 5 mg/kg (Serota, 1983a). Embora a EFSA tenha considerado essas alterações não relevantes para humanos (EFSA, 2014b), os diferentes estudos mostram que a toxicidade renal é de fato um efeito característico do 2,4D e, inclusive, o modo de ação para desenvolvimento dessa disfunção renal já foi sugerido.

Tayeb e colaboradores (2012) descreveram que a exposição oral de ratos à dose de 15 mg/kg de 2,4-D por 28 dias já foi suficiente para induzir peroxidação lipídica e diminuição de enzimas antioxidantes nos rins, eventos que desencadeiam disfunção renal. Assim, esses autores concluíram que a patogênese da falência renal induzida pelo 2,4-D ocorre via peroxidação lipídica e estresse oxidativo.

Em camundongos, foram verificados efeitos diferentes no peso relativo dos rins em machos e fêmeas: enquanto nas fêmeas o peso dos rins estava aumentado em relação aos controles (conforme também observado em ratos de ambos os sexos), nos machos este parâmetro estava diminuído (Serota, 1983b; Schulze, 1991b). Alterações histopatológicas renais já puderam ser observadas na dose de 15 mg/kg, verificando-se aumento na gravidade e incidência dessas alterações com o aumento da dose de 2,4-D (Serota, 1983b). No estudo de Schulze (1991b) o aumento do peso dos rins observado nas fêmeas não estava associado a alterações histopatológicas, mesmo em doses consideradas altas (100 e 300 mg/kg).

Em cães, as alterações histopatológicas renais já foram identificadas na dose de 3mg/kg e com 10 mg/kg essas estavam associadas ao aumento do peso relativo dos rins e à diminuição da gravidade específica da urina, que pode refletir a perda da habilidade do rim de concentrar a urina (Schulze, 1990b).

Em coelhos, foi observado aumento do peso relativo dos rins com a exposição subcrônica dérmica à dose de 1.000 mg/kg, sem alterações histopatológicas associadas (Schulze, 1990a).

5.1.2 Fígado

Em geral, em ratos verificou-se aumento do peso relativo do fígado em doses iguais ou superiores a 60 mg/kg em fêmeas (Gorzinski, 1981a e 1981b) e 100 mg/kg em machos (Schulze, 1991a), que estava associado a alterações histopatológicas (edema citoplasmático hepatocelular, aumento da homogeneidade e hiperchromatismo nuclear) e ao aumento da atividade da alanina aminotransferase em doses iguais ou superiores a 100 mg/kg (Gorzinski, 1981a e 1981b).

Em camundongos observou-se apenas alterações histopatológicas (hiperchromatismo nuclear e diminuição dos hepatócitos da região periportal devido à redução de glicogênio) e somente em altas doses (300 mg/kg; Schulze, 1991b).

Em cães, a única alteração observada relacionada ao fígado foi um aumento da atividade da alanina aminotransferase a partir de 3 mg/kg, o que indica a liberação de enzimas dos hepatócitos, como resultado de degeneração ou necrose.

5.1.3 Tireoide

O peso da tireoide não foi avaliado nos dois estudos mais antigos realizados em ratos (Gorzinski, 1981a; 1981b). Nos dois outros estudos existentes (Serota, 1983a; Schulze, 1991a), verificou-se aumento do peso relativo da tireoide, que estava associado a alterações histopatológicas (hipertrofia folicular) apenas em fêmeas (em 8 de 10 ♀) tratadas com altas doses de 2,4-D (300 mg/kg). No entanto, já puderam ser observadas diminuições nos hormônios tireoidianos (principalmente de tiroxina - T4) em fêmeas tratadas com 60 mg/kg (Gorzinski, 1981b). Em machos, os efeitos nos hormônios tireoidianos foram contraditórios, tendo sido observados aumentos de T4 em três dos quatro estudos realizados em ratos (Gorzinski, 1981a e 1981b; Serota, 1983a), que foram considerados não relacionados ao tratamento. No estudo realizado em ratos por Schulze (1991a) e que utilizou doses mais altas, foi observada diminuição do T4 nos machos tratados com 100 e 300 mg/kg e também de triiodotironina (T3) nos machos tratados com a maior dose, corroborando as observações descritas para fêmeas.



Dos dois estudos realizados em camundongos, apenas um avaliou os níveis de T4, tendo sido verificada diminuição não significativa, porém dose-dependente, desse hormônio apenas nos machos expostos às doses de 100 e 300 mg/kg.

Em cães não foram verificadas alterações no peso, níveis de hormônios ou histopatologia da tireoide, apesar de terem sido observados cistos tireoidianos em alguns animais tratados com 1 mg/kg (1 em 4 ♀); 3 mg/kg (2 em 5 ♀) e 10 mg/kg (1 em 3 ♂ e 1 em 4 ♀).

5.1.4 Testículos

Em um estudo em ratos Schulze (1991a) com alta dose de 2,4-D (300 mg/kg), verificou-se redução do peso relativo testículos (com epidídimos), a qual estava correlacionada a alterações macroscópicas (atrofia bilateral em 8 dos 10 animais: moderada em 2 e severa em 6) e histopatológicas (túbulos seminíferos com diminuição ou até depleção das células germinativas e presença de debris celulares e células gigantes no lúmen).

Em cães (Schulze, 1990b), a administração de 10 mg/kg causou esses mesmos efeitos, ou seja, diminuição do peso absoluto médio dos testículos, associada a alterações macroscópicas (atrofia) e histopatológicas (hipoespermatogênese testicular em 3 de 5 ♂: redução da atividade espermática nos túbulos seminíferos, algumas vezes em um nível que os túbulos eram revestidos apenas por células de Sertoli, com formação de células gigantes, que pareciam ser derivadas dos elementos espermatogênicos).

Em outros dois estudos realizados em ratos com doses menores de 2,4-D, (Gorzinski, 1981b; Serota, 1983a) houve achados esporádicos de atrofia testicular, considerados não relacionados ao tratamento. Além disso, em um dos estudos (Gorzinski, 1981a), verificou-se aumento do peso relativo do testículo nas doses de 100 e 150 mg/kg, resultado considerado inesperado e não relacionado ao tratamento, por ser contrário ao observado nos demais estudos.

Não foram observadas alterações testiculares em camundongos.



5.1.5 Ovários

Não foram verificadas alterações consistentes no peso dos ovários, tendo sido observados diminuição em ratas tratadas com 300 mg/kg (Schulze, 1991a) e em camundongos fêmeas tratadas com 15 mg/kg (Serota, 1983b) e aumentos em ratas tratadas com 1 a 45 mg/kg de 2,4-D (Serota, 1983a). O aumento no peso dos ovários nas ratas da dose de 45 mg/kg foi associado à incidência aumentada de cistos paraovarianos verificados histologicamente (5 em 20 no grupo tratado versus 1 em 20 no controle), considerada não relacionada à exposição ao 2,4-D.

Em cães, não foram observadas alterações ovarianas (Schulze, 1990b).

5.1.6 Olhos

Em um dos estudos realizados com ratos, verificou-se que doses orais de 100 e 300 mg/kg de 2,4-D causaram catarata e degeneração retiniana em fêmeas (Schulze, 1991a), efeitos considerados relacionados à exposição a altas doses de 2,4-D. Em outros dois estudos realizados em ratos, com as doses de 100 e 150 mg/kg, esses efeitos não foram observados (Gorzinski, 1981a; 1981b).

5.1.7 Adrenais

Em alguns estudos realizados em ratos e camundongos (Schulze, 1991a, 1991b; Serota, 1983b), foi verificado aumento do peso relativo das adrenais (em apenas um dos sexos ou nos dois, mas em diferentes doses) e alterações histopatológicas associadas (hipertrofia da zona glomerulosa do córtex da adrenal) apenas em ratos, e nas doses de 100 e 300 mg/kg.

5.1.8 Hipófise

Em dois estudos, um realizado com ratos e outro com camundongos (Serota, 1983a, 1983b), foi verificado aumento no peso da hipófise, porém esse efeito não estava associado a alterações histopatológicas e foi considerado não relacionado à

exposição ao 2,4-D. Vale ressaltar que apenas outros dois estudos subcrônicos avaliaram o peso da hipófise (Schulze, 1991a, 1991b), mas não encontraram alterações.

5.1.9 Imunotoxicidade

Em ratos, verificou-se que, em geral, doses de 150 e 300 mg/kg de 2,4-D levaram à diminuição do número de leucócitos (Gorzinski, 1981b; Schulze, 1991a), que na contagem diferencial mostrou ser devida à diminuição de linfócitos (Schulze, 1991a). Além desses efeitos, doses superiores (300 mg/kg) levaram à diminuição do peso relativo e atrofia do timo, atrofia do baço e hipocelularidade da medula óssea, a qual pode estar associada às diminuições verificadas na contagem de eritrócitos e na concentração de hemoglobina (Schulze, 1991a).

Em camundongos, ocorreu diminuição de leucócitos e linfócitos em machos em um estudo a partir da dose de 15 mg/kg; no entanto, os autores creditaram essas diminuições aos valores atípicos verificados nos animais controles (Schulze, 1991b).

Em cães machos tratados com 3 e 10 mg/kg, houve diminuição do número de linfócitos; além de ter sido verificado que dois animais da dose de 10 mg/kg (1♀ e 1♂ que morreram durante o estudo) apresentaram depleção linfóide no timo (Schulze, 1990b). A fêmea dessa maior dose ainda apresentou hematopoiese extramedular moderada no baço.

Os efeitos descritos acima poderiam sugerir ação imunotóxica do 2,4-D se não tivessem ocorrido apenas em doses que mostraram sinais de elevada toxicidade sistêmica: diminuições no peso corporal e no consumo alimentar, alopecia e alterações neurológicas.

Inclusive, recentemente a IARC considerou que, com base em estudos *in vitro* e *in vivo*, há evidência moderada de que o 2,4-D causa imunossupressão (Loomis *et al.*, 2015), porém isso ocorre apenas em altas doses, nas quais já são observados sinais evidentes de toxicidade.



Quadro 6. Descrição dos principais achados obtidos em ratos, camundongos e coelhos após exposição subcrônica ao 2,4-D.

Espécie, linhagem e número animais	Via	Idade e período de exposição	Pureza	Doses (mg/kg/dia)	Resultados relevantes	NOAEL (mg/kg/dia)	Referência
- Ratos (CDF Fischer 344) -15/sexo/dose	Oral (dieta)	- Idade no início do teste: 6 semanas - Exposição: 13 semanas (91/92 dias)	97,3%	0; 15; 60; 100; 150	<p>Rins:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 15 a 150 mg/kg: ↑ peso relativo - 60 a 150 mg/kg: alterações histopatológicas características - 100 a 150 mg/kg: alterações macroscópicas (leve inchaço) <p>Fígado:</p> <ul style="list-style-type: none"> - ♀ 150 mg/kg: ↑ peso relativo - 100 e 150 mg/kg: alterações histopatológicas, correlacionadas ao ↑ da alanina aminotransferase <p>Tireoide:</p> <ul style="list-style-type: none"> - ♀ 100 e 150 mg/kg: ↓ T4 (mas ↑ T4 ♂ 100 mg/kg e ♀ 15 e 60 mg/kg: considerados não relacionados ao tratamento), sem alterações histopatológicas associadas. O peso da tireoide não foi avaliado. <p>Órgãos Reprodutivos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - ♂ 100 e 150 mg/kg: ↑ peso relativo testículo (resultado considerado não relacionado ao tratamento) - ♀ 150 mg/kg: dilatação do lúmen uterino (3/10) <p>Outros:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 100 e 150 mg/kg: ↓ peso corporal (também em ♂ 60 mg/kg) - ♀ 100 e 150 mg/kg: hemorragia da mucosa estomacal em 1 e 4 ♀, respectivamente 	15	Gorzinski, 1981a
- Ratos (CDF Fischer 344) -15/sexo/dose	Oral (dieta)	- Idade no início do teste: 6 semanas - Exposição: 13 semanas (91/92 dias)	100%	0; 15; 60; 100; 150	<p>Rins:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 15 a 150 mg/kg: ↑ peso relativo - 60 a 150 mg/kg: alterações macroscópicas e histopatológicas características (efeitos dose-dependentes). <p>Fígado:</p> <ul style="list-style-type: none"> - ♀ 60 a 150 mg/kg: ↑ peso relativo - 100 e 150 mg/kg: alterações histopatológicas, correlacionadas ao ↑ da alanina aminotransferase <p>Tireoide:</p> <ul style="list-style-type: none"> - ♀ 60 a 150 mg/kg: ↓ T4 (mas ↑ T4 ♂ 15 a 150 mg/kg, considerado não relacionado ao tratamento devido ao valor reduzido do controle em relação ao histórico). O peso e histopatologia da tireoide não foram avaliados. <p>Órgãos Reprodutivos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - ♂ 150 mg/kg: atrofia testicular em 1/15 (e com congestão vascular em 1/15 ♂ 15 mg/kg: achados considerados espontâneos pelos autores) <p>Outros efeitos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 150 mg/kg: ↓ peso corporal (também em ♂ 100 mg/kg); ↓ leucócitos 	15	Gorzinski, 1981b



Continuação Quadro 6. Descrição dos principais achados obtidos em ratos, camundongos e coelhos após exposição subcrônica ao 2,4-D.

Espécie, linhagem e número animais	Via	Idade e período de exposição	Pureza	Doses (mg/kg/dia)	Resultados relevantes	NOAEL (mg/kg/dia)	Referência
- Ratos (CDF Fischer 344) - 20/sexo/dose	Oral (dieta)	- Idade no início do teste: 8 semanas - Exposição: 13 semanas (91 dias) - Avaliações na semana 7 (patologia clínica: 10 animais) e na semana 14	97,5%	0; 1; 5; 15; 45	Rins: - 45 mg/kg: ↑ peso relativo - 5 a 45 mg/kg: alterações histopatológicas renais características dose-dependentes (maior incidência ♂) Tireoide: - ♂ 1 a 45 mg/kg e ♀ 15 mg/kg: ↑ peso relativo (também estava levemente aumentado nas ♀ das demais doses em relação às controles, apesar de não significativamente), sem alterações histopatológicas correlacionadas - ♂ 5 e 15 mg/kg: ↑ T4 Órgãos Reprodutivos: - ♀ 1 a 45 mg/kg: ↑ peso relativo ovários (significativamente apenas com 5 e 45 mg/kg), possivelmente associado à incidência ↑ de cistos paraovarianos com 45 mg/kg (5/20 X 1/20 no controle; doses intermediárias não analisadas), considerada não relacionada ao tratamento. Cistos ovarianos verificados macroscopicamente em 2/20, 0/18, 2/19, 3/19 e 4/20 animais dos grupos. Outros: ♀ 15 mg/kg: ↑ peso relativo hipófise (considerado não relacionado ao tratamento pelos autores).	Definido pelos autores: 15 Definido pela Anvisa: 1	Serota, 1983a
- Ratos (Fischer 344) -10/sexo/dose	Oral (dieta)	- Idade no início do teste: 6 semanas - Exposição: 13 semanas (91 dias) - Patologia clínica: avaliações na semana 6 e 13	96,1%	0; 1; 15; 100; 300	Rins: - 100 e 300 mg/kg: ↑ peso relativo (também em ♂ 15 mg/kg), correlacionado alterações histopatológicas renais (300 mg/kg) Fígado: 300 mg/kg e ♂ 100 mg/kg: ↑ peso relativo, correlacionado a alterações histopatológicas Tireoide: - 100 e 300 mg/kg: ↑ peso relativo (tireoide com paratireoide), correlacionado à ↓ T3 (apenas ♀ de 100 mg/kg) e T4 (semanas 6 e 13) e a alterações histopatológicas (somente ♀: 8/10) Órgãos Reprodutivos: - 300 mg/kg: ↓ peso relativo testículos com epidídimos, correlacionada a alterações macroscópicas (atrofia bilateral) e histopatológicas; ↓ peso relativo ovários, não correlacionada a alterações histopatológicas Olhos: ♀ 100 e 300 mg/kg: catarata e degeneração retiniana Adrenais: 100 e 300 mg/kg/dia: ↑ peso relativo (♂), correlacionado a alterações histopatológicas (300 e ♀ 100 mg/kg) Outros: - 100 mg/kg e 300 mg/kg: ↓ ganho de peso e consumo alimentar - 300 mg/kg: diversos sinais clínicos como alopecia, postura encurvada; ↓ peso relativo timo, atrofia do timo e baço, hipoecularidade da medula óssea, ↓ leucócitos, linfócitos, eritrócitos e hemoglobina	15	Schulze, 1991a



Continuação Quadro 6. Descrição dos principais achados obtidos em ratos, camundongos e coelhos após exposição subcrônica ao 2,4-D.

Espécie, linhagem e número animais	Via	Idade e período de exposição	Pureza	Doses (mg/kg/dia)	Resultados relevantes	NOAEL (mg/kg/dia)	Referência
- Camundongos (B ₆ C ₃ F ₁) - 20/sexo/dose	Oral (dieta)	- Idade no início do teste: 7-8 semanas - Exposição: 13 semanas (91 dias)	97,5%	0; 5; 15; 45; 90	Rins: - ♂ 45 e 90 mg/kg: ↓ peso relativo - ♀ 90 mg/kg: ↑ peso relativo - 15 a 90 mg/kg: ↑dose-dependente da gravidade e incidência de alterações histopatológicas Tireoide: - 90 mg/kg: cisto no ducto tireoglossal de 2/20 ♀ Os hormônios da tireoide não foram avaliados. Órgãos reprodutivos: - ♂ 45 mg/kg: ↑ vesícula seminal e glândulas prepuciais em 1/20 ♂ - ♀ 15 mg/kg: ↓ peso relativo ovários (também ↓ nos demais grupos tratados, apesar de não significativamente) Adrenais: - ♂ 15 mg/kg e ♀ 5 e 90 mg/kg ↑ peso relativo, sem alterações histopatológicas Outros - 15 a 90 mg/kg (e ♀ 5mg/kg): ↑ peso relativo hipófise, sem alterações histopatológicas	Definido pelos autores: 15 Definido pela Anvisa: 5	Serota, 1983b
- Camundongos (B ₆ C ₃ F ₁) - 10/sexo/dose	Oral (dieta)	- Idade no início do teste: 6 semanas - Exposição: 13 semanas (91 dias)	96,1%	0; 1; 15; 100; 300	Rins: - ♀ 100 e 300 mg/kg: ↑ peso relativo, sem alterações histopatológicas associadas - ♂ 300 mg/kg: ↓ peso relativo, correlacionado a alterações histopatológicas (9/10). Fígado: - 300 mg/kg: alteração histopatológicas (8/10 animais/sexo). Tireoide: - ♀ 1 mg/kg: ↑ peso relativo tireoide/paratireoide - ♂ 100 e 300 mg/kg: ↓ T4 (dose-dependente, porém não significativa) Adrenais: - ♀ 1, 15 e 300 mg/kg: ↑ peso relativo adrenais Outros: - 300 mg/kg: ↓ consumo de ração - ♂ 15 a 300 mg/kg: ↓ leucócitos e linfócitos	15	Schulze, 1991b



Continuação Quadro 6. Descrição dos principais achados obtidos em ratos, camundongos e coelhos após exposição subcrônica ao 2,4-D.

Espécie, linhagem e número animais	Via	Idade e período de exposição	Pureza	Doses (mg/kg/dia)	Resultados relevantes	NOAEL (mg/kg/dia)	Referência
- Cães Beagle - 5/sexo/dose	Oral (cápsulas gelatinosas)	- Idade no início do teste: 4 a 6 meses - Exposição: 13 semanas (91 dias)	96,1 %	0; 0,3; 1; 3; 10	<p>Rins:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 1 mg/kg: ↑ nitrogênio uréico e creatinina sanguíneos - ♀ 10 mg/kg: ↑ peso relativo - 3 e 10 mg/kg: alterações histopatológicas (3/5 ♂ e em 5/5 ♂ e 2/5 ♀) - 10 mg/kg: ↓ gravidade específica da urina <p>Fígado:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 10 mg/kg e ♂ 3 mg/kg: ↑ alanina aminotransferase <p>Tireoide:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 1 a 10 mg/kg: cistos na tireoide (de 1/4 ♀ 1mg/kg, 2/5 ♀ 3mg/kg e em 1/3 ♂ e 1/4 ♀ 10mg/kg) Não houve alterações nos níveis de hormônios nem no peso da tireoide. <p>Órgãos reprodutivos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - ♂ 10 mg/kg: ↓ peso absoluto médio dos testículos, correlacionada a alterações macroscópicas (atrofia em 2/5 ♂; mas também em 1/5 de 3 mg/kg) e histopatológicas <p>Outros efeitos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 10 mg/kg: sinais clínicos de toxicidade (tremores, anorexia) e mortes durante o estudo, relacionados ao tratamento - 10mg/kg: ↓ ganho de peso e consumo alimentar - ♂ 3 e 10 mg/kg: ↓ linfócitos (semana 13), depleção linfóide no timo (apenas com 10mg/kg: 1 ♀ e 1 ♂, que morreram durante o estudo; a ♀ ainda apresentou hematopoiese extramedular moderada no baço). 	0,3	Schulze, 1990b
- Coelhos albinos New Zealand - 5/sexo/dose	Dérmica	- Exposição: 21 dias	96,1%	0; 10; 100; 1000	<p>Rins:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 1000 mg/kg: ↑ peso relativo, sem alterações histopatológicas associadas <p>Outros:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 1000 mg/kg: irritação dérmica muito leve e dose dependente (incidência maior em ♀) 	1000	Schulze, 1990a

5.2 ESTUDOS CRÔNICOS E DE CARCINOGENICIDADE

No quadro 7 estão descritos os resultados dos estudos crônicos e de carcinogenicidade em que o 2,4-D foi administrado por via oral por 24 meses (104 semanas) em doses entre 1 e 150 mg/kg a ratos e entre 1 e 300 mg/kg a camundongos (incorporado na dieta); e por 12 meses (52 semanas) em doses entre 1 e 10 mg/kg a cães (cápsulas).

Não foi observada mortalidade associada ao tratamento com o 2,4-D em ratos (Serota, 1986; Jeffries *et al.*, 1995), camundongos (Serota, 1987; Stott *et al.*, 1995a e 1995b) ou cães (Dalgard, 1993), no entanto, o estudo realizado em camundongos com as doses de 150 e 300 mg/kg (Stott *et al.*, 1995a) teve que ser interrompido em machos devido à toxicidade excessiva observada (diminuição de peso), sendo iniciado outro estudo utilizando apenas machos, com as doses de 62,5 e 125 mg/kg de 2,4-D (Stott *et al.*, 1995b). Em cães, a maior dose administrada (10 mg/kg) causou perda de peso excessiva dos animais e teve que ser reduzida para 7,5 mg/kg/dia na oitava semana do estudo (Dalgard, 1993).

Doses iguais e superiores a 75 mg/kg em ratos (Jeffries *et al.*, 1995), 150 mg/kg em camundongos (Stott *et al.*, 1995a) e 5 mg/kg em cães (Dalgard, 1993) levaram a reduções no ganho de peso e consumo alimentar.

5.2.1 Rins

Ocorreu aumento do peso relativo dos rins em ratos de maneira dose-dependente a partir de 5 mg/kg (Serota, 1986) e alterações histopatológicas relevantes a partir de 15 mg/kg (Serota, 1986). Ainda, em doses superiores houve diminuição da gravidade específica da urina e aumento da creatinina (Jeffries *et al.*, 1995).

Em camundongos, aumento de peso relativo também foi observado a partir da dose de 15 mg/kg em fêmeas (Serota, 1987). Em cães, houve aumento do nitrogênio ureico do sangue e da creatinina a partir de 5 mg/kg, os quais podem estar associados às alterações histopatológicas renais observadas (Dalgard, 1993).

5.2.2 Fígado

Em ratos, verificou-se aumento do peso relativo do fígado em fêmeas tratadas com 150 mg/kg de 2,4-D, o qual estava associado a alterações histopatológicas (Jeffries *et al.*, 1995). Em outro estudo utilizando doses mais baixas, foi observado apenas aumento da atividade da alanina aminotransferase com 45 mg/kg (Serota, 1986).

Em camundongos observaram-se alterações histopatológicas nas doses de 125 mg/kg em machos (Stott *et al.*, 1995b) e 300 mg/kg em fêmeas (Stott *et al.*, 1995a).

Em cães, doses superiores a 5 mg/kg levaram ao aumento da atividade da alanina aminotransferase, que pode estar correlacionado às alterações hepáticas verificadas (Dalgard, 1993).

Vale ressaltar que em camundongos machos tratados com doses superiores a 45 mg/kg de 2,4-D observou-se um leve aumento da incidência de carcinoma hepatocelular (Serota, 1987) e também um leve aumento da incidência de nódulos no fígado (Stott *et al.*, 1995b), os quais foram considerados não relacionados ao tratamento pelos autores e pelas demais agências reguladoras mundiais (EFSA; 2014b).

5.2.3 Tireoide

Em ratos, verificou-se aumento do peso relativo da tireoide a partir da dose de 15 mg/kg, o qual foi acompanhado por diminuições nos níveis de T4 a partir de 45 mg/kg (Serota, 1986; Jeffries *et al.*, 1995). Leves alterações histopatológicas foram observadas apenas nas fêmeas tratadas com altas doses de 2,4-D (150 mg/kg) e consistiam na diminuição dos folículos tireoidianos (diminuição do material secretório/tireoglobulina, com vacúolos de reabsorção claros) observada após 1 ano de exposição e no aumento da incidência de hiperplasia nodular das células parafoliculares após 2 anos de exposição (Jeffries *et al.*, 1995). Adicionalmente, no estudo de Jeffries e colaboradores (1995) foram verificados nódulos na tireoide (hiperplasia) após 24 meses de exposição em 1/50, 1/50, 7/50 e 4/50 machos e em 0/50, 3/50, 3/50 e 3/50 fêmeas dos respectivos grupos: controle; 5 mg/kg; 75 mg/kg e 150 mg/kg. No entanto, a incidência desses nódulos não apresentou relação dose-resposta nem foi estatisticamente significativa.

Os hormônios tireoidianos foram avaliados apenas nos estudos realizados com ratos (Serota, 1986; Jeffries *et al.*, 1995). Vale ressaltar que em ratas tratadas com 15 mg/kg de 2,4-D foi observado aumento de T4 após 1 ano de exposição, mas diminuição nas ratas tratadas por 2 anos (Serota, 1986).

Não foram observadas alterações no peso ou histopatologia da tireoide em camundongos e cães. No entanto, em um dos estudos realizados com camundongos, observou-se leve aumento na incidência de cistos tireoidianos em machos tratados com 125 mg/kg 2,4-D em relação aos controles (18 em 50 versus 13 em 49; Stott *et al.*, 1995b).

5.2.4 Testículos

Em ratos, verificou-se em um estudo que altas doses de 2,4-D (150 mg/kg) levaram à diminuição do peso relativo dos testículos após 12 e 24 meses (Jeffries *et al.*, 1995), que estava correlacionada a alterações macroscópicas (testículos flácidos) e histopatológicas (atrofia bilateral difusa moderada a severa dos túbulos seminíferos: diminuição do número de espermatozoides normais em desenvolvimento, com os túbulos frequentemente revestidos apenas por células de Sertoli). Em camundongos, verificou-se aumento do peso relativo dos testículos na dose de 125 mg/kg, não associado a alterações histopatológicas e provavelmente não relacionado ao tratamento (Stott *et al.*, 1995b). Além disso, ocorreram achados esporádicos de atrofia testicular em animais tratados e controles. Em cães, um de cinco machos tratados com a maior dose de 2,4-D (10 mg/kg, reduzida para 7,5 mg/kg na 8ª semana de estudo) apresentou degeneração testicular, aspermatogênese e diminuição da próstata (Dalgard, 1993).

5.2.5 Ovários

Não foram verificadas alterações consistentes no peso dos ovários, uma vez que foi observada diminuição em camundongos fêmeas tratados com 15 mg/kg (Serota, 1987), mas não em doses mais altas. Ainda, em camundongos fêmeas tratados com 5; 150 e 300 mg/kg de 2,4-D foram observados nódulos nos ovários de respectivamente 2; 4 e 5 animais, de um total de 50 animais por grupo (Stott *et al.*,



1995a). No entanto, nenhum efeito relacionado ao tratamento foi evidenciado após análise histopatológica dos ovários.

5.2.6 Adrenais

Em camundongos machos expostos a 15 e 45mg/kg de 2,4-D verificou-se diminuição do peso relativo das adrenais após um ano de exposição, enquanto nos animais expostos por 2 anos esse parâmetro estava aumentado (Serota, 1987). Esses efeitos inconsistentes não estavam associados a alterações histopatológicas.

5.2.7 Olhos

Em um dos estudos realizados com ratos utilizando uma alta dose de 2,4-D (150 mg/kg), foi verificada opacidade nos olhos e catarata, com maior incidência em fêmeas (Jeffries *et al.*, 1995).

5.2.8 Encéfalo

Em um estudo realizado em ratos (Serota, 1986), verificou-se que machos tratados com 45 mg/kg de 2,4-D apresentaram maior incidência de astrocitomas que, no entanto, não tinham características de tumores induzidos quimicamente. Esse dado levou à suspeita de um possível efeito carcinogênico do 2,4-D, que foi posteriormente descartada devido à ausência de achados deste tipo nos estudos mais recentes (1995), que inclusive utilizaram doses mais altas, como 75 e 150 mg/kg. O potencial para induzir carcinogenicidade do 2,4-D será discutido mais detalhadamente no item 10 deste parecer de análise.

5.2.9 Hipófise

Não foram observadas alterações no peso ou histopatologia da hipófise nos estudos crônicos; ressaltando-se, porém, que o peso desse órgão foi avaliado apenas nos estudos de Serota (1986 e 1987; ratos e camundongos) e de Dalgard (1993, cães).



5.2.10 Imunotoxicidade

Em ratos, verificou-se que a dose de 150 mg/kg levou à diminuição do número de leucócitos apenas em fêmeas, e somente na análise realizada aos 6 meses, mas não nas realizadas aos 12, 18 e 24 meses (Jeffries *et al.*, 1995). Ainda, nas fêmeas dessa mesma dose verificou-se uma diminuição da hematopoiese após 12 meses de tratamento, que não foi evidenciada nos animais tratados por 24 meses. Esses resultados podem indicar um efeito transitório do 2,4-D, que ocorreu em uma dose que induz sinais de toxicidade sistêmica como diminuição do ganho de peso e do consumo alimentar.

Em camundongos verificou-se aumento da incidência de hematopoiese extramedular no baço de fêmeas tratadas com 300 mg/kg de 2,4-D e de cistos no timo de machos tratados por 12 meses, que não foi evidenciada após 24 meses de exposição (Stott *et al.*, 1995a).



Quadro 7. Descrição dos principais achados obtidos em ratos, camundongos e coelhos após exposição crônica ao 2,4-D.

Espécie, linhagem e número animais	Via	Idade e período de exposição	Pureza	Doses (mg/kg/dia)	Resultados relevantes	NOAEL (mg/kg/dia)	Referência
- Ratos (CDF Fischer 344) - 60/sexo/dose	Oral (dieta)	- Idade no início do teste: ~ 7 semanas - Exposição: 104/105 semanas (~ 728 dias)	97,5 %	0; 1; 5; 15; 45	Rins: - ♀ 5 a 45 mg/kg: ↑ dose dependente peso relativo (somente semana 104) - ♂ 15 e 45 mg/kg: ↑ peso relativo (semanas 52 e 104) - 5 a 45 mg/kg: alterações histopatológicas (semanas 52 e 104) Fígado: - 45 mg/kg: ↑ atividade alanina aminotransferase (semana 104) Tireoide: - 15 e 45 mg/kg: ↑dose dependente peso relativo tireoide/paratireoide (nas ♀ foi tendência), sem alterações histopatológicas associadas - ♀ 45 mg/kg: ↓T4 semana 104 (leve, porém significativa; na semana 53: ↑T4♀15 mg/kg) Outros: ♂ 45 mg/kg: ↑ astrocitomas (sem características de tumores induzidos quimicamente).	Definido pelos Autores: 5 Definido pela Anvisa: 1	Serota, 1986
- Ratos (CDF Fischer 344) - 65/sexo/dose	Oral (dieta)	- Idade no início do teste: ~ 7 semanas - Exposição: 12 (15 animais/sexo/dose) ou 24 meses (50 animais/sexo/dose)	96,45 %	0; 5; 75; 150	Rins: - 75 e 150 mg/kg: ↑ peso relativo (significativo apenas em ♀ - 24 meses), associado a alterações histopatológicas características (apenas aos 12 meses), à ↓ gravidade específica da urina (aos 6, 12 e 18 meses) e ao aumento da creatinina Fígado: - 150 mg/kg/dia: ↑ peso relativo (apenas ♀ - 12 e 24 meses), associado a alterações histopatológicas aos 12 (apenas ♀, inclusive de 75 mg/kg) e 24 meses. Tireoide: - 75 e 150 mg/kg: ↑ peso relativo (12 e 24 meses), correlacionado à ↓T4 (todos os períodos) e a leves alterações histopatológicas apenas nas ♀ 150 mg/kg (12 e 24 meses) - Nódulos na tireoide (hiperplasia): 1/50, 1/50, 7/50 e 4/50 ♂ e em 0/50, 3/50, 3/50 e 3/50 ♀ (24 meses) Órgãos Reprodutivos: - 150 mg/kg: ↓ peso relativo testículos (12 e 24 meses), associada a alterações macroscópicas (testículos flácidos) e histopatológicas (12 e 24 meses); abscesso unilateral glândulas prepuciais: 0/10, 1/10, 1/10 e 3/10 ♂ após 12 meses e em 1/50 de 150 mg/kg após 24 meses; inflamação crônica ativa glândulas prepuciais: 2/50, 0/50, 3/50 e 7/50 ♂ (24 meses) Olhos: - 150 mg/kg: opacidade nos olhos e catarata (maior incidência em ♀) Outros: - 75 e 150 mg/kg: ↓ ganho de peso e consumo alimentar, e ↓ colesterol total - ♀ 150 mg/kg: ↓ leucócitos (apenas aos 6 meses) e ↓ hematopoiese (12 meses)	5	Jeffries <i>et al.</i> , 1995



Continuação Quadro 7. Descrição dos principais achados obtidos em ratos, camundongos e coelhos após exposição crônica ao 2,4-D.

Espécie, linhagem e número animais	Via	Idade e período de exposição	Pureza	Doses (mg/kg/dia)	Resultados relevantes	NOAEL (mg/kg/dia)	Referência
- Camundongos (B ₆ C ₃ F ₁) - 60/sexo/dose	Oral (dieta)	- Idade no início do teste: ~ 7 semanas - Exposição: 52 (10 animais/sexo/dose) ou 104 semanas (50 animais/sexo/dose)	97,5%	0; 1; 15; 45	Rins: - 45 mg/kg e ♀ 15 mg/kg: ↑ peso relativo, correlacionado a alterações histopatológicas (apenas em ♂) Fígado: - ♂ 45 mg/kg: ↑ carcinoma hepatocelular (leve: em 7/60; 8/60; 7/60 e 11/60 ♂ dos respectivos grupos) Tireoide: Hormônios da tireoide não foram avaliados. Não foram encontradas alterações tireoidianas. Órgãos Reprodutivos: - ♂ 15 mg/kg: testículos/epidídimos diminuídos em 2/60 ♂ (semana 104), porém os achados de atrofia/degeneração uni ou bilateral estavam distribuídos entre os grupos (respectivamente em 5/60; 1/60; 4/60 e 2/60) - ♂ 45 mg/kg/dia: ↓ vesículas seminais (em 5/60 animais x 2/60 no controle e 1mg/kg), sem alterações histopatológicas associadas - ♀ 15 mg/kg: ↓ peso relativo ovários (semana 53) Adrenais: - ♂ 15 e 45mg/kg: ↓ peso relativo adrenais na semana 52 e ↑ na semana 104, não associados a alterações histopatológicas (esses efeitos inconsistentes).	1* *porém, no estudo posterior realizado com camundongos (Stott <i>et al.</i> 1995a e 1995b), o NOAEL foi de 5 mg/kg, uma dose intermediária entre 1 e 15 mg/kg.	Serota, 1987
- Camundongos (B ₆ C ₃ F ₁) - 60/sexo/dose	Oral (dieta)	- Idade no início do teste: ~ 7 semanas - Exposição: 12 (10 animais/sexo/dose) ou 24 meses (50 animais/sexo/dose)	96,4%	0; 5; 150 e 300	Dados apenas das fêmeas, pois o estudo com machos teve que ser finalizado devido à toxicidade excessiva nas doses de 150 e 300 mg/kg (diminuição de peso). Rins: - ♀ 150 e 300 mg/kg: ↑ peso relativo, correlacionado a alterações histopatológicas Fígado: - ♀ 300 mg/kg: alterações histopatológicas (apenas 12 meses) Tireoide: Os hormônios da tireoide não foram avaliados. Não foram encontradas alterações tireoidianas. Órgãos Reprodutivos: - Nódulos nos ovários de 0, 2, 4 e 5/50 animais dos respectivos grupos, sem alterações histopatológicas associadas - Nódulos no cérvix de 0/50; 1/49; 1/49 e 2/48 ♀ dos respectivos grupos Outros: - ♀ 300 mg/kg: ↓ ganho de peso; ↑ incidência de hematopoiese extramedular no baço	5	Stott <i>et al.</i> , 1995a



Continuação Quadro 7. Descrição dos principais achados obtidos em ratos, camundongos e coelhos após exposição crônica ao 2,4-D.

Espécie, linhagem e número animais	Via	Idade e período de exposição	Pureza	Doses (mg/kg/dia)	Resultados relevantes	NOAEL (mg/kg/dia)	Referência
- Camundongos (B ₆ C ₃ F ₁) MACHOS - 60/sexo/dose	Oral (dieta)	- Idade no início do teste: ~ 7 semanas - Exposição: 12 (10 animais/dose) ou 24 meses (50 animais/dose)	96,4%	0; 5; 62,5 e 125	Rins: - ♂ 62,5 e 125 mg/kg: ↑ peso relativo (24 meses), associado a alterações histopatológicas (12 e 24) Fígado: - ♂ 62,5 e 125 mg/kg: leve ↑ nódulos no fígado (24 meses), considerado não relacionado ao tratamento. - ♂ 125 mg/kg: alterações histopatológicas (24 meses) Tireoide: Os hormônios da tireoide não foram avaliados. - ♂ 125 mg/kg (24 meses): cistos tireoidianos (em 18/50 ♂ x 13/49 no grupo controle) Órgãos reprodutivos - ♂ 125 mg/kg: ↑ peso relativo testículos; testículo de 1/10 ♂ com atrofia moderada dos túbulos seminíferos e epidídimo com azoospermia aos 12 meses (1/10 ♂ controle também apresentou epidídimo com oligospermia); testículo de 2/50 ♂ com atrofia moderada dos túbulos seminíferos e diminuição dos elementos espermáticos do epidídimo aos 24 meses (1/50 ♂ controle também apresentou ambos testículos flácidos, atrofia moderada dos túbulos seminíferos e epidídimo com diminuição dos elementos espermáticos). - 62,5 mg/kg: ↓ ambas vesículas seminais em 1/10 ♂ (12 meses) Outros: - 125 mg/kg: cistos no timo (12 meses)	5	Stott <i>et al.</i> , 1995b *Recondução do estudo anterior (Stott <i>et al.</i> , 1995a) com machos apenas, utilizando doses menores.
- Cães Beagle - 5/sexo/dose	Oral (cápsulas gelatinosas)	- Idade no início do teste: não informada - Exposição: 52 semanas (364 dias)	96,7 %	0; 1; 5; 7,5/10* (* na 8ª semana a dose de 10 foi reduzida para 7,5 mg/kg/dia, devido à perda de peso excessiva dos animais deste grupo)	Rins: - 5 e 7,5/10 mg/kg: ↑ nitrogênio ureico e creatinina do sangue, possivelmente correlacionado às alterações histopatológicas observadas Fígado: - 5 e 7,5/10* mg/kg: ↑ atividade da alanina aminotransferase, que pode estar correlacionado às alterações histopatológicas Tireoide: Os hormônios tireoidianos não foram avaliados. Não foram encontradas alterações tireoidianas. Órgãos Reprodutivos: - 7,5/10* mg/kg: degeneração testicular, aspermatogênese e ↓ próstata em 1/5 ♂. Outros: - 5 e 7,5/10* mg/kg: ↓ ganho de peso e consumo alimentar e ↑ colesterol sanguíneo total	1	Dalgard, 1993

5.3 CONCLUSÕES DOS ESTUDOS SUBCRÔNICOS E CRÔNICOS

Os resultados foram consistentes em confirmar que o rim é o órgão-alvo do 2,4-D e que efeitos evoluem progressivamente de maneira dose-dependente, indo desde aumento de peso relativo até alterações histopatológicas e funcionais.

O NOAEL dos estudos subcrônicos foi definido em 1 mg/kg/dia para roedores, com base nos achados histopatológicos renais e em 0,3 mg/kg/dia para cães, com base em alterações nos marcadores da função renal.

Conforme já discutido mais detalhadamente no item 3 da parte II deste parecer de análise, com base nos estudos de toxicocinética concluiu-se que o cão não é a espécie animal mais apropriada para extrapolação do risco para a saúde humana e, portanto, o NOAEL obtido a partir dos estudos realizados em cães não pode ser utilizado para o estabelecimento de valores de referência para humanos.

O NOAEL dos estudos crônicos foi definido em 1 mg/kg/dia para roedores, também com base nos efeitos renais, e em 1 mg/kg/dia para cães, com base em achados de patologia clínica e histopatologia. Embora os resultados não tenham mostrado a maior susceptibilidade dos cães nos estudos crônicos, isso pode ser explicado pelo fato de não terem sido testadas doses menores nessa espécie.

6 GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DO 2,4-D

Alterações genéticas em células germinativas e somáticas estão associadas a efeitos graves na saúde humana. Mutações em células somáticas podem causar câncer caso ocorram em proto-oncogenes, genes supressores de tumor ou em genes de reparo de danos ao DNA. O acúmulo de dano ao DNA em células somáticas também pode estar associado ao desenvolvimento de condições degenerativas, como aceleração do envelhecimento, disfunção imune, doenças cardiovasculares e doenças neurodegenerativas. Por outro lado, mutações nas células germinativas podem levar a abortos espontâneos, infertilidade ou danos herdáveis pelas gerações subsequentes (EFSA, 2012).

A Lei 7.802, de julho de 1989, estabelece a proibição do registro de agrotóxicos que revelem características mutagênicas. O Decreto 4.074, de janeiro de 2002, que regulamenta esta lei, determina que é proibido o registro de agrotóxicos

considerados mutagênicos, capazes de induzir mutações observadas em, no mínimo, dois testes, um deles para detectar mutações gênicas, realizado, inclusive, com o uso de ativação metabólica, e o outro para detectar mutações cromossômicas. Para compreender a legislação brasileira, é importante lembrar primeiramente que efeitos mutagênicos não devem ser confundidos com efeitos genotóxicos.

Há importantes diferenças entre os conceitos de genotoxicidade e mutagenicidade. Mutagenicidade refere-se à indução de alterações permanentes e hereditárias na estrutura do material genético da célula. Essas mutações podem ocorrer em um único gene ou em um conjunto de genes e nos cromossomos (Dearfield, 2002). Ou seja, incluem-se no conceito de mutações as aberrações cromossômicas estruturais (clastogênese) e numéricas (aneugênese). Genotoxicidade é um termo mais amplo que se refere à habilidade da substância interagir com o DNA ou com o aparato celular que regula o genoma, tais como fusos mitóticos e topoisomerasas, alterando a estrutura, a informação ou a segregação do DNA. A genotoxicidade nem sempre está associada à mutagenicidade, pois engloba todos os tipos de danos ao DNA (inclusive mutagênese), enquanto mutagenicidade se refere especificamente à indução de mutação nos genes ou cromossomos. Portanto, para a análise da genotoxicidade são incluídos ensaios que fornecem indicação de dano ao DNA mesmo que não haja evidência direta de mutação, caso dos ensaios de síntese não programada de DNA, de troca de cromátides-irmãs, de quebras de fitas de DNA, de formação de aduto de DNA e de recombinação mitótica (EFSA, 2012). Esses ensaios mensuram eventos que não são, por eles mesmos, transmissíveis de célula a célula ou de geração a geração (USEPA, 2012).

Ensaio de genotoxicidade incluem qualquer tipo de estudo que avalie a função celular envolvendo dano ou interferência na replicação ou no reparo de DNA. Efeitos mutagênicos são tipos de efeitos genotóxicos. Os efeitos genotóxicos podem ser transitórios, já os efeitos mutagênicos são persistentes e geralmente não podem ser reparados. Conseqüentemente, efeitos genotóxicos não hereditários não resultam necessariamente em efeitos adversos ao organismo e geralmente não são suficientes para prever esses efeitos (USEPA, 2012). Ou seja, a genotoxicidade auxilia no entendimento dos efeitos adversos de uma substância, mas não é suficiente para determinar efeitos hereditários na avaliação de risco (Dearfield, 2002).

Apesar de haver uma grande variedade de testes para avaliação da genotoxicidade, as agências regulatórias, inclusive no Brasil, focam primordialmente

em ensaios que determinem características mutagênicas dos agrotóxicos, isto é, alterações hereditárias no DNA que podem levar ao desenvolvimento de doenças. Enquanto dados de genotoxicidade podem ajudar na compreensão da trajetória do resultado adverso de uma substância química, o peso deles é menor na avaliação do risco do que os específicos para mutagenicidade. Cabe ressaltar que, apesar de possuírem um peso menor, eles podem ser determinantes para se concluir sobre a mutagenicidade de uma substância, quando utilizados para mensurar o peso da evidência (USEPA, 2012).

A agência reguladora americana (USEPA), por exemplo, requer como testes mutagênicos um ensaio de mutação reversa em bactérias (para detectar mutações pontuais, responsáveis por muitas doenças genéticas humanas e por mutações em oncogenes e genes supressores de tumores), um ensaio *in vitro* em células de mamíferos (para mutação pontual ou para aberração cromossômica, ou que detecte esses dois desfechos) e um estudo citogenético *in vivo* (para detectar aberração cromossômica em células de medula óssea ou para detectar dano citogenético pela formação de micronúcleo). A USEPA considera que estudos *in vivo* têm maior peso para determinar o potencial mutagênico, pois os ensaios *in vitro* não consideram a resposta do organismo ao dano do agente tóxico, ou seja, a sua capacidade de desintoxicação. A USEPA ressalta que testes de genotoxicidade incluem qualquer tipo de estudo que avalie funções celulares envolvendo dano genético, interferência com a replicação ou o reparo gênico. Diferentemente dos efeitos mutagênicos, que são permanentes e muitas vezes não reparáveis, outros efeitos genotóxicos geralmente não exibem essas características. Consequentemente, efeitos genotóxicos não hereditários não levam necessariamente a efeitos adversos no organismo como um todo e, por essa razão, não são um prognóstico confiável desses efeitos (USEPA, 2012).

A agência europeia (EFSA) também baseia suas análises principalmente em ensaios que acessam desfechos relacionados à mutagenicidade (aberração cromossômica, aberração numérica e mutações pontuais). Inicialmente os ensaios requeridos são *in vitro* e, havendo resultados positivos, equívocos ou inconclusivos, pode ser necessária a realização de ensaios *in vivo*. Os ensaios *in vivo* irão confirmar a mutagenicidade da substância, devendo, portanto, medir os mesmos desfechos dos ensaios *in vitro*. Entretanto, há ensaios de genotoxicidade que são aceitos nessa etapa, pois são suficientes para comprovação dos resultados *in vitro*, como o ensaio de cometa

e de síntese não programada de DNA. Esse último ensaio, contudo, é limitado, pois se aplica a substâncias com efeitos genotóxicos específicos no fígado, é pouco prático e possui sensibilidade questionável, por isso tem sido pouco utilizado (EFSA, 2012).

Ao encontro das metodologias de acesso à mutagenicidade adotadas pela USEPA e pela EFSA, especialistas em genotoxicidade concordam que se um ou mais ensaios *in vitro* são positivos e nenhum efeito é detectado *in vivo*, o risco de genotoxicidade é baixo (Thybaud *et al.*, 2011). Resultados negativos *in vitro* usualmente são indicativos fortes de ausência de mutagenicidade. Entretanto, há exceções, e algumas moléculas, mesmo com ensaios negativos *in vivo*, podem ser mutagênicas. Assim, se houver indicação de que os mecanismos ou rotas do metabolismo da substância não podem ser acessados *in vitro*, é necessário realizar um ensaio *in vivo* ou deve-se considerar a necessidade de modificação no sistema metabólico *in vitro* (EFSA, 2012).

Embora muitos testes *in vitro* sejam rotineiramente utilizados e aceitos pelas autoridades reguladoras, eles apresentam limitações importantes que dificultam a predição do potencial mutagênico ou genotóxico de uma substância *in vivo* em mamíferos, especialmente em humanos. Essas limitações incluem: inexistência de ativação metabólica semelhante à humana, ausência da toxicocinética, supersensibilidade em relação aos testes *in vivo*, baixa especificidade e culturas celulares nem sempre relevantes para predição da genotoxicidade em órgãos-alvos. Assim, nenhum teste *in vitro* é capaz de substituir um teste *in vivo*, sendo necessária uma bateria de testes *in vitro* para determinar a genotoxicidade de uma substância (Thybaud *et al.*, 2011).

Análises mais complexas também podem auxiliar na determinação do potencial genotóxico das substâncias. A Toxicogenômica é a aplicação de métodos de genômica para tratar de questões no campo da Toxicologia, podendo ser definida como o estudo da relação entre estrutura e atividade do genoma e os efeitos adversos de agentes exógenos. As alterações na expressão do gene/proteína como um resultado da exposição a um produto químico tóxico ou agente físico podem ser medidas em praticamente qualquer tecido (*in vitro* ou *in vivo*). A Toxicogenômica é um campo de rápido desenvolvimento e deverá ter um grande impacto em ambas as áreas de Toxicologia Genética e carcinogenicidade, como resultado de uma maior compreensão desses processos. O aumento da compreensão das vias biológicas envolvidas na



genotoxicidade e carcinogenicidade irá promover o desenvolvimento de melhores ferramentas para avaliar esses parâmetros. Essas novas metodologias já permitiram avanços no entendimento das respostas moleculares celulares e teciduais pela constatação de que alterações nos padrões de indução da expressão de genes podem ser características de classes específicas de compostos tóxicos e a identificação dessas impressões digitais distintas pode ajudar a classificar os agentes com diferentes mecanismos de ação. Com as novas metodologias, a Toxicogenômica tem o potencial de reduzir a quantidade de testes normalmente necessários para definir um modo ou mecanismo de ação. Assim, os avanços na Toxicogenômica permitirão o aperfeiçoamento dos métodos de identificação e avaliação dos toxicantes e de monitoramento da exposição e provavelmente acarretarão alterações na Toxicologia Regulatória (Aardema, 2002).

6.1 AVALIAÇÃO DAS EVIDÊNCIAS EXPERIMENTAIS DE MUTAGENICIDADE DO 2,4-D

6.1.1 Testes *in vitro* em células procariotas

Os resultados do 2,4-D no teste de Ames, para a avaliação inicial de mutações pontuais, são negativos, conforme dados do relatório da EFSA (2014b), documentos da USEPA (2012) e revisões da literatura (von Stackelberg, 2013). No quadro 8, são apresentados os resultados dos testes de Ames protocolados na Anvisa, todos com resultados negativos. Vale ressaltar que, no recente relatório da EFSA (2014b), há alguns estudos adicionais que não foram protocolados na Anvisa como, por exemplo, o de Andersen e colaboradores (1972), mas que também tiveram resultado negativo e por isso não foram solicitados às empresas detentoras de registro de 2,4-D.

Kappas (1988) foi o único autor que, em um estudo publicado na literatura, encontrou aumento de colônia revertentes e relação dose-resposta no teste de Ames para a cepa TA97a incubada com 2,4-D e com ativação metabólica (a partir de 250 µg/placa). Entretanto, o índice de mutagenicidade foi menor do que dois, o que, segundo os critérios de positividade para esse tipo de ensaio, significa que ele foi inconclusivo. Testes inconclusivos devem ser reproduzidos nas mesmas condições para que as dúvidas possam ser sanadas. Na impossibilidade dessa repetição, apenas ensaios



em células eucariotas ou ensaios *in vivo* poderão esclarecer sobre a mutagenicidade da substância. Para as demais cepas avaliadas neste estudo (TA98, TA100, TA1537, TA1538), o resultado foi negativo (Kappas, 1988).

Como existem dados inconclusivos de mutagenicidade para a cepa TA97a e considerando que a cepa TA102 é responsiva a espécies reativas de oxigênio (Kappas, 1988; Nielsen *et al.*, 2008), deve-se levar em consideração alguns aspectos dos resultados dos ensaios de Ames realizados com os produtos técnicos à base de 2,4-D. Os resultados de mutagenicidade com as linhagens TA102, TA97 e TA1537 (quadro 8) foram considerados negativos, mesmo com alguns deles apresentando certas limitações. Cabe ressaltar que as cepa TA97 e TA1537 possuem sítio primário de reversão do tipo CG, não sendo boas cepas para a detecção de mutágenos oxidantes.

Diante do exposto, não há evidências sobre a mutagenicidade do 2,4-D nos testes *in vitro* em células procariotas, mas é importante avaliar o potencial de mutação pontual *in vivo* e em células eucariotas.



Quadro 8. Avaliação da mutagenicidade do 2,4-D *in vitro* em células procariotas.

Referência	Pureza (ea)	Cepas utilizadas	Delineamento	Resultados	Limitações, inconsistências e considerações relevantes	Conclusões da Anvisa
Lawlor e Valentine, 1990 (RE)	96,1%	<i>Salmonella typhimurium</i> : TA98, TA100, TA1535, TA1537 e TA1538.	Seis concentrações: - Com S9: 333 a 10000 µg/placa. - Sem S9: 100 a 6670 µg/placa.	Citotoxicidade a partir de 3330 µg/placa.	-	Negativo para mutação pontual.
Henriques, 1993 (RE)	90,0% (75%)	<i>Salmonella typhimurium</i> : TA97, TA98, TA100 e TA102.	Cinco concentrações: - Com S9: 200 a 1000 µg/placa. - Sem S9: 1000 a 5000 µg/placa.	Citotoxicidade em 5000 µg/placa sem S9.	Média de colônias revertentes do controle negativo maior do que a média do controle histórico.	Negativo para mutação pontual.
Henriques, 1994 (RE)	95,0%	<i>Salmonella typhimurium</i> : TA97, TA98, TA100 e TA102.	Cinco concentrações: - Com S9: 200 a 1000 µg/placa. - Sem S9: 40 a 200 µg/placa.	Citotoxicidade a partir de 160 µg/placa para a cepa TA97 sem S9.	Média de colônias revertentes do controle negativo (e dos tratados) acima do controle histórico do laboratório para TA98 (com S9) e TA102 (com e sem S9). A citotoxicidade ocorreu em uma dose muito baixa com a cepa TA97 sem S9.	Negativo para mutação pontual.
Gava, 1998 (RE)	97,1%	<i>Salmonella typhimurium</i> : TA98, TA100, TA1535 e TA1537.	Cinco concentrações: - Com e sem S9: 0,001; 0,01; 0,1; 1,0 e 5,0 mg/placa.	Citotoxicidade em 5 mg/mL.	Espaçamento muito grande entre as concentrações testadas. Entretanto, outros estudos, que utilizaram concentrações intermediárias, corroboram esse resultado.	Negativo para mutação pontual.
Do Val, 2006 (RE)	98,39 %	<i>Salmonella typhimurium</i> : TA98, TA100, TA102, TA1535 e TA1537.	Cinco concentrações: - Com e sem S9: 130, 216, 360, 600 e 1000 µg/placa.	Citotoxicidade nas concentrações mais altas. Cepa TA1537 com S9: ↑ estatisticamente significativo de revertentes (p=0,004). No entanto, as razões de mutagenicidade estavam abaixo do limite de significância biológica (↑ menor que 3 vezes) e não houve relação dose-resposta.	Espaçamento muito grande entre as concentrações testadas.	Negativo para mutação pontual.
Flügge, 2009b (RE)	98,4%	<i>Salmonella typhimurium</i> : TA98, TA100, TA102, TA1535 e TA1537.	Cinco concentrações: - Com e sem S9: 31,6 a 3160 µg/placa.	Citotoxicidade em 3160 µg/placa.	-	Negativo para mutação pontual.

Legenda: ea=equivalente ácido; RE=relatório de estudo protocolado na Anvisa; S9=ativação metabólica.

6.1.2 Testes *in vitro* em leveduras

No quadro 9 foi incluída a avaliação de um estudo da literatura que teve resultado claramente positivo para a indução de mutações em leveduras. Entretanto, a USEPA também avaliou esse estudo e considerou que ele tem menos força do que aqueles realizados em mamíferos, especialmente os *in vivo* (USEPA, 2012). Assim, havendo comprovação da inexistência de mutação pontual em mamíferos *in vitro* e *in vivo*, não se pode concluir sobre a mutagenicidade do 2,4-D com base apenas nesse ensaio.

Quadro 9. Avaliação da mutagenicidade do 2,4-D *in vitro* em leveduras.

Referência	Pureza	Delineamento	Resultados	Limitações, inconsistências e considerações relevantes	Conclusões da Anvisa
Venkov <i>et al.</i> , 2000 (AC)	100%	<p><i>Saccharomyces cerevisiae</i> linhagem D7ts1 (cepa diploide). Verificação de mutações reversas, conversão gênica mitótica e taxa de sobrevivência. Experimentos: - Inicial: 8 mM de 2,4-D por 4h. - Avaliação da cinética: 8 mM de 2,4-D por 1, 2, 3, 4, 5 e 8h. - Avaliação dose-resposta: 4 (884 µg/mL), 8 (1768 µg/mL) ou 16 mM (3536 µg/mL) de 2,4-D por 4h. - Sem S9. Realizados 5 experimentos independentes para cada concentração e tempo de exposição.</p>	<p>- 2,4-D induziu conversões gênicas e mutações reversas com efeitos citotóxicos moderados (63% de sobrevivência). - Resposta dose e tempo dependente, que atingiu platô com 5h, sugerindo saturação (a partir de 5h a taxa de sobrevivência estava abaixo de 60%). Os autores citam que testes anteriores com a cepa D7 não mostraram a indução de efeitos genotóxicos pelo 2,4-D, mas que a mutação ts1 aumenta a sensibilidade do teste, pois facilita a internalização de diferentes substâncias.</p>	<p>- Resultado apresentado como a média de 5 experimentos independentes sem o desvio-padrão. - Ausência de avaliação estatística da conversão e da reversão. - Não foi utilizado controle positivo. - As diretrizes referentes aos testes de genotoxicidade realizados com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (TG 480 e 481) foram excluídas pela OECD em 2014.</p>	Positivo para mutação pontual.

Legenda: AC=artigo científico; S9=ativação metabólica.

6.1.3 Testes *in vitro* em células de mamíferos

Foram avaliados os testes *in vitro* em células somáticas de mamíferos realizados pelas empresas detentoras de registro de 2,4-D e os publicados na literatura, conforme pode ser observado no quadro 10.

Os resultados considerados positivos por alguns autores em estudos da literatura com o ingrediente ativo 2,4-D (Ahmed *et al.*, 1977; Pavlica *et al.*, 1991; Durward, 1994) não preenchem os critérios regulatórios de análise para positividade ou



apresentam inconsistências e limitações importantes que impossibilitam uma conclusão definitiva. Portanto, os estudos avaliados para os produtos técnicos à base de 2,4-D são todos negativos ou inconclusivos (quadro 10). Todavia, para produtos formulados há alguns estudos na literatura científica que mostram resultados positivos: Zeljezic e Gara-Vrhovac (2004) e Mustonen e colaboradores (1986) observaram a ocorrência de aberrações cromossômicas *in vitro* após a exposição de linfócitos humanos a produtos formulados à base de 2,4-D. Apesar de Burroughs e colaboradores (1999) terem observado a ocorrência de micronúcleos *in vitro* em linfócitos humanos expostos a um produto à base de éster de 2,4-D, esse estudo foi considerado inconclusivo pela Anvisa.

Recentemente, um estudo *in vitro* foi realizado pela Força Tarefa (Schisler, 2013) em células germinativas de mamífero (ovário de hamster chinês) e protocolado na Anvisa. Os resultados desse estudo, descritos no quadro 11, também não mostraram efeitos mutagênicos relacionados ao 2,4-D.

Quadro 10. Avaliação da mutagenicidade do 2,4-D *in vitro* em células somáticas de mamíferos.

Referência	Pureza	Delineamento	Resultados	Limitações, inconsistências e considerações relevantes	Conclusões da Anvisa
Ahmed <i>et al.</i> , 1977 (AC)	NI	Avaliação da frequência de mutações em cultura de células de pulmão de hamsters (V79). - Concentração 2,4-D: 0,01 mM - Exposição: 48h	- 0,01 mM: indução de mutações em células V79, sem dose-dependência (testada apenas 1 concentração). - ↑ não reproduzível na frequência de mutação (apenas 1 ensaio em triplicata).	- Ausência de controle positivo. - 2,4-D mais tóxico nas menores concentrações. - Utilizada apenas 1 concentração.	Inconclusivo para mutação pontual.
Korte e Jalal, 1982 (AC)	NI	Análise de aberrações cromossômicas e da troca de cromátides-irmãs em cultura de linfócitos humanos. - 8 concentrações de 2,4-D: 0,2; 2; 10; 20; 30; 40; 50 e 60 µg/mL. - 4 réplicas (de 4 indivíduos). - Exposição: 48h	- Índice mitótico: leve ↓ dose dependente, mas não significativa. - 50 e 60 µg/mL: ↑ significativo de lacunas e deleções. Quando lacunas e deleções foram avaliadas separadamente, houve ↑ significativo da proporção de lacunas com 60 µg/mL, mas não de deleções. - 10 a 60 µg/mL: ↑ significativo troca de cromátides irmãs.	- Não utilizado controle positivo. - Não houve contagem de células antes da incubação com o tratamento e nem após, mesmo o autor comentando que o procedimento leva à alta perda celular. - Resultados positivos devem ser interpretados com cautela quando encontrados apenas em altas doses com alta citotoxicidade.	Negativo para aberração cromossômica. Positivo para genotoxicidade.
Mustonen <i>et al.</i> , 1986 (AC)	- 2,4-D puro - PF (550g/L de sal de amina de 2,4-D)	Avaliação de aberrações cromossômicas em cultura de linfócitos humanos <i>in vitro</i> . - Concentrações 2,4-D puro: 0,125; 0,150; 0,200; 0,350 mM. - Concentrações PF: 0,125; 0,250; 0,500; 1,0 e 1,25 mM de ácido fenoxiacético. - Sem S9. - Exposição: 24h.	- 2,4-D puro: 0,500 mM já foi tóxica. - PF: toxicidade evidenciada apenas na concentração de 1,500 mM de fenoxiácidos. - 0,500 a 1,25 mM - PF: ↑ dose-dependente e estatisticamente significativo de aberrações cromossômicas. Autores sugerem que o PF pode possuir contaminantes com atividade clastogênica, como o clorofenol e seus derivados (encontrados na análise qualitativa do produto), que possuem indícios de ação mutagênica conforme literatura.	- Não foi utilizada S9. - Não analisou 300 metáfases por grupo. - Metodologia e resultados da avaliação de citotoxicidade não informados. - Citadas unidades diferentes para o produto puro (µM) e formulado (mM), mas na tabela e no gráfico as concentrações dos dois produtos são apresentadas em mM.	2,4-D puro: negativo para aberração cromossômica. PF: positivo para aberração cromossômica.
Pavlica <i>et al.</i> , 1991 (AC)	NI	Avaliação de mutantes HGPRT em fibroblastos de hamster chinês (V79). - Concentrações 2,4-D: 10, 25 e 100 µg/ml. - Experimentos em triplicata. - Exposição: 1h.	- 2,4-D levou a uma indução dose-dependente das mutações.	- Ausência de controles positivo e negativo. - Ausência dos dados de frequência de mutação, apresentada apenas a curva. - Ausência de análise estatística. - Citotoxicidade da última dose não revelada, não sendo possível saber se ela é válida para a análise de mutação. - Apenas 3 doses de análise em vez de 4. - Tempo curto de exposição ao 2,4-D.	Inconclusivo para mutação pontual e aberração cromossômica.

Legenda: AC= artigo científico; NI= não informada; PF= produto formulado; S9= ativação metabólica.

Quadro continua na próxima página.



Continuação Quadro 10. Avaliação da mutagenicidade do 2,4-D *in vitro* em células somáticas de mamíferos.

Referência	Pureza	Delineamento	Resultados	Limitações, inconsistências e considerações relevantes	Conclusões da Anvisa
Durward, 1994 (RE)	99,8%	Avaliação da indução de mutação gênica no lócus da timidina quinase (TK) em células de linfoma de camundongo linhagem L5178Y TK +/- 3.7.2c. - Experimento (exp) 1: 78,1; 156,25; 312,5; 625; 937,5 µg/mL. - Exp 2: 156,25 a 1250 µg/mL. - Com e sem S9 e em duplicata. - Exposição: 3h	- > 937,5 µg/mL - sem S9: leve ↑ na frequência de pequenas colônias mutantes. - 625 µg/mL (Exp 1) e de 937,5 µg/mL (Exp 2) - com S9: ↑ significativo e dose resposta de mutações. - Exp 1; 625 µg/mL: ↑ sutil grandes colônias mutantes. - Exp 2; 937,5 µg/mL: ↑ notável (>4x) pequenas colônias mutantes. - 2,4-D: frequência de mutação não excedeu limiar de fundo (126x10 ⁶ + controle negativo).	- Resultados negativos em tratamentos curtos (3h a 4h) devem ser confirmados repetindo-se o teste com ativação metabólica por 24h. - Embora não tenha excedido o limiar de fundo, há dose-dependência e aumento reproduzível na frequência de mutação.	Inconclusivo para mutação pontual e aberração cromossômica
Burroughs <i>et al.</i> , 1999 (AC)	PF	Análise de aberrações cromossômicas por MN em linfócitos humanos: - 1000 linfócitos binucleados. - 4 misturas surfactantes comerciais e 12 PFs (6 à base de clorofenóis).	- Apenas um herbicida apresentou curva dose-resposta significativa. - Todos os adjuvantes testados apresentaram ↑ na frequência de MN e curva dose-resposta significativas.	- Frequências de MN obtidas não apresentadas, mas apenas os gráficos dos produtos com resultado positivo para MN: esses achados negativos não podem ser considerados na avaliação do 2,4-D.	Inconclusivo para aberração cromossômica
Holland <i>et al.</i> , 2002 (AC)	- IA 98% - PF	Avaliação de aberrações cromossômicas por MN e proliferação celular (índice mitótico – IM – e índice de replicação – IR). Experimento <i>in vitro</i> n° 1: Cultura de sangue total ou de linfócitos isolados de 2 voluntários saudáveis, homens, de 31 e 43 anos. Concentrações: 0,001 a 1 mM. Experimento <i>in vitro</i> n° 2: Cultura de linfócitos isolados de 5 voluntários, 2 homens e 3 mulheres, entre 26 e 45 anos Concentrações: 0,005 e 0,3 mM.	Sangue total: leve, porém significativo, ↑ dose-reposta no número de MN em apenas 1 dos 2 doadores, o mais velho (43 anos). Sabe-se que os níveis de MN são idade-dependentes. Linfócitos isolados; 0,3 mM 2,4-D: ↑sutil, não significativo, mas com dose-resposta significativa. - Autores concluíram que há pouco significado biológico nesse resultado: valores estavam na faixa mais baixa dos níveis normais de adultos saudáveis. Consideraram o efeito genotóxico do 2,4-D por MN mínimo e dentro dos valores normais aceitáveis. Proliferação: ↓ na maior dose para o IA e ↑ na menor dose para o PF. - Autores concluíram que outros ingredientes do PF podem ser responsáveis pelos efeitos observados.	- Um doador do exp 1 tinha 43 anos e do 2 foi citada somente a faixa de idade (26-45 anos): idade máxima estipulada pela diretriz OECD 487 é de 35 anos. - Não utilizada S9. - Tratamento com 2,4-D iniciado 24h após estimulação com fitohemaglutinina, em vez de 44-48h após a estimulação (OECD 487). - Contados MN em 1000 linfócitos binucleados. OECD determina 2000 ou que, quando menor e sem ↑ significativo, o ensaio seja repetido com mais células ou concentrações menos citotóxicas. - Resultados similares no PF (dados não apresentados).	Negativo para aberração cromossômica
Zeljezic e Garaj-Vrhovac, 2004 (AC)	PF (500 mg/mL)	Avaliação de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos. - 0,4 e 4µg/mL, com e sem S9. - Exposição: 24h	- ↑ significativo quebras de cromátides e de cromossomos, MN e brotos nucleares (X controle negativo). -S9: ↑significativo quebras de cromátides e MN (X sem S9).	- Citotoxicidade não avaliada. - Avaliação de apenas 2 doadores (mas eles eram jovens, não fumantes e sem histórico de exposição a agrotóxicos). - Avaliação de apenas 2 concentrações.	Positivo para aberração cromossômica

Legenda: RE= relatório de estudo protocolado na Anvisa; AC= artigo científico; IA= ingrediente ativo; PF= produto formulado; S9= ativação metabólica ; MN= micronúcleos.

Quadro 11. Avaliação da mutagenicidade do 2,4-D *in vitro* em células germinativas de mamíferos.

Referência	Pureza	Delineamento	Resultados	Limitações, inconsistências e considerações relevantes	Conclusões da Anvisa
Schisler, 2013 (AC)	98,71%	Avaliação de mutações diretas em células de ovário de hamster chinês <i>in vitro</i> (CHO-HPRT). Concentrações: 138,1; 276,3; 552,2; 1105; 2210 µg/mL com e sem S9.	Citotoxicidade a partir de 1600 µg/mL.	- 2210 µg/mL com S9: excesso de citotoxicidade (sobrevivência celular relativa <10%).	Negativo para mutação pontual e aberração cromossômica.

Legenda: AC=artigo científico; S9= ativação metabólica.

6.1.4 Testes *in vivo* para detectar mutações em *Drosophila melanogaster*

6.1.4.1 Testes *in vivo* em células somáticas de *Drosophila melanogaster*

Dois estudos, descritos no quadro 12, avaliaram a genotoxicidade do 2,4-D em células somáticas de drosófilas e tiveram resultado positivo (Tripathy *et al.*, 1993; Graf e Wurgler, 1996). Entretanto, no Teste da Mancha da Asa realizado por Graf e Wurgler (1996) a positividade só foi conclusiva para recombinação somática, considerada evidência de genotoxicidade, mas não de mutação ou aberração cromossômica. Além disso, no outro tipo de ensaio realizado pelos mesmos autores, o Teste da Mancha do Olho, o 2,4-D foi claramente não mutagênico. Tripathy e colaboradores (1993) também encontraram resultados positivos, mas não é possível concluir se há positividade para mutação e aberração cromossômica ou apenas para recombinação somática, pois não houve contabilização em indivíduos heterozigotos balanceados.

Madrigal-Bujaidar e colaboradores (2001) acreditam que os resultados controversos sobre o potencial genotóxico do 2,4-D são possivelmente devidos ao efeito de impurezas nas amostras ou ao sistema/parâmetro específico avaliado em cada teste. Citam como exemplo de resultado dependente do sistema/parâmetro utilizado o caso das respostas opostas obtidas nos dois testes somáticos realizados em drosófilas por Graf e Wurgler (1996) anteriormente descritos: enquanto o Teste da Mancha do Olho produziu resultados negativos, o Teste da Mancha da Asa teve resultado positivo.

A partir das análises desses dois estudos em drosófilas, não foi possível concluir sobre a capacidade do 2,4-D de induzir mutações e aberrações cromossômicas.



Quadro 12. Avaliação da mutagenicidade do 2,4-D *in vivo* em células somáticas de *Drosophila melanogaster*.

Referência	Pureza	Delineamento	Resultados	Limitações, inconsistências e considerações relevantes	Conclusões da Anvisa
Tripathy, <i>et al</i> , 1993 (AC)	98%	<p>Teste da Mancha da Asa: detecta recombinação mitótica e vários tipos de mutações.</p> <p>- Larvas transheterozigotas expostas por todo o período larval (48 e 72 h) nas concentrações de 2,5; 5 e 10 mM de 2,4-D (esta última foi a DL₅₀).</p>	<p>- 5 e 10 mM; 48h: ↑frequência de manchas pequenas e grandes.</p> <p>- 5 mM; 72h: ↑ frequência de manchas grandes.</p> <p>- 10 mM; 72h: ↑frequência de manchas pequenas, grandes e gêmeas.</p> <p>O resultado para a frequência de manchas gêmeas foi inconclusivo para as demais doses e tempos de exposição.</p> <p>A indução de manchas foi dose-dependente.</p>	<p>Não foi feita estatística da dose-resposta.</p> <p>Não foram contabilizadas as manchas das asas dos indivíduos heterozigotos balanceados. Por isso, não é possível concluir se o resultado positivo decorre de mutações ou de recombinações.</p> <p>Não foi fornecida a frequência de mutação.</p>	<p>Positivo para genotoxicidade, mas inconclusivo com relação ao evento que é induzido: recombinação e/ou aberração cromossômica e/ou mutação.</p>
Graf e Wurgler, 1996 (AC)	NI	<p>Teste da Mancha da Asa: detecta recombinação mitótica e vários tipos de mutações.</p> <p>- Larvas de 3º estágio expostas por 48h ao 2,4-D nas concentrações de 2,5 mM e 5 mM.</p> <p>- Experimento realizado em duplicata.</p>	<p>- Transheterozigotos: ↑ significativo de manchas simples pequenas e grandes e de manchas gêmeas.</p> <p>- 5 mM; heterozigotos balanceados: ↑ apenas de pequenas manchas. Análise estatística inconclusiva para 2,5 mM e para grandes manchas.</p> <p>Portanto, há clara evidência de indução de recombinação gênica, mas fraca evidência de mutação pontual. Este resultado foi reforçado pela negatividade do teste de mancha do olho descrito abaixo.</p>	<p>Os dados foram agrupados, mas os autores não apresentaram teste estatístico mostrando que esta apresentação é adequada: apenas na ausência de diferença estatística eles podem ser agrupados.</p>	<p>Positivo para recombinação gênica (genotoxicidade).</p> <p>Inconclusivo para mutação.</p>
		<p>Teste da Mancha do Olho: detecta recombinação mitótica e mutações.</p> <p>- Larvas de 2º estágio expostas por 72h ao 2,4-D no meio: 1,0 mM e 2,5mM.</p> <p>- Experimento realizado em duplicata.</p> <p>- Concentração utilizada neste teste foi menor porque são utilizadas larvas mais novas e, portanto, a toxicidade produzida é maior.</p>	<p>2,4-D claramente não genotóxico: negativo em ambos os sexos e linhagens testadas.</p>	<p>Os autores concluíram que este ensaio é menos sensível para recombinação, contudo ele é bastante utilizado com este propósito e a recombinação pode ser acessada pela diferença na frequência das manchas entre machos e fêmeas, pois as manchas nos machos vão decorrer de recombinação homóloga.</p>	<p>Negativo para recombinação gênica (genotoxicidade) e para mutação.</p>

Legenda: AC= artigo científico; NI= não informado.



6.1.4.2 Testes *in vivo* em células germinativas de *Drosophila melanogaster*

No quadro 13 estão descritos os resultados de estudos publicados que avaliaram a não disjunção, a perda cromossômica e a letalidade recessiva em drosófilas do 2,4-D puro e de produtos formulados contendo 2,4-D. A maioria desses estudos foi realizada com o ensaio de letalidade recessiva ligado ao sexo, descrito na diretriz 477 da OECD, que foi excluída em 2014 devido ao escasso uso pelas autoridades regulatórias, uma vez que existem outros testes mais comumente utilizados para o mesmo fim.

Conforme pode ser verificado no quadro 13, os resultados dos estudos são conflitantes: há ensaios positivos e negativos. No entanto, a maioria dos estudos, tanto os positivos quanto os negativos, possuem limitações importantes que prejudicam a análise dos resultados. Como exemplo, apesar de Magnusson e colaboradores (1977) e Kale e colaboradores (1995) terem observado aumentos significativos na frequência de mutação letal, esses resultados foram inferiores a 1% e/ou a cinco vezes os valores de frequência dos controles, não sendo possível extrapolar o resultado para mamíferos como evidência de carcinogenicidade (Vogel, 1999). Assim, apenas um estudo com resultado positivo significativo se enquadrou nesses dois critérios (Tripathy *et al.*, 1993). Cabe ressaltar que apenas um estudo claramente positivo em drosófilas possui pouco peso na conclusão sobre a mutagenicidade do 2,4-D, especialmente por ser em não-mamífero.



Quadro 13. Avaliação da mutagenicidade do 2,4-D *in vivo* em células germinativas de *Drosophila melanogaster*.

Referência	Pureza	Delineamento	Resultados	Limitações, inconsistências e considerações relevantes	Conclusões da Anvisa
Vogel e Chandler, 1974 (AC)	NI	Teste de letalidade recessiva ligada ao sexo: - ♂ adultos expostos por 3 dias a 4,5 e 9 mM de 2,4-D na alimentação.	- Não houve ↑ significativo na frequência de mutação letal.	- Não foi utilizado controle positivo.	Negativo para mutação pontual.
Magnusson <i>et al.</i> , 1977 (AC)	100%	Teste de não disjunção e perda cromossômica: - ♂ e ♀ expostos durante todo o período larval a 100 ppm no substrato. Teste de letalidade recessiva ligada ao sexo: - ♂ adultos expostos por 2 semanas a 1000 ppm no substrato.	- Teste de não disjunção e perda cromossômica: sem alteração significativa. - Teste de letalidade recessiva ligada ao sexo: ↑ frequência mutações letais de apenas 2 a 3 vezes e menor do que 1%.	- Não foi utilizado controle positivo. - Falta de descrição do ensaio e da metodologia de análise estatística.	Negativo para aberração cromossômica. Positivo para mutação pontual.
Zimmering <i>et al.</i> , 1985 (AC)	99%	Teste de letalidade recessiva ligada ao sexo: - ♂ adultos expostos: - Na alimentação: 1000 e 10000 ppm (acasalados após 72 h de exposição). - Injeção: 10000 ppm (após 24h).	- Não houve ↑ na frequência de indução de mutação letal.	- Ponto forte: estudo cego.	Negativo para mutação pontual.
Tripathy <i>et al.</i> , 1993 (AC)	98%	Teste de letalidade recessiva ligada ao sexo - Larvas expostas por 48 e 72h a 2,5; 5,0 e 10,0 mM de 2,4-D (essa última=DL ₅₀) em meio de cultura.	- 5,0 e 10,0 mM; 48h: ↑ significativo frequência de mutação recessiva letal. - 2,5; 5,0 e 10,0 mM; 72h: ↑ significativo frequência de mutação recessiva letal, igual ou superior a 5 vezes e maior ou igual a 1%, permitindo a extrapolação do resultado para mamíferos como evidência de carcinogenicidade (Vogel, 1999). - Relação dose-resposta.	- Não foi utilizado controle positivo.	Positivo para mutação pontual.
Kale <i>et al.</i> , 1995 (AC)	PF	Teste de letalidade recessiva ligada ao sexo: - ♂ adultos expostos por todo o período larval, até a pupação a 10.000 ppm de 2,4-D no meio (CL ₅₀).	- ↑ significativo frequência de mutações letais, inferior a 5 vezes e a 1%.	- Concentração de 2,4-D no PF não informada. - Ausência de controle positivo. - Experimentos com controles negativos não simultâneos aos tratamentos. - Todos compostos testados (7 herbicidas e 2 inseticidas) foram positivos.	Positivo para mutação pontual.

Legenda: AC= artigo científico; NI= não informado; PF= produto formulado.

6.1.5 Testes *in vivo* em células somáticas e germinativas de mamíferos

Existem diversos testes de micronúcleo *in vivo* realizados em camundongos e protocolados pelas empresas registrantes de 2,4-D na Anvisa, além de um estudo publicado na literatura científica, todos com resultados claramente negativos ou considerados inconclusivos pela Anvisa, conforme pode ser observado no quadro 14. Em contrapartida, alguns artigos que utilizaram avaliações citogenéticas possuem resultados positivos, conforme quadro 15.

Apesar de haver na literatura quatro ensaios citogenéticos (com exposição intraperitoneal e oral) considerados pelos seus autores como positivos, dois deles foram julgados inconclusivos pela Anvisa, devido a importantes limitações. Além dos estudos descritos no quadro 15, Adhikari e Grover (1988) citam que Pilinskaya e colaboradores (1974) verificaram a indução de aberrações cromossômicas pelo 2,4-D em camundongos por meio de testes citogenéticos. A Fiocruz, na nota técnica enviada à Anvisa (Friedrich, 2014), também cita esse autor e informa que o estudo foi realizado com doses extremamente altas de 2,4-D (100-300 mg/kg) por via oral. No entanto, não foi possível analisar o estudo, pois o artigo é russo.

Com relação ao ensaio de Amer e Aly (2001) para detecção de anomalias na cabeça dos espermatozoides, os efeitos ocorreram apenas nas doses mais altas, não tendo sido observados em outros estudos da literatura ou nos estudos crônicos realizados pela Força Tarefa, que não identificaram efeitos do 2,4-D na qualidade, motilidade ou morfologia espermáticas. Também não foram observadas alterações histopatológicas relevantes nos testículos dos animais tratados com 2,4-D nos estudos crônicos que pudessem corroborar os resultados encontrados por Amer e Aly (2001), exceto em doses com evidente toxicidade sistêmica, conforme já discutido no item 5 da parte II deste parecer.

A Fiocruz (Friedrich, 2014) descreve que não foram verificadas aberrações cromossômicas quando a exposição ao 2,4-D deu-se pela via intraperitoneal, concluindo que a via de exposição pode ser determinante para desencadear a toxicidade do 2,4-D e que as diferenças de resultados entre alguns estudos pode se dar pela diferença de via de exposição. No entanto, essas diferenças parecem estar mais relacionadas aos tipos de testes utilizados do que à via de exposição, já que os testes de micronúcleo foram consistentemente negativos mas, dentre os citogenéticos, há

resultados positivos. Além disso, um dos estudos citogenéticos considerado positivo (Adhikari e Grover, 1988) verificou a ocorrência de aberrações cromossômicas após injeção intraperitoneal de 2,4-D, via essa considerada não relevante para a exposição humana.

Venkov e colaboradores (2000) citam que as variações nos resultados sobre o potencial genotóxico do 2,4-D em diferentes tipos de ensaios podem ser devidas à sensibilidade das células testadas e aos protocolos experimentais utilizados e acreditam que o perigo de dano genético a partir da exposição a formulações comerciais de 2,4-D não deve ser ignorado.

Diante desses fatos e da ausência de estudo citogenético realizado conforme protocolos internacionalmente reconhecidos, a Anvisa solicitou que a Força Tarefa protocolasse estudos de mutagenicidade realizados com o 2,4-D conforme as seguintes diretrizes vigentes da OECD: 475 - Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test (de 2014) e 483 - Mammalian Spermatogonial Chromosome Aberration Test (de 1997). Em resposta, a Força Tarefa argumentou que não conduziu ensaio citogenético com base exclusivamente na sua prerrogativa de escolher a metodologia que julga mais pertinente para avaliação de aberrações cromossômicas, tendo optado pela condução de ensaios de micronúcleo ao invés de ensaio citogenético. A Força Tarefa apresentou alguns argumentos válidos para essa escolha, reafirmou a negatividade dos ensaios e a dispensabilidade da condução de outros experimentos. Todavia, conforme já descrito, os ensaios de micronúcleo da literatura realizados com o 2,4-D são geralmente negativos, enquanto os citogenéticos são positivos. Portanto, para dirimir essa dúvida seria importante a realização de ensaios citogenéticos pela Força Tarefa, para se concluir com certeza sobre a ausência de mutagenicidade do 2,4-D.

Entretanto, os resultados positivos verificados nos ensaios citogenéticos realizados em roedores não foram confirmados pelo ensaio citogenético realizado com homens expostos ocupacionalmente ao 2,4-D realizado por Garry e colaboradores (2001). Esses autores não verificaram relação entre os níveis urinários de 2,4-D e a indução de aberrações cromossômicas, conforme descrito no item a seguir (6.1.6), sendo possível afirmar que há insuficiência de evidência para classificar o 2,4-D como indutor de aberrações cromossômicas.



Quadro 14. Avaliação da mutagenicidade do 2,4-D *in vivo* em células somáticas de camundongos por meio de ensaios de micronúcleo.

Referência	Pureza (ea)	Delineamento	Resultados	Limitações, inconsistências e considerações relevantes	Conclusões da Anvisa
Jenssen e Renberg, 1976 (AC)	NI (concentração de dioxina < 1ppm)	- Camundongos CBA ♂. - Injeção intraperitoneal: 100 mg/kg - 2,4-D quantificado no plasma e nas células da medula óssea e do sangue periférico em 2 animais/grupo, 4 ou 24h após a administração.	- Citotoxicidade após 24h (fraco efeito na atividade mitótica). - 2,4-D alcançou sangue e medula óssea em 4h. Doses começaram a ↓ em 24h (plasma sanguíneo mas não medular)	- Pequeno número de animais (3). - Avaliados apenas ♂. - Utilizada apenas 1 dose. - Via intraperitoneal não indicada (não é via pretendida de exposição humana).	Negativo
Ivett, 1990 (RE)	96,1%	- Camundongos ICR. - Gavagem: 40; 133 e 400mg/kg	- 400 mg/kg: 3 ♂ morreram 42h após a gavagem e 1 após 72h; observada citotoxicidade. - 133 mg/kg: 1/5 ♀ com 0,8% de MN após 24h (resultado fora do esperado).	- Avaliados apenas 1000 PCE (conforme estabelecia a diretriz OECD 474 vigente à época, de 1983).	Negativo
Schop <i>et al.</i> , 1990 (AC)	NI	- Camundongos CD-1. Avaliação MN em células de medula óssea e de aberração nuclear em folículo piloso. - Aplicação tópica única: 1/8, 1/16 e 1/32 DL ₅₀ . - Eutanásia: 24h após aplicação.	- Não houve ↑ significativo de MN nas células da medula óssea. - 1/8 DL ₅₀ : ↑ significativo e dose-dependente aberrações nucleares (folículo piloso).	- Não utilizada MDT. - Sem ↓ significativa da razão NCE/PCE: não é possível garantir que as doses utilizadas são relevantes e alcançaram a medula óssea. - Não realizado no tempo de 48h.	Inconclusivo para aberração cromossômica Positivo para aberração nuclear
Erdtmann, 1994a (RE)	95,0%	- Camundongos Swiss Webster. - Gavagem: 45, 90 e 180 mg/kg (divididas em 2 doses espaçadas em 24h)	- 180 mg/kg: 1 animal morreu.	-	Negativo
Erdtmann, 1994b (RE)	90,0% a 75%	- Camundongos Swiss Webster. - Gavagem: 112,5; 225 e 450 mg/kg (divididas em 2 doses espaçadas em 24h)	- 450 mg/kg: observada toxicidade (↓ 16% PCE: não significativa).	-	Negativo
Perina, 1998 (RE)	97,1%	- Camundongos Swiss. - Gavagem: 562,5mg/kg (75% da DL ₅₀) - Eutanásia 12, 36 e 72h após gavagem (na verdade 16, 40 e 70h após).	-	- Avaliados apenas 1000 MN/PCE e /NCE. - Utilizada apenas 1 dose. - Períodos inadequados de eutanásia após gavagem (desacordo com OECD). - Controles positivos com incidência muito baixa de MN/PCE (0 a 5/1000).	Inconclusivo
Charles <i>et al.</i> , 1999a	Várias formas (50,1-98%)	- Camundongos CD-1 e ICR. - Gavagem: 37,5 a 542 mg/kg - Eutanásia 24, 48 e 72h após gavagem (na verdade 16, 40 e 70h após).	- Não houve ↑ significativo na frequência de MN.	- Não houve redução na razão NCE/PCE.	Negativo

Legenda: ea= equivalente ácido; AC= artigo científico; DMA= sal de dimetilamina; RE= relatório de estudo protocolado na Anvisa; NI= Não informado; MN= micronúcleos; MDT= máxima dose tolerada; NCE= eritrócitos normocromáticos ; PCE= eritrócitos policromáticos. Quadro continua na próxima página.



Continuação Quadro 14. Avaliação da mutagenicidade do 2,4-D *in vivo* em células somáticas de camundongos por meio de ensaios de micronúcleo.

Referência	Pureza (ea)	Delineamento	Resultados	Limitações, inconsistências e considerações relevantes	Conclusões da Anvisa
Hosomi, 2006 (RE)	98,39%	Camundongos Swiss - Gavagem: 31,2; 62,5 e 125 mg/kg (divididas em 2 doses espaçadas em 24h)	- 125 mg/kg foi a MTD.	- Avaliados de 1500 a 3000 PCE.	Negativo
Flügge, 2009a (RE)	98,4%	- Camundongos NMRI. - Gavagem: 50, 100 e 200 mg/kg	- 200 mg/kg: MDT, animais apresentaram sinais de toxicidade geral.	-	Negativo

Legenda: ea= equivalente ácido; AC= artigo científico; DMA= sal de dimetilamina; RE= relatório de estudo protocolado na Anvisa; NI= Não informado; MN= micronúcleos; MDT= máxima dose tolerada; NCE= eritrócitos normocromáticos ; PCE= eritrócitos policromáticos.



Quadro 15. Avaliação da mutagenicidade do 2,4-D *in vivo* em células somáticas e germinativas de roedores por ensaios citogenéticos.

Referência	Pureza	Delineamento	Resultados	Limitações, inconsistências e considerações relevantes	Conclusões da Anvisa
Adhikari e Grover, 1988 (AC)	NI	Avaliação de aberrações cromossômicas em células de medula óssea de ratos Wistar ♂. - Injeção intraperitoneal: 2 em um intervalo de 24 h. - Doses: 17,5; 35 e 70 mg/kg/dia. - Avaliação após 6 h.	- 35 e 70 mg/kg/dia: ↑ estatisticamente significativo na frequência de quebras cromossômicas e na porcentagem total de células com aberrações. - Quebras de cromátide, fragmentos de cromatina, cromossomos em anel, dicêntricos, pulverizados e células poliploides.	- Avaliados apenas ♂. - Ensaio não realizado com a MDT. - Via ip não indicada: não prediz a exposição humana. - Menor número de animais no grupo controle negativo (apenas 2), o que provavelmente comprometeu o resultado, pois a % de células com aberração nos grupos tratados foi muito próxima à do controle e, mesmo assim, observou-se diferença estatística. - Não determinou índice mitótico (para confirmar a exposição da medula) e não avaliou a curva de tendência. - Avaliadas 40 a 50 metáfases/animal (diretriz OECD atual exige 200). - Amostras devem ser coletadas 12-18h após injeção, para que tenha sido completado 1,5 ciclo celular.	Inconclusivo para aberrações cromossômicas.
Venkov, 2000 (AC)	100%	Avaliação de aberrações cromossômicas em células de medula óssea de camundongos C57bl ♂ e ♀. - Injeção intraperitoneal (ip): 3,5 mg/kg. - Avaliação após 12h e 24h.	- Quebras, deleções e trocas: - 12h: 3,38% das células com cromossomos aberrantes. - 24h: 5,5% das células com cromossomos aberrantes e ↑ significativo de fusões centroméricas (translocações robertsonianas): efeito clastogênico. - 12h: ↓ índice mitótico (esperada e momentânea). - 24h: índice mitótico dobrou. - 2,4-D alcançou o alvo (efeito tóxico).	- Números diferentes de animais em cada grupo. - Analisadas apenas 100 metáfases/animal (a diretriz atual exige 200). - A via ip não é a mais indicada, pois não prediz a exposição humana. - Administração de uma única dose. - Os autores descreveram que houve um aumento significativo de fragmentos acêntricos no grupo analisado 24h após a administração do 2,4-D; entretanto, o número de fragmentos observados no controle foi superior ao desse grupo.	Positivo para aberrações cromossômicas.
Amer e Aly, 2001 (AC)	98%	Avaliação de aberrações cromossômicas em células de medula óssea de camundongos Swiss ♂. - Gavagem: 1,7; 3,3 e 33 mg/kg. - 1,7 e 3,3 mg/kg: tratados por 1, 3 ou 5 dias; eutanásia 24 e 48h após última dose. - 33 mg/kg: tratados por 1 dia.	- 3,3 mg/kg (3 e 5 dias; eutanásia após 24 e 48h) e 33 mg/kg (1 dia; após 24 e 48h): ↑ dose-dependente e estatisticamente significativo na % de aberrações cromossômicas (estruturais e numéricas).	- Utilizado controle não tratado, ao invés de tratado com o veículo. - O ensaio não foi realizado com a MDT. - Utilizado teste "t" na análise estatística para comparar os grupos. - Tempo longo para a coleta das amostras. - Apenas 100 metáfases/animal (ideal são 200). - Dentre as aberrações foram incluídas lacunas e poliploidias. - Não determinou o índice mitótico, que permite verificar a ocorrência de exposição da medula óssea.	Positivo para aberrações cromossômicas.

Legenda: AC= artigo científico; NI= não informado; MDT= máxima dose tolerada. Quadro continua na próxima página.



Continuação Quadro 15. Avaliação da mutagenicidade do 2,4-D *in vivo* em células somáticas e germinativas de roedores por ensaios citogenéticos.

Referência	Pureza	Delineamento	Resultados	Limitações, inconsistências e considerações relevantes	Conclusões da Anvisa
Amer e Aly, 2001 (AC)	98%	Avaliação de aberrações cromossômicas em espermátocitos: - Camundongos Swiss ♂. - Gavagem: - 1,7 mg/kg (1/200 DL ₅₀): tratados por 1, 3 ou 5 dias e eutanasiados 24h após a última administração. - 3,3 mg/kg (1/100 DL ₅₀): tratados por 1, 3 ou 5 dias e eutanasiados 24 ou 48 h ou 7 dias após a última gavagem. - 33 mg/kg (1/10 DL ₅₀): tratados por 1 dia e eutanasiados 24 ou 48 h ou 7 dias após a última gavagem.	- 3,3 mg/kg (por 3 e 5 dias, e após 24 e 48h) e 33 mg/kg (por 1 dia, após 24 e 48h): ↑ estatisticamente significativo na porcentagem de aberrações cromossômicas nos espermátocitos. - Principal tipo de aberração cromossômica: separação de univalentes, principalmente nos cromossomos sexuais. - Lacunas, fragmentos e quebras observados em baixa frequência. - Efeitos diminuíram com o aumento do tempo de eutanásia após o tratamento.	- Utilizado como controle negativo animal não tratado. - Utilizado Teste “t” na análise estatística para comparar os grupos. - A máxima dose utilizada foi baixa. - O n° total de espermatozoides foi diferente entre os grupos; a diferença chegou a 18% entre o controle positivo e negativo. - Não foram apresentados os resultados de aberrações cromossômicas sem as lacunas. - Há divergência entre os valores de aberração cromossômica da tabela e do texto. - A incidência predominante de univalentes pode ser decorrente de outros fatores além da indução pelo 2,4-D. Segundo as diretrizes OECD 475, é essencial que as células analisadas possuam 2n+2 (informação não fornecida neste estudo), pois o procedimento de fixação pode levar à quebra cromossômica na metáfase, com perda cromossômica, portanto, artefatos podem ser causadores de univalência (Allen <i>et al.</i> , 1986). Além disso, esse tipo de ensaio não é indicado para detecção de aberrações numéricas (Diretriz OECD 475). Ainda, camundongos Swiss apresentam uma incidência alta e variável de univalentes, especialmente em cromossomos sexuais (Gollapudi <i>et al.</i> , 1981) e a univalência não necessariamente leva à aneuploidia, sendo portanto um critério de análise indireto e questionável (Allen <i>et al.</i> , 1986; Liang <i>et al.</i> , 1986; Appels <i>et al.</i> , 1998).	Inconclusivo para aberração cromossômica.
Amer e Aly, 2001 (AC)	98%	Avaliação de anomalias na cabeça dos espermatozoides: - Camundongos Swiss ♂. - Gavagem: 3,3 (1/100 DL ₅₀); 33 (1/10 DL ₅₀) e 82,5 mg/kg (1/4 DL ₅₀). - Tratados por 5 dias consecutivos e eutanasiados 35 dias após a 1ª dose.	- 33 e 82,5 mg/kg: ↑ dose-dependente estatisticamente significativo na porcentagem de anomalias nas cabeças dos espermatozoides.	-	Positivo para anomalias nos espermatozoides.

Legenda: AC= artigo científico.

6.1.6 Teste com células de humanos expostos ao 2,4-D

Diversos autores verificaram aumento de aberrações cromossômicas em linfócitos de trabalhadores expostos ocupacionalmente a misturas de agrotóxicos, que incluíam o 2,4-D (Yoder *et al.*, 1973; Zeljezic e Garaj-Vrhovac, 2000; Zeljezic e Garaj-Vrhovac, 2001; Zeljezic e Garaj-Vrhovac, 2002). No entanto, conforme demonstrado pelos artigos descritos no quadro 16, quando a análise se restringe exclusivamente a aplicadores de 2,4-D ou de herbicidas fenoxiacéticos, os resultados encontrados são negativos (Mustonen *et al.*, 1986; Figgs *et al.*, 2000). Vale ressaltar que os dados experimentais de Figgs e colaboradores (2000) são os mesmos de Holland e colaboradores (2002) e, portanto, os últimos não foram incluídos no quadro 16, já que o artigo de Figgs foi publicado primeiramente e apresentava informações mais completas, como a idade dos aplicadores avaliados.

Garry e colaboradores (2001) verificaram, em ensaio citogenético, aumento de aberrações cromossômicas em linfócitos de trabalhadores que aplicavam um amplo espectro de herbicidas, inclusive 2,4-D. No entanto, eles não encontraram relação entre as aberrações cromossômicas e os níveis urinários de 2,4-D, concluindo que a exposição aguda a altos níveis de 2,4-D, com ou sem o uso de adjuvantes, não está associada à ocorrência de danos cromossômicos. Da mesma forma, Figgs e colaboradores (2000) não verificaram uma relação entre a frequência de micronúcleos e os níveis urinários de 2,4-D e concluíram que esses dados sugerem que não há dano cromossômico humano em concentrações médias de 2,4-D variando entre 12 e 1285 ppb. Portanto, os dados de micronúcleo em células humanas (Figgs e colaboradores, 2000) corroboram os achados *in vivo* em roedores, confirmando que não é possível detectar aberrações cromossômicas por esse tipo de ensaio após exposição ao 2,4-D.

Quadro 16. Avaliação da mutagenicidade em humanos expostos ao 2,4-D.

Referência	Delineamento	Resultados	Limitações, inconsistências e considerações relevantes	Conclusões da Anvisa
Mustonen <i>et al.</i> , 1986 (AC)	Análise de aberrações cromossômicas em linfócitos periféricos: - Aplicadores exclusivamente de herbicidas fenoxiacéticos, que utilizaram principalmente produtos formulados com 333 g/L de 2,4-D + 167 g/L de MCPA e 550 g/L de 2,4-D (sal de amina). - Coleta de amostras de sangue após a temporada de aplicação (aplicadores expostos entre 6 e 28 dias). - Verificação da concentração urinária de 2,4-D e dos níveis de 2,4-D na zona respiratória dos aplicadores.	- Não houve ↑ na incidência de aberrações cromossômicas nos linfócitos dos trabalhadores. - Não houve atraso na cinética do ciclo celular. - Observada grande variação nos níveis urinários de fenoxiácidos medidos nos aplicadores.	- Análise de aberrações cromossômicas em 100 células de cada indivíduo. - Não foi utilizada S9.	Negativo para aberrações cromossômicas.
Figgs <i>et al.</i> , 2000 (AC)	Avaliação do dano cromossômico (MN) e da proliferação celular: - Amostras de sangue e urina coletadas de 12 homens aplicadores exclusivamente de 2,4-D (entre 17 e 56 anos) e de 9 controles negativos (entre 19 e 32 anos). - Coletas antes do contato com o 2,4-D e ao final da observação (12 semanas ou até descontinuação do uso de 2,4-D). - Avaliação da exposição: entrevista, presença de 2,4-D na urina e registro diário das atividades.	- ↓ não significativa da frequência de MN após a exposição. - Não houve associação entre a concentração urinária de 2,4-D e a formação de MN. - ↑ índices de replicação dos linfócitos nos aplicadores expostos ao 2,4-D.	- A idade dos participantes variou mais no grupo experimental que no grupo controle.	Negativo para aberrações cromossômicas. Positivo para proliferação celular.
Garry <i>et al.</i> , 2001 (AC)	Análise de aberrações cromossômicas em linfócitos de aplicadores de agrotóxicos que utilizaram 2,4-D mais de 5 dias por ano: - Grupo exposto: 24 homens com idade média de 39,1 ± 2,9 anos - Grupo controle: homens com licença para aplicação de agrotóxicos, mas que não realizavam este trabalho. - Coleta de 2 amostras de urina e sangue: uma ao final do pico da estação de aplicação de 2,4-D e uma 6 semanas antes da temporada de aplicação seguinte.	- Baixa frequência de translocações cromossômicas, inversões, deleções, quebras e lacunas. - Essas aberrações foram ligeiramente maiores em trabalhadores que aplicaram mais de 1.000 galões durante a temporada (maioria aplicadores aéreos, que aplicam amplo espectro de herbicidas, incluindo o 2,4-D). - Ausência de relação entre os níveis urinários de 2,4-D e aberrações cromossômicas.	- Análise de 100 linfócitos em metafase/indivíduo. - Avaliaram os níveis urinários apenas de 2,4-D: as alterações observadas poderiam estar relacionadas a outros ingredientes ativos.	Negativo para aberrações cromossômicas.

Legenda: AC= artigo científico; MCPA=ácido 4-cloro-2-metilfenoxiacético; MN: micronúcleo; S9: ativação metabólica. Quadro continua na próxima página.

6.2 AVALIAÇÃO DAS EVIDÊNCIAS EXPERIMENTAIS DE GENOTOXICIDADE DO 2,4-D

A Fiocruz (Friedrich, 2014) havia demonstrado preocupação quanto ao estresse oxidativo promovido pelo 2,4-D devido à liberação de radicais livres, uma vez que esse mecanismo pode provocar mutações genéticas e induzir a formação de câncer. A liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) realmente vem sendo descrita como mecanismo de indução de mutações e até mesmo de tumores. Entretanto, não se pode generalizar, pois as substâncias possuem potenciais diferenciados de produção de EROs e, portanto, as consequências podem ter diferentes graduações, desde da inexistência desses efeitos até a direta associação entre estresse oxidativo e câncer. Além disso, o organismo possui proteínas capazes de reduzir os efeitos tóxicos das EROs, além de sistemas de reparo e outros mecanismos capazes de reverter danos oxidativos. Assim, nem toda substância genotóxica será carcinogênica (Barzilai e Yamamoto, 2004; USEPA, 2005).

Alguns estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram que o 2,4-D causa danos ao material genético por meio da produção de radicais livres (IPCS, 1984). Mustonen e colaboradores (1986), por exemplo, correlacionam de maneira genérica os fenoxiácidos à proliferação de peroxissomos, afirmando também que esse evento estaria associado à ocorrência de tumores em animais de experimentação. Eles concluem que agentes genotóxicos via produção de radicais de oxigênio são indutores fracos de trocas de cromátides irmãs e de mutações pontuais, mas possuem alta atividade clastogênica. Alinhados a essa hipótese, Madrigal-Bujaidar e colaboradores (2001) revelaram que o 2,4-D é capaz de induzir dano em hepatócitos por peroxidação lipídica e encontraram uma associação entre a peroxidação lipídica e o dano ao DNA.

Além dos estudos anteriormente citados, pode-se observar no quadro 17 que alguns outros ensaios revelam a ocorrência de genotoxicidade e citotoxicidade em decorrência da exposição ao 2,4-D. No entanto, esses resultados não parecem estar associados a um potencial mutagênico ou carcinogênico, uma vez que não foram identificados nos estudos específicos de mutagenicidade pontual e aberração cromossômica *in vitro* e *in vivo* ou nos estudos crônicos realizados em roedores.

Embora o 2,4-D tenha se mostrado genotóxico em ensaios que analisaram diferentes parâmetros como trocas de cromátides irmãs, danos aos DNA,



encurtamento de telômero, dentre outros, esses estão restritos a células expostas *in vitro*, sendo poucos os realizados com exposição *in vivo* em animais ou epidemiológicos. Além disso, muitos desses estudos foram realizados com produtos formulados. Von Stackelberg (2013) discute esse aspecto, afirmando que algumas associações positivas são verificadas após exposição a produtos comerciais contendo 2,4-D, mas não ao ácido ou sal de 2,4-D puro. Lin e Gary (2000) e Garry e colaboradores (1999) lembram que há adjuvantes indutores da proliferação celular. Ainda, achados positivos para genotoxicidade após exposição ocupacional ao 2,4-D podem ser decorrentes da exposição a misturas de agrotóxicos (Yoder *et al.*, 1973; Garry *et al.*, 2001; Hou *et al.*, 2013).

Assim, pode-se concluir que há efeito genotóxico, principalmente para as formulações à base de 2,4-D. No entanto, o conhecimento atual não permite concluir que essa genotoxicidade é relevante para a exposição humana no que diz respeito à indução de mutações ou de câncer. Essa diferenciação entre potencial genotóxico e mutagêncio deve ser sempre priorizada na análise da toxicidade de um agrotóxico, pois a proibição de registro de ingredientes ativos recai especificamente sobre o potencial de indução de mutagencidade pontual e de aberração cromossômica, não abrangendo a genotoxicidade como um todo, conforme já explicado no item 6 da parte II deste parecer.

Quadro 17. Estudos de genotoxicidade e citotoxicidade realizados com o 2,4-D.

Referência	Pureza	Delineamento	Resultados	Limitações, inconsistências e considerações relevantes	Conclusões da Anvisa
Linnainmaa, 1983 (AC)	PFs: - 333 g/L 2,4-D e 167 g/L MCPA (octilester), - 550 g/L de sal de amina de 2,4-D	Avaliação da troca de cromátides irmãs: - Coletadas 3 amostras de sangue sucessivas de 35 aplicadores homens durante a temporada de pulverização de herbicidas fenoxiacéticos. Examinados e entrevistados: história ocupacional, saúde e hábitos. - Controle: 15 homens que não trabalhavam com herbicidas. - Análise do 2,4-D na urina.	- Fumantes: ↑ significativamente maior de trocas de cromátides irmãs do que não fumantes. - Não houve diferença significativa na frequência de troca de cromátides irmãs antes, durante ou depois da exposição. - A média de troca de cromátides irmãs no controle negativo foi semelhante à média do grupo exposto ao 2,4-D.	- Exposição a herbicidas fenoxiacéticos e não exclusivamente ao 2,4-D	Negativo para troca de cromátides irmãs.
Linnainmaa, 1984 (AC)	PF: 550g/kg sal de amina de 2,4-D	Avaliação da indução de troca de cromátides-irmãs: - Linfócitos sanguíneos de ratos: 100 mg/kg de 2,4-D. - Células de medula óssea de hamsters chineses: a 100 mg/kg de 2,4-D - Células de ovário de hamster chinês: 10 ⁻⁵ , 10 ⁻⁴ e 10 ⁻³ de 2,4-D por 1h.	- Linfócitos sanguíneos de ratos e células da medula óssea de hamsters: não houve aumento na troca de cromátides-irmãs. - Células de ovário de hamster: sutil ↑ troca de cromátides-irmãs, mas sem diferença estatística ou dose-dependência na maioria dos grupos.	- Utilizado teste <i>t</i> de Student: provavelmente por isso houve 2 resultados com diferença estatística em relação ao controle para troca de cromátides-irmãs em células de ovário, mesmo ela sendo muito pequena em relação às demais.	Negativo para genotoxicidade.
Charles <i>et al.</i> , 1999b (AC)	Várias formas (50,1- 98%)	Avaliação da Síntese de DNA não programada em cultura de hepatócitos: - <i>In vitro</i> , ratos Fischer-344: Exposição: 18 a 20h. Várias formas 2,4-D: 0,5 a 478 µg/mL. - <i>In vivo</i> , ratos Han Wistar: 2,4-D por gavagem: 400 e 1000 mg/kg. Eutanásia após 2-4h ou 12-14h.	<i>In vitro</i> : nenhuma dose ou forma de 2,4-D excedeu o controle negativo em um valor ≥ 5 de granulação nuclear líquida (GNL) ou apresentou valor > 10% do controle negativo. <i>In vivo</i> : valores de GNL bem inferiores ao limiar estipulado (> 0; ao menos 20% células em reparo). - 400 e 1000 mg/kg : apenas 0,3% das células em reparo. Nenhum grupo com diferença estatística.	- Não foi apresentada justificativa para a escolha do limiar de positividade, entretanto isso não limitou o estudo.	Negativo para genotoxicidade.
Madrigal-Bujaidar <i>et al.</i> , 2001 (AC)	98,9%	Análise da troca de cromátides irmãs, do índice mitótico e da cinética de proliferação celular. -Células somáticas e germinativas de camundongos <i>in vivo</i> . - Gavagem: 50, 100 e 200 mg/kg.	- 100 e 200 mg/kg: ↑ significativo e dose dependente da troca de cromátides-irmãs em células somáticas e germinativas.	- Doses muito altas que podem não ser tão relevantes para a exposição humana.	Positivo para troca de cromátides irmãs. Negativo para índice mitótico e proliferação.

Legenda: AC= artigo científico; MCPA= ácido 4-cloro-2-metilfenoxiacético; PF= produto formulado. Quadro continua na próxima página.



Continuação Quadro 17. Estudos de genotoxicidade e citotoxicidade realizados com o 2,4-D.

Referência	Pureza	Delineamento	Resultados	Limitações, inconsistências e considerações relevantes	Conclusões da Anvisa
Garry <i>et al.</i> , 2001 (AC)	PF	Análise citogenética e da frequência de recombinações V(D)J por PCR para avaliação da instabilidade genômica (genotoxicidade): - Grupo exposto: 24 homens com idade média de 39,1 ± 2,9 anos - Grupo controle: homens com licença para aplicação de agrotóxicos, mas que não realizavam este trabalho. - Coletadas 2 amostras de urina (exposição ao 2,4-D) e sangue (genotoxicidade): final do pico da estação de aplicação de 2,4-D e 6 semanas antes da temporada seguinte.	- Recombinações V(D)J: relação direta com níveis urinários de 2,4-D durante temporada de aplicação. - ↑ significativo recombinações aplicadores manuais <i>versus</i> controles. Sem diferença entre aplicadores automatizados e manuais. - Aplicadores costais não apresentaram níveis detectáveis de recombinações no ano seguinte: mostra que é um efeito transitório. - > persistência das recombinações: trabalhadores mais antigos; expostos a > variedade ou volume de agrotóxicos; aplicadores aéreos.	Avaliação dos níveis urinários apenas do 2,4-D: alterações podem estar relacionadas a outros ingredientes ativos.	Positivo para recombinação (genotoxicidade).
Nair <i>et al.</i> , 2002 (AC)	95%	Avaliação de quebras de DNA por marcação radioativa da extremidade 5' de DNA isolado de sangue de trabalhadores expostos a agrotóxicos. - Doses: 20, 40, 60 ou 80 µg por 1h.	Não houve aumento significativo de quebras de DNA.	- Características amostras sanguíneas utilizadas para obtenção do DNA não informadas.	Negativo para genotoxicidade.
Sorensen <i>et al.</i> , 2005 (AC)	NI	Avaliação da genotoxicidade por eletroforese em gel em células de ovário de hamsters chinês. - Doses: 200 µM a 4 mM por 4h.	- Viabilidade celular acima de 80%. - Não houve aumento em relação ao controle na porcentagem de fragmentos migrantes de DNA.	-	Negativo para genotoxicidade.
González <i>et al.</i> , 2005 (AC)	IA puro: 100% PF: 60,2g sal de dimetilami na 2,4-D/100 mL.	Avaliação da viabilidade celular, da troca de cromátides irmãs, da cinética do ciclo celular e do índice mitótico pelo ensaio de cometa, dentre outros parâmetros em células de ovário de hamster chinês. - Concentrações: 2; 6 e 10 µg/ml por 90 min (cometa e viabilidade) e por 24 ou 36h nos demais ensaios.	- 6 e 10 µg/ml - 24 e 36h: ↑ dose-dependente troca de cromátides-irmãs e ↓ índice mitótico. - 2; 6 e 10 µg/ml - 90 min: ↑ significativo e dose dependente de quebras de fitas de DNA. - 36h: não houve dose-dependência (100% de células com danos no DNA em vários grupos). - Sem danos leves, graves ou ↓ viabilidade células: padrão pode ser decorrente de reparo de DNA. - Ausência de alterações no ciclo celular.	- Análise estatística da troca de cromátides-irmãs por teste t de Student.	Positivo para genotoxicidade.
Maire <i>et al.</i> , 2007 (AC)	98%	Análise da transformação celular, apoptose e dano ao DNA pelo ensaio de cometa em células de embriões de hamster sírio. - Transformação: 4,5; 11,5; 23 e 34 µM. - Expressão c-Myc: 4,5; 11,5 e 23 µM (5h). - Apoptose: 4,5; 11,5 e 23 µM e 1-16 mM (5 ou 24h). - Expressão Bcl-2 e Bax: 4,5; 11,5 e 23 µM. - Dano DNA: 4,5; 11,5 e 23 µM (5 ou 24h).	- 11,5 e 23µM: ↑ transformação celular (mas não em 34 µM), ↑ expressão c-Myc. - 2 e 5 mM - 24h: indução de apoptose. Concentrações superiores altamente citotóxicas. - Não houve expressão de proteínas anti- e pró-apoptóticas. - 11,5 e 23 µM - 5 e 24h: indução de dano ao DNA.	- Evidência <i>in vitro</i> de alguns eventos relacionados à fase de iniciação tumoral, não corroborados pelos ensaios crônicos ou epidemiológicos. Podem não ser relevantes na carcinogênese.	Positivo para genotoxicidade.

Legenda: AC= artigo científico; IA= ingrediente ativo; PF= produto formulado. Quadro continua na próxima página.



Continuação Quadro 17. Estudos de genotoxicidade e citotoxicidade realizados com o 2,4-D.

Referência	Pureza	Delineamento	Resultados	Limitações, inconsistências e considerações relevantes	Conclusões da Anvisa
Soloneski <i>et al.</i> , 2007 (AC)	NI	Avaliação de troca de cromátides irmãs, progressão do ciclo celular e índice mitótico em linfócitos de cultura de sangue total e de plasma de humanos <i>in vitro</i> . - Amostras de sangue: 6 homens com idade inferior a 30 anos (não fumantes, não ingeriam álcool, não usavam medicação ou suplementos alimentares). - Doses: 10, 25, 50 e 100 µg/mL de 2,4-D ou 2,4-DMA por 72h.	Cultura de sangue total: - 10, 25, 50 µg/mL de 2,4-D; e 25 e 50 µg/mL de 2,4-DMA: ↑ significativo e dose-dependente troca de cromátides-irmãs. - 25 e 50 µg/mL - 2,4-D e 2,4-DMA: retardo significativo progressão do ciclo celular. - 100 µg/mL: completa morte celular. Linfócitos plasmáticos: - 2,4-D ou 2,4-DMA: sem diferença na troca de cromátides-irmãs. - 100 µg/mL - 2,4-D: retardo significativo progressão do ciclo celular. Progressiva inibição dose-dependente da atividade mitótica para as duas substâncias. Potencial genotóxico atingiu todas as culturas testadas, mas foi maior na presença de eritrócitos.	- Tempo de tratamento não especificado. - Não utilizou controle positivo nem ativação metabólica. - Dados de 3 experimentos independentes foram utilizados para determinar a média da frequência de troca de cromátides-irmãs.	Positivo para genotoxicidade.
Sandal e Yilmaz, 2010 (AC)	NI	Avaliação de dano ao DNA por ensaio de cometa em linfócitos humanos. - Obtidos de 15 não fumantes e 15 fumantes. - Doses: 1,5 e 10 µM por 1h.	- Viabilidade celular de 90%. - 1,5 e 10 µM - fumantes: ↑ significativo e dose-dependências na migração de DNA em linfócitos humanos de fumantes em relação ao respectivo controle. Sem ↑ significativo em não fumantes..	-	Negativo para genotoxicidade (não fumantes).
Hou <i>et al.</i> , 2013 (AC)	- Estudo epidemiológico: exposição a diversos agrotóxicos.	Análise do comprimento relativo de telômeros por RT-qPCR: - Células da mucosa bucal de humanos. - Grupo exposto: 1234 aplicadores de agrotóxicos do estudo de coorte Agricultural Health Study. - Questionário sobre o uso de agrotóxicos (1993 a 1997). - Coleta das células da mucosa bucal de 1999 a 2006. - DNA de referência: 60 indivíduos selecionados aleatoriamente na população.	- Associação entre a ↓ significativa do comprimento relativo de telômeros e o ↑ de dias de uso do 2,4-D, dentre outros agrotóxicos.	- Fumantes e mascadores de tabaco tinham telômeros mais longos. - ↓ comprimento relativo dos telômeros associada a outros 6 agrotóxicos além do 2,4-D. - Autores não descartam a possibilidade de viés devido a confundidores não controlados ou a associações ao acaso. - Possível associação de ingredientes ativos e presença de componentes inertes dificulta a análise.	Inconclusivo para genotoxicidade.

Legenda: AC= artigo científico; DMA= sal de dimetilamina do 2,4-D; IA= ingrediente ativo; PF= produto formulado.

6.3 AVALIAÇÃO DA MUTAGENICIDADE DO 2,4-D POR AGÊNCIAS REGULADORAS E ORGANISMOS INTERNACIONAIS

Em resposta a uma petição do Conselho Americano de Defesa dos Recursos Naturais (*Natural Resources Defense Council – NRDC*) alegando que o 2,4-D era mutagênico, a USEPA elaborou documento, baseado em dados de estudos, afirmando que o 2,4-D: (1) é consistentemente negativo em testes de mutação bacteriana com e sem ativação metabólica; (2) possui alguns resultados positivos para mutagenicidade em testes em leveduras, plantas e insetos; (3) possui resultados negativos para mutagenicidade em estudos em animais *in vivo* (teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos e testes de síntese não programada de DNA em hepatócitos de rato); e (4) possui resultados mistos de mutagenicidade e genotoxicidade em testes *in vitro* em células de mamíferos (USEPA, 2012).

A USEPA cita, ainda, que os resultados dos estudos realizados com drosófilas foram conflitantes, sendo observados efeitos positivos em larvas e efeitos negativos em adultos; e considera que os resultados positivos em insetos e leveduras têm menos peso do que os estudos em mamíferos, especialmente os realizados *in vivo*. A agência americana também descreve os resultados conflitantes do 2,4-D em ensaios citogenéticos em células de mamíferos *in vitro*: ele foi negativo para danos cromossômicos estruturais até uma dose insolúvel, mas positivo em altas doses na presença de ativação metabólica. No entanto, a USEPA discute que a evidência positiva tende a ser fraca e geralmente não apoiada pelos dados de citogenética *in vivo*. Informa também que o 2,4-D foi negativo nos testes de reparo de DNA em células de mamíferos e ressalta que os resultados negativos estão de acordo com a ausência de achados positivos observada nos estudos de carcinogenicidade realizados em roedores ou nos estudos epidemiológicos. A USEPA cita, inclusive, que a Força Tarefa assume que há alguns resultados positivos para estudos de mutagenicidade realizados com o 2,4-D, mas que o peso da evidência apóia a conclusão de que ele possui nenhuma ou mínima relação com a mutagenicidade em mamíferos (USEPA, 2012).

Por fim, a USEPA esclarece que, apesar de alguns efeitos citogenéticos terem sido observados e haver algumas evidências do potencial genotóxico do 2,4-D, no geral o padrão de respostas observado em testes *in vivo* e *in vitro* indica que o 2,4-D não é mutagênico. A agência americana conclui que possui pouca ou nenhuma preocupação

com efeitos mutagênicos hereditários deste ingrediente ativo em mamíferos (USEPA, 2012).

A EFSA, em seu último relatório de avaliação do risco do 2,4-D, publicado em setembro de 2014, também concluiu que os estudos disponíveis não mostram potencial genotóxico para 2,4 D, com base nas seguintes evidências: (1) o potencial do 2,4-D causar mutação pontual *in vitro* em células bacterianas foi negativo; (2) o potencial do 2,4-D induzir aberrações cromossômicas em células somáticas *in vivo* foi negativo; (3) o 2,4-D foi fracamente positivo no teste de mutação gênica *in vitro* em células de mamíferos, mas como esse teste apresentou certas limitações, as empresas foram requisitadas a submeter um novo teste *in vitro* para avaliação de mutação gênica em células de mamíferos, o qual foi negativo (Schisler, 2013), concluindo-se que o 2,4-D não induz mutações gênicas *in vitro*; (4) não foi submetido nenhum estudo para avaliação de aberrações cromossômicas *in vitro*, no entanto, a EFSA considerou que o potencial de clastogenicidade *in vivo* já havia sido adequadamente avaliado; (5) o teste de síntese não programada de DNA *in vitro* foi negativo; (6) o potencial mutagênico em células germinativas de drosófila foi positivo em alta dose, mas esse ensaio foi considerado de baixa validade, devido a diversas limitações, portanto, seu resultado não foi considerado na avaliação do potencial mutagênico do 2,4-D.

A agência canadense considerou em seu relatório de 2007 que os resultados dos testes *in vitro* e *in vivo* não demonstram mutagenicidade para o 2,4-D ou suas demais formas (PMRA, 2007).

Em junho de 2015, a IARC realizou reunião para análise da carcinogenicidade do 2,4-D, a partir da qual concluiu que, embora exista forte evidência de que o 2,4-D induz estresse oxidativo, há fraca evidência de genotoxicidade (IARC, 2015). Não foi possível comprovar a indução de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos e os experimentos em mamíferos e não mamíferos apresentam dados conflitantes (positivos e negativos) para aberrações cromossômicas. Entretanto, foi possível concluir que o 2,4-D não induz mutações pontuais. A IARC considerou crítico o fato de muitos estudos terem sido conduzidos com formulações comerciais e não com o ingrediente ativo puro, o que confere pouca relevância aos resultados. Ainda, os estudos epidemiológicos de exposição de trabalhadores apresentam confundidores importantes, como a exposição a diferentes agrotóxicos ou o não biomonitoramento de



2,4-D no sangue ou na urina dos indivíduos, prejudicando a atribuição denexo causal entre os resultados obtidos e a exposição ao 2,4-D (IARC, 2015).

6.4 CONCLUSÃO SOBRE A GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DO 2,4-D

Conforme descrito anteriormente, as agências reguladoras e os organismos internacionais concordam que existem algumas evidências de genotoxicidade para o 2,4-D, entretanto, eles não consideram que há suficiente peso de evidência para classificar o 2,4-D como mutagênico. Inclusive, a agência europeia acredita que alguns efeitos genotóxicos observados após exposição ao 2,4-D seriam explicados pela possível presença de dioxinas nos produtos mais antigos e que, da forma como o 2,4-D é atualmente produzido, é improvável que ele apresente potencial genotóxico para humanos (EFSA, 2014). Conforme discutido no item 2 da parte II deste parecer de análise, nos últimos anos houve melhorias dos processos de síntese do 2,4-D, de forma a controlar a formação de impurezas, principalmente de dioxinas.

O conjunto dos resultados negativos observados na literatura científica, nos relatórios de organismos internacionais e nos dossiês dos produtos registrados na Anvisa reforça a evidência de ausência de potencial mutagêncio do 2,4-D para mutação pontual e aberração cromossômica. O quadro 18 resume os resultados dos estudos avaliados para acessar a mutagenicidade do 2,4-D, ficando clara a falta de peso de evidência para mutação pontual e aberrações cromossômicas.

Portanto, não há suficiente peso de evidência para considerar o 2,4-D como sendo mutagênico, concluindo-se que ele não preenche os requisitos proibitivos de registro estabelecidos pelo Decreto 4.074, de janeiro de 2002, que estabelece a proibição do registro de agrotóxicos capazes de induzir mutações em dois testes, um para detectar mutações gênicas e outro para detectar mutações cromossômicas.

Em contrapartida, a avaliação revelou que a existência de resultados positivos de mutagenicidade para produtos formulados à base de 2,4-D poderia gerar preocupação com os produtos já registrados na Anvisa. Porém, todo produto formulado novo submetido a registro na Anvisa é avaliado em relação à mutagenicidade e, se os critérios definidos em lei forem preenchidos (proibitivos), ele não será aprovado.

Quadro 18. Resumo dos resultados dos estudos de mutagenicidade realizados com o 2,4-D.

Referência	Concentração	Tipo de ensaio	Parâmetro	Resultado
Lawlor e Valentine, 1990	2,4-D (96,1%)	<i>In vitro</i> Ames	Mutação pontual	NEGATIVO
Henriques, 1993	2,4-D (90,0%)	<i>In vitro</i> Ames	Mutação pontual	NEGATIVO
Henriques, 1994	2,4-D (95,0%)	<i>In vitro</i> Ames	Mutação pontual	NEGATIVO
Gava, 1998	2,4-D (97,1%)	<i>In vitro</i> Ames	Mutação pontual	NEGATIVO
Do Val, 2006	2,4-D (98,39%)	<i>In vitro</i> Ames	Mutação pontual	NEGATIVO
Flügge, 2009b	2,4-D (98,4%)	<i>In vitro</i> Ames	Mutação pontual	NEGATIVO
Venkov <i>et al.</i> , 2000	2,4-D (100%)	<i>In vitro</i> Mutação reversa em levedura	Mutação pontual	POSITIVO
Tripathy <i>et al.</i> , 1993	2,4-D (98%)	<i>In vivo</i> Teste de Mancha da Asa em drosófila	Mutação pontual e Aberração cromossômica	INCONCLUSIVO
Graf e Wurgler, 1996	NI	<i>In vivo</i> Teste da Mancha da Asa em drosófila	Mutação pontual	INCONCLUSIVO
Graf e Wurgler, 1996	NI	<i>In vivo</i> Teste da Mancha do Olho em drosófila	Mutação pontual	NEGATIVO
Vogel e Chandler, 1974	NI	<i>In vivo</i> Letalidade recessiva ligada ao sexo em drosófila (células germinativas)	Mutação pontual	NEGATIVO
Magnusson <i>et al.</i> , 1977	2,4-D (100%)	<i>In vivo</i> Não disjunção e perda cromossômica em drosófila (células germinativas)	Mutação pontual	POSITIVO
Magnusson <i>et al.</i> , 1977	2,4-D (100%)	<i>In vivo</i> Não disjunção e perda cromossômica em drosófila (células germinativas)	Aberração cromossômica	NEGATIVO
Zimmering <i>et al.</i> , 1985	2,4-D (99%)	<i>In vivo</i> Letalidade recessiva ligada ao sexo em drosófila (células germinativas)	Mutação pontual	NEGATIVO
Tripathy <i>et al.</i> , 1993	2,4-D (98%)	<i>In vivo</i> Letalidade recessiva ligada ao sexo em drosófila (células germinativas)	Mutação pontual	POSITIVO
Kale <i>et al.</i> , 1995	PF	<i>In vivo</i> Letalidade recessiva ligada ao sexo em drosófila (células germinativas)	Mutação Pontual	POSITIVO
Ahmed <i>et al.</i> , 1977	NI	<i>In vitro</i> Resistência à Ouabaina em células de hamster V79	Mutação pontual	INCONCLUSIVO
Korte e Jalal, 1982	NI	<i>In vitro</i> Aberração em células humanas	Aberração cromossômica	NEGATIVO
Mustonen <i>et al.</i> , 1986	2,4-D (100%)	<i>In vitro</i> Aberração em células humanas	Aberração cromossômica	NEGATIVO
Pavlica <i>et al.</i> , 1991	NI	<i>In vitro</i> HGPRT em células de hamster V79	Mutação pontual e Aberração cromossômica	INCONCLUSIVO

Quadro continua na próxima página.

Continuação Quadro 18. Resumo dos resultados dos estudos de mutagenicidade realizados com o 2,4-D.

Referência	Concentração	Tipo de ensaio	Parâmetro	Resultado
Durward, 1994	2,4-D (99,8%)	<i>In vitro</i> HPRT em células de camundongos L5178Y	Mutação pontual e Aberração cromossômica	INCONCLUSIVO
Holland <i>et al.</i> , 2002	2,4-D (98%)	<i>In vitro</i> Micronúcleo em células humanas	Aberração cromossômica	NEGATIVO
Schisler, 2013	2,4-D (98,7%)	<i>In vitro</i> HPRT em células de ovário de hamster chinês	Mutação pontual e Aberração cromossômica	NEGATIVO
Jenssen e Renberg, 1976	NI	<i>In vivo</i> Micronúcleo	Aberração cromossômica	NEGATIVO
Ivett, 1990	2,4-D (96,1%)	<i>In vivo</i> Micronúcleo	Aberração cromossômica	NEGATIVO
Schop <i>et al.</i> , 1990	2,4-D (96,1%)	<i>In vivo</i> Micronúcleo	Aberração cromossômica	INCONCLUSIVO
Erdtmann, 1994a	2,4-D (95,0%)	<i>In vivo</i> Micronúcleo	Aberração cromossômica	NEGATIVO
Erdtmann, 1994b	2,4-D (90,0 – 75%)	<i>In vivo</i> Micronúcleo	Aberração cromossômica	NEGATIVO
Perina, 1998	2,4-D (97,1%)	<i>In vivo</i> Micronúcleo	Aberração cromossômica	INCONCLUSIVO
Charles <i>et al.</i> , 1999a	2,4-D (50,1 – 98%)	<i>In vivo</i> Micronúcleo	Aberração cromossômica	NEGATIVO
Hosomi, 2006	2,4-D (98,39%)	<i>In vivo</i> Micronúcleo	Aberração cromossômica	NEGATIVO
Flügge, 2009a	2,4-D (98,4%)	<i>In vivo</i> Micronúcleo	Aberração cromossômica	NEGATIVO
Adhikari e Grover, 1988	NI	<i>In vivo</i> Citogenético em medula óssea	Aberração cromossômica	INCONCLUSIVO
Venkov, 2000	2,4-D (100%)	<i>In vivo</i> Citogenético em medula óssea	Aberração cromossômica	POSITIVO
Amer e Aly, 2001	2,4-D (98%)	<i>In vivo</i> Citogenético em medula óssea	Aberração cromossômica	POSITIVO
Amer e Aly, 2001	2,4-D (98%)	<i>In vivo</i> Citogenético em espermatozoides	Aberrações cromossômicas	INCONCLUSIVO
Amer e Aly, 2001	2,4-D (98%)	<i>In vivo</i> Anomalias espermatozoides	Anomalias espermatozoides	POSITIVO
Mustonen <i>et al.</i> , 1986	Epidemiológico (MCPA e 2,4-D)	<i>In vivo</i> Citogenético em linfócitos humanos	Aberrações cromossômicas	NEGATIVO
Figgs <i>et al.</i> , 2000	Epidemiológico (2,4-D)	<i>In vivo</i> Micronúcleo em linfócitos humanos	Aberrações cromossômicas	NEGATIVO
Garry <i>et al.</i> , 2001	Epidemiológico (2,4-D)	<i>In vivo</i> Citogenético em linfócitos humanos	Aberrações cromossômicas	NEGATIVO

7 TOXICIDADE DO 2,4-D PARA A REPRODUÇÃO E PARA O DESENVOLVIMENTO E ALGUNS PARÂMETROS ENDÓCRINOS

Conforme discutido no item 3 (toxicocinética), os testículos e ovários são alvos do 2,4-D, o que gera preocupações sobre os possíveis efeitos desse ingrediente

ativo na reprodução e no desenvolvimento embrio-fetal e pós-natal. Lindquist e Ullberg (1971) verificaram que o 2,4-D atravessa a placenta de camundongos e Stürtz e colaboradores (2006) demonstraram que o 2,4-D é transferido a ratos neonatos pelo leite materno.

Diversos estudos descritos a seguir avaliaram o potencial embriofetotóxico e teratogênico do 2,4-D, além de seu efeito na prole após exposição por uma ou duas gerações.

Há também estudos epidemiológicos que avaliaram a associação entre a exposição a herbicidas clorofenóxi e ao 2,4-D com malformações congênitas e problemas reprodutivos, os quais também serão discutidos neste item.

7.1 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EMBRIOFETOTÓXICO E TERATOGENICO DO 2,4-D EM ANIMAIS

Foi realizada análise detalhada dos estudos que avaliaram o potencial embriofetotóxico e teratogênico do 2,4-D em ratos e coelhos pela Força Tarefa 2,4-D e de estudos publicados na literatura.

Conforme pode ser verificado no quadro 19, que inclui apenas os dados mais relevantes dos estudos realizados pela Força Tarefa 2,4-D, ratas expostas a 75 mg/kg de 2,4-D durante o período de organogênese apresentaram aumento não significativo de fetos com variações esqueléticas; dose essa que já causou uma inibição não significativa do ganho de peso materno. Em coelhos, a dose de 90 mg/kg de 2,4-D causou toxicidade materna (diminuição do ganho de peso e alterações comportamentais) e abortos, sem qualquer outro efeito relevante nos fetos.

Ao encontro do que foi observado nos estudos protocolados na Anvisa, estudos publicados na literatura, sucintamente descritos no quadro 20, também mostraram aumento na incidência de variações esqueléticas em fetos de ratas expostas durante a organogênese a doses superiores a 75 mg/kg de 2,4-D. As fêmeas prenhes expostas a doses maiores (100 e 115 mg/kg) apresentaram alterações comportamentais e letalidade acentuada.

Os estudos demonstraram de forma consistente que o 2,4-D não alterou o desempenho reprodutivo, os índices de fertilidade e gestação, o tamanho da ninhada e a razão sexual.



Vale ressaltar que na literatura há outros estudos que avaliaram o potencial teratogênico do 2,4-D, porém esses foram realizados em desacordo com as diretrizes internacionalmente reconhecidas e apresentam inúmeras limitações, por isso não foram incluídos nos quadros que se seguem. Como exemplo, Fofana e colaboradores (2000) relatam ter evidenciado aumento significativo de malformações renais e urogenitais em fetos de ratas expostas a doses superiores a 70 mg/kg de 2,4-D. No entanto, o estudo utiliza um número de animais muito inferior ao recomendado (apenas cinco fêmeas prenhes por dose, enquanto as diretrizes da OECD estabelecem um mínimo de dezesseis) e o resultado obtido não foi replicado por nenhum outro estudo. Inclusive, em um estudo posterior desses mesmos autores (Fofana *et al.*, 2002), que avaliou a sobrevivência pós-natal de ninhadas expostas ao 2,4-D durante a organogênese, não foram identificadas malformações nos animais que sobreviveram até o 28º dia pós natal, apesar de os autores terem atribuído o aumento de mortes verificado nos grupos tratados às possíveis malformações urogenitais dos filhotes. Vale ressaltar que esse último estudo também utilizou um número de animais muito inferior ao recomendado (apenas três fêmeas prenhes por dose).

Outro exemplo de estudo que utilizou o 2,4-D e apresenta limitações foi o realizado por Dinamarca e colaboradores (2007), que informaram não terem evidenciado alterações no desenvolvimento após tratarem camundongos dos dias zero a nove de gestação com doses de até 100 mg/kg de 2,4-D, período de exposição que está em desacordo com os protocolos internacionalmente aceitos.



Quadro 19. Descrição dos resultados dos estudos que avaliaram o potencial embriofetotóxico e teratogênico do 2,4-D.

Espécie, linhagem e número animais	Via	Idade e período de exposição	Pureza	Doses (mg/kg/dia)	Resultados relevantes	NOAEL (mg/kg/dia)	Referência
- Ratos (CDF Fischer 344) - 35 ♀ prenhes/dose	Oral (gavagem) Veículo: óleo de milho	- Idade no início do teste: ~ 20 semanas - Exposição: DG 6 a 15 (organogênese) - Eutanásia: DG 20	97,5%	0; 8; 25; 75	- 75 mg/kg: inibição não significativa do ganho de peso materno, principalmente nos primeiros quatro dias de tratamento (DG 6 a 10). - 75 mg/kg: ↑ não significativo da incidência de fetos e de ninhadas com variações esqueléticas, possivelmente relacionadas à exposição ao 2,4-D: esternóbrios leve ou moderadamente desalinhados (↑ 6,5% de fetos e de 11,5% de ninhadas), costelas cervicais (↑ de 3,1% de fetos e de 11,5% de ninhadas), 14ª costelas rudimentares (↑ de 3,1% de fetos e de 11,5% de ninhadas) e arcos vertebrais com ossificação reduzida (↑ de 3,2% de fetos e de 15% de ninhadas).	Materno: 25 Desenvolvimento: 25	Rodwell, 1983
- Coelhos albinos (New Zealand) - 20 ♀ prenhes/dose	Oral (gavagem) Veículo: solução aquosa de metilcelulose (0,5%)	- Idade no início do teste: ~ 6 meses - Exposição: DG 6 a 18 (organogênese) - Eutanásia: DG 29	96,1%	0; 10; 30; 90	- 90 mg/kg: diversos sinais de toxicidade materna, considerados relacionados à alta dose de 2,4-D (2♀ abortaram, nos DG 21 e 24; uma delas apresentou, nos DG 16 a 19, ataxia, diminuição da atividade motora, perda do reflexo de endireitamento e extremidades frias ao toque). No estudo piloto também ocorreu um aborto, uma eutanásia de animal moribundo e mortes (doses de 100 e 200 mg/kg/dia), efeitos atribuídos à substância-teste. - 90 mg/kg: tendência ↓ ganho de peso médio fêmeas prenhes durante o período de tratamento, que permaneceu durante o período pós-dosagem. - 90 mg/kg: ↑ significativo % fetos machos vivos, considerado não relacionado ao tratamento (não apresentou relação dose-resposta). - 90 mg/kg: ↑ significativo incidência de fetos com membros posteriores “virados para dentro” (2,6%); malformação considerada secundária à compressão in útero e não relacionada à substância-teste (ocorreu em apenas uma ninhada, estava dentro da variação do controle histórico e não foi significativa na comparação entre as ninhadas). - 10 mg/kg: ↓ significativa do nº de costelas por feto, considerada não relacionada ao tratamento (dentro do controle histórico, ausência de relação dose-resposta).	Materno: 30 Desenvolvimento: 90 (ou>)	Hoberman, 1990

Legenda: DG = dia gestacional.



Quadro 20. Descrição dos resultados dos estudos publicados na literatura que avaliaram o potencial embriofetotóxico e teratogênico do 2,4-D.

Espécie, linhagem e número animais	Via	Período	Pureza	Doses (mg/kg/dia)	Resultados relevantes	Referência
<p>- Ratos Sprague-Dawley</p> <p>- Avaliação do desenvolvimento fetal: 13 a 19 ♀ prenhes/grupo tratado e 36 a 41 ♀ prenhes no controle (2 grupos controle)</p> <p>- Avaliação do crescimento e sobrevivência neonatais: 16 a 20 ♀ prenhes/grupo tratado e 34 ♀ prenhes no controle</p>	<p>Oral (gavagem)</p> <p>Veículo: óleo de milho</p>	<p>- Exposição: DG 6 a 15 (organogênese)</p> <p>Eutanásia: - Avaliação do desenvolvimento fetal: GD 20</p> <p>- Avaliação do crescimento e sobrevivência neonatais: filhotes eutanasiados no DPN 20</p>	98,7 %	<p>0; 12,5; 25; 50; 75 e 87,5 (dose mais alta: apenas avaliação do desenvolvimento fetal)</p>	<p>- 87,5 mg/kg: dose próxima da máxima tolerada (estudo preliminar).</p> <p><u>Avaliação do desenvolvimento fetal:</u> - 50; 75 e 87,5 mg/kg: ↓ dose-dependente do peso fetal - 12,5; 50 e 75 mg/kg: ↑ incidência de retardo de ossificação dos ossos do crânio (fetos e ninhadas). No entanto, o autor do estudo considerou a ocorrência esporádica e sem dose resposta, o que “impede sua associação com o tratamento”.</p> <p>- 50 mg/kg: ↑ incidência de hidrocefalia (fetos). Como apenas uma ninhada foi afetada, o efeito não está aparentemente relacionado ao tratamento.</p> <p>- 50; 75 e 87,5 mg/kg: ↑ dose-resposta na incidência de edema subcutâneo (fetos e ninhadas) e de atraso na ossificação dos esternébrios (fetos; ninhadas apenas com 75 mg/kg)</p> <p>- 75 e 87,5 mg/kg: ↑ dose-resposta na incidência de 14ª costela - costela lombar (fetos; ninhadas apenas com 75 mg/kg)</p> <p>- 87,5 mg/kg: ↑ dose-resposta na incidência de esternébrios bipartidos (fetos), esternébrios ausentes (fetos e ninhadas) e de costelas onduladas (fetos)</p> <p><u>Avaliação do crescimento e sobrevivência neonatais:</u> Não foram alterados: índices de fertilidade, gestacional, de viabilidade e lactação; avaliações pós-mortem e esquelética.</p> <p>- 50 mg/kg: ↓ peso neonatos no DPN 20; entretanto, o autor atribui esse resultado a uma única ninhada com filhotes excepcionalmente pequenos.</p> <p>NOAEL: 25 mg/kg/dia.</p>	Schwetz <i>et al.</i> , 1971
<p>- Ratos Sprague-Dawley</p> <p>- 25 ♀ prenhes/grupo</p>	<p>Oral (gavagem)</p> <p>Veículo: óleo de milho</p>	- Exposição: DG 6 a 15 (organogênese)	99%	0; 115	<p>- 115 mg/kg: letalidade (12%) e ↓ ganho de peso materno</p> <p>- 115 mg/kg: ↓ peso fetal</p> <p>- 115 mg/kg: ↑ incidência de variações esqueléticas (costelas supranumerárias)</p>	Chernoff <i>et al.</i> , 1990
<p>- Ratos Rattus norvegicus</p> <p>- 10 ♀ prenhes/grupo</p>	<p>Oral (gavagem)</p> <p>Veículo: óleo de milho</p>	- Exposição: DG 1 a 19 (toda a gestação)	≥ 90%	0; 100	<p>- 100 mg/kg: evidências de toxicidade materna (hipoatividade, respiração acelerada, perda de apetite, fraqueza, hemorragia nasal, leve diarreia e perda de peso), sem efeitos nos parâmetros reprodutivos (nº de implantações, nº de fetos viáveis, reabsorções e razão sexual)</p> <p>- 100 mg/kg: ↓ peso e comprimento dos fetos viáveis</p> <p>- 100 mg/kg: ↑ incidência de variações esqueléticas - diminuição (ou atraso) do grau de ossificação de algumas estruturas (crânio, esternébrios, vértebras, metatarsos, falanges); costelas extra, fundidas ou assimétricas.</p>	Mazhar <i>et al.</i> , 2014

Legenda: DG= dia gestacional; DPN= dia pós natal.

7.2 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO 2,4-D EM ESTUDOS MULTIGERACIONAIS

7.2.1 Estudo de Duas Gerações

No Estudo de Duas Gerações realizado com o 2,4-D, cujos resultados estão descritos no quadro 21, verificou-se que a dose de 80 mg/kg/dia foi excessiva, efeito que se tornou aparente após o acasalamento da geração parental F0, durante o período de lactação. A duração da gestação das ninhadas F1b foi significativamente aumentada no grupo tratado com 80 mg/kg/dia, efeito esse considerado resultado da toxicidade nesta dose. A USEPA, na análise deste estudo realizada em 1986, considerou que esse aumento na duração da gestação da ninhada F1b poderia ser resultado de atraso na implantação, desequilíbrios hormonais ou problemas no parto. Houve diminuição do tamanho das ninhadas vivas F1a e F1b da dose de 80 mg/kg/dia, efeito que foi mais severo nas últimas (redução de aproximadamente 50% em relação ao grupo controle). Devido à observação de mortalidade excessiva nessa dose após o desmame das ninhadas F1b, todos os animais desse grupo foram eutanasiados e o estudo continuou apenas com as doses de 0, 5 e 20 mg/kg/dia para constituir a geração F1.

Os filhotes das ninhadas F1a e F1b da dose de 80 mg/kg/dia apresentaram peso corpóreo significativamente diminuído; enquanto os filhotes das ninhadas F1b da dose de 20 mg/kg/dia apresentaram diminuição do peso que foi significativa apenas no DPN 28. Por isso, a dose de 5 mg/kg/dia foi considerada o NOAEL do estudo para efeitos no desenvolvimento. Nas ninhadas F1b da dose de 80 mg/kg foi verificado aumento da incidência de fetos com variações esqueléticas, como esternébrios não ossificados, esternébrios leve ou moderadamente desalinhados, 14^a costela rudimentar, costelas curvas e arcos vertebrais com ossificação reduzida, resultados esses que corroboram aqueles obtidos no estudo de embriofetotoxicidade também conduzido em ratos Fischer 344. A severidade da resposta toxicológica nas ninhadas F1 do grupo de 80 mg/kg/dia foi considerada resultado da toxicidade materna excessiva, em oposição a um efeito direto na prole.

Vale ressaltar que este estudo apresentou diversas inconsistências, que colocam sua validade em questão. Como exemplo, houve necessidade de reanalisar as lâminas de fígado, pois inicialmente foi verificado aumento significativo na incidência de Doença de Tizzer (doença infecciosa bacteriana de roedores e outros mamíferos,

causada pela ingestão de esporos do *Clostridium piliforme* e caracterizada por lesões necróticas no fígado) nos machos da geração F0 tratados com a menor dose de 2,4-D (5 mg/kg). Devido à ausência de outros achados clínicos nos machos (como diminuição da sobrevivência ou presença de diarreia) e pelo fato das fêmeas não terem sido afetadas, o diretor do estudo acreditou que a Doença de Tizzer havia sido diagnosticada incorretamente. Dessa forma, posteriormente foi realizada nova análise histopatológica do fígado, que desta vez não identificou alterações relevantes.

Além disso, os autores inicialmente relataram não ter encontrado alterações relevantes nos rins dos animais, nem mesmo dos tratados com a dose mais alta de 2,4-D, o que estava em desacordo com os resultados de estudos subcrônicos prévios realizados com o 2,4-D e que indicaram alterações degenerativas nos túbulos renais de ratos que receberam doses de até 150 mg/kg/dia. Dessa forma, o patrocinador do estudo solicitou que as lâminas dos rins dos machos das gerações F0 e F1 e dos filhotes F1b deste estudo fossem reavaliadas ("*Addendum to the final report*", de 30/09/1986), tendo sido evidenciadas alterações histopatológicas nessa reanálise.

Outro ponto questionável foi a ausência de verificação de qualquer alteração macroscópica e histopatológica nos animais F1b e F2b, nem mesmo daquelas que em outros momentos do relatório são descritas como "alterações que ocorrem espontaneamente em ratos de laboratório".

Adicionalmente, nesse estudo não foram avaliados parâmetros relacionados à tireoide, mesmo que à época se soubesse dos efeitos do 2,4-D na função tireoidiana de ratos, já observados por Florsheim e Velcoff em 1962.

No relatório desse estudo os autores citam resultados similares aos verificados por Hansen e colaboradores (1971) num estudo reprodutivo de três gerações, em que foi observada redução na sobrevivência e diminuição do peso corpóreo dos filhotes das ninhadas que receberam 1500 ppm de 2,4-D na dieta (aproximadamente 75 mg/kg), sem efeitos na fertilidade ou no tamanho da ninhada.

Ainda, no relatório da EFSA de 2014 (2014b – item B.6.6.1/02 do relatório da EFSA), foi descrito outro estudo de 2 Gerações (de 1997) realizado com o 2,4-D (99,2%), administrado a ratos Wistar na dieta nas concentrações de 0, 200, 600 e 1800 ppm, e que apresentou resultados similares aos do estudo em questão: ausência de efeitos do 2,4-D na performance reprodutiva, nos índices de fertilidade e gestação, na duração média da gestação, no tamanho da ninhada e na razão sexual. Foi verificada



diminuição não significativa no índice de viabilidade dos filhotes F2 da maior dose no dia do parto (diminuição de 13,5% em relação ao grupo controle) e diminuição estatisticamente significativa do índice de viabilidade dos filhotes da maior dose nas duas gerações; efeitos esses considerados relacionados ao tratamento.



Quadro 21. Descrição dos resultados do Estudo de Duas Gerações realizado com o 2,4-D.

Espécie, linhagem e número animais	Via e período de exposição	Pureza do IA	Doses (mg/kg/dia)	Resultados relevantes	NOAEL (mg/kg/dia)	Referência
<p>- Ratos (CDF Fischer 344)</p> <p>-30/sexo/dose</p> <p>- Cada geração acasalada duas vezes, sendo produzidas 2 ninhadas por geração (ninhadas F1a, F1b, F2a e F2b)</p>	<p>- Oral (dieta)</p> <p>- Geração F0: exposta por 100 dias antes do acasalamento, durante a gestação e lactação e por mais 30 dias após o desmame das ninhadas F1a e F1b (total de 40 semanas)</p> <p>- Geração F1 (filhotes F1b): exposta in útero e continuamente via leite ou alimentação por 125 dias após o nascimento, e antes e durante o acasalamento, a gestação e a lactação das ninhadas F2a. A dosagem continuou pelo período de 2 semanas de descanso e durante o acasalamento, gestação e lactação das ninhadas F2b, além de por pelos menos 30 dias após o desmame dessas últimas.</p> <p>- Período total de administração contínua, da geração F0 até o final da geração F1: 77 semanas.</p> <p>- Ninhadas F1a e F2a: eutanasiadas no desmame (DPN 28).</p>	97,5 ou 95,8%	0, 5, 20 e 80* (* só primeira geração)	<p>Gerações Parentais:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 80 mg/kg F0: 1 ♀ morreu devido a severa hemorragia generalizada, possivelmente resultado da toxicidade do 2,4-D - ♂ e ♀ 80 mg/kg F0: ↓ consistente peso corporal e ganho de peso (todo o estudo) - ♀ 20 mg/kg F1: ↓ peso corporal (1ª semana gestação e lactação ninhadas F2b) - ♂ e ♀ 80 mg/kg F0: ↓ índice de fertilidade no acasalamento para gerar a ninhada F1b (não significativa) - 80 mg/kg F0: ↑ significativo duração gestação ninhada F1b, considerado resultado da toxicidade. - ♀ 5 a 80 mg/kg F0: ↑ peso rins direito e esquerdo (20 mg/kg: apenas esquerdo) - ♂ 20 mg/kg F1: ↑ peso rim esquerdo - ♂ 80 mg/kg F0: alterações histopatológicas renais (observadas apenas após a reanálise das lâminas) <p>Gerações Filiais:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 80 mg/kg - ninhadas F1a e F1b: ↓ tamanho ninhada viva (F1b: ↓ de 50%). - 80 mg/kg - ninhada F1b: ↓ índice de sobrevivência gestacional - 80 mg/kg F1b: ↓ índices de viabilidade ninhada (em todos os DPN; chegando a 68,3% no DPN1) - 80 mg/kg - ninhada F1a: ↑ razão sexual (↓ nº de ♀), efeito considerado não relacionado ao tratamento, por não ter se repetido na ninhada F1b. - 80 mg/kg ninhadas F1a e F1b: ↓ significativa peso filhotes (toda a lactação) - 20 mg/kg ninhadas F1b: ↓ peso filhotes (significativa apenas no DPN 28) - 80 mg/kg F1b: 6 fetos de 3 ninhadas com malformações e diversos com variações esqueléticas (não houve diferença estatisticamente significativa), como esternóbrios não ossificados, esternóbrios leve ou moderadamente desalinhados, 14ª costela rudimentar, costelas curvas e arcos vertebrais com ossificação reduzida. Efeitos relacionados à excessiva toxicidade materna. <p>Não foram avaliados parâmetros relacionados à função tireoidiana.</p>	<p>Materno: 5</p> <p>Reprodutivo: 20</p> <p>Desenvolvimento: 5</p>	Rodwell, 1985, 1986

Legenda: DPN= dia pós natal.



7.2.2 Estudo de Uma Geração Estendida

Devido às inúmeras inconsistências do estudo descrito no subitem anterior e à necessidade de avaliação de parâmetros adicionais como neurotoxicidade, imunotoxicidade e desregulação endócrina, a USEPA solicitou a realização de um novo estudo de duas gerações com o 2,4-D. À época da realização do referido estudo (2010), estava em processo de elaboração o protocolo do Estudo de Uma Geração Estendida e, portanto, a Força Tarefa 2,4-D discutiu e acordou com a USEPA o delineamento do estudo em questão, mesmo que o protocolo da OECD para esse estudo ainda não estivesse finalizado, o que ocorreu apenas em 28/07/2011 (OECD, 2011).

É importante citar que os resultados deste Estudo de Uma Geração Estendida já foram publicados na literatura por Marty e colaboradores (2013). Além disso, ele já foi detalhadamente descrito e avaliado pela USEPA (2010) e EFSA (2014b). Entretanto a EFSA não teve acesso e não avaliou as partes deste estudo relativas à neurotoxicidade e imunotoxicidade no desenvolvimento.

O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos potenciais do 2,4-D na função reprodutiva de machos e fêmeas, na sobrevivência, no crescimento e no desenvolvimento da prole. Para tanto, foram investigadas alterações no sistema nervoso, no sistema imune, na função endócrina (incluindo alterações na tireoide) e em outros parâmetros sistêmicos. Os estudos foram realizados incorporando elementos críticos das seguintes diretrizes da USEPA: OPPTS 870.3800 – Reproduction and Fertility Effects (1998), 870.6300 – Developmental Neurotoxicity Study (1998) e 870.7800 – Immunotoxicity (1996). Trata-se de um estudo bastante complexo, por isso seu delineamento geral foi resumido no quadro 22.



Quadro 22. Delineamento geral do Estudo de Uma Geração Estendida realizado com o 2,4-D.

Espécie, linhagem e número de animais	Via e período de exposição	Pureza	Doses			Delineamento	Referência		
- Ratos Crl:CD (SD) - cerca de 10 semanas de idade - 27/sexo/dose	- Oral (dieta) - Exposição por 4 semanas antes do acasalamento e por até 2 semanas durante o acasalamento. ♀: continuaram sendo tratadas durante a gestação (3 semanas) e lactação (3 semanas) até o dia pós-natal (DPN) 22 ♂: continuaram a ser tratados por 5 a 7 semanas após o acasalamento (exposição total de 11 semanas).	97,85 / 98,6 %	Geração parental Doses de 2,4-D em ppm			No DPN 21 todas as ninhadas foram desmamadas e subdivididas em grupos e subgrupos para as devidas avaliações, conforme quadro a seguir: Parâmetros avaliados em cada subgrupo da geração filial.	Marty <i>et al.</i> , 2010		
			Sexo/ período do estudo	100	300			600/800*	
			Doses de 2,4-D em mg/kg						
			♂ pré-acasalamento	5,5	16,6			45,3	
			♀ pré-acasalamento	7,0	20,6			40,	
			♀ gestação grupo principal	7,4	21,9			43,7	
			♀ gestação satélite	7,6	22,9			45,3	
			♀ lactação	9,5	28,7			57,5	
			*600 ppm:♀; 800 ppm:♂. Doses selecionadas com base em um estudo de toxicocinética preliminar, que indicou uma diferença na eliminação renal do 2,4-D entre ratos adultos machos e fêmeas. Por isso, foram selecionadas doses máximas diferentes para cada sexo.						
			Geração filial Doses de 2,4-D em ppm						
Grupo/Sexo	100	300	600/800*						
Doses de 2,4-D em mg/kg									
1a	♀ 9,6 9,2	28,8 28,4	57,9 76,6						
1b	♀ 10,1 9,9	30,0 29,5	5,2 81,7						
2a	♀ 9,7 9,2	28,7 28,4	58,4 75,3						
2b	♀ 9,1 8,7	26,7 25,8	55,3 71,8						
3	♀ 7,6 6,8	23,3 20,9	46,7 55,6						

No DPN 21 todas as ninhadas foram desmamadas e subdivididas em grupos e subgrupos para as devidas avaliações, conforme quadro a seguir:

Grupo/Sub grupo	N	DPN	Parâmetros avaliados	
1	1a	10	70	Toxicidade da tireoide e urinálise, além de outros parâmetros sistêmicos.
	1b	10	60	Neurotoxicidade no desenvolvimento, neuropatologia e morfologia cerebral.
2	2a	10	70-7	Imunotoxicidade: ensaio de Células Formadoras de Anticorpos em resposta a eritrócitos de carneiro.
	2b	10	87-93	Imunotoxicidade: ensaio de avaliação da atividade citotóxica das células Natural Killer.
3	-	25	139	Toxicidade reprodutiva, endócrina e estudo de toxicocinética.
Animais não incluídos em algum desses 3 grupos		22		Avaliação neuropatológica após perfusão ou avaliação dos hormônios tireoidianos, seguida de necropsia, avaliação do peso dos órgãos e coleta dos mesmos para análise histopatológica.
Grupo satélite de fêmeas prenhes, acasaladas com machos não tratados		DG 17		Avaliação dos níveis de 2,4-D no plasma, dos níveis de hormônios tireoidianos, dos parâmetros bioquímicos clínicos e hematológicos, do peso e da histopatologia da tireoide e da contagem de corpos lúteos e implantações.

Legenda: N: número de animais/sexo avaliados em cada subgrupo. DPN: dia pós natal correspondente ao final do tratamento e conseqüentemente, à eutanásia dos animais.

Os dados reprodutivos da geração filial foram utilizados para avaliar a necessidade de criação de uma segunda geração, que não foi mantida neste estudo, conforme descrito mais detalhadamente a seguir.

A seguir serão descritos apenas os achados mais relevantes do estudo. Os machos e fêmeas das gerações parental e filial não apresentaram sinais clínicos relacionados à exposição ao 2,4-D. Os dados de toxicocinética, que já foram descritos mais detalhadamente no item 3 da parte II deste parecer de análise, mostraram que os níveis plasmáticos de 2,4-D nos machos foram substancialmente (três vezes) menores do que os das fêmeas que receberam a mesma dose (300 ppm ou aproximadamente 24 mg/kg). Além disso, foi observada toxicocinética não linear nos machos expostos a doses superiores a 49,4 mg/kg e nas fêmeas expostas a doses superiores a 21,3 mg/kg, indicada por níveis plasmáticos superiores ao que seria esperado se as concentrações plasmáticas fossem diretamente proporcionais aos níveis de ingestão do 2,4-D. Esses achados sugerem que ocorreu saturação da depuração renal de 2,4-D nessas doses.

Conforme quadro 23, o estudo confirmou que o rim é o órgão-alvo da toxicidade do 2,4-D, o que está de acordo com os resultados dos demais estudos realizados com este ingrediente ativo.

Quadro 23. Dados de toxicidade geral do 2,4-D no Estudo de Uma Geração Estendida.

Parâmetros	Resultados
Peso corpóreo	<p><u>Geração parental</u> - ♀ 600 ppm: ↓ peso corpóreo (lactação).</p> <p><u>Geração filial</u> - ♂ e ♀ 600 ppm: ↓ peso corpóreo (lactação).</p>
Peso e histopatologia dos rins	<p><u>Geração parental</u> - ♂ 800 ppm: ↑ peso rins (significativo), acompanhado por lesões renais microscópicas características (leve degeneração multifocal dos túbulos contorcidos proximais da zona medular externa).</p> <p><u>Geração filial</u> - ♀ 300 e 600 ppm (subgrupo 1a): ↑ peso rins (significativo), associado a alterações histopatológicas características apenas na maior dose. - ♂ 300 e 600 ppm: alterações histopatológicas características.</p> <p>Os autores ressaltaram que as lesões renais foram muito leves e não alteraram a função renal, o que pode ser confirmado pela ausência de efeitos relacionados à exposição nos parâmetros de patologia clínica ou urinálise. Concluíram que a maior incidência de efeitos histopatológicos nos rins dos adultos da geração filial em relação aos da geração parental está provavelmente relacionada às maiores doses de 2,4-D que foram atingidas nos animais da geração filial, conforme pode ser observado no quadro anterior.</p>

Os demais resultados do estudo serão apresentados a seguir em itens específicos, relacionados a cada sistema: tireoide, reprodução e alguns parâmetros endócrinos, neuro e imunotoxicidade no desenvolvimento.

7.2.2.1 Parâmetros Tireoidianos

Os níveis de hormônios tireoidianos (tiroxina - T4; triiodotironina - T3) e de tireotrofina (TSH – hormônio tireoestimulante) e o peso e histopatologia da glândula tireoide foram avaliados em múltiplos estágios de vida, conforme quadro 24.

Quadro 24. Parâmetros tireoidianos avaliados e alterados na geração parental e em diferentes idades da geração filial.

Geração	Sexo/Idade	Parâmetros avaliados		Resultados
		Níveis de T3, T4 e TSH	Peso e Histopatologia tireoide	
Parental	♀ DG 17 (grupo satélite)	x	x	- 600 ppm: ↓ T3 (7%) e T4 (9%); ↑ TSH (25%) – não estatisticamente significativos, porém dose dependentes e associados a alterações histológicas (3/10)
	♀: desmame filhotes (DPN 22) ♂: 11 semanas de exposição	-	x	- ♀ 300 ppm: ↓ peso tireoide (estatisticamente significativo) – achado considerado não relacionado ao tratamento
Filial	♀ e ♂ DPN 4 (sobras da padronização das ninhadas)	x	-	- 600 ppm: ↓ T3 (♂: 7%) e T4 (♂: 13%; ♀: 14%); ↑ TSH (♀: 16%) – não estatisticamente significativos
	♀ e ♂ DPN 22 (filhotes desmamados)	x	x	- ♂ 600 ppm: ↓T3 (13% - não significativa) e ↓T4 (28%- estatisticamente significativa) - ♀ 600 ppm: ↑T3 (8% – não significativo) - ♂ 300 ppm: ↓T3 (19%) – estatisticamente significativa (p=0,01)
	♀ e ♂ DPN 62-64* ou 70-74 (subgrupo 1a)	x	x	- ♂ 800 ppm: ↓ T3 (8%) e T4 (14%); ↑ TSH (23%) – não significativos - ♂ 300 ppm: ↓ T3 (15%); ↑T4 (12%); ↑TSH (26%) – não significativos - ♂ 100 ppm: ↓ T3 (11%); ↓ T4 (6%); ↑TSH (9%) – não significativos
	♀ e ♂ DPN 139 (grupo 3)	-	x	-

Legenda: N= número de animais/sexo avaliados em cada subgrupo. DPN = dia pós natal correspondente à análise do parâmetro. DG= dia gestacional. T3= triiodotironina. T4= tiroxina. TSH= hormônio tireoestimulante ou tireotrofina
* sangue coletado uma semana antes do final do tratamento e, portanto, da eutanásia (para que o jejum não influenciasse os resultados das análises hormonais).

Na geração parental, foram observadas alterações nos hormônios tireoidianos apenas nas fêmeas prenhes do grupo satélite tratadas com a maior dose de 2,4-D (600 ppm ou aproximadamente 45 mg/kg), mas não naquelas do grupo principal: diminuições não estatisticamente significativas, porém dose-dependentes, nos níveis de T3 e T4 e aumento não significativo dos níveis de TSH. Essas fêmeas (aproximadamente 25 % do grupo) foram os únicos animais do estudo que apresentaram alterações histopatológicas na tireoide, caracterizadas por folículos tireoidianos menores

em relação aos do grupo controle, com vacúolos claros ao longo da periferia das células epiteliais foliculares, o que sugere a ocorrência de reabsorção de coloide. Essas alterações, apesar de muito leves, foram consideradas pelos próprios autores do estudo como consistentes com uma perturbação potencial da função tireoidiana relacionada à exposição ao 2,4-D. No entanto, os autores argumentaram que as observações não são patológicas, mas apenas adaptativas.

Na geração filial, apenas os hormônios tireoidianos apresentaram alterações (diminuições), que foram estatisticamente significativas somente nos filhotes machos das duas maiores doses (300 e 600 ppm), avaliados no dia do desmame (DPN 22). Os autores do estudo salientam que a diminuição do T3 apresentou uma fraca relação dose-resposta, já que na dose de 600 ppm os níveis de T3 diminuíram apenas 13%, menos que na dose de 300 ppm. A USEPA (2015) não considerou esses achados como relacionados ao tratamento, por não terem apresentado relação dose-resposta e por terem ocorrido em doses em que já puderam ser evidenciados sinais de toxicidade sistêmica (diminuição de 10% no peso corpóreo). Contrariamente ao verificado nos machos, nas fêmeas houve aumento dos níveis de T3 na maior dose (600 ppm).

Na discussão final do estudo, os autores informam que, ao verificar os coeficientes de variação dos níveis hormonais, pode-se confirmar que as alterações foram mínimas. No entanto, conforme verificado no relatório de validação de um estudo de avaliação da função tireoidiana de ratos jovens elaborado pela USEPA, verifica-se que os coeficientes de variação das concentrações de T4 e TSH são inerentemente altos (aproximadamente 29 e 58%, respectivamente), o que significa que esses valores são realmente variáveis, mas não diminui a importância de pequenas alterações.

Vale ressaltar que Stoker e colaboradores (2007), que realizaram o Ensaio de Hershberger com ratos, utilizando altas doses de 2,4-D (100 e 200 mg/kg), também observaram diminuição estatisticamente significativa das concentrações de T3 e T4.

A toxicidade tireoidiana do 2,4-D, a maior sensibilidade dos ratos para efeitos na tireoide e a relevância desses efeitos para humanos será discutida mais detalhadamente no item 8 da parte II deste parecer de análise, que tratará da toxicidade do 2,4-D no sistema endócrino.

7.2.2.2. Demais parâmetros endócrinos e reprodutivos

O Estudo de Uma Geração Estendida confirmou a ausência de efeito do 2,4-D na duração do ciclo estral, nos índices reprodutivos (índices de acasalamento, de concepção e de gestação), no tempo para acasalamento, na duração da gestação, na sobrevivência de filhotes e na razão sexual, confirmando os resultados dos estudos multigeracionais anteriores realizados com esse ingrediente ativo e também dos estudos específicos de toxicidade reprodutiva. Os resultados reprodutivos e endócrinos relevantes estão descritos no quadro 26.

Os autores do Estudo de Uma Geração Estendida concluíram que a diminuição estatisticamente significativa verificada no peso da vesícula seminal dos machos das doses de 300 e 800 ppm da geração parental foi espúria, pois: 1) não houve nenhum padrão de efeito antiandrogênico nos animais expostos ao 2,4-D; 2) as diminuições de peso das glândulas acessórias não foram reproduzidas na geração filial, que foi exposta por mais tempo ao 2,4-D (*in utero* e durante a lactação e a idade adulta). No entanto, quando analisamos as tabelas de peso de órgãos do estudo verificamos que houve diminuições não estatisticamente significativas tanto no peso absoluto quanto no peso relativo de todos os órgãos sexuais masculinos da geração parental, incluindo o testículo e epidídimo. Esses resultados não podem ser atribuídos à redução do peso corpóreo uma vez que isso não ocorreu e também porque não houve diminuição dos pesos absolutos e relativos dos demais órgãos como fígado, baço, adrenal, encéfalo etc. Os autores do estudo justificaram que os valores do peso relativo das vesículas seminais, próstata, testículos e epidídimos dos animais controles da geração parental foram atípicos – estavam acima da faixa de variação do controle histórico do laboratório – o que resultou na diferença significativa observada nos grupos tratados com o 2,4-D. Ainda, os autores ressaltam que não houve efeitos no peso dos órgãos reprodutivos e glândulas sexuais acessórias da geração filial avaliada nos DPN 70 (subgrupo 1a) ou 139 (grupo 3). A EFSA e a USEPA concordaram com a conclusão dos autores de que os dados em geral não indicam efeito mediado pelo 2,4-D. A Anvisa também concorda com essa conclusão.

Em relação à avaliação do início da puberdade, vale ressaltar que todos os animais da geração filial foram avaliados, tendo sido verificado pequeno atraso (1,6 dias), porém significativo, na idade de descolamento do prepúcio dos machos tratados

com a maior dose de 2,4-D. Os autores argumentam que o peso desses animais era levemente mais baixo que o dos controles no dia do descolamento do prepúcio (221,1g versus 223,2g) e que, portanto, o 2,4-D teve um efeito na taxa de crescimento dos ratos machos peripúberes. Os autores ressaltam que diminuições no peso corporal levam a atrasos na separação do prepúcio e que nesse estudo os filhotes machos da maior dose pesaram 8% menos que os controles nos DPN 28 e 35 e 7% menos no DPN 42. Citam outro estudo realizado pelo mesmo grupo (Marty *et al.*, 2003), que demonstraram atraso de até 1,8 dias na puberdade de ratos juvenis decorrentes de decréscimos similares no peso corpóreo (10%). Os autores argumentam também que a variação encontrada está dentro do controle histórico do laboratório. Os autores atribuíram o atraso no descolamento do prepúcio ao peso corpóreo diminuído dos animais, que de fato apresentou uma tendência estatística de redução ($p=0,07$). Quando foi realizada Análise de Covariância (ANCOVA), considerando o peso corpóreo como covariável, o tratamento com o 2,4-D continuou tendo influência no dia de descolamento do prepúcio, apesar de o peso desses animais de fato ter apresentado tendência estatística de redução. No entanto, pode-se considerar o argumento dos autores em parte falho; pois, ao compararmos visualmente os dados dos grupos de 100 e 300 ppm (quadro 25 seguir), observamos que o descolamento do prepúcio ocorreu antes nos animais de 300 ppm, mesmo com estes animais apresentando peso inferior ao dos tratados com 100 ppm. Adicionalmente, apesar de possuírem o mesmo peso dos animais de 300 ppm, os animais tratados com 800 ppm tiveram um atraso de 1,3 dias no descolamento do prepúcio em relação àqueles. A EFSA considerou a significância toxicológica desse achado duvidosa (EFSA, 2014) e a USEPA não considerou esse atraso biologicamente relevante, por estar dentro da faixa normal de variabilidade (USEPA, 2015).

Quadro 25. Dia e peso corpóreo dos machos no dia de descolamento do prepúcio - geração filial.

	Doses de 2,4-D (ppm)			
	0	100	300	800
Dia	43,0	43,6	43,3	44,6*
Peso corpóreo	223,2	230,3	221,9	221,1

* $p=0,05$

Em um resumo publicado na literatura, Stoker e colaboradores (2007) observaram um atraso significativo no descolamento do prepúcio (2,7 dias), além de diminuição estatisticamente significativa do peso médio da próstata ventral, dos

músculos levantador do ânus e bulbocavernoso e dos níveis de testosterona e androstenediona em ratos tratados com 200 mg/kg de 2,4-D (Ensaio de Hershberger), mas não com a dose de 100 mg/kg. Portanto, o efeito da exposição ao 2,4-D no atraso de descolamento do prepúcio não pode ser completamente descartado, pelo menos em altas doses.

Os autores não relataram diferenças no peso relativo dos testículos dos animais da geração filial, no entanto, verificou-se que foram incluídos os resultados do controle positivo para imunotoxicidade na análise estatística do peso dos testículos dos machos do subgrupo 2b, apesar deles terem recebido tratamento distinto dos demais animais do grupo. Ao excluir os dados deste controle positivo para a análise estatística, verificou-se uma tendência (ANOVA; $p=0,07$) de diminuição do peso relativo dos testículos (9%, 8% e 11%) dos animais tratados, respectivamente com 100, 300 e 800 ppm de 2,4-D, em relação ao grupo controle.

Os achados em machos acima descritos levantaram questões sobre o potencial efeito antiandrogênico de altas doses de 2,4-D. No entanto, os autores apresentaram diversos argumentos para desconsiderar esses resultados e concluir que não houve nenhum padrão consistente de alteração androgênica nos ratos machos tratados com 2,4-D. Argumentaram, ainda, que nos machos da geração filial não houve efeitos na distância anogenital ou retenção de mamilos, dois parâmetros considerados altamente sensíveis à alteração da homeostasia androgênica. Vale citar que, por conta da suspeita inicial de efeitos antiandrogênicos do 2,4-D (levantada a partir do estudo de 90 dias realizado em ratos no qual 8 dos 10 animais apresentaram testículos atrofiados após exposição a altas doses de 2,4-D), todos os estudos foram analisados detalhadamente em busca de possíveis alterações nos órgãos endócrinos e reprodutivos. No entanto, foram observadas baixas incidências dessas alterações, que estavam dentro do controle histórico das espécies utilizadas.

Por isso, levando-se em conta o peso da evidência dos efeitos observados, a Anvisa considera que, por terem ocorrido apenas na maior dose, em condições de toxicocinética claramente não linear (saturação dos processos metabólicos), eles não são relevantes para a avaliação do perigo do 2,4-D para humanos.

A idade de abertura vaginal das fêmeas não foi alterada pelo tratamento.

Foi verificada diminuição do peso da hipófise nos machos e fêmeas tratados com a maior dose de 2,4-D. Os autores consideraram que essas diminuições

não estavam relacionadas à exposição por vários motivos: a magnitude dessa diferença foi muito pequena; os valores estavam dentro do controle histórico do laboratório; não foram encontradas alterações histopatológicas associadas; esse parâmetro não estava alterado nos machos e fêmeas do subgrupo 1a, nem nas fêmeas do grupo 3; e porque alterações na função hipofisária alterariam diversos outros parâmetros dos machos do grupo 3, como o peso dos órgãos reprodutivos e das glândulas sexuais acessórias e parâmetros espermáticos.

É importante citar que no grupo em que esse efeito foi observado (3) não foram medidos os níveis de hormônios tireoidianos e de hormônio tireoestimulante dos animais, que poderiam estar alterados como no subgrupo 1a. Nos dois únicos estudos subcrônicos realizados com o 2,4-D que avaliaram o peso da hipófise, um em ratos e outro em camundongos, foram observados aumentos no peso relativo da hipófise, a partir da dose de 15 mg/kg, os quais não estavam associados a alterações histopatológicas. Por outro lado, esses efeitos não foram observados nos estudos crônicos, o que poderia sugerir um efeito transitório ou mesmo aleatório.

No entanto, vale citar um exemplo da literatura, de van der Ven e colaboradores (2006), que observaram aumento no peso da hipófise de animais tratados com uma determinada substância tóxica (um retardante de chama), sem alterações histopatológicas robustas correspondentes, e consideraram que o aumento no peso da hipófise poderia ser devido à ocorrência de hipertrofia e/ou hiperplasia celulares difusas indiscerníveis. Esses autores concluíram que, como provavelmente apenas um número limitado das inúmeras populações celulares da hipófise foi afetado de maneira específica, o leve aumento detectado no peso da hipófise poderia ser sintomático de um efeito relativamente intenso em uma única subpopulação, provavelmente nas células tireotróficas. Por isso, os efeitos observados no peso da hipófise não podem ser completamente desconsiderados por não estarem associados a alterações histopatológicas. A EFSA considerou o significado desse achado na hipófise incerto. Até o momento, não há evidências consistentes de que o 2,4-D possa alterar a função hipofisária.



Quadro 26. Demais parâmetros endócrinos e reprodutivos do Estudo de Uma Geração.

Parâmetro	Resultados																						
Peso órgãos - geração parental	- ♂ 300 e 800 ppm: ↓ peso vesícula seminal (significativa; 12 e 14 %, respectivamente) . Os valores dos controles foram considerados atípicos, pois estavam acima da faixa de variação do controle histórico do laboratório, o que resultou na diferença significativa observada nos grupos tratados com o 2,4-D.																						
Início puberdade	- ♂ 600 ppm: atraso pequeno, porém significativo, de 1,6 dias na idade de descolamento do prepúcio.																						
Peso órgãos reprodutivos geração filial	O peso dos testículos dos machos da geração filial foi avaliado em diversos subgrupos e, portanto, em diferentes DPN, conforme segue:																						
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Parâmetro</th> <th>Idade</th> <th>N</th> <th>Resultados</th> <th>Argumentos autor s</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="4">Peso dos testículos</td> <td>DPN 22 (animais que sobraram após a lactação)</td> <td>10</td> <td>- 100, 300 e 600 ppm: ↓ peso absoluto testículos</td> <td>Provavelmente é resultado da diminuição do peso corpóreo dos animais, pois não houve diferença no peso relativo nem alterações histopatológicas.</td> </tr> <tr> <td>DPN 70 (subgrupo 1a)</td> <td>10</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>DPN 87 a 93 (subgrupo 2b)</td> <td>10</td> <td>- 100, 300 e 800 ppm: ↓ peso relativo testículos (9%; 8% e 11%, respectivamente) - tendência estatística (ANOVA; p=0,07)</td> <td>Incluídos os resultados do controle positivo para imunotoxicidade na análise estatística do peso dos testículos dos machos do subgrupo 2b, apesar destes terem recebido tratamento distinto dos demais animais do grupo. Ao excluir os dados deste controle positivo para a análise estatística, verificou-se uma tendência (ANOVA; p=0,07) de diminuição do peso relativo dos testículos dos animais tratados, de 9%, 8% e 11% nos grupos tratados com 100, 300 e 800 ppm de 2,4-D, respectivamente, em relação ao grupo controle.</td> </tr> <tr> <td>DPN 139 (grupo 3)</td> <td>27</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> </tbody> </table>	Parâmetro	Idade	N	Resultados	Argumentos autor s	Peso dos testículos	DPN 22 (animais que sobraram após a lactação)	10	- 100, 300 e 600 ppm: ↓ peso absoluto testículos	Provavelmente é resultado da diminuição do peso corpóreo dos animais, pois não houve diferença no peso relativo nem alterações histopatológicas.	DPN 70 (subgrupo 1a)	10	-	-	DPN 87 a 93 (subgrupo 2b)	10	- 100, 300 e 800 ppm: ↓ peso relativo testículos (9%; 8% e 11%, respectivamente) - tendência estatística (ANOVA; p=0,07)	Incluídos os resultados do controle positivo para imunotoxicidade na análise estatística do peso dos testículos dos machos do subgrupo 2b, apesar destes terem recebido tratamento distinto dos demais animais do grupo. Ao excluir os dados deste controle positivo para a análise estatística, verificou-se uma tendência (ANOVA; p=0,07) de diminuição do peso relativo dos testículos dos animais tratados, de 9%, 8% e 11% nos grupos tratados com 100, 300 e 800 ppm de 2,4-D, respectivamente, em relação ao grupo controle.	DPN 139 (grupo 3)	27	-	-
	Parâmetro	Idade	N	Resultados	Argumentos autor s																		
	Peso dos testículos	DPN 22 (animais que sobraram após a lactação)	10	- 100, 300 e 600 ppm: ↓ peso absoluto testículos	Provavelmente é resultado da diminuição do peso corpóreo dos animais, pois não houve diferença no peso relativo nem alterações histopatológicas.																		
		DPN 70 (subgrupo 1a)	10	-	-																		
DPN 87 a 93 (subgrupo 2b)		10	- 100, 300 e 800 ppm: ↓ peso relativo testículos (9%; 8% e 11%, respectivamente) - tendência estatística (ANOVA; p=0,07)	Incluídos os resultados do controle positivo para imunotoxicidade na análise estatística do peso dos testículos dos machos do subgrupo 2b, apesar destes terem recebido tratamento distinto dos demais animais do grupo. Ao excluir os dados deste controle positivo para a análise estatística, verificou-se uma tendência (ANOVA; p=0,07) de diminuição do peso relativo dos testículos dos animais tratados, de 9%, 8% e 11% nos grupos tratados com 100, 300 e 800 ppm de 2,4-D, respectivamente, em relação ao grupo controle.																			
DPN 139 (grupo 3)		27	-	-																			
Legenda: N= número de animais avaliados em cada subgrupo. DPN = dia pós natal correspondente à análise do parâmetro.																							
Não foram encontradas diferenças na motilidade ou motilidade progressiva espermáticas, nem na contagem de espermátides testiculares ou de espermatozoides epididimais (realizadas apenas nos grupos controle e de maior dose). Não houve alterações significativas relacionadas à exposição na morfologia espermática, embora a proporção de espermatozoides anormais tenha sido levemente maior no grupo tratado com 800 ppm em relação ao controle (0,025 versus 0,016), o que foi creditado a um único valor discrepante do grupo de 800 ppm (0,024) que, ao ser removido do conjunto de dados, resultou em uma proporção média de espermatozoides anormais equivalente entre os grupos tratado e controle.																							
Órgãos femininos	<p>Não houve alterações na contagem de folículos ovarianos das fêmeas.</p> <p>Porém, em todos os grupos/subgrupos em que o peso do útero foi avaliado, este estava aumentado não significativamente na dose de 600 ppm:</p> <ul style="list-style-type: none"> - geração parental avaliada no dia de desmame dos filhotes: 17% (o desvio padrão deste grupo foi bastante superior ao do controle); - geração filial avaliada no DPN 70 (subgrupo 1a): 32% superior (com desvio padrão também bastante superior ao do grupo controle); - geração filial avaliada no DPN 139 (grupo 3): 10% superior. <p>A Força Tarefa 2,4-D (Neal e colaboradores, 2013) justifica que o aumento no peso do útero das fêmeas tratadas com a maior dose pode ter ocorrido devido à ausência de controle do estágio do ciclo estral na necropsia, pois foi verificado que este grupo apresentou uma incidência aumentada de fêmeas no proestro ou estro em comparação com o grupo controle. Informam que nesses dois estágios do ciclo estral o útero apresenta as maiores quantidades de fluido e, portanto, um peso maior. Os autores salientaram que não foram observados sinais de útero aumentado na necropsia nem achados anormais na avaliação histopatológica e concluíram que o aumento no peso uterino verificado na maior dose reflete uma variabilidade normal e não um achado relacionado à exposição ao 2,4-D.</p>																						
Hipófise	<p>Geração filial (DPN 139)</p> <ul style="list-style-type: none"> - ♂ 800 ppm: ↓ peso hipófise (8%; significativa) - ♀ 600 ppm: ↓ peso hipófise (10%; não significativa) 																						
Adrenais	- ♀ 600 ppm e ♂ 800 ppm - geração filial (DPN 22): ↓ peso adrenais (aproximadamente 30%)																						

7.2.2.3 Neurotoxicidade no Desenvolvimento

Foram observadas alterações muito sutis e não estatisticamente significativas nos parâmetros neurológicos avaliados, em geral em direções opostas em machos e fêmeas, conforme quadro 27.

Segundo os autores do estudo, a ausência de evidências consistentes de neurotoxicidade na geração filial apóia a conclusão de que não houve alterações biológicas relevantes na função da tireoide, pois é sabido que perturbações na tireoide durante o desenvolvimento podem afetar o tamanho do encéfalo, a atividade motora e o reflexo de sobressalto de animais pós-lactentes.

Há autores que relatam que o encéfalo em desenvolvimento parece não ser capaz de compensar os baixos níveis de T4 (Sharlin *et al.*, 2010) e que acreditam que pequenas deficiências tireoidianas em mulheres grávidas podem resultar em redução do desenvolvimento intelectual da prole, mesmo que essa apresente função tireoidiana normal (Haddow *et al.*, 1999). McDermott e Ridgway (2001) citam os vários sintomas associados aos casos de hipotireoidismo subclínico em que há níveis aumentados de TSH, mas níveis “normais” de T3 e T4, entre eles perda de memória, fraqueza muscular, depressão, dano cognitivo, entre outros.

Marty e colaboradores (2010), autores do Estudo de Uma Geração Estendida realizado pela Força Tarefa 2,4-D, citam Goldey e colaboradores (1995), que relataram aumento na amplitude de resposta de sobressalto de adultos com perturbações na tireoide, sugerindo hiperreatividade. Embora a prole masculina avaliada no estudo atual tenha apresentado maior amplitude de resposta de sobressalto no primeiro bloco do estudo, o mesmo não ocorreu nos outros intervalos. Ainda, os valores estavam dentro da variação do controle histórico do laboratório e os animais não apresentaram sinais associados de hiperreatividade. As alterações adaptativas nos hormônios da tireoide verificadas nas doses mais altas (600 ppm em fêmeas e 800 ppm em machos) ocorreram em condições de toxicocinética não-linear e não foram consideradas relevantes para a avaliação do risco para humanos. Os autores concluem também que somente as fêmeas prenhes do grupo satélite avaliadas no DG 17 exibiram efeito na tireoide relacionado ao 2,4-D e que o peso da evidência não sustenta um efeito do 2,4 D na função tireoidiana em nenhum outro estágio de vida. No entanto, nos machos das

duas maiores doses avaliados no DNP 22 as diminuições de T3 e T4 foram significativas e, portanto, não podem ser descartadas.

Porém, deve-se levar em consideração o fato de os ratos serem mais sensíveis a perturbações tireoidianas que os humanos, ponto que será detalhadamente discutido no subitem 9.3.5 deste parecer de análise.

É necessário lembrar que nesse Estudo de Uma Geração Estendida não foram incluídos testes que avaliam a função cognitiva e que poderiam ser úteis na avaliação de efeitos mais sutis e específicos do 2,4-D, especialmente porque esse ingrediente ativo administrado em altas doses, em condições de toxicocinética não linear, sabidamente altera os níveis de hormônios tireoidianos, que são imprescindíveis para o funcionamento normal do sistema nervoso em desenvolvimento. Inclusive, conforme estabelecido nas diretrizes desse teste, outras avaliações funcionais (como por exemplo, sensoriais, sociais e cognitivas) devem ser incluídas no delineamento do estudo se existirem informações indicando essa necessidade. Vale ressaltar que a diretriz da USEPA OPPTS 870.6300 – (1998) estabelece a necessidade de incluir um teste de aprendizagem associativa e memória na avaliação da neurotoxicidade no desenvolvimento, conduzido próximo ao período de desmame e do dia pós natal 60. No entanto, não foram realizados testes de aprendizagem e memória com o 2,4-D. É possível que a não inclusão de parâmetros relevantes mais sensíveis no delineamento do estudo tenham impedido a observação de efeitos decorrentes da exposição da prole ao 2,4-D. No entanto, conforme será discutido mais adiante na parte específica de neurotoxicidade, as informações disponíveis atualmente para o 2,4-D não sugerem preocupações com seu potencial neurotóxico para humanos.

Quadro 27. Dados dos estudos de neurotoxicidade no desenvolvimento realizado com o 2,4-D.

Parâmetros avaliados	Resultados
Bateria de Observação Funcional	- ♂ 100, 300 e 800 ppm: ↑ micção durante avaliação no campo aberto (significativo apenas com 100 e 300 ppm). Não foi interpretado como um efeito relacionado à exposição devido à ausência de relação dose-resposta e à ausência de diferença estatística na maior dose. - ♂ 800 ppm: ↓ progressiva da atividade motora no teste do campo aberto (10% no total) – não significativa - ♀ 600 ppm: ↑ progressivo da atividade motora no teste do campo aberto (12% no total) – não significativo
Resposta de agarrar	- ♀ e ♂ 600/800 ppm: ↓ resposta de agarrar do membro posterior (10%; não significativa)
Teste de pouso	- ♀ 600 ppm: ↓ extensão dos membros no teste de pouso (13%; não significativa) - ♂ 800 ppm: ↑ extensão dos membros no teste de pouso (17%; não significativo)
Reflexo Auditivo de Sobressalto (RAS)	- ♂: não houve alteração do Reflexo Auditivo de Sobressalto (RAS) nas comparações lineares entre os grupos tratados e controle; porém foi observada interação significativa “Exposição X Bloco”, provavelmente devido a um RAS levemente maior no primeiro bloco nos machos tratados com 800 ppm em relação aos controles, o que indica que a habituação do RAS foi significativamente afetada pela exposição. No entanto, esta resposta foi similar à de outros 2 estudos controles recentes do laboratório, realizados com machos da mesma linhagem, idade e peso corpóreo (Andrus, 2007).



7.2.2.4 Imunotoxicidade no Desenvolvimento

Na avaliação da imunotoxicidade, a única alteração verificada ocorreu nas fêmeas do grupo tratado com a maior dose de 2,4-D (600 ppm) no Ensaio de Células Formadoras de Anticorpos (*Antibody Forming Cell* – AFC) em resposta a eritrócitos de carneiro (*Sheep Red Blood Cells* – SRBC): houve redução de 54% das AFC/baço e de 27% das AFC/10⁶ esplenócitos. Os autores do estudo não interpretaram esta alteração como relacionada ao tratamento, por ter ocorrido em uma dose acima da toxicocinética linear, por estar dentro da faixa de variação do controle histórico do laboratório e daquela relatada na literatura para este tipo de estudo e por não terem sido verificadas alterações nos machos. No entanto, esse resultado vai ao encontro do que foi observado nos estudos subcrônicos e crônicos realizados com o 2,4-D, que demonstraram imunotoxicidade em doses que induziram toxicidade sistêmica.

7.2.2.5 Observações sobre o delineamento experimental do Estudo de Uma Geração Estendida

7.2.2.5.1 Período de tratamento pré-acasalamento

Nesse estudo, o acasalamento dos adultos da geração parental iniciou-se após aproximadamente quatro semanas de exposição ao 2,4-D; entretanto, o documento de referência citado no próprio estudo, o USEPA OPPTS 870.3800 (1998), estabelece que os animais devem ser expostos à substância-teste por no mínimo 10 semanas antes do acasalamento. As diretrizes da OECD para o Estudo de Uma Geração Estendida (OECD, 2011) estabelecem que o período de tratamento pré-acasalamento deve ser selecionado com base nas informações disponíveis sobre a substância-teste, sendo de no mínimo 2 semanas, considerado adequado na maioria dos casos. Para machos, esse período é equivalente ao tempo necessário para o trânsito epididimal de espermatozoides em maturação e deve permitir a detecção de efeitos pós-testiculares no espermatozoide (durante os estágios finais de espermição e maturação dos espermatozoides epididimais). No momento da eutanásia, quando são realizadas análises histopatológicas e dos parâmetros espermáticos dos epidídimos e testículos, os machos terão sido expostos por pelo menos um processo espermatogênico completo. No entanto, o

documento salienta que os cenários de exposição pré-acasalamento para machos devem ser adaptados se em estudos prévios forem identificadas toxicidade testicular (dano à espermatogênese) ou efeitos na função ou integridade espermáticas. Foster (2014) ressalta que o período de exposição pré-acasalamento de 10 semanas é baseado no conhecimento profundo da biologia da espermatogênese e é ainda mais importante quando um estudo de toxicidade de 90 dias não está disponível.

No estudo de 90 dias (13 semanas) realizado em ratos com altas doses de 2,4-D, diversos animais (8/10) apresentaram testículos atrofiados após exposição a altas doses de 2,4-D. No entanto, apesar de o período de tratamento pré-acasalamento utilizado neste estudo não estar de acordo com o conhecimento prévio da possível toxicidade testicular do 2,4-D, o que poderia ter impedido a verificação de possíveis efeitos na prole, ele foi considerado válido, por não terem sido observadas alterações relevantes na geração filial, o que está de acordo com os resultados do estudo de duas gerações realizado anteriormente.

7.2.2.5.2 Decisão sobre a necessidade de se criar uma segunda geração

No Estudo de Uma Geração Estendida, a decisão de se criar uma segunda geração é tomada de acordo com a avaliação de critérios pré-determinados da geração parental (ciclo estral e fertilidade) e da geração filial (distância anogenital, retenção de mamilos, abertura vaginal, descolamento do prepúcio e ciclo estral). No estudo em questão, os autores optaram por não criar uma segunda geração, apesar de ter sido observado leve atraso no descolamento do prepúcio dos machos, um dos critérios para o disparo de uma segunda geração. No entanto, segundo explicações dos autores, para que seja necessário criar uma segunda geração deve ser demonstrada dose-resposta estatisticamente significativa ou biologicamente relevante. Esses informaram que na decisão de não criarem uma segunda geração aplicaram o peso da evidência e usaram os dados do controle histórico do laboratório na interpretação dos resultados.

No entanto, Beekhuijzen e colaboradores (2009), por exemplo, avaliaram alguns estudos de duas gerações, entre eles o de um biocida administrado via dieta, em que também foi detectado leve atraso no descolamento do prepúcio de machos da geração F1 tratados com a maior dose da substância teste, o qual foi atribuído à diminuição de peso corpóreo. Esses autores consideraram que, neste caso, a verificação

de redução no peso corpóreo e de atraso no descolamento do prepúcio deveria desencadear um próximo acasalamento. Beekhuijzen e colaboradores (2009) defendem que uma segunda geração deve ser conduzida se houver ambiguidade nos dados da geração F1, já que o valor adicional de um segundo acasalamento é justamente detectar efeitos que ocorrem em baixa frequência ou que são menos robustos. Paralelamente, pode-se concluir que os indícios do ensaio com o 2,4-D deveriam ter sido considerados suficientes para se optar pelo disparo de uma segunda geração.

A opção dos autores pela não criação de uma segunda geração também foi baseada nas considerações sobre a margem de exposição defendidas pelo Programa de Avaliação da Segurança Química na Agricultura (*Agricultural Chemical Safety Assessment – ACSA*, conforme Cooper *et al.*, 2006), cujo paradigma defende que se os sinais de toxicidade estão limitados apenas à maior dose (com nenhuma tendência dose-resposta aparente), a margem de exposição dessa dose em relação às exposições humanas estimadas ou diretamente medidas deve ser considerada na decisão. Se a margem de exposição for considerada segura, a criação de uma segunda geração não é necessária. Os autores informam, com base em dados de um estudo de exposição de famílias agrícolas americanas (Alexander *et al.*, 2007), que a margem de exposição de crianças ao 2,4-D é superior a 15.000 vezes o NOAEL projetado de 5 mg/kg/dia no Estudo de Uma Geração. Usando a dose interna estimada em um estudo de toxicocinética em filhotes, a margem de exposição foi 13.000 vezes maior do que aquela estimada para a exposição de crianças. Com base nesses resultados, os autores decidiram não criar uma segunda geração nesse estudo.

Apesar dessa questão limitar a aceitabilidade do estudo, considerando-se que esse ingrediente ativo já foi extensamente avaliado e que não foram observados efeitos consistentes, ele foi considerado válido pela Anvisa.

7.2.2.6 Conclusões do Estudo de Uma Geração Estendida

Os NOAELs parental, reprodutivo e para o desenvolvimento definidos a partir do Estudo de Uma Geração Estendida realizado com o 2,4-D em ratos estão descritos no quadro 28, com as respectivas justificativas.

Quadro 28. NOAELs definidos a partir do Estudo de Uma Geração Estendida em ratos.

Tipo	Sexo	NOAEL	Justificativas
Parental	♂	16,6 mg/kg (300 ppm)	- 800 ppm: ↓ peso rins e alterações histopatológicas.
	♀	28,7 mg/kg (300 ppm)	- 600 ppm: diminuição do peso corpóreo materno durante a lactação.
Reprodutivo	♂	45,3 mg/kg (800 ppm)	- Não houve efeitos reprodutivos nas doses testadas.
	♀	40,2 mg/kg (600 ppm)	- Não houve efeitos reprodutivos nas doses testadas.
Desenvolvimento	♂	6,8 mg/kg (100 ppm)	- 300 ppm: alterações histopatológicas renais características.
	♀	7,6 mg/kg (100 ppm)	- 300 ppm: ↑ peso rins.

7.3 ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS

7.3.1 Reprodução

Arbuckle e colaboradores (1999) encontraram níveis detectáveis de 2,4-D (de < 5 ppb a 650 ppb, com uma média de 29,8 ppb e uma mediana de 4,8 ppb) no sêmen de aplicadores de 2,4-D do Canadá; entretanto, esses autores não avaliaram a qualidade desse sêmen.

Lerda e Rizzi (1991) verificaram níveis significativos de astenospermia, necrospermia e teratospermia em trabalhadores agrícolas expostos ao 2,4-D (que apresentaram um valor médio de 9,02 mg/L de 2,4-D na urina) e concluíram que o 2,4-D prejudica o epitélio germinativo, altera a espermatogênese e, portanto, a fertilidade masculina. Quando questionada sobre este resultado, a Força Tarefa 2,4-D argumentou que o estudo em questão é bastante limitado, pois os controles não foram adequadamente compostos por agricultores não expostos e o 2,4-D foi o único agente medido na urina. Portanto, não é possível determinar se apenas o trabalho agrícola, e o 2,4-D especificamente, são responsáveis pelos efeitos observados ou se os efeitos relatados podem ser atribuíveis a outros confundidores presentes no ambiente agrícola (incluindo outros agrotóxicos). Informaram que não foi verificada associação estatisticamente significativa entre as concentrações urinárias de 2,4-D e diminuições na qualidade espermática em um estudo americano (Swan *et al.*, 2003). De fato, Swan e colaboradores (2003), em um estudo caso-controle realizado nos Estados Unidos, verificaram uma associação inconsistente entre a diminuição da qualidade espermática e a detecção de 2,4-D na urina (2,4-D detectado em apenas 12% dos casos).



A EFSA, em seu relatório de 2014, citou que a literatura epidemiológica relacionada a efeitos reprodutivos do 2,4-D em humanos é esparsa e em geral negativa; concluindo que não há evidência convincente de toxicidade reprodutiva em humanos.

7.3.2 Desenvolvimento

É importante citar que desde os anos sessenta diversos estudos epidemiológicos avaliaram malformações congênitas na prole de pais expostos a agrotóxicos, entretanto, as avaliações de exposição são em geral imprecisas (utilização do cargo que o trabalhador ocupa como medida de exposição; medidas de exposição vagas como “qualquer agrotóxico”; ou medidas substitutivas de exposição) e o efeito de agrotóxicos no desenvolvimento fetal humano permanece incerto (Weselak *et al.*, 2008). Esse é o caso de diversos estudos epidemiológicos que visaram verificar a associação entre a exposição ao 2,4-D e a ocorrência de malformações congênitas, porém, apresentaram resultados pouco esclarecedores (Garry *et al.*, 1996; Schreinemachers, 2003).

Arbuckle e colaboradores (1999) não encontraram associação entre o uso de 2,4-D nos períodos pré- ou pós-concepção e a ocorrência de abortos espontâneos; no entanto, quando os abortos foram divididos em precoces ou tardios (< 12 semanas ou de 12 a 19 semanas), a associação foi significativa para os abortos precoces e a exposição pré-concepção. Weselak e colaboradores (2008) não identificaram aumento do risco de malformações congênitas devido à exposição ao 2,4-D durante os períodos pré ou pós-concepção.

A EFSA, em seu relatório de 2014, citou que a literatura epidemiológica fornece evidência de ausência de aumento de risco em humanos de malformações congênitas relacionadas à exposição ao 2,4-D.

7.4 CONCLUSÕES SOBRE A TOXICIDADE DO 2,4-D NA REPRODUÇÃO E NO DESENVOLVIMENTO

Os diversos estudos realizados com o 2,4-D confirmam a conclusão das diversas agências reguladoras de que esse ingrediente ativo não possui potencial teratogênico (USEPA, 2005; PMRA, 2007; EFSA, 2014b). Os efeitos do 2,4-D no



desenvolvimento consistem em variações esqueléticas e diminuição do peso fetal, que ocorreram em doses que causaram toxicidade materna e que estavam acima do limiar de toxicocinética linear.

Há suspeitas de efeitos do 2,4-D sobre o sistema reprodutivo, porém, esses ocorreram apenas em altas doses e não afetaram os parâmetros reprodutivos avaliados nos estudos multigeracionais. Inclusive, apesar de terem sido evidenciadas anomalias na cabeça dos espermatozóides em estudo com camundongos expostos ao 2,4-D (Amer e Aly, 2001), esses resultados não foram corroborados pelos estudos que avaliaram efeitos reprodutivos ou embriofetais.

Os efeitos tireoidianos do 2,4-D serão discutidos mais detalhadamente no item a seguir, que trata dos efeitos desse ingrediente ativo no sistema endócrino.

8 TOXICIDADE DO 2,4-D NO SISTEMA ENDÓCRINO

Em análise à situação do 2,4-D nas demais agências internacionais verificou-se que ele foi um dos ingredientes de escolha da Agência de Proteção Ambiental Americana para realizar os estudos da fase I do Programa de Detecção de Desreguladores Endócrinos (*Endocrine Disruptor Screening Program – EDSP*), com base em seu potencial de exposição (USEPA, 2009h).

A fase I do EDSP é composta por 11 testes:

- ligação ao receptor de estrógenos (*in vitro*),
- ativação transcricional do receptor de estrógenos (*in vitro*),
- ligação ao receptor de andrógenos (*in vitro*),
- aromatase recombinante (*in vitro*),
- esteroidogênese (*in vitro*),
- metamorfose de anfíbios (rãs),
- reprodução de peixes - curta duração,
- uterotrófico (ratas),
- Hershberger (ratos),
- puberdade em fêmeas (ratas),
- puberdade em machos (ratos).

A Força Tarefa 2,4-D testou o potencial modulador endócrino do 2,4-D em 7 dos 11 estudos acima citados, pois a realização dos 4 testes *in vivo* com mamíferos



(ensaios uterotrófico, Hershberger e de puberdade em machos e em fêmeas) foi dispensada pela USEPA, com base em outras informações científicas relevantes submetidas pela Força Tarefa 2,4-D e nos resultados do Estudo de Uma Geração Estendida, que incorpora diversos parâmetros endócrinos e é considerado um estudo aceitável correspondente à fase II do EDSP.

8.1 ESTUDOS *IN VITRO*

Cinco dos onze estudos do EDSP são *in vitro* e foram realizados com 2,4-D ácido em concentrações logarítmicas seriadas, variando de 10^{-11} a 10^{-4} M (0,000002 a 22,1 µg/mL). Os autores dos estudos descrevem que todos os testes da fase I do EDSP seguiram as diretrizes da USEPA, exceto por desvios planejados, em que a máxima concentração testada em quatro dos cinco testes *in vitro* (ligação e transativação do receptor de estrógenos, ligação ao receptor de andrógenos e inibição da aromatase) foi de 10^{-4} M (ou 100 µM) em vez da concentração de 1 mM (10^{-3} M) exigida nas diretrizes. Justificam que os estudos dietéticos de toxiconética existentes indicam que concentrações de 1 mM de 2,4-D em testes *in vitro* são equivalentes a doses *in vivo* que produzem concentrações plasmáticas em ratos muito acima do ponto de inflexão para a toxicocinética não-linear e, portanto, não têm relevância para informar o risco para humanos, pois excederiam muito as reais concentrações de exposição encontradas em estudos de biomonitoramento.

Os autores foram questionados pela Anvisa sobre o perfil de impurezas do lote de 2,4-D utilizado nestes estudos; entretanto, informaram ter avaliado apenas o teor de ingrediente ativo do lote utilizado.

Os resultados destes testes *in vitro* já foram publicados na literatura aberta (Coady *et al.*, 2014), avaliados pela USEPA (USEPA, 2015) e estão descritos resumidamente no quadro 29.



Quadro 29. Descrição dos estudos *in vitro* do EDSP realizados com o 2,4-D.

Teste (diretrizes)	Sistema-teste	Pureza e Concentrações de 2,4-D	Limitações	Resultado	Referência
Ligação ao Receptor de Estrógeno (OPPTS 890.1250; USEPA, 2009d)	Receptor de estrógeno em homogenato de citosol uterino de ratas.	- 98,5% - 8 concentrações: 10^{-11} a 10^{-4} M (0,000002 a 22,1 µg/mL)	- Maior concentração de 2,4-D em desacordo com o estabelecido pela USEPA: deveria ser 10^{-3} M.	Negativo 2,4-D não interage com o receptor de estrógeno em concentrações até 10^{-4} M.	LeBaron <i>et al.</i> , 2011d
Ligação ao Receptor de Andrógeno (OPPTS 890.1150; USEPA, 2009b)	Receptor de andrógeno em homogenato de citosol prostático de ratos.	- 98,5% - 8 concentrações: 10^{-11} a 10^{-4} M (0,000002 a 22,1 µg/mL)	- Maior concentração de 2,4-D em desacordo com o estabelecido pela USEPA: deveria ser 10^{-3} M.	Negativo 2,4-D não interage com o receptor de andrógeno em concentrações até 10^{-4} M.	LeBaron <i>et al.</i> , 2011c
Aromatase Recombinante (OPPTS 890.1200; USEPA, 2009c)	Microsossomos recombinantes contendo aromatase (CYP19) e citocromo P450 redutase humanas.	- 98,5% - 8 concentrações: 10^{-11} a 10^{-4} M, incluindo $10^{-4,5}$ M (0,000002 a 22,1 µg/mL)	- Maior concentração de 2,4-D em desacordo com o estabelecido pela USEPA: deveria ser 10^{-3} M. - Condições de teste não consistentes.	Negativo 2,4-D considerado não inibidor da atividade da aromatase em concentrações até 10^{-4} M.	Coady <i>et al.</i> , 2011
Ativação Transcricional do Receptor de Estrógeno (OPPTS 890.1300; USEPA, 2009e)	Células hERa-HeLa 9903 estáveis (derivadas de um tumor de colo uterino humano).	- 98,5% - 7 concentrações: 10^{-10} a 10^{-4} M (0,00002 a 22,1 µg/mL)	- Maior concentração de 2,4-D em desacordo com o estabelecido pela USEPA: deveria ser 10^{-3} M - Diversos parâmetros de confiabilidade e reprodutibilidade fora dos limites especificados nas diretrizes da USEPA, o que coloca em questão a adequabilidade do laboratório para executar este teste.	Inconclusivo Máxima resposta não atingiu 10% da resposta do controle positivo em nenhum dos quatro ensaios (0%; 8,8%; 5,3% e 7,1%), no entanto, devido às diversas limitações identificadas, os resultados foram considerados não confiáveis e, portanto, uma conclusão final não pode ser obtida.	LeBaron <i>et al.</i> , 2011a
Esteroidogênese (OPPTS 890.1550; USEPA, 2009g)	Linhagem celular de carcinoma adrenocortical humano H295R.	- 98,5% - 7 concentrações: 10^{-10} a 10^{-4} M (0,00002 a 22,1 µg/mL)	- Responsividade inadequada do sistema-teste: produção basal mínima de estradiol pelo controle negativo menor que o limite mínimo em três ensaios (28,5%; 14,5% e 4,25% menor, respectivamente) e maior inibição da produção de estradiol induzida pelo controle positivo (20%) nas quatro corridas experimentais.	Fracamente Positivo - 22,1 µg/mL: ↑ significativo e reprodutível na produção de estradiol (1,2 vezes). - 22,1 µg/mL: ↓ não significativa na produção de testosterona	LeBaron <i>et al.</i> , 2011b



Pode-se concluir que os testes de ligação ao receptor de estrógeno, de ligação ao receptor de andrógeno e da aromatase recombinante foram claramente negativos.

O teste de ativação transcricional do receptor de estrógeno teve resultado considerado inconclusivo pela Anvisa, por apresentar diversas limitações experimentais, ou seja, diversos parâmetros de confiabilidade e reprodutibilidade fora dos limites especificados nas diretrizes da USEPA, o que coloca em questão a adequabilidade do laboratório para executar esse teste. Também não é possível garantir que se a dose máxima indicada pela USEPA (10^{-3} M) tivesse sido testada, essa não atingiria os 10% da resposta do controle positivo, o necessário para o teste ser considerado positivo. Quando questionados sobre esses resultados, que se aproximaram dos 10% em duas das quatro corridas experimentais, o que poderia indicar que concentrações mais altas levariam a resposta positiva, os autores responderam que consideraram todas as corridas experimentais clara e inequivocadamente negativas; e que os valores de 8,8 e 7,1% representariam o “ruído de fundo” do sistema baseado na luciferase. Concluem que mesmo se tivesse sido observado leve aumento neste teste, o peso da evidência indica claramente que o 2,4-D não possui qualquer atividade estrogênica *in vitro* ou *in vivo*.

O teste de esteroidogênese, por outro lado, apresentou aumento estatisticamente significativo na produção de estradiol nas quatro corridas experimentais realizadas. Os autores consideraram que, embora os leves aumentos na produção de estradiol demonstrados por esse estudo tenham sido consistentes e estatisticamente significativos, aumentos de 1,2 vezes ou menores nesse teste são de relevância biológica questionável, pois argumentam que durante o desenvolvimento e validação do estudo de esteroidogênese pela USEPA foi estabelecida a necessidade de alterações de pelo menos 1,5 vezes na produção de estradiol ou testosterona, acompanhadas de significância estatística, para demonstrar efeito na esteroidogênese. Dessa forma, concluíram que o 2,4-D não foi positivo neste ensaio.

No entanto, aumento na produção de estradiol 20% menor que o indicado pelas diretrizes da USEPA pode ser considerado suficiente quando consideramos que a produção basal de estradiol estava diminuída em aproximadamente 20% e a inibição induzida pelo procloraz aumentada em relação ao máximo previsto, também em 20%. Portanto, considerando os resultados em conjunto, isto é, a diminuição da responsividade do sistema-teste (diminuição da produção basal de estradiol e aumento



da inibição da produção de estradiol pelo controle positivo) e o aumento de apenas 1,2 vezes da produção de estradiol induzido pelo 2,4-D, poderíamos inferir que, se o sistema-teste estivesse funcionando adequadamente, a resposta à concentração mais alta de 2,4-D poderia ter sido maior e, provavelmente, ter atingido as 1,5 vezes consideradas necessárias pelos autores. No relatório de validação multilaboratorial do teste de esteroidogênese elaborado em 2008 para a USEPA (Hecker *et al.*, 2008) está previsto que substâncias que aumentem de maneira estatisticamente significativa a produção de estradiol ou testosterona menos de 2 vezes sejam classificadas como indutores fracos; mas que, de fato, nem sempre é possível distinguir entre indutores fracos e substâncias negativas.

A USEPA considera que os critérios de desempenho geralmente têm o objetivo de garantir que um ensaio é sensível a substâncias fracamente ativas e prevê uma abordagem alternativa para melhor categorizar indutores ou inibidores fracos, que seria a condução de um segundo experimento com um grupo de doses que forneça relações dose-resposta mais detalhadas.

No entanto, apesar de considerar o resultado do teste de esteroidogênese positivo, a USEPA (2015) concluiu pela ausência de evidência convincente de interação potencial do 2,4-D com a via estrogênica.

Com base nos resultados de todos esses estudos *in vitro*, os autores concluíram que o 2,4-D possui baixo potencial em interagir com o sistema endócrino. Vale ressaltar que permanecem dúvidas quanto à máxima dose utilizada em quatro dos cinco estudos *in vitro* realizados com o 2,4-D: ligação ao receptor de estrógeno, ligação ao receptor de andrógeno, ativação transcricional do receptor de estrógeno e aromatase recombinante. Como exemplo, no relatório do estudo de validação interlaboratorial do teste da aromatase elaborado pela USEPA em 2007, foi citado o caso da substância nonilfenol, que não inibia a atividade da aromatase em concentrações entre 10^{-9} e 10^{-5} M, mas quando a concentração chegou a 10^{-3} M, demonstrou ser um inibidor desta enzima.

Além disso, o 2,4-D está entre as cerca de 1000 substâncias químicas testadas na bateria de ensaios do programa “ToxCast/Tox21” da USEPA, que inclui 342 ensaios e 821 parâmetros (vários ensaios incluem a avaliação de múltiplos parâmetros) que fornecem informações sobre a atividade biológica *in vitro* de substâncias e cujos resultados estão publicamente disponíveis em <http://actor.epa.gov/dashboard/> (IARC, 2015). A IARC avaliou os dados do 2,4-D gerados pelo ToxCast/Tox21 em 265



ensaios, entre eles alguns relativos aos receptores de estrógeno e de andrógeno. Os procedimentos de análise dos dados do 2,4-D seguiram a abordagem definida por Reif e colaboradores (2010 e 2013) e estarão detalhadamente descritos na Monografia IARC volume nº 113 (IARC, 2015). Dos efeitos mediados por receptores, avaliados em 92 ensaios, o 2,4-D não foi ativo em nenhum relativo aos receptores de estrógeno e de andrógeno, entre outros, apresentando atividade em apenas 1 parâmetro dos 12 relacionados ao receptor ativado por proliferador de peroxissomo (*peroxisome proliferator-activated receptor* - PPAR).

8.2 ESTUDOS *IN VIVO*

Nos estudos *in vivo* do EDSP (metamorfose de anfíbios e reprodução de peixes), as concentrações máximas de 2,4-D utilizadas estavam conforme estabelecido pela USEPA (100 mg/L). Os autores do estudo esclareceram que a concentração de 4 mg/L é consistente com uma concentração ambiental máxima, conservadora, prevista a partir do uso do 2,4-D como herbicida aquático.

Os autores foram questionados pela Anvisa sobre o perfil de impurezas do lote de 2,4-D utilizado nestes estudos; entretanto, informaram ter sido avaliado apenas o teor de ingrediente ativo do lote utilizado.

Os resultados desses testes já foram publicados na literatura aberta (Coady *et al.*, 2013), avaliados pela USEPA (USEPA, 2015) e estão resumidamente descritos no quadro 30.

Quadro 30. Descrição estudos *in vivo* do EDSP realizados com o 2,4-D.

Estudo	Sistema	Pureza e Concentrações de 2,4-D	Limitações do estudo	Resultado	Referência
Metamorfose de anfíbios – rã (OPPTS 890.1100; USEPA, 2009a; OECD 231, 2009)	Girino da rã africana de garras, <i>Xenopus laevis</i>	- 98,6% - 4 concentrações: 0,273; 3,24; 38,0 e 113 mg ea 2,4-D/L	- Alta variabilidade das concentrações de 2,4-D nos aquários - acima do aceitável (variaram de 31 a 138% das nominais).	<u>Negativo</u> 2,4-D é provavelmente inativo na tireoide em concentrações ≤ 113mg ea/L (NOEC).	Coady <i>et al.</i> , 2010
Reprodução de Peixes - Curta Duração (OPPTS 890.1350; USEPA, 2009f; OECD 229, 2009)	Peixes <i>Pimephales promelas</i> sexualment e maduros	- 98,6% - 4 concentrações: 0,245; 3,14; 34,0 e 96,5 mg ea 2,4-D/L	- Concentrações de vitelogenina apresentaram grande variabilidade e, conseqüentemente, baixíssima robustez (poder estatístico de apenas 16,6%). O número de animais também é muito baixo. - A quantidade de plasma foi insuficiente para avaliação das concentrações de 17β-estradiol e testosterona, recomendada pela USEPA.	<u>Positivo para fecundidade</u> - 96,5 mg/L: ↓ significativa (34%) da fecundidade (↓ monotônica: 29,8±6,4; 29,0±6,47; 25,9±5,27; 22,9±8,72 e 19,7±5,97 ovos/fêmea/dia nos respectivos grupos). <u>Inconclusivo para vitelogenina</u> - Impossível tirar qualquer conclusão biológica definitiva a partir dos dados de vitelogenina. - LOEC: 96,5 mg ea 2,4-D/L - NOEC: 34,0 mg ea 2,4- D/L	Marino <i>et al.</i> , 2010

Legenda: ea=equivalentes ácidos; NOEC (*No Observed Effect Concentration*)=concentração sem efeito; LOEC (*Low Observed Effect Concentration*)= concentração mais baixa na qual foi observado efeito.

O teste de metamorfose de anfíbios permite identificar a interferência de substâncias no eixo hipotálamo-hipófise-tireoide de girinos, já que os níveis de hormônios tireoidianos são essenciais para o progresso normal da metamorfose. O 2,4-D apresentou resultado negativo nesse teste.



No teste de reprodução de peixes foi observada diminuição significativa da fecundidade dos peixes expostos à maior concentração de 2,4-D. Os autores argumentam que, como não houve efeitos significativos relacionados ao tratamento nos parâmetros endócrino-responsivos mais específicos, como concentração de vitelogenina, índice gônado-somático, histopatologia gonadal ou registro de tubérculos, é provável que a diminuição da fecundidade observada na maior concentração testada seja uma resposta generalizada ao estresse, não necessariamente ligada a um modo de ação endócrino específico no eixo hipotálamo-hipófise-gônada (HPG) dos peixes expostos. No artigo publicado com os resultados deste estudo, os autores relatam que esse tipo de resposta ao estresse não está previsto em concentrações ambientalmente relevantes de 2,4-D.

De fato, sabe-se que a fecundidade é um parâmetro também responsivo a outros eventos estressores já que, além de ser uma resposta consistente de peixes com alteração no eixo HPG, integra efeitos de toxicidade geral, comportamentais, entre outros (USEPA, 2007a). Mesmo assim, a fecundidade é considerada o parâmetro mais importante e integrativo do estudo de reprodução em peixes, por ser um achado consistentemente observado após a exposição a diversas substâncias endócrinas, e por incluir os principais modos de ação propostos pelo ensaio. A diminuição da fecundidade é observada como uma resposta predominante a altas concentrações de compostos estrogênicos ou fracamente estrogênicos. Além disso, no estudo em questão não foi possível garantir que as concentrações de vitelogenina não foram afetadas pelo 2,4-D, dada a variabilidade dos resultados obtidos para esse parâmetro.

Adicionalmente, não foi realizada a análise dos níveis de esteróides sexuais, especialmente útil nos casos em que é observada uma redução da fecundidade, pois pode fornecer informações adicionais sobre a ocorrência de um modo de ação endócrino-mediado ou não. Sabe-se que alterações nos níveis dos hormônios sexuais tipicamente coincidem com alterações em outros parâmetros, como fecundidade e concentrações de vitelogenina. De qualquer maneira, há pesquisadores (Eastern Research Group, 2008) que esclarecem que uma alteração apenas da fecundidade já qualifica uma substância como tóxica para a reprodução, embora não necessariamente como um composto com atividade endócrina (mas sim como um potencial desregulador do eixo HPG). Dessa forma, a alteração na fecundidade pode ser um efeito adverso com



importância regulatória, seja devido à atividade mediada por hormônios ou devida a outro mecanismo de ação.

8.3 ANÁLISE DA LITERATURA CIENTÍFICA SOBRE OS POSSÍVEIS EFEITOS ENDÓCRINOS E REPRODUTIVOS DO 2,4-D

Conforme já descrito, o 2,4-D apresentou resultados claramente negativos nos testes de ligação ao receptor de estrógeno, de ligação ao receptor de andrógeno e de inibição da aromatase recombinante. No entanto, a partir dos resultados dos estudos do EDSP e do Estudo de Uma Geração Estendida realizados com o 2,4-D, restam dúvidas sobre os potenciais efeitos desse ingrediente ativo na ativação transcricional do receptor de estrógeno, na esteroidogênese, na reprodução de peixes e na tireoide.

Por isso, foi realizada extensa pesquisa da literatura científica relacionada aos possíveis efeitos do 2,4-D no sistema endócrino, cujos principais resultados estão descritos a seguir.

8.3.1 Avaliação da Atividade Estrogênica

Ao encontro do que foi verificado no estudo realizado pela própria Força Tarefa, o 2,4-D foi negativo em estudos *in vitro* que avaliaram seu potencial de ligação ao receptor de estrógeno de preparados de citossol uterino de ratas (Blair *et al.*, 2000) e de oviduto de jacaré (Vonier *et al.*, 1996).

Adicionalmente, concentrações de até 1 mM de 2,4-D não apresentaram atividade estrogênica, conforme verificado em diversos estudos *in vitro* realizados em diferentes linhagens celulares: células de câncer de mama (MCF-7) sensíveis a estrógenos (Soto *et al.*, 1995), células de levedura transfectadas com o receptor estrogênico α (Nishihara *et al.*, 2000; Jungbauer e Beck, 2002; Hurst e Sheahan, 2003), células renais de macaco transfectadas com o receptor estrogênico α (Sun *et al.*, 2012) e células de ovário de hamster (Kojima *et al.*, 2004) ou de câncer de colo uterino humano (Lemaire *et al.*, 2006) transfectadas com os receptores estrogênicos α e β .

Portanto, apesar do estudo de ativação transcricional do receptor de estrógeno realizado pela Força Tarefa ter apresentado resultado considerado inconclusivo pela Anvisa, os diversos resultados verificados na literatura indicam que o 2,4-D provavelmente não leva à ativação transcricional do receptor de estrógeno.

8.3.2 Avaliação da Atividade Androgênica

Concentrações de até 10 μM de 2,4-D não mostraram atividade androgênica ou antiandrogênica em diversos ensaios *in vitro* (Kojima *et al.*, 2004; Lemaire *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2012), confirmando a ausência de efeitos observada nos estudos realizado pela Força Tarefa. Por outro lado, Kim e colaboradores (2005) relataram que o 2,4-D (até 0,5 μM) causou inibição competitiva da ligação da di-hidrotestosterona ao receptor de andrógeno, diferentemente do verificado por outros autores (Kojima *et al.*, 2004; Lemaire *et al.*, 2006) e pela Força Tarefa, que não verificaram alteração na ligação ao receptor de andrógenos induzida pelo 2,4-D.

Além disso, o 2,4-D (até 10 μM), isoladamente, não aumentou a proliferação nem a ativação transcricional do receptor de andrógenos de células de câncer de próstata (Kim *et al.*, 2005). No entanto, quando as células (de duas diferentes linhagens) foram tratadas com 2,4-D (10 nM) em adição à di-hidrotestosterona, Kim e colaboradores (2005) observaram aumento na proliferação e ativação transcricional do receptor androgênico induzida pela di-hidrotestosterona (sem alterar a expressão do receptor), o que sugere efeitos sinérgicos ou aditivos dessas duas substâncias. Da mesma forma, Sun e colaboradores (2012) relataram aumento induzido pelo 2,4-D (14 μM) nos efeitos da testosterona em células Vero (células renais do macaco verde africano) transfectadas com o receptor androgênico.

Todavia, é provável que os efeitos sinérgicos ou aditivos verificados por Kim e colaboradores (2005) e por Sun e colaboradores (2012) não tenham relevância *in vivo*, considerando-se que nos estudos realizados em roedores não foi observado qualquer indicativo de que o 2,4-D possua efeitos androgênicos. Pelo contrário, a partir da observação de alguns indícios como o leve atraso no descolamento do prepúcio ou a diminuição no peso das glândulas acessórias no Estudo de Uma Geração Estendida, poderíamos, na verdade, suspeitar que esse ingrediente ativo apresentasse potenciais efeitos anti-androgênicos.



Portanto, o conjunto dos resultados indica que o 2,4-D não possui efeitos na ligação ao receptor androgênico ou na ativação transcricional desse.

8.3.3 Avaliação da Esteroidogênese e da Atividade da Aromatase

A esteroidogênese envolve os processos pelos quais o colesterol é convertido em hormônios esteroides biologicamente ativos, ou seja, andrógenos, estrógenos, progestágenos, mineralocorticoides e glicocorticoides (Sanderson, 2006; Miller e Auchus, 2011). As enzimas esteroidogênicas consistem em diversas enzimas citocromo p450 específicas, hidroxisteroide desidrogenases e esteroide redutases (Sanderson, 2006). Os estrógenos são produzidos pela aromatização de andrógenos (inclusive aqueles derivados da esteroidogênese adrenal) por uma série de reações catalisadas por uma única enzima microsomal, a citocromo P450 aromatase (Simpson *et al.*, 1994). Apesar da biossíntese de estrógenos ocorrer em todos os vertebrados (mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes), na maioria deles a aromatase é encontrada principalmente nas gônadas e encéfalo. Em humanos e outros primatas, por outro lado, há maior distribuição desta enzima, sendo também encontrada na placenta e no tecido adiposo (Simpson *et al.*, 1994).

As células H295R utilizadas no teste de esteroidogênese possuem características fisiológicas de células indiferenciadas da adrenal humana fetal e têm a capacidade de produzir hormônios esteroidais encontrados no córtex adrenal de adultos e nas gônadas, permitindo a avaliação de efeitos de substância na síntese de corticosteroides e na produção de hormônios esteroides sexuais como andrógenos e estrógenos, conforme figura a seguir (Gazdar *et al.*, 1990). No entanto, no teste de esteroidogênese do EDSP são avaliados apenas os níveis de testosterona e estradiol, conforme figura 1 a seguir.

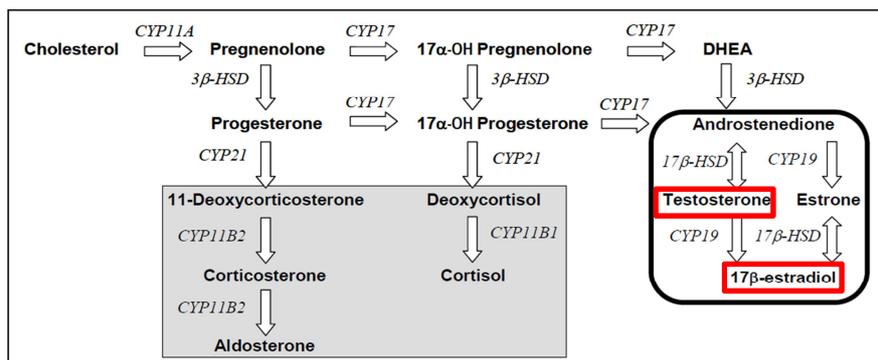


Figura 1. Via esteroidogênica em células H295R. As enzimas estão em itálico, os hormônios em negrito e as setas indicam a direção da síntese. O retângulo acidentado indica a via de síntese de corticosteroides, não avaliada no teste de esteroidogênese do Programa de Detecção de Desreguladores Endócrinos da USEPA. A via de síntese dos hormônios sexuais está circundada em preto. Os hormônios avaliados no teste de esteroidogênese estão circundados em vermelho. CYP= citocromo P450; HSD= hidroxisteroide hidrogenase. Fonte: Hecker *et al.*, 2008.

Crain e colaboradores (1997) e Spiteri e colaboradores (1999) avaliaram a exposição de ovos de jacaré ao 2,4-D (0,14; 1,4 e 14 mg/L) e não verificaram alterações nos parâmetros endócrinos avaliados, entre eles a atividade da aromatase gonadal e hepática *in vitro*, a reversão sexual, as concentrações plasmáticas de estrógeno e testosterona e a histopatologia gonadal.

Por outro lado, Liu e colaboradores (1996) verificaram em um estudo de esteroidogênese *in vitro* com células de Leydig de ratos Crl:CDBR que o 2,4-D, em concentrações iguais ou superiores a 500 e 1000 µM, aumentou significativamente a produção de estradiol. Ainda, foi verificada redução não significativa da liberação de testosterona estimulada pela gonadotrofina coriônica (para 70% do controle), sem alteração na secreção basal de testosterona pelas células de Leydig.

Esse último resultado parece ir ao encontro daquele verificado no estudo de esteroidogênese realizado pela Força Tarefa (Coady *et al.*, 2013): a maior concentração de 2,4-D utilizada levou a um leve, porém significativo, aumento na produção de estradiol, com diminuição leve e não significativa na produção de testosterona, o que poderia indicar uma indução da citocromo P450 aromatase pelo 2,4-D, conforme figura 2, que mostra apenas parte da via esteroidogênica acima descrita. Inclusive, verificando-se o esquema, pode-se entender porque uma diminuição não significativa da testosterona ainda pode indicar uma indução da aromatase, pois pode haver também aumento de estrona, com consequente redução da androstenediona, hormônios cuja avaliação não está prevista no estudo de esteroidogênese do EDSP. Mais estrona sendo sintetizada também levaria ao aumento de estradiol.

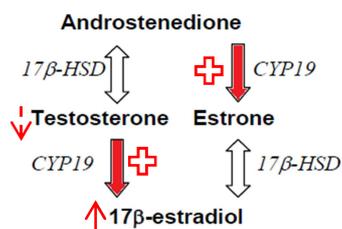


Figura 2. Via de síntese dos hormônios sexuais no estudo de esteroidogênese e possíveis efeitos da indução (+) da CYP 19 (aromatase) nos níveis de estradiol (↑ : aumento significativo) e de testosterona (↓ : diminuição não significativa).

Outra possível hipótese para o aumento do estradiol verificado no teste de esteroidogênese seria uma ação indireta do 2,4-D, como uma interação com as enzimas metabolizadoras de estradiol, hipótese de Higley e colaboradores (2010) para o aumento de estrógeno, sem alteração na concentração de testosterona, induzida pelo prometon, um herbicida avaliado por esses autores. Uma inibição da formação de sulfato de estradiol inativo leva a um aumento na biodisponibilidade do estradiol nos tecidos alvo (mas não necessariamente nos níveis circulantes de estradiol), e portanto, a um efeito estrogênico indireto (Kester *et al.*, 2000). Kester e colaboradores (2000) avaliaram os efeitos de bifenilas policloradas e diversos fenóis (até 1 μM) no metabolismo de estradiol pela sulfotransferase e verificaram que o 2,4-DCP, o 2,4,6-TCP e o pentaclorofenol inibem essa enzima, porém de forma muito menos potente que o fenol. Esse mecanismo pode ser compartilhado pelo 2,4-D, apesar dele ter sido verificado apenas na concentração de 100 μM , que seria bastante superior às das demais substâncias testadas e pouco relevante para humanos.

Ainda, o resultado observado pode ser efeito de possíveis contaminantes das amostras de 2,4-D utilizadas no teste, considerando-se que a Força Tarefa 2,4-D não apresentou o perfil de impurezas do lote utilizado nos estudos do EDSP.

8.3.3.1 Possível relação entre desregulação endócrina da esteroidogênese e a ocorrência de câncer

Conforme já descrito anteriormente, apesar da biossíntese de estrógenos ocorrer em todos os vertebrados, na maioria deles a aromatase é encontrada principalmente nas gônadas e encéfalo, enquanto em humanos e outros primatas ela é também encontrada na placenta e no tecido adiposo (Simpson *et al.*, 1994). O

significado fisiológico da biossíntese de estrógenos na placenta e no tecido adiposo de humanos ainda é incerto (Simpson *et al.*, 1994). O estrógeno produzido em cada tecido é específico: como exemplo, o ovário humano sintetiza principalmente estradiol, enquanto a placenta sintetiza estriol e o tecido adiposo estrona (Simpson *et al.*, 1994). Sabe-se que a produção de estrógeno pelo tecido adiposo, que possui como principal substrato a androstenediona circulante, produzida pelo córtex da adrenal, aumenta com o peso e a idade e está diretamente correlacionada com a incidência de câncer de endométrio e de mama (Simpson *et al.*, 1994).

Esse fato poderia gerar preocupação no caso de uma substância que possivelmente induz a produção de estrógeno por indução da aromatase, pois, pelo fato a aromatase não estar presente no tecido adiposo de roedores, os possíveis efeitos carcinogênicos da indução dessa enzima em humanos não poderiam ser previstos em estudos que utilizam animais. Ao encontro desta discussão, Laville e colaboradores (2006), quando comparam seus resultados sobre desregulação endócrina de agrotóxicos *in vitro* com os obtidos por outros autores, contrários, enfatizam que na escolha do modelo celular a ser utilizado na avaliação do potencial *in vitro* de desregulação da aromatase humana deve-se levar em consideração o fato de que a indução da aromatase é tecido-específica. Por isso, se o 2,4-D realmente causar indução da aromatase *in vitro*, mas não apresentar efeitos nos estudos em roedores, ele ainda pode representar perigo para humanos.

Inclusive, essa preocupação torna-se maior no caso da verificação de associação entre o uso de 2,4-D e o risco de câncer de mama em um estudo epidemiológico caso-controle com membros hispânicos do sindicato agrícola da Califórnia/EUA (Mills e Yang, 2005). No entanto, a IARC verificou diversas limitações nesse estudo, entre elas a ausência de ajuste para diversos potenciais confundidores (IARC, 2015). Outro estudo, como o de coorte realizado por Kogevinas e colaboradores (1993), que avaliou 701 mulheres (Registro Internacional da IARC), oriundas de 10 países (maioria da Europa), expostas ocupacionalmente (fabricação) a diversos herbicidas clorofenoxi (além de outras substâncias envolvidas no processo de fabricação, como solventes, clorofenóis etc), não observou associação dessa classe de herbicidas com o câncer de mama. Vale citar que a maioria dos estudos epidemiológicos que avaliaram os herbicidas clorofenoxi ou o 2,4-D especificamente envolvem apenas populações masculinas (Kogevinas *et al.*, 1993).

No entanto, ainda não está claro se a indução da aromatase ocorre *in vivo* ou em quais tecidos-alvo ela poderia ocorrer (Sanderson, 2006). Sanderson (2006) ressalta que ainda se sabe relativamente pouco sobre os mecanismos subjacentes de interferência de substâncias químicas com a esteroidogênese e seus potenciais efeitos tóxicos nos tecidos esteroidogênicos em seres humanos ou animais selvagens. Enzimas-chave envolvidas na síntese e metabolismo de hormônios esteroides estão cada vez mais sendo consideradas alvos importantes de substâncias desreguladoras endócrinas, particularmente as enzimas citocromo P450 responsáveis pelas reações altamente específicas da via biossintética de esteroides (Sanderson, 2006). Porém, esta área da toxicologia endócrina ainda foi relativamente inexplorada e os mecanismos de regulação da CYP19 e outras enzimas esteroidogênicas em animais selvagens ainda são pouco conhecidos (Sanderson, 2006). São necessárias evidências experimentais adicionais para apoiar a hipótese de que a indução da aromatase, por exemplo, pode desempenhar um papel *in vivo* (Sanderson, 2006).

Se for demonstrado que a indução da aromatase desempenha algum papel *in vivo*, pode-se admitir a hipótese de que a indução deve ocorrer em tecidos que contêm níveis relativamente maiores de androstenediona do que de testosterona como precursor; como o córtex da adrenal e o tecido adiposo (Sanderson, 2006). Entretanto, como já foi dito, a natureza da regulação da expressão da aromatase é altamente tecido-específica e complexa, o que se torna um fator complicador. Além disso, em humanos, a CYP19 é expressa no ovário, testículo, cérebro, adrenal, placenta, tecido adiposo, ossos e pele, onde seus produtos, estradiol e estrona, possuem várias funções (Sanderson, 2006).

Sanderson (2006) salienta que maiores esforços precisam ser feitos para interpretar a relevância de leves perturbações endócrinas em sistemas isolados *in vitro* para a situação real em organismos intactos e que as diferenças espécie- e tecido-específicas na regulação da expressão da enzima esteroidogênica podem ser potencialmente grandes e devem ser consideradas.

A partir de todos esses dados, ainda não há como avaliar se o fraco efeito de altas doses de 2,4-D na esteroidogênese *in vitro* poderia representar algum perigo para seres humanos, principalmente porque os poucos estudos epidemiológicos existentes até o momento apresentam resultados também conflitantes e pouco consistentes. A USEPA não manifestou preocupações em relação ao pequeno aumento observado na produção de estradiol observado no teste de esteroidogênese e concluiu

pela ausência de evidência convincente de interação potencial do 2,4-D com a via estrogênica (USEPA, 2015). De qualquer forma, a Anvisa deverá manter-se atenta aos avanços da ciência nesta área e à avaliação do assunto pelas demais agências reguladoras internacionais, de forma a verificar se futuramente será necessário solicitar novos estudos mais específicos para avaliar as suspeitas levantadas até então. Além disso, deverá avaliar qualquer novo estudo epidemiológico publicado que possa indicar alguma associação que corrobore com os dados dos estudos *in vitro* existentes.

8.3.4 Avaliação dos Efeitos na Reprodução e em Hormônios Sexuais

Coady e colaboradores (2013), os autores do estudo de reprodução em peixes realizado pela Força Tarefa, descrevem que a ausência de alterações significativas nas concentrações de vitelogenina observada por eles está em contraste com os resultados relatados por Xie e colaboradores (2005) em trutas-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) jovens, que indicaram que após 7 dias de exposição a concentrações de 0,164 e 1,64 mg de equivalentes ácidos de 2,4-D/L, os níveis de vitelogenina estavam significativamente aumentados em relação aos dos controles. Eles questionam o fato de Xie e colaboradores (2005) terem avaliado os níveis de vitelogenina em peixes jovens machos e fêmeas, sem levar em conta o potencial de diferenças sexuais dessa medida. A inclusão de peixes imaturos machos e fêmeas, sem a diferenciação sexual individual, pode ter contribuído para a variabilidade nas medidas resultantes de vitelogenina e também nas respostas medidas, já que fêmeas imaturas de trutas arco-íris possuem níveis mais altos de vitelogenina do que machos imaturos (Bon *et al.*, 1997; Kramer *et al.*, 2008).

Outras razões alegadas por Coady e colaboradores (2013) para as diferenças nas medidas de vitelogenina entre os dois estudos também podem ser devidas a diferenças de sensibilidade entre as espécies, à forma química do 2,4-D utilizado (ácido versus sal) ou a diferenças no delineamento experimental. Um total de 3 tanques réplicas com 2 peixes cada (n=6 peixes por tratamento) foram utilizados por Xie e colaboradores (2005), enquanto um maior número de réplicas (n=4) e peixes (n= 8 machos e 16 fêmeas por nível de tratamento) foram testadas para as concentrações de vitelogenina por Coady e colaboradores (2013).



Vale ressaltar que pode haver diferenças de sensibilidade entre as diferentes espécies de peixes testadas. Como exemplo, peixes medaka foram aproximadamente 10 vezes menos sensíveis que outras espécies de peixes em testes agudos e 9,3 vezes menos sensíveis que as trutas arco-íris em um teste crônico com o 2,4-D (Holcombe *et al.*, 1995). Entretanto, em um estudo recém publicado na literatura, o 2,4-D foi testado para expressão de vitelogenina em peixes machos de duas espécies, *Pimephales promelas* e trutas arco-íris (Crago *et al.*, 2015) e, diferentemente do verificado por Xie e colaboradores (2005) nas trutas arco-íris, o resultado foi negativo para a indução da expressão de vitelogenina no fígado, mesmo esses autores tendo utilizado a mesma concentração de 2,4-D (1,64 mg/L). Por outro lado, nos peixes machos *Pimephales promelas*, a mesma espécie utilizada pela Força Tarefa, verificou-se que o 2,4-D (1,64 mg/L) induziu aumento concentração-dependente de RNAm de vitelogenina no fígado, resultado diferente do obtido por Coady e colaboradores (2013), que não observou efeito na concentração de vitelogenina plasmática mesmo em concentrações 60 vezes superiores às utilizadas por Crago e colaboradores (2015). Vale citar que os resultados de vitelogenina do teste de reprodução de peixes realizado pela Força Tarefa foram considerados inconclusivos pela Anvisa, pois apresentaram alta variabilidade e, conseqüentemente, baixa robustez. Ainda, de acordo com Crago e colaboradores (2015), a resposta da vitelogenina nas trutas arco-íris não foi estatisticamente diferente do controle, mas também apresentou altíssima variabilidade, com alguns peixes apresentando aumento no RNAm de vitelogenina após tratamento com o 2,4-D. No entanto, vale ressaltar que os parâmetros avaliados nos testes foram diferentes: expressão de RNAm no fígado versus concentração plasmática de vitelogenina. E, apesar de por algum tempo pesquisadores terem utilizado alterações na expressão gênica como evidência de alterações na expressão proteica, isso nem sempre é verdade, já que existem fatores biológicos e técnicos que influenciam a relação quantitativa entre o conteúdo de RNAm e de proteína, de forma que a maioria dos estudos que avaliaram essa questão encontraram apenas uma fraca correlação entre essas duas classes de moléculas biológicas (Maier *et al.*, 2009).

A Força Tarefa argumentou também que os seus resultados no estudo de reprodução de peixes são consistentes com outro estudo disponível de toxicidade em animais selvagens no qual o 2,4-D não demonstrou atividade no eixo HPG de jacarés (Spiteri *et al.*, 1999) e concluem que é mais provável que a diminuição da fecundidade

observada na máxima concentração testada tenha sido devida a uma resposta ao estresse, e não à interação específica com o eixo HPG de peixes. De fato, Ankley e Jensen (2014) afirmam que a fecundidade e a fertilidade são considerados os parâmetros menos diagnósticos do estudo de reprodução de peixes para a identificação de uma substância que interage diretamente com o eixo HPG e que, claramente, qualquer substância química em concentrações suficientemente altas irá inibir a reprodução (Ankley e Jensen, 2014). Inclusive, devido à falta de especificidade desses parâmetros, alguns pesquisadores propuseram a não coleta de dados reprodutivos no estudo de reprodução de peixes para a avaliação de desreguladores endócrinos (Ankley e Jensen, 2014).

Coady e colaboradores (2013) relatam que alterações em biomarcadores de estresse oxidativo têm sido demonstradas em estudos de toxicidade de curto prazo com vários peixes expostos a concentrações nominais de 87 mg de equivalentes ácidos de 2,4-D/L, indicando que as vias de estresse oxidativo estão ativadas em peixes expostos a essas doses relativamente altas de 2,4-D (Oruc *et al.*, 2004), não relevantes ambientalmente.

Por fim, Coady e colaboradores (2013) descrevem que a falha em observar, no estudo de reprodução de peixes, nível aumentado de vitelogenina, um marcador responsivo ao receptor de estrógeno, não é inesperada, já que o 2,4-D não mostrou sinais de ligação competitiva com receptores de estrógenos de humanos ou de trutas arco-íris em sistemas celulares de leveduras (Petit *et al.*, 1997; Orton *et al.*, 2009). Entretanto, substâncias podem modular o sistema endócrino por mecanismos não mediados por receptor (Higley *et al.*, 2010). De fato, Ankley e Jensen (2014) ressaltam que substâncias que não são agonistas do receptor estrogênico parecem não induzir de maneira consistente a expressão da vitelogenina em peixes machos. E, conforme já descrito, o 2,4-D parece não ser agonista do receptor estrogênico mas sim aumentar a concentração de estradiol, como observado no estudo de esteroidogênese.

Podemos verificar que os resultados dos estudos de reprodução de peixes realizados com o 2,4-D são conflitantes quanto às alterações nas concentrações de vitelogenina. Se o 2,4-D possuir algum efeito estrogênico, ele seria muito fraco e aconteceria apenas em altas doses.

Por isso, apesar de ter sido verificada diminuição da fecundidade no estudo de reprodução em peixes, nos demais estudos descritos anteriormente

(multigeracionais e de embriofetotoxicidade), que foram realizados em ratos, não houve alterações nos parâmetros reprodutivos correspondentes. Conforme já mencionado anteriormente, o Estudo de Uma Geração Estendida é considerado correspondente à fase II do EDSP. Isso significa que os testes da fase I, como o de reprodução de peixes, servem como uma triagem para identificar substâncias com potencial de interagir com os sistemas estrogênico, androgênico e tireoidiano. Já os testes de fase II, como o Estudo de Uma Geração Estendida, permitem a obtenção de um perfil mais abrangente das consequências biológicas da exposição a uma substância química específica e a identificação das doses que causam essas consequências. Por não terem sido observados efeitos no desempenho reprodutivo dos ratos avaliados no Estudo de Uma Geração Estendida, o resultado observado no estudo de reprodução de peixes não parece ser relevante para humanos.

Vale citar que o 2,4-D não interagiu com o receptor de progesterona de preparado de oviduto de jacaré (Vonier *et al.*, 1996).

8.3.5 Avaliação dos Efeitos Tireoidianos

A interferência do 2,4-D com os hormônios tireoidianos de ratos já é conhecida há mais de cinco décadas, quando Florsheim e colaboradores (1962; 1963) demonstraram que o 2,4-D diminui a ligação do T4 às proteínas plasmáticas ao competir com os sítios de ligação dessas, embora seja um competidor fraco. Posteriormente, em 1991, Van den Berg e colaboradores avaliaram a capacidade de diversos compostos fenoxi ácidos e clorofenóis interferirem *in vitro* com o sítio de ligação ao T4 da transtirretina humana e verificaram que o 2,4-D, além do 2,4-DB, 2,4,5-T, 2,4-DCP e 2,4,6-TCP, dentre outros, competiram com o T4 de forma moderada a potente.

O 2,4-D não possui efeitos no receptor de hormônio tireoidiano (Sun *et al.*, 2012).

Coady e colaboradores (2013), os autores do estudo de metamorfose de anfíbios realizado pela Força Tarefa, concordam que há algumas evidências de que o 2,4-D tem o potencial de interagir com o eixo hipotálamo-hipófise-tireoide (HPT) de larvas de peixes em ensaios experimentais ou em concentrações relativamente altas que excedem o limite de saturação da eliminação renal de mamíferos. Como exemplo, no

estudo de Raldua e Babin (2009), larvas de peixe-zebra (*Danio rerio*) foram expostas às concentrações de 0,04; 0,5 e 5,5 mg/L de 2,4-D por 3 dias, tendo sido verificada diminuição no conteúdo de T4 da glândula tireoide, avaliado por imunofluorescência. Ainda, Coady e colaboradores (2013) citam o estudo subcrônico realizado com ratos Fischer 344, expostos ao 2,4-D por 13 semanas (Schulze, 1991a), em que foram verificadas diminuições nos níveis de hormônios tireoidianos e aumentos no peso da tireoide apenas nas doses de 100 e 300 mg/kg/dia de 2,4-D, as quais salientam estar bem acima da saturação da eliminação renal de 2,4-D (> 20 mg/kg/dia). Citam, ainda, o Estudo de Uma Geração Estendida realizado com o 2,4-D (Marty *et al.*, 2010, 2013) e já anteriormente descrito, em que foram observadas alterações consideradas pelos autores como adaptativas na histopatologia da tireoide (foliculos tireoidianos menores, com vacúolos menores) em 25% das fêmeas prenhes no dia gestacional 17, após 7 semanas de exposição a 600 ppm (aproximadamente 45 mg/kg/dia) de 2,4-D, dose sabidamente acima do limite de saturação renal das ratas.

A Força Tarefa foi questionada sobre a possível relevância para humanos dos efeitos observados na tireoide em diversos estudos realizados com o 2,4-D utilizando roedores (subcrônicos, crônicos, de uma geração) e apresentou diversos argumentos negando esta hipótese, entre eles: (1) que os níveis desses hormônios são continuamente modulados por estímulos endógenos e exógenos, (2) que há importantes diferenças interespecie na função do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide e (3) que os efeitos na tireoide foram observados apenas em doses que estão na faixa da toxicocinética não linear, muito superiores à real exposição humana. Esses argumentos são detalhadamente discutidos a seguir.

A Força Tarefa informa que os níveis de hormônios tireoidianos são dinâmicos e sujeitos a alterações em resposta a estímulos endógenos e exógenos, incluindo condições ambientais como estresse, padrões de alimentação, variações diurnas, estágio do desenvolvimento etc (Boelen *et al.*, 2008). Cita, ainda, que em humanos e animais verifica-se ampla variabilidade interindividual nos níveis mensurados de hormônios tireoidianos, que em geral resultam em distribuições não-normais de dados.

De fato, já há muitos anos se sabe que os níveis de T3, T4 e TSH variam de acordo com o sexo, idade, período do dia, ciclo estral da fêmea, linhagem do rato, temperatura, alojamento, manuseio etc (Döhler *et al.*, 1979). Wiedmann e colaboradores

(1993) avaliaram os níveis de TSH, T3, T4 total e T4 livre de neonatos, bebês, crianças e adolescentes por método imunoenzimático visando estabelecer valores de referência para esses hormônios em diferentes grupos etários e verificaram que na maioria dos grupos separados por idade os valores dos hormônios não mostraram distribuição normal. Verificaram que há diminuições significativas desses hormônios com o aumento da faixa etária e, portanto, os níveis mais altos de T4 total e T4 livre são encontrados em neonatos (Wiedmann *et al.*, 1993), conforme demonstrado também por outros autores.

Com base nessas informações, a Força Tarefa concluiu que variações nos níveis de hormônios tireoidianos são um fenômeno natural necessário para manter a homeostase e não indicam perturbações significativas da tireoide e referenciou as diretrizes da USEPA e da OECD, que citam que a identificação definitiva de substâncias que afetam a tireoide é mais confiável pela análise histopatológica do que pela avaliação dos níveis hormonais e que alterações estatística ou biologicamente significativas em um ou ambos os hormônios entre os grupos controle e tratado devem ser avaliadas em conjunto com quaisquer alterações no peso ou histopatologia da tireoide, bem como com avaliações neurológicas ou no desenvolvimento usadas na avaliação do risco.

Döhler e colaboradores (1979) concordam que o aumento ou a diminuição dos níveis hormonais no plasma não são necessariamente uma indicação de efeitos tóxicos de uma substância. Da mesma forma, a OECD (2014) lembra que qualquer efeito nos hormônios tireoidianos circulantes deve ter uma duração e magnitude suficientes para interferir com a homeostase normal e que os resultados podem variar entre as espécies.

Além das diferenças intra-espécie acima discutidas, a Força Tarefa argumenta que há importantes diferenças interespecie na função do eixo HPT: apesar de seres humanos e ratos serem qualitativamente similares na função do eixo HPT, há diferenças quantitativas entre as espécies, de forma que os seres humanos são geralmente considerados menos sensíveis que ratos a alterações nesse eixo, os quais apresentam alterações mais pronunciadas e agudas (Boelen *et al.*, 2008). Isso acontece porque os seres humanos possuem uma globulina de ligação ao T4 de alta afinidade para transportar o hormônio tireoidiano pelo corpo. Ratos, por outro lado, possuem

proteínas de transporte de baixa afinidade, como a transtirretina e a albumina (Lewandowski *et al.*, 2004).

De fato, Döhler e colaboradores (1979) estudaram as diferentes proteínas de ligação aos hormônios tireoidianos de cada espécie animal e verificaram que a globulina ligadora de T4, que possui alta afinidade de ligação (1.000 vezes superior à da pré-albumina), é encontrada em diversas espécies de mamíferos, mas não em roedores, aves, répteis, anfíbios ou peixes. Da mesma forma, Larsson e colaboradores (1985), em um estudo que avaliou as proteínas de ligação ao T4 em 15 espécies de vertebrados, verificaram que a pré-albumina ligadora de T4 está presente em todas as espécies (exceto no salmão), porém a globulina ligadora de T4 está presente apenas nos mamíferos de maior porte, incluindo humanos, primatas, cães, entre outros. Humanos e cães apresentam níveis similares de T4 ligado à globulina ligadora de T4 (72 e 60 %, respectivamente), a principal transportadora de T4 nessas espécies, apesar da capacidade de ligação dessa ser bastante superior em humanos em relação aos cães. Isso pode explicar porque doses de 2,4-D consideradas altas para cães provocaram mortes nesses animais mas não causaram alterações tireoidianas (níveis de hormônios, peso e histopatologia), conforme verificado no estudo de 91 dias descrito no item 5 da parte II deste parecer de análise. Isso reafirma a maior sensibilidade dos ratos às alterações tireoidianas.

A presença da globulina de ligação ao T4 de alta afinidade em seres humanos limita a metabolização e depuração desse hormônio antes de alcançar os tecidos-alvo (Lewandowski *et al.*, 2004) e, por isso, a meia-vida biológica do T4 no plasma humano é maior que no do rato (Döhler *et al.*, 1979). Consequentemente, a tireoide de humanos é muito menos ativa que a de ratos, que possui níveis normais de TSH aproximadamente 25 vezes superiores aos de humanos (Dellarco *et al.*, 2006). Até a aparência histológica da tireoide é diferente entre ratos e humanos: os ratos possuem uma maior parte do epitélio folicular estimulado (células cuboides altas, ativas), enquanto os humanos possuem um maior número de células em estado quiescente (Dellarco *et al.*, 2006). Pelo fato de já serem geralmente ativas, as células foliculares dos ratos respondem à estimulação pelo TSH com hiperplasia, enquanto a resposta primária de humanos seria a reabsorção de tireoglobulina e a hipertrofia celular, em vez de hiperplasia (Dellarco *et al.*, 2006). A Força Tarefa conclui que essas propriedades, em conjunto com outras diferenças entre as espécies, garantem aos seres humanos uma

reserva muito maior de hormônio tireoidiano e um menor potencial de sofrer as perturbações tireoidianas que ocorrem em roedores e que, portanto, os ratos são um modelo conservador para potenciais alterações relacionadas à tireoide. De fato, Lewandowski e colaboradores (2004) avaliaram as diferenças interespecie nos efeitos de uma substância específica, o perclorato, na homeostase da tireoide e verificaram que o rato foi 100 vezes mais sensível que as outras espécies para as alterações nos níveis séricos de TSH.

Por fim, a Força Tarefa ressalta que a relevância de dados de toxicidade em que a dose excede o limite de toxicocinética linear é altamente questionável para a avaliação do risco humano e que seres humanos não seriam expostos a doses de 2,4-D na faixa da toxicocinética não linear, pois a margem de exposição relatada a partir de estudos de biomonitoramento é suficiente, isto é, muito superior a 10.000 vezes. No caso dos testes em que foram observadas alterações no peso e histopatologia da tireoide, os autores ressaltam que essas alterações foram consistentemente observadas apenas em doses na faixa da toxicocinética não linear, que seriam mais de 25.000 superiores às exposições humanas. Especialistas da USEPA, da academia, de indústrias e do ILSI acreditam que o uso de altas doses em estudos em animais é irrelevante para a avaliação do risco para humanos (Carmichael *et al.*, 2006).

8.3.5.1 Imprevisibilidade de alguns efeitos em testes tradicionais realizados em animais

Rosso e colaboradores (1998) ressaltam que a interação de substâncias químicas com a transtirretina pode também ter implicações neurobiológicas, já que a transtirretina é uma das poucas proteínas identificadas no líquido cefalorraquidiano e pode ter uma função no transporte de T4 pela barreira hematoencefálica. Por isso, é possível que substâncias que interagem com a transtirretina possam afetar o transporte no plexo coroide, com possíveis consequências nas funções encefálicas (Rosso *et al.*, 1998). No entanto, Florsheim e colaboradores (1963) verificaram aumento de iodo radiomarcado no encéfalo de animais tratados com 2,4-D, o que poderia explicar a ausência de efeitos neurológicos decorrentes da diminuição do T4 no sangue de ratos tratados com 2,4-D.

Ainda, a OECD (2014) destaca que o período da vida do animal em que ocorre a insuficiência hormonal pode influenciar a severidade de seu efeito e que o feto

em desenvolvimento e o neonato apresentam maior vulnerabilidade, já que os hormônios tireoidianos são críticos durante o desenvolvimento (Zoeller, 2003). No entanto, ainda não está claro qual o nível de perturbação tireoidiana associado a efeitos no desenvolvimento: estudos demonstraram claramente que a ocorrência de hipotireoidismo materno identificado clinicamente durante a gravidez resulta em efeitos adversos no desenvolvimento, enquanto os efeitos de diminuições leves, subclínicas, nos níveis de hormônio tireoidiano são conflitantes (Lewandowski *et al.*, 2004).

Segundo Rosso e colaboradores (1998), alterações no status da tireoide em humanos e roedores parecem similares durante a gravidez, mas, devido às diferenças na fisiologia da tireoide e nos efeitos observados em humanos e animais com alterações na tireoide, acredita-se que alguns modelos experimentais atuais não sejam preditivos dos efeitos que poderiam ocorrer em humanos. Esses autores indicam como parte da avaliação neurotoxicológica a análise do reflexo auditivo de sobressalto pós-natal de filhotes de ratos, pois esse teste possui uma boa correlação interespecie entre roedores e humanos (Rosso *et al.*, 1998). Conforme já relatado no subitem 7.2.2.3 deste parecer de análise, esse teste foi realizado com o 2,4-D, não tendo sido observadas alterações consistentes relacionadas ao tratamento. No entanto, conforme já descrito anteriormente na parte deste relatório relativa ao Estudo de Uma Geração Estendida realizado com o 2,4-D, não foram realizadas análises comportamentais que pudessem identificar alterações cognitivas, como testes de aprendizagem e memória.

É interessante citar que os hormônios tireoidianos parecem desempenhar um papel significativo no desenvolvimento do sistema reprodutor de roedores e humanos do sexo masculino, mas não nos do sexo feminino (Rosso *et al.*, 1998). Os principais efeitos dos hormônios tireoidianos ocorrem durante o desenvolvimento testicular, enquanto no rato macho adulto variações dos hormônios tireoidianos apresentam um efeito mínimo de na fertilidade (Rosso *et al.*, 1998). Como o 2,4-D não causou alterações testiculares nos animais expostos durante o desenvolvimento, acredita-se que as leves alterações observadas nos hormônios tireoidianos no estudo de uma geração realmente não foram relevantes para levarem a algum efeito secundário.



8.4 ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS SOBRE OS EFEITOS TIREOIDIANOS DO 2,4-D

Em um estudo epidemiológico prospectivo realizado com homens aplicadores de agrotóxicos dos Estados Unidos, Goldner e colaboradores (2013) verificaram uma associação entre o uso do herbicida 2,4-D e o aumento do hipotireoidismo ($p < 0,05$), com relação exposição-resposta ($p = 0,025$). No entanto, o desfecho foi baseado no autorrelato de doença da tireoide (hipotireoidismo, hipertireoidismo e “outras” doenças da tireoide) fornecido pelos aplicadores, sem nenhum diagnóstico comprobatório.

A Força Tarefa foi questionada sobre esses recentes dados epidemiológicos, que sugerem uma associação entre o 2,4-D e a ocorrência de hipotireoidismo em humanos e seriam consistentes com os dados dos estudos realizados com animais, apesar dos inúmeros argumentos apresentados para descartar a relevância desses dados para humanos. Respondeu, novamente, que os efeitos na tireoide observados nos testes em animais estão limitados a altas doses, que estão bastante acima da inflexão da saturação da excreção renal do 2,4-D, o que limita a relevância desses achados para humanos e a plausibilidade biológica de fracas associações do 2,4-D com o hipotireoidismo em estudos epidemiológicos em que as exposições humanas são substancialmente menores, conforme demonstrado pelos estudos de biomonitoramento. A Força Tarefa argumentou que as caracterizações de exposição utilizadas por Goldner e colaboradores (2013) foram grosseiramente identificadas, isto é, não foram baseadas em dados de biomonitoramento, e que o estudo também identificou associações positivas com outros cinco herbicidas, com óleo de petróleo e oito inseticidas, o que limita qualquer conclusão específica em relação ao 2,4-D.

8.5 CONCLUSÕES SOBRE A TOXICIDADE TIREOIDIANA DO 2,4-D

Apesar de haver autores que suspeitem (Sun *et al.*, 2012) ou mesmo considerem o 2,4-D um desregulador endócrino (Alves *et al.*, 2013), ele é um ingrediente ativo extremamente estudado (Sun *et al.*, 2012), com inúmeros dados experimentais e poucas evidências dessa ação.



É indiscutível que o 2,4-D causa efeitos nos hormônios tireoidianos em roedores, porém esses efeitos estão restritos a altas doses (iguais ou superiores a 100 mg/kg em estudos subcrônicos e a 75 mg/kg em estudos crônicos) e, considerando-se a toxicocinética não linear, as diferenças entre as espécies no transporte de hormônios tireoidianos e a alta margem de exposição, esse modo de ação parece não ser relevante para a saúde humana. Dessa forma, acredita-se que o 2,4-D não representa perigo à tireoide de humanos. De qualquer maneira, a Anvisa deve manter-se atenta a avanços científicos e futuros estudos epidemiológicos que possam trazer novas evidências que mostrem o contrário.

9 NEUROTOXICIDADE DO 2,4-D

Conforme já descrito no item 3 deste parecer de análise (toxicocinética), Elo e Ylitalo (1977) verificaram aumento dos níveis de 2,4-D no encéfalo e líquido cefalorraquidiano após a intoxicação com esse ingrediente ativo, o que demonstra que o sistema nervoso central é alvo do 2,4-D.

9.1 ESTUDOS DE NEUROTOXICIDADE REALIZADOS EM ANIMAIS

No quadro 31 estão descritos os resultados dos estudos específicos de neurotoxicidade aguda e crônica realizados com o 2,4-D. Vale ressaltar que esses dois estudos foram considerados limitados devido à alta incidência de achados neuropatológicos nos animais do grupo controle.

9.1.1 Neurotoxicidade Aguda

O estudo de neurotoxicidade aguda realizado com o 2,4-D em ratos foi analisado detalhadamente e os resultados mais relevantes descritos sucintamente a seguir.

Conforme pode ser observado no quadro 31, alta dose aguda de 2,4-D (250 mg/kg) administrada por gavagem alterou a locomoção e atividade motora dos animais, mas essas alterações desapareceram em até 4 dias. Não foram observadas diferenças na incidência de alterações histopatológicas entre animais controles e



tratados com 2,4-D. Foi verificada alta incidência de alterações histopatológicas nos controles, o que limita a validade do estudo.

9.1.2 Neurotoxicidade Subcrônica e Crônica

Conforme já descrito anteriormente, no item 5 deste parecer de análise (estudos subcrônicos e crônicos), em estudos subcrônicos e crônicos foi observada degeneração retiniana (neuropatologia) em ratos após a exposição a altas doses de 2,4-D (300 mg/kg em estudos subcrônicos e 150 mg/kg em estudos crônicos), especialmente nas fêmeas (Schulze, 1991a; Jeffries *et al.*, 1995). Além disso, cães expostos a altas doses de 2,4-D (10 mg/kg em estudo subcrônico) apresentaram tremores (Schulze, 1990b).

No estudo que avaliou o potencial embriofetotóxico e teratogênico do 2,4-D em coelhos, uma fêmea prenhe tratada com a maior dose de 2,4-D (90 mg/kg) durante o período de organogênese apresentou sinais clínicos de neurotoxicidade (ataxia, diminuição da atividade motora, perda do reflexo de endireitamento e extremidades frias ao toque) e teve que ser eutanasiada no dia gestacional 21; esses efeitos foram considerados relacionados à exposição ao 2,4-D.



Quadro 31. Descrição dos principais achados de neurotoxicidade obtidos em ratos após exposição aguda ou crônica ao 2,4-D.

Espécie, linhagem e número animais	Via	Idade e período de exposição	Pureza do IA	Doses (mg/kg)	Resultados relevantes	NOAEL (mg/kg/dia)	Referência
- Ratos (CDF Fischer 344) - 10/sexo/dose	Oral (gavagem) Veículo (óleo de milho)	- Idade no início do teste: 8 semanas - Exposição única e observação por 14 dias	96,6%	0; 15; 75; 250	- Máxima dose não-letal com efeitos neurotóxicos: 250 mg/kg - Pico do efeito clínico: 5 a 6 h após a administração do 2,4D - 15 e 75 mg/kg: 1 ♀ e 1 ♂ com leves alterações no andar (dias 3 ou 8) - 250 mg/kg: alterações leves no andar no dia 3 (8/10 animais/sexo) - 250 mg/kg: descoordenação motora no dia 1 (4/10 ♀ e 6/10 ♂), que diminuiu gradualmente (7/20 animais afetados no dia 2; 3/30 no dia 3; 1/20 no dia 4 e 0/20 nos dias 8 e 15). - 15 e 75 mg/kg: 1 ♀ 15 mg/kg e 1 ♂ e 1 ♀ 75 mg/kg com tremor da cauda (efeito considerado incidental e não relacionado ao tratamento devido à baixa incidência e ausência de dose-resposta) - 250 mg/kg: 2 ♀ e 1 ♂ apresentaram andar com as patas rígidas - 250 mg/kg: ↓ clara da atividade motora no dia 1 (período de máximo efeito), que permaneceu diminuída apenas nos ♂ no dia 8 (resposta similar entre ♂ e ♀) - Não houve alterações relacionadas ao tratamento na morfologia do sistema nervoso ou muscular (foram avaliados apenas os animais controles e da maior dose; os animais controles apresentaram alta incidência de alterações histopatológicas).	75	Mattsson <i>et al.</i> , 1994a
- Ratos (Fischer 344) - 10/sexo/dose (avaliação neuropatológica: 5/sexo/dose)	Oral (dieta)	- Idade no início do teste: 7 semanas - Exposição: 12 meses - Avaliações: pré-exposição e nos meses 3, 6, 9 e 12	96,45 %	0; 5; 75 e 150	- Máxima dose tolerada: 150 mg/kg - ♀ 150 mg/kg (meses 9 e 12): ↑ micção na bateria de observação funcional - ♂ 75 mg/kg (9 meses): ↓ resposta ao ruído agudo - ♂ e ♀ 150 mg/kg: ↑ significativo força de agarrar do membro anterior normalizada (pelo peso corpóreo). No entanto, os animais dessa dose apresentaram redução do peso corpóreo e quando a força de agarrar absoluta do membro anterior foi avaliada não foi observada diferença significativa. Significado toxicológico incerto. - ♀ 150 mg/kg: degeneração retiniana bilateral (moderada em 1/5 ♀ e severa em 4/5: ausência das camadas de cones e bastonetes e da camada nuclear externa), considerada relacionada ao tratamento. - Não houve alterações relacionadas ao tratamento na morfologia do sistema nervoso ou muscular (foram avaliados apenas os animais controles e da maior dose; os animais controles apresentaram alta incidência de alterações histopatológicas).	5	Mattsson <i>et al.</i> , 1994b



9.1.3 Neurotoxicidade no Desenvolvimento

Como parte do Estudo de Uma Geração Estendida, foi avaliada a neurotoxicidade do desenvolvimento do 2,4-D, já detalhadamente descrita no subitem 7.2.2.3 deste parecer de análise.

Além desse estudo, um grupo de pesquisa da Argentina (Universidad Nacional de Rosario) publicou diversos artigos que avaliaram a neurotoxicidade do 2,4-D para o desenvolvimento, verificando-se que altas doses (acima de 70 mg/kg, por via intraperitoneal) administradas durante o período gestacional ou pós-natal causam diminuição do peso do encéfalo, estresse oxidativo, diminuição da mielinização e alterações comportamentais em ratos (Bortolozzi *et al.*, 1999, 2003; Duffard *et al.*, 1996; Duffard *et al.*, 1995; Ferri *et al.*, 2007; Konjuh *et al.*, 2008; Rosso *et al.*, 1997, 2000).

9.2 RELATOS DE CASOS E ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS

9.2.1 Relatos de Caso de Neurotoxicidade em Humanos

Apesar da ampla utilização de 2,4-D, a intoxicação por este herbicida é incomum em seres humanos (Berwick, 1970; Brahmi *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2003; Azazh, 2010) e acontece principalmente após tentativa de suicídio (Singh *et al.*, 2003). Bradberry e colaboradores (2000; 2004) relatam os seguintes sintomas associados à intoxicação por 2,4-D: coma, hipertonia, hiperreflexia, ataxia, nistagmo, miose, alucinações, convulsões, fasciculação, paralisia, além de sintomas miopáticos que incluem fraqueza muscular dos membros, perda de reflexos dos tendões, miotonia e aumento da atividade da creatina quinase.

Goldstein e colaboradores, em um artigo de 1959, relataram três casos de neuropatia periférica que se iniciaram algumas horas após o uso de herbicidas contendo éster de 2,4-D e que tiveram recuperação incompleta mesmo depois de anos. Berkley e Magee (1963) relataram um caso de neurite periférica após a exposição ao sal de dimetilamina do 2,4-D e Todd (1962) relatou um caso de neurite periférica que durou 2 anos, provavelmente causada por um éster de 2,4-D.

Singer e colaboradores (1982) verificaram que trabalhadores expostos aos herbicidas fenoxi 2,4-D e 2,4,5-T e seus contaminantes (dioxinas) apresentaram maior prevalência de lentificação de velocidade de condução nervosa; o nervo sural foi especialmente afetado. O aumento do tempo de exposição dos trabalhadores a essas substâncias foi significativamente correlacionado com a diminuição da velocidade de condução no nervo sural. O entendimento dos efeitos da exposição humana ao 2,4-D tem sido prejudicado pela exposição simultânea a outros xenobióticos (Duffard *et al.*, 1996), especialmente às dioxinas contaminantes. Há suspeitas de que as dioxinas (Singer *et al.*, 1982; Bertazzi, 1991) e o 2,4,5-T (Singer *et al.*, 1982) causem neuropatia periférica. Há evidências de neuropatia em animais de experimentação expostos a herbicidas fenoxi (Singer *et al.*, 1982), porém apenas em estudos bastante antigos, das décadas de 1940 e 1960, o que pode reforçar o papel dos contaminantes na indução desses efeitos.

9.2.2 Estudos Epidemiológicos

A Fiocruz, na nota técnica enviada à Anvisa (Friedrich, 2014), descreveu que em um “estudo com trabalhadores expostos cronicamente” “apresentaram esclerose lateral amiotrófica (Burns *et al.*, 2001), um tipo de efeito que, apesar de sua gravidade, não é objeto de estudo dos testes realizados para a obtenção do registro, nem tão pouco levados em consideração para fins de rotulagem”.

A esclerose lateral amiotrófica é uma doença neurológica progressiva fatal, de etiologia desconhecida (Burns *et al.*, 2001; Kamel *et al.*, 2012; Kang *et al.*, 2014), caracterizada pela degeneração de neurônios motores do córtex motor primário, tronco cerebral e medula espinhal (Ingre *et al.*, 2015) e que tem como sintomas a fraqueza muscular progressiva, com atrofia e fasciculações (McGuire *et al.*, 1997).

De fato, Burns e colaboradores (2001), em um estudo de coorte que avaliou trabalhadores de quatro plantas industriais de 2,4-D dos Estados Unidos entre 1945 e 1994, verificaram que três mortes foram atribuídas à esclerose lateral amiotrófica (ELA), o que levou a um risco aumentado dessa doença em relação a trabalhadores de outras indústrias. A morte desses indivíduos, que desempenharam as atividades de fabricação ou formulação de 2,4-D em diferentes épocas e por diferentes períodos de tempo (1,3; 1,8 e 12,5 anos), ocorreu mais de 20 anos após a primeira

exposição ao 2,4-D. Os autores do estudo, que são da empresa Dow Agrosiences, consideraram o aumento verificado inesperado e inconsistente com os dados de estudos prévios realizados em animais e seres humanos, e, portanto, possivelmente não relacionado à exposição ao 2,4-D. Vale citar que o artigo de Burns e colaboradores (2001) foi considerado “não relevante” pela EFSA no relatório de avaliação do risco do 2,4-D publicado em 2014.

Freedman (2001), epidemiologista do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos, em uma correspondência publicada como comentário ao artigo de Burns e colaboradores (2001), critica a conclusão dos autores de que a associação verificada entre o 2,4-D e o excesso de mortes por ELA não é consistente com estudos prévios em animais e humanos. Além disso, Freedman (2001) critica a caracterização dos estudos epidemiológicos “relevantes” pelos autores, que pareceu levar em consideração apenas a significância estatística e desmereceu a importância do achado. Freedman (2001) salientou que, apesar da associação significativa entre o 2,4-D e a ELA verificada por Burns e colaboradores (2001) não ser conclusiva, é consistente com diversos outros estudos prévios, que também mostraram aumento (não estatisticamente significativo) da incidência de ELA após exposição ao 2,4-D e concluiu que este achado merece atenção em estudos futuros. Em resposta a esses comentários de Freedman, Burns (2001) argumentou que um ponto crítico na valoração da causalidade é o peso da evidência a ser dado ao aumento não significativo observado em estudos que avaliaram a ocorrência de ELA relacionada a exposições não-específicas em humanos, em comparação com o peso dado aos estudos controlados realizados em animais, que utilizam especificamente o herbicida 2,4-D. Burns (2001) salienta que nos estudos caso-controle em que foram encontradas razões de chances elevadas não há evidências de que os indivíduos tenham sido expostos ao 2,4-D, já que as exposições foram limitadas aos grupos “agrotóxicos” e “herbicidas”. Citam que, por outro lado, os estudos de coorte, que não mostraram consistentemente aumentos no risco de ELA, avaliaram trabalhadores que foram de fato expostos ao 2,4-D e, portanto, fornecem uma avaliação de risco mais válida, mesmo que eles tenham um poder estatístico menor que o dos estudos caso-controle.

Em duas metanálises conduzidas recentemente por Kamel e colaboradores (2012) e Kang e colaboradores (2014), foi identificada associação entre a ocorrência de ELA e o uso de agrotóxicos em geral; resultados esses que estão de

acordo com os de outros estudos caso-controle prévios que avaliaram o papel da exposição a agrotóxicos como um grupo e em geral encontraram razões de chances elevadas, embora nem sempre estatisticamente significativas. Além disso, Kamel e colaboradores (2012) utilizaram os dados do Estudo de Saúde Agrícola (*Agricultural Health Study - AHS*), um estudo de coorte dos Estados Unidos, para verificar a associação entre a ELA e agrotóxicos específicos. Apesar de não terem verificado associação entre a ELA e os agrotóxicos em geral, foi encontrada associação (não estatisticamente significativa) entre o risco de ELA e o uso de inseticidas organoclorados (aldrin, dieldrin, DDT e toxafeno especificamente), piretróides, herbicidas, e fumigantes; mas não com o uso específico de 2,4-D.

Kamel e colaboradores (2012) citam que apenas um estudo de coorte prévio (Weisskopf *et al.*, 2009) avaliou a relação entre a ELA e o uso de agrotóxicos em geral, tendo encontrado uma fraca associação, o que os fez acreditar que as associações relatadas nos estudos caso-controle podem ser devidas a vieses.

Outra possível explicação para as inconsistências encontradas nos estudos é o baixo poder estatístico, já que no caso de doenças raras, como a ELA, o número de casos disponíveis para o estudo é muito limitado (Kang *et al.*, 2014). Kamel e colaboradores (2012) lembram que a estrutura química e a neurotoxicidade dos agrotóxicos são bastante variáveis e a avaliação deles como um grupo pode prejudicar associações com agrotóxicos específicos.

Vale ressaltar que o risco de ELA por exposição ao 2,4-D não foi discutido pelas demais agências reguladoras mundiais em seus últimos relatórios de avaliação do risco deste ingrediente ativo, o que sugere que esta não seja uma real preocupação relacionada ao 2,4-D até o momento.

9.3. CONCLUSÕES SOBRE A NEUROTOXICIDADE DO 2,4-D

As demais agências reguladoras não apresentam grandes preocupações com o potencial neurotóxico do 2,4-D, exceto pelo aumento de degeneração retiniana observado em ratas tratadas com altas doses dessa substância. Os dados dos estudos protocolados na Anvisa, principalmente o estudo de neurotoxicidade no desenvolvimento de uma geração estendida, não mostram efeitos neurotóxicos preocupantes relacionados à exposição ao 2,4-D.



De qualquer modo, a Anvisa deverá manter-se atenta a futuras evidências de que as demais suspeitas relacionadas ao 2,4-D acima relatadas possam ser relevantes para humanos, principalmente as quem relacionam a exposição ao 2,4-D ao risco elevado de esclerose lateral amiotrófica.

10 CARCINOGENICIDADE DO 2,4-D

Os compostos clorofenoxi são utilizados mundialmente desde 1940 e, apesar de diversos autores relatarem que os achados sobre o potencial carcinogênico do 2,4-D são controversos, ambíguos (Knopp, 1994; Holland *et al.*, 2002; Maire *et al.*, 2007), acredita-se que atualmente não existem claras evidências experimentais de que o 2,4-D possa estar relacionado ao câncer (Figgs *et al.*, 2000; Holland *et al.*, 2002; Garabrant e Philbert, 2002). Figgs e colaboradores (2000) citam que, embora o 2,4-D não pareça causar câncer em ensaios realizados com animais, foram encontradas associações com Linfoma não-Hodgkin (LNH) em alguns estudos epidemiológicos. Além de estar possivelmente relacionado à ocorrência de LNH, o 2,4-D também foi associado a outras formas de câncer linfohematopoiético, como doença de Hodgkin, sarcoma de partes moles e leucemia (von Stackelberg, 2013), bem como a outros tipos de câncer, como o de próstata; no entanto, uma relação causa-efeito não foi estabelecida (Harris *et al.*, 2010). Pelo fato do 2,4-D não ter se mostrado mutagênico na maioria dos sistemas, acredita-se que é improvável que ele seja um carcinógeno genotóxico (Ibrahim *et al.* 1991).

As dioxinas, contaminantes do 2,4-D principalmente no passado, foram frequentemente relacionadas ao excesso de riscos observados em estudos de coorte e caso-controle realizados com o 2,4-D (Kogevinas *et al.*, 1993), conforme será discutido mais detalhadamente a seguir.

10.1 AVALIAÇÃO DA CARCINOGENICIDADE DO 2,4-D POR ORGANISMOS INTERNACIONAIS

Ao longo das últimas décadas diversos organismos internacionais avaliaram o potencial carcinogênico do 2,4-D (quadro 32) e concordaram que até o atual momento não existe evidência consistente de carcinogenicidade nos estudos

experimentais realizados em animais e que os estudos epidemiológicos não mostram uma associação clara entre a exposição ao 2,4-D especificamente e a ocorrência de cânceres humanos.

Quadro 32. Resumo das avaliações da carcinogenicidade do 2,4-D por organismos internacionais (ordem cronológica).

Organismo	Tipo de Avaliação	Conclusões
Agência Internacional de Pesquisas sobre o Câncer (IARC, 1977)	Avaliação do risco carcinogênico do 2,4-D e seus ésteres	Devido às limitações dos estudos avaliados, não foi possível avaliar a carcinogenicidade do 2,4-D.
Agência Internacional de Pesquisas sobre o Câncer (IARC, 1987)	Avaliação do risco carcinogênico dos herbicidas clorofenoxi	Herbicidas clorofenoxi classificados no grupo 2B (possivelmente carcinogênicos para humanos), devido à evidência limitada de carcinogenicidade para humanos e à evidência insuficiente de carcinogenicidade para animais.
Comitê de Revisão de Carcinogenicidade e Conselho Consultivo Científico da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 1994 e 1997)	4ª Revisão por pares sobre a carcinogenicidade do 2,4-D	2,4-D provisoriamente classificado pelo Comitê no Grupo C (possível carcinógeno humano), devido à tendência de aumento de astrocitomas observada em um estudo em ratos Fischer. Essa decisão não foi compartilhada pelo Conselho Consultivo Científico, que concluiu que o 2,4-D deveria ser classificado no Grupo D - não classificável quanto à carcinogenicidade humana, devido às evidências ambíguas em animais e humanos. Após avaliar os resultados dos novos estudos conduzidos em animais, que não mostraram aumento de tumores, o Comitê concordou que o 2,4-D deveria permanecer classificado no Grupo D.
Painel de Especialistas da Nova Zelândia (New Zealand Pesticides Board, 2000)	Painel de Especialistas em 2,4-D	Concluíram que o 2,4-D não possuía evidência de carcinogenicidade.
Comissão Europeia (EU, 2001)	Revisão do ingrediente ativo 2,4-D	Concluíram que o 2,4-D não possuía evidência de carcinogenicidade.
Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 2005)	Revisão dos estudos epidemiológicos que ligavam o 2,4-D ao câncer (duas revisões realizadas em 2004)	Concluíram que não existiam evidências adicionais que implicassem o 2,4-D como causa de câncer, mantendo esse no Grupo D (não classificável quanto à carcinogenicidade).
Agência Reguladora de Controle de Pragas do Canadá (PMRA, 2007)	Reavaliação do 2,4-D	Concluíram que o 2,4-D não pode ser classificado quanto à carcinogenicidade para humanos.
Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 2012)	Resposta à petição do Conselho de Defesa dos Recursos Naturais americano que solicitava a revogação do registro do 2,4-D	Concluíram que não existiam novas evidências para alterar a classificação do 2,4-D quanto à carcinogenicidade.
Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA, 2014b)	Revisão da avaliação do risco do 2,4-D	Concluíram que é improvável que o 2,4-D represente um risco carcinogênico para humanos.
Agência Internacional de Pesquisas sobre o Câncer (Loomis <i>et al.</i> , 2015)	Classificação da carcinogenicidade do 2,4-D	2,4-D classificado no grupo 2B (possivelmente carcinogênico para humanos), devido à evidência inadequada de carcinogenicidade para humanos e à evidência limitada de carcinogenicidade para animais.

10.2 ANÁLISE DAS EVIDÊNCIAS EXPERIMENTAIS E EPIDEMIOLÓGICAS DE CARCINOGENICIDADE DO 2,4-D

10.2.1 Análise das Evidências Experimentais em Animais

Os resultados dos estudos crônicos que avaliaram a carcinogenicidade do 2,4-D submetidos à Anvisa já foram descritos no subitem 5.2 deste parecer de análise. Inicialmente havia dúvidas sobre a carcinogenicidade do 2,4-D em animais, devido à observação de uma tendência ($p=0,07$) de aumento de astrocitomas em ratos Fischer tratados cronicamente com 45 mg/kg/dia de 2,4-D (Serota, 1986), o que levou a USEPA a requisitar às empresas registrantes de 2,4-D a repetição dos estudos em ratos e camundongos utilizando doses mais altas, já que as doses utilizadas até aquele momento foram consideradas inadequadas para a avaliação do potencial carcinogênico do 2,4-D (USEPA, 1997). Após a administração crônica de doses mais altas de 2,4-D pela dieta a ratos (até 150 mg/kg/dia) e camundongos (machos até 125 mg/kg/dia; e fêmeas até 300 mg/kg/dia), não foi verificado aumento de tumores em nenhum dos sexos ou espécie (Jeffries *et al.*, 1995; Stott *et al.*, 1995a e 1995b).

Vale ressaltar que, além do estudo que mostrou tendência de aumento de astrocitomas em ratos expostos ao 2,4-D anteriormente descrito (Serota, 1986), a IARC, em suas monografias de 1977, 1987 e 2015 também considerou o resultado de um estudo realizado em camundongos (NTIS, 1968) em que, após injeção subcutânea única de 2,4-D (éster isooctílico; 21,5 mg/kg) e observação por 74 semanas, as fêmeas apresentaram incidência aumentada ($p<0,01$) de sarcoma de células reticulares (sarcoma histiocítico). No entanto, já em 1977 a IARC considerou esse estudo limitado, devido ao relato inadequado e ao pequeno número de animais utilizados. Inclusive, no mesmo documento em que é relatado esse estudo positivo (NTIS, 1968), são apresentados os resultados de outros experimentos realizados com camundongos em que o 2,4-D ou seus ésteres (isopropílico, isobutílico e isooctílico) foram administrados por diferentes vias, períodos ou doses (oral – 18 meses: 46,4 até 323 mg/kg; subcutânea – injeção única e observação por 18 meses: 21,5 a 215 mg/kg) e que tiveram resultado negativo para carcinogenicidade. Portanto, entre os diversos estudos realizados na década de 1960, o único que apresentou resultado positivo (aumento de sarcoma histiocítico em fêmeas) foi aquele em que foi administrada uma baixa dose de éster isooctílico de 2,4-D (21,5

mg/kg) por injeção subcutânea (NTIS, 1968), via esta que não é usual em estudos de carcinogenicidade e não representa condições reais de exposição. Além disso, conforme já discutido anteriormente, sabe-se que na década de 1960 muitos dos produtos à base de 2,4-D estavam contaminados com dioxinas (IARC, 2015), compostos sabidamente carcinogênicos (IARC, 2012) que podem ter contribuído para o resultado positivo obtido no estudo em questão. Com base nesses estudos a IARC concluiu recentemente que há evidências limitadas de carcinogenicidade do 2,4-D em animais de experimentação (IARC, 2015).

Considerando que os estudos posteriores realizados em roedores com o 2,4-D e de acordo com protocolos internacionalmente aceitos (utilizando a via oral, um número maior de animais por grupo, diversas doses) não confirmaram o resultado positivo acima citado (NTIS, 1968), esse foi desconsiderado pela Anvisa na avaliação da carcinogenicidade do 2,4-D em animais de experimentação.

10.2.2 Análise dos Estudos Epidemiológicos em Humanos

As revisões de estudos epidemiológicos conduzidos entre 1981 e 1993 mostram que existiam contradições sobre o potencial carcinogênico do 2,4-D para humanos (EFSA, 2014b).

É importante lembrar que, no passado, a produção e o uso de 2,4-D estavam intimamente relacionados com a produção e o uso do 2,4,5-T; consequentemente, os dados epidemiológicos mais antigos avaliaram as consequências da exposição a esses dois agentes e outros compostos relacionados (IARC, 2015), incluindo as dioxinas contaminantes. Inclusive, a IARC, em sua última classificação da carcinogenicidade do 2,4-D (IARC, 2015), considerou os estudos que avaliaram a exposição a herbicidas clorofenoxi em geral ou a misturas de agrotóxicos, mas não forneceram estimativas de risco específicas para o 2,4-D, como não informativos e os excluiu de sua análise. Isso porque diversos estudos que mostraram aumento no risco de câncer associado à exposição aos herbicidas clorofenoxi, principalmente os que mostraram riscos elevados, incluíram a exposição a outras substâncias, como as dioxinas (von Stackelberg, 2013).

Há mais de duas décadas Knopp (1994) já acreditava que a associação aparente entre a exposição ao 2,4-D e o sarcoma de partes moles e o linfoma maligno,

se existente, poderia ser resultado de dioxinas contaminantes. Ele verificou que a exposição ao 2,4,5-T ou um grau elevado de exposição aos clorofenóis levou a um risco significativamente aumentado em respectivamente 3 ou 5 vezes e atribuiu esse aumento do risco à contaminação por dioxinas policloradas, que sabidamente ocorre em produtos comerciais de 2,4,5-T e alguns clorofenóis.

Ainda, Hardell (2008) realizou uma metanálise de quatro estudos caso-controle conduzidos na Suécia e verificou uma associação significativa entre o risco de sarcoma de partes moles e a exposição a todos os tipos de herbicidas clorofenoxi em conjunto, os clorofenóis, o 2,4,5-T em qualquer combinação e a TCDD, além de outros tipos de dioxinas. Não foi encontrada associação com o 2,4-D ou o ácido 4-cloro-2-metilfenoxi acético (MCPA) isoladamente. A maior razão de chances foi observada para a exposição aos fenoxiácidos nas décadas de 1970 e 1980. O autor relata que essas substâncias foram introduzidas durante ou logo após a Segunda Guerra Mundial e que a exposição a elas cresceu e teve os mais altos níveis na década de 1970, até que surgiram restrições na Suécia ao final desta mesma década (1977) para o 2,4,5-T, os clorofenóis e as bifenilas policloradas. Após este período, as concentrações dessas substâncias no ambiente e conseqüentemente na cadeia alimentar diminuíram, até se estabilizarem nos anos 1990. O autor acredita que as alterações na exposição a agrotóxicos podem explicar a diminuição da incidência de LNH atribuível a esses compostos.

Schinasi e Leon (2014), pesquisadores da IARC, realizaram uma revisão sistemática e diversas metanálises de cerca de três décadas sobre a relação entre LNH e alguns de seus subtipos específicos e a exposição ocupacional a tipos, grupos químicos e ingredientes ativos de agrotóxicos, entre eles os herbicidas, os herbicidas fenoxiacéticos e mais especificamente o 2,4-D, o 2,4,5-T e o MCPA, dentre outros. Os autores verificaram associação entre a exposição a herbicidas clorofenoxi e o linfoma de células B, linfoma linfocítico e linfoma difuso de células grandes B, com estimativas de efeito relativamente precisas. As estimativas metanalíticas de associação entre a exposição a herbicidas clorofenoxi e subtipos de LNH foram mais positivas que aquelas para LNH no geral, embora as últimas tenham sido mais precisas. Quando os ingredientes ativos foram avaliados individualmente, foi observada evidência consistente de associação positiva entre LNH e o herbicida clorofenoxi MCPA; exceto quando a metanálise foi restrita às estimativas dos estudos conduzidos apenas na América do Norte. No caso do 2,4-D especificamente não foi observada associação. No

entanto, a estimativa metanalítica de associação com o LNH tornou-se mais positiva, porém menos precisa, quando a análise foi restrita a estudos que incluíam homens e mulheres. Vale ressaltar que os autores obtiveram as estimativas de associação de LNH com grupos químicos ou ingredientes ativos de agrotóxicos a partir de 44 artigos que relataram análises dos resultados de 17 estudos independentes, que representam dados coletados em 12 países, na maioria localizados na Europa ou América do Norte.

Numa revisão de dados epidemiológicos sobre a carcinogenicidade do 2,4-D, o Conselho Consultivo Científico da USEPA relatou que os estudos epidemiológicos de coorte em geral não mostraram aumento do risco de câncer (embora a população com exposição específica ao 2,4-D avaliada tenha sido pequena e período de acompanhamento curto), enquanto os estudos caso-controle mostraram um risco aumentado de LNH em associação à atividade agrícola (embora a exposição a outros agentes além do 2,4-D não tenha sido controlada), porém sem distinguir se os riscos observados eram de fato devidos ao uso do 2,4-D (USEPA, 1994).

Da mesma forma, a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA; 2014b) relata que em alguns estudos foi observado um risco significativamente aumentado de câncer entre aplicadores de herbicidas clorofenoxi, mas considera que nesses estudos existe grande dificuldade em avaliar o risco de câncer para a população exposta e que esta avaliação não indica inequivocadamente que a exposição humana ao 2,4-D causa os tumores observados. A EFSA ressalta que a pureza do 2,4-D e principalmente o conteúdo de dioxinas e furanos não foram relatados em nenhum desses estudos e que, portanto, a suspeita de associação do 2,4-D com o câncer por ser devida, pelo menos em parte, à exposição a outros contaminantes.

Isso porque, conforme já mencionado no subitem 2.4.2 deste parecer de análise, que trata das impurezas do 2,4-D, em 2012 a IARC considerou que existe evidência suficiente sobre a carcinogenicidade da 2,3,7,8-TCDD em humanos e em animais de experimentação e informou que os maiores níveis dessas impurezas ocorreram em trabalhadores que fabricavam herbicidas fenoxi e clorofenóis no passado, o que reforça a suspeita de que alguns resultados de estudos epidemiológicos antigos que relacionam a exposição ao 2,4-D à ocorrência de câncer poderiam ser devidos à contaminação por dioxinas. A IARC também avaliou a carcinogenicidade dos policlorofenóis em 1999 e os classificou no Grupo 2B, como possivelmente carcinogênicos para humanos (IARC, 1999). Além das dioxinas, muito pouco é sabido

sobre as possíveis interações envolvendo ingredientes adjuvantes tipicamente contidos em formulações comerciais, que poderiam influenciar o risco de câncer (Kachuri *et al.*, 2013).

Como já citado anteriormente, a exposição ao 2,4-D tem sido historicamente associada ao risco de câncer no sistema linfático, principalmente de LNH. É importante lembrar que os LNH são um grupo heterogêneo de cânceres que inclui diversos subtipos com características variadas e possivelmente etiologias diversas e, conseqüentemente, em um estudo epidemiológico, a avaliação do grupo total de neoplasias representadas pelos LNH pode ser um parâmetro extremamente diverso para permitir a detecção adequada de associações a exposições a agrotóxicos (Schinasi e Leon, 2014). Os sistemas de classificação de LNH mudaram ao longo do tempo, o que refletiu em alterações na definição da doença que, após o ano 2000, tornou-se mais abrangente e agora inclui entidades que não estavam incluídas nas definições anteriores, como neoplasias das células plasmáticas (mieloma múltiplo) e leucemia linfóide crônica, que estão entre os subtipos mais frequentemente relatados de LNH (Schinasi e Leon, 2014). Dessa forma, estimativas de associação entre agrotóxicos e LNH em geral obtidas de estudos conduzidos em períodos anteriores podem não ser inteiramente comparáveis às estimativas de pesquisas conduzidas desde o ano 2000, que usam a definição atualizada de LNH (Schinasi e Leon, 2014).

Desde a avaliação do 2,4-D realizada em 2001 pela União Europeia, diversos estudos epidemiológicos caso controle e de coorte investigaram a associação entre o 2,4-D e a ocorrência de LNH. A EFSA, em seu último relatório de avaliação do risco do 2,4-D (2014), avaliou e descreveu detalhadamente esses estudos e verificou que os maiores e mais robustos não encontraram relação dose resposta nem aumento estatisticamente significativo de LNH com a exposição ao 2,4-D e que os poucos resultados estatisticamente significativos relatados foram inconsistentes, imprecisos ou não confirmados por estudos em outras populações. A EFSA concluiu que esses estudos fornecem evidência de que não há um risco aumentado de LNH ou outros cânceres do sistema linfático associado à exposição ao 2,4-D. Além disso, salientou que o AHS, um estudo de coorte ocupacional realizado nos Estados Unidos, o qual conta com 90.000 agricultores aplicadores de agrotóxicos e suas esposas, o que diminui as inconsistências geralmente encontradas em dados epidemiológicos (atribuídas à baixa qualidade ou tamanho inadequado da amostra), avaliou a relação da exposição ao 2,4-D com o câncer



de próstata, câncer de mama, câncer colorretal, melanoma da pele e câncer infantil e também não encontrou associação. Da mesma forma, a IARC, na sua recente avaliação da carcinogenicidade do 2,4-D, considerou que a avaliação de exposição realizada no AHS é de alta qualidade e que nesse estudo não foi verificada associação entre a exposição ao 2,4-D e a incidência de câncer de próstata, de pulmão e melanoma (IARC, 2015).

A Agência Reguladora de Controle de Pragas do Canadá também avaliou a evidência de carcinogenicidade humana do 2,4-D e considerou em seu relatório de 2007 que, embora tenham sido relatadas associações entre LNH e o uso de agrotóxicos, esse não é um achado consistente e merece investigação mais aprofundada (PMRA, 2007). A PMRA ressalta que a etiologia da maioria dos casos de LNH permanece desconhecida e múltiplos fatores causais são prováveis. As inconsistentes associações epidemiológicas, o reconhecimento de que existem muitos outros fatores que podem ter contribuído para as fracas associações positivas e o fato dos estudos em animais delineados para mostrar causalidade terem sido consistentemente negativos levaram os cientistas da PMRA a concluir que, com base em todos os dados disponíveis e relevantes, o 2,4-D não pode ser classificado quanto à sua carcinogenicidade para humanos (PMRA, 2007).

A IARC, em sua última classificação da carcinogenicidade do 2,4-D (IARC, 2015), avaliou a associação entre a exposição ao 2,4-D e o risco de câncer em estudos caso-controle populacionais conduzidos nos Estados Unidos, Canadá e Europa, em diversas coortes de trabalhadores agrícolas, aplicadores e fabricantes de agrotóxicos, além de metanálises. A avaliação detalhada de cada estudo pela IARC poderá ser consultada no volume nº 113 das Monografias de Avaliação do Risco Carcinogênico para Humanos (<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/PDFs/index.php>), ainda não publicado (IARC, 2015). Vale ressaltar que o grupo de trabalho da IARC realizou uma metanálise adicional, que incluiu 10 estudos, e não verificou associação entre a exposição ao 2,4-D e a ocorrência de LNH. A IARC também verificou que há poucos estudos que avaliaram outros sítios de câncer como próstata, pulmão, mama, estômago, melanoma e glioma e os achados deles são inconsistentes (IARC, 2015). A partir da análise dos inúmeros estudos que avaliaram a associação entre a exposição ao 2,4-D e a ocorrência de câncer em humanos a IARC concluiu que há evidências inadequadas sobre a carcinogenicidade do 2,4-D em humanos.

10.2.2.1 Limitações dos Estudos Epidemiológicos

Em um documento datado de 1994, que trata da carcinogenicidade do 2,4-D, a USEPA descreve as limitações dos estudos epidemiológicos e salienta que a interpretação dos resultados deles pode ser dificultada por possíveis efeitos de fatores confundidores relacionados tanto à exposição de interesse quanto ao risco de doença, o que limita a capacidade dos estudos epidemiológicos fornecerem evidência convincente de causalidade (USEPA, 1994). Considera-se que há suspeita de causalidade se diversos estudos possuem achados consistentes; se a associação entre o agente e o risco de doença é forte (isto é, possui alta razão de chances) e se a associação está de acordo com a teoria biológica. Dados animais corroborantes ajudam a defender a causalidade, especialmente pelo estabelecimento de plausibilidade biológica e de mecanismos potenciais. Entretanto, a falha em detectar uma associação não é suficiente para refutá-la, especialmente se os estudos possuem um poder estatístico limitado devido ao tamanho reduzido da amostra ou ao reduzido tempo de acompanhamento.

No caso do 2,4-D, os resultados dos estudos epidemiológicos são inconsistentes e as associações encontradas são fracas; não sendo possível determinar se a fraca associação é devida ao fato do agente ser um fraco carcinógeno, a um possível baixo nível de exposição, a fontes de confundimento ou viés ou à variação aleatória que pode acontecer na resposta de cada estudo. A menos que sejam extremamente grandes, os estudos epidemiológicos em geral não são capazes de fornecer evidência convincente de efeitos à saúde no caso de fraca associação causal. Desse forma, na avaliação do peso da evidência dos estudos epidemiológicos relacionados à exposição ao 2,4-D, é necessário realizar um julgamento subjetivo do peso dos dados dos vários estudos e suas conclusões conflitantes.

De fato, alguns estudos demonstraram uma relação entre o 2,4-D e LNH, mas existem inconsistências nos resultados, mesmo naqueles positivos, que levantam dúvidas sobre a causalidade da relação. A maioria dos epidemiologistas reconhece que estudos epidemiológicos são insensíveis e, portanto, incapazes de fornecer evidência inequívoca quando a exposição a determinado agente é uma fraca causa de câncer. Desse modo, se um toxicante aumenta o risco entre as pessoas expostas em uma pequena porcentagem, por exemplo 10%, é improvável que estudos epidemiológicos forneçam uma clara demonstração do risco aumentado. Isso acontece devido à natureza

não experimental dos dados obtidos de estudos epidemiológicos e ao tamanho reduzido do efeito. A classificação incorreta dos níveis de exposição e/ou da presença de doença pode distorcer as associações epidemiológicas. Outros fatores não mensurados, incluindo a variabilidade da amostragem, podem causar associações aparentes em dados epidemiológicos.

De outra forma, a ausência de observação de uma associação pode ser devida ao tamanho reduzido da população do estudo, a um tempo insuficiente de acompanhamento ou à baixa exposição ao agente carcinogênico. A USEPA ressalta que qualquer decisão quanto ao significado do banco de dados epidemiológicos, ou na verdade de quaisquer dados científicos, é mais uma questão de julgamento qualitativo do que de inferência quantitativa.

A Agência Reguladora de Controle de Pragas do Canadá (2007) ressalta que, no processo de decisão regulatória, a confiança em estudos epidemiológicos na ausência de uma medida direta de exposição é desafiadora. Os estudos epidemiológicos mais úteis e relevantes no processo de decisão regulatória são aqueles que caracterizam e medem adequadamente a exposição a um produto específico. As associações epidemiológicas inconsistentes, o reconhecimento de que existem muitos outros fatores que podem ter contribuído para as associações fracamente positivas e o fato de os estudos em animais delineados para mostrar causalidade terem sido consistentemente negativos levaram os cientistas da PMRA a concluir que o 2,4-D não pode ser classificado quanto à carcinogenicidade para humanos.

Schinasi e Leon (2014) ressaltaram a necessidade de estudos epidemiológicos adicionais, em uma variedade mais ampla de localizações geográficas, já que os padrões de uso, aplicação e manuseio de agrotóxicos, além da legislação, regulamentos, demografia e genética, diferem entre as regiões, e podem contribuir para diferenças área-específicas nas associações. Como exemplo, citam que em países de baixa renda, os equipamentos de proteção podem estar menos disponíveis ou serem menos utilizados. Schinasi e Leon relataram não ter encontrado artigos com resultados de estudos conduzidos em países de baixa e média renda e acreditam que é possível que em tais regiões, onde o acompanhamento do câncer e a determinação da exposição podem ser particularmente desafiadores, não haja estudos que investiguem a relação de LNH com a exposição a agrotóxicos. A ausência de estudos nessas regiões foi considerada potencialmente alarmante pelos autores, já que elas são responsáveis pela



maior parte da produção agrícola mundial. Eles ressaltaram, ainda, que os cânceres linfo-hematopoiéticos representam uma proporção substancial dos cânceres observados em países de baixa e média renda. Com base em estimativas da Organização Mundial da Saúde (Projeto GLOBOCAN 2012, que teve como objetivo fornecer uma estimativa da incidência, mortalidade e prevalência de câncer pelo mundo em 2012), os LNH foram responsáveis por 37,7% dos casos prevalentes de câncer diagnosticados nos últimos cinco anos em adultos de regiões menos desenvolvidas (África, Ásia – excluindo o Japão, América Latina e Caribe, Melanésia, Micronésia e Polinésia).

10.3 CONCLUSÕES SOBRE A CARCINOGENICIDADE DO 2,4-D

Com base no disposto, a Anvisa concorda com os demais organismos internacionais que até o atual momento não existe evidência consistente de carcinogenicidade nos estudos experimentais realizados em animais e que os estudos epidemiológicos não mostram uma associação clara entre a exposição ao 2,4-D e a ocorrência de cânceres humanos.

De qualquer maneira, a Anvisa deverá manter-se atenta a futuros estudos epidemiológicos que possam indicar alguma evidência mais consistente de carcinogenicidade do 2,4-D. Ressalta-se a necessidade de condução de estudos epidemiológicos no Brasil que avaliem a relação entre a exposição a agrotóxicos específicos, como o 2,4-D, e a ocorrência de câncer.

11 INGESTÃO DIÁRIA ACEITÁVEL (IDA) DO 2,4-D

Após análise de todos os estudos disponíveis, a Anvisa optou por manter a IDA do 2,4-D no Brasil em 0,01 mg/kg de peso corpóreo, com base no NOAEL do estudo crônico realizado em ratos Fischer por Serota (1986; descrito no quadro 7 desse parecer), utilizando-se um fator de segurança de 100 vezes.

No quadro 33 são apresentadas as IDAs (ou doses de referência crônica – RfD) do 2,4-D em outros países.

Quadro 33. Ingestão Diária Aceitável (ou dose de referência crônica) do 2,4-D em outros países.

País	IDA (mg/kg/dia)	NOAEL (mg/kg/dia)	Fator de Segurança	Estudos	Observações
Austrália (The Office of Chemical Safety, 2015)	0,01	1	100	Crônicos em ratos, camundongos e cães	-
Canadá (PMRA, 2007)	0,017	5	300	Crônicos em ratos e camundongos	Utilizado fator adicional de 3 devido à potencial sensibilidade de jovens verificada em estudo de reprodução em ratos com limitações e em estudos de neurotoxicidade.
Estados Unidos (USEPA, 2013)	0,21	21	100	Uma Geração Estendida em ratos	-
União Europeia (EFSA, 2014b)	0,05	5	100	Crônico em ratos e camundongos	-
FAO/OMS (JMPR, 1997)	0,01	1	100	Crônico em cães e ratos	-

12 PRESENÇA DE RESÍDUOS DE 2,4-D NO SOLO, EM ALIMENTOS E NA ÁGUA

Depois da aplicação de um agrotóxico, vários processos físicos, químicos, físico-químicos e biológicos determinam seu comportamento. O destino de agrotóxicos no ambiente é governado por processos de retenção (sorção), de transformação (degradação biológica e decomposição química) e de transporte (deriva, volatilização, lixiviação e carreamento superficial), e por interações desses processos (Spadotto, 2006).

Boivin e colaboradores (2005) observaram que, após aplicação em três tipos diferentes de solo, grande parte do 2,4-D foi mineralizada relativamente rápido (dentro de 30 dias). A mineralização do 2,4-D ocorre por microorganismos geralmente encontrados naturalmente em solos cultivados. A própria EFSA relata que a quantidade de 2,4-D no solo declina rapidamente (EFSA 2014b). Dessa forma, embora o 2,4-D seja um dos herbicidas mais móveis, sua rápida mineralização (50% da dose aplicada em 10 dias) diminui sua disponibilidade e, conseqüentemente, a contaminação de águas superficiais e subterrâneas (Boivin *et al.*, 2005).

12.1 MONITORAMENTO DE 2,4-D EM ALIMENTOS

Segundo a monografia do 2,4-D, esse ingrediente ativo está autorizado para aplicação em pré e pós-emergência das plantas infestantes nas culturas de arroz, aveia, café, cana-de-açúcar, centeio, cevada, milho, pastagem, soja, sorgo e trigo (Monografia Anvisa D27). Os limites máximos de resíduos (LMR) de 2,4-D para cada cultura autorizada estão especificados na tabela 6.

Tabela 6. Culturas com uso autorizado de 2,4-D e seus respectivos limites máximos de resíduos (LMR).

Culturas	LMR (mg/kg)
Arroz	0,2
Aveia	0,2
Café	0,1
Cana-de-açúcar	0,1
Centeio	0,2
Cevada	0,2
Milho	0,2
Pastagem	300,0
Soja	0,1
Sorgo	0,2
Trigo	0,2

Em 2001 a Anvisa implementou o Programa de Monitoramento de Resíduos de Agrotóxicos (PARA), com o objetivo de avaliar continuamente os níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos *in natura* (Pires, 2013). Resíduos de 2,4-D foram monitorados no PARA somente em 2012, na cultura de laranja (Anvisa, 2013), por suspeita de uso irregular do herbicida nessa cultura. De 157 amostras de laranja avaliadas, foi detectado resíduo de 2,4-D em apenas uma (0,4%), em quantidade inferior ao limite de quantificação (0,010 mg/kg; com limite de detecção de 0,005 mg/kg).

Ainda, de acordo com os resultados do Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes, da Secretaria de Defesa Agropecuária do MAPA, no ano-safra 2013/2014 foram analisadas para a presença de 2,4-D 13 amostras de banana, 10 amostras de café e 23 de tomate, todas dentro da conformidade (Brasil, 2015b). Vale ressaltar o uso de 2,4-D não está autorizado nas culturas de banana e café.

12.1.1 Literatura publicada sobre monitoramento de 2,4-D em alimentos

Apesar de haver na literatura muitos estudos sobre detecção de 2,4-D em alimentos, a maioria refere-se apenas ao desenvolvimento de métodos analíticos (Santilio *et al.*, 2009; 2014). No entanto, foram identificados alguns artigos publicados que tratam do monitoramento de 2,4-D em alimentos em diferentes países do mundo, descritos no quadro 34. Conforme pode ser verificado, em três dos artigos descritos, os resíduos de 2,4-D estavam presentes em quantidades inferiores ao limite de quantificação do método de análise empregado (Jiang *et al.*, 2010; Santilio *et al.*, 2011; Botero-Coy *et al.*, 2012). Inclusive, Jiang e colaboradores (2010) concluíram que a ausência de resíduos detectáveis de 2,4-D evidenciada indica que a aplicação da dose recomendada do produto (nesse caso, 720 g/L de sal de dimetilamônio de 2, 4-D) em plantações de trigo é segura.

Em dois dos artigos descritos no quadro 34 foram encontrados resíduos de 2,4-D na casca de laranjas e tangerinas e na soja. O uso 2,4-D não é autorizado nas culturas de laranja e tangerina no Brasil.

Nas avaliações do risco dietético agudo realizadas em 1998 e 2001 o JMPR (1999 e 2001) concluiu que é improvável que o consumo de resíduos de 2,4-D represente risco à saúde pública (apenas 3 a 10% da IDA em 1998 e 3 a 20% em 2001).

Quadro 34. Monitoramento de resíduos de 2,4-D em alimentos em diferentes países do mundo.

Tipo de amostra	Ano	Origem	Quantidade de Resíduos	Referência
Alimentos líquidos e sólidos de crianças e adultos	2000, 2001	Estados Unidos (estados - CN e OH)	Líquidos: 2 e 3% (crianças CN e OH) e 3 e 6% (adultos) com 2,4-D detectável (máx 0,2 e 0,3 ng/mL; 0,3 e 0,8 ng/mL) Sólidos: 47 e 44% (crianças CN e OH) e 50 e 48% (adultos) com 2,4-D detectável (máx 4,0 e 20,2 ng/g e 4,0 e 3,7 ng/mL)	Morgan <i>et al.</i> , 2008
Planta de trigo, grão de trigo e solo	2008, 2009	China	Todos abaixo do limite de quantificação (0,02 mg/kg)	Jiang <i>et al.</i> , 2010
Arroz integral, couve-china, maçã, pimenta e soja	2009	Coreia do Sul	Soja: 0,102 mg/kg (apenas 1/40 amostra)	Shin <i>et al.</i> , 2011
Cereais (farinha de centeio e de aveia, aveia em flocos e descascada)	NI	Itália (Roma)	Todas abaixo do limite de quantificação (0,02 mg/kg)	Santilio <i>et al.</i> , 2011
Frutas tropicais (<i>uchuva, tamarillo, granadilla, gulupa, maracuya, papaya e pithaya</i>)	NI	Colômbia	Todas abaixo do limite de quantificação (0,05 mg/kg)	Botero-Coy <i>et al.</i> , 2012
Casca de laranjas e tangerinas	NI	Vietnã (Hanói)	Laranja: 0,079 a 0,104 mg/kg Tangerina: 0,00166 a 0,00282mg/kg	Vdovenko <i>et al.</i> , 2013

Legenda: NI=não informado; CN= Carolina do Norte; OH=Ohio.

12.2 MONITORAMENTO DE 2,4-D NA ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO

Além da presença nos alimentos, pode ocorrer também a contaminação da água superficial e subterrânea por agrotóxicos. No Brasil, a norma que define o padrão de potabilidade e os procedimentos relativos ao controle e à vigilância da qualidade da água, incluindo a presença de agrotóxicos, é a Portaria MS nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011 (Barbosa, 2013). Conforme o Anexo VII dessa Portaria (Brasil, 2011), o 2,4-D está entre os 27 agrotóxicos previstos para monitoramento semestral, com o valor máximo permitido (VMP) de 0,03 mg/L ou 30 µg/L (30 ppm).

O VMP é derivado da ingestão diária aceitável (IDA), segundo a seguinte equação: $VMP = (IDA \times mc \times P)/C$, onde mc=massa corporal; P=fração da IDA proveniente da água potável e C=consumo diário de água (WHO, 2011).

O VMP adotado pelo Brasil é aquele sugerido pela OMS, que considera a IDA de 0,01 mg/kg, o valor de massa corporal de 60 kg (adultos), o consumo diário de água de 2 litros (adultos) e que para o 2,4-D 10% da IDA é proveniente da água potável (WHO, 2011). Os VMPs estabelecidos para o 2,4-D no Canadá e Estados Unidos são superiores (70 e 100 µg/L, respectivamente) ao adotado pela OMS e, conseqüentemente, pelo Brasil (Neto e Sarcinelli, 2009).

O Ministério da Saúde coordena o Programa Nacional de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano (Vigiagua) e possui o Sistema de Informação de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano (Sisagua) para o monitoramento sistemático da qualidade da água consumida pela população (Brasil, 2004). Considerando que os dados do Siságua não estão publicamente disponíveis, foram verificados os resultados do Siságua de 2007 a 2013 constantes em artigos científicos e nos boletins epidemiológicos publicados pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, os quais estão resumidos no quadro 35. Os dados mostram que mesmo que o 2,4-D tenha sido o 3º agrotóxico mais utilizado no Brasil entre 2009 e 2012, apenas três amostras de água (de 8124 analisadas), ou seja, 0,04%, apresentaram resíduos de 2,4-D acima do permitido entre 2007 e 2011.

No entanto, vale citar que Barbosa e colaboradores (2015), que analisaram os dados de monitoramento de agrotóxicos do Sisagua fornecidos pelo Ministério da Saúde de 2007 a 2010, consideraram 10 a 30% deles inválidos, devido a diversas ausências e inconsistências encontradas (não cumprimento do número mínimo

de amostras exigido pela norma, falta de informações sobre os limites de detecção e quantificação, falta de padronização na apresentação dos resultados). A partir disso, esses autores concluíram que o Siságua possui baixa credibilidade e que os dados de monitoramento de agrotóxicos não avaliam de fato a exposição da população a essas substâncias via água de consumo (Barbosa *et al.*, 2015).

Quadro 35. Monitoramento de 2,4-D em amostras de água para consumo humano no Brasil (dados Sisagua).

Ano	Origem das amostras	Amostras analisadas para 2,4-D	Nº e percentual de amostras com 2,4-D acima do VMP	Municípios com 2,4-D acima do VMP	Referência
2007 a 2010	9 a 17% dos municípios	5.766	2 (0,035 %)	Araucária/PR (2008)* Palmeirópolis/TO (2010)	Barbosa, 2013 Bergamasco <i>et al.</i> , 2011
2011	16% dos municípios	2.428	1 (0,04%)	Florestal/MG	Brasil, 2013a
2012	25,1% dos municípios	4.838*	3 (0,06%)*	Mallet/PR* Missal/PR* Santa Cruz da Conceição/SP*	Brasil, 2013b
2013	28,6% dos municípios	5.721*	1 (0,01%)*	Jacinto Machado/SC*	Brasil, 2015c

*Dados obtidos diretamente com o Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (Ofício nº 64/2015/DSAST/SVS/MS, de 25/05/2015).

Vale ressaltar que os dados do último boletim do Sisagua, resumidos no quadro 35, mostram que em 2013 apenas 28,6% dos municípios brasileiros possuíam resultados referentes ao monitoramento de agrotóxicos na água para consumo humano (Brasil, 2015c). Sabe-se que o maior número de municípios com informações sobre o monitoramento de agrotóxicos na água para consumo humano encontram-se nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste (Brasil, 2013b). No entanto, apesar da abrangência do monitoramento de agrotóxicos no Brasil ainda estar longe do ideal, podemos evidenciar que, na comparação anual, esse número vem crescendo ao longo dos anos (quadro 35), e que os resultados obtidos para o 2,4-D sugerem que esse ingrediente ativo parece não representar um risco para a população exposta pela água de bebida.

Adicionalmente, foi realizada pesquisa da análise da água de consumo para presença de 2,4-D realizada pelos Estados Unidos de 2009 a 2013, descrita no quadro 36. Apesar desse ingrediente ativo ser detectado em grande parte das amostras (de 59 a 98%), nenhum valor estava acima do VMP estabelecido nos EUA (70 µg/L); pelo contrário, os valores representaram no máximo 2,6% do VMP definido para aquele país. Apesar do VMP americano ser mais de duas vezes maior que o brasileiro (30

µg/L), esses dados mostram que o 2,4-D é também encontrado em baixíssimas concentrações na água nos Estados Unidos.

Quadro 36. Monitoramento de 2,4-D em amostras de água para consumo humano nos Estados Unidos.

Ano	Tipo de amostra	% Amostras com detecção de 2,4-D	Faixa de valores de 2,4-D	Max % do VMP (70.000 ppt)	Referência
2013	Água tratada	98%	1,1 a 84 ppt	0,12%	USDA, 2014b
	Água não tratada	98%	1,1 a 99 ppt	0,14%	
2012	Água tratada	85,3%	1,1 a 820 ppt	1,17%	USDA, 2014a
	Água não tratada	87%	1,1 a 1800 ppt	2,57%	
2011	Água tratada	59,3%	6 a 348 ppt	0,49%	USDA, 2013
	Água não tratada	79,2%	6 a 720 ppt	1,03%	
2010	Água tratada	78,9%	1,1 a 1100 ppt	1,43%	USDA, 2012
	Água não tratada	82,6%	1,1 a 630 ppt	0,9%	
2009	Água tratada	81,4%	1,1 a 180 ppt	0,26%	USDA, 2011
	Água não tratada	92%	1,1 a 690 ppt	0,98%	

12.3 CONCLUSÃO SOBRE O MONITORAMENTO DO 2,4-D EM ALIMENTOS E EM ÁGUA

Não há dados suficientes de monitoramento de resíduos de 2,4-D em alimentos no Brasil, no entanto, a EFSA ressaltou em 2011 que não se espera encontrar resíduos quantificáveis de 2,4-D nas partes comestíveis de culturas e que a exposição crônica total ao 2,4-D representa menos de 10% da IDA (EFSA, 2011a). Portanto, o consumo de 2,4-D por meio dos alimentos parece não representar um risco à população. De qualquer maneira, como o 2,4-D é o segundo ingrediente ativo de agrotóxico mais utilizado no Brasil, é importante que a Anvisa inclua no PARA o monitoramento de resíduos nas culturas com uso autorizado de 2,4-D, ao menos temporariamente, de forma que se possa confirmar a ausência de risco à população após exposição dietética.

Em relação aos dados de monitoramento em água, o 2,4-D também parece não representar risco atualmente, apesar das amostras de água analisadas pelo



Sisagua serem pouco representativas da situação nacional, já que abrangem apenas 28,6% dos municípios brasileiros, e os dados apresentarem diversas inconsistências, conforme relatado por Barbosa e colaboradores (2015). Por isso, é importante que o 2,4-D seja analisado em um maior número de amostras de água e de localidades do país, principalmente nas regiões onde o uso de 2,4-D é mais expressivo.

III – CONCLUSÃO

Considerando a avaliação de perigo constante neste parecer e as determinações da legislação brasileira, conclui-se que os dados atualmente disponíveis não fornecem evidências consistentes de que o ingrediente ativo de agrotóxico 2,4-D causa efeitos graves à saúde humana que impeçam seu registro e utilização no Brasil. Ele não se enquadra nas características proibitivas de registro de agrotóxicos no Brasil previstas no §6º itens “c”, “d” e “e” do art. 3º da Lei 7.802, de 11 de julho de 1989, ou seja, ele não revela características teratogênicas, carcinogênicas ou mutagênicas nem provoca distúrbios hormonais ou danos ao aparelho reprodutor, conforme resultados de estudos científicos disponíveis até o momento. Dessa forma, sugere-se a manutenção dos produtos à base do ingrediente ativo 2,4-D no Brasil.

No entanto, conforme o estipulado pelo art. 19 do Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002, a partir da reavaliação de todos os aspectos toxicológicos relevantes do ingrediente ativo pode-se concluir pela necessidade de realizar alterações no registro do agrotóxico, como alteração da formulação, da dose ou do método de aplicação; bem como restrição da sua produção, importação, comercialização ou uso.

A partir da reavaliação do ingrediente ativo 2,4-D foi verificada a necessidade de:

1. Revisão da Monografia do ingrediente ativo 2,4-D, de forma a incluir como contaminantes de importância toxicológica, além das dioxinas totais (no limite máximo de 0,01 ppm), os fenóis livres (no limite máximo de 3g/kg), calculados como 2,4-diclorofenol (2,4-DCP), conforme estabelecido pela INC 02, de 2008.
2. Revisão da Monografia do 2,4-D, de forma a incluir a definição de “dioxinas totais”. Essa discussão deve ser realizada no âmbito



do Comitê Técnico de Assessoramento de Agrotóxicos, que possui representantes do MAPA, Anvisa e Ibama, os três órgãos envolvidos na regulamentação de agrotóxicos no Brasil, responsáveis pelas revisões da INC 02, de 2008. Os encaminhamentos relativos à periodicidade dos relatórios de impurezas dos produtos técnicos à base de 2,4-D também devem continuar a ser tratados pelo CTA.

3. Realização das avaliações da exposição e do risco ocupacional ao 2,4-D, para verificar se são necessárias alterações nas formulações, dose, métodos de aplicação ou culturas autorizadas para este ingrediente ativo. Essa avaliação deverá ser realizada imediatamente após a finalização da consolidação das contribuições à Consulta Pública da proposta de regulamento técnico subsidiada por este parecer.
4. Realização do monitoramento de 2,4-D pelo Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos (PARA) nas culturas autorizadas no Brasil.
5. Ampliação do monitoramento de resíduos de 2,4-D em água pelo Programa Nacional de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano (Vigiagua), coordenado pelo Ministério da Saúde.
6. Fomento à realização de estudos epidemiológicos no Brasil que avaliem a associação entre a exposição ao 2,4-D e a ocorrência de doenças.

Sugere-se que após a finalização da consolidação das contribuições à Consulta Pública da proposta de regulamento técnico para o ingrediente ativo 2,4-D seja realizado painel de especialistas, prática que vem sendo adotada nas recentes reavaliações toxicológicas de agrotóxicos conduzidas pela Anvisa.

Vale ressaltar que a Anvisa deverá manter-se atenta aos resultados de futuros estudos que tratem do 2,4-D (especialmente os epidemiológicos) e às avaliações de seus efeitos à saúde por outros organismos internacionais de forma a verificar possíveis alterações na percepção dos riscos à saúde humana pela exposição a este ingrediente ativo que possam demandar nova reavaliação.



É o parecer para consideração superior.

Brasília, 21 de dezembro de 2015.

IV - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aardema, M.J.; MacGregor, J.T. Toxicology and genetic toxicology in the new era of “toxicogenomics”: impact of “-omics” technologies. *Mutation Research*, 499:13-25; 2002.

Abdellaue, A. Pesticide active ingredient 2,4-D - Kontaktskjema mattilsynet.no - 26052015 - 15:01:56 [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por correio eletrônico institucional em 02 julho 2015.

Adhikari, N.; Grover, I.S. Genotoxic effects of some systemic pesticides: in vivo chromosomal aberrations in bone marrow cells in rats. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 12:235-242, 1988.

Agência Nacional De Vigilância Sanitária - Anvisa. Memória de Reunião - Reavaliação Toxicológica do Ingrediente Ativo 2,4-D; 18/07/2006. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/7497f80047458d8a96d4d63fbc4c6735/2_4D.pdf?MOD=AJPERES>.

Agência Nacional De Vigilância Sanitária - Anvisa. Monografia D27 – 2,4-D. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/bdea3b804745780e857bd53fbc4c6735/D27++24-D.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 19 maio 2015.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Gerência Geral de Toxicologia. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) Relatório de atividades 2011 e 2012 e Relatório Anexo II – Detalhamento dos Resultados (2012). Brasília, 22 de outubro de 2013, disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Programa+de+Analise+de+Residuos+de+Agrotoxicos+em+Alimentos>>. Acesso em: 20 agosto 2015.

Ahmed, F.E.; Lewis, N.J.; Hart, R.W. Pesticide-induced ouabain resistant mutants in Chinese hamster V79 cells. *Chemico-Biological Interactions*, 19: 369-374, 1977.

Alexander, B.H.; Mandel, J.S.; Baker, B.A.; Burns, C.J.; Bartels, M.J.; Acquavella, J.F.; Gustin, C. Biomonitoring of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid exposure and dose in farm families. *Environ Health Perspect.* , 115(3):370-6; 2007.

Allen, J. W.; Liang, J. C.; Carrano, A. V.; Preston, R. J. Review of literature on chemical-induced aneuploidy in mammalian male germ cells. *Mutation Research*, 167: 123-137; 1986.



Alves, M. G.; Neuhaus-Oliveira, A.; Moreira, P.I.; Socorro, S.; Oliveira, P.F. Exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid alters glucose metabolism in immature rat Sertoli cells. *Reprod Toxicol.*,38:81-8; 2013.

Amer, S. M.; Aly, F. A. E. Genotoxic effect of 2,4- dichlorophenoxy acetic acid and its metabolite 2,4-dichlorophenol in mouse. *Mutation Research*, v. 494, n. 1-2, p. 1–12, 2001.

Andrus, A.K. Auditory startle response control data in CRL:CD (SD) rats. 070383; 2007.

Ankley, G.T.; Jensen, K.M. A novel framework for interpretation of data from the fish short-term reproduction assay (FSTRA) for the detection of endocrine-disrupting chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(11):2529–2540; 2014.

Appels, R.; Morris, R.; Gill, B. S.; May, C. E. *Chromosome Biology*. Springer US. Kluwer Academic Publishers. ISBN 978-1-4613-7470-1. 401p. 1998.

Arbuckle, T.E.; Schrader, S.M.; Cole, D.; Hall, J.C.; Bancej, C.M.; Turner, L.A.; Claman, P. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid residues in semen of Ontario farmers. *Reproductive Toxicology* ;13(6):421-9, 1999.

Australian Pesticides & Veterinary Medicines Authority (APVMA). The Reconsideration of Approvals and Registrations Relating to 2,4-D. Review Scope Document. Canberra/Austrália, 2003.

Azazh, A. Case series of 2,4-D poisoning in Tikur Anbessa Teaching Hospital. *Ethiopian Medical Journal*, 48(3):243-6; 2010.

Aydin, H.; Ozdemir, N.; Uzunören, N. Investigation of the accumulation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in rat kidneys. *Forensic Sci Int*, 153(1):53-7; 2005.

Barbosa, A.M.C. O monitoramento de agrotóxicos na água para consumo humano no Brasil: uma avaliação crítica. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brasil, 2013. 115 f.

Barbosa, A.M.C.; Solano, M.L.M.; Umbuzeiro, G.A. Pesticides in drinking water – the Brazilian monitoring program. *Frontiers in Public Health*, 3:246; 2015.

Barnekow, D.E.; Hamburg, A.W.; Puvanesarajah, V.; Guo, M. Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in laying hens and lactating goats. *J Agric Food Chem*, 49(1):156-63; 2001.

Barzilai, A.; Yamamoto, K-I. DNA damage response to oxidative stress. *DNA Repair*, v. 4:1109-1115, 2004.

Beekhuijzen, M.; Zmarowski, A.; Emmen, H.; Frieling, W. To mate or not to mate: a retrospective analysis of two generation studies for evaluation of criteria to trigger



additional mating in the extended one-generation design. *Reprod Toxicol.*, 28(2):203-8; 2009.

Bergamasco, A.M.D.D.; Sékula, C.; Daniel, M.H.B.; Queiroz, F.B; Cabral, A.R. Contaminantes químicos em águas destinadas ao consumo humano no Brasil. *Cad. Saúde Colet*, 19 (4): 479-86; 2011.

Berkley, M.C.; Magee, K.R. Neuropathy Following Exposure to a Dimethylamine Salt of 2, 4-D. *Archives of Internal Medicine*, 111(3):351-352; 1963.

Bertazzi, P.A. Long-term effects of chemical disasters. Lessons and results from Seveso. *Science of the Total Environment*, 106(1-2):5-20, 1991.

Berwick, P. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid poisoning in man. *JAMA*, 214:1114–1117; 1970.

Blair, R. M.; Fang, H.; Branham, W. S.; Hass, B. S.; Dial, S. L.; Moland, C. L.; Tong, W.; Shi, L.; Perkins, R.; Sheehan, D. M. The estrogen receptor relative binding affinities of 188 natural and xenochemicals: Structural diversity of ligands. *Toxicological Sciences*, 54:138–153; 2000.

Boelen, A.; Wiersinga, W. M.; Fliers, E. Fasting-Induced Changes in the Hypothalamus–Pituitary–Thyroid Axis. *Thyroid*, 18(2):123-9; 2008.

Boivin, A.; Amellal, S.; Schiavon, M.; van Genuchten, M.T. 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-d) sorption and degradation dynamics in three agricultural soils. *Environ Pollut.*, 138(1):92-9; 2005.

Bon, E.; Barbe, U.; Nuñez Rodriguez, J.; Cuisset, B.; Pelissero, C.; Sumpter, J.P.; Le Menn, F. Plasma vitellogenin levels during the annual reproductive cycle of the female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): establishment and validation of an ELISA. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B – Biochemistry and Molecular Biology*, 117(1):75-84; 1997.

Bortolozzi, A.; Duffard, R.; Evangelista de Duffard, A.M. Behavioral alterations induced in rats by a pre- and post-natal exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Neurotoxicology and Teratology*, 21: 451–65; 1999.

Bortolozzi, A.; Duffard, R.; Evangelista de Duffard, A.M. Asymmetrical development of the monoamine systems in 2,4-dichlorophenoxyacetic acid treated rats. *Neurotoxicology*, 24(1): 149-157; 2003.

Botero-Coy, A.M., Marín, J.M.; Ibáñez, M.; Sancho, J.V.; Hernández, F. Multi-residue determination of pesticides in tropical fruits using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, 402(7):2287-300; 2012.

Bradberry, S.M.; Watt, B.E.; Proudfoot, A.T.; Vale, J.A. Mechanisms of toxicity, clinical features, and management of acute chlorophenoxy herbicide poisoning: a review. *Journal of Clinical Toxicology*, 38(2):111-22; 2000.



Bradberry, S.M.; Proudfoot, A.T.; Vale, J.A. Poisoning due to chlorophenoxy herbicides. *Toxicological Reviews*, 23(2):65-73; 2004.

Brahmi, N.; Mokhtar, H.B.; Thabet, H.; Bouselmi, K.; Amamou, M. 2,4-D (chlorophenoxy) herbicide poisoning. *Veterinary and Human Toxicology*, 45(6):321-2; 2003.

Brand, R.M.; Charron, A.R.; Sandler, V.L.; Jendrzewski, J.L. Moisturizing lotions can increase transdermal absorption of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid across hairless mouse skin. *Cutan Ocul Toxicol*, 26(1):15-23, 2007a.

Brand, R.M.; McMahon, L.; Jendrzewski, J.L.; Charron, A.R. Transdermal absorption of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid is enhanced by both ethanol consumption and sunscreen application. *Food Chem Toxicol*, 45(1):93-7, 2007b.

Brasil. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos das embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, 12 de julho de 1989.

Brasil. Portaria nº 3, 16 de janeiro de 1992. Ratifica os termos das "diretrizes e orientações referentes à autorização de registros, renovação de registro e extensão de uso de produtos agrotóxicos e afins - nº 1, de 09/12/1991". *Diário Oficial da União*, Brasília, 04 de fevereiro de 1992.

Brasil. Decreto nº 4074, de 4 de janeiro de 2002. Regulamenta a 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. *Diário Oficial da União*, Brasília, 8 de janeiro de 2002.

Brasil. Ministério da Saúde. Programa Nacional de Vigilância em Saúde Ambiental Relacionada à Qualidade da Água para Consumo Humano. 2004.

Brasil. Instrução Normativa Conjunta nº 2, de 20 de junho de 2008. Dispõe sobre o estabelecimento das impurezas toxicológica e ambientalmente relevantes a serem pesquisadas nos estudos de cinco bateladas dos produtos técnicos a base dos ingredientes ativos. *Diário Oficial da União*, nº 120, Brasília, 25 de junho de 2008.

Brasil. Ministério da Saúde. Portaria MS nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. *Diário Oficial da União – Seção 1*, nº 239, p. 39-46, 14 de dezembro de 2011.



Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento de agrotóxicos na água para consumo humano no Brasil, 2011. Boletim Epidemiológico, 44(10); 2013a.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento de agrotóxicos na água para consumo humano no Brasil, 2011/2012. Boletim Epidemiológico, 44(17); 2013b.

Brasil. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). Extrato de Parecer Técnico nº 4.406/2015. Diário Oficial da União nº 56, p. 8, 24 de março de 2015a.

Brasil. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria nº 44, de 8 de maio de 2015. Resultados do Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes, de que trata o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Vegetal - PNCRC/Vegetal, no ano-safra 2013/2014. Diário Oficial da União – Seção 1, nº 88, p. 4-11, 12 de maio de 2015b.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento de agrotóxicos na água para consumo humano no Brasil, 2013. Boletim Epidemiológico, 46(4); 2015c.

Burns, C.J.; Beard, K.K; Cartmill, J.B. Mortality in chemical workers potentially exposed to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 1945–94: an update. *Occupational and Environmental Medicine*, 58:24–30; 2001.

Burns, C.J. Reply to Amyotrophic lateral sclerosis and occupational exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Occupational and Environmental Medicine*, 58(9): 610, 2001.

Burroughs, B.; Tarone, R.; Kesner, J.S. Garry, V.F. Herbicides and adjuvants: an evolving view. *Toxicol Ind Health*, 15:159–167; 1999.

Carmichael, N.G.; Barton, H.A.; Boobis, A.R.; Cooper, R.L.; Dellarco, V.L.; Doerrer, N.G.; Fenner-Crisp, P.A.; Doe, J.E.; Lamb, J.C.; Pastoor, T.P. Agricultural chemical safety assessment: A multisector approach to the modernization of human safety requirements. *Critical Reviews in Toxicology*, 36(1):1-7; 2006.

Charles, J.M.; Cunny, H.C.; Wilson, R.D. In vivo micronucleus assays on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and its derivatives. *Mutat Research*, v. 444: 227-234, 1999a.

Charles, J.M.; Cunny, H.C.; Wilson, R.D.; Bus, J.S; Lawlor, T.E.; Cifone, M.A.; Fellows, M.; Gollapudi, B. Ames assays and unscheduled DNA synthesis assays on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and its derivatives. *Mutation Research*, v. 444: 207-216, 1999b.

Chernoff, N.; Setzer, R.W.; Miller, D.B.; Rogers, J.M. Effects of chemically induced maternal toxicity on prenatal development in the rat. *Teratology*, 42: 65 1-658; 1990.



Coady, K. K.; Marino T. A.; Thomas, J. “2,4-Dichlorophenoxyacetic acid: the amphibian metamorphosis assay using the south african clawed frog, *Xenopus laevis*”. Laboratory Project Study ID 101025, 2010.

Coady, K. K.; Sosinski, L. K. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid: evaluation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in the human recombinant aromatase assay. Laboratory Project Study ID 111036, 2011.

Coady, K.; Marino, T.; Thomas, J.; Sosinski, L.; Neal, B.; Hammond, L. An evaluation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in the Amphibian Metamorphosis Assay and the Fish Short-Term Reproduction Assay. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 90:143–150; 2013.

Coady; K.K., Kan, H.L.; Schisler; M.R.; Gollapudi, B.B.; Neal, B.; Williams, A.; LeBaron, M.J. Evaluation of potential endocrine activity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid using *in vitro* assays. *Toxicology in Vitro*, 28:1018–1025; 2014.

Comitê Técnico de Assessoramento de Agrotóxicos (CTA). Memória da 7ª Reunião Ordinária do CTA – 01 julho 2015. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/fccbfd80494c318bbc45fdb32cf0f1c1/Memoria+da+7a+Reuniao+Ordinaria+do+CTA++01-07.pdf?MOD=AJPERES>.

Cooper, R.L.; Lamb, J.C.; Barlow, S.M.; Bentley, K.; Brady, A.M.; Doerrer, N.G.; Eisenbrandt, D.L.; Fenner-Crisp, P.A.; Hines, R.N.; Irvine, L.F.; Kimmel, C.A.; Koeter, H.; Li, A.A.; Makris, S.L.; Sheets, L.P.; Speijers, G.; Whitby, K.E. A tiered approach to life stages testing for agricultural chemical safety assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* 36(1):69–98, 2006.

Crago, J.; Tran, K.; Budicin, A.; Schreiber, B.; Lavado, R.; Schlenk, D. Exploring the impacts of two separate mixtures of pesticide and surfactants on estrogenic activity in male fathead minnows and rainbow trout. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 68:362–370; 2015.

Crain, D.A.; Guillette Jr., L.J.; Rooney, A.A.; Pickford, D.B. Alterations in steroidogenesis in alligators (*Alligator mississippiensis*) exposed naturally and experimentally to environmental contaminants. *Environmental Health Perspectives*, 105:528–533; 1997.

Dalgard, D. W. 52-Week Dietary Toxicity Study with 2,4-D in Dogs. HWA 2184-124, 1993.

David Suzuki Foundation. The food we eat - An International Comparison of pesticide regulations. Vancouver, Canada, 2006.

Dearfield, K.; Cimino, M.; McCarroll, N.; Mauer, I.; Valcovic, L. Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. *Mutation Research*, 521: 121–135; 2002.

Dellarco, V.L.; McGregor, D.; Berry, S.C.; Cohen, S.M.; Boobis, A.R. Thiazopyr and thyroid disruption: case study within the context of the 2006 IPCS Human Relevance



Framework for analysis of a cancer mode of action. *Crit Rev Toxicol*, 36(10):793-801; 2006.

Dinamarca, V.M.; Hidalgo, M.E.; Cavieres, M.F. Lack of effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid administration on markers of oxidative stress during early pregnancy in mice. *Toxicology*, 237(1-3):104-10, 2007.

Do Val, R.R. Bacterial reverse mutation test (Ames Test) for 2,4-D TECHNICAL [REDACTED] - RL5421-06AM-B; 2006.

Döhler, K.D.; Wong, C.C.; von zur Mühlen, A. The rat as model for the study of drug effects on thyroid function: consideration of methodological problems. *Pharmacol Ther B*, 5(1-3):305-18; 1979.

Duffard, R.; Garcia, G.; Rosso, S.; Bortolozzi, A.; Madariaga, M.; di Paolo, O.; Evangelista de Duffard, A.M. Central nervous system myelin deficit in rats exposed to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid throughout lactation. *Neurotoxicology and Teratology*, 18(6):691-6; 1996.

Durward, R. 2,4-D: OECD 476 Mutation of L5178Y mouse lymphoma cells at the thymidine kinase TK +/- locus. *Fluctuation assay* - 238/39; 1994.

Eastern Research Group, Inc. Peer Review Results for the Fish Short-term Reproduction Assay; prepared for USEPA, 2008. Disponível em: <http://www.epa.gov/endo/pubs/fishassay_peer_review_013008.pdf>.

Elo, H.; Ylitalo, P. Substantial increase in the levels of chlorophenoxyacetic acids in the CNS of rats as a result of severe intoxication. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, 41(3):280-4; 1977.

Erdtmann, B. Estudo para determinar a habilidade do produto 2,4-D Ácido Defesa Indústria de Defensivos Agrícolas S.A. para induzir mutações cromossômicas avaliadas pelo teste de micronúcleos. MN85; 1994a.

Erdtmann, B. Estudo para determinar a habilidade do produto 2,4-D Amina Técnico Defesa Indústria de Defensivos Agrícolas S.A. para induzir mutações cromossômicas avaliadas pelo teste de micronúcleos. MN81; 1994b.

European Commission Health and Consumer Protection Directorate (EU). Review report for the active substance 2,4-D, Appendix II. Endpoints and related information, 1. Toxicology and metabolism, 7599/V1/97-final, 2001.

European Food Safety Authority (EFSA). Reasoned Opinion. Review of the existing maximum residue levels (MRLs) for 2,4-D according to Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005. *EFSA Journal*, 9(11):2431; 2011a.

European Food Safety Authority (EFSA) Scientific Committee. Scientific opinion on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed safety assessment. *EFSA journal*, 9(9):2379; 2011b.



European Food Safety Authority (EFSA). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance 2,4-D. EFSA Journal 12(9):3812; 2014a.

European Food Safety Authority (EFSA). Final addendum to the 2,4-D Renewal Assessment Report. Risk assessment provided by the rapporteur Member State Hellas and co-rapporteur Member State Poland for the active substance 2,4-D, Atenas/Grécia; 2014b.

European Union (EU). COMMISSION IMPLEMENTING REGULATION 2015/2033 of 13 November 2015 renewing the approval of the active substance 2,4-D in accordance with Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council concerning the placing of plant protection products on the market, and amending the Annex to Commission Implementing Regulation (EU) No 540/2011. Official Journal of the European Union, L 298, v. 58, Bruxelas, 14/11/2015.

Evangelista de Duffard, A.M.; Bortolozzi, A.; Duffard, R. Altered behavioral responses in 2,4-dichlorophenoxyacetic acid treated and amphetamine challenged rats. *NeuroToxicology*, 16:479–88; 1995.

Feldmann, R.J.; Maibach, H.I. Percutaneous penetration of some pesticides and herbicides in man. *Toxicol Appl Pharmacol*; 28(1):126-32; 1974.

Ferment, G. Parecer Técnico sobre riscos para a saúde humana e animal associados ao uso de herbicidas à base de 2,4-D em plantas convencionais e transgênicas Tolerantes a Herbicidas (TH), 2014.

Ferri, A.; Duffard, R.; de Duffard, A.M.E. Selective Oxidative Stress in Brain Areas of Neonate Rats Exposed to 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Through Mother's Milk. *Drug and Chemical Toxicology*, 30:17–30, 2007.

Figgs, L.W.; Holland, N.T.; Rothmann, N.; Zahm, S.H.; Tarone, R.E.; Hill, R.; Vogt, R.F.; Smith, M.T.; Boysen, C.D.; Holmes, F.F.; VanDyck, K.; Blair, A. Increased lymphocyte replicative index following 2,4dichlorophenoxyacetic acid herbicide exposure. *Cancer Causes Control*, 11(4):373-80; 2000.

Florsheim, W. H.; Velcoff, S. M. Some effects of 2,4- dichlorophenoxyacetic acid on thyroid function in the rat: effects on iodine accumulation. *Endocrinology*, 71:1–6; 1962.

Florsheim, W. H.; Velcoff, S.M.; Williams, A. D. Some effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on thyroid function in the rat: effects on peripheral thyroxine. *Endocrinology*, 72:327–333; 1963.

Flügge, C. Micronucleus test of 2,4-D acid in bone marrow cells of the NMRI mouse by oral administration. LPT 24809; 2009a.



Flügge, C. Mutagenicity study of 2,4-D acid in the *Salmonella typhimurium* reverse mutation assay (*in vitro*) - LPT 24810; 2009b.

Fofana, D.; Kobae, H.; Oku, S.; Nishi, J.I.; Miyata, K. Prenatal developmental effects of pure 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) on the rat. *Congenital Anomalies*, 40(4): 287–296, 2000.

Fofana, D.; Kobae, H.; Sameshima, K.; Miyata, K. Postnatal survival of rat offspring prenatally exposed to pure 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). *Congenital Anomalies*, 42(1):32-5; 2002.

Foster, P.M. Regulatory Forum opinion piece: New testing paradigms for reproductive and developmental toxicity- the NTP modified one generation study and OECD 443. *Toxicol Pathol*, 42(8):1165-7; 2014.

Freedman, M. Amyotrophic lateral sclerosis and occupational exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Occupational and Environmental Medicine*, 58(9): 609, 2001.

Friedrich, K. Nota técnica. Avaliação dos efeitos tóxicos sobre o sistema reprodutivo, hormonal e câncer para seres humanos após o uso do herbicida 2,4-D, 2014.

Garry, V.F.; Schreinemachers, D.; Harkins, M.E.; Griffith, J. Pesticide applicers, biocides and birth defects in rural Minnesota. *Environmental Health Perspectives*, 104, 394–399; 1996.

Garry, V.F.; Burroughs, B.; Tarone, R.; Kesner, J. S. Herbicides and adjuvants: an evolving view. *Toxicol Ind Health*, v. 15(1-2): 159-167, 1999.

Garry, V.F.; Tarone, R.E.; Kirsch, I.R.; Abdallah, J.M.; Lombardi, D.P.; Long, L.K.; Burroughs, B.L.; Barr, D.B.; Kesner, J.S. Biomarker Correlations of Urinary 2,4-D Levels in Foresters: Genomic Instability and Endocrine Disruption. *Environ Health Perspect*, 109:495–500, 2001.

Gava, M.A. The *Salmonella typhimurium* reverse mutation by ACIDO 2,4-D TECNICO - G.1.1 – 038/98; 1998.

Gazdar, A. F., Oie, H. K., Shackleton, C. H., Chen, T. R., Triche, T. J., Myers, C. E., Chrousos, G. P., Brennan, M. F., Stein, C. A., and LaRocca, R. V. Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses Multiple pathways of steroid biosynthesis. *Cancer Res.* 50, 5488-5496; 1990.

Garabrant, D.H.; Philbert, M.A. Review of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) epidemiology and toxicology. *Crit Rev Toxicol*, 32(4):233-57; 2002.

Griffin, R. J., Godfrey, V. B., Kim, Y. C., and Burka, L. T. Sexdependent differences in the disposition of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in Sprague-Dawley rats, B6C3F1 mice, and Syrian hamsters. *Drug Metabolism and Disposition*, 25:1065–1071; 1997.



Goldey, E.S.; Kehn, L.S.; Rehnberg, G.L.; Crofton, K.M. Effects of developmental hypothyroidism on auditory and motor function in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 135(1):67-76; 1995.

Goldner, W.S.; Sandler, D.P.; Yu, F.; Shostrom, V.; Hoppin, J.A.; Kamel, F.; LeVan, T.D. Hypothyroidism and pesticide use among male private pesticide applicators in the agricultural health study. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 55(10):1171-8, 2013.

Goldstein, N.P.; Jones, P.H.; Brown, J.R. Peripheral neuropathy after exposure to an ester of dichlorophenoxyacetic acid. *JAMA*, 171:1306-1309; 1959.

Gollapudi, B.B.; Kamra; O. P.; Blecher, S. R. A search for a genetic basis for gonosomal univalency in mice. *Cytogenet Cell Genet*, 29(4):241-249; 1981.

González, M.; Soloneski, S.; Reigosa, M.A.; Larramendy, M.L. Genotoxicity of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic and a commercial formulation, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid dimethylamine salt. I. Evaluation of DNA damage and cytogenetic endpoints in Chinese Hamster ovary (CHO) cells. *Toxicology in Vitro* 19:289–297, 2005.

Gorzinski, S.J., Wade, C.E., Morden, D.C., Keyes, D.G., Wolfe, E.L., Dittenber, D.A., Kalnins, R.V., Schuetz, D.J. and Kociba, R.J. Technical grade 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D): results of a 13-week subchronic dietary toxicity study in the CDF Fischer 344 Rat. OCR 559-141A; 1981a.

Gorzinski, S.J., Wade, C.E., Morden, D.C., Keyes, D.G., Dittenber, D.A., Kalnins, R.V., Schuetz, D.J. and Kociba, R.J. Purified 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D): results of a 13-week subchronic dietary toxicity study in the CDF Fischer 344 Rat. OCR 559-141; 1981b.

Graf, U.; Wurgler, F.E. The Somatic white ivory Eye Spot Test Does Not Detect the Same Spectrum of Genotoxic Events as the Wing Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 27:219-226, 1996.

Haddow, J.E.; Palomaki, G.E.; Allan, W.C. *et al.* Maternal thyroid deficiency during pregnancy and subsequent neuropsychological development of the child. *N Engl J Med* 341:549–555; 1999.

Hansen, W. H.; Quaife, M. L.; Habermann, R. T.; Fitzhugh, O. G. Chronic Toxicity of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid in Rats and Dogs. *Toxicology And Applied Pharmacology*, 20: 122-129; 1971.

Hardell, L. Pesticides, soft-tissue sarcoma and non-Hodgkin lymphoma - historical aspects on the precautionary principle in cancer prevention. *Acta Oncologica*, 47: 347-354; 2008.



Harris, S.A.; Solomon, K.R. Percutaneous penetration of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2,4-D dimethylamine salt in human volunteers; 36(3):233-40; 1992.

Harris, S.A.; Villeneuve, P.J.; Crawley, C.D.; Mays, J.E.; Yeary, R.A.; Hurto, K.A.; Meeker, J.D. National study of exposure to pesticides among professional applicators: an investigation based on urinary biomarkers. J Agric Food Chem, 58(18):10253-61, 2010.

Hecker, M.; Giesy, J.P.; Timm, G. Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production. Report by ENTRIX, Inc., prepared for U.S.Environmental Protection Agency, 2008. Disponível em:
<http://www.epa.gov/endo/pubs/h295r_validation_study_interim_report.pdf>.

Henriques, J.A.P. Estudo para determinar a habilidade do produto 2,4-D Amina Técnico Defesa para induzir mutação em quatro linhagens de *Salmonella typhimurium* - PN125; 1993.

Henriques, J.A.P. Estudo para determinar a habilidade do produto 2,4-D Ácido para induzir mutação em quatro linhagens de *Salmonella typhimurium* - PN130; 1994.

Higley, E.B.; Newsted, J.L.; Zhang, X.; Giesy, J.P.; Hecker, M. Assessment of chemical effects on aromatase activity using the H295R cell line. Environmental Science Pollution Research, 17(5):1137-48; 2010.

Holcombe, G.W.; Benoit, D.A.; Hammermeister, D.E.; Leonard, E.N.; Johnson, R.D. Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 28:287-297, 1995.

Hoberman, A.M. Developmental toxicity (Embryo-fetal toxicity and teratogenic potential) study of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D Acid) administered orally via stomach tube to New Zealand white rabbits. 320-003; 1990.

Holland, N.T.; Duramad, P.; Rothman, N.; Figgs, L.W.; Blair, A.; Hubbard, A.; Smith, M.T. Micronucleus frequency and proliferation in human lymphocytes after exposure to herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid *in vitro* and *in vivo*. Mutation Research 521:161-178, 2002.

Holt, E.; Weber, R.; Stevenson, G.; Gaus, C. Polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans (PCDD/Fs) impurities in pesticides: a neglected source of contemporary relevance. Environ Sci Technol., 44(14):5409-15; 2010.

Holt, E.; Weber, R.; Stevenson, G.; Gaus, C. Formation of dioxins during exposure of pesticide formulations to sunlight. Chemosphere, 88(3):364-70; 2012.

Hosomi, R.Z. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test for 2,4-D TECHNICAL [REDACTED] RL5421-06MN-B; 2006.



Hou, L.; Andreotti, G.; Baccarelli A.A.; Savage, S.; Hoppin, J.A.; Sandler, D.P.; Barker, J.; Zhu, Z.; Hoxha, M.; Dioni, L.; Zhang, X.; Koutros, S.; Freeman, L.E.B.; Alavanja, M.C. Lifetime pesticide use and telomere shortening among male pesticide applicators in the Agricultural Health Study. *Environmental Health Perspectives* 121:919–924, 2013.

Hurst, M. R.; Sheahan, D. A. The potential for oestrogenic effects of pesticides in headwater streams in the UK. *The Science of the Total Environment*, 301:87–96; 2003.

International Agency For Research On Cancer (IARC). IARC monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs, Volumes 1 to 42, Supplement 7, chlorophenoxy herbicides, 1987.

International Agency for Research on Cancer (IARC). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Volume 69. Polychlorinated Dibenzo- para-dioxins and Polychlorinated Dibenzofurans. Lyon/França, 1997.

International Agency for Research on Cancer (IARC). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Volume 71. Re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide. Polychlorophenols or their sodium salts (combined exposures). Lyon/França, 1999.

International Agency for Research on Cancer (IARC). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Volume 100. A review of human carcinogens. Part F: Chemical agents and related occupations. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*para*-dioxin, 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran, and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl. Lyon/França, 2012.

International Agency for Research on Cancer (IARC). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Volume 113. 2015. Monografia ainda não publicada, mas referente a encontro realizado em junho de 2015, do qual a Anvisa participou.

Ibama. Os 10 ingredientes ativos mais vendidos, 2013. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/areas-tematicas-qa/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos/pagina-3>>.

Ibrahim, M.A.; Bond, G.G.; Burke, T.A.; Cole, P.; Dost, F.N.; Enterline, P.E.; Gough, M.; Greenberg, R.S.; Halperin, W.E.; McConnell, E. *et al.* Weight of the evidence on the human carcinogenicity of 2,4-D. *Environ Health Perspect*, 96:213-22; 1991.

Ingre, C.; Roos, P. M.; Piehl, F.; Kamel, F.; Fang, F. Risk factors for amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical Epidemiology*, 7: 181–193; 2015.

International Programme on Chemical Safety (IPCS). World Health Organization. Environmental Health Criteria 29: 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D). Geneva, 1984.



Ivett, J.L. Mutagenicity test on 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid *in vivo* mouse micronucleus assay. 10979-0-455; 1990.

Jeffries, T.K.; Yano, B.L.; Ormand, J.R.; Battjes, J.E. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid: Chronic toxicity/oncogenicity study in fischer 344 rats – final report. K-002372-064; 1995.

Jenssen, D.; Renberg, L. Distribution and cytogenetic test of 2,4-D and 2,4,5-T phenoxyacetic acids in mouse blood tissues. Chem. Biol. Interactions, 14: 291-299; 1976.

Jiang, H.; Yan, S.; Donglan, W.; Xing, S.; Mingtao, F.; Xianjin, L. Dissipation and residues of 2,4-D dimethylammonium in wheat and soil. Bull Environ Contam Toxicol, 85(2):157-9; 2010.

Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (JMPR). Pesticide residues in food - 1996. 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. FAO Plant Production and Protection Paper, 140, 1997.

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. FAO Plant Production and Protection Paper, 148, 1999.

Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (JMPR). Pesticide residues in food - 2001. 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. FAO Plant Production and Protection Paper, 167, 2001.

Jungbauer, A.; Beck, V. Yeast reporter system for rapid determination of estrogenic activity. Journal of Chromatography B, 77:167–178; 2002.

Kachuri, L.; Demers, P.A.; Blair, A.; Spinelli, J.J.; Pahwa, M.; McLaughlin, J.R.; Pahwa, P.; Dosman, J.A.; Harris, S.A. Multiple pesticide exposures and the risk of multiple myeloma in Canadian men. Int J Cancer, 133(8):1846-58; 2013.

Kale, P.G.; Petty Jr., B.T., Walker, S.; Ford, J.B; Dehkordi, N.; Tarasia, S.;Tasie, B.O.; Kale, R; Sohni, Y.R.Mutagenicity Testing of Nine Herbicides and Pesticides Currently Used in Agriculture. Environmental and Molecular Mutagenesis: 25: 148-153, 1995.

Kamel, F.; Umbach, D.M.; Bedlack, R.S.; Richards, M.; Watson, M.; Alavanja, M.C.R.; Blair, A.; Hoppin, J.A.; Schmidt, S.; Sandler, D.P. Pesticide Exposure and Amyotrophic Lateral Sclerosis. Neurotoxicology, 33(3): 457–462; 2012.

Kang, H.; Cha, E.S.; Choi, G.J.; Lee, W.J. Amyotrophic Lateral Sclerosis and Agricultural Environments: A Systematic Review. Journal of Korean Medical Science, 29: 1610-1617; 2014.



Kappas, A. On the mutagenic and recombinogenic activity of certain herbicides in *Salmonella typhimurium* and in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 204:615–621, 1988. Apud Madrigal-Bujaidar, E.; Hernández-Ceruelos, A.; Chamorro, G. Induction of sister chromatid exchanges by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in somatic and germ cells of mice exposed in vivo. *Food Chem Toxicol.*, 39(9):941-6; 2001.

Kester, M.H.; Bulduk, S.; Tibboel, D.; Meinl, W.; Glatt, H.; Falany, C.N.; Coughtrie, M.W.; Bergman, A.; Safe, S.H.; Kuiper, G.G.; Schuur, A.G.; Brouwer, A.; Visser, T.J. Potent inhibition of estrogen sulfotransferase by hydroxylated PCB metabolites: a novel pathway explaining the estrogenic activity of PCBs. *Endocrinology*, 141(5):1897-900; 2000.

Kim, H.J.; Park, Y.I.; Dong, MS. Effects of 2,4-D and DCP on the DHT induced androgenic action in human prostate cancer cells. *Toxicological Sciences*, 88:52–59; 2005.

Knopp, D. Assessment of exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in the chemical industry: results of five year biological monitoring study. *Occup Environ Med.*, 51(3):152-9; 1994.

Kogevinas, M.; Saracci, R.; Winkelmann, R.; Johnson, E.S.; Bertazzi, P.A.; Bueno de Mesquita, B.H.; Kauppinen, T.; Littorin, M.; Lynge, E.; Neuberger, M.; Pearce, N. Cancer incidence and mortality in women occupationally exposed to chlorophenoxy herbicides, chlorophenols, and dioxins. *Cancer Causes and Control*, 4(6):547-53;1993.

Kojima, H.; Katsura, E.; Takeuchi, S.; Niiyama, K.; Kobayashi, K. Screening for estrogen and androgen receptor activities in 200 pesticides by in vitro reporter gene assays using Chinese hamster ovary cells. *Environmental Health Perspectives*, 112:524–531; 2004.

Konjuh, C.; García, G.; López, L.; de Duffard, A.M.; Brusco, A.; Duffard, R. Neonatal hypomyelination by the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Chemical and ultrastructural studies in rats. Toxicological Sciences*, 104(2):332-40; 2008.

Korte, C.; Jalal, S.M. 2,4-D-induced clastogenicity and elevated rates of sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes. *The Journal of Heredity*, 73: 224-226; 1982.

Kramer, V.; Blewett, C.; Gersich, M. Comments on “Evaluation of estrogenic activities of aquatic herbicides and surfactants using a rainbow trout vitellogenin assay”. Letter to the editor. *Toxicological Sciences*, 104(1): 228–230; 2008.

Larsson, M.; Pettersson, T.; Carlström, A. Thyroid hormone binding in serum of 15 vertebrate species: isolation of thyroxine-binding globulin and prealbumin analogs. *General and Comparative Endocrinology*, 58(3):360-75; 1985.

Laville, N.; Balaguer, P.; Brion, F; Hinfrey, N.; Casellas, C.; Porcher, J.M.; Ait-Aïssa, S. Modulation of aromatase activity and mRNA by various selected pesticides in the human choriocarcinoma JEG-3 cell line. *Toxicology*, 228(1):98-108; 2006.



Lawlor, T.E.; Valentine, D.C. Mutagenic test on 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in the salmonella/mammalian-microsome reverse mutation assay (Ames Test) - 10979-0-401; 1990.

LeBaron, M. J.; Kan, H. L. Evaluation of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-d) in an *in vitro* estrogen receptor transcriptional activation assay in human cell line HELA-9903. Laboratory Project Study ID 111043; 2011a.

LeBaron, M. J.; Kan, H. L.; Perala, A. W. Evaluation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in the *in vitro* steroidogenesis assay. Laboratory Project Study ID 111038, 2011b.

LeBaron, M. J.; Schisler, M. R.; Visconti, N. R. Evaluation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-d) in an *in vitro* androgen receptor binding assay. Laboratory Project Study ID 111111; 2011c.

LeBaron, M. J.; Schisler, M. R.; Visconti, N. R. Evaluation of 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-d) in an *in vitro* estrogen receptor binding assay. Laboratory Project Study ID 111121; 2011d.

Lemaire, G.; Mnif, W.; Mauvais, P.; Balaguer, P.; Rahmani, R. Activation of alpha- and beta-estrogen receptors by persistent pesticides in reporter cell lines. Life Sciences, 79(12):1160-9; 2006.

Lewandowski, T.A.; Seeley, M.R.; Beck, B.D. Interspecies differences in susceptibility to perturbation of thyroid homeostasis: a case study with perchlorate. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 39(3):348-62; 2004.

Lerda, D.; Rizzi R. Study of reproductive function in persons occupationally exposed to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). Mutation Research, 262:47-50, 1991.

Liang, J. C.; Sherron, D. A; Johnston, D. Lack of correlation between mutagen-induced chromosomal univalency and aneuploidy in mouse spermatocytes. Mutation Research, 163:285-297; 1986.

Lin, N.; Garry, V. F. In vitro studies of cellular and molecular developmental toxicity of adjuvants, herbicides, and fungicides commonly used in Red River Valley, Minnesota. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues, v. 60 (6):423-439, 2000.

Lindquist, N.G.; Ullberg, S. Distribution of the herbicides 2,4,5-T and 2,4-D in pregnant mice. Accumulation in the yolk sac. Experientia, 27: 1439-1441, 1971.

Linnainmaa, K. Sister Chromatid Exchanges Among Workers Occupationally Exposed to Penoxy Acid Herbicides 2,4-D and MCPA. Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis, 3:269-279; 1983.



Linnainmaa, K. Induction of sister chromatid exchanges by the peroxisome proliferators 2,4-D, MCPA, and clofibrate *in vivo* and *in vitro*. *Carcinogenesis*, 5(6): 703-707; 1984.

Liu, R.C.; Hahn, C.; Hurtt, M.E. The direct effect of hepatic peroxisome proliferators on rat Leydig cell function *in vitro*. *Fundam Appl Toxicol.*, 30(1):102-8; 1996.

Liu, W.; Li, H.; Tao, F.; Li, S.; Tian, Z.; Xie, H. Formation and contamination of PCDD/Fs, PCBs, PeCBz, HxCBz and polychlorophenols in the production of 2,4-D products. *Chemosphere*, 92(3):304-8; 2013.

Loomis, D.; Guyton, K.; Grosse, Y.; El Ghissasi, F.; Bouvard, V.; Benbrahim-Tallaa, L.; Guha, N.; Mattock, H.; Straif, K. International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group, IARC, Lyon, France. Carcinogenicity of lindane, DDT, and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Lancet Oncol*, 2015.

Madrigal-Bujaidar, E.; Hernández-Ceruelos, A.; Chamorro, G. Induction of sister chromatid exchanges by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in somatic and germ cells of mice exposed *in vivo*. *Food Chem Toxicol.*, 39(9):941-6; 2001.

Maier, T.; Güell, M.; Serrano, L. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Letters*, 583: 3966–3973; 2009.

Maire, M.A.; Rast, C.; Landkocz, Y.; Vasseur, P. 2,4 Dichlorophenoxyacetic acid: effects on Syrian hamster embryo (SHE) cell transformation, c-Myc expression, DNA damage and apoptosis. *Mutat Res.*, 631(2):124-36; 2007.

Magnusson, J.; Ramel, C.; Eriksson, A. Mutagenic effects of chlorinated phenoxyacetic acids in *Drosophila melanogaster*. *Hereditas*, 87:121-123, 1977.

Marino, T. A.; Coady, K. K.; Sosinski, L. K.; Thomas, J. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid: a fish short-term reproduction assay using the fathead minnow, *Pimephales promelas*. Laboratory Project Study ID 101026, 2010.

Marty, M.S.; Johnson, K.A.; Carney, E.W. Effect of feed restriction on Hershberger and pubertal male assay endpoints. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 68(4):363-74; 2003.

Marty, M.S.; Zablony, C.L.; Andrus, A.K.; Boverhof, D.R.; Bus, J.S.; Perala, A.W.; Saghir, S.A. 2,4-D: An F1-Extended one generation dietary toxicity study in CRL:CD(SD) Rats. 081104; 2010.

Marty, M.S.; Neal, B.H.; Zablony, C.L.; Yano, B.L.; Andrus, A.K.; Woolhiser, M.R.; Boverhof, D.R.; Saghir, S.A.; Perala, A.W.; Passage, J.K.; Lawson, M.A.; Bus, J.S.; Lamb, J.C.; Hammond, L. An F1-Extended One-Generation Reproductive Toxicity Study in Crl:CD(SD) Rats With 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid. *Toxicological Sciences*, 136(2): 527-547, 2013.



Masunaga, S.; Takasuga, T.; Nakanishi, J. Dioxin and dioxin-like PCB impurities in some Japanese agrochemical formulations. *Chemosphere*, 44:873-885; 2001.

Mattsson, J.L.; McGuirk, R.J.; Yano, B.L. 2,4-Dichlorophenoxyacetic (2,4-D): Acute neurotoxicity study in Fischer 344 rats. K-002372-066; 1994a.

Mattsson, J.L.; Jeffries, T.K.; Yano, B.L. 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid: Chronic neurotoxicity study in Fischer 344 rats. K-002372-064N; 1994b.

Mazhar, F.M.; Moawad, K.M.; El-Dakdoky, M.H.; Amer, A.S. Fetotoxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in rats and the protective role of vitamin E. *Toxicology and Industrial Health*, 30(5) 480–488; 2014.

McDermott, M.T.; Ridgway, E. C. Subclinical hypothyroidism is mild thyroid failure and should be treated. *J Clin Endocrinol Metab*, 86(10):4585-90; 2001.

McGuire, V.; Longstreth, W.T. Jr.; Nelson, L.M.; Koepsell, T.D.; Checkoway, H.; Morgan, M.S.; van Belle, G. Occupational exposures and amyotrophic lateral sclerosis. A population-based case-control study. *American Journal of Epidemiology*, 145(12):1076-88; 1997.

Mehmood, Z.; Williamson, M.P.; Kelly, D.E.; Kelly, S.L. Human cytochrome P450 3A4 is involved in the biotransformation of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2(4):397-401; 1996.

Miller, W. L.; Auchus, R. J. The Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology of Human Steroidogenesis and Its Disorders. *Endocrine Reviews*, 32(1):81–151; 2011.

Mills, P.K.; Yang, R. Breast Cancer Risk in Hispanic Agricultural Workers in California. *International Journal of Occupational and Environmental Health*, 11(2):123-131; 2005.

Moody, R.P.; Franklin, C.A.; Ritter, L.; Maibach, H.I. Dermal absorption of the phenoxy herbicides 2,4-D, 2,4-D amine, 2,4-D isooctyl, and 2,4,5-T in rabbits, rats, rhesus monkeys, and humans: a cross-species comparison. *Toxicology and Environmental Health*, 29:237-45; 1990.

Morgan, M.K.; Sheldon, L.S.; Thomas, K.W.; Egeghy, P.P.; Croghan, C.W.; Jones, P.A.; Chuang, J.C.; Wilson, N.K. Adult and children's exposure to 2,4-D from multiple sources and pathways. *J Expo Sci Environ Epidemiol*, 18(5):486-94; 2008.

Munro, I. C.; Caro, G. L.; Orr, J. C.; Sund, K. G.; Wilson, R. M.; Kennepohl, E.; Lynch, B. S.; Jablinske, M.; Lee, N. L. A comprehensive, integrated review and evaluation of the scientific evidence relating to the safety of the herbicide 2,4-D. *Journal of the American College of Toxicology*, 11:559–647; 1992.



Mustonen, R.; Kangas, J.; Vuojolahti, P.; Linnainmaa, K. Effects of phenoxyacetic acids on the induction of chromosome aberrations *in vitro* and *in vivo*. *Mutagenesis*, v.1, n.4, p. 241-245; 1986.

Nair, R.S.; Paulmurugan, R.; Singh, A.J.A.R. Simple Radioactive Assay for the Estimation of DNA Breaks. *Journal of Applied Toxicology*, v. 22:19-23, 2002.

Neal, B.; Williams, A.; Lamb, J.C.; Freeman, E.; Staveley, J.; Marty, M.S.; Coady, K.K.; Bus, J. EDSP Tier 1 Screening Results: Weight-of-Evidence Evaluation of Potential Endocrine Pathway Interactions for 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D); 2013.

Neal, B.; Bus, J; Marty, M.S.; Williams, A.; Coady, K.K.; Lamb, J.C. Evaluation of Functional Equivalence of Other Scientifically Relevant Information (OSRI) to EPA's Tier 1 Screening Battery for Evaluating the Potential Estrogen, Androgen or Thyroid (EAT) Effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). *TFII12APR10*; 2012.

Neto, M.L.F.; Sarcinelli, P.N. Agrotóxicos em água para consumo humano: uma abordagem de avaliação de risco e contribuição ao processo de atualização da legislação brasileira. *Eng Sanit Ambient*, 14(1): 69-78; 2009.

New Zealand Pesticides Board. Report of the Pesticides Board Expert Panel on 2,4-D, 2000.

Nielsen E., *et al.* Toxicological Risk Assessment of Chemicals: A Practical Guide. Ed. Informa Healthcare, 2008.

Nishihara T.; Nishikawa, J.; Kanayama, T.; Dakeyama, F.; Saito, K.; Imagawa, M. Takatori, S.; Kitagawa, Y.; Hori, S.; Utsumi, H. Estrogenic activities of 517 chemicals by yeast two-hybrid assay. *Journal of Health Sciences*, 46(4):282–298; 2000.

NTIS (National Technical Information Service). Evaluation of Cacinogenic, Teratogenic and Mutagenic Activities of Selected Pesticides and Industrial Chemichals, Vol. 1, Carcinogenic Study, Washington DC, US Department of Commerce.

Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). OECD Guideline for the Testing of Chemicals 229: Fish Short Term Reproduction Assay, 2009.

Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). OECD Guideline for the Testing of Chemicals 231: The Amphibian Metamorphosis Assay. 2009.

Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD). OECD Guideline for the testing of chemicals 443: Extended One-Generation Reproductive Toxicity Study, 2011.

Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD). New scoping document on *in vitro* and *ex vivo* assays for the identification of modulators of thyroid hormone signalling. Series on Testing and Assessment No. 207. ENV/JM/MONO23. Paris, 148 p.; 2014. Disponível em:



http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mon_o%282014%2923&doclanguage=en.

Orton, F.; Lutz, I.; Kloas, W.; Routledge, E.J. Endocrine disrupting effects of herbicides and pentachlorophenol: *in vitro* and *in vivo* evidence. *Environmental Science & Technology*, 43:2144–2150; 2009.

Oruc, E.O.; Sevgiler, Y.; Uner, N. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 137:43–51; 2004.

Pahwa, M.; Beane Freeman, L.; Spinelli, J.J.; Blair, A.; Pahwa, P.; Dosman, J.A.; McLaughlin, J.R.; Demers, P.A.; Hoar Zahm, S.; Cantor, K.P.; Weisenburger, D.D.; Harris, S.A. North American Pooled Project (NAPP): Pooled analyses of case-control studies of pesticides and agricultural exposures, lymphohematopoietic cancers and sarcoma. *Occup Environ Med*, 71 Suppl 1:A116; 2014.

Pavlica, M.; Papes, D.; Nagy, B. 2,4- Dichlorophenoxyacetic acid causes chromatin and chromosome abnormalities in plant cells, mutation in cultured mammalian cells. *Mutation Research*, 263:77-81, 1991.

Perina, V.C.F. A micronucleus study in mice for ÁCIDO 2,4-D TÉCNICO. G.1.2-44/98; 1998.

Pest Management Regulatory Agency (PMRA) - Health Canada. Proposed Acceptability for Continuing Registration. PACR2007-06. Re-evaluation of the Agricultural, Forestry, Aquatic and Industrial Site Uses of (2,4-Dichlorophenoxy)acetic Acid [2,4-D]), Ottawa/Ontario, 2007.

Pest Management Regulatory Agency (PMRA) - Health Canada. (2,4-Dichlorophenoxy) acetic Acid [2,4-D]. Re-evaluation Decision. RVD2008-11; Ottawa/Ontario, 2008.

Pest Management Regulatory Agency (PMRA) - Health Canada. Re-evaluation Update 2,4-D. Re-evaluation Note REV2013-02. Ottawa, Ontario; 2013a.

Pest Management Regulatory Agency (PMRA) - Health Canada. Special Review Initiation of 23 Active Ingredients. Re-evaluation Note REV2013-06. Ottawa, Ontario; 2013b.

Petit, F.; Le Goff, P.; Cravedi, J.P.; Valotaire, Y.; Pakdel, F. Two complimentary bioassays for screening the estrogenic potency of xenobiotics: recombinant yeast for trout estrogen receptor and trout hepatocyte cultures. *Journal of Molecular Endocrinology*, 19:321–335; 1997.

Pilinskaya. Cytogenetic effects of the herbicide 2,4-D on human and animal chromosomes. *Tsitol Genet*, 8:202-206; 1974.



Pires, M.V. Desenvolvimento e emprego de um banco de dados para a condução de estudos de avaliação do risco da exposição crônica a resíduos de agrotóxicos na dieta. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brasil, 2013. 86 f.

Pont, A.R.; Charron, A.R.; Brand, R.M. Active ingredients in sunscreens act as topical penetration enhancers for the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Toxicol Appl Pharmacol*, 195(3):348-54; 2004.

Pont, A.R.; Charron, A.R.; Wilson, R.M.; Brand, R.M. Effects of active sunscreen ingredient combinations on the topical penetration of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Toxicol Ind Health*. 2003 Feb;19(1):1-8.

Raldua, D.; Babin, P.J. Simple, rapid zebrafish larva bioassay for assessing the potential of chemical pollutants and drugs to disrupt thyroid gland function. *Environmental Science & Technology*, 43:6844–6850, 2009.

Reif, D.M.; Martin, M.T.; Tan, S.W.; Houck, K.A.; Judson, R.S.; Richard, A.M.; Knudsen, T.B.; Dix, D.J.; Kavloc, R.J. Endocrine profiling and prioritization of environmental chemicals using ToxCast data. *Environ Health Perspect*, 118(12):1714-20; 2010.

Reif, D.M.; Sypa, M.; Lock, E.F.; Wright, F.A.; Wilson, A.; Cathey, T.; Judson, R.R.; Rusyn, I. ToxPi GUI: an interactive visualization tool for transparent integration of data from diverse sources of evidence. *Bioinformatics*. 29(3):402-3; 2013.

Rodwell, D.E. A Teratology Study in Fischer Rats with 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid. WIL-81135; 1983.

Rodwell, D.E. A Dietary Two-Generation Reproduction Study in Fischer 344 Rats with 2, 4- Dichlorophenoxyacetic Acid – Final Report. WIL-81137; 1985.

Rodwell, D.E. Addendum to the final report. A Dietary Two-Generation Reproduction Study in Fischer 344 Rats with 2, 4- Dichlorophenoxyacetic Acid. WIL-81137; 1986.

Ross, J.H.; Driver, J.H.; Harris, S.A.; Maibach, H.I. Dermal absorption of 2,4-D: a review of species differences. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 41:82–91; 2005.

Rosso, S.B., Di Paolo, O. A.; Evangelista de Duffard, A.M. ; Duffard, R. Effects of 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid on central nervous system of developmental rats. Associated changes in ganglioside pattern. *Brain Research*. 769: 163–167, 1997.

Rosso, S.B.; Gonzalez, M.; Bagatolli, L.A.; Duffard, R.O.; Fidelio, G.D. Evidence of a strong interaction of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicide with human serum albumin. *Life Sciences*, 63:2343–2351; 1998.

Rosso, S.B.; García, G.B.; Madariaga, M.J.; Evangelista de Duffard, A.M.; Duffard, R.O. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid in developing rats alters behaviour, myelination and regions brain gangliosides pattern. *Neurotoxicology*, 21(1-2):155-63; 2000.



Saghir, S.A.; Marty, M.S.; Zablony, C.L.; Passage, J.K.; Perala, A.W.; Neal, B.H.; Hammond, L.; Bus, J.S. Life-stage-, sex-, and dose-dependent dietary toxicokinetics and relationship to toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in rats: implications for toxicity test dose selection, design, and interpretation. *Toxicological Sciences*, 136(2):294-307; 2013.

Sandal, S.; Yilmaz, B. Endosulfan and 2,4-D on Human Peripheral Lymphocytes Cultured from Smokers and Nonsmokers. *Mutation Research*, v. 444:227-234, 1999.

Sanderson, J. T. The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals. *Toxicological Sciences*, 94(1): 3–21; 2006.

Santilio, A.; Stefanelli, P.; Dommarco, R. Fast determination of phenoxy acid herbicides in carrots and apples using liquid chromatography coupled triple quadrupole mass spectrometry . *J Environ Sci Health B*, 44(6):584-90; 2009.

Santilio, A.; Stefanelli, P.; Girolimetti, S.; Dommarco, R. Determination of acidic herbicides in cereals by QuEChERS extraction and LC/MS/MS. *J Environ Sci Health B*, 46(6):535-43; 2011.

Santilio, A.; Girolimetti, S.; Barbini, D.A. Estimation of the validation parameters for a fast analysis of herbicide residues by LC-MS/MS. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.*, 31(5):845-51; 2014.

Sauerhoff, M.W.; Braun, W.H.; Blau, G.E.; Gehring, P.J. The fate of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) following oral administration to man. *Toxicology*, 8(1):3-11; 1977.

Schinasi, L.; Leon, M.E. Non-Hodgkin Lymphoma and Occupational Exposure to Agricultural Pesticide Chemical Groups and Active Ingredients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Environ Res Public Health*, 11(4):4449-527; 2014.

Schisler, M.R. Evaluation of 2,4- Dichlorophenoxyacetic acid in the chinese hamster ovary cell/hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl transferase (CHO/HGPRT) forward mutation assay- 131053; 2013.

Schop, R.N.; Hardy, M.H.; Goldberg, M.T. Comparison of the Activity of Topically Applied Pesticides and the Herbicide 2,4-D in Two Short-Term in Vivo Assays of Genotoxicity in the Mouse. *Fundamental and Applied Toxicology*, v. 15:666-675, 1990.

Schreinemachers, D.M. Birth malformations and other adverse perinatal outcomes in four US wheat producing states. *Environmental Health Perspectives*, 111: 1259–1264; 2003.

Schulze, G.E. 21-Day Dermal Irritation and Dermal Toxicity Study in Rabbits with 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid. HLA study n° 2184-109; 1990a.



Schulze, G.E. Subchronic toxicity study in dogs with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. HLA 2184-115; 1990b.

Schulze, G.E. Subchronic toxicity study in rats with 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid. HLA 2184-116; 1991a.

Schulze, G.E. Subchronic toxicity study in mice with 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid. HLA 2184-117, 1991b.

Schwetz, B.A.; Sparschu, G.L.; Gehring, P.J. The effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and esters of 2,4-D on rat embryonal, foetal and neonatal growth and development. Food Cosmet Toxicol, 9(6):801-17; 1971.

Serota, D. G. Subchronic Toxicity Study in Rats-2,4- Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) Final Report. 2184-102; 1983a.

Serota, D. G. Subchronic Toxicity Study in Mice-2,4- Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) Final Report. 2184-100; 1983b.

Serota, D. G. Combined toxicity and oncogenicity study in rats 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid. HLA 2184-103; 1986.

Serota, D. G. Oncogenicity study in mice with 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). HLA 2184-101; 1987.

Sharlin, D.S.; Gilbert, M.E.; Taylor, M.A.; Ferguson, D.C.; Zoeller, R.T. The nature of the compensatory response to low thyroid hormone in the developing brain. J Neuroendocrinol, 22(3):153-65; 2010.

Shin, E.H.; Choi, J.H.; Abd El-Aty, A.M.; Khay, S.; Kim, S.J.; Im, M.H.; Kwon, C.H.; Shim, J.H. Simultaneous determination of three acidic herbicide residues in food crops using HPLC and confirmation via LC-MS/MS. Biomed Chromatogr, 25(1-2):124-35; 2011.

Silveira, A.V.T. da; Antoniosi Filho, N.R. Proposta de alternativas menos tóxicas para ingredientes ativos de agrotóxicos no mercado brasileiro. Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente, Curitiba, v. 23, 2013.

Simpson, E.R.; Mahendroo, M.S.; Means, G.D.; Kilgore, M.W.; Hinshelwood, M.M.; Graham-Lorence, S.; Amarnah, B.; Ito, Y.; Fisher, C.R.; Michael, M.D.; Mendelson, C.R.; Bulun, S.E. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. Endocrine Reviews, 15(3):342-55; 1994.

Singer, R.; Moses, M.; Valciukas, J.; Lilis, R.; Selikoff, T.J. Nerve conduction velocity studies of workers employed in the manufacture of phenoxy herbicides. Environmental Research, 29:297-311;1982.

Singh, S.; Yadav, S.; Sharma, N.; Malhotra, P.; Bambery, P. Fatal 2,4-D (ethyl ester) ingestion. The Journal of the Association of Physicians of India, 51:609-10, 2003.



Soloneski, S.; González, N.V.; Reigosa, M.A.; Larramendy, M.L. Herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-induced cytogenetic damage in human lymphocytes *in vitro* in presence of erythrocytes. *Cell Biology International*, v. 31:1316-1322, 2007.

Sorensen, K. C.; Stucki, J. W.; Warner, R. E.; Wagner, E. D.; Plewa, M. J. Modulation of the Genotoxicity of Pesticides Reacted with Redox-Modified Smectite Clay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 46:174-181, 2005.

Soto, A. M.; Sonnenschein, C.; Chung, K. L.; Fernandez, M. F.; Olea, N.; Serrano, F. O. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: An update on estrogenic environmental pollutants. *Environmental Health Perspectives*, 103(S7), 113–122; 1995.

Spadotto, C.A. Abordagem interdisciplinar na avaliação ambiental de agrotóxicos. *Revista Núcleo de Pesquisa Interdisciplinas*, São Manuel, 2006 (disponível em <http://www.fmr.edu.br/npi/003.pdf>).

Spiteri, I.D.; Guillette, L.J.; Crain, D.A. The functional and structural observations of the neonatal reproductive system of alligators exposed *in ovo* to atrazine, 2,4-D, or estradiol. *Toxicology and Industrial Health*, 15:181–186, 1999.

Swedish Chemicals Agency. Current status of the active ingredient 2,4-D in Sweden [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por correio eletrônico institucional em 22 julho 2015.

Stoker, T.; Kaydos, E.; Jeffay, S.; Cooper, R. Effect of 2,4-D exposure on pubertal development and thyroid function in the male Wistar rat. *Biology of Reproduction*, 77:75; 2007.

Stott, W.; Johnson, K.; Gilbert, K. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid: Dietary oncogenicity study in B6C3F1 Mice – two year Final Report. K-002372-063F; 1995a.

Stott, W.T.; Johnson, K.A.; Gilbert, K.S.; Ormand, J.R.; Battjes, J.E. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid: Dietary oncogenicity study in male B6C3F1 Mice – two year Final Report. K-002372-063M; 1995b.

Stürtz, N.; Bongiovanni, B.; Rassetto, M.; Ferri, A.; Duffard, A.M.; Duffard, R. Detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in rat milk of dams exposed during lactation and milk analysis of their major components. *Food Chem Toxicol*, 44(1):8-16; 2006.

Sun, H.; Si, C.; Bian, Q.; Chen, X.; Chen, L.; Wang, X. Developing *in vitro* reporter gene assays to assess the hormone receptor activities of chemicals frequently detected in drinking water. *Journal of Applied Toxicology*, 32(8):635-41; 2012.

Swan, S.H.; Kruse, R.L.; Liu, F.; Barr, D.B.; Drobnis, E.Z.; Redmon, J.B.; Wang, C.; Brazil, C.; Overstreet, J.W. Semen quality in relation to biomarkers of pesticide exposure. *Environmental Health Perspectives*, 111(12):1478-84; 2003.



Tayeb, W.; Nakbi, A.; Trabelsi, M.; Miled, A.; Hammami, M.. Biochemical and histological evaluation of kidney damage after sub-acute exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetic herbicide in rats: involvement of oxidative stress. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 22(9): 696–704; 2012.

The Office of Chemical Safety. Department of Health. Australian Government. ADI list. Acceptable Daily Intakes for Agricultural and Veterinary Chemicals. Australia, 2015.

Thybaud, V.; MacGregor, J.T.; Müller, L.; Crebelli, R.; Dearfield, K.; Douglas, D.; Farmer, P.B.; Gocke, E.; Hayashi, M.; Lovell, D.P.; Werner, K.L.; Marzin, D.; Moore, M.; Nohmi, T.; Phillips, D.H. e Benthem, J.V. *Mutation Research*, 723:121-128; 2011.

Timchalk, C.; Drizga, M.D.; Brzak, K.A. 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid: Tissue Distribution and Metabolism of ¹⁴C-Labeled 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid in Fischer 344 Rats. K-2372-(47); 1990.

Timchalk, C. Comparative inter-species pharmacokinetics of phenoxyacetic acid herbicides and related organic acids. evidence that the dog is not a relevant species for evaluation of human health risk. *Toxicology*, 200(1): 1-19; 2004.

Todd, R.L. A case of 2-4D intoxication. *Journal Iowa State Medical Society*. 52:663-4; 1962.

Tripathy, N.K.; Routray, P.K.; Sahu, G.P.; Kumar, A.A. Genotoxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid tested in somatic and germ-line cells of *Drosophila*. *Mutation Research*, 319: 237-242; 1993.

United States Department of Agriculture (USDA). Pesticide Data Program's (PDP) 19th Annual Summary for calendar year 2009; 2011. Disponível em: <<http://www.ams.usda.gov/AMSV1.0/PDP>>.

United States Department of Agriculture (USDA). Pesticide Data Program's (PDP) 20th Annual Summary for calendar year 2010; 2012. Disponível em: <<http://www.ams.usda.gov/AMSV1.0/PDP>>.

United States Department of Agriculture (USDA). Pesticide Data Program's (PDP) 21st Annual Summary for calendar year 2011; 2013. Disponível em: <<http://www.ams.usda.gov/AMSV1.0/PDP>>.

United States Department of Agriculture (USDA). Pesticide Data Program's (PDP) 22nd Annual Summary for calendar year 2012; 2014a. Disponível em: <<http://www.ams.usda.gov/AMSV1.0/PDP>>.

United States Department of Agriculture (USDA). Pesticide Data Program's (PDP) 23rd Annual Summary for calendar year 2013; 2014b. Disponível em: <<http://www.ams.usda.gov/AMSV1.0/PDP>>.



United States Environmental Protection Agency (USEPA) and Science Advisory Board. An SAB Report: Assessment Of Potential 2,4-D Carcinogenicity. Review Of The Epidemiological And Other Data On Potential Carcinogenicity Of 2,4-D By The Sab/Sap Joint Committee. EPA-SAB-EHC-94-005, 1994.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.7800 - Immunotoxicity. 1996

United States Environmental Protection Agency (USEPA), "Carcinogenicity peer review (4th) of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), U.S. Environmental Protection Agency Memorandum from Jeff Rowland and Esther Rinde (letter), Office of Pesticide Programs, Health Effects Division," Washington, DC, USA, 1997.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.3800 - Reproduction and Fertility Effects. 1998.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.6300 - Developmental Neurotoxicity Study. 1998

United States Environmental Protection Agency (USEPA). Registration eligibility decision for 2,4-D. EPA 738-R-05-002, 2005.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report, 2007a Disponível em: <http://www.epa.gov/endo/pubs/fish_assay_isr.pdf>.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). Endocrine Disruptor Screening Program Test Guidelines OPPTS 890.1100: Amphibian Metamorphosis (Frog). EPA 740-C-09-002, 2009a.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). Endocrine Disruptor Screening Program Test Guidelines OPPTS 890.1150: Androgen Receptor Binding (Rat Prostate Cytosol. EPA 640-C-09-003, 2009b.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). Endocrine Disruptor Screening Program Test Guidelines OPPTS 890.1200: Aromatase (Human Recombinant). EPA 740-C-09-004, 2009c.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). Endocrine Disruptor Screening Program Test Guidelines OPPTS 890.1250: Estrogen Receptor Binding Assay using Rat Uterine Cytosol (ER-RUC). EPA 740-C-09-005, 2009d.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). Endocrine Disruptor Screening Program Test Guidelines OPPTS 890.1300: Estrogen Receptor Transcriptional Activation (Human Cell Line HeLa-9903). EPA 740-C-09-006, 2009e.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). Endocrine Disruptor Screening Program Test Guidelines OPPTS 890.1350: Fish Short-Term Reproduction Assay. EPA 740-C-09-007, 2009f.



United States Environmental Protection Agency (USEPA). Endocrine Disruptor Screening Program Test Guidelines OPPTS 890.1550: Steroidogenesis (Human Cell Line H295R). EPA 640-C-09-003, 2009g.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). Final List of Initial Pesticide Active Ingredients and Pesticide Inert Ingredients to be Screened Under the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act. EPA-HQ-OPPT-2004-0109; FRL-8399-7. Federal Register/ Vol. 74, No. 71; 2009h. Disponível em: <http://www.epa.gov/endo/pubs/final_list_frn_041509.pdf>.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). EPA's Records Disposition Schedule PEST 361 Scientific Data Reviews HED Records Center – File R188444 (Review of Extended 1-Generation Reproduction Study and Dose-Range-Finding and Pharmacokinetic Titration Studies), 30/11/2010, 108 páginas. Disponível em: <http://www.epa.gov/opp00001/chem_search/cleared_reviews/csr_PC-030001_30-Nov-10_a.pdf>.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). “40 CFR Part 180, [EPA–HQ–OPP–2008–0877; FRL–9344–1]. 2,4-D; Order Denying NRDC’s Petition To Revoke Tolerances,” 77FR23135 (04-18-2012). Order. Federal Register vol. 77, no. 75, pp. 23135-23158, 2012.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). Office of Chemical Safety and Pollution Prevention. DP No. D389455. Memorandum: Human Health Risk Assessment for a Proposed Use of 2,4-D Choline on Herbicide-Tolerant Corn and Soybean; 08/08/2013.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). Memorandum - EDSP Weight of Evidence Conclusions on the Tier 1 Screening Assays for the List 1 Chemicals - 2, 4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D); 29/06/2015.

Van den Berg, K.J.; van Raaij, J.A.; Bragt, P.C.; Notten, W.R. Interactions of halogenated industrial chemicals with transthyretin and effects on thyroid hormone levels in vivo. Archives of Toxicology, 65(1):15-9; 1991.

Van den Berg, M.; Birnbaum, L.S.; Denison, M.; De Vito, M.; Farland, W.; Feeley, M.; Fiedler, H.; Hakansson, H.; Hanberg, A.; Haws, L.; Rose, M.; Safe, S.; Schrenk, D.; Tohyama, C.; Tritscher, A.; Tuomisto, J.; Tysklind, M.; Walker, N.; Peterson, R.E. The 2005 World Health Organization reevaluation of human and Mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. Toxicol Science, 93(2):223-41, 2006.

van der Ven, L.T.; Verhoef, A.; van de Kuil, T.; Slob, W.; Leonards, P.E.; Visser, T.J.; Hamers, T.; Herlin, M.; Håkansson, H.; Olausson, H.; Piersma, A.H.; Vos, J.G. A 28-day oral dose toxicity study enhanced to detect endocrine effects of hexabromocyclododecane in Wistar rats. Toxicol Sci, 94(2):281-92, 2006.



Van Ravenzwaay, B., Hardwick, T. D.; Needham, D.; Pethen, S.; Lappin, G. J. Comparative metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4- D) in rat and dog. *Xenobiotica*, 33:805–821; 2003.

Vdovenko, M.M.; Stepanova, A.S.; Eremin, S.A.; Van Cuong, N.; Uskova, N.A.; Yu Sakharov, I. Quantification of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in oranges and mandarins by chemiluminescent ELISA. *Food Chemistry*, 141(2):865-8; 2013.

Venkov, P.; Topashka-Ancheva, M.; Gerorgieva, M.; Alexieva, V.; Karanov, E. Genotoxic effect of substituted phenoxyacetic acids. *Arch Toxicol* 74: 560–566; 2000.

Vogel, E.; Chandler, J.L.R. Mutagenicity testing of cyclamate and some pesticides in *Drosophila melanogaster*. *Experientia*, 30:621-623;1974.

Vogel, E.W.; Graf, U.; Frei, H.J.; Nivard, M.M. The results of assays in *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens. *IARC Sci Publ.*, 146:427-70; 1999.

von Stackelberg, K. A Systematic Review of Carcinogenic Outcomes and Potential Mechanisms from Exposure to 2,4-D and MCPA in the Environment. *Journal of Toxicology*, 2013:371610; 2013.

Vonier, P. M.; Crain, D.A.; Mclachlan, J. A.; Guillette Jr, L. J.; Arnold, S. F. Interaction of environmental chemicals with the estrogen and progesterone receptors from the oviduct of the American alligator. *Environmental Health Perspectives*, 104:1318–1322; 1996.

Xie, L.; Thrippleton, K.; Irwin, M.A.; Siemering, G.S.; Mekebri, A.; Crane, D.; Berry, K.; Schlenk, D. Evaluation of estrogenic activities of aquatic herbicides and surfactants using an rainbow trout vitellogenin assay. *Toxicol Sci.*, 87(2):391-8; 2005.

Yoder, J.; Watson, M.; Benson, W.W. Lymphocyte chromosome analysis of agricultural workers during extensive occupational exposure to pesticides. *Mutation Research*, 21(6): 335–340, 1973.

Zeljezic, D.; Garaj-Vrhovac, V. Chromosomal aberrations, micronuclei and nuclear buds induced in human lymphocytes by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid pesticide formulation. *Toxicology*, 200(1):39-47; 2004.

Zimmering, S; Mason, J.M.; Valencia, R.; Woodruff, R.C. Chemical mutagenesis testing in *Drosophila*. II. Results of 20 coded compounds tested for the National Toxicology Program. *Environmental Mutagenesis*, 7:87-100, 1985.

Zoeller, R.T. Challenges confronting risk analysis of potential thyroid toxicants. *Risk Anal.*, 23(1):143-62; 2003.

Weisskopf, M.G.; Morozova, N.; O'Reilly, E.J.; McCullough, M.L.; Calle, E.E.; Thun, M.J.; Ascherio, A. Prospective study of chemical exposures and amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 80:558–561; 2009.



Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Gerência Geral de Toxicologia
Coordenação de Produtos Novos e de Baixo Risco

Weselak, M., Arbuckle, T. E.; Wigle, D.T.; Walker, M.C.; Krewski, D. Pre- and post-conception pesticide exposure and the risk of birth defects in an Ontario farm population. *Reproductive Toxicology*, 25(4): 472-480; 2008.

Wiedemann, G.; Jonetz-Mentzel, L.; Panse, R. Establishment of reference ranges for thyrotropin, triiodothyronine, thyroxine and free thyroxine in neonates, infants, children and adolescents. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 31(5):277-88; 1993.

World Health Organization (WHO). *Guidelines for drinking-water quality - 4th ed.* Genebra, Suíça, 2011.