

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À MISTURA COMERCIAL DE GASOLINA/ETANOL
SOBRE A FUNÇÃO REPRODUTIVA MASCULINA EM MODELO EXPERIMENTAL

KÁTIA CRISTINA DE MELO TAVARES VIEIRA

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À MISTURA COMERCIAL DE GASOLINA/ETANOL
SOBRE A FUNÇÃO REPRODUTIVA MASCULINA EM MODELO EXPERIMENTAL**

**KÁTIA CRISTINA DE MELO TAVARES
VIEIRA**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre – Área de concentração: Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional.

Orientador:
Profa. Dra. Ana Paula Alves Favareto

Coorientador:
Prof. Dr. Danillo Roberto Pereira

616.980 3
V658e

Vieira, Kátia Cristina de Melo Tavares.

Efeitos da exposição à mistura comercial de gasolina/etanol sobre a função reprodutiva masculina em modelo experimental / Kátia Cristina de Melo Tavares Vieira. – Presidente Prudente, 2018.

69 f.: il.

Dissertação (Mestrado em meio Ambiente e Desenvolvimento Regional) -Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2018.

Bibliografia.

Orientador: Ana Paula Alves Favareto.

1. Benzeno. 2. Tolueno. 3. Xileno. 4. Reprodução. 5. Rato. Título.

KÁTIA CRISTINA DE MELO TAVARES VIEIRA

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À MISTURA COMERCIAL DE GASOLINA/ETANOL
SOBRE A FUNÇÃO REPRODUTIVA MASCULINA EM MODELO EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre - Área de Concentração: Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional

Presidente Prudente, 21 de março de 2018

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Alves Favareto
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente – SP

Banca: Prof^a. Dr^a. Ines Cristina Giometti
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente – SP

Banca: Prof^a. Dr^a. Glaura Scantamburlo Alves Fernandes
Universidade Estadual de Londrina – UEL
Londrina – PR

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado a minha mãe Eva, por todo amor, auxílio e compreensão me dado durante a vida.

Ao meu pai Aparecido, por todo o incentivo e suporte para os estudos.

Dedico também ao meu noivo Pedro Henrique que sempre esteve ao meu lado me ouvindo, incentivando, ajudando de todas as maneiras possíveis, e compreendendo minha ausência para que fosse possível a realização desta etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida, por me permitir realizar mais essa etapa, por todas as bênçãos e tropeços, e por me ensinar o poder da gratidão.

Agradeço a minha orientadora Ana Paula, por todo o ensinamento, paciência e carinho durante esses anos de orientação.

Agradeço ao meu coorientador Danillo, por toda disposição e paciência para me ajudar a compreender uma parte deste trabalho.

Agradeço aos amigos Andressa, Karina, Thiele, Vitor e Ludimila, que me ajudaram durante a execução desse trabalho, e também aos funcionários do biotério de experimentação que sempre estavam dispostos a nos ajudar.

Agradeço as minhas amigas Viviane e Jacqueline, por toda ajuda e companheirismo durante esta etapa de nossas vidas.

A CAPES pela bolsa de estudos concedida durante o período de estudos no programa. Ao MMADRE por todo apoio e conhecimento adquirido. Aos professores, coordenadores, funcionários e colaboradores do programa, meu muito obrigado.

*“Aprendi que deveríamos ser gratos a Deus por não nos dar tudo que lhe pedimos.”
(William Shakespeare)*

RESUMO

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À MISTURA COMERCIAL DE GASOLINA/ETANOL SOBRE A FUNÇÃO REPRODUTIVA MASCULINA EM MODELO EXPERIMENTAL

Vazamentos em postos de combustíveis provocam grandes problemas ao meio ambiente, principalmente no que diz respeito à contaminação de águas subterrâneas e solos. Os maiores problemas da contaminação por derivados de petróleo são atribuídos aos hidrocarbonetos monoaromáticos (BTEX - benzeno, tolueno e xileno), que são os constituintes mais solúveis e mais móveis da fração da gasolina, sendo os primeiros a atingir o lençol freático. No mais recente levantamento realizado pela Companhia Estadual de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), identificou-se que mais de 85% dos casos de contaminação na região do Oeste Paulista estão relacionados a resíduos de postos de combustíveis. O presente estudo avaliou o potencial toxicológico da exposição de ratos machos adultos à mistura comercial de gasolina/etanol (75/25 em volume), com ênfase nos possíveis impactos sobre a morfofisiologia reprodutiva. Ratos machos Wistar adultos foram alocados em 4 grupos experimentais (n=8/grupo). Os animais receberam gasolina comercial diluída em óleo de milho, via gavagem, nas doses de 0 (grupo controle - C), 16 (grupo A - GA), 160 (grupo B - GB) ou 800 mg/kg/dia (grupo C - GC). Os órgãos reprodutivos foram coletados e pesados. Os parâmetros espermáticos avaliados foram motilidade, integridade da membrana plasmática e acrossomal, atividade mitocondrial e morfologia. Além disso, o epidídimo e testículo direito foram coletados para contagens espermáticas. Também foram realizadas análise histopatológica do testículo e epidídimo, contagens dos estágios da espermatogênese e de células. Para o teste de aprendizado de máquina foram utilizados diferentes algoritmos de reconhecimento de padrões: *Artificial Neural Network* (ANN), *Bayes Classifier* (BAY), *K-Nearest Neighbors* (K-NN), *Support Vector Machine* (SVM) e *Optimum Path Forest* (OPF). Os resultados foram comparados por ANOVA com o teste “a posteriori” de Tukey, e o teste de Kruskal-Wallis, com “a posteriori” de Dunn, considerando $p < 0,05$. Os parâmetros espermáticos foram reduzidos de maneira dose-dependente. A atividade mitocondrial e integridade acrossomal foram diminuídas nos grupos GC e GB em relação ao grupo controle. Houve um aumento de cabeças isoladas nos grupos GC e GB em relação ao grupo controle. A integridade de membrana plasmática foi reduzida em GC em relação ao grupo controle. Foi observada uma redução no número de espermatozoides móveis com trajetória progressiva nos grupos GC e GB, em relação ao grupo controle. A produção diária espermática foi reduzida em GC e GB em relação ao grupo controle. Além disso, este parâmetro foi menor em GC em relação a GB. Houve um atraso significativo no tempo de trânsito na cauda do epidídimo nos grupos GC e GB em relação ao grupo controle. O número de células de Sertoli sofreu redução nos grupos GC e GB quando comparado aos grupos controle e GA. A análise histopatológica, contagem dos estágios da espermatogênese e de células germinativas não apresentaram diferença significativa entre os grupos. Houve presença de padrão com a subdivisão de duas classes (grupo controle e grupos expostos), com melhor classificação com o teste SVM e 90% de acurácia para o grupo controle. Assim, concluiu-se que a exposição de ratos a diferentes doses da mistura comercial de gasolina/etanol pode alterar a espermatogênese e a qualidade espermática, com reconhecível padrão de classificação de algoritmos de aprendizado de máquina.

Palavras-chave: benzeno, tolueno, xileno, reprodução, rato.

ABSTRACT

EFFECTS OF EXPOSURE TO THE COMMERCIAL GASOLINE / ETHANOL MIXTURE ON MALE REPRODUCTIVE FUNCTION IN EXPERIMENTAL MODEL

Leaks at gas stations cause major problems for the environment, especially with regard to contamination of groundwater and soils. The major problems of oil derivative contamination are attributed to monoaromatic hydrocarbons (BTEX - benzene, toluene and xylene), which are the most soluble and mobile constituents of the gasoline fraction, being the first to reach the water table. In the most recent survey carried out by the State Company of Environmental Sanitation Technology of the State of São Paulo (CETESB), it was identified that more than 85% of the contamination cases in the region of West Paulista are related to waste from fuel stations. The present study evaluated the toxicological potential of exposure of adult male rats to the commercial gasoline / ethanol blend (75/25 by volume), with emphasis on the possible impacts on reproductive morphophysiology. Adult male Wistar rats were allocated into 4 experimental groups (n = 8 / group). The animals received commercial gasoline diluted in corn oil via gavage at doses of 0 (control group- C), 16 (group A - GA), 160 (group B - GB) or 800 mg / kg / day (group C - GC). The reproductive organs were collected and weighed. The sperm parameters evaluated were motility, plasma membrane integrity and acrosomal, mitochondrial activity and morphology. In addition, the epididymis and right testis were collected for sperm counts. Histopathological analysis of the testis and epididymis, spermatogenesis and cell counts. For the machine learning test, different pattern recognition algorithms were used: Artificial Neural Network (ANN), Bayes Classifier (BAY), K-Nearest Neighbors (KNN), Support Vector Machine (SVM) and Optimum Path Forest OPF). The results were compared by ANOVA with Tukey's posterior test, and the Kruskal-Wallis test with Dunn's a posteriori, considering $p < 0.05$. The sperm parameters were reduced in a dose-dependent manner. Mitochondrial activity and acrosomal integrity were decreased in the GC and GB groups in relation to the control group. There was an increase of isolated heads in the GC and GB groups in relation to the control group. Plasma membrane integrity was reduced in GC in relation to the control group. A decrease in the number of mobile spermatozoa with progressive trajectory was observed in the GC and GB groups, in relation to the control group. The daily sperm production was reduced in GC and GB in relation to the control group. In addition, this parameter was lower in GC than in GB. There was a significant delay in transit time in the tail of the epididymis in the GC and GB groups in relation to the control group. The number of Sertoli cells decreased in the GB and GC groups when compared to the CG and GB groups. Histopathological analysis, spermatogenesis and germ cell counts showed no significant difference between the groups. There was presence of pattern with the subdivision of two classes (control group and exposed groups), with better classification with the SVM test and 90% accuracy for control group. Thus, it was concluded that the exposure of rats to different doses of the commercial gasoline / ethanol mixture can alter spermatogenesis and sperm quality, with a recognizable classification pattern of machine learning algorithms.

Keywords: benzene, toluene, xylene, reproduction, rat.

LISTA DE SIGLAS

AM –	Aprendizagem de máquina
ANN –	<i>Artificial Neural Network</i>
BAY –	<i>Bayes Classifier</i>
BTEX –	Benzeno, Tolueno e Xileno
CAPES –	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CETESB –	Companhia Estadual de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo
CEUA –	Comitê de Ética no Uso de Animais
CIMA –	Conselho Interministerial do Açúcar e do Alcool
EPA –	<i>Environmental Protection Agency</i>
IA –	Inteligência Artificial
IBGE –	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
K-NN –	<i>K-Nearest Neighbors</i>
mg –	Miligrama
OMS –	Organização Mundial da Saúde
OPF –	<i>Optimum Path Forest</i>
PAHs –	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
PDE –	Produção diária de espermatozoides
ROS –	Espécies reativas de oxigênio
SBCAL –	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
UGRHI –	Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos
US EPA –	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
SVM –	<i>Support Vector Machine</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química das classes de hidrocarbonetos.....	20
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estágios do ciclo do epitélio seminífero do rato.	23
---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1	Aspectos Ambientais	15
2.2	Região do Pontal do Paranapanema	17
2.3	Contaminação por combustíveis.....	18
2.4	Compostos BTEX.....	19
2.5	Sistema reprodutor masculino	21
2.6	Avaliações espermáticas	23
2.6.1	Integridade acrossomal	23
2.6.2	Integridade da membrana plasmática	24
2.6.3	Atividade mitocondrial.....	25
2.7	Contaminantes ambientais e fertilidade masculina	25
2.8	Aprendizado de Máquina.....	27
3	ARTIGO	29
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
	REFERENCIAS	61
	ANEXOS	68
	ANEXO A – PARECER FINAL.....	68
	ANEXO B – GUIA PARA AUTORES	69

1 INTRODUÇÃO

O grande desenvolvimento da economia e o crescimento industrial das últimas décadas contribuíram para o aumento da demanda pelo uso dos recursos naturais. Além disso, o crescimento da população nas áreas urbanas, juntamente com o aumento do número de veículos em circulação, tem colaborado com inevitáveis impactos ambientais como a poluição do ar, da água e do solo (ELROY, 2002).

A Companhia Estadual de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) é o único órgão de controle ambiental que dispõe de informações detalhadas sobre áreas impactadas. No levantamento mais recente disponibilizado pela CETESB (2016) é indicada a existência de 5.662 áreas impactadas no estado de São Paulo. Entre os empreendimentos que se destacaram como responsáveis pelos impactos estão os postos de combustíveis, totalizando 74% dos casos de contaminação. No Oeste Paulista foram identificados 75 pontos de contaminação, no ano de 2016, desses 64 foram contaminados por postos de combustíveis, representando 85,33% dos casos (CETESB, 2016). De acordo com os relatórios de anos anteriores, nota-se o crescimento do número de áreas contaminadas na região, com 70 pontos em 2013 e 73 pontos em 2014 e 2015 (CETESB, 2013; CETESB, 2014; CETESB, 2015).

Vazamentos em postos de combustíveis provocam grandes problemas ao meio ambiente (PROMMER; BARRY; DAVIS, 1999). Pelo fato dos tanques serem subterrâneos, os combustíveis podem facilmente atingir e contaminar solos e águas subterrâneas. Os vazamentos geralmente ocorrem em áreas populosas, onde o abastecimento público e doméstico de água está concentrado, e é difícil e caro descontaminá-los, especialmente quando envolvem uma fonte de água potável (EPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2008). Os maiores problemas das contaminações por derivados de petróleo são atribuídos aos hidrocarbonetos monoaromáticos (BTEX - benzeno, tolueno e xileno), que são os constituintes mais solúveis e mais móveis da fração da gasolina, sendo os primeiros a atingir o lençol freático (ARAMBARRI et al., 2004).

O etanol é utilizado no Brasil como combustível de automóveis e como parte da mistura da gasolina comercial, atualmente, na proporção de gasolina Premium 25% e comum 27% (Resolução Nº 1, de 4 de março de 2015). No solo, o etanol pode colaborar no processo de solubilização dos compostos BTEX, aumentando a mobilidade com que os mesmos se dispersam pelo solo e pelas águas. Alguns estudos indicam que o etanol em altas concentrações no solo pode até mesmo prejudicar a biodegradação dos compostos BTEX, devido à sua ação inibidora do crescimento bacteriano (OLIVEIRA; LOUREIRO, 1998).

O tipo de solo é uma das características de maior influência do transporte de substâncias no solo. Com a ocupação das lacunas do solo, começa a atingir regiões mais profundas. Assim, se a textura do solo apresenta maior índice de vazios, esta ocupação tende a ser mais rápida, portanto o combustível alcança as águas subterrâneas mais rapidamente e inicia-se a interação gasolina-água (MENDES et al., 2009)..

Os solos do oeste paulista são, em sua grande maioria, originários de arenitos do Grupo Bauru. Em termos gerais, tais solos são predominantemente constituídos por areia fina pouco argilosa, vermelha ou marrom escura. O processo de lixiviação dos finos dos horizontes superficiais resultou num solo poroso e estruturalmente instável, o que torna a percolação da água mais facilitada (MENDES et al., 2009).

A ingestão oral é uma das rotas mais comuns de exposição à gasolina. Nos EUA em 1998, foram documentados cerca de 20.000 casos de ingestão acidental de gasolina, um terço dos quais eram crianças menores de 6 anos (LITOVITZ et al., 1998). Populações nas imediações dos vazamentos possuem maior risco de exposição a hidrocarbonetos associados à gasolina, através da ingestão de água contaminada (BEAVERS et al., 1996).

Vários estudos apontam os impactos do BTEX à saúde (D'ALASCIO et al., 2014; EDOKPOLO; YU; CONNELL, 2014; MORO et al., 2015). O benzeno é considerado como uma substância potencialmente cancerígena ao ser humano (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2003), enquanto que os seus derivados apresentam uma toxicidade menor, porém com possibilidade de risco a saúde humana,

especialmente quando expostos de forma crônica (GHELERI, 2003; BALTRÉNAS et al., 2011).

Estudo de Che et al. (2009) indica que os vapores de gasolina podem promover estresse oxidativo testicular, o que pode ser um possível mecanismo para alteração da função reprodutiva masculina de mamíferos. No entanto, foram encontrados poucos estudos sobre os efeitos do BTEX sobre aspectos morfofisiológicos da reprodução masculina e seus impactos sobre a fertilidade. A maioria dos estudos experimentais avaliam os efeitos de cada composto BTEX separadamente (YAMADA, 1993; KANTER, 2011; MARCHETTI et al., 2012). Considerando os altos níveis de contaminação causada por resíduos de combustíveis, identificados pela CETESB na região do Pontal do Paranapanema (CETESB, 2016), estudos toxicológicos tornam-se extremamente importantes para a identificação de possíveis prejuízos à saúde da população em geral.

Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial toxicológico da exposição de ratos machos adultos à mistura comercial de gasolina/etanol (75/25 em volume), com ênfase nos possíveis impactos sobre a morfofisiologia reprodutiva.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos Ambientais

A criação das cidades e a crescente ampliação das áreas urbanas têm contribuído para o crescimento de impactos ambientais negativos. No ambiente urbano, determinados aspectos culturais como o consumo de produtos industrializados e a necessidade da água como recurso natural vital, influenciam como se apresenta o ambiente. Os costumes e hábitos no uso da água e a produção de resíduos pelo exacerbado consumo de bens materiais são responsáveis por parte das alterações e impactos ambientais (MUCELIN; BELLINI, 2008).

Alterações ambientais físicas e biológicas ao longo do tempo modificam a paisagem e comprometem ecossistemas (MUCELIN; BELLINI, 2008). Para Fernandez (2004) as alterações ambientais ocorrem por

inumeráveis causas, muitas denominadas naturais e outras oriundas de intervenções antropológicas, consideradas não naturais. É fato que o desenvolvimento tecnológico contemporâneo e as culturas das comunidades têm contribuído para que essas alterações no e do ambiente se intensifiquem, especialmente no ambiente urbano.

Atualmente a maior parte das pessoas habita ambientes urbanos. Dados apresentados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010) indicam que no Brasil mais de 80% das pessoas são moradores urbanos. Odum (1988) considera que a acelerada urbanização e crescimento das cidades, especialmente a partir de meados do século XX promoveram mudanças fisionômicas no Planeta, mais do que qualquer outra atividade humana.

É possível observarmos que determinados impactos ambientais estão aumentando, principalmente pelo crescimento populacional mundial (MUCELIN; BELLINI, 2008). A população do Brasil apresenta a mesma tendência mundial de ocupação ambiental, ou seja, opta pelo ecossistema urbano como lar. Ott (2004) considera que a transformação do Brasil de país rural para urbano ocorreu segundo um processo predatório em essência, com acentuada exclusão social de classes da população menos privilegiada que por não terem condições de aquisição de terrenos em áreas urbanas estruturadas ocupam em sua maioria, terrenos que deveriam ser protegidos para preservação das águas, encostas, fundos de vale entre outros.

Atualmente, o mundo passa por uma escassez de água. Embora o volume total de água existente na Terra seja de 1.386 milhões de km³, 97,2% deste total é constituído pelos oceanos, mares e lagos de água salgada. Na parte formada pela água doce, 68,9% está nas calotas polares, geleiras e neves que cobrem os cumes das montanhas mais altas da Terra; 30% são águas subterrâneas; 0,9% compõe a umidade do solo e pântanos e 0,3% constitui a porção superficial da água doce presente em rios e lagos (SHIKLOMANOV; RODDA, 2003).

Nas últimas décadas, as águas subterrâneas vêm assumindo papel relevante como fonte de abastecimento doméstico, industrial e agrícola, tornando-se uma reserva estratégica de água doce para o abastecimento público no planeta. A Organização das Nações Unidas estima que entre 1,5 e

2,7 bilhões de pessoas no mundo são abastecidos pelas águas subterrâneas (MORRIS, 2003). Isto é devido tanto à escassez quanto à poluição das águas superficiais, tornando os custos de tratamento, em níveis de potabilidade, cada vez mais elevados. Em geral, as águas subterrâneas são potáveis e dispensam tratamento prévio, pois os processos de filtração e depuração do subsolo promovem a purificação da água durante a sua percolação no meio, tornando-se uma fonte potencial de água de boa qualidade e baixo custo, podendo sua exploração ser realizada em áreas rurais e urbanas (OLIVEIRA; LOUREIRO, 1998).

A qualidade das águas subterrâneas deve ser preservada, daí a crescente preocupação com a sua contaminação. Entre as principais fontes de contaminação do solo e das águas subterrâneas podemos citar os vazamentos em dutos e tanques de armazenamentos subterrâneos de combustível, atividades de mineração e uso de defensivos agrícolas (ALABURDA; NISHIHARA, 1998).

2.2 Região do Pontal do Paranapanema

O Pontal do Paranapanema corresponde a uma área com 11.838 Km², localizada no sudoeste do Estado de São Paulo e é formada por um conjunto de 32 municípios, sendo eles: Alfredo Marcondes, Álvares Machado, Anhumas, Caiabú, Caiuá, Emilianópolis, Estrela do Norte, Euclides da Cunha Paulista, Iepê, Indiana, João Ramalho, Marabá Paulista, Martinópolis, Mirante do Paranapanema, Nantes, Narandiba, Piquerobi, Pirapozinho, Presidente Bernardes, Presidente Epitácio, Presidente Prudente, Presidente Venceslau, Rancharia, Regente Feijó, Ribeirão dos Índios, Rosana, Sandovalina, Santo Anastácio, Santo Expedito, Taciba, Tarabai e Teodoro Sampaio (FIRETTI et al., 2012).

Ela conta com uma Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos, a UGRHI 22 (Pontal do Paranapanema), e alguns municípios tem partes pertencentes a UGRHI 20 (Aguapeí) e UGRHI 21(Rio do Peixe), tendo essas duas últimas importância na região (PRANDI et al., 2002). Os principais rios desta região são os rios Paranapanema, Paraná, Santo Anastácio e

Pirapozinho (COOPERATIVA DE SERVIÇOS, PESQUISAS TECNOLÓGICAS E INDUSTRIAIS, 1999).

O mais recente relatório da CETESB (2016) apontou os pontos de contaminação no estado de São Paulo, com um total de 75 áreas contaminadas na região do oeste paulista. Na região da UGRHI 22 - Pontal do Paranapanema foram identificados 23 pontos impactados, enquanto que 26 pontos de contaminação foram observados nas UGRHI 20 – Aguapeí e UGRHI 21 – Rio do Peixe.

Os postos de combustíveis destacam-se na lista de 2016, com 64 registros (85,33% do total), seguidos das atividades industriais com 7 (9,33%), das atividades comerciais com 2 (2,67%) e das instalações para destinação de resíduos com 2 (2,67%) (CETESB, 2016).

Os principais grupos de contaminantes encontrados nas áreas contaminadas refletem o número de áreas contaminadas pela atividade de revenda de combustíveis, destacando-se: solventes aromáticos (basicamente representados pelo benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos presentes na gasolina vazada nos postos de combustível), combustíveis líquidos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), metais e solventes halogenados (CETESB, 2016).

2.3 Contaminação por combustíveis

A origem das áreas contaminadas está relacionada ao desconhecimento, em épocas passadas, de procedimentos seguros para o manejo de substâncias perigosas, ao desrespeito a procedimentos seguros e à ocorrência de acidentes ou vazamentos durante o desenvolvimento dos processos produtivos, de transporte ou de armazenamento de matérias primas e produtos (CETESB 2014). A existência de uma área contaminada pode causar danos à saúde humana, comprometimento da qualidade dos recursos hídricos, restrições ao uso do solo e prejuízo ao patrimônio público e privado, com a desvalorização das propriedades, além de danos ao ambiente (SANCHES, 2001).

A contaminação se dá por muitos tanques terem mais de 25 anos de uso, então acredita-se que a possibilidade de ocorrerem vazamentos é extremamente grande, principalmente pelo surgimento de rachaduras ou corrosão. Assim, apesar dos grandes vazamentos acidentais provocados pelo envelhecimento de tanques, de tubulações e de acessórios nos locais de armazenamento de combustível serem preocupantes, Tiburtius, Peralta-Zamora e Leal (2004) descrevem que os pequenos e contínuos vazamentos de combustível constituem fonte fundamental de contaminação.

A gasolina comercializada na maioria dos estados brasileiros é a gasolina C que é uma mistura de gasolina automotiva A e álcool etílico anidro combustível. A proporção obrigatória de álcool na mistura é fixada por portaria do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, condicionada à aprovação do Conselho Interministerial do Açúcar e do Álcool – CIMA pode variar de 25 a 27% (Conforme determinado pela Resolução Nº 1, de 4 de março de 2015). Na Tabela 1 está especificada a composição química das classes de hidrocarbonetos da gasolina tipo A.

Tabela 1. Composição química das classes de hidrocarbonetos.

Classe de hidrocarbonetos	% (v/v)^a ± SD
Aromáticos	18,9 ± 1,10
Isoparafinas	23,3 ± 1,85
Naftalenos	11,6 ± 1,75
Olefinas	22,9 ± 2,50
Parafinas	11,3 ± 1,75
Total	88,1 ± 0,60

Fonte: Adaptado de Carvalho e Dantas (2014)

A contaminação do lençol freático causada pelo contato da gasolina comercial brasileira com a água subterrânea podem ser de maior magnitude, em relação às causadas por gasolinas convencionais de outros países. Isso pode ocorrer em função da habilidade do etanol em aumentar a solubilização dos hidrocarbonetos de petróleo na água (CORSEUIL; MARINS, 1997).

2.4 Compostos BTEX

A gasolina possui vários compostos de alta periculosidade que podem produzir efeitos prejudiciais não só para o homem como para o ambiente (TIBURTIUS, 2008). Ela apresenta em sua composição, principalmente, alcanos de cadeia linear e cicloalcanos e possui características de combustão insatisfatória, onde uma mistura de ar e gasolina deste tipo tende a sofrer ignição espontânea antes que seja comprimida e receba uma descarga elétrica para provocar sua ignição. A fim de superar esse problema toda gasolina é formulada contendo antidetonantes que durante décadas foi à base de chumbo, mas após ser banido por países desenvolvidos foram utilizados alcanos ramificados, benzeno, tolueno e xileno (BTEX) ou compostos orgânicos. A gasolina brasileira possui grande quantidade de etanol e BTEX, sendo estes últimos muito reativos e causam forte poluição do ar (LOURENÇO, 2006).

O caráter tóxico do benzeno está relacionado diretamente com o seu potencial carcinogênico e mutagênico (FERNANDES et al., 2002). Investigações ocupacionais em diferentes indústrias mostram que o benzeno desempenha um papel de risco aos humanos (RÖMMELT et al., 1999). Bono et al. (2001), investigando a poluição de aromáticos no ar, destacaram que os hidrocarbonetos aromáticos provocam danos à saúde, principalmente devido à toxicidade e/ou mutagenicidade ou carcinogenicidade do BTEX. Também advertem que a inalação de tolueno ou xilenos pode induzir distúrbios no modo de falar, na visão, audição, no controle dos músculos e outros, além de sugerirem a associação entre benzeno e xilenos e o surgimento de tumores cerebrais (BONO et al. 2001).

A Agência de Proteção Ambiental Americana (*United States Environmental Protection Agency - US EPA*) inclui o benzeno em sua lista de produtos cancerígenos (EPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2003). No Brasil, a ação cancerígena do benzeno foi também reconhecida oficialmente a partir de 1994, pela portaria da Secretaria de Segurança e Saúde no Trabalho (SSST nº3), de 10 de março de 1994.

Alguns estudos relatam toxicidade do BTEX sobre o sistema reprodutor masculino, especialmente quanto à qualidade espermática e histologia testicular, porém a maioria dos estudos de toxicologia reprodutiva abordam os seus constituintes (benzeno, tolueno e xileno) separadamente

(ONO et al., 1996; DE CELIS et al., 2000; SINGH; BANSODE, 2011; KATUKAM et al., 2012).

2.5 Sistema reprodutor masculino

O sistema reprodutor masculino do rato, assim como na maioria dos mamíferos, é composto por testículos (gônadas), epidídimos, ductos deferentes, glândulas sexuais e órgão copulador.

Os testículos, epidídimos e as glândulas sexuais acessórias são órgãos andrógeno-dependentes e qualquer tóxico que possa atuar desordenando a interação coordenada do eixo hipotálamo – hipófise – gônada pode levar a anormalidades reprodutivas (SOKOL, 1997).

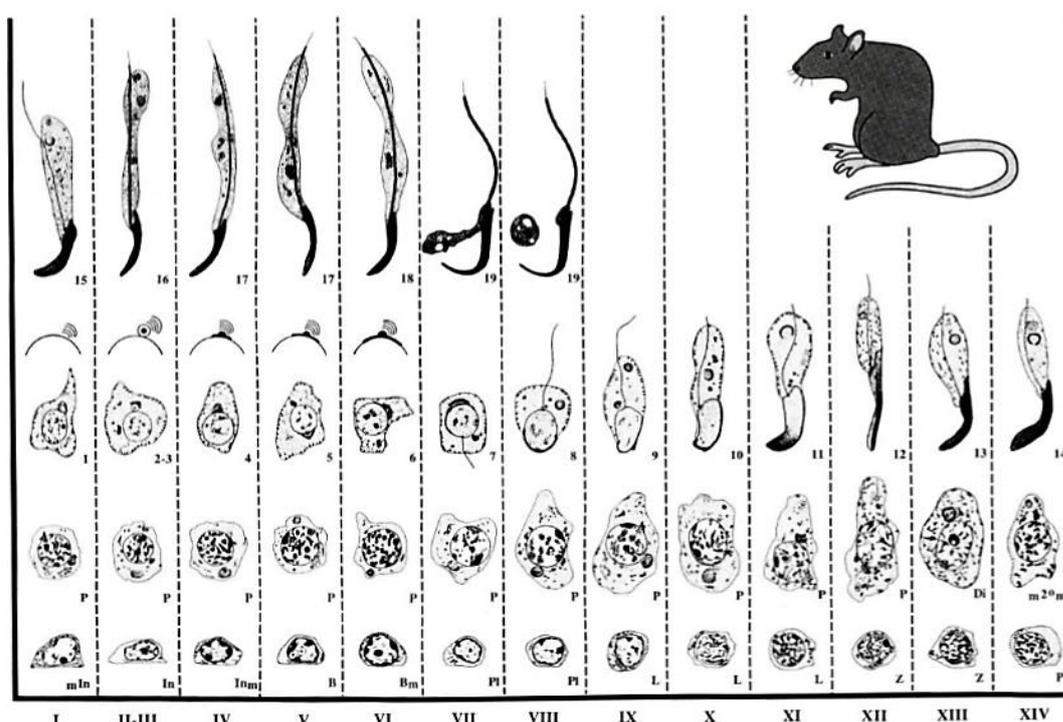
Os testículos podem ser funcional e anatomicamente divididos em duas partes: tecido intersticial e túbulos seminíferos, responsáveis pela esteroidogênese e pela espermatogênese, respectivamente (RODRIGUEZ; FAVARETTO, 1999). Os túbulos seminíferos são constituídos pelo tecido peritubular e epitélio seminífero com as células de Sertoli e células germinativas (espermatogônias, espermatócitos e espermátides, em animais adultos). A espermatogênese é um processo elaborado pelo qual células-tronco espermatogoniais tornam-se células haploides altamente diferenciadas, os espermatozoides (CLERMONT, 1972). O tecido intersticial fica entre os túbulos seminíferos e possui vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e as células intersticiais (células de Leydig), os quais responsáveis pela produção de andrógenos, e fonte para uma variedade de outros esteroides (RUSSELL et al., 1990).

A célula de Sertoli é uma célula somática que se estende desde a lâmina basal até a luz do túbulo seminífero. Desempenha variadas funções importantes no processo espermatogênico, dentre elas podemos destacar o suporte estrutural e nutricional às células germinativas em desenvolvimento, a formação da barreira hematotesticular através de junções intercelulares, fagocitose, e a secreção de fluido e hormônios (FOLEY 2001). Alterações no número, estrutura e/ou função deste tipo celular podem resultar em danos ao epitélio germinativo e comprometimento da espermatogênese (BOEKELHEIDE; JOHNSON; RICHBURG, 2005), uma vez que o número de células de Sertoli

está relacionado ao tamanho testicular no indivíduo adulto e sua produção espermática (CHAPIN et al., 1996).

O epitélio seminífero de um rato adulto pode apresentar uma ou duas gerações de espermatogônias, espermatócitos e espermátides. Cada geração representa um grupo de células em um mesmo estágio de desenvolvimento, ou seja, que foram produzidas aproximadamente ao mesmo tempo e de maneira sincronizada. As diversas gerações de células germinativas não estão organizadas aleatoriamente no epitélio seminífero, mas formam associações celulares de composição fixa que correspondem aos estágios do ciclo espermatogênico (CLERMONT, 1972) (Figura 1).

Figura 1. Estágios do ciclo do epitélio seminífero de rato. Estágios I-VI apresentam 2 gerações de espermátides, VII-VIII apresentam espermátide madura, IX-XIII apresentam 2 gerações de espermátides e XIV apresenta espermatócito secundário



Fonte: Russell et al. (1990).

Um ciclo da espermatogênese de ratos dura aproximadamente 12 dias e apresenta-se composto por 14 estágios. Uma espermatogônia necessita de 4,5 ciclos para formar um espermatozoide, o que significa que a espermatogênese completa de rato tem duração de 52 a 53,2 dias,

dependendo da linhagem animal avaliado (CLERMONT, 1972). A duração do processo espermatogênico é regulada pelo genótipo das células germinativas, sendo geralmente constante entre indivíduos de uma mesma espécie (FRANÇA; AVELAR; ALMEIDA, 2005).

O epidídimo dos mamíferos é um órgão formado por um ducto único e enovelado que liga os ductos eferentes ao ducto deferente (HERMO; ROBAIRE, 2002), sendo anatomicamente dividido em três regiões principais: cabeça (com o segmento inicial), corpo e cauda (FRANÇA; AVELAR; ALMEIDA, 2005).

A função primária do epidídimo é o transporte dos espermatozoides que chegam do testículo (BROOKS, 1983). Além do transporte, o epidídimo é responsável pela estocagem, proteção, concentração e maturação dos gametas (HERMO; ROBAIRE, 2002), regulando o desenvolvimento da motilidade, a aquisição da capacidade de sofrer reação acrossômica e tornando-os capazes de fertilizar um ovócito II (FRANÇA; AVELAR; ALMEIDA, 2005). Em adição, o epidídimo protege os espermatozoides de espécies reativas de oxigênio (ROS) e estoca os gametas maduros na região da cauda (HERMO; ROBAIRE, 2002).

2.6 Avaliações espermáticas

Aspectos importantes no processo de avaliação da fertilidade masculina incluem informações sobre o número de espermatozoides presente no ejaculado, a proporção em que são móveis e a percentagem que são morfológicamente normais. No entanto, como nem sempre estes testes sozinhos explicam alguns casos de infertilidade e para refinar o diagnóstico foram desenvolvidos testes adicionais que fornecem informações sobre o potencial de fertilização dos espermatozoides, chamados Testes Funcionais (AITKEN, 2006; RIJSSELAERE et al., 2005). Esses testes são capazes de avaliar a capacidade dos espermatozoides de realizar passos específicos no processo de fertilização, demonstrando sua competência funcional (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2003).

2.6.1 Integridade acrossomal

O acrossoma é a parte do espermatozoide responsável pela reação acrossomal, que é o processo que permite a penetração do espermatozoide na zona pelúcida, para que ocorra a fertilização (MAKHLUF, 2006). Porém, para que o espermatozoide adquira a habilidade de fecundar o oócito e iniciar o desenvolvimento embrionário, é necessário que ele passe por uma série de eventos, como o transporte para o oviduto, a capacitação, a ligação com a zona pelúcida, a reação acrossomal e a ativação do ovócito (HERRICK; SWANSON, 2003).

Os espermatozoides utilizam enzimas acrossomais para penetrar a região mais espessa da zona pelúcida em mamíferos. No entanto, a reação acrossomal não libera apenas enzimas, mas altera o perfil apical da cabeça do espermatozoide, promovendo afinamento na borda da célula e favorecendo a penetração no óvulo, que é dependente de um impulso físico, facilitado pelo aumento da motilidade (STAUSS; VOTTA; SUAREZ, 1995). Anormalidades morfológicas ou no tamanho do acrossoma os tornam menos capazes de se ligar a zona pelúcida, comprometendo a fertilização do ovócito II (GARRETT; LIU; BAKER, 1997; MENKVELD et al., 1996).

Uma das maneiras de se identificar a integridade do acrossoma espermático é através da coloração de POPE (Coloração Simples Fast-Green/Rosa-Bengala), onde se identificam acrossomas íntegros e não íntegros, através da microscopia (POPE; ZHANG; DRESSER, 1991).

2.6.2 Integridade da membrana plasmática

A membrana espermática possui um importante papel nos processos de capacitação do espermatozoide e sua constituição bioquímica é um dos principais pontos de interesse da fisiologia e patologia espermática (LENZI et al., 1996; WATSON, 2000). Além de um limite celular, realiza interações célula a célula, como entre os espermatozoides e o epitélio do trato genital feminino e entre o espermatozoide e a membrana do ovócito (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2003).

A viabilidade de um espermatozoide está ligada a sua motilidade e também a fato de possuir uma membrana plasmática intacta. Por isso a

maioria dos ensaios de viabilidade avalia se a membrana plasmática está intacta ou não, utilizando corantes impermeáveis (que não penetram na membrana intacta) e penetrantes (penetram na membrana não intacta) alternadamente ou em combinação (HOSSAIN et al., 2011).

Para a avaliação da integridade da membrana plasmática dos espermatozoides, pode ser utilizada a coloração de Eosina-Nigrosina. Nesta coloração, por alterações na permeabilidade das membranas dos espermatozoides, a eosina consegue penetrar nas células corando-as de rosa. Os espermatozoides com membranas íntegras não permitem a entrada do corante, portanto, contrastando com o plano de fundo tomado pela coloração escura da nigrosina, as células aparecem brancas (BARTH; OKO, 1989).

2.6.3 Atividade mitocondrial

As mitocôndrias estão localizadas na peça intermediária do espermatozoide e sua função é produzir energia necessária para a movimentação do flagelo, que gera a motilidade do espermatozoide, uma característica importante para o transporte de material genético para o sítio de fertilização (HUNG et al., 2008). A motilidade depende em grande parte do volume mitocondrial dentro da peça intermediária do espermatozoide, fatores que afetam a produção de energia mitocondrial podem dar origem a alterações na motilidade e podem estar relacionadas com casos de astenozoospermia, onde ocorre redução ou ausência da mobilidade espermática (RUIZ-PESINI et al., 1998).

Há uma forte correlação entre a motilidade espermática e a atividade de enzimas mitocondriais específicas (RUIZ-PESINI et al., 1998). Hrudka (1987) propôs uma técnica citoquímica que detecta a atividade mitocondrial. A técnica é baseada na oxidação da 3,3'-diaminobenzidina (DAB), através de uma reação em cadeia na qual o reagente é polimerizado e se deposita nos locais onde ocorre a reação, ou seja, se restringe à mitocôndria.

2.7 Contaminantes ambientais e fertilidade masculina

O debate sobre o possível declínio dos espermatozoides humanos começou nos anos 70, foi revisto nos anos 90 e tem inquietado os pesquisadores desde então. Considera-se que durante os últimos 50 anos a média de contagem dos espermatozoides tenha diminuído em 50%, apesar de não estar claro o motivo desta diminuição. Acredita-se que possa decorrer de fatores ambientais, tais como poluição (MULTIGNER; OLIVA, 2002).

A infertilidade pode ocorrer por várias causas relacionadas ao meio ambiente, entre elas pode-se citar contaminação por contato com agroquímicos, solventes orgânicos, metais pesados entre outros. O processo de infertilidade muitas vezes acontece por efeito citotóxico direto nas células germinativas masculinas, mas também pode ocorrer por interferência dos chamados desreguladores endócrinos, que podem afetar o desenvolvimento reprodutor e sexual através de mecanismos diversos, tanto mediados por receptores como por mecanismos bioquímicos (PETRELLI; MANTOVANI, 2002).

Em 1999, foi publicado um trabalho realizado no Hospital Universitário de Utrecht e Hospital Universitário de Rotterdam na Holanda, com parceiros masculinos de casais que haviam procurado pela primeira vez duas clínicas de fertilidade e que tinham, em suas ocupações, contato direto com solventes orgânicos, metais e agroquímicos. O objetivo desse estudo foi verificar se existe uma associação entre parâmetros anormais de sêmen e exposições ocupacionais a estes produtos. Neste estudo, foi observada uma associação entre solventes aromáticos e volume reduzido de sêmen, independentemente do modo de exposição (TIELEMANS et al., 1999).

Vários estudos têm relatado alterações causadas por solventes à reprodução masculina, sendo que o benzeno, tolueno e xileno podem apresentar propriedades de desregulação endócrina, mesmo em concentrações consideradas seguras pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA) (BOLDEN; KWIATKOWSKI; COLBORN, 2015).

Estudo de Katukam et al. (2012) demonstrou que trabalhadores industriais expostos ao benzeno apresentavam redução da motilidade espermática e aumento das anormalidades morfológicas nos espermatozoides, bem como, aumento da degradação do DNA espermático, identificado pelo teste do cometa. Alterações espermáticas cromossômicas também têm sido

relatadas após exposição ocupacional ao benzeno (MARCHETTI et al., 2012). Estudo de Singh e Bansode (2011) relatou redução da vesícula seminal e citotoxicidade do benzeno ao testículo de ratos, com formação de células gigantes multinucleadas, vacuolização, células com núcleo picnótico, descamação de células germinativas na luz tubular.

Redução da espermatogênese e diâmetro dos túbulos seminíferos e aumento do espaço intercelular em células de Sertoli e espermatídes foram observados após exposição crônica ao tolueno em ratos (KANTER, 2011). As alterações reprodutivas causadas pelo tolueno têm sido relacionadas ao dano oxidativo ao DNA no testículo (NAKAI et al., 2003). Estudo de exposição de ratos ao xileno indicam que o solvente pode levar a redução do peso dos testículos e glândulas sexuais anexas, bem como, da atividade da fosfatase ácida prostática e níveis de testosterona plasmática (YAMADA, 1993). Estudos ocupacionais demonstram que a mistura de BTEX pode afetar as glândulas sexuais anexas e qualidade espermática, com possível impacto sobre a gestação (XIAO et al., 1999).

2.8 Aprendizado de Máquina

O método de aprendizagem de máquina (AM) é uma subárea da inteligência artificial que utiliza métodos capazes de “aprender” automaticamente extraindo padrões a partir de um conjunto de amostras de exemplo (COPPIN, 2010). Estes métodos fazem uso de um vasto ferramental matemático e estatístico e possuem uma ampla gama de aplicações. As principais áreas de aplicação são aquelas nas quais se deseja extrair conhecimento de um conjunto de dados; como, por exemplo: diagnóstico médico, classificação de imagens de satélite, identificação de furto de energia, fraudes em cartões de crédito, dentre outras (KOERICH, 2012).

Os métodos de aprendizado de máquina utilizam um conjunto de amostras pré-classificadas (comumente referenciado como conjunto de treinamento) para extrair padrões destes exemplos e posteriormente classificar amostras de testes (MARTINO, 2009). Cada uma das amostras dos conjuntos de treino e teste é composta por um conjunto de características de entrada e um rótulo que representa sua classe (quando este estiver disponível) (REYNOL, 2010). Deste modo, estes métodos exigem a classificação (ou rotulação) das amostras a

priori por um “especialista” ou conhecimento prévio da natureza das amostras (PEREIRA, 2005).

No caso de métodos de AM que utilizam aprendizado supervisionado, uma vez executado o seu treinamento é necessário estimar sua medida de acurácia (COPPIN, 2010). Para este fim, é comumente utilizado um conjunto de teste ou validação, cujas amostras estão rotuladas (COPPIN, 2010). Cada amostra deste conjunto é classificada pelo método em questão e o rótulo predito é comparado com o rótulo desejado (BEUREN, 2010). Caso o rótulo obtido seja igual ao rótulo verdadeiro da amostra, obteve um acerto; caso contrário, ocorreu um erro de classificação. Utilizando este critério, é possível calcular o percentual de acertos do método de AM empregado, o qual será utilizado como uma métrica de acurácia (BEUREN, 2010). Desta forma, esta métrica é sensível ao desequilíbrio de amostras entre classes (COPPIN, 2010).

3 ARTIGO

O presente estudo deu origem a um artigo intitulado “**Avaliação reprodutiva masculina de ratos adultos expostos à gasolina, usando algoritmos de aprendizagem de máquina**”, que será submetido ao periódico *Environmental Science and Pollution Research* (fator de impacto 2,74, Qualis A1 na área de Ciências Ambientais da CAPES).

**Avaliação reprodutiva masculina de ratos adultos expostos à gasolina,
usando algoritmos de aprendizagem de máquina.**

Kátia Cristina de Melo Tavares Vieira¹; Andressa Àgata Fernandes²; Karina Martins Silva²; Viviane Ribas Pereira¹; Danillo Roberto Pereira¹; Ana Paula Alves Favareto^{1,2*}

¹Mestrado em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional, Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil.

²Faculdade de Artes, Ciências, Letras e Educação de Presidente Prudente – Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil.

*Autor de Correspondência:

Dra. Ana Paula Alves Favareto

Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil.

CEP. 19.067-175. Tel: +55 (18) 3229- 1098

E-mail: anafavareto@unoeste.br (A.P.A. Favareto).

RESUMO

A contaminação causada por vazamentos em postos de combustíveis leva à possível exposição da população em geral, quando em contato com água e solo contaminados. O objetivo deste estudo foi avaliar possíveis alterações reprodutivas de ratos machos expostos à gasolina e identificar possíveis padrões de classificação dos grupos de exposição. Ratos adultos foram divididos em quatro grupos experimentais, e receberam gasolina comercial diluída em óleo de milho, via gavagem, nas doses de 0 (grupo controle - C), 16 (grupo A - GA), 160 (grupo B - GB) ou 800 mg/kg/dia (grupo C - GC). A integridade acrossomal (C=92,12±0,67, GA=90,31±0,67, GB=88,87±0,59, GC=87,62±0,53), atividade mitocondrial (C=98,62±0,20, GA=97,31±0,25, GB=96,81±0,25, GC=96,62±0,29), porcentagem de espermatozoides com movimento progressivo e produção diária espermática (C=25,36±0,24, GA=24,33±0,40, GB=22,74±0,66, GC=21,44±0,36) foram reduzidas em GC e GB em relação ao C. Já a integridade de membrana plasmática foi reduzida apenas em GC em relação ao grupo controle (C=93,50±0,35, GA=93,06±0,50, GB=92,94±0,60, GC=91,69±0,27). O número de cabeças espermáticas isoladas e o tempo de trânsito na cauda do epidídimo foram aumentados em GC e GB em relação ao grupo controle. O número de células de Sertoli sofreu redução nos grupos GB e GC quando comparado aos grupos controle e GA. Houve presença de padrão com a subdivisão de duas classes (grupo controle e grupos expostos), com melhor classificação com o teste *Support Vector Machine* e 90% de acurácia para o grupo controle. Concluiu-se que a exposição de ratos a diferentes doses da mistura comercial de gasolina/etanol pode alterar a espermatogênese e a qualidade espermática, com reconhecível padrão de classificação de algoritmos de aprendizado de máquina.

Palavras chave: Gasolina, BTEX, rato, reprodução, aprendizagem de máquina.

Introdução

O rápido crescimento populacional mundial e os processos de globalização, urbanização e desenvolvimento econômico levaram a um aumento relevante da demanda por combustíveis, especialmente da gasolina (Ekpenyong 2013). A composição da gasolina apresenta uma mistura complexa de hidrocarbonetos (Azari et al. 2012) e aditivos químicos considerados contaminantes emergentes (Richardson, 2010). A concentração de cada componente é dependente da fonte de petróleo, processo de refinamento e produção (Ekpenyong e Asuquo 2017).

A exposição ocupacional em estações de gasolina a compostos orgânicos tais como benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno, ocorre principalmente por via inalatória. No entanto, a exposição oral devido ao consumo de água contaminada também é uma das rotas mais comuns (Poon et al. 2001).

Vazamentos de combustível e derrames em estações de gasolina são fontes significativas de contaminação ambiental por hidrocarbonetos em áreas urbanas (Chen et al. 2000; López et al. 2008). Os vazamentos de combustível ocorrem principalmente devido a falhas no sistema de armazenamento de combustível, como corrosão nas estruturas metálicas dos tanques e procedimentos operacionais inadequados (Forte et al. 2007). Os sistemas de tanques de armazenamento subterrâneo que armazenam combustíveis e outros produtos químicos são numerosos e representam uma ameaça significativa para a qualidade do solo e da água (EPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2008). Estima-se que a contaminação a partir destes tanques pode afetar quase 50% da população dos Estados Unidos, chegando a 99% das populações rurais que dependem das águas subterrâneas (Wilson et al. 2013).

O uso de etanol como combustível ou adicionado a outros combustíveis é uma tendência global (Corseuil et al. 2004). No Brasil, a gasolina pode conter de 25 a 27% de etanol, enquanto que nos EUA 10% (Leone et al. 2014). Assim, em um vazamento de gasolina, a presença de etanol aumenta a transferência dos hidrocarbonetos para a fase líquida, aumentando a concentração de contaminantes nas águas subterrâneas. Este

processo, conhecido como co-solvência (Corseuil et al. 2004), reduz a biodegradação natural dos contaminantes e aumenta sua persistência na água (Powers et al. 2001; Tiburtius et al. 2004).

Estudos demonstram que a exposição à gasolina e / ou seus componentes pode levar a efeitos deletérios em humanos e animais. Os principais efeitos descritos são carcinogênese (IARC 2000), hematotoxicidade (Ajugwo et al. 2014), neurotoxicidade (Wiwanitkit 2009; Kinawy 2009), nefrotoxicidade (Awodele et al. 2014), hepatotoxicidade (Momoh e Oshin 2015), cardiotoxicidade (Mohammadi et al. 2012), genotoxicidade (Santiago et al. 2014), imunotoxicidade (Akinosun et al. 2006) e desregulação endócrina (Bolden et al. 2015). Além disso, efeitos sobre o sistema reprodutor masculino, especialmente quanto à qualidade espermática, e histologia testicular também tem sido relatados (De Celis et al. 2000; Xiao et al. 2001; Katukam et al. 2012).

Os avanços na inteligência de máquina criaram algoritmos capazes de encontrar padrões ocultos em dados, classificar objetos com base em suas características medidas e associar pacientes / doenças / drogas semelhantes com base em características comuns (Altman 2017). A aprendizagem de máquina (AM) é uma subarea da inteligência artificial que utiliza métodos capazes de “aprender” automaticamente extraíndo padrões a partir de um conjunto de amostras de exemplo (Coppin 2010). Recentemente, os métodos de AM têm sido realizados para o diagnóstico, tomada de decisões clínicas e as previsões de sobrevivência (Hu et al. 2015; Zhang et al. 2017).

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da exposição de ratos machos adultos à mistura comercial de gasolina/etanol, com ênfase nos possíveis impactos sobre a morfofisiologia reprodutiva. Além disso, pretendeu-se avaliar o desempenho de algoritmos de aprendizado de máquina para o reconhecimento de padrões e classificação dos grupos de exposição.

Material e Métodos

Animais e ambiente de experimentação

Ratos machos (n= 32, com 75 dias de idade e aproximadamente 300g de peso corpóreo) da linhagem Wistar e provenientes do Biotério Central da UNOESTE, Presidente Prudente, foram mantidos no Biotério de Experimentação do Campus II da UNOESTE, em gaiolas de polipropileno (dois animais por gaiola), sob condições controladas de luminosidade (ciclo de 12 horas claro/escuro) e temperatura (média de 25°), e receberam água e ração comercial para roedores à vontade. Os procedimentos experimentais estavam de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob protocolo nº 3183.

Delineamento experimental e exposição

Os ratos foram previamente pesados e distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais (n=8/grupo). Os animais dos grupos expostos receberam 16 (grupo A - GA); 160 (grupo B - GB) ou 800 mg / kg / dia (grupo C – GC) de gasolina contendo 25% de etanol diluído em óleo de milho, durante 30 dias por gavagem (Marouani et al. 2017). Os animais do grupo controle (C) receberam apenas veículo (óleo de milho), no mesmo protocolo experimental dos grupos expostos. Foi feita a aferição da porcentagem de etanol contida na gasolina. As doses utilizadas foram baseadas no estudo de toxicologia reprodutiva de fêmeas de Poon et al. (2001), com adaptações para a porcentagem de etanol misturado à gasolina comercial do Brasil. Os ratos foram pesados três vezes por semana e tiveram sua ingestão diária de ração estimada (em gramas) e água (em mililitro).

Coleta dos materiais biológicos

Ao término do período de exposição, os ratos sofreram eutanásia com 100mg/kg de tiopental sódico por administração intraperitoneal.

Os testículos, epidídimos, ductos deferentes, próstata ventral, vesículas seminais (cheias e vazias, sem a glândula coaguladora), fígado e rins foram removidos e seus pesos foram determinados.

Motilidade e morfologia espermática

Imediatamente após a eutanásia, o ducto deferente esquerdo foi coletado e os espermatozoides foram liberados com ajuda de uma seringa em meio HTF modificado (Irvine Scientific) a 34°C. Esta solução espermática foi utilizada para avaliação da motilidade, integridade de membrana plasmática e acrossomal e atividade mitocondrial.

A análise da motilidade foi feita em câmara de Neubauer, por estimativa visual (200 espermatozoides por animal, em duplicata) em microscópio de luz (Leica DMLS) em aumento de 400X. Os espermatozoides foram classificados como: móveis com trajetória progressiva; móveis sem progressão e imóveis.

Para análise da morfologia espermática, os espermatozoides foram coletados do ducto deferente direito com auxílio de uma agulha com seringa contendo 1,0 mL de formol salina a 10%. A análise morfológica foi realizada de acordo com Seed et al. (1996) e as anormalidades foram classificadas de acordo com Filler (1993).

Integridade de membrana plasmática e acrossomal e atividade mitocondrial

Para a análise da integridade de membrana plasmática, uma gota de solução espermática em HTF e duas gotas de solução de coloração eosina/nigrosina foram colocadas em uma lâmina histológica, e com auxílio de outra lâmina foi realizado o esfregaço. Duzentos espermatozoides foram contados em microscópio de luz, usando a objetiva de 100X em óleo de imersão e classificados como: não corados (intacto, vivo) e com coloração vermelha (com membrana danificada).

A análise da membrana acrossomal foi realizada por meio da coloração de Pope (Pope et al. 1991). Foram contados 200 espermatozoides por lâmina em microscópio de luz em aumento de 1000X. Estes foram classificados em: acrossoma íntegro (região acrossomal de coloração lilás, levemente mais escura na região pós-acrossomal); acrossoma não íntegro

(região acrossomal de coloração rosa, levemente mais clara na região pós-acrossomal).

Para a avaliação da atividade mitocondrial, foram incubados 10 μ L da amostra diluída em 300 μ L de diaminobenzidine (DAB) dissolvido em fosfato de sódio 0,15M, pH 7,2. A amostra foi homogeneizada e incubado em banho-maria a 37°C por uma hora, no escuro. Após incubação, foram preparados esfregaço sem lâminas, que foram fixados em formaldeído 10% por 10 minutos. As avaliações dos espermatozoides foram feitas em objetiva 100X, sob imersão em óleo, usando microscópio de luz. Foram classificados 200 espermatozoides por lâmina e a avaliação da atividade mitocondrial da peça intermediária dos espermatozoides obedeceu escala de quatro classes propostas por Hrudka (1987): Classe 1: maioria das mitocôndrias ativas, contendo produto de reação colorido, o que dá à bainha mitocondrial a aparência de um cilindro compacto e proeminente; Classe 2: bainha mitocondrial fragmentada, com predominância de segmentos ativos; Classe 3: espermatozoides com menos da metade da bainha mitocondrial ativa e com poucas mitocôndrias ativas dispersas; Classe 4: espermatozoides completamente inativos.

Contagens espermáticas

Os testículos direitos foram decapsulados e os segmentos cabeça / corpo e cauda do epidídimo direito foram separados. As espermátides testiculares resistentes à homogeneização (estágio 19 da espermiogênese) e os espermatozoides no epidídimo cabeça / corpo e cauda foram avaliados como descrito por Robb et al. (1978), com adaptações de Fernandes et al. (2007). Para calcular a produção diária de espermatozoides (PDE), o número de espermátides foi dividido por 6,1 (número de dias em que estas células estão presentes no epitélio seminífero). O tempo de trânsito do espermatozóide através do epidídimo foi determinado dividindo o número deste tipo celular em cada porção pela PDE.

Processamento histológico e análise quantitativa da espermatogênese

O testículo e epidídimo esquerdos foram coletados e fixados em solução fixadora de Davidson. As peças foram incluídas em Paraplast e seccionadas a 5 µm. As seções foram utilizadas para avaliação histológica foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e ácido periódico-Schiff (PAS) e examinadas por microscopia óptica.

Cem seções transversais tubulares aleatórias por animal foram classificadas em quatro categorias, de acordo com o tipo de célula germinativa presente. Os grupos de estágios I-VI, VII-VIII, IX-XIII e XIV do ciclo do epitélio seminífero (Leblond e Clermont, 1952) foram identificados sob um microscópio de luz em aumento de 200X.

Os núcleos de células de Sertoli (CS) e células germinativas (espermatogonia tipo A - SPGA, espermatócitos em paquíteno – SP I e espermátides redondas SP R) foram contados em 20 túbulos seminíferos por animal, nos estágios VII e VIII da espermatogênese, em microscópio de luz, em aumento de 400X. Além disso, foram determinados os seguintes índices:

- Capacidade total de suporte das Células de Sertoli = $SP\ R / CS$.
- Coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais (índice mitótico) = $SP\ I / SPG\ A$.
- Índice meiótico: $SP\ R / SP\ I$.
- Rendimento geral da espermatogênese = $SP\ R / SPG\ A$.

Aprendizado de Máquina

Para a verificação da existência/reconhecimento de padrões foram utilizados os seguintes parâmetros: peso corpóreo final, peso dos órgãos reprodutivos, fígado e rins, motilidade e morfologia espermática, integridade da membrana plasmática, integridade acrossomal, atividade mitocondrial, número de células de Sertoli e germinativas e contagem espermática no testículo (número de espermatozoides e PDE) e no epidídimo (número de espermatozoides e tempo de trânsito nos segmentos cabeça/corpo e cauda). De modo a realizar uma análise robusta, foram utilizados diferentes algoritmos de reconhecimento de padrões: *Artificial Neural Network* (ANN), *Bayes Classifier* (BAY), *K-Nearest Neighbors* (K-NN), *Support Vector Machine* (SVM)

e *Optimum Path Forest* (OPF). Com intuito de manter a clareza e facilitar a discussão dos resultados, foi utilizada a matriz de confusão.

A matriz de confusão ou de classificação foi criada a partir de um conjunto de dados divididos em categorias, que determinaram se os resultados (valores) esperados correspondem ao valor real, sendo o total desses resultados exibidos em uma matriz.

Análise estatística e algoritmos de classificação

As análises estatísticas foram realizadas pelo teste ANOVA com teste “a posteriori” de Tukey ou teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com “a posteriori” de Dunn, de acordo com as características de cada variável. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP) ou mediana e quartil 1 e 3 (Q1 / Q3). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Os métodos de classificação utilizam um conjunto de amostras pré-classificadas (que são comumente referidas como um conjunto de treinamento) que reconhece os padrões dessas amostras e depois classifica as amostras que não estejam presentes no conjunto de treinamento.

Cada amostra de treinamento e de teste consistiu em um conjunto de recursos e um rótulo que representou sua classe (GC, GA, GB e GA). Esses métodos exigem classificação prévia (ou reconhecimento) das amostras. No contexto deste estudo, os rótulos eram anteriormente conhecidos por seus tipos de exposição (CG, GA, GB e GA). Para investigar a taxa de aprendizagem dos algoritmos e os conjuntos de dados, usamos cinco diferentes tamanhos de conjunto de treinamento considerando 10, 30, 50, 70 e 80% da totalidade conjunto de dados, o restante dos dados foi usado para o teste.

Para os experimentos computacionais, consideramos duas versões do conjunto de dados coletados:

- Dataset1: quatro classes (CG, GA, GB e GA).
- Dataset2: duas classes (CG e grupos expostos em conjunto, devido à similaridade dos grupos de exposição).

Para cada tamanho de conjunto de treino e cada versão de conjunto de dados, corremos 20 execuções. Todos os experimentos foram realizados em um computador com um Processador Intel i5 6500U com 8 GB de RAM usando Linux como o sistema operacional.

Resultados

Toxicidade geral

Os animais de todos os grupos não apresentaram sinais clínicos de intoxicação durante o período de exposição. Além disso, não houve diferença estatística ($p > 0,05$) no peso corpóreo (Tabela 1) e consumo de ração entre os grupos experimentais, durante o período de exposição. O consumo de água foi afetado somente no 27º dia de exposição (C = $40,21 \pm 1,02$ mL; GA = $39,48 \pm 0,65$ mL; GB = $39,06 \pm 1,77$ mL; GC = $44,37 \pm 1,10$ mL; $p < 0,05$), com um aumento de GC em relação à GA e GB.

Observou-se diminuição significativa ($p < 0,05$) no peso absoluto da vesícula seminal cheia em GB e GC em relação a GA.

Avaliação espermática

O número de espermatozoides com movimento progressivo e imóveis foi, respectivamente, reduzido e aumentado ($p < 0,01$) em GB e GA em relação à GC. Além disso, o número de espermatozoides imóveis também foi maior em GA em relação a GB (Figura 1A e 1C). A porcentagem de espermatozoides sem progressão no movimento foi aumentada ($p < 0,001$) em GB e GB em relação GC (Figura 1B).

Houve uma redução significativa ($p < 0,05$) na porcentagem de espermatozoides morfológicamente normais em GA, quando comparados a GC e GB. As alterações de cabeça espermática (especialmente cabeça isolada) foram aumentadas nos animais expostos às doses média e alta, mas o número de alterações de cauda espermática não foi afetado (Tabela 3).

A produção diária de espermatozoides no testículo foi menor ($p < 0,01$) em GB e GA, quando comparada a GC. Além disso, este parâmetro

também foi menor em GA em relação a GB. Houve um atraso significativo ($p < 0,05$) no tempo de trânsito na cauda do epidídimo em GB e GA quando comparado a GC (Tabela 3). O número de espermatozoides no segmento cabeça/corpo do epidídimo sofreu redução ($p < 0,01$) em GB e GA em relação a GC e GB. Quando levou-se em consideração o peso do órgão, foi observada uma redução significativa ($p < 0,01$) em todos os grupos expostos em relação ao controle. No entanto, o trânsito espermático nesse segmento não foi afetado pela exposição.

A integridade da membrana plasmática e acrossomal foi reduzida ($p < 0,05$) em GA em relação a GC. Além disso, a integridade do acrossoma também foi reduzida em GB, quando comparado a CG (Tabela 4).

A atividade mitocondrial foi prejudicada pela exposição à gasolina comercial. O número de espermatozoides com alta atividade mitocondrial foi reduzido ($p < 0,01$) em todos os grupos expostos em relação ao controle. Enquanto que o número de espermatozoides contendo menores níveis de atividade mitocondrial foi aumentado ($p < 0,05$) em todos os grupos expostos em relação ao controle (Tabela 4).

Avaliação da espermatogênese

A análise histopatológica do testículo e epidídimo mostrou que a estrutura dos túbulos seminíferos, tecido intersticial (células de Leydig) e diferentes regiões da cabeça, corpo e cauda do epidídimo foram semelhantes entre os grupos experimentais. Além disso, os estágios da espermatogênese (Tabela 5) e contagens de células germinativas (Tabela 6) não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos experimentais. No entanto, o número de células de Sertoli sofreu redução nos grupos GB e GA ($p < 0,01$) quando comparado aos grupos GC e GB, porém a eficiência da célula de Sertoli foi maior ($p < 0,05$) no grupo GA quando comparado ao grupo GC, já os outros parâmetros não apresentaram diferença estatística (Tabela 6).

Aprendizado de máquina

Os testes aplicados foram: ANN, BAY, OPF, KNN e SVM (Figura 2). O teste SVM foi o que apresentou maior precisão de classificação considerando a separação de quatro classes de estudo (dataset1), e quando considerada a separação de apenas duas classes (dataset2).

Ao analisar a matriz de confusão com quatro classes (dataset1), verificou-se uma precisão maior nos resultados referentes à classe GC (100% de acurácia) (Tabela 7). Ao unir todos os grupos expostos em uma única classe (dataset2) obteve-se 90% de precisão de classificação para GC e 100% para os grupos de exposição, indicando que a análise computacional conseguiu identificar todas as diferenças dos parâmetros avaliados entre estas classes (Tabela 8).

Quando os quatro grupos foram considerados (Tabela 7), o número de acertos nos grupos de exposição isolados (GB, GB e GA) não manteve a variação esperada para o teste (55 a 70%), devido à similaridade dos grupos que receberam baixa e média dose de gasolina.

Discussão

Apesar da preocupação sobre os potenciais riscos à saúde, causados pela exposição aos componentes da gasolina, a maioria dos estudos de toxicologia reprodutiva abordam os seus principais constituintes (benzeno, tolueno e xileno) separadamente. Desta forma, muitos estudos não consideram a exposição real às fontes de contaminação (Ono et al. 1996; De Celis et al. 2000; Singh e Bansode 2011; Katukam et al. 2012).

No presente estudo, não foi observado impacto sobre a saúde geral dos animais expostos à gasolina, sinais clínicos de toxicidade e alteração no peso corpóreo e consumo de ração. O grupo exposto à alta dose (GA) teve apenas um aumento pontual no consumo de água no 27º dia de exposição. Clark et al. (2014) também não observaram alteração no peso corporal de ratos expostos durante 13 semanas a vapores de gasolina nas concentrações 0, 2000, 10000 ou 20000 mg/m³. No entanto, Abubakar et al. (2015) observaram redução no ganho de peso corporal de ratos expostos a vapores de gasolina na concentração de 11,13 ± 1,1 cm³/h. Singh e Bansode (2011) também relataram

redução do peso corpóreo e consumo de água e ração de ratos expostos via gavagem a 1 mL kg^{-1} de benzeno.

O peso da vesícula seminal sofreu uma diminuição, Singh e Bansode (2011) também observaram essa redução. A vesícula seminal tem importante na regulação da fertilidade, pois sua secreção estimula diretamente a motilidade dos espermatozoides. A queda na coagulação é relacionada à baixa atividade da vesícula seminal (SOUZA, 2007).

A viabilidade de um espermatozoide está ligada a sua motilidade e também ao fato de possuir uma membrana plasmática intacta, uma vez que esta é crucial para interações entre os espermatozoides e outras células em seu ambiente. Por isso a maioria dos ensaios de viabilidade avalia se a membrana plasmática está intacta ou não (Hossain et al. 2011). No presente estudo, o número de espermatozoides com a membrana plasmática intacta foi reduzido no grupo que recebeu a maior dose de gasolina. Esta alteração observada corrobora com estudos de Ducci et al. (2001) e Xiao et al. (2001) que relataram diminuições da viabilidade dos espermatozoides de trabalhadores expostos a diferentes doses de benzeno isolado ou associado a tolueno e xileno.

Hiroshi et al. (2005) relatam que o metabolismo celular do benzeno leva à produção contínua de espécies reativas de oxigênio (ROS), que danificam DNA, RNA e proteínas por reações químicas como oxidação, nitratação e halogenação, levando a modificação genética e alterações nas funções de enzimas e proteínas importantes. Um dos fatores mais importantes que contribuem para o sêmen de má qualidade é o estresse oxidativo (Bucak et al. 2010). A produção descontrolada de ROS que excede a capacidade antioxidante do plasma seminal é prejudicial aos espermatozoides (Desai et al. 2010), podendo causar dano estrutural no DNA espermático (Davies 1987; Lopes et al. 1998), motilidade espermática reduzida (Jones et al. 1979; Kao et al. 2008; Shi et al. 2011) e degradação na membrana espermática através da peroxidação lipídica (Agarwal et al. 2008; Aitken et al. 2014).

A atividade mitocondrial e conseqüentemente a motilidade dos espermatozoides foi prejudicada nos animais expostos a todas as doses de gasolina. Alteração da motilidade espermática também tem sido relatada em estudos de exposição ocupacional crônica ao BTEX (Xiao et al. 2001) e

benzeno (Katukam et al. 2012). Além disso, o aumento de patologias espermáticas observadas no presente estudo corrobora estudos de exposição ocupacional de homens ao benzeno (Ducci et al. 2001; Katukam et al. 2012).

Os animais dos grupos expostos à média e alta dose de gasolina apresentaram um maior número de espermatozoides com acrossoma não íntegro quando comparados ao controle, o que pode comprometer a capacidade fértil dos animais. Anormalidades morfológicas ou no acrossoma podem comprometer a fertilização (Menkveld et al. 1996; Garrett et al. 1997), no presente estudo a alteração na morfologia espermática principalmente na cabeça do espermatozoide reflete alteração na espermiogênese.

No presente estudo, a produção espermática diária sofreu redução e o trânsito espermático na cauda do epidídimo sofreu atraso. No entanto, a análise histopatológica desses órgãos foi semelhante entre os grupos, assim como a contagem dos estágios da espermatogênese e as contagens de células germinativas. Já no estudo de Ono et al. (1996), foi observado uma diminuição nas contagens espermáticas. Ducci et al. (2001) relatou diminuições significativas da contagem de espermatozoides e na concentração espermática. O tempo de trânsito do espermatozoide através do epidídimo tem papel importante na maturação dos espermatozoides. Portanto uma alteração neste tempo pode provocar problemas em tais como na maturação, bem como alterar o número de gametas disponíveis para a ejaculação (Klinefelter, 2002).

Apesar da redução do número de células de Sertoli no grupo GC, a composição de células germinativas não foi afetada. Desta forma, o aumento da eficiência da célula de Sertoli observada neste grupo não corresponde a uma melhora funcional deste tipo celular, mas sim, a uma consequência da ausência de impacto sobre o número de espermátides e dinâmica da espermatogênese.

Para uma melhor interpretação de todas as informações encontradas neste estudo, foi utilizado o reconhecimento de padrões, que é uma das funcionalidades mais importantes da inteligência artificial (Papa et al. 2012). Alguns estudos tem demonstrado a eficiência do procedimento de classificação por máquinas na área médica e biológica (Patel et al. 2009; Yilmaz, et al. 2016) podendo se extrair conhecimento de um conjunto de dados,

para o auxílio em diagnóstico médico (Koerich 2012), e associar pacientes / doenças / drogas com base em características comuns (Altman 2017).

Este foi o primeiro estudo que utilizou esta ferramenta para correlacionar as alterações reprodutivas em ratos expostos à gasolina. E conseguiu-se identificar um padrão na distribuição das alterações entre os grupos de exposição agrupados e o controle, chegando a 100% de precisão, confirmando a diferença significativa entre estes grupos, e indicando a eficiência da análise computacional em conseguir identificar todas as diferenças dos parâmetros avaliados entre estas classes.

Conclusão

A exposição de ratos machos adultos a diferentes doses de gasolina comercial leva a alterações estruturais e funcionais dos espermatozoides, bem como, na produção espermática. Apesar do processo de fertilização não ter sido avaliado, estas alterações observadas indicam redução da qualidade espermática, com possíveis implicações na fertilidade. Além disso, o uso de algoritmos de aprendizado de máquina mostra-se eficiente para o reconhecimento de padrões e diferenciação dos animais expostos e não expostos, o que ressalta os impactos reprodutivos causados pela exposição à gasolina.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa PROSUP concedida e à Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE) pelo apoio financeiro para a realização do estudo.

Referências

Abubakar MB (2015) The effects of exposure to petrol vapours on growth, hematological parameters and oxidative markers in sprague-dawley male rats. *Malays J Med Sci* 22(1):23-31.

Agarwal A, et al (2008) Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *Am J Reprod Immunol* 59:2-11.

Aitken RJ, et al (2014) . Oxidative stress and male reproductive health. *Asian J Androl* 16:31–38.

Ajugwo AO, et al (2014) Reduced haematological indices in auto-mechanics and fuel attendants in Elele Nigeria. *Am J Med Biol Res* 2:1–4.

Akinosun OM, Arinola OG, Salimonu LS (2006) Immunoglobulin classes and liver function tests in Nigeria petrol attendants. *Indian J Occup Environ Med* 10:58–61.

Altman RB (2017) Artificial intelligence (AI) systems for interpreting complex medical data sets. *Clin Pharmacol Ther* 101(5):585–586.

Awodele O, Sulayman AA, Akintonwe A (2014) Evaluation of hematological hepatic and renal function of petroleum tanker drivers in Lagos, Nigeria. *Afr Health Sci*14:178–84.

Azari MR, et al (2012) Occupational exposure of petroleum depot workers to BTEX compound. *Int J Occup Environ Med* 3:39–44.

Bolden AL, et al (2015) New Look at BTEX: Are Ambient Levels a Problem?. *Environmental science & technology* 49(9):5261-5276.

Brautbar N (2004) Industrial solvent and kidney disease. *Int J Occup Environ Health* 10:79–83.

Bucak MN, et al (2010) The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancyrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. *Small Ruminant Research* 89(1):24–30.

Chen D, et al (2000) Exposure to benzene, occupational stress, and reduced birth weight. *Occup Environ Med* 57:661–7.

Clark CR, et al (2014) Health assessment of gasoline and fuel oxygenate vapors: Subchronic inhalation toxicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 70(2):S18-S28.

Coppin B (2010) *Inteligência artificial*. Rio de Janeiro: LTC.

Corseuil HX, Kaipper BIA, Fernandes M (2004) Cosolvency effect in subsurface systems contaminated with petroleum hydrocarbons and ethanol. *Water Res* 38(6):1449-56.

Davies KJA (1987) Protein damage and degradation by oxygen radicals: I. general aspects. *J Biol Chem* 262:9895-9901.

De Celis R, et al (2000) Semen quality of workers occupationally exposed to hydrocarbons. *Fertil. Steril* 73(2):221–228.

Desai NR, et al (2010) Reactive oxygen species levels are independent of sperm concentration, 4 motility, and abstinence in a normal, healthy, proven fertile man: a longitudinal study. *Fertility and Sterility* 94(4):1541–1543.

Ducci M, et al (2001) Assessment of trans, trans-muconic acid in human seminal plasma. *Andrology* 33 (5):300–304.

Ekpenyong CE, Davies K, Daniel N (2013) Effect of gasoline inhalation on menstrual characteristics and the hormonal profile of female petrol pump workers. *J Environ Protect* 4:65–73.

Ekpenyong C, Asuquo A (2017) Recent advances in occupational and environmental health hazards of workers exposed to gasoline compounds. *International Journal Of Occupational Medicine And Environmental Health* :1-26.

EPA – United States Environmental Protection Agency (2008) Learn About Underground Storage Tanks (USTs).

Fernandes GS, et al (2007). Reproductive effects in male rats exposed to diuron. *Reproductive Toxicology* 23(1):106-112.

Filler R, (1993) Methods for evaluation of rat epididymal sperm morphology. In Chapin RE, Heindel JH (1996) *Methods in toxicology: Male reproductive toxicology*. (p. 334-343). San Diego CA: Academic Press.

Forte EJ, Azevedo MS, Oliveira RC, Almeida R (2007) Hydrocarbon contamination in groundwater: the case of Tupi Village, Porto Velho-RO. *Quim Nova* 30(7):1539-44.

Garrett C, Liu DY, Baker HWG (1997) Selectivity of the human sperm-zona pellucida binding process to sperm head morphometry. *Fertility and Sterility* 67(2):362-371.

Hiroshi O, et al (2005) Prevention of human cancer by modulation of chronic inflammatory processes. *MutatRes* 591(1-2):110-122.

Hossain MS, et al (2011) Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. *Asian Journal of Andrology* 13(3):406–419.

Hrudka F (1987) Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome-c oxidase in spermatozoa and dynamics of changes accompanying ageing or induced by stress. *International Journal of Andrology* 10(6):809-828.

Hu L, Hong G, Ma J, Wang X, Chen H (2015) An efficient machine learning approach for diagnosis of paraquat-poisoned patients. *Comput Biol Med* 59:116–124.

IARC (2000) IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human. *Some Industrial Chemicals* 77.

Jones R, et al (1979) Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril* 31:531-537.

Kao SH (2008) Increase of oxidative stress in human sperm with lower motility. *Fertility and Sterility* 89(5):1183–1190.

Katukam V, et al (2012) Effect of benzene exposure on fertility of male workers employed in bulk drug industries. *Genetic testing and molecular biomarkers* 16(6):592-597.

Kinawy AA (2009) Impact of gasoline inhalation on some neuro-behavioral characteristics of male rats. *BMC Physiology* 9:21.

Klinefelter, G. R. (2002) Actions of toxicants on the structure and function of the epididymis. In: *The Epididymis – From Molecules to Clinical Practice* (eds B. Robaire & B. T. Hinton), pp. 353–369. Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York.

Koerich A (2012) *Aprendizagem de Máquina*. Paraná: [s.n.].

Leblond CP e Clemont Y (1952) Spermatogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the periodic acid-fuchsin sulfurous acid technique. *The American Journal of Anatomy* 90(2):167-215.

Leone TG, et al (2014) Effects of fuel octane rating and ethanol content on knock, fuel economy, and CO₂ For a turbocharged DI engine, *SAE Int. J. Fuels Lubr*, 7:9–28.

Liu DY, Baker HWG (2003) Disordered zona pellucida–induced acrosome reaction and failure of *in vitro* fertilization in patients with unexplained infertility. *Fertility and Sterility* 79(1):74-80.

Lopes S (1998) Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Human Reproduction* (4):896–900.

López E, Schuhmacher M, Domingo JL (2008) Human health risk of petroleum-contaminated groundwater. *Environ Sci Pollut Res Int* 15(3):278-88.

Makhluf SBD (2006) Loading magnetic nanoparticles into sperm cells does not affect their functionality. *Langmuir* 22(23):9480–9482.

Menkveld R, et al (1996) Acrosomal morphology as a novel criterion for male fertility diagnosis : relation with acrosin activity, morphology (strict criteria), and fertilization *in vitro*. *Fertility and Sterility* 65(3):637-644.

Mohammadi S, et al (2012) Effects of exposure to mixed organic solvents on blood pressure in non-smoking women working in a pharmaceutical company. *Arc Hig Rada Toksikol* 63:161–9.

Momoh J, Oshin TT (2015) Severe hepatotoxicity and nephrotoxicity of gasoline (petrol) on some biochemical parameters in Wistar male albino rats. *Am J Biochem* 5:6–14.

Morris BL, et al (2003) Groundwater and its Susceptibility to Degradation: A Global Assessment of the Problem and Options for Management. Early Warning and Assessment Report Series, RS. 03-3. United Nations Environment Program, Nairobi, Kenya.

Nwanjo HU, Ojiako, OA (2007) Investigation of the Potential Health Hazards of Petrol Station Attendants in Owerri. *J. Appl. Sci Environ Manage* 11(2):197 – 200.

Ono A (1996) Reproductive and developmental toxicity studies of toluene. II. Effects of inhalation exposure on fertility in rats. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 15(1):9-20.

Papa JP, Falcão AX, Suzuki CTN (2009) Supervised pattern classification based on optimum-path forest. *Int J Imaging Syst Technol* 19(2): 120–131.

Patel VL, et al (2009) The coming of age of artificial intelligence in medicine. *Artif Intell Med* 46(1):5–17.

Poon R, et al (2001) Short-term oral toxicity of gasohol in female rats. *Journal of applied toxicology* 21(6):461-467.

Pope CE, et al (1991) A simple staining method for evaluating acrosomal status of cat spermatozoa. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 22(1):87-95.

Powers SE, et al (2001) The transport and fate of ethanol, and BTEX in ground water contaminated by gasohol. *Critical Rev Environ Sci Technol* 31(1):79-123.

Richardson SD (2010) Environmental mass spectrometry: emerging contaminants and current issues. *Analytical Chemistry* 82(12):4742-4774.

Robb GW, et al (1978) Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *Journal of Reproduction and Fertility* 54(1):103-107.

Santiago F, et al (2014) Monitoring of gas station attendants exposure to benzene, toluene, xylene (BTX) using three-color chromosome painting. *Mol Cytogenet* 7:15.

Seed J, et al (1996) Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. ILSI risk science institute expert working group on sperm evaluation. *Reproductive Toxicology* 10(3): 237-244.

Singh RK, Bansode FW (2011) Benzene-induced histopathological changes and germ cell population dynamics in testes of Sprague Dawley rats. *Journal of environmental biology / Academy of Environmental Biology* 32(6):687-694.

Shi TY, et al. (2011) Effects of reactive oxygen species from activated leucocytes on human sperm motility, viability and morphology. *Andrology* (44):696–703.

SOUZA, F. Proteínas do semen do cão são importantes ou não na fertilização? *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 31, n. 01, p. 108-114, 2007.

Tiburtius ERL, et al (2004) Contaminação de águas por BTXs e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. *Quim Nova* 27(3):441-6.

Xiao G, et al (2001) Effect of benzene, toluene, xylene on the semen quality and the function of accessory gonad of exposed workers. *Health* 39(2):206-210.

Wilson S, et al (2013) Leaking Underground Storage Tanks and Environmental Injustice: Is There a Hidden and Unequal Threat to Public Health in South Carolina? *Environ Justice*6(5):175-182.

Wiwaniitkit V (2008) Headaches in subjects occupationally exposed to benzene vapours. *J Headache Pain* 9:253-4.

Yilmaz A, Ari S, Kocabiçak U (2016) Risk analysis of lung cancer and effects of stress level on cancer risk through neuro-fuzzy model. *Comput Methods Prog Biomed* 137:35-46.

Zhang H, et al (2017) The correlation-base-selection algorithm for diagnostic schizophrenia based on blood-based gene expression signatures. *Biomed Res Int* 2017:7860506.

Tabela 1 Pesos absolutos de órgãos dos ratos.

Pesos	C	GA	GB	GC
Valores Absolutos				
Testículo (g)	1,43 ± 0,09	1,54 ± 0,16	1,47 ± 0,14	1,49 ± 0,13
Epidídimo (mg)	576,88 ± 45,74	652,13 ± 61,08	634,38 ± 62,73	614,88 ± 34,24
Ducto deferente (mg)	112,13 ± 15,14	113,75 ± 12,27	122,75 ± 15,38	124,13 ± 9,14
Próstata ventral (mg)	366,13 ± 89,99	404,13 ± 95,51	356,88 ± 61,26	338,88 ± 84,17
Vesícula seminal cheia (g)	1,36 ± 0,22a	1,13 ± 0,28ab	1,04 ± 0,22b	1,00 ± 0,12b
Vesícula seminal vazia (mg)	745,63 ± 145,38	620,88 ± 174,36	616,63 ± 154,88	582,50 ± 93,77
Fígado (g)	11,58 ± 2,06	11,19 ± 0,92	11,19 ± 0,64	12,56 ± 1,42
Rim direito (g)	1,39 ± 0,23	1,45 ± 0,16	1,44 ± 0,17	1,51 ± 0,20
Rim esquerdo (g)	1,35 ± 0,20	1,40 ± 0,12	1,39 ± 0,09	1,47 ± 0,18

Valores expressos como média ± DP. ANOVA com teste *a posteriori* de Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$). C = grupo controle, GA = 16mg/kg/day, GB = 160mg/kg/day, GC = 800mg/kg/day.

Tabela 2 Parâmetros espermáticos.

Parâmetro	C	GA	GB	GC
^aContagens espermáticas no testículo				
Número de espermatozoides no testículo ($\times 10^6$)	154,70 \pm 1,47a	148,40 \pm 2,43ab	138,73 \pm 4,04bc	130,81 \pm 2,20c
Número de espermatozoides/g de testículo ($\times 10^6$ /g)	118,15 \pm 3,31	114,00 \pm 4,27	110,00 \pm 1,80	105,63 \pm 2,87
PDE ($\times 10^6$ /testículo/dia)	25,36 \pm 0,24a	24,33 \pm 0,40ab	22,74 \pm 0,66bc	21,44 \pm 0,36c
PDEr ($\times 10^6$ /dia/g)	19,37 \pm 0,54	18,69 \pm 0,70	18,04 \pm 0,29	17,32 \pm 0,47
^aContagens espermáticas no epidídimo				
Número de espermatozoides na região cabeça/corpo do epidídimo ($\times 10^6$)	140,94 \pm 3,79a	135,37 \pm 3,02a	120,16 \pm 3,64b	114,87 \pm 3,38b
Número de espermatozoides/g da região cabeça/corpo do epidídimo ($\times 10^6$ /g)	443,29 \pm 7,88a	381,29 \pm 10,99b	334,10 \pm 3,37c	342,36 \pm 7,97c
Tempo de trânsito na região cabeça/corpo do epidídimo (dias)	5,56 \pm 0,17	5,57 \pm 0,10	5,51 \pm 0,13	5,60 \pm 0,18
Número de espermatozoides na cauda do epidídimo ($\times 10^6$)	184,07 \pm 4,87	188,78 \pm 4,76	182,69 \pm 8,46	182,40 \pm 5,05
Número de espermatozoides/g na cauda do epidídimo ($\times 10^6$ /g)	793,75 \pm 9,81	736,72 \pm 17,42	750,00 \pm 13,41	736,72 \pm 21,98
Tempo de trânsito na cauda do epidídimo (dias)	7,27 \pm 0,24a	7,77 \pm 0,19ab	8,37 \pm 0,33bc	8,88 \pm 0,26c
^bMorfologia espermática				
Espermatozoides normais (%)	96,52(95,00–96,62)ab	95,75(94,75–96,50)ab	93,75(93,37–94,75)bc	93,25(92,87–93,75)c
Anormalidades da cabeça (%)	2,50(2,37–3,312)a	3,00(2,37–3,62)ab	4,75(4,00–5,62)bc	5,25(4,50–5,62)c
Anormalidades da cauda (%)	1,50(1,00–1,62)	1,25 (1,00–2,00)	1,00(1,00–1,50)	1,50(1,00–1,50)

^aValores expressos como média \pm DP. ANOVA com teste *a posteriori* de Tukey. ^bValores expressos em mediana (Q1 – Q3). Kruskal–Wallis, com teste *a posteriori* Dunn. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$). C = grupo controle, GA = 16mg/kg/day, GB = 160mg/kg/day, GC = 800mg/kg/day.

Tabela 3 Integridade da membrana plasmática e acrossomal e atividade mitocondrial.

Parâmetro	C	GA	GB	GC
Membrana plasmática íntegra (%)	93,75 (91,87 – 95,62)a	93,25 (91,75 – 95,12)ab	94,25 (91,00 – 94,75)ab	92,25 (89,00 – 93,37)b
Membrana acrossomal íntegra (%)	92,25 (90,87 – 93,62)a	90,00 (88,87 – 91,62)ab	88,50 (87,87 – 90,12)ab	87,50 (86,50 – 88,62)b
Atividade mitocondrial (%)				
Classe 1	98,75 (98,00 – 99,00)a	97,25 (96,88 – 97,63)ab	96,75 (96,38 – 97,13)b	96,50 (96,000 – 97,13)b
Classe 2	1,00 (0,88 – 1,13)a	1,50 (1,00 – 1,50)ab	1,50 (1,50 – 2,00)b	1,50 (1,50 – 2,00)b
Classe 3	0,25 (0,00 – 0,50)a	1,00 (0,50 – 1,00)ab	1,00 (0,88 – 1,00)b	1,00 (0,88 – 1,00)b
Classe 4	0,00 (0,00 – 0,13)a	0,50 (0,50 – 0,63)ab	0,50 (0,50 – 0,63)b	0,75 (0,38 – 1,00)b

Valores expressos em mediana (Q1 – Q3). Kruskal–Wallis, com teste *a posteriori* Dunn. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$). C = grupo controle, GA = 16mg/kg/day, GB = 160mg/kg/day, GC = 800mg/kg/day.

Tabela 4 Estágios da espermatogênese.

Parâmetro	C	GA	GB	GC
I-VI	46,00 (43,75 – 47,25)	44,50 (43,00 – 46,25)	45,00 (43,00 – 46,25)	45,50 (43,00 – 46,25)
VII-VIII	26,50 (25,75 – 27,75)	26,00 (25,75 – 26,25)	25,00 (24,00 – 26,25)	26,00 (25,75 – 27,00)
IX-XIII	24,00 (22,75 – 25,00)	25,00 (23,75 – 26,25)	25,5 (24,00 – 26,00)	24,00 (23,00 – 25,25)
XIV	4,50 (3,50 – 5,25)	4,00 (3,00 – 4,50)	5,00 (4,00 – 5,25)	4,50 (3,75 – 6,00)

Valores expressos em mediana (Q1 – Q3). Kruskal–Wallis, com teste *a posteriori* Dunn ($p > 0,05$). C = grupo controle, GA = 16mg/kg/day, GB = 160mg/kg/day, GC = 800mg/kg/day.

Tabela 5 Número de células de Sertoli e células germinativas

Parâmetro	C	GA	GB	GC
Células de Sertoli	10,59±0,50a	9,99±0,45ab	9,82±0,96bc	9,27±0,38c
Espermatogonia tipo A	8,88±0,67	8,40±0,38	8,37±0,43	8,15±0,32
Espermatócito em paquíteno	64,89±1,62	63,98±2,33	63,86±1,74	63,39±1,32
Espermátide redonda	137,40±1,06	136,26±5,61	136,19±2,34	135,83±3,14
Eficiência da célula de Sertoli	13,00±0,62a	13,67±0,94ab	13,98±1,41ab	14,68±0,78b
Índice mitótico	7,35±0,56	7,63±0,41	7,64±0,26	7,79±0,33
Índice meiótico	2,12±0,05	2,13±0,10	2,13±0,05	2,14±0,04
Rendimeto geral da espermatogênese	15,55±1,12	16,25±0,90	16,30±0,65	16,68±0,56

Valores expressos como média ± DP. ANOVA com teste *a posteriori* de Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$). C = grupo controle, GA = 16mg/kg/day, GB = 160mg/kg/day, GC = 800mg/kg/day.

Tabela 6 Matriz de confusão considerando a classificação de quatro classes (GC, GA, GB e GA), usando o teste SVM e 90% das amostras para conjunto de treinamento.

Classificado como (%)	Classe Verdadeira (%)			
	C	GA	GB	GC
GC	100	0	0	0
GA	30	30	40	0
GB	1	40	60	0
GA	0	0	0	100

Resultados apresentados em porcentagem. Classes referentes aos grupos de estudo: C = grupo controle, GA = 16mg/kg/day, GB = 160mg/kg/day, GC = 800mg/kg/day.

Tabela 7 Matriz de confusão considerando a classificação de duas classes (GC, e grupos expostos em conjunto), usando o teste SVM e 90% das amostras para conjunto de treinamento.

Classificado como (%)	Classe Verdadeira (%)	
	C	GE
GC	90	10
GE	0	100

Resultados apresentados em porcentagem. Classes referentes aos grupos de estudo: C = grupo controle, GE = grupos expostos.

LEGENDA DAS FIGURAS

Figura 1 A) Evolução do peso corpóreo durante o período de exposição. B) Ganho de peso. Valores expressos como média \pm DP. ANOVA com teste *a posteriori* de Tukey. Valores expressos em mediana (Q1 – Q3). Kruskal–Wallis, com teste *a posteriori* Dunn ($p > 0,05$). C = grupo controle, GA = 16mg/kg/day, GB = 160mg/kg/day, GC = 800mg/kg/day.

Figura 2 Motilidade espermática. A) Espermatozoides móveis com trajetória progressiva; B) Espermatozoides móveis sem progressão; C) Espermatozoides imóveis. Valores expressos em mediana (Q1 – Q3). Kruskal–Wallis, com teste *a posteriori* Dunn. Letras diferentes indicam diferenças estatística ($p < 0,05$). C = grupo controle, GA = 16mg/kg/day, GB = 160mg/kg/day, GC = 800mg/kg/day.

Figura 3 Efeito do treinamento sobre o desempenho de classificação por grupo de exposição. Valores em porcentagem (%) de acurácia dos diferentes testes aplicados. ANN = *Artificial Neural Network*, BAY = *Bayes Classifier*, KNN = *K-Nearest Neighbors*, OPF = *Optimum Path Forest* e SVM = *Support Vector Machine*. A) Análise realizada com os quatro grupos de estudo. B) Análise realizada com dois grupos, C (controle) e GE (grupos expostos).

Figura 1

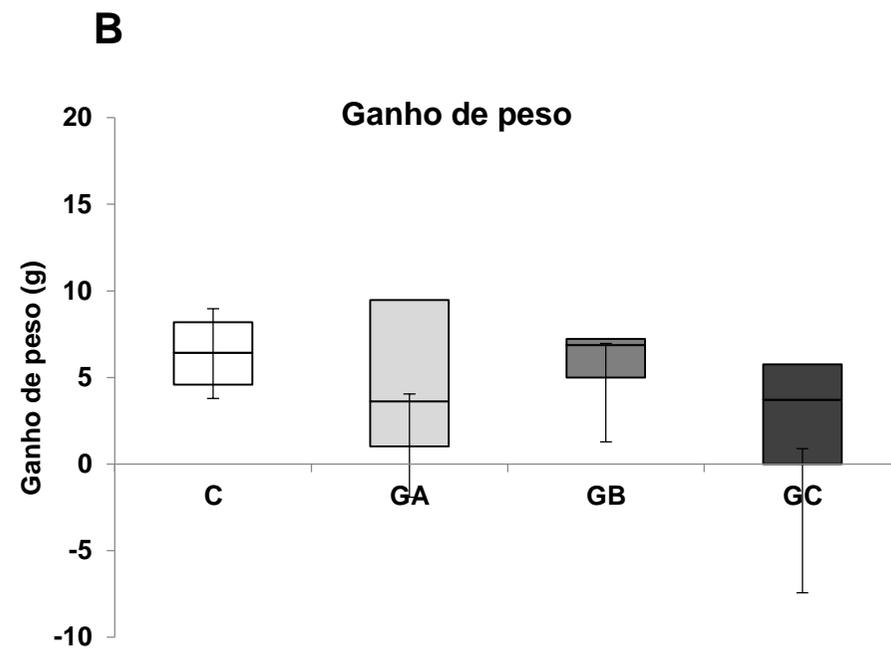
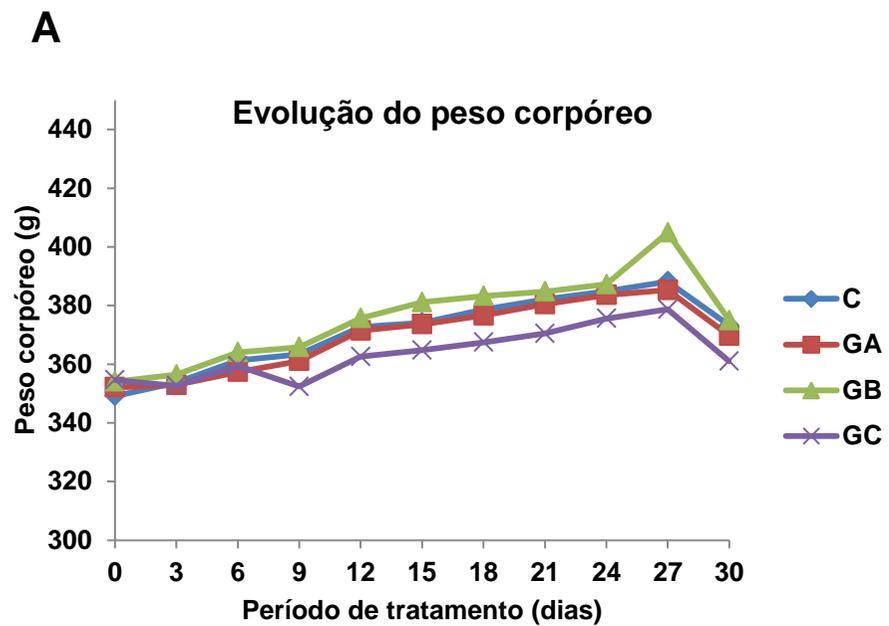


Figura 2

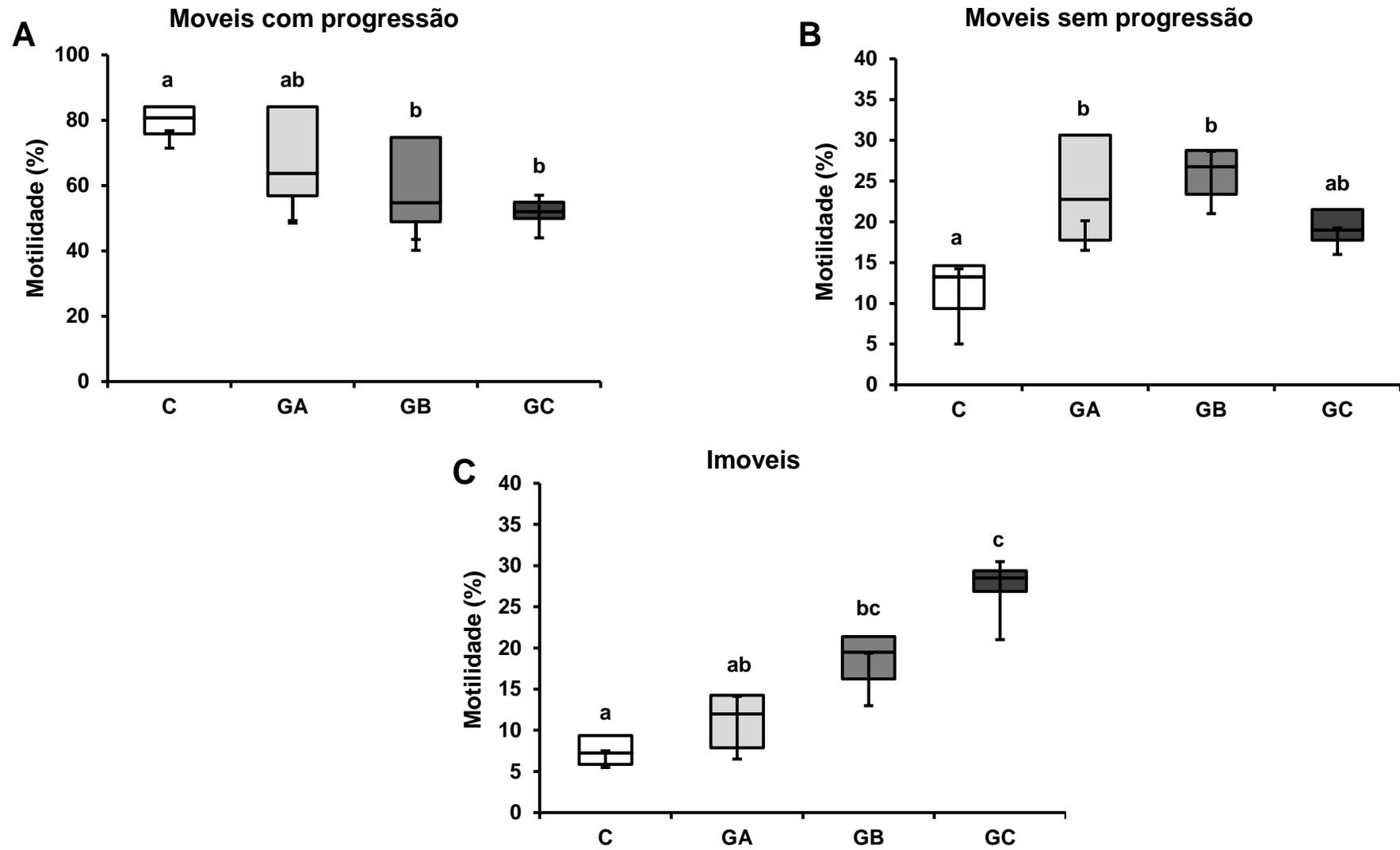
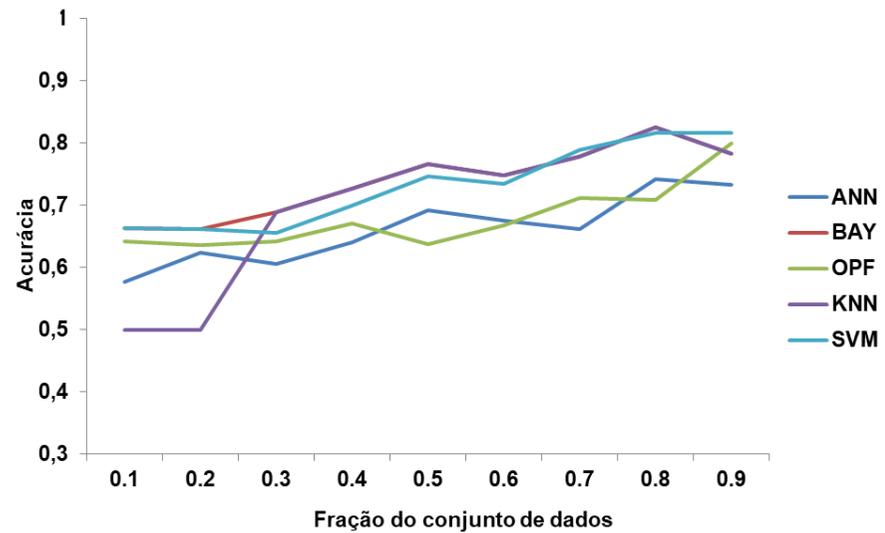
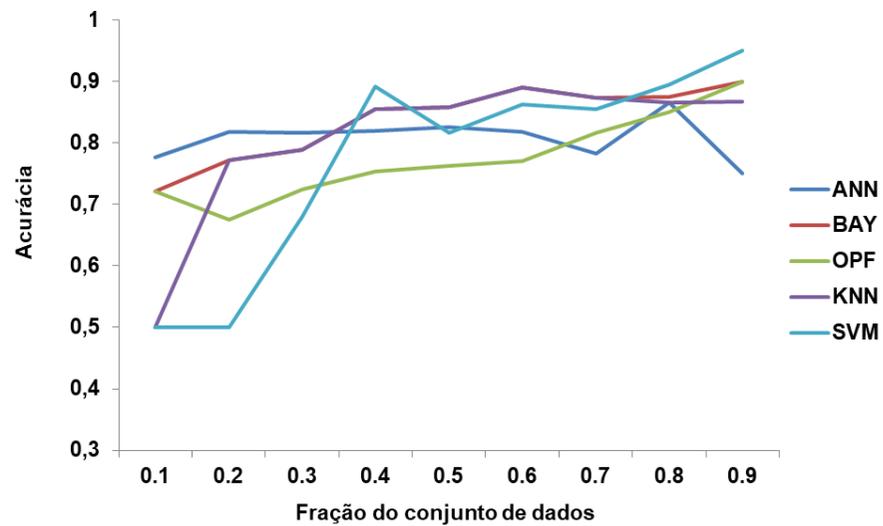


Figura 3

A



B



4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A exposição de ratos machos adultos a diferentes doses da mistura comercial de gasolina/etanol demonstrou ser prejudicial para o sistema reprodutivo, levando a alterações da estrutura e funcionalidade dos espermatozoides, assim como prejudicando a produção espermática, e podendo estar relacionada a um déficit na qualidade espermática. Além disso, a análise de aprendizado de máquina demonstrou ser uma eficiente ferramenta para identificação de padrões entre os grupos exposto e controle, demonstrando assim a importância desta ferramenta em estudos na área biológica.

REFERENCIAS

- AITKEN, R. J. Sperm function tests and fertility. **International Journal of Andrology**, v. 29, n.1, p. 69-75, 2006.
- ALABURDA, J.; NISHIHARA, L. Presença de compostos de nitrogênio em águas de poços. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 160-165, abr. 1998.
- ARAMBARRI, I. et al. Determination of fuel dialkyl ethers and BTEX in water using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-flame ionization detection. **Journal of Chromatography.A**, Netherlands, v.1033, n.2, p.193-203, apr. 2004.
- BALTRÉNAS, P. et al. Atmospheric BTEX concentrations in the vicinity of the crude oil refinery of the Baltic region. **Environmental monitoring and assessment**, Netherlands, v. 182, n.1, p. 115-127, nov. 2011.
- BARTH; A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames: Iowa State University Press, 1989.
- BEAVERS, J. D. et al. Exposure in a household using gasoline-contaminated water. **Journal of occupational and environmental medicine**, United States , v. 38, n. 1, p. 35–38, jan. 1996.
- BEUREN, I. M. **Como elaborar trabalhos monográficos em contabilidade**. 3. ed. São Paulo: Atlas, 2010.
- BOEKELHEIDE, K.; JOHNSON, K. J.; RICHBURG, J. H. **Sertoli Cell Toxicantes. Sertoli Cell Biology**. [S.l.]: Elsevier, 2005. p. 345-382.
- BOLDEN, A. L.; KWIATKOWSKI, C. F.; COLBORN, T. New look at BTEX: are ambient levels a problem? **Environmental Science & Technology**, United States, v.49, n. 9, p. 5261-5276, may. 2015.
- BONO, R. et al. Ambient air levels and occupational exposure to Benzene, Toluene, and Xylenes in northwestern Italy. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, United States, v. 35, p. 107-113, 2001.
- BROOKS, D. E. Epididymal functions and their hormonal regulation. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 36, p. 205-221, 1983.
- CARVALHO, F. I. M; DANTAS-FILHO, H. A. Estudo da qualidade da gasolina tipo A e sua composição química empregando análise de componentes principais. **Química Nova**, Brasil, v. 37, n. 1, p. 33-38, 2014.
- CETESB. **Texto explicativo: relação de áreas contaminadas e reabilitadas no Estado de São Paulo**. [São Paulo], dez. 2013.

CETESB. **Texto explicativo**: relação de áreas contaminadas e reabilitadas no Estado de São Paulo. [São Paulo], dez. 2014.

CETESB. **Texto explicativo**: relação de áreas contaminadas e reabilitadas no Estado de São Paulo. [São Paulo], dez. 2015.

CETESB. **Texto explicativo**: relação de áreas contaminadas e reabilitadas no Estado de São Paulo. [São Paulo], dez. 2016.

COOPERATIVA DE SERVIÇOS, PESQUISAS TECNOLÓGICAS E INDUSTRIAIS. **Diagnóstico de situação dos recursos hídricos da UGRHI – 22**: Pontal do Paranapanema: relatório zero. São Paulo, 1999

CHAPIN, R. E. et al. Endocrine modulation of reproduction. **Fundament. Appl. Toxicol.**, v. 29, p. 1-17, 1996.

CHE, W. et al. Oxidative damage of the extracts of condensate, particulate and semivolatile organic compounds from gasoline engine exhausts on testicles of rats. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, United States, v.83, n. 1, p. 42-47, jul. 2009.

CLERMONT, Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. **Physiological reviews**, v. 52, p. 198-236, 1972.

COPPIN, B. **Inteligência artificial**. Rio de Janeiro: LTC, 2010.

CORSEUIL, H. X.; MARINS, M. D. M. Contaminação de águas subterrâneas por derramamentos de gasolina: o problema é grave. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 2, p. 50-54, 1997.

D'ALASCIO, R. G. et al. Sintomas relacionados à exposição ocupacional ao benzeno e hábitos ocupacionais em trabalhadores de postos de revenda de combustíveis a varejo na região sul de Santa Catarina. **Revista Brasileira de Medicina**, Rio de Janeiro, v. 12, p. 21–29, 2014.

DE CELIS, R. et al. Semen quality of workers occupationally exposed to hydrocarbons. **Fertil. Steril.**, v. 73, n. 2, p. 221–228, 2000.

EDOKPOLO, B.; YU, Q. J.; CONNELL, D. Health Risk Assessment of Ambient Air Concentrations of Benzene, Toluene and Xylene (BTX) in Service Station Environments. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Switzerland, v. 11, p. 6354-6374, jun. 2014.

ELROY, M. B. **The atmospheric environment**: effects of human activity. New Jersey: Princeton University Press, 2002.

EPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Learn About Underground Storage Tanks (USTs)**. [United States], 2008.

- EPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Integrated Risk Information System (IRIS): Benzene**. [United States], 2003.
- FERNANDES, M. et al. Atmospheric BTX and polyaromatic hydrocarbons in Rio de Janeiro, Brazil. **Chemosphere**, England, v. 47, n. 4, p. 417-425, apr. 2002.
- FERNANDEZ, F. A. S. **O poema imperfeito: crônicas de Biologia, conservação da natureza, e seus heróis**. 2. ed. Curitiba: UFPR, 2004.
- FIRETTI, R. et al. Análise de variáveis estratégicas para o desenvolvimento da agropecuária da região do Pontal do Paranapanema. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 50, n. 1, p. 141-156, jan/mar. 2012.
- FOLEY, G. L. Overview of male reproductive pathology. **Toxicol. Pathol**, v. 29, n. 1, p. 49-63, 2001.
- FRANÇA, L. R.; AVELAR, G. F.; ALMEIDA, F. F. L. Spermatogenesis and transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. **Theriogenology**, v. 63, p. 300-318, 2005.
- GARRETT, C.; LIU, D. Y.; BAKER, H. W. G. Selectivity of the human sperm-zona pellucida binding process to sperm head morphometry. **Fertility and Sterility**, v. 67, n. 2, p. 362-371, 1997.
- GHELERI, L. C. **Amostragem passiva de benzeno presente na atmosfera**. 2003. 127 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.
- HERMO, L.; ROBAIRE, B. Epididymal cell types and their functions. In: Robaire, B.; Hinton, B. T. (Eds.). **The epididymis: from molecules to clinical practice**. New York: Kluwer Academic, 2002. p. 81-102.
- HERRICK, J. R.; SWANSON, W. F. Gonadotropin exposure, salt storage and storage duration affect penetration of domestic cat oocytes by homologous spermatozoa. **Theriogenology**, v.59, n.7, p.1503-1513, 2003.
- HOSSAIN, M. S. et al. Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. **Asian Journal of Andrology**, v.13, n.3, p. 406–419, 2011.
- HRUDKA, F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome-c oxidase in spermatozoa and dynamics of changes accompanying ageing or induced by stress. **International Journal of Andrology**, v.10, n.6, p. 809-828, 1987.
- HUNG, P. et al. Sperm mitochondrial integrity is not required for hyperactivated motility, zona binding, or acrosome reaction in the rhesus macaque. **Biology of Reproduction**, v. 79, n. 2, p. 367–375, 2008.
- IBGE. **Censo demográfico 2010**. [Brasília], 2010.

KANTER, M. Thymoquinone reestablishes spermatogenesis after testicular injury caused by chronic toluene exposure in rats. **Toxicology and Industrial Health**, England, v. 27, n. 2, p. 155-166, mar. 2011.

KATUKAM, V. et al. Effect of benzene exposure on fertility of male workers employed in bulk drug industries. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers**, United States, v. 16, n. 6, p. 592-597, jun. 2012.

KOERICH, A. **Aprendizagem de máquina**. Paraná: [s.n.], 2012.

LENZI, A. et al. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. **Human Reproduction Update**, v.2, n.3, p.246-256, 1996.

LITOVITZ, T. L. et al. 1998 Annual Report of the American Association of Poison Control Centers Toxic Exposure Surveillance System. **The American Journal of Emergency Medicine**, v. 17, n. 5, p. 435-87, sep. 1999.

LOURENÇO, E. S. O. **Avaliação físico-química da remediação de solos contaminados por BTEX**. 2006. 118 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2006.

MAKHLUF, S. B. D. Loading magnetic nanoparticles into sperm cells does not affect their functionality. **Langmuir**, v. 22, n. 3, p. 9480–9482, 2006.

MARCHETTI, F. et al. Occupational exposure to benzene and chromosomal structural aberrations in the sperm of Chinese men. **Environmental Health Perspectives**, United States, v.120, n. 2, p. 229-234, feb. 2012.

MARTINO, J. M. **Elementos de inteligência artificial utilizados em jogos digitais: conceitos, objetivos e tendências**. Campinas: [s.n.], 2009.

MENKVELD, R. et al. Acrosomal morphology as a novel criterion for male fertility diagnosis: relation with acrosin activity, morphology (strict criteria), and fertilization *in vitro*. **Fertility and Sterility**, v. 65, n. 3, p.637-644, 1996.

MORO, A. M. et al. Early hematological and immunological alterations in gasoline station attendants exposed to benzene. **Environmental Research**, United States, v. 137, p. 349-356, feb. 2015.

MORRIS, B. L. et al. **Groundwater and its susceptibility to degradation: a global assessment of the problem and options for management**. Nairobi: United Nations Environment Program, 2003. (Early Warning and Assessment Report Series, RS. 03-3).

MUCELIN, A. C.; BELLINI, M. Lixo e impactos ambientais perceptíveis no ecossistema urbano. **Sociedade & Natureza**, Uberlândia, v. 20, n. 1, p. 111-124, jun. 2008.

MULTIGNER, L.; OLIVA, A. Variações seculares na qualidade dos espermatozoides: fato ou ficção científica? **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 2, p. 403-412, mar/abr. 2002.

NAKAI, N. et al. Oxidative DNA damage induced by toluene is involved in its male reproductive toxicity. **Free Radical Research**, England, v. 37, n. 1, p. 69-76, jan. 2003.

ODUM, E. P. **Ecologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.

OLIVEIRA, L. I.; LOUREIRO, C. O. Contaminação de aquíferos por combustíveis orgânicos em Belo Horizonte: avaliação preliminar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ÁGUAS SUBTERRÂNEAS, 10. **Anais...** São Paulo: ABAS, 1998.

ONO, A et al. Reproductive and developmental toxicity studies of toluene. II. Effects of inhalation exposure on fertility in rats. **J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.**, v. 15, n. 1, p. 9-20, 1996.

OTT, C. **Gestão pública e políticas urbanas para cidades sustentáveis: a ética da legislação no meio urbano aplicada às cidades com até 50.000 habitantes**. 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

PEREIRA, L. M. **Inteligência artificial: mito e ciência** . São Paulo: [s.n.], 2005.

PETRELLI, G.; MANTOVANI, A. Environmental risk factors and male fertility and reproduction. **Contraception**, United States, v. 65, n. 4, p. 297-300, apr. 2002.

POPE, C. E.; ZHANG, Y. Z.; DRESSER, B. L. A simple staining method for evaluating acrossomal status of cat spermatozoa. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 22, n. 1, p. 87-95, 1991.

PRANDI, et al. Gerenciamento das águas do Aquífero Caiuá na Gleba XV de Novembro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ÁGUAS SUBTERRÂNEAS, 12. Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: [s.n.], 2002. v.1.

PROMMER, H.; BARRY, D. A.; DAVIS, G. B. A one-dimensional reactive multi-component transport model for biodegradation of petroleum hydrocarbons. **Environmental Modelling & Software** : With Environment Data News, England, v. 14, p. 213-223, 1999.

REYNOL, F. **Pesquisa da Unicamp impulsiona campo da computação quântica** . São Paulo: [s.n.], 2010.

RIJSSELAERE, T. et al. New techniques for the assessment of canine sperm quality: a review. **Theriogenology**, v.64, n.3, p.706-719, 2005.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? **Reproduction of Domestic Animals**, v.38, n.4, p. 312-318, 2003.

RODRIGUEZ, J. A.; FAVARETTO, A. L. V. Sistema reprodutor. In: AIRES, M. M. (Ed.). **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 877-917.

RÖMMELT, H. et al. Benzene exposures caused by traffic in Munich public transportation systems between 1993 and 1997, **The Science of the Total Environment**, Netherlands, v. 241, n. 1-3, p. 197-203, oct. 1999.

RUIZ-PESINI, E. et al. Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities. **Clinical Chemistry**, v. 44, n. 8, p. 1616-1620, 1998.

RUSSELL, L. D. et al. Histological and histopathological evaluation of the testis. Clearwater: **Cache River Press**, 1990.

SANCHES, L. E. **Desengenharia: o passivo ambiental na desativação de empreendimentos industriais**. São Paulo: EDUSP, 2001.

SHIKLOMANOV, I. A.; RODDA, J. C. World Water Resources at the Beginning of the Twenty-First Century. Cambridge: **Cambridge University Press**, 2003.

SINGH, R. K.; BANSODE, F. W. Benzene-induced histopathological changes and germ cell population dynamics in testes of Sprague Dawleyrats. **Journal of Environmental Biology / Academy of Environmental Biology**, India, v. 32, n. 6, p. 687-694, nov. 2011.

SOKOL, R. Z. The hypothalamic – pituitary – gonadal axis as a target for toxicants. In: SIPES, G.; MCQUEEN, C. A.; GANDOLFI, A. J. (Eds.). **Comprehensive toxicology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1997. p. 87-98.

STAUSS, C. R.; VOTTA, T. J.; SUAREZ, S. S. Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of the hamster zona pellucida. **Biology of Reproduction**, v.53, n. 06, p.1280-1285, 1995.

TIBURTIUS, E. R. L. **Remediação de solos e águas contaminadas por compostos orgânicos voláteis (BTX), utilizando processos fenton e lavagens com biosurfactantes**. 2008. 179 p. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

TIBURTIUS, E. R. L.; PERALTA-ZAMORA, P.; LEAL, E. S. Contaminação de águas por BTXs e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 3, p. 441-446, 2004.

TIELEMANS, E. et al. Occupationally related exposures end reduced semen quality: a case-control study. **Fertility and Sterility**, v. 71, n. 4, p. 690-696, apr. 1999.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p.481-492, 2000.

XIAO, G.et al. Effect of benzene, toluene, xylene on the semen quality of exposed workers. **Chinese Medical Journal**, China, v. 112, n. 8, p. 709-712, 1999.

YAMADA, K. Influence of lacquer thinner and some organic solvents on reproductive and accessory reproductive organs in the male rat. **Biological & pharmaceutical bulletin**, Japan, v.16, n. 4, p. 425-427, apr. 1993.

ANEXOS

ANEXO A – PARECER FINAL

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PPG - Programa de Pesquisa de Pós-Graduação
PEIC - Programa Especial de Iniciação Científica

Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "EFEITOS DA EXPOSIÇÃO A MISTURA COMERCIAL DE GASOLINA/ETANOL SOBRE A FUNÇÃO REPRODUTIVA MASCULINA DE UM MODELO EXPERIMENTAL", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 3183 e tendo como participante(s) ANA PAULA ALVES FAVARETO (responsável), ANDRESSA AGATA FERNANDES TAMIAO (discente), KARINA MARTINS SILVA (discente), KATIA CRISTINA DE MELO TAVARES VIEIRA (discente), foi avaliado e APROVADO pelo COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) e COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

Este Projeto de Pesquisa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de Julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido APROVADO em reunião realizada em 18/05/2016.

Vigência do projeto: 05/2016 a 02/2018.

Espécie/Linhagem	Nº de Animais	Peso	Idade	Sexo	Origem
Rato wistar	32	300 gramas	75 dias	M	Biotério Central

Presidente Prudente, 2 de Junho de 2016.


 Prof. Dr. Jair Rodrigues Garcia Jr.
 Coordenador Científico da CPDI


 Prof. Ms. Adriana Falcão de Brito
 Coordenadora da CEUA - UNOESTE

ANEXO B - GUIA PARA AUTORES

Environmental Science and Pollution Research

Link: <http://www.springer.com/environment/journal/11356>