UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA E HEPATOLOGIA

CAMILA PEREIRA BALDIN

# AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO 2,4- D EM AGRICULTORES DO RIO GRANDE DO SUL

Porto Alegre
2024

CAMILA PEREIRA BALDIN

# AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO 2,4- D EM AGRICULTORES DO RIO GRANDE DO SUL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestra em Gastroenterologia e Hepatologia.

Orientador(a): Profª Drª Dvora Joveleviths

Porto Alegre

2024

**CIP - Catalogação na Publicação**

Baldin, Camila Pereira
AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO 2,4- D EM AGRICULTORES DO RIO GRANDE DO SUL Porto Alegre 2024 / Camila Pereira Baldin. -- 2024.
70 f.
Orientadora: Dvora Joveleviths.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia, Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. 2,4-D. 2. toxicidade . 3. pesticidas. 4. saúde. 5. trabalhador . I. Joveleviths, Dvora, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

CAMILA PEREIRA BALDIN

# AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO 2,4- D EM AGRICULTORES DO RIO GRANDE DO SUL

**Dissertação** apresentada ao Programa de Pós-Graduação Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestra em Gastroenterologia e Hepatologia.

BANCA EXAMINADORA

_____

Profª. Drª. Solange Cristina Garcia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

_____

Profª. Drª. Marina Siebert
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

_____

Prof. Dr. Alexandre Simões Dias
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

_____

Prof. Dr. Alexandre Simões Dias
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

*Dedico este trabalho a todos os agricultores.*

*"Todo agricultor faz visitas à sua plantação; da mesma maneira, Deus aduba a vida daqueles que frutificam"*
*Helgir Girodo*

## AGRADECIMENTOS

*Gostaria de agradecer primeiramente à professora Dra. Dvora Joveleviths pela oportunidade de fazer parte do PPG Gastroenterologia e Hepatologia, bem como todo o apoio, aprendizado, incentivo e confiança depositados em mim.*

*Ao PPG de Gastroenterologia e Hepatologia da UFRGS.*

*Ao grupo de pesquisa de Hepatotoxicidade da Prof. Dvora.*

*Agradeço ao Sindicato de Agricultores de Passo Fundo, Marau e Casca, bem como à Feira dos Agricultores Orgânicos do Bom Fim, por terem nos acolhido e permitirem a realização da pesquisa com tanto entusiasmo.*

*À minha família, minhas filhas Rafaela e Sofia e meu marido Cícero, obrigada pela compreensão e apoio.*

*Aos meus pais, Môsiris e Denise, que sempre foram os meus maiores incentivadores.*

*Agradeço também à CAPES pelo apoio recebido.*

## RESUMO

Introdução: O agronegócio, no país, ampliou o uso de insumos químicos como agrotóxicos e fertilizantes em toda sua cadeia produtiva para manter a produção adequada. Em virtude disto, o Brasil é um dos maiores consumidores de pesticidas do mundo. O Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é um herbicida amplamente utilizado para controlar as ervas daninhas especialmente nas plantações de soja no Brasil e no mundo. A grande preocupação se refere principalmente à exposição crônica. Objetivo: avaliar a hepatotoxicidade em trabalhadores expostos e não expostos ao 2,4-D no Rio Grande do Sul. Metodologia: foi realizado um estudo transversal no Rio Grande do Sul, Brasil comparado com 54 agricultores do grupo exposto (região do planalto médio) e 51 do grupo não exposto a 2,4- D (agricultores orgânicos da região da grande Porto Alegre). Foram avaliados bioquímica, estresse oxidativo, genotoxicidade através de micronúcleos e análise de telômeros e dosagem de 2,4-D na urina dos expostos e controles. Resultados: foi detectado 2,4-D em 25% dos controles e 88,5% dos expostos. Comparando o grupo exposto ao grupo controle, encontramos concentrações urinárias de 2,4-D significativamente mais elevadas nos expostos ($P<0,001$). Todas as variáveis bioquímicas analisadas não foram estatisticamente significativas, com exceção de níveis mais elevados de CK nos expostos ($p<0,05$). Esse estudo mostrou que exposição ao 2,4-D está associada com marcadores de estresse oxidativo, através de TBARS ($P <0,001$), CAT($P<0,001$) e SOD($P<0,001$) e que a exposição ao 2,4-D pode levar ao dano do DNA, com encurtamento dos telômeros ($P=0,001$) Conclusões: o aumento do da peroxidação lipídica e da atividade das enzimas antioxidantes nos expostos ao 2,4-D evidenciou a presença de estresse oxidativo. Exames de bioquímica não demonstraram diferenças significativas entre os grupos, mas a genotoxicidade ficou bem caracterizada pela diminuição dos telômeros no grupo exposto. Também foi possível pela primeira vez, no Brasil, realizar o biomonitoramento do 2,4-D em humanos.



Palavras-chave: 2,4-D; hepatotoxicidade; pesticidas; saúde; trabalhador; toxicidade.

## ABSTRACT

Background: Agribusiness in this country increased the use of chemical inputs such as pesticides and fertilizer throughout its production chain to maintain adequate production. Thus, Brazil is one of the greatest pesticide consumers in the world. 2,4 dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) is an herbicide widely used to control weeds, especially in the soybean crops in Brazil and worldwide. The great concern is mainly chronic exposure. The objective of this study was to evaluate hepatotoxicity in workers exposed and not exposed to 2,4-D in Rio Grande do Sul. Methodology: A cross-sectional study was performed in Rio Grande do Sul, Brazil comparing 54 farmers in the exposed group (Planalto Médio (Middle Plateau) region) to 51 in the group not exposed to 2,4- D (the organic farms of the metropolitan area of Porto Alegre). The following were evaluated: biochemistry, oxidative stress, genotoxicity through micronuclei and analysis of telomeres and 2,4-D dosage in the urine of those exposed and controls. Results: 2,4-D was detected in 25% of the controls and 88.5% of the exposed. Comparing the exposed group to the control group we find significantly higher urinary concentrations of 2,4-D in the exposed ($P<0.001$). The biochemical variables analyzed were not all statistically significant, except for higher levels of CK in those exposed. ($p<0.05$). This study showed that exposure to 2,4-D is associated with oxidative stress markers, though TBARS ($P<0.001$), CAT($P<0.001$) and SOD($P<0.001$), and that exposure to 2,4-D may lead to DNA damage, with shortening of the telomeres ($P=0.001$). Conclusions: The increase in lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity in those exposed to 2,4-D evidenced the presence of oxidative stress. Except CK, biochemical tests did not show significant differences between the groups, but genotoxicity was well characterized by the decrease in telomeres in the exposed group. It was also possible, for the first time in Brazil, to carry out biomonitoring of 2,4-D in humans.



Keywords: 2,4-D; hepatotoxicity; pesticides; health; worker; toxicity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1 - Semelhanças estruturais entre auxina natural IAA (ácido indol-3-acético) e 2,4-D** ..... 16
**Figura 2 - Teste de Micronúcleo em células bucais esfoliadas** ..... 24

**ARTIGO**

**Figure 1 - Alteration of CK according to group** ..... 37
**Figure 2 – Association between the concentrations of 2,4-D adjusted by creatinine and the time since the last exposure in the exposed group** ..... 39
**Figure 3 – TBARS values according to group.** ..... 40
**Figure 4 – Telomere length results using qPCR according to group** ..... 41

## LISTA DE TABELAS

**ARTIGO**

**Table 1 - Demographic data, life style (N=105)** ..... 35
**Table 2 – Risk fators (N = 105)** ..... 35
**Table 3 - Comparison between groups regarding laboratory tests** ..... 37
**Table 4 - Concentrations of 2,4-D measured in urine collected in a morning sample in growers (N=105)** ..... 38
**Table 5 – Associations with the concentration of 2,4-D in the group exposed to the pesticide** ..... 38
**Table 6 – Comparison between groups regarding the oxidative stress results** ..... 40
**Table 7 – Comparison between groups regarding the genotoxicity results** ..... 41

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---|---|
| 2,4-D | Ácido 2,4-diclorofenoxiacético |
| 8 - isoPGF | 8-isoprostaglandina-F2α |
| 8 - OHdG | 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina |
| AChE | Acetilcolinesterase |
| ALP | Fosfatase alcalina |
| ALT | Alanina aminotransferase |
| AST | Aspartato aminotransferase |
| AUDIT | Alcohol Use Disorders Identification Test |
| CAAE | Certificado de Apresentação de Apreciação Ética |
| CAT | Catalase |
| CAPES | Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior |
| CK | Creatinoquinase |
| cm | Centímetro |
| EO | Estresse oxidativo |
| EPI | Equipamento de Proteção Individual |
| EROS | Espécies reativas de oxigênio |
| g | Gramas |
| GPx | Glutationa Peroxidase |
| GSH | Glutationa reduzida |

| | |
|---|---|
| H2O | Água |
| ha | Hectare |
| Hb | Hemoglobina |
| HCPA | Hospital de Clínicas de Porto Alegre |
| IAA | Ácido indol-3-acético |
| Kg | Quilograma |
| LOD | Limite de detecção do método |
| LOQ | Limite de quantificação do método |
| MDA | Malondialdeído |
| mL | Mililitros |
| MN | Micronúcleo |
| PCO | proteína carbonila |
| SOD | Superóxido dismutase |
| TBARS | Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico |
| α | Alfa |
| β | Beta |
| μL | Microlitro |

**SUMÁRIO**

**1 INTRODUÇÃO ..... 13**
**2 REVISÃO DA LITERATURA ..... 15**
2.1 HERBICIDAS ..... 15
2.2 DANO AMBIENTAL ..... 18
2.3 DANO EM HUMANOS ..... 18
2.4 BIOMONITORAMENTO ..... 19
2.5 HEPATOTOXICIDADE ..... 20
2.6 ESTRESSE OXIDATIVO ..... 21
2.7 TESTES PARA AVALIAÇÃO DE GENOTOXICIDADE ..... 23
**2.7.1 Micronúcleos ..... 23**
**2.7.2 Telômeros ..... 24**
2.8 ESTUDOS DE GENOTOXICIDADE ..... 25
**3 JUSTIFICATIVA ..... 27**
**4 EXPERIÊNCIA DO GRUPO ..... 27**
**5 QUESTÃO DE PESQUISA ..... 27**
**6 HIPÓTESE ..... 27**
**7 OBJETIVOS ..... 28**
7.1 OBJETIVO GERAL ..... 28
7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS ..... 28
**8 ARTIGO ..... 29**
**ANNEX 1 – QUESTIONNAIRE DEMOGRAPHIC DATA AND PESTICIDE EXPOSURE DATA ..... 49**
**ANNEX 2 – AUDIT QUESTIONNAIRE ..... 51**
**ANNEX 3 – METHOD OF ANALYSIS FOR THE PESTICIDE (2,4-D) IN URINE ..... 53**
**9 LIMITAÇÕES DO ESTUDO E CONSIDERAÇÕES FINAIS ..... 53**
**10 CONCLUSÕES ..... 54**
**11 REFERÊNCIAS ..... 55**
**ANEXO A – QUESTIONÁRIO DADOS DEMOGRÁFICOS E DADOS DE EXPOSIÇÃO A PESTICIDAS ..... 61**
**ANEXO B – QUESTIONÁRIO AUDIT ..... 64**
**ANEXO C – REAÇÃO QUANTITATIVA EM CADEIA DA POLIMERASE (QPCR) PARA MEDIÇÃO DO COMPRIMENTO DO TELÔMERO (TL) ..... 66**
**ANEXO D – MÉTODO DE ANÁLISE DO PESTICIDA (2,4-D) NA URINA ..... 68**

# 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores e exportadores agrícolas do mundo, com destaque para soja, cana-de-açúcar e milho, e essa atividade desempenha um importante papel na economia brasileira. Para manter a alta produção, são utilizadas intensivamente práticas agrícolas como o manejo de plantas daninhas e dos agrotóxicos[1,2]. O Brasil é um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo[3]. Diante do aumento do uso desses produtos ao longo dos anos, diversos órgãos ambientais têm suscitado questionamentos preocupantes acerca dos efeitos dos agrotóxicos no meio ambiente e na saúde humana[2.]

Em 2015, o Rio Grande do Sul foi o terceiro estado que mais consumiu agrotóxicos, com 8,5 milhões de hectares plantados, e é um dos principais produtores de soja, que utiliza grandes quantidades destes produtos[1.]

A soja é o maior responsável pelo crescimento das vendas externas do agronegócio em 2023[4.] No Brasil, na safra de 2022/2023, foram produzidas 156 milhões de toneladas de soja. No ano de 2022 foram consumidas 50.932 toneladas de soja em grãos no país, segundo a Embrapa[5]. Os agrotóxicos mais utilizados na soja são glifosato, 2,4-D, Metolacloro, Tebuthiuron, Trifluralin, Paraquat, Flutriafol, Carbofuran[1].

Os agrotóxicos combatem as doenças, pragas e plantas daninhas nas plantações, contribuindo para os recordes de safra, exportações e produtividade na agricultura. A produtividade brasileira de grãos, nos últimos 20 anos, teve um aumento de 65%, o que permitiu que a produção de grãos, nesse mesmo período, aumentasse 210%[5]. Do total de agrotóxicos comercializados no Brasil, a maior parte refere-se a herbicidas, chegando a quase 58% do total dos agrotóxicos comercializados. Estes herbicidas, apesar de serem formulados com o propósito de ação somente sobre as plantas daninhas, podem também afetar organismos não alvo e contaminar cursos hídricos[2].

O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é o segundo produto agroquímico mais comercializado no Brasil, ficando atrás somente do glifosato, segundo o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, o Ibama[6]. O glifosato, por sua vez, não tem indicador biológico de exposição disponível em humanos.

Segundo dados do Ministério da Saúde por meio do Sistema de Informação e Vigilância da Qualidade da Água para consumo Humano (SISÁGUA)[7], o 2,4-D foi detectado em 92% das amostras de água utilizadas para abastecer mais de 2.300 cidades no Brasil, entre 2014 e 2017. Apenas duas detecções exibiram valores superiores ao limite permitido no Brasil (30µg/L), mas 4.270 detecções exibiram valores superiores ao limite estabelecido pela União

Européia, que é bem menor (0,1µg/L)[7]. A preocupação com a presença de 2,4-D na água concerne sobre seus efeitos tóxicos em organismos não alvo.

Em relação aos efeitos em seres vivos, há diversos estudos que destacam sua hepatotoxicidade em diferentes modelos biológicos, como roedores e peixes[7,8,9] evidenciando aumento nas atividades de fosfatase alcalina (ALP), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), inibição da ação das enzimas antioxidantes hepáticas, peroxidação lipídica[10].

Devido aos possíveis danos causados pelo 2,4-D secundários à exposição prolongada, optou-se em estudar com detalhes seus efeitos hepatotóxicos em humanos.

# 2 REVISÃO DA LITERATURA

## 2.1 HERBICIDAS

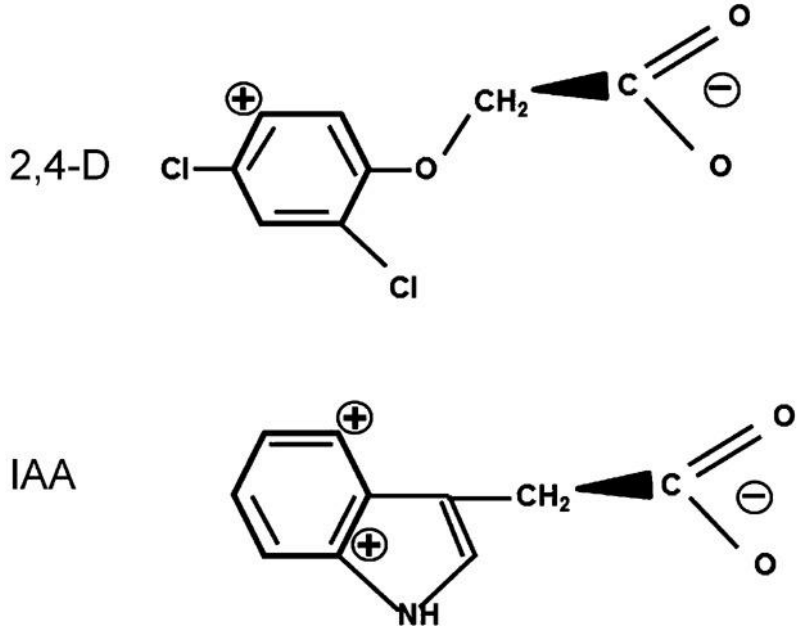
Herbicidas são agroquímicos utilizados para controlar o crescimento de ervas daninhas indesejáveis e visam aumentar significativamente a produtividade das culturas. Os herbicidas são geralmente classificados como não seletivos, quando matam ou danificam todo o crescimento, e seletivos, que funcionam por meio de algum tipo de perturbação hormonal. A auxina sintética é um herbicida seletivo e serve como um dos mais importantes herbicidas para controlar o crescimento de ervas daninhas na agricultura em todo o mundo[11].

O ácido 2,4–diclorofenoxiacético (2,4-D) também regula o crescimento das plantas e atua como um imitador de auxina natural, promovendo a divisão e alongamento celular e aumentando a vida útil dos frutos em baixas concentrações[12,13]. Suas formulações incluem ésteres, ácidos e sais que variam em suas propriedades químicas, comportamento ambiental, e em menor grau, toxicidade. As formulações de sal e éster de 2,4-D são derivadas da molécula de ácido original. Mais de 1.500 produtos herbicidas contêm 2,4-D como ingrediente ativo. O 2,4-D fazia parte do Agente Laranja, herbicida amplamente utilizado durante a guerra do Vietnã[14].

O baixo custo, seletividade, eficácia e amplo espectro do 2,4-D levaram ao uso contínuo e hoje é um dos herbicidas mais utilizados no mundo[11]. Outra razão é que as formulações comerciais de 2,4-D são facilmente solúveis em água e em outros solventes (etanol, 1-pentenol, 1-butanol, 1-propanol, acetona, 2-butanona, éter metil tec-butílico, acetato de metila)[15], resultando em rápida penetração através das folhas e raízes, tornando-o mais eficaz[12].

Há mais de setenta herbicidas contendo o 2,4-D ou um de seus derivados como ingrediente ativo, registrados no mercado brasileiro, associados ou não com outros ingredientes ativos, como picloram e glifosato, segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), só no ano de 2018[4].

**Figura 1 - Semelhanças estruturais entre auxina natural IAA (ácido indol-3-acético) e 2,4-D**




Fonte: Song, 2014.

De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, os maiores produtores de 2,4-D são EUA, América do Sul, Europa e Rússia, com um aumento no seu consumo de 40% na última década[16]. A produção e o consumo de 2,4-D cresceram rapidamente nos últimos anos no mundo, e em 2010, a produção foi de 40.000 toneladas na China[17]. Na Argentina, cerca de 2.200 toneladas de 2,4-D são aplicadas anualmente em diferentes culturas[18].

No Brasil, o herbicida 2,4-D é utilizado no solo, denominado de pré-emergência , e pós-emergência, quando é utilizado na folha das plantas daninhas infestantes nas cultura de soja, cana-de-açúcar, milho, aveia, trigo, arroz, café, cevada, centeio, sorgo. O 2,4-D é diretamente aplicado no solo ou pulverizado sobre campos de cultivo e, a partir daí, muitas vezes atinge águas superficiais e sedimentos[19].

No meio ambiente, o 2,4-D se move por diferentes mecanismos, como água da chuva, volatilização, remoção de culturas, lixiviação, absorção pelas plantas, degradação química, adsorção, escoamento superficial e degradação microbiana e processo de fotodecomposição. A aplicação excessiva e inadequada de pesticidas pode produzir efeitos negativos no ambiente e na biodiversidade. Além disso, o uso incorreto desses compostos pode produzir efeitos negativos na saúde animal e humana[16].

Os herbicidas à base de 2,4-D podem sofrer processos de degradação biológica ou química e transformar-se em outros produtos ou metabólitos com diferentes propriedades químicas e físicas. Alguns destes produtos de degradação são 2,4-DCP, 2-CP e 4-CP e podem

ser mais tóxicos do que as suas moléculas originais, causando efeitos deletérios em organismos não-alvos[16].

Após ingestão, inalação e contato dérmico[20], O 2,4-D é absorvido pelo corpo humano rapidamente e excretado predominantemente pela urina não metabolizada, com meia-vida, com meia-vida de 10 a 33 horas (média 17,7 horas). Os níveis urinários de 2,4-D, em geral, estão relacionados com o comportamento individual e a oportunidade de contato direto com o herbicida[21].

A principal fonte de exposição ao 2,4-D em humanos e animais é o ar contaminado, a água potável, o solo e os alimentos[16]. A exposição ocupacional a 2,4-D pode resultar de fabricação de produtos, uso agrícola através de aplicações principalmente líquidas, e aplicação por trator ou mochilas pulverizadoras[20]; além de silvicultura, aplicações em gramados. Exposições indiretas podem ocorrer no caminho de “levar para casa” e na deriva. Exposição ocupacional tipicamente ocorre durante a absorção dérmica ou inalação, embora a ingestão acidental pode acontecer. A absorção dérmica é a principal via de absorção para aplicadores de herbicida em spray[20].

Entre os pesticidas, os herbicidas auxínicos demonstraram efeitos hepatotóxicos e nefrotóxicos em animais quando expostos a altos níveis desses herbicidas[7,16].

A análise do 2,4-D na urina é o método mais utilizado para o biomonitoramento de exposição humana, porque a excreção de 2,4-D e seus conjugados ácido-hidrolisáveis é quase exclusivamente na urina. Em geral, as concentrações urinárias de 2,4 D estão correlacionadas com comportamento individual, tarefas realizadas e oportunidade de contato direto com o herbicida. A exposição ocupacional ao 2,4- D com maior risco está correlacionada ao processo de mistura, transporte e aplicação do produto, além da falta de uso de proteção individual[21]. Alguns estudos epidemiológicos foram realizados para detectar a presença de 2,4-D urinário[22-25].

O 2,4-D e seus sais e ésteres não ocorrem naturalmente no ambiente. Devido à ampla produção e uso de herbicidas contendo 2,4-D, existe um potencial considerável de exposição de seres humanos em atividades ocupacionais e em ambientes não ocupacionais[20], em consumidores, em ambientes não ocupacionais.

## 2.2 DANO AMBIENTAL

Em ambientes aeróbicos, o 2,4-D degrada-se rapidamente a partir de 2 a 13 dias[21]. No entanto, a contaminação por 2,4-D pode atingir águas subterrâneas, água da torneira e alimentos[23]. A poluição das águas superficiais e subterrâneas causada por pesticidas é muito grave e causa problemas em ecossistemas de água doce e costeiros em todo o mundo. A contaminação com pesticida afeta diretamente a qualidade da água potável nas áreas locais, e causa impactos indiretos ao transferir entre espécies, como no solo e a cadeia alimentar[26].

Foram encontrados altos níveis de quatro herbicidas no Rio Guaporé, no Rio Grande do Sul, dentre eles: 2,4-D, atrazina, dietilatrazina e simazina. A maior contaminação com 2,4-D foi correlacionada com áreas de produção intensiva de soja e cereais de inverno[27].

## 2.3 DANO EM HUMANOS

Segundo publicação da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), o 2,4-D foi classificado como grupo 2-B, possivelmente carcinogênico em humanos, devido a alguns estudos que mostraram alguma indicação de risco aumentado de linfoma Não-Hodgkin[20]. O 2,4-D também foi já foi associado a câncer de próstata[28].

Em 2019 foi publicada uma meta-análise que associou exposição ao 2,4-D e linfoma Não-Hodgkin, com risco relativo de 1,73 e IC 95% (1,10-2,72) em grupos altamente expostos (exposição ocupacional ou residencial ao 2,4-D)[29].

O 2,4-D também tem sido relacionado à desregulação endócrina – aumento de hormônio luteinizante (LH) e aumento de testosterona – em aplicadores do herbicida[30].

Além disso, o 2,4-D está associado ao risco de desenvolvimento de Doença de Parkinson, observado pela primeira vez em estudo caso-controle em 2009, em pacientes com parkinsonismo; Odds Ratio 98% IC 2,59 (1,03-6,48)[31]. Estudo de coorte brasileiro que avaliou 150 pacientes com Doença de Parkinson Idiopática encontrou que os que tinham exposição ocupacional a agrotóxicos tinham mais do que o dobro de probabilidade de morrer do que os não expostos (HR = 2,32, IC 95% (1,15- 4,66), p = 0,018)[32].

## 2.4 BIOMONITORAMENTO

A população é exposta ao 2,4-D através de ingestão, inalação ou via dérmica. Pode contaminar-se através de solo contaminado, águas superficiais ou profundas, alimentos e ar. A principal exposição é a ocupacional através da agricultura[23].

A absorção dérmica de 2,4-D em humanos é baixa em comparação com a absorção oral. A excreção na urina ocorre em geral até 3 dias após a administração oral. Durante um período de 6 dias após a administração, a recuperação da dose administrada foi quase completa. A meia-vida de eliminação pela urina variou de 10,2 a 28,5 horas[33].

O 2,4-D é eliminado na urina como o composto original inalterado (80-95%) ou como conjugado, com meia-vida urinária na ordem de 1 dia. Não há evidência de metabolismo oxidativo. A maioria das avaliações de biomonitoramento da exposição ao 2,4-D baseiam-se nas medições de urina[34].

Estudos foram realizados para medir a exposição ocupacional ao 2,4-D proveniente da agricultura, silvicultura e aplicações em gramado. Aplicadores agrícolas profissionais tinham concentrações urinárias de 2,4-D variando de não detectado a 2.858 µg/L. Estudo americano que estimou a dosagem urinária de 2,4-D na população verificou que níveis médios de 2,4-D na urina eram mais elevados entre aqueles que relataram uso recente de produtos para gramado ou jardim. Trabalhar na agricultura sugeriria uma influência ocupacional neste segmento da população[23]. Em um estudo realizado em mulheres grávidas na China para relatar a exposição urinária ao 2,4-D, foi detectado em 97,4% das amostras de urina. O 2,4-D foi significativamente associado a biomarcadores a estresse oxidativo[22].

Estudo em agricultores que aplicavam 2,4-D realizado nos Estados Unidos em Minnesota e Carolina do Sul, mostrou que a média geométrica de 2,4-D para 34 aplicadores foi de 3,8µg/L na pré-aplicação, 29 µg/L no dia da aplicação, 64,2 µg/L no dia 1 da aplicação, 45,3 µg/L no dia 2 da aplicação e 28,3 µg/L no dia 3 da aplicação[24].

Um estudo epidemiológico com aplicadores de pesticidas nos Estados Unidos incluiu participantes na época do uso agrícola e mediram níveis urinários de 2,4-D. Os valores de média geométrica para 69 aplicadores de 2,4-D foram de 7,8 e 25µg/L na urina pré-aplicação e pós-aplicação, respectivamente[25].

Até onde sabemos, não há estudos no Brasil que tenham realizado a dosagem de 2,4-D em humanos.

A colinesterase sanguínea, a acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase ou a colinesterase plasmática (BChE) são usadas para monitorar a exposição a agrotóxicos

organofosforados e carbamatos. A AChE está presente nos tecidos neurais e nos eritrócitos e a BChE é sintetizada pelo fígado e encontrada no soro sanguíneo. A colinesterase é significativamente reduzida nas populações expostas a agrotóxicos.

## 2.5 HEPATOTOXICIDADE

O fígado é um órgão complexo, que metaboliza carboidratos, proteínas e gorduras, sendo composto por diferentes tipos de células, como hepatócitos, células de Kupffer, células estreladas e células endoteliais hepáticas. É o local onde ocorre detoxificação dos resíduos é responsável pela síntese e secreção da bile e pela síntese de lipoproteínas e proteínas plasmáticas, incluindo fatores de coagulação. O fígado também mantém um nível estável de glicose no sangue, captando e armazenando glicose como glicogênio (glicogênese), decompondo-a em glicose quando necessário (glicogenólise) e formando glicose a partir de fontes não-carboidratos, como aminoácidos (gliconeogênese)[7,35.]

Marcadores hepáticos são usados para avaliar a função hepática e são particularmente úteis na detecção e monitoramento de lesões causadas por vários fatores, incluindo compostos químicos tóxicos. Em uma revisão de estudos de modelos biológicos in vivo e in vitro, o 2,4-D aumentou os níveis de diferentes marcadores hepáticos, como aspartato aminotransferase (AST) e a alanina aminotransferase (ALT) sendo a mais recorrente entre os artigos analisados[7]. A fosfatase alcalina (ALP) é uma enzima que transporta metabólitos através de membranas celulares e está localizada nos canalículos biliares, estruturas responsáveis pelo transporte de bile no fígado. Um aumento dos níveis de ALP indica disfunção ou obstrução do fluxo biliar, uma condição que pode ser causada por danos hepáticos e distúrbios hepatobiliares[7,35].

O uso generalizado de AST e ALT se deve ao fato que a proporção AST/ALT é um marcador bem estabelecido de dano hepático[35], embora seja utilizado pela facilidade e custo nas diferentes pesquisas. O fígado é o órgão de defesa de primeira linha contra xenobióticos nocivos e, como resultado, é também alvo de toxicidade. Vazamentos de enzimas intracelulares, incluindo AST e ALT, do citosol do fígado para a corrente sanguínea são bons indicadores de dano hepatocelular. Elevação das enzimas hepáticas associadas a produtos químicos podem resultar em vários graus de lesão, como hepatite, fibrose, cirrose e até câncer[10].

Um estudo de 2013 investigou os efeitos do 2,4-D no metabolismo do peixe dourado após 96 horas de exposição, usando apenas doses não letais. A atividade da ALT aumentou 46% no plasma expostos a 100 mg/L de 2,4-D. A atividade de AST não se alterou com a exposição, bem como a atividade da acetilcolinesterase (AChE)[36].

Estudo de 2015 publicado na Revista Europeia de Biofísica avaliou o efeito tóxico do 2,4-D em hepatócitos de ratos. Foram comparados 5 ratos controles com 10 ratos tratados com 2,4-D; as análises foram realizadas 24 horas após a administração de 2,4-D. Os resultados mostraram que houve redução no conteúdo de proteína e uma diminuição acentuada na estrutura secundária da proteína após intoxicação por 2,4-D. O glicogênio foi diminuído no fígado do rato após a indução de 2,4-D. O grupo intoxicado com 2,4-D mostrou aumento de peso absoluto do fígado e uma porcentagem de ganho de peso corporal menor do que a do grupo controle ($p<0,05$)[37].

No estudo de Tayeb[8], foram analisados os fígados dos ratos tratados com “Désormone Lourd", um herbicida à base de 2,4-D. O peso corporal dos ratos tratados com 2,4-D diminuiu em relação ao controle e o peso do fígado do rato aumentou significativamente no final da 4ª semana. A avaliação microscópica mostrou que o 2,4-D induziu a ruptura do cordão hepático, necrose focal, dilatação dos vasos e núcleo picnótico[8].

Outro estudo realizado em ratos tratados com “Désormone Lourd", mostrou que o tratamento por 4 semanas com 2,4-D resultou em hepatotoxicidade, com aumento de aminotransferases (ALT, AST), fosfatase alcalina, lactato desidrogenase e bilirrubina total, além de diminuição de proteína total e albumina. Um efeito pró-oxidante geral foi associado a uma diminuição no conteúdo da glutationa reduzida (GSH) e na atividade enzimática da glutationa S-transferase (GST), catalase (CAT), superoxido dismutase (SOD) e glutationa peroxidade (GPx), e aumento nos níveis de malondialdeído (MDA) e proteína carbonila (PCO)[38].

Em um relato de caso na Irlanda, um homem de 65 anos teve quadro agudo de hepatite, com aumento de aminotransferases (AST 205 U/l ALT 380 U/l), bilirrubina 142, ALP 412, e que se acredita que foi causado por exposição ao 2,4-D. O paciente ingeriu o 2,4-D ao lamber as bolas de golfe que jogava habitualmente[39].

## 2.6 ESTRESSE OXIDATIVO

Os radicais livres são moléculas que possuem um elétron desemparelhado em seu orbital de valência. Os produtos mais reativos e, portanto, prejudiciais, são o radical hidroxila à base de oxigênio e o ânion peroxinitrito à base de nitrogênio. A geração de oxigênio molecular na forma de espécies reativas de oxigênio (ERO) é uma parte natural da vida aeróbia. No entanto, uma quantidade excessiva de ERO é altamente tóxica para as células. O estresse oxidativo afeta os principais componentes celulares: proteínas, lipídios e DNA[40].

O estresse oxidativo é causado pela presença de radicais livres, quando eles sobrecarregam os antioxidantes e os mecanismos de reparo de DNA de um organismo. As fontes de estresse oxidativo são criadas endogenamente como parte de processos celulares naturais ou são introduzidas através de exposições exógenas ambientais ou de estilo de vida. O estresse oxidativo afeta vários processos celulares e como consequência, pode estar associado à patogênese de doenças humanas como as neurodegenerativas, inflamatórias, cardiovasculares, diabetes e câncer[41].

Os principais mecanismos enzimáticos de defesa antioxidante consistem em diferentes formas de superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GPx), bem como compostos não enzimáticos, por exemplo, tocoferol, beta-caroteno, ascorbato e glutationa (GSH)[40]. Acredita-se que a SOD forneça a primeira linha de defesa contra os radicais de oxigênio, especificamente o ânion superóxido (O 2 •−), que é o principal radical livre produzido pela respiração mitocondrial e por várias reações metabólicas. A SOD remove os ânions superóxido potencialmente perigosos dos sistemas biológicos, convertendo-os em H2O2, enquanto a CAT catalisa a conversão de duas moléculas de H2O2 em O2 e duas moléculas de H2O. O antioxidante intracelular mais abundante, a glutationa (GSH), está envolvida na proteção das células contra o estresse oxidativo. A exposição a pesticidas, no entanto, parece estar associada a um aumento significativo de ERO e à indução de estresse oxidativo, além do que o sistema antioxidante celular intrínseco pode reduzir para níveis fisiológicos normais[42].

A peroxidação lipídica é um dos principais efeitos causados pela toxicidade dos pesticidas e muito xenobióticos. Um dos principais indicadores desse mecanismo é a formação de aldeídos como o malondialdeído (MDA)[43]. Esses aldeídos gerados no processo de peroxidação lipídica podem ser mensurados através da Técnica das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)[44].

O estresse oxidativo é comumente citado como um mecanismo potencial de carcinogênese para diversas exposições ambientais, incluindo pesticidas[41].

A diminuição da capacidade antioxidante foi mostrada por estudo realizado em ratos tratados com 2,4-D e azeite extravirgem que observou diminuição da atividade das enzimas antioxidantes hepáticas SOD, CAT, GPx e glutationa redutase. A ingestão de azeite extravirgem e fração hidrofílica durante o tratamento com 2,4-D induziu um aumento significativo nas atividades das enzimas antioxidantes e uma diminuição dos níveis de dienos conjugados e TBARS no fígado[9].

Estudo realizado em produtores de milho e controles não agrícolas no estado americano de Iowa para examinar o impacto da exposição do 2,4-D no estresse oxidativo

mostrou que os agricultores apresentaram níveis mais altos de 2,4-D na urina que os controles e o 2,4-D foi associado a níveis elevados de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) e 8-isoprostaglandina-F2α (8-isoPGF). Esses marcadores de estresse oxidativo são considerados respostas imediatas ou de curto prazo às exposições ambientais[45].

Estudo publicado em 2019 avaliou o estresse oxidativo em células-tronco de polpa dental humana (dentes de siso que eram indicados para extração), tratadas com doses crescentes de 2,4-D[46]. Distribuição do ciclo celular, nível de EROs e atividade de fosfatase alcalina foram medidos antes e após o tratamento. A intensidade de MDA aumentou significativamente nestas células-tronco tratadas com 2,4-D comparando o controle não tratado ($p<0,001$). As quantificações de SOD e GPx indicaram redução notável na atividade das enzimas após a exposição de 2,4-D ($p<0,001$). A administração de 2,4-D levou a um nível significativamente mais alto de atividade de caspase em comparação ao grupo controle, indicando um processo de apoptose[46].

A exposição de 2,4-D experimentalmente pode produzir neurotoxicidade devido à produção de ERO, pois o sistema nervoso central tem alto grau de ácidos graxos insaturados facilmente peroxidáveis, alta taxa de consumo de oxigênio e relativa escassez de enzimas antioxidantes. A administração de doses menores de 2,4-D em ratos Wistar por quatro semanas se manifestou na perda de peso do cérebro e da atividade da acetilcolinesterase no plasma e no cérebro e aumento do nível de TBARS cerebrais, demonstrando uma acentuada peroxidação lipídica cerebral. A mudança na atividade da acetilcolinesterase é um indicador de dano da membrana, que pode estar relacionado à geração de radicais livres produzidos pela ação do 2,4-D. A exposição dos ratos ao 2,4-D produziu aumento significativo das enzimas antioxidantes, como SOD e GPx, em homogeizados cerebrais[47].

Em um estudo realizado com 41 pulverizadores agrícolas do sexo masculino saudáveis expostos a pesticidas durante 5 anos comparados com 21 controles para avaliar estresse oxidativo, foi encontrado aumento significativo no TBARS na população agrícola quando comparada com controle[44].

## 2.7 TESTES PARA AVALIAÇÃO DE GENOTOXICIDADE

### 2.7.1 Micronúcleos

Os micronúcleos (MN) consistem em pedaços ou cromossomos inteiros que se perdem durante a divisão celular (anáfase), formando um núcleo secundário menor que o principal da

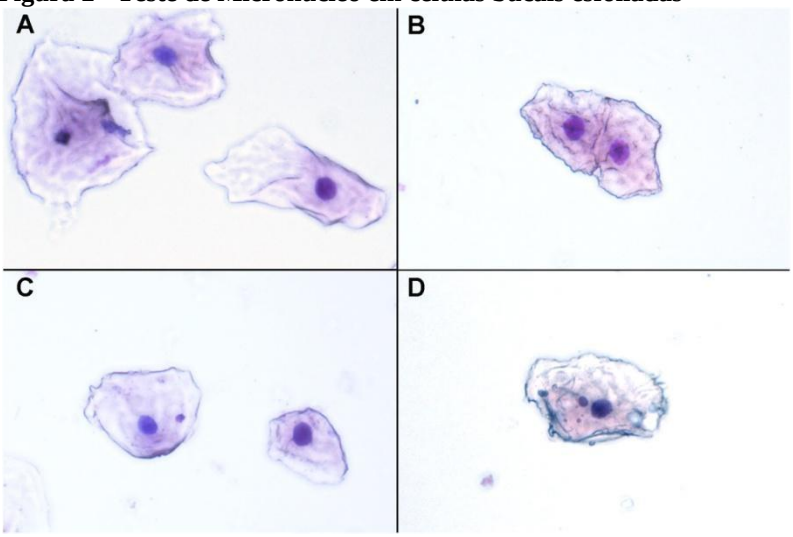
célula, por isso é chamado de micronúcleo. A dosagem de MNs bucais em células epiteliais esfoliantes da mucosa oral é amplamente utilizada em estudos de biomonitoramento para avaliar a exposição humana a agentes genotóxicos e é utilizada para avaliar a exposição ocupacional[48].

O teste de micronúcleo tem a vantagem de ser rápido, de baixo custo, sensível a agrotóxicos e suas misturas e pode ser realizado em amostras de mucosa oral, sendo mais fácil obter amostras biológicas com testes menos invasivos[49].

*Teste de Micronúcleo em células bucais esfoliadas*

Com base nos critérios de Tolbert et al (1992), as células bucais são classificadas com base na morfologia nuclear em células normais (**Figura 2**, A, B) e células consideradas anormais[50]. Acredita-se que essas morfologias nucleares anormais sejam indicativos de danos ao DNA ou morte celular. As células com MNs são caracterizadas pela presença de um núcleo principal e um ou mais núcleos menores chamados MNs (**Figura 2**, C, D)[46].

**Figura 2 - Teste de Micronúcleo em células bucais esfoliadas**




Descrição: A – Células diferenciadas. B – Célula binucleada. C, D – Célula com MNs (micronúcleos) são caracterizadas pela presença de um núcleo principal e um ou mais núcleos menores chamados micronúcleos.
Fonte: Sara Leonardi S. et al, 2020.

### 2.7.2 Telômeros

Os telômeros humanos são estruturas nucleoproteínas que consistem em uma repetição de TTAGGG em sequência, localizado no final dos cromossomos. Os telômeros encurtam a cada divisão celular devido a replicação da fita atrasada. Na maioria das células de adultos

humanos, o comprimento dos telômeros diminuiu com a idade, sugerindo que o atrito dos telômeros contribui para a senescência do organismo, reduzindo a proliferação celular[51]. Este ensaio tem resultados promissores para biomonitoramento genotóxico, porque telômeros muito curtos ou muito longos tem sido associado ao risco de câncer[49]. Além disso, os telômeros podem ser encurtados por idade; estresse oxidativo, como aquele causado pelo ambiente e exposição ocupacional aos agrotóxicos, pois alguns destes fatores têm sido relacionados à inflamação e a doenças crônicas; além de estilo de vida, como obesidade e tabagismo[49,51].

Células senescentes apresentam 30% mais guaninas modificadas em seu DNA e quatro vezes mais base livre de 8-oxo-dG, contribuindo para a perda telomérica por estresse oxidativo[51].

## 2.8 ESTUDOS DE GENOTOXICIDADE

Em relação à exposição a pesticidas, muitos relatórios que tratam sobre aberrações cromossômicas, trocas de cromátides irmãs, micronúcleos e ensaio cometa encontraram aumento significativo destes biomarcadores, fornecendo evidências sugestivas de efeitos genotóxicos induzidos por pesticidas. Os micronúcleos e os ensaios cometa são testes rápidos e confiáveis usados em biomonitoramento humano, que detectam danos ao DNA causados por agentes sob diferentes exposições circunstanciais[52].

Estudo realizado na Argentina e publicado em 2005 avaliou o efeito genotóxico do 2,4-D em células de ovário de Hamster-Chinês, medindo a frequência de troca de cromátides irmãs, índice mitótico e análises do ciclo celular encontrou doses de 2,4-D genotóxicas em todos os ensaios[53].

Um estudo de 2013 avaliou o DNA de células bucais de 1.234 aplicadores de pesticidas masculinos livres de câncer nos estados americanos de Iowa e Carolina do Norte. O comprimento relativo dos telômeros médios para os participantes diminuiu em associação com o aumento dos dias de uso para sete pesticidas, dentro deles o 2,4-D, todos associados ao risco de câncer ($p=0,01$)[54].

Um estudo realizado no Brasil por Kahl et al mostrou que os trabalhadores da produção de tabaco tiveram uma redução significativa dos telômeros em comparação com o grupo não exposto[55], o que também ocorreu com análise de peroxidação lipídica através de TBARS[55].

Outro estudo realizado no Egito em 2019 avaliou exposição ocupacional a agrotóxicos em dois grupos de trabalhadores com padrões socioeconômicos diferentes comparados com 50 pesquisadores urbanos não expostos e 50 agricultores rurais não expostos a agrotóxicos. Foi

avaliada a atividade da enzima telomerase, o comprimento relativo dos telômeros e dano ao DNA, usando ensaio cometa. O resultado foi aumento do dano ao DNA, com encurtamento do comprimento dos telômeros e diminuição da atividade da enzima telomerase em indivíduos expostos a agrotóxicos em comparação com seus controles[56].

## 3 JUSTIFICATIVA

O agronegócio tem gerado cada vez mais lucros ao Brasil, os grãos produzidos no nosso país alimentam a população e ainda são exportados para o mundo. A produção de soja é motivo de destaque em nossa economia, frequentemente exibida pela mídia. Porém, não se tem dado a devida importância à saúde do trabalhador rural e daqueles que consomem os alimentos que contêm agrotóxicos. Com esse estudo, pode-se contribuir para aumentar a vigilância em saúde dos trabalhadores expostos ao 2,4-D, ampliar o reconhecimento de seus efeitos tóxicos e propor protocolos para o monitoramento da saúde dos agricultores expostos.

## 4 EXPERIÊNCIA DO GRUPO

O grupo realizou um estudo experimental em camundongos com o fungicida mancozebe, onde foram avaliadas medidas antropométricas, alterações hematológicas, bioquímica, genotoxicidade e estresse oxidativo. Foi encontrada significância estatística ao se compararem os grupos expostos e o grupo controle. Esses resultados foram apoiados pela avaliação microscópica do fígado, que registrou alterações histológicas como infiltrado inflamatório e balonização dos hepatócitos dos grupos tratados.

## 5 QUESTÃO DE PESQUISA

A exposição ocupacional ao 2,4-D gera um risco maior de desenvolver danos hepáticos, estresse oxidativo e genotoxicidade?

## 6 HIPÓTESE

Agricultores cronicamente expostos ao 2,4-D têm risco aumentado de desenvolver danos hepáticos.

# 7 OBJETIVOS

## 7.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a toxicidade do herbicida ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) em agricultores expostos, em plantações de grãos, e em não expostos, em culturas orgânicas no Sul do Brasil.

## 7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar alterações hepáticas através das transaminases - AST e ALT;
2. Mensurar os indicadores de exposição;
3. Estudar biomarcadores de estresse oxidativo através das enzimas antioxidantes no sangue: catalase, superóxido dismutase e lipoperoxidação através de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no sangue.
4. Avaliar genotoxicidade através de contagem de micronúcleos e análise de telômeros.

## 8 ARTIGO

EVALUATION OF 2,4-D HEPATOTOXICITY

Article to be submitted to the Liver International Journal: World Journal of Hepatology

Camila Pereira Baldin[1], Sheila de Castro Cardoso Toniasso[1], Vittoria Calvi Sampaio[1], Raquel Boff da Costa[1], Nelson David Suarez Uribe[1], Patrícia Gabriela Riedel[1], Norma Marroni[2], Elizângela Schemitt[2], Sandyelly Rebeca Benitez da Fonseca[2], Juliana da Silva[3], Eliane Dallegrave[4], Osmar Damian Prestes[5], Luciana Grazziotin Rossato Grando[6], Dvora Joveleviths[1].

1. Graduate Program In Gastroenterology and Hepatology, Federal University of Rio Grande Do Sul, Porto Alegre 90410000, Brazil.
2. Laboratório de Ciências Pneumológicas e Inflamação – Hospital de Clínicas De Porto Alegre – RS, Brazil.
3. Laboratório de Genética Toxicológica- Universidade Luterana do Brasil (ULBRA). Av. Farroupilha, 8001, Prédio 22, 4º andar, sala 22, CEP 92425-900 - Canoas-RS – Brasil.
4. Laboratório de Análises Clínicas - Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA.
5. Laboratório De Análise De Resíduos De Pesticidas (LARP) – Universidade Federal de Santa Maria-RS, Brazil.
6. Faculty of Pharmacy, Institute of Biological Sciences, Bioexperimentation Post-Graduate Program, Passo Fundo University, BR 285, Passo Fundo 99052-900, Rio Grande do Sul, Brazil.

*Corresponding Author: Camila Pereira Baldin, Rua Ramiro Barcelos, nº 2400, Porto Alegre, RS, Brazil, CEP 90035-002
Telephone: +5551992770321
E-mail: cbaldin@hcpa.edu.br

**ABSTRACT**

**Background**: Agribusiness in this country increased the use of chemical inputs such as pesticides and fertilizer throughout its production chain to maintain adequate production. Thus, Brazil is one of the greatest pesticide consumers in the world. 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) is a herbicide widely used to control weeds, especially in the soybean crops in Brazil and worldwide. The great concern is mainly chronic exposure. The objective of this study was to evaluate hepatotoxicity in workers exposed and not exposed to 2,4-D in Rio Grande do Sul. **Methodology**: A cross-sectional study was performed in Rio Grande do Sul, Brazil comparing 54 farmers in the exposed group (Planalto Médio (Middle Plateau) region) to 51 in the group not exposed to 2,4- D (the organic farms of the metropolitan area of Porto Alegre). The following were evaluated: biochemistry, oxidative stress, genotoxicity through micronuclei and analysis of telomeres and 2,4-D dosage in the urine of those exposed and controls. **Results**: 2,4-D was detected in 25% of the controls and 88.5% of the exposed. Comparing the exposed group to the control group we find significantly higher urinary concentrations of 2,4-D in the exposed ($P<0.001$). The biochemical variables analyzed were not all statistically significant, except for higher levels of CK in those exposed. ($p<0.05$). This study showed that exposure to 2,4-D is associated with oxidative stress markers, though TBARS ($P<0.001$), CAT($<P<0.001$) and SOD($P<0.001$), and that exposure to 2,4-D may lead to DNA damage, with shortening of the telomeres ($P=0.001$). **Conclusions**: This study is pioneering in that it performs biomonitoring of exposure and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid dosage in humans in Brazil, including contamination. Although we did not observe a significant difference in the transaminase enzymes in the farmers exposed to 2,4-D, evidence was found of liver toxicity of this compound by means of interference with the antioxidant enzymes and the occurrence of lipid peroxidation and genotoxicity by diminishing the telomeres.

## 1. INTRODUCTION

Brazil is one of the main agricultural producers and exporters in the world, especially of crops such as soybeans, sugar cane and maize, which drive the country's economy (1,2). The intensive use of pesticides, such as herbicides, is a common practice in Brazilian agriculture. Glyphosate and 2,4–dichlorophenoxyacetic (2,4-D) are the most widely used agricultural pesticides, above all for soybean production (2). Although these products contribute to high agricultural yields, they have raised concern due to their potentially negative impacts on the environment and human health (3).

2,4–dichlorophenoxyacetic acid is an herbicide used to control the growth of undesirable weeds and to significantly increase crop productivity. Due to low cost, selectivity, efficacy and a broad spectrum, it is currently one of the most widely used herbicides in the world (4). Indiscriminate use of 2,4-D contributes to environmental contamination affecting aquatic and terrestrial ecosystems (5,6). The degradation of 2,4-D in the environment may lead to the formation of more toxic metabolites, further increasing the risk to biodiversity (7).

On the other hand, occupational and environmental exposure to 2,4-D is a significant risk to human health. Contamination of drinking water and food is a major source of exposure, while agricultural workers are subject to high levels of occupational exposure (8). Epidemiological studies suggest associations between exposure to 2,4-D and increased risks of non-Hodgkin lymphoma (9), endocrine deregulation (10) and Parkinson's disease (11).

Furthermore, studies have highlighted the liver toxicity of 2,4-D in different biological models, including rodents and fishes (12,13,14), which may alter the antioxidant enzyme system (15,16). The toxicity of 2,4-D seems to be mediated by its pro-oxidant effect, favoring the production of reactive oxygen species (EROS) and free radicals. Another study shows a reduction of antioxidant activity with catalase (CAT), dismutase superoxide (SOD), glutathione peroxidase (GPx) reduction and lipid peroxidation of the membrane which is associated with the production of free radicals (17).

The evaluation of genotoxicity, through a micronucleus (MN) is a biomarker utilized in buccal cells to determine possible genotoxic damage, and data on telomere length is another study with promising results for genotoxic biomonitoring (18,19), because very short or very long telomeres have been associated with the risk of lung and kidney cancer. Shorter telomeres are found in several types of cancer: bladder, head/neck, ovarian, gastric, skin, osteosarcoma and esophagus cancer (20).

After ingestion, inhalation and dermal contact, 2,4-D is fast absorbed by the human body and predominantly excreted by the non-metabolized urine, with a half-life of 10 to 33 hours (mean 17.7 hours) (21). This study is the first to perform the biomonitoring of 2,4-D in humans in Brazil.

Due to the possible damage caused by 2,4-D secondary to prolonged exposure it was chosen to perform a detailed study of its hepatotoxic effects in humans.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 STUDY POPULATION

This study is characterized by being a cross-sectional study performed in 2023 during the month of July, the month when 2,4-D was sprayed on the soybean fields. A total number of 54 soybean growers was recruited from the middle plateau region of Rio Grande do Sul as the exposed group and 51 growers of agricultural crops in the metropolitan region of Porto Alegre as the control group. The inclusion criteria for the exposed group were age greater than or equal to 18 years and use of 2,4-D for a period of 5 years or more and for the control group equal to or greater than 18 years, working in organic crops since at least 5 years and self-declared organic agriculture farmers and having a certificate or evaluation of organic conformity accredited to supervisory agencies. Workers with active neoplasms were excluded.

The study was approved by the Research Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre – CAAE: 68042722.4.0000.5327, and all participants signed informed consent prior to enrollment.

### 2.2 DATA COLLECTION

The data were collected by the team using a questionnaire with sociodemographic information, level of schooling, work practices, use of personal protection equipment (PPE), time of use of 2,4-D; health status and medications currently being used. The Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT) questionnaire was employed for the use of alcoholic beverages. Anthropometric data and physical examination of all participants in the study were performed. A quick test was applied for hepatitis B and C. Blood samples were collected for the evaluation of hematology, genotoxicity, oxidative stress and activity of

butyrylcholinesterase (BChE) enzyme. The samples were collected in the field, centrifuged, separated and the serum was transported in ice for analysis in Porto Alegre.

Biochemical and Hematological analyses: the following were analyzed: urea, creatinine (colorimetric method), AST and ALT (enzymatic method), alkaline phosphatase (colorimetric kinetic method (p-NNP – DG KC). Evaluation of blood count and platelets using the light absorbance/impedance/flow cytometry and butyrylcholinesterase (kinetic enzymatic) methods.

Oxidative Stress: lipoperoxidation levels were measured in serum using TBARS and expressed in nmol/mg of protein according to Buege and Aust, 1978. Protein concentration was determined using the method of Bradford, 1976. The activity of the antioxidant enzyme SOD was evaluated according to Misra and Fridovich, 1972 and data were expressed in USOD/min/mg prot. The activity of the CAT enzyme was evaluated according to Boveris and Chance, 1973 and the data expressed in pmoles/min/mg prot.

Genotoxicity was evaluated using the Micronucleus test in Buccal cell samples.

Micronucleus Cytome Assay (BMCyt) biomarkers of DNA damage (total number of MN, broken egg and nuclear buds – NBUDs; binucleated cells – BIN) were classified according to Thomas et al. (2009). Two thousand cells per individual were analyzed microscopically. Cells containing MN or NBUDs were confirmed as being positive.

The quantitative polymerase chain reaction q(PCR) was used to measure telomere length (TL). TL measurement followed the protocol described by Cawthon (2002), with minor modifications by Kahl et al. (2018). The genomic DNA was extracted using PureLink Genomic DNA isolation kit (Invitrogen, USA) and then quantified by NanoDrop™ Lite Spectophotometer (Cat. ND-LITE, Thermo Scientific™), and only samples between the range 1.7–2.0 (OD260/OD280) were used. Each sample were diluted at the time of use as per experimental requirement (5 ng/μL). A standard curve was established by serial dilution of known amounts of a DNA pool sample. In each run, pooled genomic DNA generated within the laboratory also was included. Standard DNA and reference sample was the same for all experiments. A melting curve analysis to verify the specificity and identity of the products were performed. All single reactions showing a single coefficient of variation (CV) value > 5% for either the TEL PCR or the 36B4 PCR will be checked and when the error will be identified, they are excluded from the analysis. To standard parameters recommended assay efficiency between 90% and 110% and an R 2 between 0.98 and 1. Individual samples with a standard deviation of cycle threshold (Ct) < 0,5 for the triplicate samples were included in the full analysis. The sequences of the primers used for the telomeric region gene and the control acid

ribosomal phosphoprotein PO (36B4) primers, forward and reverse were telomere primers (forward: 5′-GGTTTTTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGT-3′; reverse: 5′-CCCGACTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTA-3′) and of 36B4 primers (forward: 5′-CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC-3′; reverse: 5′-CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA-3′). Each reaction examining the telomere and 36B4 fragments included SYBR Green Power UP (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 0.2 μmol of the telomere, and 36B4 primers (forward and reverse), 20 ng genomic DNA, and enough water was added to yield a 20 μL reaction. For the telomere and 36B4 amplicons, qPCR was performed using the following reaction conditions: set at 95 ◦C for 10 min; followed by 40 cycles of denaturation at 95 ◦C for 15 s, and annealing and extension at 60 ◦C for 1 min. Data obtained from experiments were calculated according to the formula suggested by Dhillon et al. (2017), the Ct of each sample was used to convert the T/S ratio into TL in base pairs (bp) using the following equation: AX + B, where X = T/S ratio, A is the slope and B is the intercept from PCR equation. All samples were analyzed in triplicate, with negative control, lymphoblastic T-leukemia cell line 1301 as positive control and standard curve on each plate, using the Step One Plus ™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Urine samples were collected and stored in a polypropylene tube at -80ºC until later analysis. Details on the analysis to determine the 2,4-D, QuEChERS method modified by liquid chromatography (López A, 2016) are shown in the **Annex 3**.

The method Limit of Detection (LOD) was 0.030 μg/L and the Limit of Quantification (LOQ) was 0.100 μg/L. A separate aliquot of each urine sample was analyzed for creatinine.

## 2.3 STATISTICAL ANALYSIS

The sample size was calculated by program WINPEI, taking into account the differences between the averages of the quantitative variables (considering a power of 80% and an alpha of 0.05).

The quantitative variables were described by mean and standard deviation or median and interquartile range, depending on the data distribution.

The categorical variables were described by absolute and relative frequencies.

The Student t-test was applied to compare means between groups. The Mann-Whitney test was used for asymmetry. The Pearson chi-square test was applied to compare proportions.

The associations among the numerical variables with the 2,4-D concentrations were evaluated using the Spearman correlation test.

To adjust confounding factors (age or the use of antilipemics), generalized linear models (GLM) with Bonferroni adjustment or Poisson Regression Analysis were performed.

The level of significance adopted was 5% ($p \leq 0.05$) and the analyses were performed using SPSS program, version 28.0.

## 3. RESULTS

One hundred and five farmers were analyzed, 51 in the control group and 54 in the exposed group, as shown in **Table 1**.

**Table 1 - Demographic data, life style (N=105)**

| Variables | Controls (n=51) | Exposed (n=54) | p |
|---|---|---|---|
| **Sex – n (%)** | | | **<0.001** |
| Female | 16 (31.4) | 2 (3.7) | |
| Male | 35 (68.6) | 52 (96.3) | |
| **Age mean±SD** | 49.47± 12.20 | 46.91± 12.93 | 0.299 |
| **Schooling– n (%)** | | | |
| | | | 0.398 |
| Elementary school | 19 (37.3) | 27 (51) | |
| High school | 20 (39.2) | 18 (34) | |
| Higher Education | 12 (23.5) | 8 (15.1) | |

Source: the author.

As to provenance, all the controls were from the metropolitan region of Porto Alegre, while of the exposed 42.6% were from Passo Fundo, 20.4% were from Marau and 37% were from Casca.

**Table 2 – Risk fators (N = 105)**

| Variables | Controls (n=51) | Exposed (n=54) | p |
|---|---|---|---|
| **Classification of BMI – n (%)** | | | 0.570 |
| Below weight | 1 (2.0) | 1 (1.9) | |
| Normal | 19 (37.3) | 16 (29.6) | |
| Overweight | 21 (41.2) | 20 (37.0) | |
| Obesity | 10 (19.6) | 17 (31.5) | |
| | | | |
| **Use of PPE – n (%)** | | | |
| Mask | 10 (22.7) | 37 (69.8) | **<0.001** |
| Gloves | 26 (51.0) | 37 (69.8) | 0.078 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Consumer risk alcohol– n (%)** | 5/51 (9.8) | 2/53 (3.8) | 0.265 |
| **Smoking – n (%)** | 0/34 (0.0) | 3/53 (5.7) | 0.277 |
| **Hypertension – n (%)** | 15 (29.4) | 25 (46.3) | 0.114 |
| **Use of medications – n (%)** | | | |
| None | 31 (60.8) | 23 (42.6) | 0.095 |
| Anti-hypertensives | 6 (11.8) | 11 (20.4) | 0.352 |
| Antidepressive/neuromodulators | 5 (9.8) | 7 (13.0) | 0.840 |
| Antilipemic | 0 (0.0) | 7 (13.0) | **0.013** |
| Tenofovir | 1 (2.0) | 2 (3.7) | 1.000 |
| Others | 11 (21.6) | 8 (14.8) | 0.519 |
| **Time of exposure – n (%)** | | | - |
| Not exposed | 51 (100) | - | |
| From 5 to 9 years | - | 4 (7.5) | |
| From 10 to 19 years | - | 16 (30.2) | |
| From 20 to 29 years | - | 12 (22.6) | |
| 30 years or more | - | 21 (39.6) | |
| Planted area (ha) **– median (P25-P75)** | 9 (5 – 15) | 40 (28.5 – 70) | **<0.001** |
| **Time of last exposure (days) – median (P25 – P75)** | - | 20 (14 – 30) | - |

Variables Controls (n=51). Exposed (n=54). ha: acre.
Source: the author.

As to BMI, the groups were similar (p= 0.570). Use of PPE was reported by 69.8% of the exposed group and 22.7% of the control group, with a value of (p<0.001).

None of the farmers use the properly personal protective equipment (PPE). The mean pesticide exposure time was 30 years or more for almost 40% of those exposed.

Consumers at risk for alcohol were considered the individuals who consume more than two doses at least 2-3 times a week or 4 times or more a week. Thus, 9.8% of the controls are considered excessive alcohol consumers and 3.8% of the exposed presented this condition, without statistical significance (p=0.265).

Regarding the use of medications, 60% of the control individuals and 42.6% of the exposed were not using any. However, the use of antilipemic was significantly higher in the exposed group than in the controls (13% vs 0%. p=0.013).

The planting area of the exposed group was significantly greater than that of the control group (p<0.001).

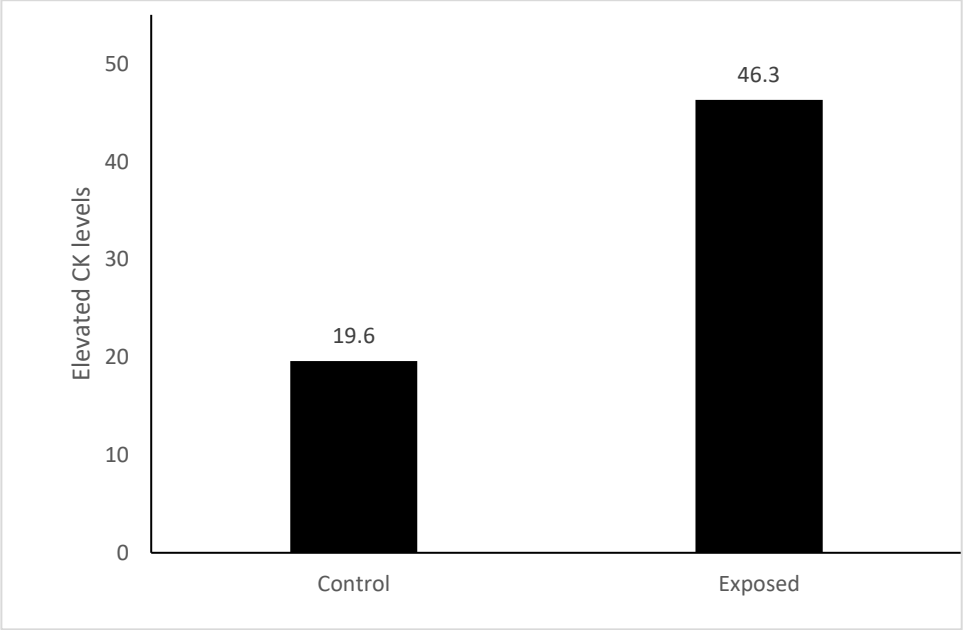
In the exposed group, most of the people were exposed to pesticides for many years, and the most prevalent time of exposure was 30 years or more (39.6%) and the time, as a median, of the last exposure to 2,4-D was 20 days.

The presence of Hepatitis B was above the average of the population of Rio Grande do Sul, 6.4% in the control group and 7.4% in the exposed group, without a statistically significant difference between the groups (p=1.000). Hepatitis C was not detected in any individual.

None of the biochemical variables analyzed were statistically significant, except for higher levels of CK in those exposed (p<0.05).

Even after the adjustments, the exposed group presented a higher prevalence of altered CK, increasing the prevalence of this alteration when exposure occurs by 128%.

**Figure 1 - Alteration of CK according to group**




Source: the author.

**Table 3 - Comparison between groups regarding laboratory tests**

| Variables | Controls (n=51) | Exposed (n=54) | p |
|---|---|---|---|
| **Hepatitis B – n/total (%)** | | | **1.000** |
| Negative | 44/47 (93,6) | 50/54 (92,6) | |
| Positive | 3/47 (6,4) | 4/54 (7,4) | |
| **AST** median (P25-P75) | 22 (17-27) (n=48) | 22 (18-27) (n=54) | 0,949 |
| **ALT** median (P25-P75) | 20,5 (15-3.,8) (n=48) | 27,5(19.8-32.5) (n=54) | 0,103 |
| **Alkaline phosphatase** median (P25-P75) | 22.5 (18-25.8) (n=44) | 14 (13-15) (n=54) | <0,001 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| **BChE (U/L) mean±SD** | 8139 ± 1648 (n=51) | 8844 ± 1556 (n=54) | 0,026 |
| **CK** – median (P25-P75) | 128 (92 – 184) | 187 (137 – 287) | <0,001 |

BChE: butyrylcholinesterase or plasmatic cholinesterase. Source: the author.

Presence of Hepatitis B was above the average for the population of the Rio Grande do Sul. 6,4% of group control and 7,4% in the exposed group, with no statistically significant difference between the groups (p=1.000).

Lower alkaline phosphatase values were found in those exposed (p<0.001), but all within the normal limit.

Butyrylcholinesterase: there was a significant difference between the groups, with a higher value between those exposed (p=0.026).

**Table 4 - Concentrations of 2,4-D measured in urine collected in a morning sample in growers (N=105)**

| Concentrations | Controls **(n=51)** | Exposed **(n=54)** | |
|---|---|---|---|
| | **Median (interquartile range)** | **Median (interquartile range)** | **p** |
| **2.4 D Cr (µg/g)** | 0.00 (0.00 to 0.02) | 0.43 (0.07 to 2.84) | <0.001 |
| **2.4 D (µg/L)** | 0.00 (0.00 to 0.03) | 0.29 (0,07 to1.71) | <0.001 |
| **2.4 D ≥ 0.03 µg/L (LOD)** | 6/24 (25.0) | 46/52 (88.5) | <0.001 |
| **2.4 D ≥ 0.10µg/L (LOQ)** | 3/24 (12.5) | 34/52 (65.4) | <0.001 |

LOD: Limit of detection of the method; LOQ: Limit of quantification of the method. Source: the author.

The urinary concentrations of 2,4-D were significantly higher in the exposed, both adjusted and non-adjusted (<0.001). 2,4-D was detected in 25% of the controls and 88.5% of the exposed.

**Table 5 – Associations with the concentration of 2,4-D in the group exposed to the pesticide**

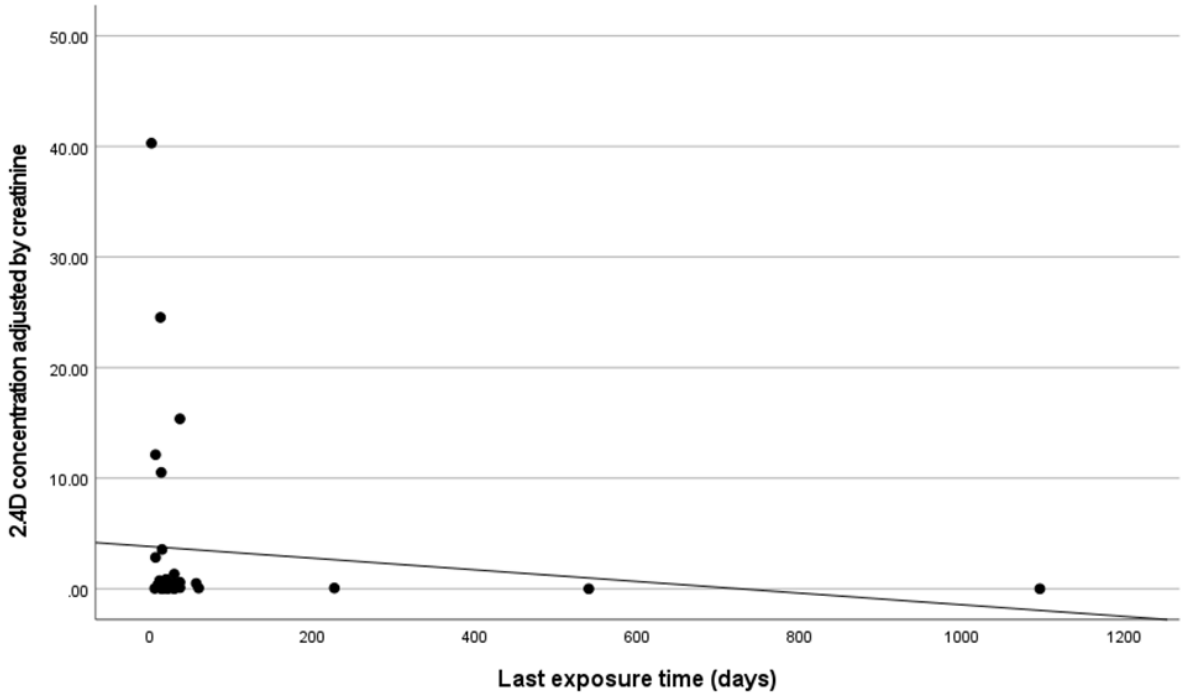
| **Variables** | **2.4 D Cr (µg/g)** | **p** | **2.4 D (µg/L)** | **p** |
|---|---|---|---|---|
| **Planting Area (ha) – Spearman correlation** | 0.279 | 0.050 | 0.240 | 0.089 |
| **Time since the last exposure (days) – Spearman correlation** | -0.37 | 0.027 | 0.362 | 0.035 |

Source: the author.

Inverse relationship to the time since the last exposure, i.e., higher median levels of 2,4-D in the urine were observed among those who had recently used 2,4-D in the soybean

plantations. Direct relationship between the planting area and the concentration adjusted by creatinine. i.e., the larger the planted area, the higher the concentration of 2,4-D.

**Figure 2 – Association between the concentrations of 2,4-D adjusted by creatinine and the time since the last exposure in the exposed group**




Source: the author.

## 3.1 OXIDATIVE STRESS

When the oxidative stress markers were evaluated, a significant difference was found in the parameters evaluated. Lipoperoxidation (LPO) evaluated using the Technique of the substances that react to thiobarbituric acid (TBARS) showed a significant elevation in the Exposed group compared to the Control group ($p<0.0001$).

When the activity of the antioxidant enzymes was evaluated (**Table 6**), catalase (CAT) was increased in the Exposed group. compared to the Control group ($p<0.0001$) and superoxide dismutase (SOD) was diminished in the Exposed group and increased in the Control group ($p<0.0001$).

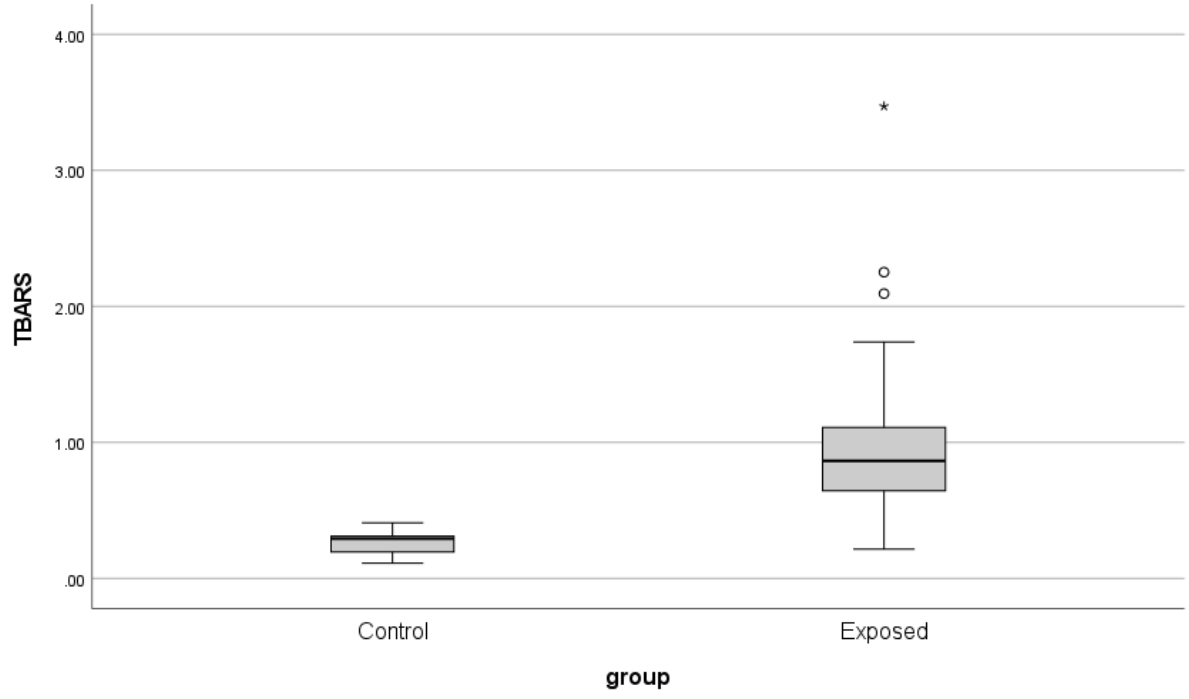
**Table 6 – Comparison between groups regarding the oxidative stress results**

| Variables | Controls (N=51) | Exposed (N=54) | p |
|---|---|---|---|
| **TBARS – median (P25 – P75)** | 0.29 (0.19-0.31) | 0.87 (0.64-1.11) | <0.001 |
| **CAT – mean ± SD** | 4.00 ± 1.27 | 7.53 ± 0.99 | <0.001 |
| **SOD – mean ± SD** | 864.50 ± 82.90 | 333.7 ± 56.40 | <0.001 |

Source: the author.

The exposed group presented significantly higher levels of TBARS and CAT and significantly lower levels of SOD.

**Figure 3 – TBARS values according to group.**




Source: the author.

The line inside the box represents the median and the inferior and superior limits of the box represent percentiles 25 and 75, respectively. The error bars are the minimum and maximum values expected for the sample and the circles and asterisks represent the extreme values of the groups.

## 3.2 GENOTOXICITY

Genotoxicity was evaluated by collecting oral mucosa cells to analyze micronuclei (MN), and quantitative polymerase chain reaction PCR) to measure telomere length (TL), according to **Table 7**.

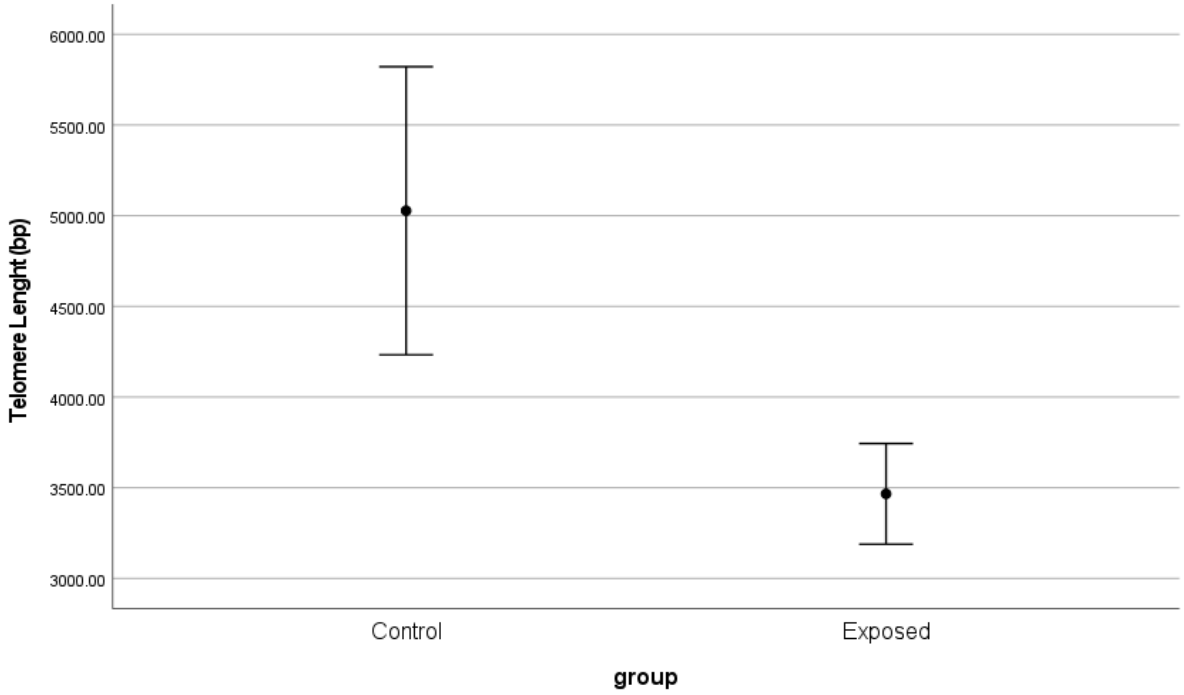
**Table 7 – Comparison between groups regarding the genotoxicity results**

| Variables | Controls (N=51) | Exposed (N=54) | p |
|---|---|---|---|
| | Median (P25 – P75) | Median (P25 – P75) | |
| **Binucleate** | 26 (19 – 33) | 20 (12 – 28) | 0.025 |
| **Micronuclei** | 7 (3 – 13) | 2 (1 – 3.5) | <0.001 |
| **BUD + BE** | 2 (1 – 7) | 4 (2 – 6.5) | 0.140 |
| **Telomeres**** | 4907 ± 1157* | 3531 ± 2270 | 0.001 |

*controls from another study (n=29), with mean age 29.8 years (± 13.2); **described as mean ± standard deviation (analysis adjusted by age). Source: the author.

As to genotoxicity, the exposed group presented significantly lower values of binucleates, micronuclei and telomeres.

**Figure 4 – Telomere length results using qPCR according to group**




Source: the author.

The circle represents the mean, and the inferior and superior error bars the limits of the 95% confidence interval for the mean.

## 4. DISCUSSION

The sample of growers who applied 2,4-D was majoritarily male, very similar to the studies by Alexander BH et al (22) and Bernieri. T (23). The region of the exposed was the area where soybeans are planted in southern Brazil.

As to risk factors, the first to be studied as the BMI, in the exposed and control groups, were equal to each other, without a statistical difference and similar to those of the Brazilian population in 2022 (24).

The prevalence of hypertension in the organic growers was similar to those of the Brazilian population in 2023, since 27.9%, while that of the exposed group was 10% (25).

As to schooling, the control group of the Porto Alegre region had a higher level of instruction, possibly due to the closeness to several teaching institutions. The group exposed mostly only had elementary education, as expected in the countries of Latin America.

The AUDIT scale was used to evaluate alcohol consumption and the variables analyzed were quantity of alcohol greater two doses than and frequency of alcohol consumption two to three times a week of four or more times a week.

Although there is some evidence of the cardioprotective effect of low quantities of ethanol, larger quantities increase mortality and cardiovascular risks. Alcohol has been associated with cancer, with doses of 10g/day. Patients with compensated advanced chronic liver disease must be advised against any alcohol consumption (26).

As to the use of protection equipment, 30% of the individuals exposed did not use PPE when it would have been ideal for 100% to do so, since the risk of intoxication and exposure increases and the main routes of exposure to 2.4-D are by inhalation, dermal contact and ingestion (8). The group that was exposed even when using PPE when compared to the control showed changes. We suggest pesticide use policies to avoid such exposures.

A difference in creatinophosphokinase (CK) was found between the exposed and the control, with higher levels among the exposed. In a study by Ann Emerg. Med 2006, CK is utilized in cases of intentional self-poisoning (27). After oral ingestion of chlorophenoxy herbicides, musculoskeletal effects occur which include muscle weakness and may go as far as rhabdomyolysis. Increased CK occurs together with myalgia and may be consistent with

continuous skeletal muscle toxicity. Although CK occurs early, it may be a biomarker of 2,4-D toxicity.

BChE leves was used as a quantitative estimation of pesticide exposure. Control group showed significantly lower BChE than exposed group. One would expect the opposite result if those exposed used organophosphates or carbamates (28), but 2,4-D is a herbicide and does not inhibit cholinesterase.

The liver function tests did not present a statistical difference in this study, but do not exclude liver toxicity. Ideally, a liver biopsy of all participants should be performed, but since this is an invasive method, it proved unfeasible due to ethical issues and also to cost.

For the first time in this study, 2,4-D was dosed in human beings in Brazil. According to some studies, the majority of the growers exposed (88.5%) had detectable levels of 2,4-D in urine, higher than in the study by Alexander et al, which was 70% of those who applied it, which found 2,4-D in 62% in the children and 41% in the spouses (22). In the study by Arbuckle et al. 2002, 2,4-D was detected in 79% of farmers who applied 2,4-D and reported its use (29).

According to some studies, the organic growers showed 2,4-D in 25% of the samples. The location of the control group may have drift, which explains the 2,4-D detections in the urine. A study of pregnant women detected 2,4-D in 97.4% of the urine samples (30).

The expected tendency to increase the use of 2,4-D and a prospect of more significant growth until 2030 raises concerns regarding changes in the exposure of the population (31).

As to finding a greater number of MN in the controls than in the exposed, these numbers are considered normal for the Brazilian population, according to a study by Rohr P, which showed a great variability in the frequencies of MN in healthy individuals within individual sets (32). The populations studied are from different places and made up of different origins; one of them was more diversified, close to the capital, and another was of Italian origin from soybean plantations.

As to the exposed, not finding micronuclei in some of them one may suppose that the damage to DNA can be repaired, since some growers had used pesticides over 30 days before, and 2,4-D is eliminated in about 24 hours in urine.

However, on analyzing the telomeres, the study showed significant damage to DNA, with a shortening of the telomere length in the agricultural workers exposed to 2,4-D. This association suggests that exposure to this herbicide may contribute to cell aging (20,33). Telomere shortening is associated with an increased cancer risk (34).

Toxicity has been evaluated in experimental studies, showing that 2,4-D can alter the antioxidant enzyme system in a dose-dependent form and promoting the occurrence of liver

damage (12,15,16). The toxicity of 2,4-D appears to be mediated by its pro-oxidant effect, favoring the production of reactive oxygen species (ERO) and free radicals. The latter could interact with biological molecules such as membrane lipids and mitochondria, proteins and DNA, causing a malfunction of the cell metabolism (36).

In this study the exposed growers had increased lipoperoxidation, which could be due to the increase of free radicals generated by 2,4-D. The high activity of CAT is due to the adaptive response to the ERO generated, indicating a possible alteration in the total antioxidant defense mechanism, resulting in a failure of the protection against the mechanical damage provoked by 2,4-D, as in the study by Prakasam et al (37). SOD in this study was diminished in the exposed group compared to the controls. Under physiological conditions, SOD activity may increase or diminish as a result of alterations in the biosynthesis of this enzyme and under conditions of oxidative stress. Damage in only one route of the antioxidant defense system would already be enough to significantly affect the defense mechanisms against the attack of free radicals in the cell (38).

CAT is increased by trying to metabolize products that are toxics. CAT catalyzes the conversion of two molecules H2O2 to O2 and water. On the other hand, SOD was reduced. The SODs remove the potentially dangerous superoxide anions from biological systems by converting them to H2O2. SOD is so activated that it eventually decreases (39).

## 5. FINAL CONSIDERATIONS

A few limitations of the study should be considered. It was not possible to evaluate at the same time environmental exposure and perform collection at different times, in different regions, and all pesticides used could not be analyzed. Brazilian farmers use several pesticides at the same time, and this study was focused on 2,4-D. Other pesticides were not analysed.

The purpose of this study was to deal with some aspects. Other studies of the group will provide a complementation, using microbiota data, nutritional aspects and transient liver elastography to evaluate liver fibrosis in this population.

The surveillance of workers' health by repeated measurements of urinary 2,4-D may supply comparative data of continued exposure over a period of time, with another design (cohort study) associating exposures and effects at different times and types of 2,4-D use, such as seasonal peaks and months of the year, as well as observations of work practices and the use of PPE (in substitution of the self-report of PPE use), with advantages over the cross-sectional study performed.

This study gave rise to the improvement of health surveillance and health care of the workers exposed, not only by passive surveillance but mainly through the active surveillance of the ensemble of the workers exposed, performance of clinical health tests, biomonitoring and laboratory tests, beside information and training of the workers and their representatives (unions).

## 6. CONCLUSION

This pioneering study biomonitors exposed people and doses 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in Brazilian farmers. Comparing the exposed group to the control group, we find urinary concentrations of 2,4-D that are significantly higher in the exposed.

This study showed that exposure to 2,4-D is associated with oxidative stress markers, through TBARS, CAT and SOD, and that exposure to 2,4-D may lead to damage to the DNA with telomere shortening.

The liver cells are especially vulnerable to the oxidative stress caused by toxic agents due to the primary role of the liver in drug metabolism (40). Although we have not observed a significant increase in the transaminase enzymes in growers exposed to the 2,4-D herbicide, the liver toxicity of this compound was evidenced by interference with the antioxidant enzymes and the occurrence of lipid peroxidation.

## 7. ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Sindicato dos Agricultores Rurais de Passo Fundo, Marau e Casca (Rural workers Union) and the Feira dos Agricultores Ecologistas Sul (Ecological Farmers' Market of the South) for allowing access to the farmers.

## 8. FUNDING

This research was supported in part by CAPES.

## 9. DISCLOSURE (AUTHORS)

The authors report no conflicts of interest.

## 10. REFERENCES


1. Pignati WA, Lima FANDSE, Lara SSD, Correa MLM, Barbosa JR, Leão LHDC, et al. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. Ciênc saúde coletiva. 2017 Oct;22(10):3281–93.

2. Vieira KC, Silva CT, Silva MMD, Costa ASVD. Potencial de contaminação ambiental dos herbicidas utilizados nas culturas do milho, soja e cana de açúcar. RSD. 2020 Aug 23;9(9):e417997442.

3. Lopes CVA, Albuquerque GSCD. Desafios e avanços no controle de resíduos de agrotóxicos no Brasil: 15 anos do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos. Cad Saúde Pública. 2021;37(2):e00116219.

4. Freitas L, Valadares LDA, Camozzi M, De Oliveira P, Ferreira Machado M, Lima F. Animal models in the neurotoxicology of 2,4-D. Hum Exp Toxicol. 2019 Oct;38(10):1178–82.

5. LaKind JS, Burns CJ, Naiman DQ. 2,4-D and NHANES: Sources of exposure and identification of data gaps. Hygiene and Environmental Health Advances. 2022 Dec;4:100023.

6. Lopes-Ferreira M, Maleski ALA, Balan-Lima L, Bernardo JTG, Hipolito LM, Seni-Silva AC, et al. Impact of Pesticides on Human Health in the Last Six Years in Brazil. IJERPH. 2022 Mar 9;19(6):3198.

7. Magnoli K, Carranza CS, Aluffi ME, Magnoli CE, Barberis CL. Herbicides based on 2,4-D: its behavior in agricultural environments and microbial biodegradation aspects. A review. Environ Sci Pollut Res. 2020 Nov;27(31):38501–12.

8. Humans IWG on the E of CR to. DDT, Lindane, and 2,4-D. Place of publication not identified: International Agency for Research on Cancer; 2018.

9. Smith AM, Smith MT, La Merrill MA, Liaw J, Steinmaus C. 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and risk of non-Hodgkin lymphoma: a meta-analysis accounting for exposure levels. Annals of Epidemiology. 2017 Apr;27(4):281-289.e4.

10. Garry VF, Tarone RE, Kirsch IR, Abdallah JM, Lombardi DP, Long LK, et al. Biomarker correlations of urinary 2,4-D levels in foresters: genomic instability and endocrine disruption. Environ Health Perspect. 2001 May;109(5):495–500.

11. Tanner CM, Ross GW, Jewell SA, Hauser RA, Jankovic J, Factor SA, et al. Occupation and Risk of Parkinsonism: A Multicenter Case-Control Study. Arch Neurol [Internet]. 2009 Sep 1 [cited 2024 Apr 29];66(9). Available from: http://archneur.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archneurol.2009.195

12. Tayeb W, Nakbi A, Trabelsi M, Attia N, Miled A, Hammami M. Hepatotoxicity induced by sub-acute exposure of rats to 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid based herbicide “Désormone lourd”. Journal of Hazardous Materials. 2010 Aug 15;180(1–3):225–33.

13. Dakhakhni TH, Raouf GA, Qusti SY. Evaluation of the toxic effect of the herbicide 2, 4-D on rat hepatocytes: an FT-IR spectroscopic study. Eur Biophys J. 2016 May;45(4):311–20.

14. Kubrak OI, Atamaniuk TM, Storey KB, Lushchak VI. Goldfish can recover after short-term exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetate: Use of blood parameters as vital biomarkers. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. 2013 Apr;157(3):259–65.

15. Nakbi A, Tayeb W, Grissa A, Issaoui M, Dabbou S, Chargui I, et al. Effects of olive oil and its fractions on oxidative stress and the liver's fatty acid composition in 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid-treated rats. Nutr Metab (Lond). 2010;7(1):80.

16. Ince S, Demirel HH, Zemheri-Navruz F, Arslan-Acaroz D, Kucukkurt I, Acaroz U, et al. Synergistic toxicity of ethanol and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid enhances oxidant status, DNA damage, inflammation, and apoptosis in rats. Environ Sci Pollut Res. 2022 Sep 9;30(4):10710–23.

17. Tayeb W, Nakbi A, Cheraief I, Miled A, Hammami M. Alteration of lipid status and lipid metabolism, induction of oxidative stress and lipid peroxidation by 2,4-dichlorophenoxyacetic herbicide in rat liver. Toxicology Mechanisms and Methods. 2013 Jul;23(6):449–58.

18. Leonardi S, Poma AMg, Colafarina S, D'Aloisio F, Scatigna M, Zarivi O, et al. Early genotoxic damage through micronucleus test in exfoliated buccal cells and occupational dust exposure in construction workers: a cross-sectional study in L'Aquila, Italy. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2020 Oct;203:110989.

19. Silva Pinto BG, Marques Soares TK, Azevedo Linhares M, Castilhos Ghisi N. Occupational exposure to pesticides: Genetic danger to farmworkers and manufacturing workers – A meta-analytical review. Science of The Total Environment. 2020 Dec;748:141382.

20. Kahl VFS, Da Silva J. Telomere Length and Its Relation to Human Health. In: Larramendy ML, editor. Telomere - A Complex End of a Chromosome [Internet]. InTech; 2016 [cited 2024 Apr 29]. Available from: http://www.intechopen.com/books/telomere-a-complex-end-of-a-chromosome/telomere-length-and-its-relation-to-human-health

21. Burns CJ, Swaen GMH. Review of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) biomonitoring and epidemiology. Critical Reviews in Toxicology. 2012 Oct;42(9):768–86.

22. Alexander BH, Mandel JS, Baker BA, Burns CJ, Bartels MJ, Acquavella JF, et al. Biomonitoring of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Exposure and Dose in Farm Families. Environ Health Perspect. março de 2007;115(3):370–6.

23. Bernieri T, Moraes MF, Ardenghi PG, Basso Da Silva L. Assessment of DNA damage and cholinesterase activity in soybean farmers in southern Brazil: High versus low

pesticide exposure. Journal of Environmental Science and Health, Part B. 2020 Apr 2;55(4):355–60.

24. SBCBM SB de CB e M. Obesidade atinge mais de 6,7 milhões de pessoas no Brasil em 2022 [Internet]. 2023 [cited 2024 Mar 13]. Available from: https://www.sbcbm.org.br/obesidade-atinge-mais-de-67-milhoes-de-pessoas-no-brasil-em-2022/

25. Brasil, Ministério da Saúde. Vigitel Brasil 2023: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico [Internet]. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Departamento de Análise Epidemiológica e Vigilância, editor. 2023 [cited 2024 Mar 27]. Available from: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel_brasil_2023.pdf

26. Romero-Gómez M, Arab JP, Oliveira CP, Hernández M, Arrese M, Cortez-Pinto H, et al. Is There a Safe Alcohol Consumption Limit for the General Population and in Patients with Liver Disease? Semin Liver Dis. 2024 Feb;44(01):069–78.

27. Roberts DM, Seneviratne R, Mohammed F, Patel R, Senarathna L, Hittarage A, et al. Intentional Self-Poisoning With the Chlorophenoxy Herbicide 4-Chloro-2-Methylphenoxyacetic Acid (MCPA). Annals of Emergency Medicine. 2005 Sep;46(3):275–84.

28. Bernieri T, Rodrigues D, Barbosa IR, Ardenghi PG, Basso da Silva L. Occupational exposure to pesticides and thyroid function in Brazilian soybean farmers. Chemosphere. 2019 Mar;218:425–9.

29. Arbuckle T, Burnett R, Cole D, Teschke K, Dosemeci M, Bancej C, et al. Predictors of herbicide exposure in farm applicators. International Archives of Occupational and Environmental Health. 2002 Aug 1;75(6):406–14.

30. Wang Y, Wan Y, Cao M, Wang A, Mahai G, He Z, et al. Urinary 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in Chinese pregnant women at three trimesters: Variability, exposure characteristics, and association with oxidative stress biomarkers. Chemosphere. 2022 Oct;304:135266.

31. Freisthler MS, Robbins CR, Benbrook CM, Young HA, Haas DM, Winchester PD, et al. Association between increasing agricultural use of 2,4-D and population biomarkers of exposure: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey, 2001–2014. Environ Health. 2022 Dec;21(1):23.

32. Rohr P, Da Silva GF, Vicentini VEP, Almeida IVD, Dos Santos RA, Takahashi CS, et al. Buccal micronucleus cytome assay: Inter-laboratory scoring exercise and micronucleus and nuclear abnormalities frequencies in different populations from Brazil. Toxicology Letters. 2020 Oct;333:242–50.

33. González M, Soloneski S, Reigosa MA, Larramendy ML. 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. 2005 Mar;19(2):289–97.

34. Gunes C, Avila AI, Rudolph KL. Telomeres in cancer. Differentiation. 2018 Jan;99:41–50.

35. Martins RX, Carvalho M, Maia ME, Flor B, Souza T, Rocha TL, et al. 2,4-D Herbicide-Induced Hepatotoxicity: Unveiling Disrupted Liver Functions and Associated Biomarkers. Toxics. 2024 Jan 2;12(1):35.

36. Tichati L, Trea F, Ouali K. Potential Role of Selenium Against Hepatotoxicity Induced by 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid in Albino Wistar Rats. Biol Trace Elem Res. 2020 Mar;194(1):228–36.

37. Prakasam A, Sethupathy S, Lalitha S. Plasma and RBCs antioxidant status in occupational male pesticide sprayers. Clinica Chimica Acta. 2001 Aug;310(2):107–12.

38. Bukowska B. Effects of 2,4-D and its metabolite 2,4-dichlorophenol on antioxidant enzymes and level of glutathione in human erythrocytes. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. 2003 Aug;135(4):435–41.

39. Sule RO, Condon L, Gomes AV. A Common Feature of Pesticides: Oxidative Stress—The Role of Oxidative Stress in Pesticide-Induced Toxicity. Zhou X, editor. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2022 Jan 19;2022:1–31.

40. Cichoż-Lach H. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. WJG. 2014;20(25):8082.

## 11. ANNEXES

### ANNEX 1 – QUESTIONNAIRE DEMOGRAPHIC DATA AND PESTICIDE EXPOSURE DATA

Data: _____ / Telefone: _____

Data de nascimento: _____ / Idade: _____

Sexo: _____

Grupo étnico: ( ) euro-descendente ( ) afrodescendente ( ) misto

Escolaridade:

( ) ensino médio completo ( ) ensino médio incompleto ( ) ensino fundamental completo ( ) ensino fundamental incompleto ( ) analfabeto

COMORBIDADES:

Hipertensão: ( ) Sim ( ) Não

Diabetes: ( ) Sim ( ) Não

Dislipidemia: ( ) Sim ( ) Não

Depressão ( ) Sim ( ) Não

Teste rápido hepatite B ( ) negativo ( ) Positivo

Teste rápido hepatite C ( ) negativo ( ) Positivo

Medicações em uso: _____

Suplementos: ( )Sim ( )Não / Se sim, quais? _____

Chás: ( )Sim ( ) Não / Se sim, quais? _____

ESPÉCIES CULTIVADAS: ( ) Uva ( ) Soja

EXPOSIÇÃO:

Idade de início da exposição:

Local onde trabalha:

Consome produtos com agrotóxicos: ( ) Sim ( ) Não

Já teve alguma intoxicação: ( ) Sim ( ) Não

Modo de exposição:

Aplicar ( ) Sim ( ) Não

Preparar ( ) Sim ( ) Não

Transportar: ( ) Sim ( ) Não

Ajudar na aplicação: ( ) Sim ( ) Não

Limpar equipamentos: ( ) Sim ( ) Não

Mistura: ( ) Sim. O que? _____ ( ) Não

Modo de aplicação:

Trator ( ) Sim ( ) Não

Mangueira ( ) Sim ( ) Não

Pulverizador ( ) Sim ( ) Não

CONDIÇÕES DE PROTEÇÃO INDIVIDUAL:

Utiliza Equipamento de Proteção Individual (EPI)? ( ) Sim ( ) Não

Se não, qual o motivo? ( ) Mal estar ( ) Desconforto ( ) Asfixia

EPIs utilizados

Luvas ( ) Sim ( ) Não

Óculos ( ) Sim ( ) Não

Botas ( ) Sim ( ) Não

Máscara ( ) Sim ( ) Não

Manga longa ( ) Sim ( ) Não

Calça ( ) Sim ( ) Não

Frequência de uso EPIs:

_____x/semana

Durante toda a jornada de trabalho ( ) Sim ( ) Não

_____horas/dia

PESTICIDAS UTILIZADOS

Fungicidas:

O ano inteiro ( ) Sim ( ) Não

Apenas na época da Safra ( ) Sim ( ) Não

Do mês_____a_____ _____x/semana _____x/mês

Herbicidas:

O ano inteiro ( )Sim ( )Não

Apenas na época da Safra ( )Sim ( )Não

Do mês_____a_____ _____x/semana _____x/mês

Inseticidas:

O ano inteiro ( )Sim ( )Não

Apenas na época da Safra ( )Sim ( )Não

Do mês_____a_____ _____x/semana _____x/mês

## ANNEX 2 – AUDIT QUESTIONNAIRE

1. Com que frequência consome bebidas que contêm álcool?
   0 = nunca
   1 = uma vez por mês ou menos
   2 = duas a quatro vezes por mês
   3 = duas a três vezes por semanas

4 = quatro ou mais vezes por semana

2. Quando bebe, quantas bebidas contendo álcool consome num dia normal?
   0 = uma ou duas
   1 = três ou quatro
   2 = cinco ou seis
   3 = de sete a nove
   4 = dez ou mais

3. Com que frequência consome seis bebidas ou mais numa única ocasião?
   0 = nunca
   1 = menos de uma vez por mês
   2 = pelo menos uma vez por mês
   3 = pelo menos uma vez por semana
   4 = diariamente ou quase diariamente

4. Nos últimos 12 meses, com que frequência se apercebeu de que não conseguia parar de beber depois de começar?
   0 = nunca
   1 = menos de uma vez por mês
   2 = pelo menos uma vez por mês
   3 = pelo menos uma vez por semana
   4 = diariamente ou quase diariamente

5. Nos últimos 12 meses, com que frequência não conseguiu cumprir as tarefas que habitualmente lhe exigem por ter bebido?
   0 = nunca
   1 = menos de uma vez por mês
   3 = pelo menos uma vez por mês
   3 = pelo menos uma vez por semana
   4 = diariamente ou quase diariamente

6. Nos últimos 12 meses, com que frequência precisou de beber logo de manhã para "curar" uma ressaca?
   0 = nunca
   1 = menos de uma vez por mês
   2 = pelo menos uma vez por mês
   3 = pelo menos uma vez por semana
   4 = diariamente ou quase diariamente

7. Nos últimos 12 meses, com que frequência teve sentimento de culpa ou de remorsos por ter bebido?
   0 = nunca
   1 = menos de uma vez por mês
   2 = pelo menos uma vez por mês
   3 = pelo menos uma vez por semana
   4 = diariamente ou quase diariamente

8. Nos últimos 12 meses, com que frequência não se lembrou do que aconteceu na noite anterior por causa de ter bebido?

0 = nunca
1 = menos de uma vez por mês
2 = pelo menos uma vez por mês
3 = pelo menos uma vez por semana
4 = diariamente ou quase diariamente

9. Já alguma vez ficou ferido ou ficou alguém ferido por você ter bebido?
   0 = não
   1 = sim, mas não nos últimos 12 meses
   2 = sim, aconteceu nos últimos 12 meses

10. Já alguma vez um familiar, amigo, médico ou profissional de saúde manifestou preocupação pelo seu consumo de álcool ou sugeriu que deixasse de beber?
   0 = não
   1 = sim, mas não nos últimos 12 meses
   2 = sim, aconteceu nos últimos 12 meses

## ANNEX 3 – METHOD OF ANALYSIS FOR THE PESTICIDE (2,4-D) IN URINE

For sample preparation, a modified QuEChERS method was employed, in which 10 mL of urine (previously centrifuged at 6000 rpm for 3 min; pH 5) were extracted with 2 mL of acidified acetonitrile. The partitioning step was performed using magnesium sulfate and sodium chloride. Subsequently, a cleanup step of the extract was carried out employing dispersive solid-phase extraction, in which an aliquot of the supernatant was mixed with magnesium sulfate, PSA, and C18. The obtained extract was diluted (1:4, v/v) in ultrapure water and filtered, followed by analysis using ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS).

For the determination of the pesticide 2,4-D in urine samples, a UHPLC-MS/MS system Xevo® TQ-XS (Waters, USA) and an analytical column Acquity UPLC® HSS T3 (2.1 × 100 mm, 1.8 μm particle size) were used. The mobile phase consisted of (A) water and (B) acetonitrile: methanol (1:1, v/v), both containing 0.1% (v/v) formic acid and 5 mmol L-1 ammonium formate, at a constant flow rate of 0.5 mL min-1. The injection volume was 5 μL, and the total analysis time was 19 min.

## 9 LIMITAÇÕES DO ESTUDO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Algumas limitações do estudo devem ser consideradas.

As bilirrubinas não foram mensuradas por motivos financeiros, e a glicose sérica não foi medida devido a problemas técnicos na máquina de processamento. Seria melhor se várias coletas de urinas fossem realizadas para a análise do 2,4-D em dias diferentes, assim provavelmente se acharia valores muito mais altos nos expostos.

Não foi possível avaliar ao mesmo tempo, exposição ambiental e realizar coleta em tempos diferentes, regiões diferentes, não conseguir analisar todos os agrotóxicos que são utilizados.

Exames de função hepática não foram diferentes entre os grupos. Para se excluir hepatotoxicidade, seria necessário realizar biópsia hepática em todos os participantes, o que não é possível tanto pelo custo quanto por questões éticas. Outros estudos do grupo complementarão com dados de microbiota, aspectos nutricionais e elastografia hepática transitória para avaliação de fibrose hepática nessa população.

Concentrações urinárias de 2,4-D mais altas foram observadas nos expostos do que nos controles, o que era esperado pois são populações em risco.

O aumento do estresse oxidativo foi encontrado nos indivíduos expostos ao 2,4-D.

A genotoxicidade foi encontrada através do encurtamento dos telômeros no grupo exposto.

A vigilância da saúde dos trabalhadores, através de medições repetidas de 2,4-D urinário podem fornecer dados comparativos de exposição continuada ao longo de um período de tempo, com outro delineamento (estudo de coorte), associando exposições e efeitos em diferentes tipos e momentos de uso do 2,4-D,tais como picos sazonais e meses do ano, bem como observações das práticas de trabalho e uso de EPI (em substituição ao autorrelato do uso de EPI), com vantagens sobre o estudo transversal realizado.

Por conseguinte, esse estudo suscita o aprimoramento da vigilância em saúde e da atenção à saúde dos trabalhadores expostos, não apenas através da vigilância passiva, mas, principalmente, através da vigilância ativa do conjunto dos trabalhadores expostos, realização de exames clínicos de saúde, biomonitoramento e exames laboratoriais, além de informação e capacitação dos trabalhadores e seus representantes (sindicatos).

## 10 CONCLUSÕES

O aumento da peroxidação lipídica e da atividade das enzimas antioxidantes nos expostos ao 2,4-D evidenciou a presença de estresse oxidativo. Exames de bioquímica não demonstraram diferenças significativas entre os grupos, mas a genotoxicidade ficou bem

caracterizada pela diminuição dos telômeros no grupo exposto. Também foi possível pela primeira vez, no Brasil, realizar o biomonitoramento do 2,4-D em humanos.

## 11 REFERÊNCIAS


1. PIGNATI, Wanderlei Antonio; LIMA, Francco Antonio Neri De Souza E; LARA, Stephanie Sommerfeld De; et al. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. Ciência & Saúde Coletiva, v. 22, n. 10, p. 3281–3293, 2017.

2. VIEIRA, Keila Cristina; SILVA, Cícero Teixeira; SILVA, Marcio Marques Da; et al. Potencial de contaminação ambiental dos herbicidas utilizados nas culturas do milho, soja e cana de açúcar. Research, Society and Development, v. 9, n. 9, p. e417997442, 2020.

3. LOPES, Carla Vanessa Alves; ALBUQUERQUE, Guilherme Souza Cavalcanti De. Desafios e avanços no controle de resíduos de agrotóxicos no Brasil: 15 anos do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos. Cadernos de Saúde Pública, v. 37, n. 2, p. e00116219, 2021.

4. CEPEA/ESALQ. Exportação: pelo quarto ano consecutivo, agronegócio registra recorde de faturamento. Disponível em: <https://www.agrimidia.com.br/negocios/economia/exportacao/exportacao-pelo-quarto-ano-consecutivo-agronegocio-registra-recorde-de-faturamento/>. Acesso em: 2 mar. 2024.

5. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Soja em números (safra 2022/23). Disponível em: <https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>. Acesso em: 27 jan. 2024.

6. BRASIL, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos. Relatórios de comercialização de agrotóxicos. Disponível em: <https://www.gov.br/ibama/ pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>. Acesso em: 13 fev. 2024.

7. MARTINS, Rafael Xavier; CARVALHO, Matheus; MAIA, Maria Eduarda; et al. 2,4-D Herbicide-Induced Hepatotoxicity: Unveiling Disrupted Liver Functions and Associated Biomarkers. Toxics, v. 12, n. 1, p. 35, 2024.

8. TAYEB, Wafa; NAKBI, Amel; TRABELSI, Mounir; et al. Hepatotoxicity induced by sub-acute exposure of rats to 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid based herbicide “Désormone lourd”. Journal of Hazardous Materials, v. 180, n. 1–3, p. 225–233, 2010.

9. NAKBI, Amel; TAYEB, Wafa; GRISSA, Abir; et al. Effects of olive oil and its fractions on oxidative stress and the liver’s fatty acid composition in 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid-treated rats. Nutrition & Metabolism, v. 7, n. 1, p. 80, 2010.

10. SHAFEEQ, Sehrish; MAHBOOB, Tabassum. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid induced hepatic and renal toxicological perturbations in rat model: Attenuation by selenium supplementation. Toxicology and Industrial Health, v. 37, n. 3, p. 152–163, 2021.

11. FREITAS, Lm; VALADARES, Lp De Assis; CAMOZZI, Mgm; et al. Animal models in the neurotoxicology of 2,4-D. Human & Experimental Toxicology, v. 38, n. 10, p. 1178–1182, 2019.

12. SONG, Yaling. Insight into the mode of action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) as an herbicide. Journal of Integrative Plant Biology, v. 56, n. 2, p. 106–113, 2014.

13. ISLAM, Faisal; FAROOQ, Muhammad A.; GILL, Rafaqat A.; et al. 2,4-D attenuates salinity-induced toxicity by mediating anatomical changes, antioxidant capacity and cation transporters in the roots of rice cultivars. Scientific Reports, v. 7, n. 1, p. 10443, 2017.

14. ISLAM, Faisal; WANG, Jian; FAROOQ, Muhammad A.; et al. Potential impact of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on human and ecosystems. Environment International, v. 111, p. 332–351, 2018.

15. LI, Jiulong; JI, Xu; LI, Chang; et al. Solubility measurement and thermodynamic correlation of (2,4-dichlorophenoxy) acetic acid in fifteen pure solvents. The Journal of Chemical Thermodynamics, v. 163, p. 106589, 2021.

16. MAGNOLI, Karen; CARRANZA, Cecilia Soledad; ALUFFI, Melisa Eglé; et al. Herbicides based on 2,4-D: its behavior in agricultural environments and microbial biodegradation aspects. A review. Environmental Science and Pollution Research, v. 27, n. 31, p. 38501–38512, 2020.

17. LIU, Wenbin; LI, Haifeng; TAO, Fang; et al. Formation and contamination of PCDD/Fs, PCBs, PeCBz, HxCBz and polychlorophenols in the production of 2,4-D products. Chemosphere, v. 92, n. 3, p. 304–308, 2013.

18. MERINI, Luciano J.; CUADRADO, Virginia; FLOCCO, Cecilia G.; et al. Dissipation of 2,4-D in soils of the Humid Pampa region, Argentina: A microcosm study. Chemosphere, v. 68, n. 2, p. 259–265, 2007.

19. CHINALIA, F.A.; KILLHAM, K.S. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) biodegradation in river sediments of Northeast-Scotland and its effect on the microbial communities (PLFA and DGGE). Chemosphere, v. 64, n. 10, p. 1675–1683, 2006.

20. HUMANS, IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to. DDT, Lindane, and 2,4-D. Place of publication not identified: International Agency for Research on Cancer, 2018.

21. BURNS, Carol J.; SWAEN, Gerard M. H. Review of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) biomonitoring and epidemiology. Critical Reviews in Toxicology, v. 42, n. 9, p. 768–786, 2012.

22. WANG, Yan; WAN, Yanjian; CAO, Meiling; et al. Urinary 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in Chinese pregnant women at three trimesters: Variability, exposure characteristics, and association with oxidative stress biomarkers. Chemosphere, v. 304, p. 135266, 2022.

23. LAKIND, Judy S.; BURNS, Carol J.; NAIMAN, Daniel Q. 2,4-D and NHANES: Sources of exposure and identification of data gaps. Hygiene and Environmental Health Advances, v. 4, p. 100023, 2022.

24. ALEXANDER, Bruce H.; MANDEL, Jack S.; BAKER, Beth A.; et al. Biomonitoring of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Exposure and Dose in Farm Families. Environmental Health Perspectives, v. 115, n. 3, p. 370–376, 2007.

25. THOMAS, Kent W; DOSEMECI, Mustafa; HOPPIN, Jane A; et al. Urinary biomarker, dermal, and air measurement results for 2,4-D and chlorpyrifos farm applicators in the Agricultural Health Study. Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology, v. 20, n. 2, p. 119–134, 2010.

26. LOPES-FERREIRA, Monica; MALESKI, Adolfo Luis Almeida; BALAN-LIMA, Leticia; et al. Impact of Pesticides on Human Health in the Last Six Years in Brazil. International Journal of Environmental Research and Public Health, v. 19, n. 6, p. 3198, 2022.

27. DE CASTRO LIMA, José Augusto Monteiro; LABANOWSKI, Jérôme; BASTOS, Marília Camotti; et al. “Modern agriculture” transfers many pesticides to watercourses: a case study of a representative rural catchment of southern Brazil. Environmental Science and Pollution Research, v. 27, n. 10, p. 10581–10598, 2020.

28. BAND, Pierre R.; ABANTO, Zenaida; BERT, Joel; et al. Prostate cancer risk and exposure to pesticides in British Columbia Farmers. The Prostate, v. 71, n. 2, p. 168–183, 2011.

29. SMITH, Adam M.; SMITH, Martyn T.; LA MERRILL, Michele A.; et al. 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and risk of non-Hodgkin lymphoma: a meta-analysis accounting for exposure levels. Annals of Epidemiology, v. 27, n. 4, p. 281-289.e4, 2017.

30. GARRY, V F; TARONE, R E; KIRSCH, I R; et al. Biomarker correlations of urinary 2,4-D levels in foresters: genomic instability and endocrine disruption. Environmental Health Perspectives, v. 109, n. 5, p. 495–500, 2001.

31. TANNER, Caroline M.; ROSS, G. Webster; JEWELL, Sarah A.; et al. Occupation and Risk of Parkinsonism: A Multicenter Case-Control Study. Archives of Neurology, v. 66, n. 9, 2009. Disponível em: <http://archneur.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archneurol.2009.195>. Acesso em: 29 abr. 2024.

32. SCHNEIDER MEDEIROS, Márcio; P. REDDY, Sumanth; P. SOCAL, Mariana; et al. Occupational pesticide exposure and the risk of death in patients with Parkinson’s

disease: an observational study in southern Brazil. Environmental Health, v. 19, n. 1, p. 68, 2020.

33. SAUERHOFF, M.W.; BRAUN, W.H.; BLAU, G.E.; et al. The fate of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) following oral administration to man. Toxicology, v. 8, n. 1, p. 3–11, 1977.

34. AYLWARD, Lesa L.; MORGAN, Marsha K.; ARBUCKLE, Tye E.; *et al.* Biomonitoring Data for 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid in the United States and Canada: Interpretation in a Public Health Risk Assessment Context Using Biomonitoring Equivalents. Environmental Health Perspectives, v. 118, n. 2, p. 177–181, 2010.

35. GIANNINI, E. G. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. Canadian Medical Association Journal, v. 172, n. 3, p. 367–379, 2005.

36. KUBRAK, Olga I.; ATAMANIUK, Tetiana M.; STOREY, Kenneth B.; et al. Goldfish can recover after short-term exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetate: Use of blood parameters as vital biomarkers. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, v. 157, n. 3, p. 259–265, 2013.

37. DAKHAKHNI, Tahani H.; RAOUF, Gehan A.; QUSTI, Safaa Y. Evaluation of the toxic effect of the herbicide 2, 4-D on rat hepatocytes: an FT-IR spectroscopic study. European Biophysics Journal, v. 45, n. 4, p. 311–320, 2016.

38. TICHATI, Lazhari; TREA, Fouzia; OUALI, Kheireddine. Potential Role of Selenium Against Hepatotoxicity Induced by 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid in Albino Wistar Rats. Biological Trace Element Research, v. 194, n. 1, p. 228–236, 2020.

39. LEONARD, C; BURKE, C M; O'KEANE, C; et al. "Golf ball liver": agent orange hepatitis. Gut, v. 40, n. 5, p. 687–688, 1997.

40. CICHOŻ-LACH, Halina. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. World Journal of Gastroenterology, v. 20, n. 25, p. 8082, 2014.

41. BLOCK, G. Factors Associated with Oxidative Stress in Human Populations. American Journal of Epidemiology, v. 156, n. 3, p. 274–285, 2002.

42. SULE, Rasheed O.; CONDON, Liam; GOMES, Aldrin V. A Common Feature of Pesticides: Oxidative Stress—The Role of Oxidative Stress in Pesticide-Induced Toxicity. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, v. 2022, p. 1–31, 2022.

43. INCE, Sinan; DEMIREL, Hasan Huseyin; ZEMHERI-NAVRUZ, Fahriye; et al. Synergistic toxicity of ethanol and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid enhances oxidant status, DNA damage, inflammation, and apoptosis in rats. Environmental Science and Pollution Research, v. 30, n. 4, p. 10710–10723, 2022.

44. PRAKASAM, A.; SETHUPATHY, S.; LALITHA, S. Plasma and RBCs antioxidant status in occupational male pesticide sprayers. Clinica Chimica Acta, v. 310, n. 2, p. 107–112, 2001.

45. LERRO, Catherine C.; BEANE FREEMAN, Laura E.; PORTENGEN, Lützen; et al. A longitudinal study of atrazine and 2,4-D exposure and oxidative stress markers among iowa corn farmers. Environmental and Molecular Mutagenesis, v. 58, n. 1, p. 30–38, 2017.

46. MAHMOUDINIA, Samira; NIAPOUR, Ali; GHASEMI HAMIDABADI, Hatef; et al. 2,4-D causes oxidative stress induction and apoptosis in human dental pulp stem cells (hDPSCs). Environmental Science and Pollution Research, v. 26, n. 25, p. 26170–26183, 2019.

47. AMEL, Nakbi; WAFA, Tayeb; SAMIA, Dabbou; et al. Extra virgin olive oil modulates brain docosahexaenoic acid level and oxidative damage caused by 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid in rats. Journal of Food Science and Technology, v. 53, n. 3, p. 1454–1464, 2016.

48. LEONARDI, Sara; POMA, Anna Mg.; COLAFARINA, Sabrina; et al. Early genotoxic damage through micronucleus test in exfoliated buccal cells and occupational dust exposure in construction workers: a cross-sectional study in L'Aquila, Italy. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 203, p. 110989, 2020.

49. SILVA PINTO, Bruna Gabriele; MARQUES SOARES, Tábatta Kim; AZEVEDO LINHARES, Maristela; et al. Occupational exposure to pesticides: Genetic danger to farmworkers and manufacturing workers – A meta-analytical review. Science of The Total Environment, v. 748, p. 141382, 2020.

50. TOLBERT, Paige E.; SHY, Carl M.; ALLEN, James W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, v. 271, n. 1, p. 69–77, 1992.

51. KAHL, Vivian F.S.; DA SILVA, Juliana. Telomere Length and Its Relation to Human Health. In: LARRAMENDY, Marcelo L. (Org.). Telomere - A Complex End of a Chromosome. [s.l.]: InTech, 2016. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/telomere-a-complex-end-of-a-chromosome/telomere-length-and-its-relation-to-human-health>. Acesso em: 29 abr. 2024.

52. DA SILVA, J.; MORAES, C. R.; HEUSER, V. D.; et al. Evaluation of genetic damage in a Brazilian population occupationally exposed to pesticides and its correlation with polymorphisms in metabolizing genes. Mutagenesis, v. 23, n. 5, p. 415–422, 2008.

53. GONZÁLEZ, M.; SOLONESKI, S.; REIGOSA, M.A.; et al. 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, v. 19, n. 2, p. 289–297, 2005.

54. HOU, Lifang; ANDREOTTI, Gabriella; BACCARELLI, Andrea A.; et al. Lifetime Pesticide Use and Telomere Shortening among Male Pesticide Applicators in the

Agricultural Health Study. Environmental Health Perspectives, v. 121, n. 8, p. 919–924, 2013.

55. KAHL, Vívian F Silva; DHILLON, Varinderpal Singh; SIMON, Daniel; et al. Chronic occupational exposure endured by tobacco farmers from Brazil and association with DNA damage. Mutagenesis, v. 33, n. 2, p. 119–128, 2018.

56. SAAD-HUSSEIN, Amal; BESHIR, Safia; TAHA, Mona M.; et al. Early prediction of liver carcinogenicity due to occupational exposure to pesticides. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, v. 838, p. 46–53, 2019.

57. FORSTER, Genevieve M.; BROWN, Dustin G.; DOOLEY, Gregory P.; et al. Multiresidue Analysis of Pesticides in Urine of Healthy Adult Companion Dogs. Environmental Science & Technology, v. 48, n. 24, p. 14677–14685, 2014.

58. LÓPEZ, Antonio; DUALDE, Pablo; YUSÀ, Vicent; et al. Retrospective analysis of pesticide metabolites in urine using liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. Talanta, v. 160, p. 547–555, 2016.

## ANEXO A – QUESTIONÁRIO DADOS DEMOGRÁFICOS E DADOS DE EXPOSIÇÃO A PESTICIDAS

Data: _____ / Telefone: _____

Data de nascimento: _____ / Idade: _____

Sexo: _____

Grupo étnico: ( ) euro-descendente ( ) afrodescendente ( ) misto

Escolaridade:

( ) ensino médio completo ( ) ensino médio incompleto ( ) ensino fundamental completo ( ) ensino fundamental incompleto ( ) analfabeto

COMORBIDADES:

Hipertensão: ( ) Sim ( ) Não

Diabetes: ( ) Sim ( ) Não

Dislipidemia: ( ) Sim ( ) Não

Depressão ( ) Sim ( ) Não

Teste rápido hepatite B ( ) negativo ( ) Positivo

Teste rápido hepatite C ( ) negativo ( ) Positivo

Medicações em uso: _____

Suplementos: ( )Sim ( )Não / Se sim, quais? _____

Chás: ( )Sim ( ) Não / Se sim, quais? _____

ESPÉCIES CULTIVADAS: ( ) Uva ( ) Soja

EXPOSIÇÃO:

Idade de início da exposição:

Local onde trabalha:

Consome produtos com agrotóxicos: ( ) Sim ( ) Não

Já teve alguma intoxicação: ( ) Sim ( ) Não

Modo de exposição:

Aplicar ( ) Sim ( ) Não

Preparar ( ) Sim ( ) Não

Transportar: ( ) Sim ( ) Não

Ajudar na aplicação: ( ) Sim ( ) Não

Limpar equipamentos: (  ) Sim  (  ) Não

Mistura: (  ) Sim. O que? _____  (  ) Não

Modo de aplicação:

Trator (  ) Sim  (  ) Não

Mangueira (  ) Sim  (  ) Não

Pulverizador (  ) Sim  (  ) Não

CONDIÇÕES DE PROTEÇÃO INDIVIDUAL:

Utiliza Equipamento de Proteção Individual (EPI)? (  ) Sim  (  ) Não

Se não, qual o motivo? (  ) Mal estar (  ) Desconforto  (  ) Asfixia

EPIs utilizados

Luvas (  ) Sim  (  ) Não

Óculos (  ) Sim  (  ) Não

Botas (  ) Sim  (  ) Não

Máscara (  ) Sim  (  ) Não

Manga longa (  ) Sim  (  ) Não

Calça (  ) Sim  (  ) Não

Frequência de uso EPIs:

_____x/semana

Durante toda a jornada de trabalho (  ) Sim  (  ) Não

_____horas/dia

PESTICIDAS UTILIZADOS

Fungicidas:

O ano inteiro (  ) Sim  (  ) Não

Apenas na época da Safra (  ) Sim  (  ) Não

Do mês_____a_____  _____x/semana  _____x/mês

Herbicidas:

O ano inteiro (  )Sim  (  )Não

Apenas na época da Safra (  )Sim  (  )Não

Do mês_____a_____  _____x/semana  _____x/mês

Inseticidas:

O ano inteiro (  )Sim  (  )Não

Apenas na época da Safra (  )Sim  (  )Não

Do mês_____a_____  _____x/semana  _____x/mês

## ANEXO B – QUESTIONÁRIO AUDIT

11. Com que frequência consome bebidas que contêm álcool?
    0 = nunca
    1 = uma vez por mês ou menos
    2 = duas a quatro vezes por mês
    3 = duas a três vezes por semanas
    4 = quatro ou mais vezes por semana

12. Quando bebe, quantas bebidas contendo álcool consome num dia normal?
    0 = uma ou duas
    1 = três ou quatro
    2 = cinco ou seis
    3 = de sete a nove
    4 = dez ou mais

13. Com que frequência consome seis bebidas ou mais numa única ocasião?
    0 = nunca
    1 = menos de uma vez por mês
    2 = pelo menos uma vez por mês
    3 = pelo menos uma vez por semana
    4 = diariamente ou quase diariamente

14. Nos últimos 12 meses, com que frequência se apercebeu de que não conseguia parar de beber depois de começar?
    0 = nunca
    1 = menos de uma vez por mês
    2 = pelo menos uma vez por mês
    3 = pelo menos uma vez por semana
    4 = diariamente ou quase diariamente

15. Nos últimos 12 meses, com que frequência não conseguiu cumprir as tarefas que habitualmente lhe exigem por ter bebido?
    0 = nunca
    1 = menos de uma vez por mês
    4 = pelo menos uma vez por mês
    3 = pelo menos uma vez por semana
    4 = diariamente ou quase diariamente

16. Nos últimos 12 meses, com que frequência precisou de beber logo de manhã para "curar" uma ressaca?
    0 = nunca
    1 = menos de uma vez por mês
    2 = pelo menos uma vez por mês
    3 = pelo menos uma vez por semana
    4 = diariamente ou quase diariamente

17. Nos últimos 12 meses, com que frequência teve sentimento de culpa ou de remorsos por ter bebido?
    0 = nunca
    1 = menos de uma vez por mês
    2 = pelo menos uma vez por mês
    3 = pelo menos uma vez por semana
    4 = diariamente ou quase diariamente

18. Nos últimos 12 meses, com que frequência não se lembrou do que aconteceu na noite anterior por causa de ter bebido?
    0 = nunca
    1 = menos de uma vez por mês
    2 = pelo menos uma vez por mês
    3 = pelo menos uma vez por semana
    4 = diariamente ou quase diariamente

19. Já alguma vez ficou ferido ou ficou alguém ferido por você ter bebido?
    0 = não
    1 = sim, mas não nos últimos 12 meses
    2 = sim, aconteceu nos últimos 12 meses

20. Já alguma vez um familiar, amigo, médico ou profissional de saúde manifestou preocupação pelo seu consumo de álcool ou sugeriu que deixasse de beber?
    0 = não
    1 = sim, mas não nos últimos 12 meses
    2 = sim, aconteceu nos últimos 12 meses

## ANEXO C – REAÇÃO QUANTITATIVA EM CADEIA DA POLIMERASE (QPCR) PARA MEDIÇÃO DO COMPRIMENTO DO TELÔMERO (TL)

A medição do TL seguiu o protocolo descrito por Cawthon (2002), com pequenas modificações por Kahl et al. (2018). O DNA genômico foi extraído usando o kit de isolamento PureLink Genomic DNA (Invitrogen, EUA) e depois quantificado pelo espectrofotômetro NanoDrop™ Lite (Cat. ND-LITE, Thermo Scientific™), e apenas amostras entre a faixa 1,7–2,0 (OD260/OD280) foram usados. Cada amostra foi diluída no momento do uso conforme exigência experimental (5 ng/μL). Uma curva padrão foi estabelecida por diluição em série de quantidades conhecidas de uma amostra de pool de DNA. Em cada corrida, também foi incluído DNA genômico reunido gerado no laboratório. O DNA padrão e a amostra de referência foram os mesmos para todos os experimentos. Uma análise da curva de fusão para verificar a especificidade e identidade dos produtos. Todas as reações únicas mostrando um único valor de coeficiente de variação (CV) > Serão verificados 5% tanto para o TEL PCR quanto para o PCR 36B4 e quando o erro for identificado, eles serão excluídos da análise. Para parâmetros padrão, eficiência de ensaio recomendada entre 90% e 110% e um R 2 entre 0,98 e 1. Amostras individuais com desvio padrão do limiar do ciclo (Ct) < 0,5 para as amostras em triplicado foram incluídos na análise completa. As sequências dos primers utilizados para o gene da região telomérica e os primers PO (36B4) da fosfoproteína ribossômica ácido controle, forward e reverse foram primers de telômeros (forward: 5′-GGTTTTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGT-3′; reverso: 5′-CCCGACTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTA-3′) e de primers 36B4 (avançar: 5′-CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC-3′; reverso: 5′-CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA-3′). Cada reação examinando o telômero e os fragmentos 36B4 incluiu SYBR Green Power UP (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 0,2 μmol do telômero e primers 36B4 (direto e reverso), 20 ng de DNA genômico e água suficiente foi adicionada para produzir uma reação de 20 μL. Para os telômeros e amplicons 36B4, o qPCR foi realizado usando as seguintes condições de reação: regulado a 95 ◦C por 10 min; seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95 ◦C por 15 s, e recozimento e extensão a 60 ◦C por 1 min. Os dados obtidos nos experimentos foram calculados de acordo com a fórmula sugerida por Dhillon et al. (2017), o Ct de cada amostra foi utilizado para converter a razão T/S em TL em pares de bases (pb) usando a seguinte equação: AX + B, onde X = razão T/S, A é a inclinação e B é a interceptação da equação PCR. Todas as amostras foram analisadas em triplicata, com controle negativo, linhagem celular de leucemia T linfoblástica 1301 como

controle positivo e curva padrão em cada placa, utilizando o sistema Step One Plus™ Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

## ANEXO D – MÉTODO DE ANÁLISE DO PESTICIDA (2,4-D) NA URINA

Para o preparo de amostras foi empregado o método QuEChERS modificado, no qual 10 mL de urina (previamente centrifugada a 6000 rpm, por 3 min; pH 5) foram extraídos com 2 mL de acetonitrila acidificada. A etapa de partição foi realizada sulfato de magnésio e cloreto de sódio. Após, realizou-se uma etapa de limpeza do extrato empregando extração em fase sólida dispersiva, em que uma alíquota do sobrenadante foi misturada com sulfato de magnésio, PSA e C18. O extrato obtido foi diluído (1:4, v/v) em água ultrapura e filtrado, com posterior análise por cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS, do inglês ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry)[57,58].

Para a determinação do agrotóxico 2,4-D nas amostras de urina foi utilizado um sistema UHPLC-MS/MS Xevo ® TQ-XS (Waters, EUA) e uma coluna analítica Acquity UPLC ® HSS T3 (2,1 × 100 mm, 1,8 μm de tamanho de partícula). A fase móvel composta por (A) água e (B) acetonitrila:metanol (1:1, v/v), ambas contendo 0,1% (v/v) de ácido fórmico e 5 mmol L -1 de formiato de amônio, a uma vazão constante de 0,5 mL min -1. O volume de injeção foi de 5 μL e o tempo total de análise foi de 19 min[57,58].