



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEIO
AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO REGIONAL -
PPGMADRE**

JORGE GOMES DO NASCIMENTO

**UTILIZAÇÃO DO PROCESSAMENTO DIGITAL DE IMAGENS COMO MÉTODO
DE ANÁLISE DO EPITELIO HEPÁTICO DE RATOS CRONICAMENTE EXPOSTOS
DE MODO ORAL E INALATORIO AO HERBICIDA GLIFOSATO**

Presidente Prudente - SP
2024



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEIO
AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO REGIONAL -
PPGMADRE**

JORGE GOMES DO NASCIMENTO

**UTILIZAÇÃO DO PROCESSAMENTO DIGITAL DE IMAGENS COMO MÉTODO
DE ANÁLISE DO EPITELIO HEPÁTICO DE RATOS CRONICAMENTE EXPOSTOS
DE MODO ORAL E INALATORIO AO HERBICIDA GLIFOSATO**

Dissertação apresentada Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional. Área de Concentração: Ciências Ambientais.
Linha de Pesquisa: Avaliação e Análise de Impacto Ambiental.

Orientadora: Dra. Renata Calciolari Rossi
Co-orientadora: Dra. Ana P. Alves Favareto
Co-orientadora: Dra. Maíra Rodrigues Uliana
Co-orientador: Dr. Sérgio Marques Costa

Presidente Prudente - SP
2024

615.907
N244u

Nascimento, Jorge Gomes do.

Utilização do processamento digital de imagens como método de análise do epitélio hepático de ratos cronicamente expostos de modo oral e inalatório ao herbicida glifosato / Jorge Gomes do Nascimento. – Presidente Prudente, 2024.
49 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2024.

Bibliografia.

Orientadora: Dra. Renata Calciolari Rossi

Co-orientadores: Dra. Ana P. Alves Favareto; Dra. Maíra Rodrigues Uliana; Dr. Sérgio Marques Costa.

1. Agroquímicos. 2. Toxicidade. 3. Fígado. 4. Modelos animais. I. Título.

JORGE GOMES DO NASCIMENTO

**UTILIZAÇÃO DO PROCESSAMENTO DIGITAL DE IMAGENS COMO MÉTODO
DE ANÁLISE DO EPITELIO HEPÁTICO DE RATOS CRONICAMENTE EXPOSTOS
DE MODO ORAL E INALATORIO AO HERBICIDA GLIFOSATO**

Dissertação apresentada Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional. Área de Concentração: Ciências Ambientais.
Linha de Pesquisa: Avaliação e Análise de Impacto Ambiental.

Presidente Prudente, 12 de março de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Orientador Renata Calciolari Rossi
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Prof. Dr. Ana Karina Marques Salge Mendonça
UFG - Universidade Federal de Goiás
Goiânia- Goiás

Prof. Dr. Sérgio Marques Costa
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, que é meu alento e meu guia, que nas horas difíceis sempre se fez presente a minha família e ao meu cônjuge.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente e fundamentalmente, a Deus por ter me sustentado guiado até aqui. E que em meio a muitas lutas e incertezas sempre se fez presente ratificando que os planos de Dele são muito maiores que os meus, que em silêncio Ele está trabalhando em cada detalhe, e sei que sem Ele eu nada seria. Obrigado por não me deixar desistir, me levantar e fazer com que fique claro que as pedras no caminho, não são para derrubar-me, e sim para dar impulso a novos mais altos voos.

Gratidão, por sempre enviar anjos, nos momentos menos prováveis e mais necessários, somente desta forma torna-se possível a concretização de mais essa jornada. Agradeço a Deus, por ter conduzido de maneira tão sublime para que essa pessoa tão iluminada, de riso fácil e jeito doce, assim como um bom mineiro, essa querida que com doces palavras e sorriso afável, me fez confiar que eu poderia chegar até aqui, e ir além, muito obrigado a minha orientadora, Professora Dra. Renata Calciolari Rossi, mais que uma orientadora, um exemplo de amor pelo que faz, repercutindo todo esse amor em muita maestria; um ser de muita luz, disseminando seu conhecimento e transformando vidas.

Minha eterna gratidão, em todas as conquistas da minha vida, também é para os meus pais Vivaldo e Edina. Que nunca mediram esforços para tornar meus sonhos realidade, os quais em todos os momentos sempre acolhiam-me com ternura. Obrigado, por tamanho amor que vocês sempre dedicaram, por todo trabalho árduo, a vida não foi fácil com vocês, porém isso os tornou ainda mais amorosos, dando para os filhos e agregados todo amor que vocês não receberam o amor de vocês sempre uniu e tornou os dias mais fáceis. Obrigado por tudo!

Ao meu cônjuge, Willian, por sempre ser um entusiasta, e acreditar que eu poderia. Obrigado, pelo companheirismo, as dificuldades da jornada ficam mais fáceis quando dividido. Com certeza, a caminhada fica mais fácil com você em minha vida. Obrigado por quinze anos de muita parceria.

“Até que tenhamos coragem de reconhecer crueldade pelo que ela é - seja a vítima um animal humano ou não humano - não podemos esperar que as coisas melhorem neste mundo... não podemos ter paz vivendo entre homens cujos corações se deleitam em matar criaturas vivas. Para cada ato que glorifica o prazer de matar, estamos atrasando o progresso da humanidade.”. (Rachel Carson)

RESUMO

UTILIZAÇÃO DO PROCESSAMENTO DIGITAL DE IMAGENS COMO MÉTODO DE ANÁLISE DO EPITELIO HEPÁTICO DE RATOS CRONICAMENTE EXPOSTOS DE MODO ORAL E INALATORIO AO HERBICIDA GLIFOSATO

Introdução: O glifosato (N-fosfonometil-glicina) é um herbicida não seletivo, sistêmico, amplamente utilizado nas lavouras de algodão, milho, soja entre outras, visando o controle de ervas daninhas. Sua ampla utilização visa majorar a produtividade tornando o processo mais rentável. A exposição ao herbicida causa danos à flora a fauna e pode ser um possível agente nocivo ao epitélio hepático e causar alterações patológicas. **Modelo do estudo:** Estudo do tipo experimental. **Objetivo:** analisar os efeitos da exposição crônica oral e inalatória ao em diferentes concentrações ao herbicida glifosato sobre o tecido hepático de ratos, utilizando processamento digital de imagens. Foram utilizados para a pesquisa 112 ratos Wistar alocados em 2 grupos com 14 ratos em cada gaiola. Grupo controle inalatório (GCI) foi composto por grupo baixa concentração (GBI), grupo media concentração (GMI) e grupo de alta concentração (GAI) e grupo controle oral (GCO) grupo baixa concentração (GBO), grupo media concentração (GMO) e grupo alta concentração (GAO). O grupo inalatória recebia nebulização diária, enquanto o grupo oral recebia alimentação nebulizada com o glifosato. Após o período de 180 dias de experimento os animais foram eutanasiados e procedeu se a confecção das laminas. Foram feitas imagens de microscópio, os núcleos hepáticos selecionados e delimitados, para posteriormente abastecer o respectivo programa com as informações e assim criar um banco de dados que possibilitou a analise do processamento digital de 200 mil hepatócitos. **Resultados:** Observou se que tanto as vias de exposição quanto às dosagens exercem alterações preponderantes, sugestivas de danos hepáticos. As Vias de Administração apresentaram uma diferença significativa ($p < 0,05$). O mesmo ocorreu com a dose (GC, GB, GM e GA), onde o efeito da dose foi significativo e valor de $p < 0,05$. **Conclusão:** A exposição ao glifosato de maneira crônica inalatória apresenta alto potencial nocivo às células hepáticas. Desta forma configura como um fator de risco aos trabalhadores com contato direto, e aos moradores de regiões que fazem o uso do glifosato e sofrem com o efeito da deriva.

Palavras-chave: Agroquímicos; Toxicidade; Fígado; Modelos animais.

ABSTRACT

USE OF DIGITAL IMAGE PROCESSING AS A METHOD FOR ANALYSIS OF THE HEPATIC EPITHELIUM OF RAT CHRONICALLY EXPOSED ORALLY AND INHALED TO THE HERBICIDE GLYPHOSATE

Introduction: Glyphosate (N-phosphonomethyl-glycine) is a non-selective, systemic herbicide, widely used in cotton, corn, soybean crops, among others, aiming to control weeds. Its wide use aims to increase productivity, making the process more profitable. Exposure to the herbicide causes damage to flora and fauna and can be a possible harmful agent to the hepatic epithelium and cause pathological changes. Study design: Experimental study. Objective: to analyze the effects of chronic oral and inhalation exposure to different concentrations of the herbicide glyphosate on the liver tissue of rats, using digital image processing. 112 Wistar rats were used for the research, allocated into 2 groups with 14 rats in each cage. Inhalation control group (GCI) was composed of a low concentration group (GBI), medium concentration group (GMI) and high concentration group (GAI) and oral control group (GCO) low concentration group (GBO), medium concentration group (GMO) and high concentration group (GAO). The inhalation group received daily nebulization, while the oral group received nebulized feeding with glyphosate. After a period of 180 days of experiment, the animals were euthanized and the slides were made. Microscope images were taken, the hepatic nuclei were selected and delimited, to later supply the respective program with the information and thus create a database that made it possible to analyze the digital processing of 200 thousand hepatocytes. Results: It was observed that both the routes of exposure and the dosages exert preponderant changes, suggestive of liver damage. The Routes of Administration showed a significant difference ($p < 0.05$). The same occurred with the dose (GC, GB, GM and GA), where the dose effect was significant and p value < 0.05 . Conclusion: Chronic inhalation exposure to glyphosate has a high potential for harm to liver cells. In this way, it constitutes a risk factor for workers with direct contact, and for residents of regions that use glyphosate and suffer from the effect of drift.

Keywords: Agrochemicals; Toxicity; Liver; Animal models.

LISTA DE SIGLAS

IBAMA -	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
TON/IA -	Tonelada por Ingrediente Ativo
IBGE -	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ANVISA -	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
EPA -	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
EPI -	Equipamento de Proteção Individual
OSD-	Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
ONU-	Organização das Nações Unidas
IARC -	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
GCI -	Grupo Controle Inalatório
GCO -	Grupo Controle Oral
GBCI -	Grupo Baixa Concentração Inalatório
GBCO -	Grupo Baixa Concentração Oral
GMCI -	Grupo Média Concentração Inalatório
GMCO -	Grupo Média Concentração Oral
GACI -	Grupo Alta Concentração Inalatório
GACO -	Grupo Alta Concentração Oral
AST-	Enzimas aspartato aminotransferase
ALT-	Alanina aminotransferase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Objetivos de Desenvolvimento Sustentável.	20
Figura 2-	Caixas de experimentação com nebulizador.....	30
Figura 3-	Imagens de lâminas, grupo inalatório.....	32
Figura 4-	Imagens de lâminas, grupo oral.	32
Figura 5-	Comparação entre grupos e dosagens.	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Classificação toxicológica em função da toxidade oral, cutânea e inalatória.....	23
Tabela 2-	Divisão dos animais por grupo de distintas concentrações do herbicida Glifosato e formas de exposição (inalatória e oral).	300
Tabela 3-	Diluição do composto ativo por hectare (g.i.a/ha), diluídos em Cloreto de sódio (inalatória e oral).....	311

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1	O meio Ambiente e o Desenvolvimento Sustentável	19
2.2	Agroquímicos na pulverização aérea: riscos e impactos ambientais ...	21
2.3	Implicações do Glifosato na Saúde Hepática.....	24
2.4	Aplicações do Processamento Digital de Imagens (PDI).....	27
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1	Aspecto de natureza ética	29
3.2	Caracterização da amostra	29
3.3	Protocolo de exposição ao herbicida glifosato	300
3.4	Coleta do material.....	311
3.5	Análise histológica	32
3.6	Análise estatística	33
4.	RESULTADOS	355
5.	DISCUSSÃO	377
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	400
	REFERÊNCIAS	411

PRÓLOGO

Nasci em uma cidade do interior do Mato grosso do sul; o primogênito de uma família de três filhos. Durante todo o percurso da minha infância morei na área rural, filho de pais que não tiveram acesso aos bancos escolares, porém sempre conscientes da importância da educação como ferramenta de mudança, não somente pessoal, mas também da sociedade que esteja inserido. Durante boa parte da minha segunda infância, morando na área rural, com assíduo convívio com meu avô materno; nonagenário, que dispunha de muita vitalidade e disposição para as tarefas inerentes de quem vive na área rural; alimentar bichos, ordenhar vacas e por ai adiante. Esse convívio com meu avô, empiricamente norteou minhas escolhas profissionais atuais. Após meu vô falecer em decorrência de complicação de um câncer de próstata aos 93 anos, passamos a residir em área urbana com maior acesso a educação. Sempre fui uma criança bastante introvertida que buscava nos poucos livros que dispunha, ferramentas para conhecer novos mundos. E por intermédio disso acabou despertando a necessidade da busca por conhecimento, sempre alicerçado e impulsionado pelos meus pais. Após o colegial sentia que necessitava fazer algo, porém ainda muito incerto do que fazer, optei pelo curso de administração de empresas, que me abriu um leque muito grande, logo após o fim do curso me aventurei em uma especialização de gestão de pessoas. Após algum tempo atuando na área administrativa e lecionando na mesma área, sentia que precisava alçar novos voos, me encontrar profissionalmente, fazer algo que não fosse condicionado a fatores extrínsecos, mais algo que pudesse fazer o coração pulsar e trazer brilho aos olhos.

Neste período em meio às incertezas de começar tudo de novo, pairou muita insegurança de sair da minha zona de conforto; mais uma vez o apoio familiar foi incondicional e de muita importância. Em 2014 iniciei o curso de fisioterapia, a cada nova matéria uma descoberta e um amor novo; comecei então a vislumbrar de todas as maneiras a qual eu poderia conduzir minha carreira. A neurologia e a geriatria fundamentaram minha edificação pessoal e profissional funcionando com uma bússola nas minhas escolhas, é neste contexto, que vejo como o convívio com meu avô me norteou a querer estar diretamente trabalhando com essa população da “melhor idade”. Embora tendo atuado lecionando, sempre tive dúvidas quanto estar conseguindo passar a informação; tão importante quanto ter o conhecimento é saber

dissemina-lo. Na metade do curso de fisioterapia, na primeira apresentação do pré-projeto, com uma banca a qual eu não conhecia, em meio há muito nervosismo, apresentei o meu projeto “ DESENVOLVIMENTO PSICOMOTOR E APRENDIZAGEM MOTORA POR TEMPO DE REAÇÃO EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES INSTITUCIONALIZADOS EM ABRIGOS”, ao finalizar uma ilustre figura teceu comentários a cerca da minha apresentação, “... Que ficaria horas me ouvindo apresentar, que havia passado com muita didática o conteúdo...” foi então que a mesma sugeriu que eu deveria buscar pelo mestrado após findar a graduação, e se colocou a disposição para tanto.

O tempo passou, a graduação terminou, busquei formação, para fundamentar-me na minha área de atuação, e após algumas especializações; neurofuncional adulto, ortopedia, geriatria/gerontologia, me vi querendo alçar novos voos, buscar novos conhecimentos, novos desafios. Foi então que em período pandêmico, caos total lembrou-me daquela professora que havia outrora plantado essa semente do mestrado. Então na manhã do dia 14 de Dezembro de 2021 as 09h58min enviei uma mensagem despretensiosamente para a professora Renata Calciolari, que de pronto me acolheu, e iniciamos as tratativas para iniciar essa nova jornada.

Hoje percebo que nada foi por acaso até mesmo o delineamento da pesquisa desenvolvida está atrelado a minha historia, o herbicida que pesquisamos, fez parte presente da minha vida, usado de maneira despreocupada sem muitos aparatos de segurança durante muitos anos pelo meu pai.

Desta forma, almejo buscar ainda mais conhecimento para intervir diretamente, melhorando qualidade de vida, dos meus pacientes que são metaforicamente uma extensão do meu avô; figura essa tão importante em minha vida. O saber só tem valor quando compartilhado, e assim novas vidas serão transformadas, é um processo cíclico transformar outras vidas, e essa, espero ser a minha missão de vida, buscar e compartilhar conhecimento, honrando todo esforço e sacrifício que foi feito pelos meus pais, para que hoje fosse possível, eu estar aqui nesta jornada rumo ao conhecimento.

1. INTRODUÇÃO

Desde o período colonial o Brasil destaca se, no mundo como um importante produtor agrícola, permanecendo assim até a atualidade. No panorama atual, a exportação de commodities constitui-se como um dos pilares econômicos do país, uma vez que o Brasil ocupa o ranking como o segundo país que mais exporta esses produtos, resultando em uma expressiva contribuição para seu PIB (Produto Interno Bruto). É evidente que todo esse dinamismo na produção agrícola, crucialmente na atualidade só é possível devido ao emprego em extensa escala dos defensivos agrícolas; com o ensejo de majorar a produção nos grandes latifúndios, mesmo que este processo culmine em danos sociais e ambientais (Reyna; Braga; Moraes, 2020; IPEA, 2019).

O processo de aplicação dos agrotóxicos ocorre de diversas formas, podem ser pulverizados por meio de aplicação manual, tratores e aviões sobre as plantações, todavia nesse processo além de atingirem o alvo desejado, é alastrado no meio ambiente e podem contaminar o solo, lagos, manancial o ar e os alimentos, além de atingir de maneira direta os trabalhadores, moradores e animais que vivem ao entorno dessas áreas pulverizadas (Lopes; Albuquerque, 2018; Soares; Silva; Duarte *et al.*, 2021).

A mesma tecnologia que permitiu avançar o processo produtivo na agricultura com a mecanização dos processos, também trouxe novas tecnologias para alavancar as pesquisas. Neste contexto surge o processamento digital de imagens, processo que torna possível e mais fidedigno a mensuração de dados. Processo em que o pesquisador fomenta a aprendizagem do *software* para que o mesmo possa posteriormente identificar as informações requeridas (Silva; Soares; Melo, 2023; Vieira Neto; Marques Filho, 1999).

A mecanização no meio rural torna possível diagnosticar por meio de drones, áreas com infestações de ervas daninhas e desta forma, entrar com as medidas necessárias para dirimir o problema. Após a detecção de áreas afetadas entrarem com os respectivos recursos. Dentre os recursos disponíveis o uso do glifosato um potente herbicida que atua no mecanismo de inibição da síntese de aminoácidos capaz de extirpar as ervas daninhas (Silva; Soares; Melo, 2023).

O glifosato configura hoje o herbicida mais utilizado no Brasil e no mundo, e o aumento do seu consumo já está bem abalizado, sobretudo em países da América

do Norte, da América do Sul, Europa e Ásia. O mercado dos herbicidas apresenta-se como um importante agregador financeiro chegando a gerar cerca de US\$ 17 bilhões anualmente, com tendência ao crescimento exponencial (Gianessi, 2013; BRASIL, 2018). De acordo com estimativas mais recentes, os herbicidas representam quase US\$ 24 bilhões em valor de comércio (BRASIL, 2023; Martins-Gomes; Silva; Andreani *et al.*, 2022).

Estudos anteriores corroboram com achados demonstrando o auto potencial tóxico do glifosato, tanto para humanos quanto para os animais. Em humanos foi observado que pode ser nocivo, apresentando efeitos carcinogênicos, mutagênicos, teratogênicos, neuroendócrinos, dificuldades respiratórias, problemas de memória e de pele, depressão, entre outros (Kwiatkowska; Jarosiewicz; Bukowska, 2013; Baek; Bobadilla; Giacomini *et al.*, 2021). Já em animais, estudos mostraram que peixes sofrem alterações espermatogônia, reduzindo a fecundidade, na população de abelhas causa alterações comportamentais e alterações na microbiota intestinal deixando as mais suscetíveis a doenças e morte (Antunes; Ribeiro; Roque *et al.*, 2023; Santos; Becher; Retcheski *et al.*, 2009).

Além do que, as injúrias à saúde atrelada ao uso de glifosato são muito bem evidenciadas por meio de estudos há tempos, contudo, no âmbito nacional, há poucas informações na literatura sobre os efeitos causados pela exposição crônica a essa substância, necessitando de uma maior atenção, especialmente pelo fato de simular a exposição inalatória do trabalhador rural e a exposição oral da população que consome os alimentos muitas vezes contaminados.

O aumento da produção nas últimas décadas tem causado impacto significativo no que tange o aumento alarmante no uso de defensivos agrícolas, dados substanciais que evidenciam o quanto nos últimos dez anos o mercado mundial de agrotóxicos cresceu no entorno de 93%, o mercado brasileiro cresceu 190%. No ano de 2008, o Brasil ultrapassou os Estados Unidos ocupando o lugar de maior mercado de agrotóxicos do mundo. Essa posição ocupada pelo país traz consequências colossais, que envolve não apenas as limitações agrícolas, como toda a comunidade no seu entorno, além dos consumidores dos alimentos (Lopes; Albuquerque, 2018).

Em uma análise realizada pelo Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) do Ministério da Saúde, encontrou-se contaminação em 51% das amostras de 14 alimentos dentre eles

cereais/frutas/hortaliças analisadas e coletadas no período de agosto de 2017 a junho de 2018. Os resultados mostraram que 23% das amostras analisadas estavam contaminadas acima dos Limites Máximos de Resíduos (LMR) e/ou seus resíduos encontrados não eram autorizados para aquelas culturas; 35% das amostras consideradas satisfatórias, porque estavam abaixo do LMR apesar de apresentar resíduos de agrotóxicos e 37% das amostras não apresentavam resíduos dos herbicidas (Brasil, 2023).

O processo de produção agrícola resulta na exposição humana (ambiental + ocupacional + alimentar) que poderá contaminar os trabalhadores e população e provocar vários agravos à saúde, que deverão ser diagnosticados, tratados e notificados a partir dos municípios brasileiros, via SINAN, pela vigilância em saúde. Além das intoxicações agudas, também são notificadas as intoxicações crônicas relacionadas aos agrotóxicos alguns tipos de cânceres e malformações fetais, distúrbios neurológicos, endócrinos, mentais e cognitivos (Pignati; Oliveira; Silva, 2014).

Apesar do fato de que a pesquisa brasileira em relação ao impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana tenha crescido nos últimos anos, ainda não é suficiente para conhecer a extensão da carga química de exposição ocupacional e a dimensão dos danos à saúde. Um dos problemas apontados é a falta de informações sobre o consumo de agrotóxicos e a insuficiência dos dados sobre intoxicações por estes produtos (Tosetto; Andrioli; Christoffoli, 2021; Figueiredo; Trape; Alonzo, 2011).

Somado a isso, ainda existe a questão da deficiência dos profissionais de saúde da rede básica e de alta e média complexidade no Brasil em investigar as exposições humanas, os surtos de intoxicação e os diagnósticos de intoxicação por agrotóxicos. Desta maneira, torna-se evidente a necessidade de propiciar a capacitação da rede de saúde, principalmente da atenção básica, além de promover o avanço das notificações nos sistemas de informação do SUS (Araújo; Oliveira, 2016).

Diante do exposto, pode-se perceber a pertinência em abordar tal tema, já que é fato a grandeza do uso de herbicidas no Brasil e do número de indivíduos expostos tanto de forma direta quanto indireta, aliado à insuficiência de dados na literatura sobre as consequências da exposição crônica a tais substâncias. Desse modo, os resultados deste estudo terão potencial para colaborar com a melhoria da

saúde e qualidade de vida dos trabalhadores e da população, seja através da conscientização das empresas sobre os riscos à saúde, seja através do desenvolvimento de iniciativas sustentáveis e políticas públicas.

Desta forma, precisamos angariar informações que evidencie se há riscos, na exposição crônica ao glifosato, seja ela de forma oral ou inalatório.

A proeminência da temática é avultada ao ponderar a extensão da área de utilização do herbicida glifosato no âmbito regional e nacional e a gama de pessoas expostas ao produto. Desta forma, os resultados impetrados deste estudo poderão contribuir para a conscientização da população em geral quanto aos riscos à saúde do uso indiscriminado dos herbicidas, dando início a discussões quanto à criação de projetos sustentáveis e políticas públicas, que priorizem a saúde e a qualidade de vida de todos os envolvidos.

A presente pesquisa tem por objetivo analisar as alterações morfológicas em fígado de ratos que foram submetidos cronicamente ao glifosato, sob a forma oral e inalatória, utilizando-se do processamento digital de imagens. Avaliar as diferenças de danos hepáticos entre a exposição crônica oral e inalatória ao glifosato em diferentes concentrações utilizando-se o processamento digital de imagens e desta e discutir sobre os possíveis impactos à saúde de trabalhadores, a partir da utilização do herbicida glifosato.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O meio Ambiente e o Desenvolvimento Sustentável

O meio ambiente saudável é um direito humano, todas as pessoas no planeta têm direito a um meio ambiente saudável, assim assegura a ONU (Organização das Nações Unidas) da mesma forma como é assegurado na lei 225 da constituição federal que todos têm direito a um meio ambiente equilibrado e também é dever de todos primar pela qualidade e integridade do mesmo (ONU, 2023).

A busca por meios de progresso e produtividade de maneira mais limpa e menos prejudicial ao meio ambiente, tem se tornado foco de diversos debates, com intuito de instituir políticas para nortear ações em prol da sustentabilidade.

O desenvolvimento sustentável tem como objetivo atender as necessidades das gerações presentes sem afetar as futuras. A iminente preocupação com métodos sustentáveis levou organizações públicas, produtivas e sociais a instituírem métodos para avaliar o desempenho ambiental. Tal processo tem a finalidade de a longo prazo gerar ganhos (Dietrich; Almeida, 2020).

Na medida em que a agricultura avança as áreas verdes naturais, são desmatadas para dar lugar a vastas plantações, fazendo importantes alterações a fauna e flora local. Além do uso de diversos recursos como o grande uso de água no processo de irrigação, expõe também o uso de agrotóxico que poluem e alteram os microrganismos existentes no solo e rios (Dietrich; Almeida, 2020).

As alterações climáticas, inerentes ao processo de desgaste ao qual o planeta vem sendo exposto ao longo dos anos, tem sido objeto de estudos e por meio destes resultados há uma preocupação em reverter à situação. A preocupação com o meio ambiente e o bem-estar social é tópico de debates em distintas esferas da sociedade. Visando nortear ações a ONU em 2015 propôs a Agenda 2030, composta por 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) e 169 metas visando à promoção do desenvolvimento sustentável (Figura 1). Os ODS incluem a erradicação da pobreza, proteção ambiental e garantia do bem-estar social (ONU, 2021). Para que haja uma implantação efetiva dos respectivos ODS e alcançar as metas estabelecidas para 2030, faz-se necessário minuciosa análise crítica para

maior assertividade a cerca das estratégias a serem implementadas (Dietrich; Almeida, 2020).

É importante fomentar meios para que o processo produtivo torne se mais sustentável, e para que isso ocorra as pesquisas a cerca de temáticas relevantes em prol de uma sociedade mais atenta aos danos inerentes ao processo produtivo, os selos preconizados pela ONU, trazem um norte acerca do que buscar, quais conflitos precisam serem mitigados. Neste contexto a presente pesquisa aborda dois dos 17 selos que são eles ODS3 e ODS 12.

Entre os ODS 3, Saúde e bem-estar - Assegurar uma vida saudável e promover o bem-estar para todos, em todas as idades (ONU). Fomentar meio para que o processo de produção agrícola seja cada vez mais limpo, com menos percentual de resíduos de agrotóxicos nos alimentos e no meio ambiente. Dentro deste contexto a presente pesquisa contempla o ODS 12, consumo e produção responsável- Assegurar padrões de produção e de consumo sustentáveis (ONU). Angariar meios que possibilitem um processo produtivo mais sustentável, sem que para produzir mais precise afetar de maneira negativa o meio ambiente. Tornar o processo produtivo integrativo ao meio ambiente. Reduzir o uso de agrotóxicos, que possibilitam o aumento da produtividade, contudo acaba por causar letalidade da diversidade de microrganismo do solo entre outros seres vivos, flora e fauna (Dietrich; Almeida, 2020; Lopes; Santiago; Silva *et al.*, 2023).

Figura 1- Objetivos de Desenvolvimento Sustentável.



Fonte: ONU 2021

2.2 Agroquímicos na pulverização aérea: riscos e impactos ambientais

No decorrer dos últimos anos o Brasil vem se consolidando como uma importante potência no que tange a agricultura, com a vasta densidade territorial e a diversidade de clima encontrado no território nacional possibilitou uma vasta gama de cultivares que se adaptam ao clima e solo do país (Kwiatkowska; Jarosiewicz; Bukowska, 2013; Pignati; Oliveira; Silva, 2014). Esse processo deu origem à necessidade do aumento no consumo de agrotóxicos, neste cenário o uso do glifosato veio aumentando e consolidando seu papel na agricultura, enquanto houve um aumento global de 93% de venda de agroquímicos, o Brasil lidera esse cenário com um aumento exponencial de 190% (Brasil, 2023).

Desde então este cenário vem angariando mais espaço, em relatório lançado em 2022 pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) aponta que o Brasil comercializou mais de 685 mil toneladas de ingrediente ativo (TON/IA), no ano de 2020, houve uma crescente de 10% quando comprado ao ano anterior cuja comercialização foi de um pouco mais de 620 mil toneladas (TON/IA) (Baek; Bobadilla; Giacomini *et al.*, 2021). O Relatório do IBAMA aponta ainda que a região com maior concentração em comercialização encontra-se na região Centro-oeste do Brasil com maior incidência no Mato Grosso, perfazendo um total de 133.290 TON/IA, seguido pela região sul, com o estado do Paraná destacando-se neste cenário, no cenário da região sudeste, o estado de São Paulo lidera com a comercialização de mais de 88 mil TON/IA, cerca de 61% das vendas de toda a região sudeste (IPEA, 2019; Brasil, 2022).

São diversas classes de agrotóxicos disponíveis no mercado, porém uma das classes mais utilizadas é os herbicidas, especialmente no Estado de São Paulo, que responde por 43,1% do faturamento total do estado. Os herbicidas comercializados em São Paulo são destinados manejo de cana-de-açúcar, soja e milho (Gianessi, 2013). Neste cenário os agroquímicos que tem maior destaque são: glifosato, cipermetrina, enxofre, 2,4-D, atrazina e metamidofós, o estado de São Paulo configura-se como o maior produtor de cana-de-açúcar do Brasil, o que representa em torno de 50% da área plantada no cenário nacional, assemelhando-se ao estado do Mato Grosso, campeão em venda de agrotóxicos, o qual a cana-de-

açúcar configura como uma das culturas mais preponderantes para a agricultura regional (IPEA, 2019; Brasil, 2017).

Diante da grande densidade de áreas cultivadas, o uso de tecnologias e inovações a fim de maximizar os processos vem angariando cada dia mais espaço.

Neste cenário cada vez mais mecanizado o processo de pulverização manual vem perdendo espaço para a pulverização aérea, mesmo que este processo suscite dúvida quanto aos impactos para a saúde e para todo o ecossistema, a pulverização aérea destaca como uma das principais e mais usadas formas de aplicação de agroquímicos (Soares; Silva; Duarte *et al.*, 2021). O processo de pulverização aérea permite pulverizar uma grande área em um curto período de tempo (Soares; Silva; Duarte *et al.*, 2021; Araújo, 2020).

Embora usada amplamente a técnica de pulverização aérea vem sendo objeto de estudos e de apontamentos que levam a discussão quanto à assertividade e segurança da técnica, tendo em vista que as partículas aspergidas sofrem com intempéries climáticas, espalhando-as (Gianessi, 2013). Não é possível delimitar de maneira fidedigna a área a ser pulverizada; ocasionando o processo de deriva, processo pelo qual há disseminação do agroquímico perpassa a região a ser pulverizada (Reyna; Braga; Moraes, 2020; Gianessi, 2013). A deriva acontece, mesmo quando todas as normas técnicas de aplicação são seguidas. Isso indica que utilizar agroquímicos sem contaminar o meio ambiente e sem afetar os que trabalham ou vivem ao entorno da aplicação é uma tarefa quase impossível (Costa; Velini; Negrisoni *et al.*, 2007).

A deriva técnica pode exceder os 80% na pulverização e assim atingir lugares distantes, devido ao deslocamento do produto fora do local desejado, e pode ser influenciada pelo vento, temperatura do ar, umidade relativa do ar, distância do alvo, velocidade de aplicação e tamanho das gotas (Cunha, 2008). A deriva da pulverização aérea gera muitos contratempos, que a torna algo que suscita cautela, devido aos diversos fatores que corroboram para a falta de controle. O Ministério da Saúde tem se demonstrado favorável à proposta de suspensão da pulverização aérea no país, contudo ainda não houve um consenso para a concretização, apenas o Estado do Ceará tem Lei vigente que torna crime ambiental o processo de pulverização aérea, a Lei 16.820/2019, do estado do Ceará (Ceará, 2019; Castro, 2023).

O processo decorrente da pulverização aérea do glifosato; N-fosfonometil glicina, herbicida pertencente à classe do fosfonato, que é corresponde à classe bem similar aos organofosforados, que pode ser encontrado com os nomes comerciais de Rondup ou Sting. É um herbicida amplamente difundido, com uso anual de cerca 1 milhão de toneladas em todo o mundo (Brasil, 2018).

O glifosato, formulado como Roundup, é um herbicida de amplo espectro tem como principal função eliminar as plantas infestantes nas lavouras e também é usado como dessecante antes da colheita (Dietrich; Almeida, 2020; Van Bruggen; He; Shin *et al.*, 2018). O uso do glifosato estende se para as áreas urbanas, seja para uso em domicílio, pequenos jardins, parques e em áreas marinhas para a contenção de plantas aquáticas (Heneka; Golenbock; Latz, *et al.*, 2020).

Atualmente no âmbito nacional o glifosato exhibe classe toxicológica V pela ANVISA, improvável de causar dano agudo (Tabela 1) (Perron; Anwar; Bloem, 2017).

Tabela 1- Classificação toxicológica em função da toxicidade oral, cutânea e inalatória.

Classificação quanto à toxicidade						
Categoria	Categoria 1	Categoria 2	Categoria 3	Categoria 4	Categoria 5	Categoria 6
Nome de categoria	Extremamente tóxico	Altamente tóxico	Medianamente tóxico	Pouco tóxico	Improvável de causar dano Agudo tóxico	Altamente tóxico Não classificado
Via de exposição	≤ 5	>5 - 50	>50 – 300	>300- 2000	>2000 - 5000	> 5000
Oral (mg/kg p.c.)						
Via de exposição	≤ 50	>50 - 200	>200 - 1000	>1000- 2000	>2000 - 5000	> 5000
Cutânea (mg/kg p.c.)						
Gases (ppm/V)	≤ 100	>100 - 500	>500 - 2500	>2500-20000	>20000-50000	
Via de exposição	≤ 0,5	> 0,5 - ≤ 2,0	>2,0 - ≤ 10	> 10 ≤ 20	> 20-50	
Vapores (mg/L)						
Inalatória	≤ 0,05	>0,05 - 0,5	>0,5 - 1,0			
Produtos sólidos				>1,0- 5,0	> 5,0-12,5	
e líquidos (mg/L)						

Fonte: ANVISA 2019

Entretanto, assim como o 2,4-D, antes da reclassificação toxicológica de 2019 o glifosato era rotulado como extremamente tóxico (Classe I). O uso do glifosato ainda suscita certas questões na comunidade científica e seus consumidores, há um contínuo debate sobre o seu uso devido à segurança do glifosato para a saúde humana. Os Estados Unidos e agências europeias defendem

que o uso glifosato e suas formulações comerciais são classificados como produtos químicos de baixa possibilidade de serem cancerígenos (Fogliatto; Ferrero; Vidotto, 2020). Contudo a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) faz uma classificação em torno dessa substância como provável cancerígena, com base em sua capacidade de induzir danos ao DNA e indução de estresse oxidativo (Kudsk, 2020).

É imperativo atentar com a saúde da população, e, sobretudo, com os trabalhadores rurais, visto que o glifosato foi encontrado em altas concentrações na urina de agricultores e outros fluidos biológicos, como sangue e leite materno, e também esteve presente em 60-80% da população geral, incluindo crianças (Van Bruggen; He; Shin *et al.*, 2018). O composto é absorvido por via oral e dérmica, sendo excretado em sua maior parte na urina. A excreção biliar, todavia, é limitada e a eliminação por meio do ar expirado é muito baixa, quando ingerido o glifosato é amplamente absorvido pelo sistema digestivo e amplamente difundido pelo sangue no organismo (Soares; Silva; Duarte *et al.*, 2021; Connolly; Jones; Basinas *et al.*, 2019).

Alguns trabalhos anteriores já demonstraram efeitos tóxicos do glifosato no sistema nervoso, hepático, renal e reprodutivo (Van Bruggen; He; Shin *et al.*, 2018; Pu; Yang; Chang *et al.*, 2020; Kubsad; Nilsson; King *et al.*, 2019).

Estudos *in vitro*, também já evidenciaram que o glifosato causa danos genéticos, aumenta o estresse oxidativo, interfere na via do estrogênio, pode comprometer as funções cerebrais e tem sido correlacionado com várias formas de câncer (Peillex; Pelletier, 2020; Nagy; Tessema; Budnik *et al.*, 2019).

Como aludido, os dados são amplos sobre os efeitos nocivos da exposição ao glifosato na saúde, e por ser um herbicida muito utilizado a garantia da sua segurança nas concentrações de exposições para a população em geral necessita estar em constante ponderação, e por isso requer um número maior de estudos que corroborem, abalizando a cerca da segurança a exposição crônica oral ou inalatória ao glifosato.

2.3 Implicações do Glifosato na Saúde Hepática

O fígado é um órgão protagonista em diversos processos metabólicos inerentes ao funcionamento do corpo humanos e também desempenha papel

coadjuvante correlacionando ação com outros órgãos e glândulas. O fígado representa o segundo maior órgão do corpo humano podendo chegar a pesar cerca de 1.500kg aproximadamente (Souza; Moreira, 2007). O fígado desempenha o papel de glândula mista, neste contexto ele é considerado a maior glândula do corpo humano e constitui-se como a maior glândula do corpo humano. Ele é considerado uma das glândulas anexas do sistema digestório e se localiza predominantemente no quadrante superior direito do abdome, onde é protegido pela caixa torácica e pelo diafragma (Souza; Moreira, 2007).

O fígado pode ser dividido anatomicamente em lobo direito, lobo esquerdo, lobo caudado e lobo quadrado. O plano mediano definido pelo ligamento falciforme e pela fissura sagital esquerda separa o lobo hepático direito, que é o mais extenso, do lobo hepático esquerdo, bem menor. Os lobos quadrado e caudado são os dois lobos acessórios partes do lobo hepático direito anatômico. O quadrado é anterior e inferior, enquanto o caudado é posterior e superior (Souza; Moreira, 2007).

O fígado é também constituído pelo sistema porta hepática compondo esse sistema encontra-se a veia hepática, a artéria hepática e o ducto hepático, responsáveis por carrear substâncias e nutrientes absorvidas pelo estômago, pâncreas e intestino grosso (ceco e reto) (Souza; Moreira, 2007; Kubes; Jenne, 2018).

As veias centrais se unem e formam as hepáticas, que drenam para a veia cava inferior. Entre os hepatócitos encontram-se vasos sanguíneos de diâmetro reduzido, os sinusoides hepáticos. Os ductos hepáticos direito e esquerdo se unem e formam o ducto hepático comum. Este se une ao ducto cístico para formar o ducto colédoco. Os ductos hepáticos são os ductos responsáveis pela saída da bile do fígado, por isso são chamados de ductos biliares (Ober; Lemaigre, 2018). Fígado participa ativamente no processo digestivo, sendo este uma ponte do sistema digestório e a corrente sanguínea, uma vez que participa ativamente no processo de captação e distribuição de nutrientes (Kubes; Jenne, 2018).

No sistema circulatório, o fígado é o responsável pela captação, transformação e acúmulo de metabólitos, neutralização e eliminação de substâncias tóxicas, que ocorre através da bile, a secreção exócrina do fígado, fundamental na digestão lipídica. O fígado também é fundamental na produção das proteínas plasmáticas, como a albumina heparina e alguns fatores de coagulação, das

vitaminas, como A, D e B12, e do ferro, além de ser responsável pelo armazenamento de glicogênio (Trefts; Gannon; Wasserman, 2017).

Na hiperglicemia, o fígado promove a captação e o armazenamento da glicose em forma de glicogênio e, na hipoglicemia, ele permite a gliconeogênese como mecanismo compensatório. Há também as células de Kupffer, existentes ao longo dos capilares hepáticos, que fazem fagocitose de algumas bactérias, leucócitos e eritrócitos velhos e alguns detritos que possam atingir a circulação sanguínea, proporcionando ainda uma pequena função de defesa do organismo pelo fígado (Trefts; Gannon; Wasserman, 2017).

As correlações que o fígado estabelece com diversos sistemas fisiológicos, o tornam um órgão muito importante a ser estudado, devido às implicações patológicas que o mesmo pode sofrer e desta forma acarretar um efeito cascata de funcionamento inadequado nos demais sistemas fisiológicos. Nos últimos anos diversos achados tem mostrado como fatores orgânicos, intrínsecos e extrínsecos podem causar mutações celulares e desta forma dar origem a doenças (Eskenazi; Gunier; Rauch *et al.*, 2023).

A exposição prolongada ao Glifosato mesmo que não diretamente, como por mulheres grávidas, e crianças na primeira infância exacerba exponencialmente os casos de distúrbios cardiometabólicos e distúrbios hepáticos; com o aumento de biomarcadores inflamatórios (Eskenazi; Gunier; Rauch *et al.*, 2023).

Buscado nortear ações de segurança a saúde, diversos estudos têm sido conduzido com intuito de evidenciar as ações deletérias ao funcionamento fisiológico do fígado. O mecanismo de ação desse potente e tão abundantemente usado agroquímico foi observado em diversos animais, em peixes o processo de exposição desencadeia um processo inflamatório intestinal, inibi de maneira significativa a biossíntese de ácidos biliares, induz ao processo de inflamação hepática e de esteatose hepática, danos no sistema nervoso também tem sido alvo de estudo devido alguns achados em peixes (Yan; Sun; Fu *et al.*, 2023; Cao; Rao; Cui *et al.*, 2022).

Um importante achado fisiológico no fígado é o estresse oxidativo; processo que ocorre quando há desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a resposta do sistema de defesa antioxidante, a exposição ao glifosato induz a interrupção do metabolismo energético culminando na ativação do processo inflamatório, esse foi achado importante visto em exposição do glifosato em

camundongos. A exposição propiciou alterações estruturais às células hepáticas, vacuolização, edema mitocondrial, promoção da glicogênese síntese e alongamento de ácidos graxos e complemento ativado e sistema de cascatas de coagulação no fígado (Qi; Dong; Chao *et al.*, 2023).

Pelo importante papel do fígado no sistema digestivo, exposição de forma oral tem demonstrado contaminação e agravos quando comprado a outros tipos de contaminação. A contaminação oral pode acarretar danos ao longo da vida, podendo se manifestar de formas diferentes no decorrer do tempo, e variando também de acordo com o contato com o material contaminado. São diversos os achados que corroboram com a hipótese de danos severos as células hepáticas, com o aprimoramento de tecnologias outrora inexistente, têm sido usadas para viabilizar estudos assertivos com maior acurácia e imparcialidade diante do material a ser estudado (Eskenazi; Gunier; Rauch *et al.*, 2023).

2.4 Aplicações do Processamento Digital de Imagens (PDI)

Com o advento da era da informação, houve grandes transformações subsidiadas pela tecnologia. Com as ferramentas tecnológicas atuais, possibilitou o surgimento de estudos mais apurados a cerca do funcionamento das células humanas, isso graças a tecnologia que permite tornar visíveis estruturas nanoscópicas. Desta forma o uso de processamento digital de imagens permite dar maior acurácia, e amplitude nos resultados de estudos. Neste sentido as tecnologias têm sido amplamente usadas em prol da busca por esclarecimentos mais precisos e imparciais em diversas áreas da ciência, o processamento digital vem ganhando cada vez mais espaço, por ser uma ferramenta que torna o processo mais imparcial e fidedigno (Pereira; Rafael, 1992).

O processamento digital de imagens (PDI) se desenvolveu substancialmente a partir de meados da década de 60; trata-se de uma área da eletrônica na qual as imagens são convertidas em matrizes e números inteiros, em que cada elemento é composto por Picture element (pixel) e por meio de algoritmos computacionais ocorre aprendizagem de máquina, com desenvolvimento de simulações e classificações que retenham os mecanismos originários encontrados em sistemas naturais, permitindo a manipulação e tratamento das imagens de acordo com os objetivos pretendidos com maior facilidade de extração das

informações, de forma automatizada, uma maior definição da imagem em si, identificação de características de componentes particulares, detecção de lesões, análise quantitativa e qualitativa de diversos parâmetros (como quantidade, diâmetro, volume, área, densidade, morfologia e até mesmo textura, de acordo com o reconhecimento de padrão e algoritmo utilizados (Ruiz; Lordsleem Junior; Sousa Neto *et al.*, 2021).

Mesmo em um conjunto de células microscópicas, abalizando se estão doentes ou íntegras) possibilitando a análise de um grande volume de dados em rápida velocidade de manipulação, de forma constantemente atualizada e permitindo a geração de novos produtos, como gráficos, tabelas e imagens (Pereira; Rafael, 1992).

O processamento digital de imagens é uma ferramenta com vasta gama de aplicabilidade estendendo desde a área de construção civil, para identificação precoce de fissuras em revestimentos cerâmicos, tornando o processo de inspeção de fachadas, muito mais dinâmico e com maior acurácia (Ruiz; Lordsleem Junior; Sousa Neto *et al.*, 2021).

Essa ferramenta perpassa diversas áreas, no âmbito da saúde pode ser usado para melhorar a qualidade de imagens, e torna-las mais relevantes, facilitando o consenso para diagnóstico (Kubes; Jenne, 2018). Ainda dentro do âmbito da saúde um importante estudo acerca de retinopatia diabética, visando angariar dados para a construção de uma ferramenta de identificação da patologia de forma mais rápida e precisa, usou-se da ferramenta de processamento digital de imagens com intuito de mensurar estruturas e por fim estabelecer o estado de integridade das células (Winder; Morrow; Mcritchie *et al.*, 2009).

É inegável a contribuição do processamento digital para as pesquisas contrapondo-se à inteligência artificial, a análise manual das imagens limita-se à trabalhosa estereotipia, sistemas de pontuação mal definidos, está condicionado à experiência do pesquisador ou especialista e ainda possui subjetividade quanto à expectativa de resultados (Albuquerque; Albuquerque, [s.d]). Portanto, o uso do PDI permite um padrão de alto rendimento de forma imparcial, elevando a eficácia e objetividade, atributos essenciais na detecção e estudos das diversas patologias dentro da medicina, tendo um impacto direto na saúde pública (Pereira; Rafael, 1992; Dietert; Nouailles; Gutbier *et al.*, 2018).

MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspecto de natureza ética

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética no uso de Animais da Universidade do Oeste Paulista para ser realizado de acordo com o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório do Instituto Nacional de Saúde (USA).

Todo o material biológico usado na elaboração do presente estudo encontra-se armazenado no laboratório da universidade, proveniente de um outro estudado já aprovado e realizado, intitulado 'COMPARAÇÃO MORFOLÓGICA PULMONAR DE RATOS EXPOSTOS CRONICAMENTE POR VIA INALATÓRIA E ORAL AOS HERBICIDAS GLIFOSATO E ÁCIDO 2,4 DICLOROFENOXIACÉTICO', aprovado em 13/11/2019 sob protocolo 5684, de responsabilidade da Dra. Renata Calciolari Rossi.

3.2 Caracterização da amostra

Para a realização dos experimentos, foram utilizados 112 ratos Wistar ambos os sexos (100-150g), fornecidos pelo Biotério Central da UNOESTE, alocados em gaiolas plásticas coletivas (5 animais por gaiola) medindo 600 X 415 milímetros, à temperatura média de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com ciclos de 12 horas de luminosidade, perfazendo o período das 07:00 as 19:00 horas (período claro) e 19:00 as 07:00 horas (período escuro).

Os animais foram divididos aleatoriamente em oito grupos composto por 14 animais. Conforme aludido na (tabela 2):

Tabela 2- Divisão dos animais por grupo de distintas concentrações do herbicida Glifosato e formas de exposição (inalatória e oral).

Grupo Experimental	Sigla	Concentração de Glifosato
Controle Oral	GCO	Ração nebulizada com 10 ml de água destilada
Baixa Concentração Oral	GBCO	Ração nebulizada com 187,17 mg/m ³
Média Concentração Oral	GMCO	Ração nebulizada com 312,28 mg/m ³
Alta Concentração Oral	GACO	Ração nebulizada com 467,63 mg/m ³
Controle Inalatório	GCI	Inalação com 10 ml de água destilada
Baixa Concentração Inalatória	GBCI	Inalação com 187,17 mg/m ³
Média Concentração Inalatória	GMCI	Inalação com 312,28 mg/m ³
Alta Concentração Inalatória	GACI	Inalação com 467,63 mg/m ³

Legenda: *Em miligramas por metros cúbicos (mg/m³), avaliando ensaio ambientalmente relevante segundo desenho de aplicação do produto.

Fonte: Autor

3.3 Protocolo de exposição ao herbicida glifosato

O protocolo de experimentação contou com duas caixas (32 x 24 x 32 cm), cada uma ligada a um nebulizador ultrassônico da marca Pulmosonic Star® (Figura 2), o qual foi administrada as seguintes concentrações diluídas em 10 ml de cloreto de sódio, conforme exposto (tabela 3).

Figura 2- Caixas de experimentação com nebulizador.



Fonte: Gomes, Gabriela

Tabela 3- Diluição do composto ativo por hectare (g.i.a/ha), diluídos em Cloreto de sódio (inalatória e oral).

Grupo Experimental	Sigla	Ingrediente Ativo
Grupo Controle	GC	Solução composta apenas por
		10 ml de Cloreto de sódio
Grupo Baixa Concentração	GBC	Solução composta por $3,71 \times 10^{-3}$
		(g.i.a/ha), diluídos em Cloreto de sódio
Grupo Média Concentração	GMC	Solução composta por $6,19 \times 10^{-3}$
		(g.i.a/ha), diluídos em Cloreto de sódio
Grupo Alta Concentração	GAC	Solução composta por $9,28 \times 10^{-3}$
		(g.i.a/ha), diluídos em Cloreto de sódio

Legenda: (g.i.a/ha) gramas de ingrediente ativo por hectare

Fonte: Autor

O tempo de exposição foi de aproximadamente 15 minutos, para que toda a solução fosse nebulizada. Os animais que foram expostos por via inalatória foram nebulizados diariamente. A ração dos animais expostos por via oral foi trocada a cada dois dias, sendo a nebulização da ração realizada 24 horas antes de ser ofertada aos animais. Todos os animais foram submetidos a 180 dias de experimento.

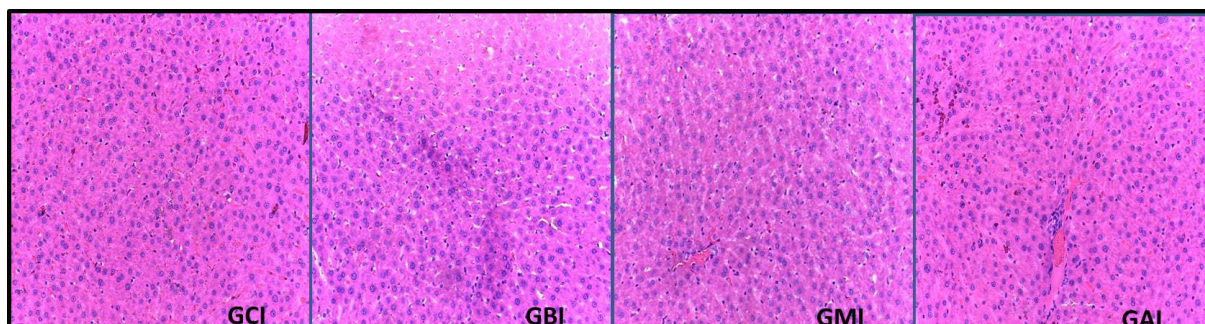
3.4 Coleta do material

Depois de realizado o protocolo de experimentação, os animais foram eutanasiados utilizando-se de tiopental sódico (30 mg/kg do peso corporal) por via intraperitoneal. Após esta etapa, procedeu-se a autópsia para retirada do fígado destes animais e posteriormente o processamento e confecção dos blocos em parafina.

3.5 Análise histológica

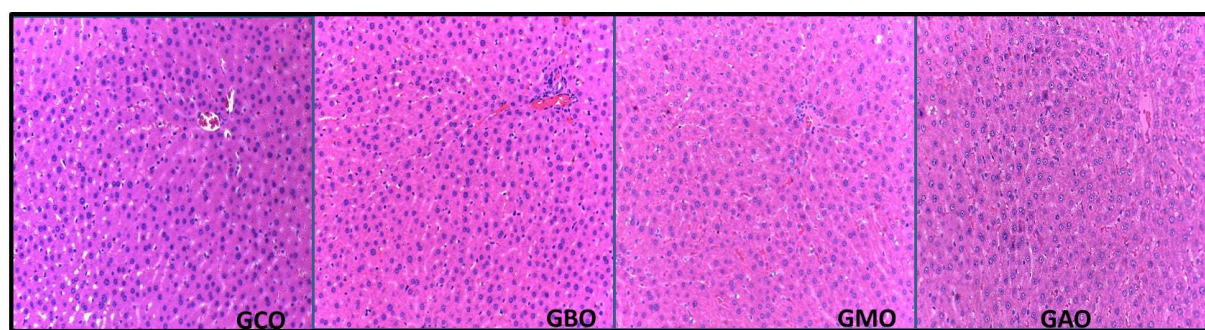
Foram realizados cortes de 5µm das amostras de fígado, foram corados com Hematoxilina e Eosina para posterior seleção das áreas hepáticas mais apropriadas para avaliação morfológica. Foram incluídos no estudo lâminas de fígado com preservação da arquitetura histológica. O protocolo da técnica de Hematoxilina e Eosina consiste primeiramente em desparafinizar, alcoolizar (álcool absoluto) e hidratar. Em seguida a este procedimento mergulha-se em Hematoxilina de Harris por 5 minutos e lava-se em água corrente, após isso mergulha-se a lâmina no diferenciador por 4 segundos (álcool ácido clorídrico) e lava-se rapidamente em água corrente. Subsequente a esta fase, o fragmento é mergulhado em Eosina por 5 minutos, seguido por álcool absoluto, para posterior montagem em meio sintético com entelan. Foi utilizado o software Image-Pro Plus® (Versão 7.0, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) para quantificar as células hepáticas, em toda extensão do corte do tecido do fígado dos ratos.

Figura 3– Imagens de lâminas, grupo inalatório.



Fonte: Autor

Figura 4- Imagens de lâminas, grupo oral.



Fonte: Autor

Para cada imagem, a contagem de hepatócitos íntegros e lesados foi realizada de forma automática utilizando uma metodologia com base em técnicas de processamento digital de imagens. Para isso, inicialmente, foi realizado um pré-processamento nas imagens para a segmentação de cada hepatócito; a sequência, e os hepatócitos segmentados foram classificados como íntegros ou lesados, seguindo algumas métricas obtidas dos hepatócitos das imagens e alguns parâmetros definidos empiricamente:

- Área do hepatócito (contagem dos pixels interiores da região do hepatócito segmentado) calculada utilizando o algoritmo de preenchimento de região (Vieira Neto; Marques Filho, 1999).
- Pontos de contorno do hepatócito (perímetro) usando o algoritmo Border Following (Suzuki; Be, 1985).
- Retângulo envolvendo o hepatócito a partir dos planos cartesianos;
- Retângulo mínimo envolvendo o hepatócito segmentado (possivelmente rotacionado) utilizando os pontos de contorno obtidos pelo algoritmo Border Following (Suzuki; Be, 1985).

Com o uso do processamento de imagem foi possível dar maior robustez a quantidade de células estudadas; foram avaliadas 25 mil células hepáticas de cada grupo, perfazendo o total de 200 mil células avaliadas.

As classificações dos hepatócitos como íntegros ou lesados foram realizadas seguindo algumas regras e alguns parâmetros mínimos e máximos atribuídos empiricamente às métricas definidas e obtidas dos hepatócitos segmentados das imagens. Foi definido que todos os hepatócitos encontrados nas bordas das imagens, ou menores do que um tamanho mínimo de 43x43, ou com área menor que uma área mínima de 725, ou perímetro menor que um perímetro mínimo de 175, ou largura menor do que uma largura mínima de 37 seriam excluídos da classificação.

Após a confecção das lâminas, foram capturadas imagens em microscópio com câmera acoplada (Leica ICC50 HD) para analisá-las morfometricamente. Foi utilizado o software Image-Pro Plus® (Versão 7.0, Media Cybernetics). Para a análise dos resultados foi criado um banco de dados eletrônico (Excel®).

3.6 Análise estatística

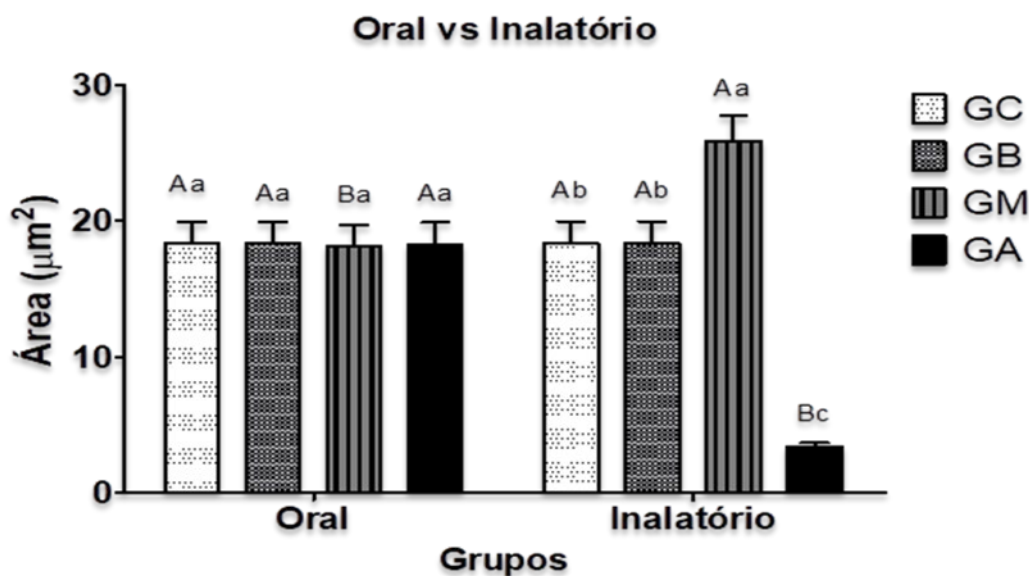
Para análise estatística foi utilizado o programa estático R Studio, para a confecção do gráfico o programa graphpad prisma. Os dados foram avaliados quanto a sua normalidade utilizando o teste estatísticos de Shapiro-Wilk, foram estimados normais os dados que apresentaram $p > 0,05$. Para as análises estatísticas, foram considerados o esquema fatorial de 4 doses (GC, GBC, GMC e GAC) em dois tipos de tratamentos (Inalatório e Oral). Neste sentido, foi utilizado o teste estatístico de Anova de dois fatores (TwoWay Anova) para medidas não repetidas. Foram considerados como estatisticamente diferente os valores de média que apresentaram um $p < 0,05$. Em seguida realizamos uma análise a posteriori de comparações múltiplas, utilizando o teste de Bonferroni. A análise de Bonferroni ajusta o nível de significância para contabilizar múltiplas comparações. Os resultados foram apresentados em gráficos de colunas onde pode ser observada a média como medida de posição e a variação representada pelo desvio padrão.

4 RESULTADOS

Durante o período de exposição crônica oral e inalatória de 180 dias, não houve morte de nenhum dos animais objeto do estudo, até a referida data da eutanásia.

O período de exposição ao glifosato apresentou alterações no epitélio hepático dos animais expostos por via inalatória, os animais cuja exposição procedeu por via oral, não apresentaram alterações quando comparados ao grupo inalatório. Os resultados da ANOVA de dois fatores evidenciam que a Via de Administração (Oral e Inalatória) apresentaram uma diferença significativa ($p < 0,05$) conforme exposto na figura 5.

Figura 5- Comparação entre grupos e dosagens.



Legenda: Letras maiúscula comparação entre grupos (Inalatório e Oral). Letras minúsculas comparação entre as doses (GC=Grupo Controle; GB=Grupo Baixa Concentração; GM=Grupo Média Concentração; GA=Grupo Alta Concentração.) Letras diferentes apresentam diferença estatística ($p < 0,05$)

Outro achado preponderante foi encontrado o grupo de exposição inalatória, o qual demonstrou alterações no grupo de média concentração inalatória, este grupo destacou se entre todos, com maior número de células alteradas, a via de administração e a dose apresentaram efetividade em causar efeitos nocivos. Os resultados obtidos através do ANOVA de dois fatores abalizam este achado com

evidencia de valor de $p < 0,05$. Ratificando que a interação entre a via de administração e a dose também mostra um efeito expressivo.

Os resultados obtidos através das análises realizadas são indicativos que tanto a via de administração quanto a dose, e sua interação, têm efeitos significativos nos resultados medidos. Isso sugere que a resposta depende tanto da via de administração quanto da dose, e que o efeito de uma pode variar em função uma da outra.

Observando a análise de comparações múltiplas (Bonferroni), a média do grupo GM da via de administração inalatória foi maior em comparação com os outros grupos. Este grupo também apresentou maior média em comparação com a via de administração oral. Já quando observamos o grupo GA da via de administração inalatória foi menor em comparação com os outros grupos desta mesma via. Isso poderia ter levado ao resultado de interação.

A interação significativa entre Dose e Via de administração indica que o efeito da Dose nos resultados varia dependendo da Via de administração. Isso significa que a influência da Dose não é consistente em todos os níveis de Via de administração. Tanto a Dose quanto o Via de administração têm efeitos significativos e isolados nos resultados. No entanto, devido à interação significativa, os efeitos da Dose e do Via de administração nos resultados não podem ser interpretados de forma independente. Isso significa que o efeito de um depende do nível do outro.

5. DISCUSSÃO

Embora o uso e a interação do glifosato seja um tema bastante abordado, no que tange alterações as células hepáticas, carecem de mais estudos para definir o mecanismo de interação, e as suas respectivas implicações em longo prazo, no processo de surgimento de patologias (Christensen, 2023; Pinheiro; Batista; Ourique *et al.*, 2023). A presente pesquisa aborda uma temática de extrema importância para a sociedade, com robustez de resultados, foram analisadas 200 mil células hepáticas, para que então fosse possível chegar aos resultados alcançados.

Neste contexto o presente estudo traz novas e relevantes informações acerca da temática. A pesquisa angariou dados importantes da exposição oral e inalatória ao glifosato, a pesquisa evidenciou que há uma maior interação quando o mecanismo de contaminação do glifosato é por via inalatória; evidenciou ainda que a dosagem de media concentração quando administrada por via inalatória apresenta uma interação significativa sendo capaz de causar danos hepáticos.

A via inalatória com dose de media concentração apresentou maiores alterações que a via de alta concentração, esse achado pode ser atribuído por uma provável sensibilidade maior a medias concentrações de ingrediente ativo (Parizi; Tolardo; Lisboa *et al.*, 2020).

Esses achados corroboram com a pertinência da temática, tendo em vista as grandes áreas de pulverização, que expõe trabalhadores ao glifosato. A deriva do produto faz com que moradores de áreas próximas também sejam indiretamente expostos ao ingrediente ativo nocivo.

Embora tendo seu efeito deletério atingindo diversos sistemas corpóreos, em diferentes proporções, no período de exposição proposto pelo estudo, os resultados angariados evidenciam que as concentrações de ingrediente ativo, assim como a via, são preponderantes para as alterações. Contudo a exposição crônica mesmo em doses altas não culminou em letalidade, é possível que em maior tempo de observação, fosse observado o desenvolvimento de quadros e agravos que levassem a letalidade, outros estudos com período de exposição análoga a este, chegaram a resultados semelhantes sem que houvesse o óbito das matrizes estudadas, o que embasa a necessidade de estudos observacionais a longo prazo para acompanhar o desenvolvimento dos agravos sugestivos obtidos com a exposição crônica (Maia; Porto; Magalhães *et al.*, 2021).

Tão importante quanto à cronicidade da exposição encontra-se a via de contaminação; a via de exposição ao ingrediente ativo pode condicionar respostas imunológicas mais exacerbadas, induzindo a resposta diferente. No presente estudo foi observado que a via inalatória apresentou maiores alterações quando comparada a via de administração oral, o grupo exposto de maneira inalatória com média concentração de ingrediente ativo houve maior injúria às células hepáticas. As diferentes concentrações de ingrediente ativo administrada por via oral, não suscitaram alterações com relevância significativa, para embasamento de que a exposição oral seja mais nociva, contrapondo-se a estudo realizado em carpas que tiveram sua contaminação via oral através de alimentação e evidenciou danos hepáticos significativos, com alterações nos níveis das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), sendo sugestivo de injúria hepática (Abdelmagid; Said; Abdel-Gawad *et al.*, 2023).

O processo de exposição crônica ao glifosato ocorre majoritariamente pela via inalatória, seja de maneira direta através do manuseio, da aplicação do produto, ou de maneira indireta pela deriva que leva as gotículas para lugares aquém do local de pulverização. O presente estudo evidenciou que a dosagem de média concentração inalatória, é responsável por alterações de relevância científica, esta dosagem é capaz de suscitar alterações importantes às células hepáticas, o que é sugestivo de alterações e danos ao fígado. A cronicidade da exposição traz consigo alterações relevantes em diversos processos fisiológicos, assim como encontrado nesta pesquisa, outro estudo realizando a coleta de urina de trabalhadores da área rural que expuseram-se nos últimos anos durante o processo de pulverização, encontrou glifosato sendo excretado na urina (Chang; Andreotti; Ospina *et al.*, 2023).

As diferentes concentrações de exposição vêm sendo observadas, a fim de estabelecer níveis de segurança quanto ao contato com o glifosato, na presente pesquisa não foi possível observar relevância no que tange baixos níveis de exposição, tanto na exposição oral quanto inalatória, as baixas concentrações não foi possível identificar disparidades nas alterações, em contra-ponto a um estudo de coorte prospectivo realizado com pessoas expostas a contaminação inalatória devido à deriva, as participantes gestantes expostas ao glifosato foram acompanhadas por um período de 18 anos, neste período as crianças foram sendo acompanhadas e monitoradas. Todos estavam a cerca de 1,6km de distância do foco de aplicação

do glifosato. Este estudo inferiu que esta exposição crônica exacerbou o risco de injúria hepática, entre outras doenças (Eskenazi; Gunier; Rauch *et al.*, 2023).

Observou-se no grupo exposto a alta concentração inalatória de ingrediente ativo, uma média menor do que os outros grupos da mesma via, isso reforça a ideia de que a Via de Administração influencia diferentemente o efeito das doses, evidenciando como um processo de interação pode se manifestar. Em controversa ao estudo realizado com metodologia e tempo de exposição semelhante, que observou uma maior alteração relativa a altas concentrações e alterações esôfago e intestino delgado e grosso, independente do sexo (de Maria Serra; Parizi; Odorizzi *et al.*, 2021).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente estudo evidenciam que o herbicida glifosato causa alterações no epitélio hepático, quando administrado por via inalatória em media concentração, por período crônico.

A via de exposição oral no que tange tecido hepático não demonstrou resultados sugestivos de alterações, independente das doses administradas, enquanto que o grupo exposto por via inalatória em media concentração apresentou alterações sugestivas de dano hepático. Um período maior de acompanhamento seria necessário para observar o progresso dos danos e assim compreender até que ponto as injúrias ao tecido hepático poderiam suscitar um quadro de ineficácia da homeostase.

A exposição crônica ao glifosato em diferentes concentrações e por diferentes meios seja oral ou inalatório, apresentam alterações nas dimensões do núcleo do tecido hepático, essas alterações podem culminar em desenvolvimento de quadros patológicos. É indubitável a necessidade de maiores estudos, em períodos maiores e maiores populações ensejando, acompanhar as alterações ao longo do tempo.

Há um grande caminho a ser percorrido a fim de evidenciar o efeito deletério do glifosato, não somente na saúde do homem, quanto para todo o ecossistema. É de crucial importância buscar meios e alternativos mais seguros para a população exposta e também para o meio ambiente. Assim sendo, são necessários maiores estudos de comparação entre grupos e sistemas corpóreos para desta forma mitigar os riscos que a exposição ao glifosato pode causar. Sugere-se ampliar as pesquisas sobre os efeitos da exposição por períodos mais longos na saúde animal, humana e ambiental.

REFERÊNCIAS

- ABDELMAGID, A. D.; SAID, A. M.; ABD EL-GAWAD, E. A.; SHALABY, S. A.; DAWOOD, M. A. O. Glyphosate-induced liver and kidney dysfunction, oxidative stress, immunosuppression in Nile tilapia, but ginger showed a protection role. **Vet Res Commun**, v. 47, n. 2, p. 445–455, 30 jun. 2023. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s11259-022-09961-0>
- ALBUQUERQUE, M. P. de; ALBUQUERQUE, M. P. de. Processamento de Imagens: Métodos e Análises. Cent Bras Pesqui Físicas – CBPF/MCT, [s.d].
- ANTUNES, B. C.; RIBEIRO, L. G.; ROQUE, A. M.; FERREIRA, K. M.; WINKALER, E. U; LHANO, M. G. O herbicida glifosato pode interferir nas interações sociais de abelhas *Apis mellifera* operárias? **Res Soc Dev**, v. 12, n. 6, pe29412642439, 2023.
- ARAÚJO, E. C. de. **Frota brasileira de aeronaves agrícolas – 2020**. SINDAG- Sindicato Nacional das Empresas de Aviação Agrícola, 2020. Disponível em: <https://sindag.org.br/wp-content/uploads/2021/05/frota-2020-versao-2.pdf>
- ARAÚJO, I. M. M. de; OLIVEIRA, Â. G. R. da C. Agronegócio e agrotóxicos: impactos à saúde dos trabalhadores agrícolas no nordeste brasileiro. **Trab Educ e Saúde**, v. 15, n. 1, p. 117–129, 15 dez. 2016. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1981-77462017000100117&lng=pt&tlng=pt
- BAEK, Y.; BOBADILLA, L. K.; GIACOMINI, D. A.; MONTGOMERY, J. S.; MURPHY, B. P.; TRANEL, P. J. Evolution of Glyphosate-Resistant Weeds. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 255, p. 93–128, 2021. Disponível em: https://link.springer.com/10.1007/398_2020_55
- BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **LSPA - Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Brasília: IBGE, 2017.
- BRASIL. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos. **Relatórios de**

comercialização de agrotóxicos. Brasília: IBAMA, 2022. Disponível em:

<https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>

BRASIL. Ministério da Fazenda. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Parecer nº 4/2018.** Brasília: ANVISA, 2018. Disponível em: https://www.gov.br/fazenda/pt-br/central-de-conteudo/notas-tecnicas-e-pareceres/advocacia-da-concorrencia/2018/parecer-04_2018_anvisa.pdf/view

BRASIL. Ministério da Fazenda. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa de análise de resíduos de agrotóxico em alimentos- PARA.** Brasília: ANVISA, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos/arquivos/3772json-file-1>; 2018. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos/arquivos/3772json-file-1>

CAO, X.; RAO, C.; CUI, H.; SUN, D.; LI, L.; GUO, S.; ZHOU, J.; YUAN, R.; YANG, S.; CHEN, J. Toxic effects of glyphosate on the intestine, liver, brain of carp and on epithelioma papulosum cyprinid cells: Evidence from in vivo and in vitro research. **Chemosphere**, v. 302, p. 134691, set. 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35489457/>

CASTRO, A. **Pulverização aérea de agrotóxico pode causar doenças e até matar, dizem debatedores.** Brasília: Senado Federal, 2023. Disponível em: <https://www12.senado.leg.br/noticias/materias/2023/05/15/pulverizacao-aerea-de-agrotoxico-pode-causar-doencas-e-ate-matar-dizem-debatedores#:~:text=Em%20audi%C3%A2ncia%20p%C3%ABlica%20na%20Comiss%C3%A3o,ou%20at%C3%A9%20levar%20%C3%A0%20morte.>

CEARÁ (estado). **Lei Nº 16.820**, de 08 de janeiro de 2019. Dispõe sobre o uso, a produção, o consumo, o comércio e o armazenamento dos agrotóxicos, seus componentes e afins bem como sobre a fiscalização do uso de consumo do comércio, do armazenamento e do transporte interno desses produtos. Fortaleza,

2019.

CHANG, V. C.; ANDREOTTI, G.; OSPINA, M.; PARKS, C. G.; LIU, D.; SHEARER, J. J.; ROTHMAN, N.; SILVERMAN, D. T.; SANDLER, S. P.; CALAFAT, A. M.; FREEMAN, L. E. B.; HOFMANN, J. N. Glyphosate exposure and urinary oxidative stress biomarkers in the Agricultural Health Study. **JNCI J Natl Cancer Inst**, v. 115, n. 4, p. 394–404, 11 abr. 2023. Disponível em: <https://academic.oup.com/jnci/article/115/4/394/6984725>

CHRISTENSEN, K. Looking beyond Cancer: Glyphosate and Liver, Metabolic Diseases in Youth. **Environ Health Perspect**, v. 131, n. 5, mai. 2023. Disponível em: <https://ehp.niehs.nih.gov/doi/10.1289/EHP12940>

CONNOLLY, A.; JONES, K.; BASINAS, I.; GALEA, K. S.; KENNY, L.; MCGOWAN, P.; COGGINS, M. A. Exploring the half-life of glyphosate in human urine samples. **Int J Hyg Environ Health**, v. 222, n. 2, p. 205–10, mar. 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1438463918305972>

COSTA, A. G. F.; VELINI, E. D.; NEGRISOLI, E.; CARBONARI, C. A.; ROSSI, C. V. S.; CORRÊA, M. R.; SILVA, F. M. L. Efeito da intensidade do vento, da pressão e de pontas de pulverização na deriva de aplicações de herbicidas em pré-emergência. **Planta Daninha**, v. 25, n. 1, mar. 2007. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010083582007000100023&lng=pt&tlng=pt

CUNHA, J. P. A. R. da. Simulação da deriva de agrotóxicos em diferentes condições de pulverização. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 5, p. 1616–1621, out. 2008. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542008000500039&lng=pt&tlng=pt

de MARIA SERRA, F.; PARIZI, J. L. S.; ODORIZZI, G. A. S. DE M.; SATO, G. M. R. H.; PATRÃO, I. B.; CHAGAS, P. H. N.; MELLO, F. de A.; NAI, G. A. Subchronic exposure to a glyphosate-based herbicide causes dysplasia in the digestive tract of Wistar rats. **Environ Sci Pollut Res**, v. 28, n. 43, p. 61477–61496, nov. 2021.

Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s11356-021-15051-6>

DIETERT, K.; NOUAILLES, G.; GUTBIER, B.; REPPE, K.; BERGER, S.; JIANG, X.; SCHAUER, A. E.; HOCKE, A. C.; HEROLD, S.; SLEVOGT, H.; WITZENRATH, M.; SUTTORP, N.; GRUBE, A. D. Digital Image Analyses on Whole-Lung Slides in Mouse Models of Acute Pneumonia. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 58, n. 4, p. 440–448, abr. 2018. Disponível em: <http://www.atsjournals.org/doi/10.1165/rcmb.2017-0337MA>

DIETRICH, L. J.; ALMEIDA, N. M. de. Desmatamento da Amazônia, impactos ambientais e desafios para a espiritualidade cristã. **Franciscanum**, v. 62, n. 173, p.1–30, 10 abr. 2020. Disponível em: <https://revistas.usb.edu.co/index.php/Franciscanum/article/view/4112>

ESKENAZI, B.; GUNIER, R. B.; RAUCH, S.; KOGUT, K.; PERITO, E. R.; MENDEZ, X.; LIMBACH, C.; HOLLAND, N.; BRADMAN, A.; HARLEY, K. G.; MILLS, P. J.; MORA, A. M. Association of Lifetime Exposure to Glyphosate and Aminomethylphosphonic Acid (AMPA) with Liver Inflammation and Metabolic Syndrome at Young Adulthood: Findings from the CHAMACOS Study. **Environ Health Perspect**, v. 131, n. 3, mar. 2023. Disponível em: <https://ehp.niehs.nih.gov/doi/10.1289/EHP11721>

FIGUEIREDO, G. M. DE; TRAPE, A. Z.; ALONZO, H. A. Exposição a múltiplos agrotóxicos e prováveis efeitos a longo prazo à saúde: estudo transversal em amostra de 370 trabalhadores rurais de Campinas (SP). **Revista Brasileira de Medicina do Trabalho**, v. 9, n. 1, 2011. Disponível em: <http://www.rbmt.org.br/details/93/pt-BR>

FOGLIATTO, S.; FERRERO, A.; VIDOTTO, F. Current and future scenarios of glyphosate use in Europe: Are there alternatives? **Advances in Agronomy**, v. 163, p. 219-278, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S006521132030050X>

GIANESSI, L. P. The increasing importance of herbicides in worldwide crop

production. **Pest Manag Sci**, v. 69, n. 10, p. 1099–1105, out. 2013. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.3598>

HENEKA, M. T.; GOLENBOCK, D.; LATZ, E.; MORGAN, D.; BROWN, R. Immediate and long-term consequences of COVID-19 infections for the development of neurological disease. **Alzheimers Res Ther**, v. 12, n. 1, p. 69, 04 dez. 2020. Disponível em: <https://alzres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13195-020-00640-3>

IPEA. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada. **Texto para discussão:** Agrotóxicos no Brasil: padrões de uso, política da regulação e prevenção da captura regulatória. Brasília: Ipea, 2019. p. 76. Disponível em: http://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/9371/1/td_2506.pdf

KUBSAD, D.; NILSSON, E. E.; KING, S. E.; SADLER-RIGGLEMAN, I.; BECK, D.; SKINNER, M. K. Assessment of Glyphosate Induced Epigenetic Transgenerational Inheritance of Pathologies and Sperm Epimutations: Generational Toxicology. **Sci Rep**, v. 9, n. 1, p. 1–17, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-42860-0>

KUBES, P.; JENNE, C. Immune Responses in the Liver. **Annu Rev Immunol**, v. 36, n. 1, p. 247–277, 26 abr. 2018. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-immunol-051116-052415>

KUDSK, P. R. K. M. Pesticide regulation in the European Union and the glyphosate controversy. **Weed Sci**, v. 68, 2020.

KWIATKOWSKA, M.; JAROSIEWICZ, P.; BUKOWSKA, B. Glyphosate and its formulations - toxicity, occupational and environmental exposure. **Med Pr**, 01 set. 2013. Disponível em: <http://medpr.imp.lodz.pl/Glifosat-i-jego-preparaty-toksycznosc-narazenie-zawodowe-i-srodowiskowe,507,0,1.html>

LOPES, C. V. A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. de. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde em Debate**, v. 42, n.

117, p. 518–534, jun. 2018. Disponível em:
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-11042018000200518&lng=pt&tlng=pt

LOPES, M. J. DOS S.; SANTIAGO, B. S.; SILVA, I. N. B. DA; GURGEL, E. S. C. Impacto do desmatamento e queimas na biodiversidade invisível da Amazônia. **Rev em Agronegócio e Meio Ambient**, v. 16, n. 1, p. 1–14, 17 fev. 2023. Disponível em: <https://periodicos.unicesumar.edu.br/index.php/rama/article/view/9608>

MAIA, F. C. C.; PORTO, R. A.; MAGALHÃES, L. R.; CHAGAS, P. H. N.; NAI, G. A. Cardiovascular damage associated with subchronic exposure to the glyphosate herbicide in Wistar rats. **Toxicol Ind Health**, v. 37, n. 4, p. 210–218, 24 abr. 2021. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0748233721996578>

MARTINS-GOMES, C.; SILVA, T. L.; ANDREANI, T.; SILVA, A. M. Glyphosate vs. Glyphosate-Based Herbicides Exposure: A Review on Their Toxicity. **J Xenobiotics**, v. 12, n. 1, p. 21–40, 17 jan. 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2039-4713/12/1/3>

NAGY, K.; TESSEMA, R. A.; BUDNIK, L. T.; ÁDÁM, B. Comparative cyto- and genotoxicity assessment of glyphosate and glyphosate-based herbicides in human peripheral white blood cells. **Environ Res**, v. 179, p. 108851, dez. 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0013935119306486>

OBER, E. A.; LEMAIGRE, F. P. Development of the liver: Insights into organ and tissue morphogenesis. **J Hepatol**, v. 68, n. 5, p. 1049–1062, mai. 2018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827818300151>

ONU. Organização das Nações Unidas. **Objetivos de Desenvolvimento Sustentável**. Brasília: ONU, 2023. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs>.

PARIZI, J. L. S.; TOLARDO, A. J.; LISBOA, A. C. G.; BARRAVIEIRA, B.; MELLO F. DE A.; ROSSI, R. C.; NAI, G. A. Evaluation of buccal damage associated with acute inhalation exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in mice. **BMC Vet Res**,

v. 16, n. 1, p. 1–10, 2020.

PEILLEX, C.; PELLETIER, M. The impact and toxicity of glyphosate and glyphosate-based herbicides on health and immunity. **J Immunotoxicol**, v. 17, n. 1, p. 163–174, 01 jan. 2020. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/1547691X.2020.1804492>

PEREIRA, A. S.; RAFAEL, J. A. Processamento de imagem em medicina*. **Acta Med Port**, v. 5, p. 23-27, 1992.

PERRON, M. M.; ANWAR, D. Y.; BLOEM, T. Glyphosate. Draft Human Health Risk Assessment in Support of Registration Review. **Human Health Risk Assessment**, p. 1–41, 2017.

PIGNATI, W.; OLIVEIRA, N. P.; SILVA, A. M. C. da. Vigilância aos agrotóxicos: quantificação do uso e previsão de impactos na saúde-trabalho-ambiente para os municípios brasileiros. **Cien Saude Colet**, v. 19, n. 12, p. 4669–4678, dez. 2014. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232014001204669&lng=pt&tlng=pt

PINHEIRO, J. F.; BATISTA, D. G. DE; OURIQUE, I. S.; GÖRCK, L. M. C.; PROBST, R. Q.; HECK, T. G. Efeitos da dose diária aceitável de herbicida à base de glifosato sobre o perfil lipídico hepático. *In*: Congresso Internacional em Saúde, 10., 2023, Ijuí. **Anais** [...]. Ijuí, RS: Universidade Regional, 2023.

PU, Y.; YANG, J.; CHANG, L.; QU, Y.; WANG, S.; ZHANG, K.; XIONG, Z.; ZHANG, J.; TAN, Y.; WANG, X.; FUJITA, Y.; ISHIMA, T.; WAN, D.; HWANG, S. H.; HAMMOCK, B. D. Maternal glyphosate exposure causes autism-like behaviors in offspring through increased expression of soluble epoxide hydrolase. **Proc Natl Acad Sci**, v. 117, n. 21, p. 11753–11759, 26 mai. 2020. Disponível em: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1922287117>

QI, L.; DONG, Y.-M.; CHAO, H.; ZHAO, P.; MA, S.-L.; LI, G. Glyphosate based-herbicide disrupts energy metabolism and activates inflammatory response through

oxidative stress in mice liver. **Chemosphere**, v. 315, p. 137751, fev. 2023.

Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653523000176>

REYNA, E. F.; BRAGA, M. J.; MORAIS, G. A. da S. Impactos do uso de agrotóxicos sobre a eficiência técnica na agricultura brasileira. *In*: VIEIRA FILHO, J. E. R.; GASQUES, J. C. **Uma jornada pelos contrastes do Brasil**: cem anos do Censo Agropecuário. Brasília: Ipea, 2020. p. 173–187. Disponível em:

https://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/10339/17/Uma_jornada_Cap12.pdf

RUIZ, R. D. B.; LORDSLEEM JUNIOR, A. C.; SOUSA NETO, A. F. DE; FERNANDES, B. J. T. Processamento digital de imagens para detecção automática de fissuras em revestimentos cerâmicos de edifícios. **Ambient Construído**, v. 21, n. 1, p. 139–147, jan 2021. Disponível em:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1678-86212021000100139&tlng=pt

SANTOS, A. C. B.; BECHER, R. A.; RETCHESKI, M. C.; CAZAROLLI, L. H.; ROMÃO, S. Efeitos da contaminação por glifosato em duas gerações do peixe. *In*: XI Jornada de Iniciação Científica e Tecnológica, 11., 2009, Curitiba. **Anais [...]**. Curitiba: Fundação Araucária, 2009. p. 3–6.

SILVA, L. G. da; SOARES, U. G.; MELO, S. G. F. de. Evolução da mecanização agrícola: a trajetória da mecanização das colheitadeiras e tratores um estudo com o olhar sobre as máquinas da CASE IH®. **Sci Gen**, v. 4, n. 2, p. 419–428, 3 nov. 2023. Disponível em: <http://scientiageneralis.com.br/index.php/SG/article/view/536>

SOARES, D.; SILVA, L.; DUARTE, S.; PENA, A.; PEREIRA, A. Glyphosate use, toxicity and occurrence in food. **Foods**, v. 10, n. 11, p. 1–22, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8622992/pdf/foods-10-02785.pdf>

SOUZA, A. R.; MOREIRA, A. L. **Observação do fundo ocular**. Porto, Portugal: Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. 2007.

SUZUKI, S.; BE, K. Topological structural analysis of digitized binary images by

border following. **Comput Vision, Graph Image Process**, v. 30, n. 1, p. 32–46, abr. 1985. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0734189X85900167>

TOSETTO, E. E.; ANDRIOLI, A. I.; CHRISTOFFOLI, P. I. Análises das causas das subnotificações das intoxicações por agrotóxicos na rede de saúde em município do Sul do Brasil. **Cien Saude Colet**, v. 26, n. 12, p. 6037–6047, dez. 2021. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232021001206037&tlng=pt

TREFTS, E.; GANNON, M.; WASSERMAN, D. H. The liver. **Curr Biol**, v. 27, n. 21, p. R1147–1151, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5897118/pdf/nihms956351.pdf>

VAN BRUGGEN, A. H. C.; HE, M. M.; SHIN, K.; MAI, V.; JEONG, K. C.; FINCKH, M. R.; MORRIS, J. G. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. **Sci Total Environ**, p. 255–68, 2018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969717330279>

VIEIRA NETO, H.; MARQUES FILHO, O. Processamento digital de imagens. **Brasport**, 1999. Disponível em: <https://www.ogemarques.com/wp-content/uploads/2014/11/pdi99.pdf>

WINDER, R. J.; MORROW, P. J.; MCRITCHIE, I. N.; BAILIE, J. R.; HART, P. M. Algorithms for digital image processing in diabetic retinopathy. **Comput Med Imaging Graph**, v. 33, n. 8, p. 608–622, dez. 2009. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0895611109000810>

YAN, B.; SUN, Y.; FU, K.; ZHANG, Y.; LEI, L.; MEN, J.; GUO, Y.; WU, S.; HAN, J.; ZHOU, B. Effects of glyphosate exposure on gut–liver axis: Metabolomic and mechanistic analysis in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). **Sci Total Environ**, v. 902, p. 166062, dez. 2023. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969723046879>