



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

**EXPOSIÇÃO EXPERIMENTAL AO FUNGICIDA AGRÍCOLA DIFENOCONAZOL E  
SEUS EFEITOS SOBRE A QUALIDADE ESPERMÁTICA**

**VIVIANE RIBAS PEREIRA**

Presidente Prudente - SP  
2018



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

**EXPOSIÇÃO EXPERIMENTAL AO FUNGICIDA AGRÍCOLA DIFENOCONAZOL E  
SEUS EFEITOS SOBRE A QUALIDADE ESPERMÁTICA**

**VIVIANE RIBAS PEREIRA**

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.

Orientadora:

Profa. Dra. Ana Paula Alves Favareto

Coorientadora:

Profa. Dra. Patrícia Alexandra Antunes

632.952  
P436e

Pereira, Viviane Ribas.

Exposição experimental ao fungicida agrícola difenoconazol e seus efeitos sobre a qualidade espermática / Viviane Ribas Pereira. -- Presidente Prudente, 2018.  
86 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. Difenoconazol. 2. Ratos. 3. Espermatozoide. 4. Espectroscopia Raman. 5. Aprendizado de máquina. I. Título.

**VIVIANE RIBAS PEREIRA**

**EXPOSIÇÃO EXPERIMENTAL AO FUNGICIDA AGRÍCOLA DIFENOCONAZOL E SEUS EFEITOS SOBRE A QUALIDADE ESPERMÁTICA**

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, 14 de maio de 2018.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Ana Paula Alves Favareto  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste  
Presidente Prudente-SP

---

Profa. Dra. Rebeca Delatore Simões  
Universidade Estadual Paulista – Unesp  
Tupã-SP

---

Prof. Dr. Edson Assunção Mareco  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste  
Presidente Prudente-SP

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico este trabalho a meu pai, Jair Ribas Rodrigues e minha mãe Angela Maria Pereira Ribas por todo amor, carinho, incentivo, auxílio e suporte necessário para a realização desse sonho.*

## **AGRADECIMENTOS**

*Agradeço a Deus por ter me dado saúde e sabedoria para superar todas as dificuldades para que esse trabalho fosse concluído.*

*Um agradecimento especial para meu pai, Jair Ribas Rodrigues e minha mãe Angela Maria Pereira Ribas por ser meu porto seguro, estarem sempre presentes me dando forças, me apoiando e me incentivando para seguir adiante em tudo que me proponho a fazer. A meu irmão Vitor Pereira Ribas por estar sempre ao meu lado e também no laboratório me ajudando.*

*Agradeço também a minha orientadora Ana Paula Alves Favareto e a co-orientadora Patrícia Alexandra Antunes, pelo carinho, atenção, por estarem sempre prontas para ensinar, pelo auxílio e todo suporte necessário no decorrer da pesquisa. Agradeço o professor Danillo por toda disposição e paciência para com este trabalho.*

*Agradeço a minha amiga e companheira Kátia por todo apoio e auxílio. Agradeço aos amigos Andressa, Karina, Thiele e Ludimila, que me ajudaram durante a execução desse trabalho e a todos os funcionários do Biotério de experimentação e dos laboratórios de química do bloco Q da Universidade do Oeste Paulista-UNOESTE e a própria instituição pelo auxílio. Ao funcionário Daniel e minha amiga Jaqueline Nascimento que estavam sempre prontos para me ajudar no que fosse preciso.*

*A todos os responsáveis pelo Laboratório de Filmes Finos e Espectroscopia Raman da UNESP e ao Prof. Carlos Constantino por disponibilizar o laboratório para o desenvolvimento da pesquisa.*

*A CAPES pela taxa concedida durante o período de estudos no programa.*

*Ao MMADRE por todo apoio e conhecimento adquirido. Aos professores, coordenadores, funcionários e colaboradores do programa.*

*Em suma, um muito obrigado a todos que me auxiliaram e me apoiaram nesta jornada.*

*“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”. (Isaac Newton)*

## RESUMO

### **Exposição experimental ao fungicida agrícola difenoconazol e seus efeitos sobre a qualidade espermática**

O difenoconazol, um fungicida do grupo dos triazóis, é amplamente utilizado durante o cultivo de maracujá, laranja, morango, mamão e em outras culturas. Sua intensa utilização traz preocupações ambientais e no âmbito da saúde pública, visto que, pode afetar a população através do consumo de alimentos contaminados. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da exposição ao difenoconazol sobre a qualidade espermática, de um modelo experimental. Para isso, foram utilizados ratos machos Wistar (45 dias) divididos em 4 grupos experimentais (n=10/grupo): controle e expostos a 5 (DA), 10 (DB) e 50 (DC) mg/kg/dia de difenoconazol, via gavagem por 30 dias consecutivos. Durante o período de exposição, os animais foram acompanhados em relação aos sinais clínicos de toxicidade, consumo de água e ração e peso corpóreo. Ao término deste período, os órgãos reprodutivos, fígado e rins foram coletados e pesados. Os espermatozoides foram submetidos à avaliação da motilidade, morfologia, vitalidade, integridade acrossomal e análise de Espectroscopia de Espalhamento Raman Amplificado em Superfície (SERS). O testículo e o epidídimo direito foram coletados para as contagens espermáticas. Para o teste de aprendizado de máquina foram utilizados quatro algoritmos de reconhecimento de padrões: *Artificial Neural Network* (ANN), *Bayes Classifier* (BAY), *K-Nearest Neighbors* (K-NN) e *Support Vector Machine* (SVM). 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  $p < 0,05$ . O peso corpóreo e dos órgãos reprodutivos, fígado e rins não sofreram alterações significativas após a exposição ao fungicida. A motilidade progressiva, a integridade da membrana acrossomal e a porcentagem de espermatozoides morfologicamente normais foram reduzidas nos grupos DB e DC em relação ao grupo controle. Já a vitalidade foi reduzida apenas no grupo DC. Além disso, os números de espermatozoides no testículo e no segmento cabeça/corpo do epidídimo e a produção diária de espermatozoides foram reduzidos nos três grupos expostos. As medidas de SERS mostraram alterações nas bandas dos espectros dos espermatozoides do grupo DC em relação ao controle. A análise computacional identificou a presença de um padrão para os grupos experimentais com boa classificação no teste SVM ( $\geq 80\%$  de acurácia). Assim, concluiu-se que a exposição de ratos Wistar a diferentes doses do fungicida difenoconazol pode reduzir a qualidade espermática, com reconhecível padrão de classificação de grupos de exposição.

**Palavras-chave:** Difenoconazol. Ratos. Espermatozoide. Espectroscopia Raman. Aprendizado de máquina.

## ABSTRACT

### Experimental exposure to the fungicide difenoconazole and its effects on sperm quality

Difenoconazole, a fungicide of the triazoles group, is widely used during the cultivation of passion fruit, orange, strawberry, papaya and other crops. Respiratory return and in the public health space, as it can affect the population through the consumption of contaminated food. Thus, the present study was evaluated as an experimental challenge on sperm quality, from an experimental model. For this, Wistar males (45 days) were divided into 4 experimental groups (n = 10 / group): control and exposed to 5 (DA), 10 (DB) and 50 (DC) mg / kg / day of difenoconazole, via gavage for 30 consecutive days. During the exposure period, the animals were followed for clinical signs of toxicity, water and feed intake and body weight. Throughout this period, the reproductive organs, liver and kidneys were collected and weighed. Spermatozoa were submitted to evaluation of motility, morphology, vitality, acrosome and Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS). The testis and epididymis were scaled for sperm counts. For the original network learning test, the Bayes classifier (BAY), K-Nearest Neighbors (K-NN) and Support Vector Machine (SVM). The results were compared by ANOVA with Tukey posterior test, and the Kruskal-Wallis test with Dunn a posteriori, considering  $p < 0.05$ . Body weight and reproductive organs, liver and culture are not altered during exposure to the fungicide. The progressive motility, the acrosomal membrane and the percentage of spermatozoa were the variables used in the variables DB and DC in relation to the joint control. Already vitality was only doubled in the DC group. In addition, sperm indices were not tested and were reduced in the three groups exposed. SERS measurements resulted in changes in the sperm bands of the DC group in relation to the control. The computational analysis identified the presence of a standard for the experimental groups with good classification in the SVM test ( $\geq 80\%$  accuracy). Thus, the exposure of Wistar rats to doses of the difenoconazole fungicide may be reduced by reducing the sperm quality, with the classification pattern of exposure groups.

**Keywords:** Difenoconazole. Rats. Sperm Raman spectroscopy. Machine learning.

## LISTA DE SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Ache	Acetilcolinesterase
ATP	Adenosina Trifosfato
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos
C	Controle
CL50	Concentração Letal média
CYP	Citocromo P450
DA	5mg/Kg/dia
DB	10mg/Kg/dia
DC	50mg/Kg/dia
DL50	Dose Letal Média
EPI	Equipamentos de Proteção Individual
IA	Ingrediente Ativo
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente
LMR	Limite Máximo de Resíduo
LOAEL	Nível do Menor Efeito Observado
NA	Não Autorizado
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDE	Produção Diária de Espermatozoides
PPA	Potencial de Periculosidade
SERS	Surface Enhanced Raman Scattering
SINDAG	Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola

## LISTA DE QUADRO

Quadro 1 -	Dados toxicológicos do difenoconazol.....	26
Quadro 2 -	Dinâmica/destino de agroquímicos no ambiente .....	28

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Consumo de agroquímicos (2000-2014).....	23
Figura 2 –	Municípios que compõem a Região do Pontado Paranapanema.....	24
Figura 3 -	Estrutura química do difenoconazol.....	26
Figura 4 -	Amostras de alimentos analisadas pela ANVISA.....	30
Figura 5 -	Casos de intoxicação por agroquímicos de uso agrícola por unidade federada em 2012.....	31
Figura 6 -	Diagrama de níveis de energia ilustrando a origem dos espalhamentos Raman e Rayleigh.....	36
Figura 7 -	Modos de vibrações moleculares .....	36
Figura 8 -	Espectro de Absorção no UV-vis da solução coloidal de Ag SERS ativo (A) e Imagem de Microscopia eletrônica de transmissão óptica de coloides de Ag SERS ativos (B) .....	38

## LISTA DE FIGURA DO ARTIGO

- Figura 1 - Peso corpóreo (A), consumo de água (B), consumo de ração (C) e ganho de peso (D) dos animais dos grupos controle e expostos ao difenoconazol.....68
- Figura 2 - Motilidade progressiva (A), motilidade sem progressão (B), imóveis (C) e Vitalidade espermática dos animais (D) dos grupos controle e expostos ao difenoconazol.....69
- Figura 3 - Espectros de Espalhamento Raman Amplificado em Superfície das amostras de espermatozoides de animais do grupo controle (A), espectros das amostras de espermatozoides de animais expostos ao difenoconazol (grupo DC) (B) e difenoconazol puro (C).....70
- Figura 4 - Efeito do treinamento sobre o desempenho de classificação por grupo de exposição.....71

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Classificação toxicológica.....	21
------------	---------------------------------	----

## LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

Tabela 1 -	Pesos dos órgãos dos ratos ao final do período de exposição.....	61
Tabela 2 -	Morfologia espermática e integridade do acrossoma.....	62
Tabela 3 -	Contagens espermática em testículo e epidídimo.....	63
Tabela 4-	Média das Intensidades relativas (IR) das principais bandas obtidas dos Espalhamento Raman Amplificado das amostras de espermatozoides de animais do grupo controles (A), espectros das amostras de espermatozoides de animais expostos ao difenoconazol (grupo DC) (B) e Difenconazol puro (C).....	64
Tabela 5 -	Matriz de Confusão.....	66

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>20</b>
<b>2.1</b>	<b>Meio Ambiente .....</b>	<b>20</b>
<b>2.2</b>	<b>Agroquímicos: conceito e característica.....</b>	<b>20</b>
<b>2.3</b>	<b>A utilização de agroquímicos .....</b>	<b>22</b>
<b>2.4</b>	<b>Contexto regional .....</b>	<b>24</b>
<b>2.5</b>	<b>Fungicida de estudo: Difenoconazol. ....</b>	<b>26</b>
<b>2.6</b>	<b>Impactos dos agroquímicos no meio ambiente e na saúde.....</b>	<b>27</b>
<b>2.7</b>	<b>Sistema reprodutor do rato.....</b>	<b>31</b>
<b>2.8</b>	<b>Agroquímicos no sistema reprodutor.....</b>	<b>33</b>
<b>2.9</b>	<b>Espectroscopias de Espalhamento Raman (ER) e Raman Amplificado em Superfície (SERS) .....</b>	<b>34</b>
<b>2.9.1</b>	<b>Técnica de SERS.....</b>	<b>37</b>
<b>2.10</b>	<b>Aprendizagem de máquina. ....</b>	<b>38</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>72</b>
<b>3</b>	<b>ARTIGO.....</b>	<b>40</b>
	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>43</b>
	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
	<b>Animais.....</b>	<b>45</b>
	<b>Delineamento experimental e tratamento.....</b>	<b>45</b>
	<b>Coleta de órgãos.....</b>	<b>46</b>
	<b>Análises espermáticas clássicas .....</b>	<b>46</b>
	<b>Análise espermática por Espectroscopia de Espalhamento Raman Amplificado em Superfície (SERS).....</b>	<b>47</b>
	<b>Algoritmos de classificação.....</b>	<b>48</b>
	<b>Análises estatísticas.....</b>	<b>49</b>
	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>49</b>
	<b>Toxicidade geral.....</b>	<b>49</b>
	<b>Análises espermáticas clássicas .....</b>	<b>50</b>
	<b>Análise espermática por Espectroscopia de Espalhamento Raman</b>	

<b>Amplificado em Superfície SERS .....</b>	<b>51</b>
<b>Algoritmos de classificação.....</b>	<b>51</b>
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>52</b>
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>56</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>56</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>84</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos líderes mundiais na produção e exportação de diversos produtos agropecuários. Neste sentido, o uso de agroquímicos é considerado imprescindível para o aumento da produtividade das áreas destinadas à agricultura visando, minimizar perdas e garantir alimentos em quantidade e qualidade, com a eliminação dos insetos-pragas (BRASIL, 2018).

O Pontal do Paranapanema, localizado no extremo oeste do Estado de São Paulo possui predominância de atividades agrônômicas variadas voltadas para a lavoura, o que evidencia a utilização de agroquímicos (SÃO PAULO, 2013). Segundo Silva, (2009) independente da forma de aplicação, cerca de 50% da dose total dos agroquímicos pode contaminar o solo, podendo ainda, serem transportados por processos de volatilização, lixiviação e escoamento superficial. A lixiviação é uma forma importante de contaminação do lençol freático, com transporte de contaminantes do solo pela água da chuva ou irrigação, com possível intoxicação de animais e seres humanos (SILVA, 2009). Além disso, a grande maioria dos agricultores, principalmente os pequenos, faz uso dessas substâncias, muitas vezes sem assistência técnica, em condições inseguras e insalubres de trabalho, sem proteção da saúde no nível individual e coletivo (OLIVEIRA, 2015).

O uso indiscriminado dos agroquímicos também pode acarretar a presença de resíduos acima dos níveis autorizados em alimentos, o que gera preocupação no âmbito da saúde pública e exige do governo, investimento e organização para implementar ações de controle para o uso destes compostos (ANVISA, 2016). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) conta com o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos (PARA) com o objetivo de estruturar, avaliar e garantir a qualidade dos alimentos em relação ao uso de agroquímicos e afins, visando prevenir intoxicações agudas ou crônicas (ANVISA, 2016).

No relatório mais recente de 2016, das 12.051 amostras de culturas coletadas e analisadas pela ANVISA, 38,3% apresentaram resíduos com concentrações iguais ou inferiores ao LMR (limite máximo de resíduo). No entanto, 19,7% dos resultados foram considerados insatisfatórios por apresentarem resíduos de produtos não autorizados, ou autorizados, mas em concentrações acima do LMR (ANVISA, 2016).

É importante ressaltar também, que os agroquímicos têm a capacidade de serem absorvidos pelas folhas e polpas dos vegetais. Sendo assim, procedimentos de lavagem e retirada de cascas e folhas externas das mesmas favorecem a redução dos resíduos, mas são incapazes de eliminar aqueles contidos em suas partes internas. A higienização dos alimentos com solução de hipoclorito de sódio diminui os riscos de microbiológicos, mas não elimina os resíduos de agroquímicos (ANVISA, 2016).

Dentre os agroquímicos utilizados na agricultura no Brasil, especialmente no Pontal do Paranapanema, estão os triazóis, altamente empregados no controle de doenças causadas por fungos, bactérias ou algas. Estes compostos são inibidores da desmetilação, etapa da síntese do ergosterol, um dos principais componentes da parede celular de fungos pertencentes ao grupo dos ascomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos (VIRGENS et al., 2015).

O difenoconazol (cis-trans-3-cloro-4-[4-metil-2(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil)-1,3-dioxolan-2-il] fenil 4-clorofenil éter) possui princípio ativo da classe fungicida, é recomendado e altamente utilizado no controle de doenças em culturas de alface, banana, morango, entre outras (WANG et al., 2012; SUN et al., 2015; VIRGENS et al., 2015 ). Apesar da ampla utilização agrícola, estudos toxicológicos com difenoconazol são escassos, especialmente sobre sistema reprodutor de modelos mamíferos. Os estudos encontrados até o momento abordam o impacto da exposição ao fungicida sobre a fertilidade feminina e viabilidade de desenvolvimento embrionário em modelos aquáticos, principalmente em peixes (HINFRAY et al., 2006; MU et al., 2013; MU et al., 2015; TENG et al., 2017ab).

Tem sido relatado que a exposição a fungicidas triazóis pode desencadear desregulação endócrina, com interferência na biossíntese de estrógenos, devido à inibição da atividade da aromatase (MONOD et al., 2004; TAXVIG et al., 2007; KJAERSTAD et al., 2010; TENG et al., 2017ab).

Considerando que a população em geral estaria exposta a estes compostos e aos seus potenciais efeitos sobre produção de hormônios sexuais, identificar possíveis prejuízos à qualidade espermática se torna fundamental.

Uma das ferramentas atuais mais promissoras para avaliação da qualidade espermática e caracterização química do DNA é a espectroscopia de espalhamento Raman (HUSER et al., 2009; MALLIDIS et al., 2011; SANCHEZ et al., 2012; HUANG et al., 2013; LANG et al., 2013; LI et al., 2014). Apesar desta técnica ser usada para

caracterização química de espermatozoides humanos, estudos do gameta masculino de outras espécies são escassos, especialmente de ratos. Amaral, et al (2018) realizaram um estudo de comparação por Espectroscopia de Espalhamento Raman das diferentes regiões dos espermatozoides (cabeça, peça intermediária e flagelo) de diferentes espécies (humano, camundongo, macaco e ouriço do mar). Os autores sugerem que não há diferenças significativas entre os espectros das espécies estudadas.

A aprendizagem de máquina (AM) é uma subárea da inteligência artificial que se utiliza de métodos capazes de “aprender” automaticamente, extraíndo padrões a partir de um conjunto de amostras de exemplo (COPPIN, 2010). A aplicação de algoritmos de aprendizado de máquina tem sido realizada de forma bem sucedida em pesquisa de diversas áreas da medicina e biologia (ALBUQUERQUE et al., 2016; ALBUQUERQUE et al., 2017; PEREIRA et al., 2016; PEREIRA et al., 2017; PEREIRA et al., 2018; TOMIAZZI et al., 2018).

Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da exposição ao fungicida difenoconazol sobre a qualidade espermática, utilizando como modelo experimental ratos Wistar. Para isto, utilizou-se métodos de avaliação clássica de qualidade espermática e a espectroscopia de Espalhamento Raman Amplificado em Superfície, a fim de determinar possíveis alterações em bandas da cabeça espermática. Para a verificação de padrões utilizou-se a técnica de aprendizagem de máquina, com o objetivo de avaliar o desempenho de algoritmos na classificação dos grupos de exposição ao difenoconazol.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Meio Ambiente**

O meio ambiente é formado por um conjunto de elementos bióticos e abióticos, formando um ecossistema interligado entre os organismos vivos e o ambiente físico, onde, os recursos naturais existentes se inter-relacionam. Essa teia de relações pode ser fortemente prejudicada em decorrência do mau uso dos recursos naturais e da poluição gerada pelo homem (ODUM, 2008).

A paisagem natural da terra vem sendo ameaçada no processo de desenvolvimento dos países, que muitas vezes, ocorre devido ao uso indiscriminado dos recursos naturais e da transformação do meio ambiente. Com isso, as mudanças climáticas e a degradação dos ecossistemas aumentam, prejudicando diretamente as populações mais vulneráveis e afetando a todos, no que diz respeito, aos recursos hídricos, segurança alimentar e energética (ZULAUF, 2000; BAIRD, 2006; GIONGO, 2015).

Esta problemática envolve ainda, a utilização em larga escala dos agroquímicos no processo de produção agrícola, utilizados para o aumento da produção e consumo do país. O uso destas substâncias causa modificações no ambiente, contamina as comunidades de seres vivos, e acumula nos segmentos bióticos e abióticos, além de gerarem efeitos indiretos em espécies não ligadas à produção agrícola (PERES; MOREIRA; DUBOIS, 2003). Desta forma, a contaminação dos recursos presentes no meio ambiente pelos agroquímicos traz uma grande preocupação com os possíveis danos à saúde, ao meio ambiente e fatores de alerta a toda população (GOMES; BARIZON, 2014).

### **2.2 Agroquímicos: conceito e características**

Os agroquímicos contribuem para o crescimento e melhor desenvolvimento da agricultura e seus produtos.

De acordo com a Lei nº 7.802 de 11 de julho de 1989, existem diferentes definições para agroquímicos. Mas de forma geral são considerados agroquímicos os produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, geralmente empregados na produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas,

nas pastagens, proteção de florestas tanto nativas quanto as implantadas, utilizados também em ambientes urbanos, hídricos e industriais, com a finalidade de alterar a composição da flora ou da fauna, tendo em vista a preservação destas da ação danosa de seres vivos considerados nocivos.

Os agroquímicos podem ser classificados de acordo com o modo de ação do ingrediente ativo no organismo alvo, estrutura química e efeitos nocivos à saúde humana (SAVOY, 2011). Também podem ser classificados segundo seu potencial tóxico, sendo fundamental para o conhecimento da toxicidade de um produto, os seus possíveis efeitos agudos. No Brasil, a classificação toxicológica está a cargo do Ministério da Saúde (OPAS/OMS, 1996) e apresentada na Tabela 1.

Tabela 1- Classificação toxicológica

GRUPOS	DL50 (mg/Kg)	DOSE CAPAZ DE MATAR UMA PESSOA ADULTA	CLASSIFICAÇÃO MS PRODUTO COMERCIAL	
<b>Extremamente Tóxico</b>	<5	1 Pitada/algumas gotas	Classe I	Faixa vermelha
<b>Altamente Tóxico</b>	5-50	Algumas gotas/uma colher de chá	Classe II	Faixa Amarela
<b>Medianamente Tóxico</b>	50-500	1 colher de chá/2 colheres de sopa	Classe III	Faixa Azul
<b>Pouco Tóxico</b>	500-5000	2 colheres de sopa – um copo	Classe IV	Faixa Verde
<b>Muito Pouco Tóxico</b>	>5000	Um copo – um litro		

Fonte: Adaptada. BNDES, 2006.

Os estudos necessários para a avaliação da toxicidade são: DL50 (Dose Letal) oral aguda; DL50 dérmica aguda; irritabilidade ocular; irritabilidade dérmica; sensibilização dérmica e CL50 (Concentração Letal Média) inalatória. (SILVA, 2011). Em cumprimento à legislação, todos os produtos devem apresentar em seus rótulos uma faixa que especifique sua classe toxicológica (OPAS/OMS, 1996).

A partir dos impactos causados pelos agroquímicos estabelece-se o Potencial de Periculosidade Ambiental (PPA) para todos os produtos técnicos e formulações existentes no mercado. De acordo com Stutzer e Guimarães (2003), para elaboração do PPA, a legislação ambiental requer estudos e testes das características físico-químicas, toxicidade de organismos não-alvo, determinação do comportamento ambiental, toxicidade para animais, incluindo potencial genotóxico, embriofetotóxico e carcinogênico. A partir destes dados, a classificação toxicológica é determinada.

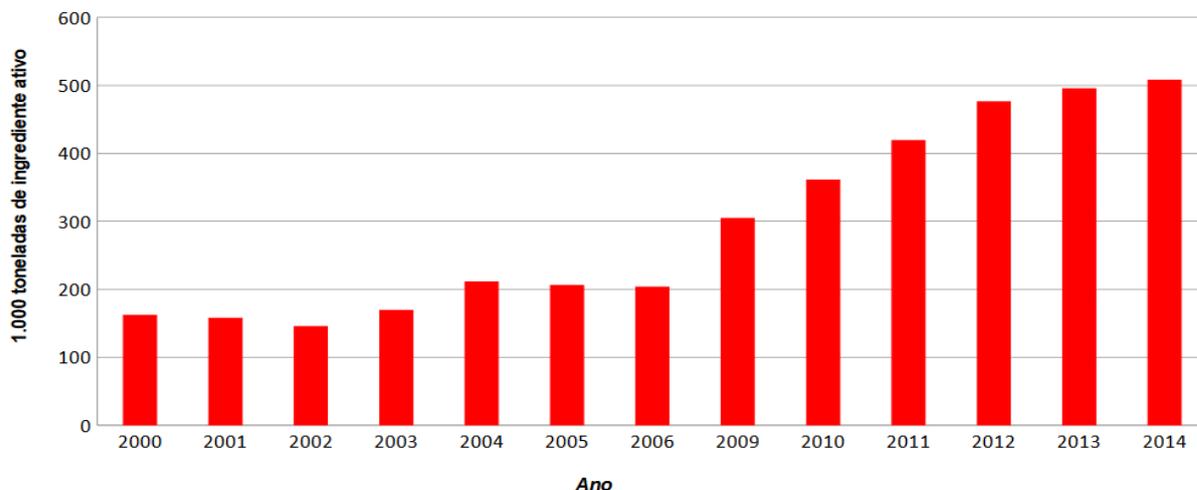
### 2.3 A utilização de agroquímicos

A utilização de agroquímicos surgiu com o objetivo de proteger a agricultura, evitando perdas no rendimento das colheitas, devido à presença de pragas nas culturas (STOPPELI; MAGALHÃES, 2005). O Brasil é considerado o maior consumidor de agroquímicos do mundo e um dos mais eficientes no uso desses defensivos agrícolas. Na safra agrícola de 2012 foram pulverizados, nos seus 95 milhões de hectares de lavouras, cerca de 1,05 bilhões de litros de herbicidas, inseticidas e fungicidas, principalmente nos cultivos de soja, milho, cana de açúcar, algodão, cítricos, café e hortaliças (CARNEIRO, 2012; SINDAG, 2012).

O Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola (SINDAG) destacou um aumento de 12,7% nas vendas de defensivos agrícolas em 2012 em relação ao ano anterior, atingindo 823.226 toneladas, o equivalente a US\$ 9,71 bilhões. Em relação aos fungicidas, o valor comercializado foi de US\$ 2,45 bilhões, o correspondente a 96.993 toneladas, sendo que seu principal destino, em valor, foi para a produção de soja (50%), seguido de café, feijão, milho, algodão, batata inglesa e culturas de inverno (BRASIL, 2013).

No período de 2012 a 2014 o uso de agroquímicos foi da ordem de 8,33 Kg por hectare. No entanto, nos estados do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás e São Paulo este número chega a 12 e 16 Kg por Hectare (BOMBARDI, 2017). No ano de 2014 foram vendidos 508.556,84 toneladas de agroquímicos no Brasil. O gradual aumento deste consumo pode ser observado na Figura 1.

Figura 1– Consumo de agroquímicos (2000-2014)



Fonte: IBAMA / Consolidação de dados fornecidos pelas empresas registrantes de produtos técnicos, agrotóxicos e afins, conforme art. 41 do Decreto nº4.074/2002.

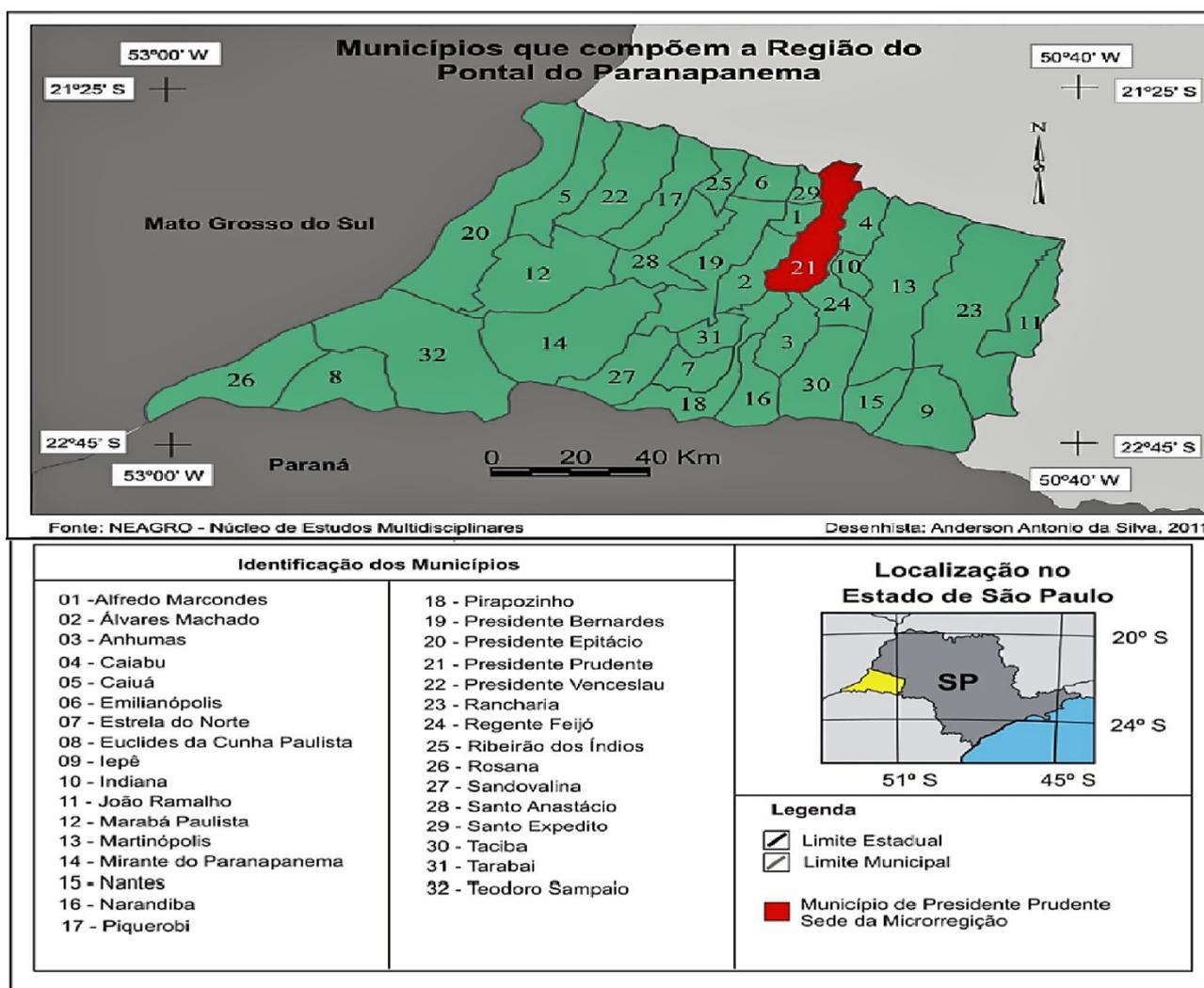
Segundo o Sindicato Nacional na Indústria de Produtos para Defesa Vegetal (SINDIVEG) as vendas gerais de agroquímicos no Brasil no ano de 2016 somaram mais de US\$ 9,6 bilhões. As principais classes de agroquímicos comercializados foram os herbicidas (33%), fungicidas (33%), inseticidas (29%), acaricidas (1%) e outras (4%). Dentre os estados que mais consumiram agroquímicos em 2016 está Mato Grosso (20,4%), São Paulo (14%), Paraná (13,6%), Rio Grande do Sul (13,2%), Goiás (9,6%) e demais estados. Além disso, as importações de fungicidas no país chegaram a mais de 94,1 mil quilos em 2016 (SINDIVEG, 2017).

O uso de fungicidas cresceu consideravelmente 32% desde a safra de 2014/2015. Em relação a safra de 2016/2017 houve um aumento de 38% no consumo de fungicidas nas áreas destinadas a soja. Essa expansão na demanda por fungicidas ganhou força com o aumento da resistência da ferrugem asiática. O estado que mais utilizou fungicidas no Brasil no ano de 2017 foi o Rio grande do Sul (55%), seguido pelo Mato Grosso do Sul (40%), Mato Grosso (39%), São Paulo (39%), Paraná (34%) e Goiás (33%) (SINDIVEG, 2017; ABRAPA, 2017).

## 2.4 Contexto regional

Situada no extremo oeste do estado de São Paulo, a região do Pontal do Paranapanema apresenta uma área de 18.441,60 Km<sup>2</sup>, que abrange um território rural composto por 32 municípios. De acordo com o último censo do IBGE de 2010 a população total do território era de 583.766 habitantes, dos quais 59.911 viviam na área rural, o que corresponde a 10,26% do total. Possuindo 12.349 agricultores familiares e 5.853 famílias assentadas (BARONE; MELAZZO; SILVA, 2011). A Figura 2 apresenta os municípios que compõem a região do Pontal do Paranapanema.

Figura 2- Municípios que compõem a Região do Pontal do Paranapanema



Fonte: BARONE; MELAZZO; SILVA, 2011.

A região apresenta uma grande concentração de assentamentos rurais, considerada a maior do Brasil. Possui atualmente 113 assentamentos espalhados em 14 dos 32 municípios que fazem parte da União dos Municípios do Pontal do Paranapanema (UNIPONTAL). Estes assentamentos possuem cerca de 12.500 agricultores familiares e cerca de seis mil famílias assentadas (VERGES, 2013).

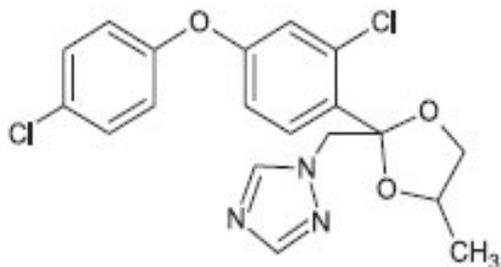
A região do Pontal do Paranapanema é composta de mata atlântica de interior ou estacional semi-decídua de planalto (BEDUSCHI-FILHO, 2002). A região apresenta em suas características agropecuárias uma grande incidência de cultivos agrícolas, destacando-se a cana-de-açúcar, que saltou de 92 mil hectares em 1995/96 para 403 mil hectares em 2007/08, correspondendo a 18% da área da região. Também são significativas as culturas do amendoim, mandioca, soja, eucalipto e seringueira.

Por se tratar de uma região com grandes atividades agrônômicas, a região do Pontal do Paranapanema está associada à ampla utilização de agroquímicos. Segundo Barreto (2013), as cidades de Euclides da Cunha Paulista; Marabá Paulista; Mirante do Paranapanema, Rosana, Sandovalina e Teodoro Sampaio apresentam maior predominância de atividades agrícolas e conseqüentemente há uma maior utilização e contato dos trabalhadores rurais com os agroquímicos.

## **2.5 Fungicida de estudo: Difenconazol**

Dentre os agroquímicos comercializados no Brasil, foi selecionado para o estudo o difenconazol (*cis-trans*-3-cloro-4-[4-metil-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil)-1,3-dioxolan-2-il]fenil 4-clorofenil eter) da classe dos fungicidas sistêmicos (HELENO et al., 2014). A estrutura química dos fungicidas triazólicos apresenta o anel 1,2,4-triazol que é um anel heterocíclico aromático contendo três átomos de nitrogênio dispostos nas posições 1, 2 e 4 de um anel de cinco membros, conectado ao restante hidrofóbico da molécula pela posição 1 (WU et al., 2001). A Figura 3 apresenta a estrutura química do difenconazol.

Figura 3 - Estrutura química do difenoconazol



Fonte: Heleno et al., 2014.

Por integrar o grupo químico triazol, o composto provoca o rompimento da parede celular, controlando dessa forma, o crescimento de diferentes classes de fungos (SYNGENTA, 2002). Os triazóis são fungicidas empregados no controle de doenças causadas por fungos, bactérias ou algas, por alguns desses compostos inibirem o crescimento dos fungos. Essas substâncias são inibidoras da desmetilação, etapa na síntese do ergosterol, um dos principais componentes da parede celular de fungos pertencentes ao grupo dos ascomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos (VIRGENS et al., 2015). Segundo sua classificação toxicológica, o ele pertence à classe dos extremamente tóxicos (classe I) e é indicado para aplicação foliar (pulverização) em diferentes culturas (HELENO et al., 2014).

Os compostos cujo coeficiente de partição octanol/água é alto e cuja solubilidade em água é baixa (natureza hidrofóbica) podem sofrer forte adsorção no solo ou sedimentos e, também, bioacumular-se em organismos aquáticos, como é o caso do difenoconazol (SILVA, 2009). O quadro 1 apresenta dados toxicológicos do difenoconazol.

Quadro 1- Dados toxicológicos do difenoconazol

<b>Dados toxicológicos</b>	
DL50 oral (ratos)	2.470 mg/Kg
DL50 dermal (ratos)	> 4.000 mg/Kg
DL50 inalação (ratos, 4 horas)	> 5.400 mg/m <sup>3</sup>
Irritação para olhos (coelhos)	Irritante
Irritação para pele (coelhos)	Não irritante

Fonte: Adaptada. SYNGENTA, 2002.

## 2.6 Impactos dos agroquímicos no meio ambiente e na saúde

Segundo Oliveira (2015), a problemática envolvida com a utilização de agroquímicos engloba desde o manuseio, aplicação até o destino final das embalagens. Para que se evite contaminações é essencial ter conhecimento das características da substância utilizada, da forma correta de utilização, além do uso de equipamentos de proteção individual (EPI). Também é fundamental que se obedecem às dosagens recomendadas pelo fabricante.

Apesar da produção agrícola convencional ter trazido resultados positivos importantes para a sociedade, à utilização intensiva de agroquímicos, leva à contaminação de alimentos, águas, ar, chuvas, trabalhadores, população do entorno e dos animais tanto na zona rural quanto urbana (OLIVEIRA, 2015).

As propriedades físico-químicas dos agroquímicos, bem como a quantidade e a frequência de uso, métodos de aplicação, características do ambiente e as condições meteorológicas determinam qual será o destino dessas substâncias no meio ambiente. Silva (2009) descreve o processo de adsorção que influencia diretamente os efeitos de biodegradabilidade, bioacumulação, e interação com a superfície das partículas da fase sólida do solo. O Quadro 2 apresenta processos de transferência e degradação que controlam a dinâmica e o destino dos agroquímicos no meio ambiente.

Quadro 2 – Dinâmica/destino de agroquímicos no ambiente

PROCESSO	CONSEQUÊNCIA	FATORES
<b>Transferência (processo que realoca a molécula sem alterar sua estrutura)</b>		
<b>Deriva física</b>	Movimento pela ação do vento	Velocidade do vento, tamanho das gotas
<b>Volatilização</b>	Perda por evaporação do solo, da planta ou do ecossistema aquático	Pressão de vapor, velocidade do vento, temperatura
<b>Adsorção</b>	Remoção pela interação com plantas, solo e sedimentos	Conteúdo mineral e matéria orgânica, tipo de mineral, umidade
<b>Absorção</b>	Absorção pelas raízes ou ingestão animal	Transporte pela membrana celular, tempo de contato, suscetibilidade
<b>Lixiviação</b>	Translocação lateral e vertical através do solo	Conteúdo de água, macro poros, textura do solo, quantidade de mineral e conteúdo de matéria orgânica
<b>Erosão</b>	Movimento pela ação da água ou do vento	Chuva, velocidade do vento, tamanho das partículas do mineral e da matéria orgânica com moléculas adsorvidas
<b>Degradação (processo que altera a estrutura química)</b>		
<b>Fotoquímica</b>	Quebra da molécula devido a adsorção de luz solar	Estrutura química, intensidade e duração da luz solar, exposição
<b>Microbiana</b>	Degradação microbiana	Fatores ambientais (pH, umidade, temperatura), condições de nutriente, conteúdo de matéria orgânica
<b>Química</b>	Alteração por processos químicos como hidrólise e reações de oxirredução	Alto ou baixo pH e fatores ambientais
<b>Metabolismo</b>	Transformação química após absorção pelas plantas e animais	Capacidade de ser absorvido, ser metabolizado e interagir com organismos

Fonte: Adaptada. PIERZYNSKI; SIMS; VANCE, 1994.

Os agroquímicos podem ainda, acumular-se ao longo da cadeia alimentar que leva a um fenômeno ecológico chamado de biomagnificação, que é o aumento das concentrações de uma determinada substância de acordo com o aumento do nível trófico (nível que um ser vivo ocupa na cadeia alimentar) (PERES; MOREIRA; DUBOIS, 2003).

Os alimentos, assim como a água e o solo, apresentam vestígios dos agroquímicos utilizados durante o processo de produção. Essa contaminação está diretamente relacionada com a dose de aplicação. Devido à contaminação esses alimentos quando ingeridos podem causar sérios danos à saúde (OLIVEIRA, 2015). Além disso, substâncias restritas a determinadas culturas são utilizadas indiscriminadamente em outras, conforme é evidenciado pelo PARA. Órgão

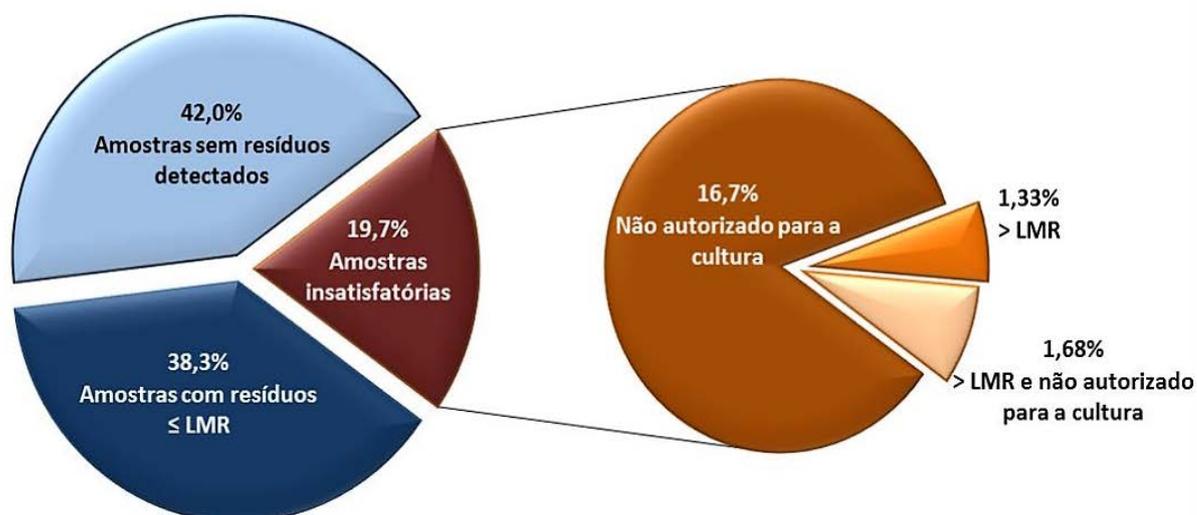
responsável por fiscalizar e monitorar os níveis de resíduos de agroquímicos nos alimentos que são comercializados no Brasil (ANVISA, 2016).

Entre 2001 e 2007, foram analisadas 7321 amostras dos alimentos *in natura*. As maiores irregularidades encontradas permitem concluir que o maior problema é o uso indiscriminado dos agroquímicos não autorizados para as culturas (ANVISA, 2008). No monitoramento de 2008 foi constatado o uso de substâncias organocloradas e resíduos de agroquímicos não autorizados, como o endossulfam em amostras de batata, mamão, morango, pimentão e uva, e o dicofol em pimentão (ANVISA, 2009). Todos estes compostos geram uma série de implicações na saúde humana.

Das 3.130 amostras analisadas pelo PARA no ano 2009, 29,0% foram consideradas insatisfatórias. As principais irregularidades encontradas nas amostras foram: a presença de agroquímicos em níveis acima do LMR representando 2,8%; agroquímicos não autorizados (NA) para a cultura 23,8% e, resíduos acima do LMR e NA na mesma amostra 2,4% do total. Em 2010 das 2.488 amostras analisadas 28% foram consideradas insatisfatórias e as principais irregularidades foram: a presença de agroquímicos em níveis acima do LMR 1,7%, agroquímicos NA 24,3% e resíduos acima do LMR e NA simultaneamente em 1,9 % do total de amostras (ANVISA, 2010; ANVISA, 2011).

Em 2012, verificou-se que entre as 1.397 amostras analisadas, 25% foram insatisfatórias. A presença de agroquímicos em níveis acima do LMR foi de 1,9 %; a constatação de agroquímicos (NA) para a cultura 21% e resíduos acima do LMR e NA simultaneamente 1,9 % do total (ANVISA, 2013). A Figura 4 apresenta a distribuição dos resíduos de agroquímicos encontrados nas 12.051 amostras de alimentos monitorados no período de 2013 a 2015.

Figura 4- Amostras de alimentos analisadas pela ANVISA no período de 2013-2015.



Fonte: Adaptada. ANVISA, 2016.

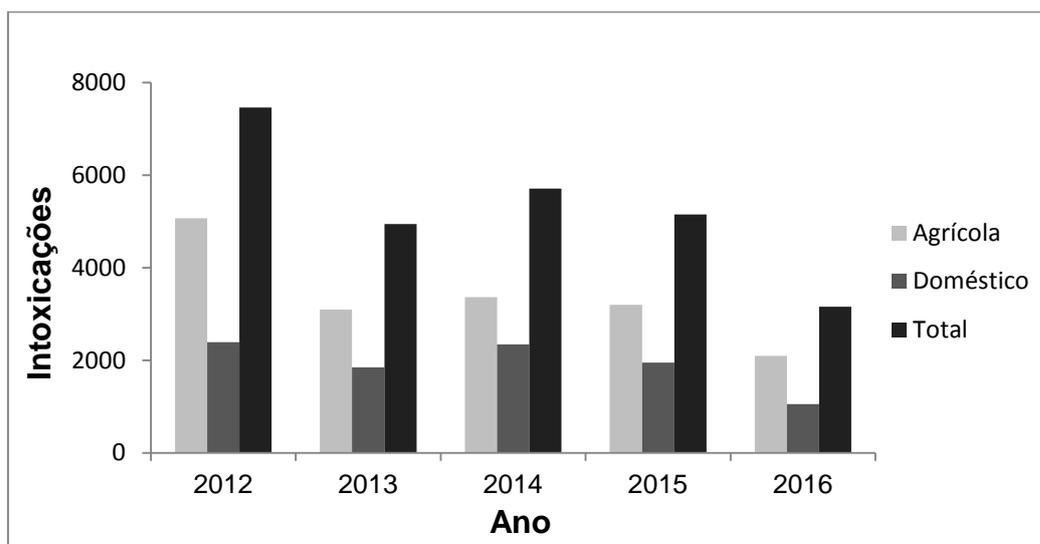
Observou-se que 9.680 das amostras (80,3%) foram consideradas satisfatórias quanto aos agroquímicos pesquisados, sendo que 42,0% não foram detectados resíduos e 38,3% apresentaram resíduos em concentrações iguais ou inferiores ao LMR. No entanto, dentre as 12.051 amostras analisadas, 2.371 (19,7%) foram consideradas insatisfatórias (ANVISA, 2016).

Se um resíduo do agroquímico é encontrado em um alimento em concentração igual ou inferior ao LMR, o alimento pode ser considerado seguro para a saúde do consumidor. No entanto, se um resíduo excede o LMR ou não é autorizado para a cultura, existe uma irregularidade podendo trazer risco à saúde humana (ANVISA, 2016). No histórico de monitoramentos realizado pela ANVISA podemos observar uma diminuição nas amostras consideradas insatisfatórias e naquelas onde há a presença de agroquímicos não autorizados para a cultura. No entanto, o risco ainda permanece, visto que, ainda se encontram esses problemas em quase 20% das amostras analisadas.

A utilização desses agroquímicos de forma inadequada e indiscriminada pode trazer sérios riscos à saúde da população. Numa série acumulada de 1989 a 2004 foram notificados no Brasil 1.055.897 casos de intoxicações humanas por agroquímicos e 6.632 óbitos (SINITOX, 2018). Somente em 2012, houve 4.656 casos de intoxicações no Brasil, em destaque a região Sudeste com 52,28% dos

casos. Vale ressaltar que a OMS indica que, para cada caso notificado de intoxicação por agroquímicos, existem 50 outros casos não notificados (SINITOX, 2018). A Figura 5 mostra a incidência de casos de intoxicações por agroquímicos de uso agrícola e doméstico no período de 2012 a 2016 no Brasil.

FIGURA 5 – Casos de intoxicação por agroquímicos de uso agrícola e doméstico no período de 2012 a 2016 no Brasil.



Fonte: Adaptada. SINITOX, 2018.

## 2.7 Sistema reprodutor do rato

A fase da puberdade de um rato ocorre entre os 40 e 50 dias de idade. Neste período já são encontradas as primeiras espermátides maduras no testículo e constatados espermatozoides na cauda do epidídimo (ROBB et al., 1978; ZANATO et al., 1994). Esse período é muito importante no desenvolvimento sexual dos animais, devido à ocorrência de uma série de eventos (hipotalâmico-hipofisário-gonadal) para o início do ciclo reprodutivo da espécie (OJEDA; URBANSKI, 1994).

O aparelho reprodutor masculino do rato é composto por testículos, epidídimos, ductos deferentes, glândulas acessórias (como próstata e vesícula seminal) e pênis. O testículo é o órgão responsável pela produção de espermatozoides e andrógenos (LIMA, 2013). São órgãos pares revestidos por uma espessa cápsula de tecido conjuntivo denso, a albugínea testicular. Histologicamente e funcionalmente são divididos em tecido intersticial e túbulos

seminíferos, responsáveis pela esteroidogênese e espermatogênese (RODRIGUEZ; FAVARETTO, 1999; FRANÇA; GODINHO, 2002).

O ciclo da espermatogênese de ratos dura aproximadamente 12 dias, e, é composto por 14 estágios. Uma espermatogônia precisa de 4,5 ciclos para formar um espermatozoide, ou seja, a espermatogênese completa de rato tem uma duração de 52 a 53,2 dias (depende da linhagem animal) (CLERMONT, 1972). Este processo é regulado pelo genótipo das células germinativas (FRANÇA; AVELAR; ALMEIDA, 2005).

Os espermatozoides saem dos testículos imóveis e incapazes de fertilizar um ovócito. Apenas adquirem motilidade e capacidade de fertilizar um ovócito após sua passagem pelo ducto epididimário (SHUM et al., 2009). O epidídimo é um órgão formado por um ducto único e enovelado que liga os ductos eferentes ao ducto deferente (HERMO; ROBAIRE, 2002). Pode ser dividido em três regiões principais: segmento inicial, cabeça, corpo e cauda (HERMO; ROBAIRE, 2002; FRANÇA; AVELAR; ALMEIDA, 2005; CORNWALL, 2009).

As regiões do epidídimo apresentam funções distintas. O segmento inicial está relacionado com a absorção de fluidos vindos do testículo, as regiões da cabeça e corpo estão envolvidas nos processos de maturação espermática, aquisição da motilidade progressiva e da capacidade de reconhecimento e fertilização do ovócito. A região da cauda está ligada ao armazenamento espermático e a fagocitose de espermatozoides anormais (ROBAIRE; VIGER, 1995; CORNWALL, 2009). Neste sentido, o epitélio epididimário é responsável por criar um microambiente altamente especializado responsável pelo transporte, maturação, estocagem e proteção espermática (ROBAIRE; VIGER, 1995; HERMO; ROBAIRE, 2002).

Os espermatozoides do rato possuem uma cabeça alongada em formato de gancho e podem ser divididos em cabeça e cauda. A cabeça contém o núcleo haploide, com cromatina altamente compactada e o acrossoma, uma estrutura de dupla parede situada entre a membrana plasmática e a porção anterior do núcleo (HAFEZ, 1970; ALBERTS et al., 2010).

A cauda do espermatozoide é formada por um longo flagelo, que pode ser dividido em de quatro segmentos: peça de ligação, peça intermediária, peça principal e terminal. A peça intermediária é composta por um grande número de mitocôndrias que possuindo a função de produzir a energia necessária para a

motilidade espermática. O axonema do flagelo se inicia na região da peça intermediária e se estende ao longo de toda a cauda. (GILBERT, 2003; ALBERTS, 2010).

As análises espermáticas permitem a avaliação de parâmetros morfofuncionais de espermatozoides que podem estar correlacionados com a fertilidade. Motilidade, morfologia, concentração espermática, vitalidade e integridade acrossomal são importantes parâmetros para avaliação da qualidade seminal e do potencial reprodutivo de machos (VERSTEGEN et al., 2002).

As anormalidades morfológicas são encontradas na cabeça, peça intermediária e na cauda dos espermatozoides. Os maiores defeitos incluem anormalidades na cabeça e peça intermediária, como a gota citoplasmática proximal e alterações individuais e os menores defeitos incluem cabeças de espermatozoides destacadas e gota citoplasmática distal (MENON et al., 2010).

## **2.8 Agroquímicos no sistema reprodutor**

Nos últimos anos houve uma crescente preocupação sobre contaminantes ambientais estarem alterando o sistema reprodutivo masculino. Estudos relatam que os agroquímicos podem afetar o sistema reprodutivo por vários mecanismos e vias. Do ponto de vista toxicológico, podem afetar a espermatogênese, levando a uma baixa qualidade do sêmen e a alterações morfológicas (FISCH et al., 1996; WISNIEWSKI, 2013).

Koifman e Hatagima (2003) afirmam que um grande número de agroquímicos apresenta atividade potencialmente capaz de desregular o equilíbrio endócrino de seres humanos e animais. A exposição a esses desreguladores endócrinos estaria associada a cânceres, a modificação na razão entre sexos ao nascimento, infertilidade, mal formações congênitas no trato genital masculino e a modificações na qualidade do sêmen.

Hinfray et al. (2006) relatam que alguns agroquímicos (clotrimazol, imazalil, prochloraz, fenbuconazole, propiconazole, difenoconazol, triadimenol, fenarimol) têm o potencial de interferir na biossíntese de estrogênios endógenos. Com base nos resultados obtidos, os autores sugerem ainda, que estes compostos podem afetar o desenvolvimento sexual e a reprodução de peixes.

Em aves, o epoxiconazol provocou a diminuição da produção de espermatozoides e alterações na morfologia de testículos (GROTE et al., 2008). A exposição de epoxiconazol durante a gravidez de ratas levou a alteração do desenvolvimento reprodutivo e a perdas fetais. A exposição à mistura dos fungicidas tebuconazol e epoxiconazol apresentaram desregulações endócrinas em diversos níveis (TAXVIG et al., 2007).

A administração oral de fluconazol (50 mg / kg de peso corporal em água destilada) diariamente durante um mês para coelhos machos sexualmente maduros induziu uma diminuição significativa na testosterona sérica, volume de sêmen, contagem e porcentagem de espermatozoides móveis (EL-MEDANY et al., 2002).

Segundo Abd-Alrahman et al. (2014) ratos albinos machos expostos ao fungicida difenoconazol e ao herbicida diclofope-metilo induziram alterações significativas nos diferentes parâmetros bioquímicos. O estudo também demonstrou claramente a inibição da atividade da acetilcolinesterase (AChE), sugerindo esta enzima como um bom indicador de intoxicação de eritrócitos por ambos os agroquímicos, além de, um aumento da peroxidação lipídica em ratos expostos ao diclofope-metilo e difenoconazol e sua mistura.

Em função disso, há a necessidade de estudos investigativos nesta área para entender melhor os mecanismos de toxicidade destes agroquímicos. Os testes *in vivo* em animais são essencialmente importantes para a detecção de substâncias desreguladoras do sistema endócrino devido a sua complexidade. Os resultados obtidos através desses testes permitem uma extrapolação para os seres humanos indicando os possíveis riscos da exposição da população a estas substâncias (KITA, 2004).

## **2.9 Espectroscopias de Espalhamento Raman (ER) e Raman Amplificado em Superfície (SERS)**

A espectroscopia molecular é uma ferramenta que vem sendo empregada em diferentes tipos de estudos (AOKI, 2013) e também crescentemente na área da biomedicina (MORRIS et al., 2002; HUSER et al., 2009; FENN et al., 2011; HUANG et al., 2011; MALLIDIS et al., 2011, CHEN, et al., 2015, AMARAL et al., 2018).

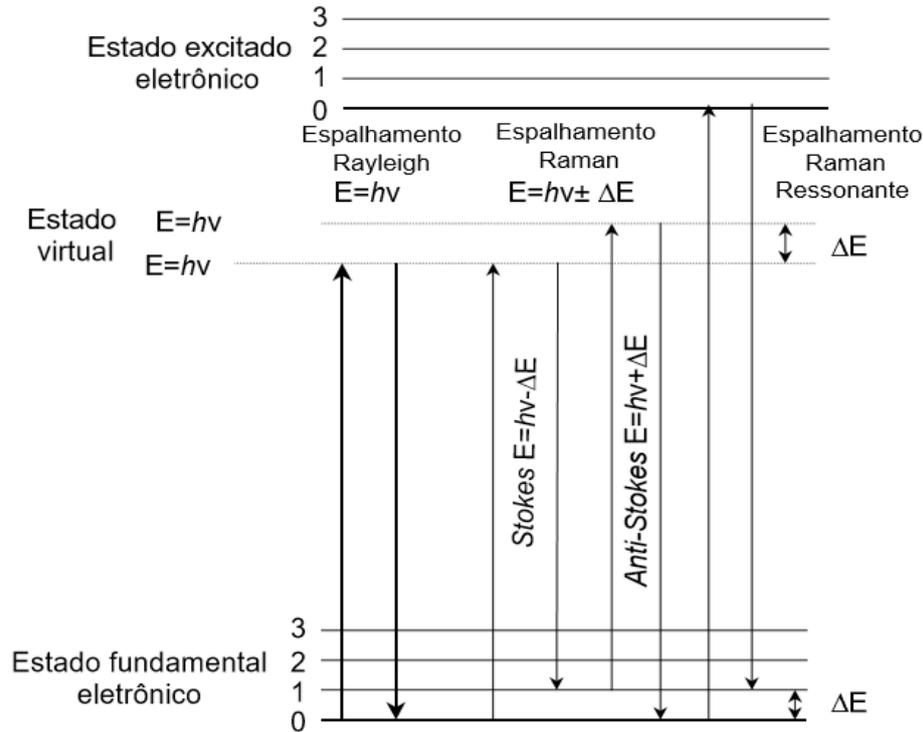
Esta técnica estuda a interação da matéria com a radiação eletromagnética e o resultado é a obtenção de um espectro da radiação eletromagnética por meio da energia da radiação eletromagnética absorvida, espalhada ou emitida pelas moléculas que interagem com a radiação incidente. No caso de moléculas, elas podem sofrer transição em níveis eletrônicos, vibracionais ou rotacionais. Essas técnicas são geralmente utilizadas para a obtenção de informações sobre níveis de energia, ligações químicas e estrutura molecular (SALA, 2008; OSTERBERG et al., 2014).

A Espectroscopia de Espalhamento Raman é uma técnica que utiliza uma fonte monocromática de luz, um feixe de radiação laser de baixa potência, que ilumina uma pequena área do objeto de estudo. Essa luz incidida sobre a área definida é espalhada em todas as direções, sendo em primeiro caso observado uma radiação elástica que não é de interesse. Em segundo caso a radiação é espalhada inelasticamente, ou seja, possui uma frequência ou comprimento de onda diferente da incidente (FARIA, 2011).

Laserna (1996), diz que a incidência da radiação eletromagnética produz uma perturbação dependente do tempo, a qual se manifesta por um estado virtual de energia. Assim, quando os estados estacionários final e inicial são os mesmos, o efeito da perturbação é chamado de espalhamento Rayleigh, onde as frequências das radiações incidente e espalhada são as mesmas. No entanto, quando se tem a frequência da radiação espalhada maior que a da radiação incidente, tem-se o espalhamento Raman anti-Stokes, resultado da transição da molécula para um estado vibracional de menor energia. Caso ocorra o inverso, ou seja, a frequência da radiação espalhada ser menor que a da radiação incidente, tem-se o chamado espalhamento Raman Stokes.

A probabilidade de ocorrência do espalhamento Raman Stokes é maior que para o espalhamento Raman anti-Stokes a temperatura ambiente, uma vez que ele se dá para as moléculas presentes no estado fundamental de energia. No caso do Raman anti-Stokes, o espalhamento só ocorre em moléculas que se encontrem no estado vibracional excitado, cuja ocorrência é menor que no estado vibracional fundamental em temperatura ambiente (LASERNA, 1996). A Figura 6 ilustra um diagrama de energia envolvendo os espalhamentos Raman (Stokes e o anti-Stokes) e Rayleigh.

Figura 6– Diagrama de níveis de energia ilustrando a origem dos espalhamentos Raman e Rayleigh

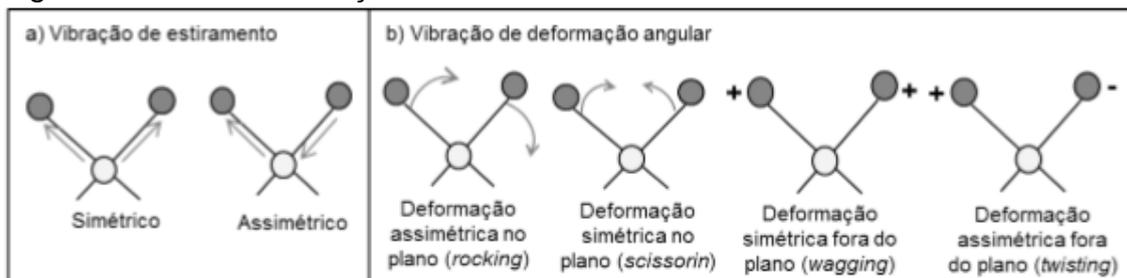


Fonte: LASERNA, 1996.

A diferença entre a radiação espalhada e a incidente corresponde à energia com que os átomos presentes na área estudada estão vibrando, tornando possível a obtenção de informações importantes sobre a composição e estrutura química das espécies (FARIA, 2011).

As vibrações que ocorrem em uma molécula são ocasionadas pela oscilação das posições relativas dos átomos, e elas podem ser classificadas nas categorias de estiramento (deformação axial) e deformação (deformação angular), conforme mostrado na Figura 7.

Figura 7 - Modo de vibrações moleculares



Fonte: HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009.

As variações nas frequências da radiação ocorrem em função das vibrações moleculares e são representadas pelo número de ondas ( $\text{cm}^{-1}$ ) e pela intensidade em número de fótons espalhados. As vibrações estão diretamente relacionadas as características da molécula, como as conformações moleculares, distribuição dos elétrons nas ligações químicas, tipo de ligação envolvida, entre outras propriedades físicas (OLIVEIRA, 2015).

No intuito de melhorar os diagnósticos de doenças a Espectroscopia de Espalhamento Raman vem sendo frequentemente empregada na área da biomedicina. Sua capacidade de detectar alterações de DNA/RNA, proteínas, lipídios, faz dela uma excelente ferramenta para quantificação de modificações à nível celular (FEN et al., 2011; MALLIDIS et al., 2013; D'AMICO et al., 2015; OLDENHOF et al., 2016).

Segundo HUANG et al. (2013) pode se distinguir espermatozoides normais de anormais, de modo que o diagnóstico não permite apenas a avaliação da qualidade (motilidade), mas também a seleção de espermatozoides de alta qualidade para uma futura fertilização in vitro.

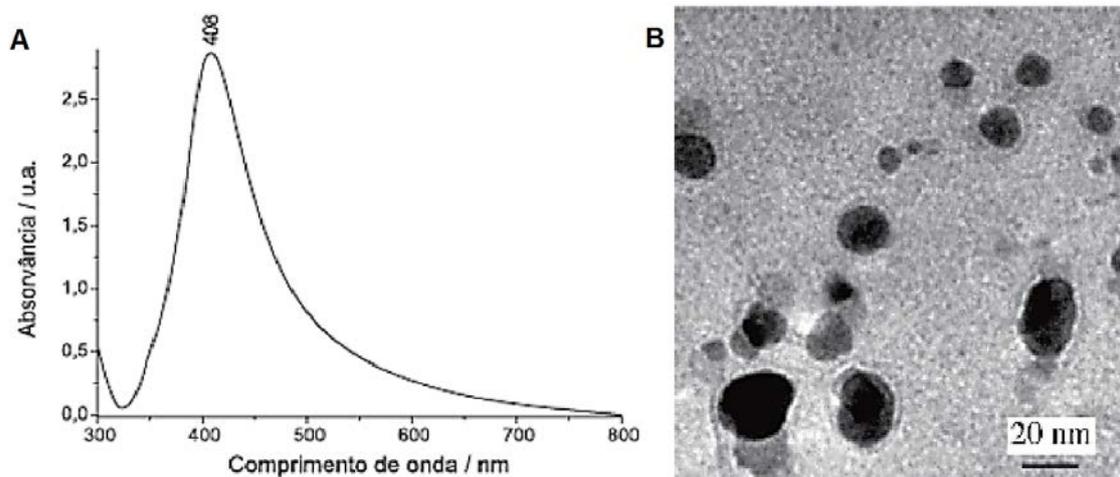
### **2.9.1 Técnica de SERS**

A utilização de superfícies metálicas nanoestruturadas tem como característica intensificar o sinal do Raman de moléculas adsorvidas na ordem de  $10^6$  vezes. Esse efeito é conhecido como SERS (Surface Enhanced Raman Scattering) (DE SANTANA et al., 2006).

Nesta técnica, diferentes metais (Ag, Al, Au e Cu principalmente) em diferentes formatos (ilhas metálicas, soluções coloidais, nanotubos) são utilizados afim de obter a maior amplificação de sinal (CONSTANTINO et al., 2002; TOLAIEB et al., 2004; VOLPATI et al., 2008, AOKI et al., 2010). Dentre os substratos ativos mais utilizados estão os coloides, devido a suas propriedades ópticas apresentam inúmeras vantagens: fácil preparação, sua superfície ativa pode ser facilmente renovada por meio de agitação, o tamanho e formato de suas partículas podem ser medidas e caracterizadas facilmente por absorção UV-Vis e há a possibilidade da preparação de filmes de coloides. Um exemplo é a solução de prata coloidal

preparada a partir de solução de  $\text{AgNO}_3$  (DE SANTANA et al., 2006). A Figura 8 apresenta o espectro de absorção de Uv-visível da solução coloidal de Ag e a imagem de microscopia eletrônica de transmissão ótica de coloides de Ag SERS ativo.

Figura 8 - Espectro de absorção de Uv-visível da solução coloidal de Ag SERS ativa (A) e a imagem de microscopia eletrônica de transmissão ótica de coloides de Ag SERS ativos (B)



Fonte: Adaptada, DE SANTANA (2006).

Segundo De Santana (2006), a aplicação da técnica de SERS possibilita uma maior aplicabilidade da espectroscopia vibracional de Espalhamento Raman para análises na ordem de nano, pico e fentograma devido a sua sensibilidade e seletividade. Uma técnica bastante promissora nas áreas médica e ambiental. A técnica também tem sido utilizada em diversos estudos biológicos como na determinação de drogas e componentes celulares em células vivas ou em membranas celulares (KNEIPP et al., 1997; FARIA, 2011; DE SANTANA, et al., 2006; OAKI, 2010).

## 2.10 Aprendizagem de Máquina

Aprendizagem de Máquina (AM) (ou *Machine Learning*) compreende uma área de sistemas inteligentes. Trata-se de uma subárea da Inteligência Artificial (IA) que se utiliza de métodos e do desenvolvimento de algoritmos que permitem que o

computador seja capaz de “aprender” automaticamente extraindo padrões a partir de um conjunto de amostras de exemplo (COPPIN, 2010; KOERICH, 2012). Os métodos de A M possuem uma ampla gama de aplicações para a resolução de problemas, principalmente em áreas nas quais se deseja extrair conhecimento de um conjunto de dados; como, por exemplo: diagnóstico médico, bioinformática, detecção de fraudes em cartões de crédito, previsões financeiras, classificação de sequência de DNA, sistemas biométricos, dentre outras (KOERICH, 2012).

As técnicas de aprendizado de máquinas empregam um princípio de inferência denominado indução, no qual se utilizam de um conjunto particular de exemplos (conjunto de treinamento ou amostras pré-classificadas) para extrair padrões destes exemplos. Nos casos que se utilizam do aprendizado supervisionado é fornecida uma referência do objetivo a ser alcançado, isto é, um treinamento. O treinamento consiste em um conjunto de exemplos com entradas e uma saída esperada. O algoritmo de aprendizado de máquina extrai o conhecimento necessário a partir desses exemplos. O objetivo é que a representação gerada seja capaz de produzir saídas corretas para novas entradas não apresentadas antes (PELLUCCI et al., 2011).

Para este fim, é comumente utilizado um conjunto de teste ou validação, cujas amostras estão rotuladas (COPPIN, 2010). Posteriormente o rótulo predito é comparado ao rótulo desejado, e caso o rótulo obtido seja igual ao rótulo verdadeiro da amostra, obtém-se um acerto; caso contrário, ocorre um erro de classificação. Assim, tornasse possível calcular o percentual de acertos do método de AM empregado, o qual será utilizado como uma métrica de acurácia (BEUREN, 2010). A matriz de confusão (ou tabela de contingência) também é utilizada como uma medida efetiva do modelo de classificação, ao mostrar o número de classificações corretas versus as classificações preditas para cada classe, sobre um conjunto de exemplos (PRATI, 2006).

### 3 ARTIGO

O presente estudo deu origem a um artigo científico intitulado “EXPOSIÇÃO EXPERIMENTAL AO FUNGICIDA AGRÍCOLA DIFENOCONAZOL E SEUS EFEITOS SOBRE A QUALIDADE ESPERMÁTICA” que será submetido para publicação no periódico *Environmental Science and Pollution Research*, Qualis A1 (Ciências Ambientais) – CAPES.

## **EXPOSIÇÃO EXPERIMENTAL AO FUNGICIDA AGRÍCOLA DIFENOCONAZOL E SEUS EFEITOS SOBRE A QUALIDADE ESPERMÁTICA**

Viviane Ribas Pereira<sup>1</sup>, Kátia Cristina de Melo Tavares Vieira<sup>1</sup>, Vitor Pereira Ribas<sup>2</sup>, Ludimila Mariele Lopes<sup>2</sup>, Danillo Roberto Pereira<sup>1,2</sup>, Patrícia Alexandra Antunes<sup>1,2</sup>, Ana Paula Alves Favareto<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup>Faculdade 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

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da exposição do fungicida difenoconazol sobre a qualidade espermática de ratos. Ratos Wistar (45 dias) foram divididos em quatro grupos experimentais: controle e expostos a 5 (DA), 10 (DB) e 50 mg/kg/dia (DC) de difenoconazol, durante 30 dias, via gavagem. Os espermatozoides foram submetidos à avaliação da motilidade, morfologia, vitalidade, integridade acrossomal e análises de Espectroscopia de Espalhamento Raman amplificado em Superfície (SERS). O testículo e o epidídimo direito foram coletados para as contagens espermáticas. Para o teste de aprendizado de máquina foram utilizados os algoritmos *Artificial Neural Network* (ANN), *Bayes Classifier* (BAY), *K-Nearest Neighbors* (K-NN) e *Support Vector Machine* (SVM). A motilidade progressiva, a integridade da membrana acrossomal e a porcentagem de espermatozoides morfologicamente normais foram reduzidas nos grupos DB e DC em relação ao grupo controle. Já a vitalidade foi reduzida apenas no grupo DC. Além disso, os números de espermatozoides no testículo e no segmento cabeça/corpo do epidídimo e a produção diária de espermatozoides foram reduzidos nos três grupos expostos. As medidas de SERS mostraram alterações nas bandas dos espectros dos espermatozóides do grupo DC em relação ao controle. A análise computacional identificou a presença de um padrão para os grupos experimentais com boa classificação no teste SVM ( $\geq 80\%$  de acurácia). Assim, concluiu-se que a exposição de ratos Wistar a diferentes doses do fungicida difenoconazol pode reduzir a qualidade espermática, com reconhecível padrão de classificação de grupos de exposição.

**Palavras-chave:** Difenoconazol, Triazóis, Rato, Espermatozoides, Fertilidade, Espectroscopia de espalhamento Raman Amplificado em Superfície, Aprendizado de máquina.

## INTRODUÇÃO

Os fungicidas triazóis são amplamente utilizados na agricultura para o controle e proteção de manchas foliares, ferrugem e oídio em frutas, vegetais, cereais e sementes, culminando no aumento da produtividade das lavouras (Reuveni e Sheglov 2002; Wang et al. 2012). Entre eles, destaca-se o difenoconazol (cis-trans-3-cloro-4-[4-metil-2(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil)-1,3-dioxolan-2-il] fenil 4-clorofenil éter), um fungicida sistêmico de amplo espectro, usado especialmente em culturas de arroz, tomate, morango (Wang et al. 2012; Sun et al. 2015).

O modo de ação dos triazóis afeta diretamente a permeabilidade da membrana das células fúngicas, através de alterações na biossíntese de lipídeos esteróides, com inibição de enzimas do citocromo P450 (CYP). Isto leva à interferência no crescimento do micélio, inibição da germinação por esporos e consequentemente do crescimento do fungo (Reuveni e Sheglov 2002; Goetz et al. 2006).

Estudos têm mostrado que esses fungicidas podem modular a expressão e a função de genes e enzimas CYP de mamíferos (El-medany et al. 2002; Goetz et al. 2006; Tully et al. 2006; Barton et al. 2006). Desta forma, seus resíduos podem levar a impactos sobre a saúde de organismos não-alvos, incluindo animais e seres humanos.

Segundo Sun et al. (2015), resíduos (0,039-0,096 mg / kg) de difenoconazol podem ser encontrados em morangos, mesmo após o período de 7 dias (intervalo de segurança). Outros estudos também identificaram a presença de resíduos de difenoconazol em arroz, maçãs, uvas e solo (Thom et al. 1997; Banerjee et al. 2008; Wang et al. 2012), além de águas superficiais próximo a regiões de cultivo de arroz (Satapornvanit et al. 2004;). Esses resíduos de agroquímicos prejudicam os sistemas aquáticos e podem contaminar os seres humanos através da cadeia alimentar, trazendo riscos à saúde (Satapornvanit et al. 2004; Latiff et al. 2010; Teló et al. 2015).

A exposição *in vivo* e *in vitro* ao difenoconazol e a outros triazóis pode apresentar potencial de desregulação endócrina (Monod et al. 2004; Taxvig et al. 2007; Kjaerstad et al. 2010; Teng et al. 2017ab). Estudos mostram que a ação estrogênica do difenoconazol pode afetar a homeostase dos hormônios esteróides sexuais, levando a alterações reprodutivas (Teng et al. 2017ab). No entanto, estudos

de toxicidade reprodutiva do difenoconazol e outros triazóis são escassos e geralmente conduzidos com espécies aquáticas e aves (Hinfray et al. 2006; Grote et al. 2008; Mu et al. 2013; Liang et al. 2015; Mu et al. 2015; Teng et al. 2017). Não foram encontrados na literatura, até o momento, estudos de toxicologia reprodutiva masculina do difenoconazol, usando o rato ou outro modelo experimental mamífero.

A exposição da população, por meio da ingestão de água e alimentos contaminados e a exposição ocupacional ao difenoconazol (El-medany et al. 2002; Grote et al. 2008; Sun et al. 2015), bem como seu potencial de desregulação endócrina (Monod et al. 2004; Taxvig et al. 2007; Kjaerstad et al. 2010; Teng et al. 2017ab) levam à necessidade de avaliação dos seus possíveis efeitos deletérios, especialmente sobre o sistema reprodutor.

Uma das ferramentas atuais mais promissoras para avaliação da qualidade espermática e caracterização química do DNA é a Espectroscopia de Espalhamento Raman (Mallidis et al. 2011; Sanchez et al. 2012; Huang et al. 2013; Lang et al. 2013; Li et al. 2014). Apesar desta técnica ser usada para caracterização química de espermatozoides humanos, estudos do gameta masculino de outras espécies são escassos, especialmente de ratos. Amaral et al. (2018) realizaram um estudo de comparação por Espectroscopia de Espalhamento Raman das diferentes regiões dos espermatozoides (cabeça, peça intermediária e flagelo) de diferentes espécies (humano, camundongo, macaco e ouriço do mar). Os autores sugerem que não há diferenças significativas entre os espectros das espécies estudadas.

A aprendizagem de máquina (AM) é uma subárea da inteligência artificial que se utiliza de métodos capazes de “aprender” automaticamente, extraíndo padrões a partir de um conjunto de amostras de exemplo (Coppin, 2010). A aplicação de algoritmos de aprendizado de máquina tem sido realizada de forma bem sucedida em pesquisa de diversas áreas da medicina e biologia (Albuquerque et al. 2016; Albuquerque et al. 2017; Pereira et al. 2016; Pereira et al. 2017; Pereira et al. 2018; Tomiazzi et al. 2018).

Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da exposição ao fungicida difenoconazol sobre a qualidade espermática, utilizando como modelo experimental ratos Wistar. Para isto, utilizou-se métodos de avaliação clássica de qualidade espermática e a Espectroscopia de Espalhamento Raman Amplificada em Superfície (SERS), a fim de determinar possíveis alterações em bandas da cabeça espermática. Para a verificação de padrões utilizou-se a técnica de aprendizado de

máquina, com o objetivo de avaliar o desempenho de algoritmos na classificação dos grupos de exposição ao difenoconazol.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Animais**

Foram utilizados 40 ratos machos (45 dias de idade e 200g de peso corpóreo) da linhagem Wistar e provenientes do Biotério Central da UNOESTE, Presidente Prudente. Durante o período experimental, os animais foram mantidos no Biotério de Experimentação do Campus II da UNOESTE, em gaiolas de prolipropileno (43 x 30 x 15 cm) com aparas de pinheiro de laboratório como cama, sob condições controladas de luminosidade (fotoperíodo 12L, 12D) e temperatura ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ), e receberam água filtrada e ração comercial para roedores. O protocolo experimental seguiu os Princípios Éticos em Pesquisa Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (Protocolo nº 3407-CEUA).

### **Delineamento experimental e exposição**

Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais (n=10/grupo): controle e expostos a 5 (DA), 10 (DB) e 50 (DC) mg/kg/dia de difenoconazol (SYNGENTA®, SCORE, Monthey, Suíça) diluído em água destilada, por 30 dias, via gavagem. A escolha das doses foi realizada de acordo com o estudo de Abd-Alrahman et al. (2014), considerando a LOAEL (menor dose onde se observa um efeito adverso) de 10mg/kg/dia e DL50 (dose letal mediana) oral para ratos de 2470 mg/Kg (Score, 2018).

Os animais do grupo controle receberam água destilada, no mesmo protocolo de exposição que os grupos expostos. Para avaliação da toxicidade geral, durante o período de exposição, os ratos foram pesados três vezes por semana e tiveram sua ingestão diária de ração estimada (g) e água (mililitro). Além disso, foram observados quanto ao aparecimento de sinais clínicos de toxicidade, (piloereção, alteração no padrão de deambulação no interior da gaiola, ocorrência de diarreia e vocalização) (Christian, 2001).

### **Coleta dos órgãos**

Ao final do período de exposição, os ratos de cada grupo experimental sofreram eutanásia com tiopental sódico (100 mg.kg<sup>-1</sup>), por administração intraperitoneal. O testículo, epidídimo e ducto deferente direito, a próstata ventral, a vesícula seminal (sem glândula coagulante e cheia de secreção), fígado e rins foram removidos e seus pesos foram determinados.

### **Análises espermáticas clássicas**

Após a eutanásia, o ducto deferente esquerdo foi coletado e as amostras espermáticas foram obtidas com a ajuda de uma seringa e agulha, por meio da lavagem interna com 1,0 mL de meio HTF modificado (*Human Tubal Fluid*; IrvineScientific, Santa Ana, CA, USA) a 34°C.

Uma pequena alíquota da solução espermática foi colocada em câmara de Neubauer para avaliação da motilidade. Para isso, 200 espermatozoides por animal (em duplicata) foram contados sob microscópio (Leica DMLS) em aumento de 200X e classificados em imóveis, móveis sem progressão e móveis com movimento progressivo.

Para a análise da vitalidade, uma pequena alíquota de solução espermática foi depositada sobre uma lâmina histológica, juntamente com solução eosina/nigrosina (1:1). Com o auxílio de outra lâmina foi realizado o esfregaço, que foi seco ao ar livre. Duzentos espermatozoides foram contados ao microscópio de luz, em aumento de 1000X, em óleo de imersão, e classificados como: não corados (íntacto, vivo) e com coloração vermelha (com membrana danificada). A vitalidade espermática foi definida como a contagem de células íntactas.

Para avaliação da integridade da membrana acrossomal, uma alíquota de 10ul da solução espermática foi adicionada a 45ul de uma solução de citrato de sódio 2,9%. A essa mistura foi adicionada a solução de coloração Pope (Pope; Zhang; Dresser 1991). Após o tempo de 1 minuto em temperatura ambiente, foram realizados os esfregaços em lâmina histológica. As lâminas foram deixadas secar a temperatura de 37° C. Duzentos espermatozoides foram contados em microscópio óptico, em objetiva de 100X, em óleo de imersão, e caracterizados em íntegros e não íntegros, conforme sua aparência. A não integridade da membrana acrossomal

foi identificada pela porção anterior da cabeça do espermatozoide levemente mais clara que a porção posterior.

O ducto deferente direito foi coletado e lavado internamente com 1,0 mL de solução formol salina 10%, com auxílio de uma seringa e agulha. Foram realizados esfregaços em lâminas histológicas, e deixadas secar ao ar livre. Duzentos espermatozoides por animal foram observados em microscópio em aumento de 400X (Seed et al. 1996). As anormalidades morfológicas encontradas foram classificadas em duas categorias: anormalidades da cabeça (sem curvatura característica, em forma de alfinete ou isolada); e anormalidades da cauda (enrolada, quebrada, dobrada e isolada) (Filler, 1993).

As contagens espermáticas foram realizadas utilizando-se os testículos e epidídimos direitos. Para isto, os testículos foram descapsulados e os segmentos cabeça/corpo e cauda do epidídimo foram separados. As espermátides testiculares resistentes à homogeneização (estágio 19 da espermiogênese) e os espermatozoides nos segmentos do epidídimo foram contados, como descrito por Robb; Amann e Killian (1978), com adaptações de Fernandes et al. (2007). Para calcular a produção diária espermática (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 espermático através do epidídimo foi determinado por divisão do número de espermatozoides em cada porção pela PDE.

### **Análise espermática por Espectroscopia de Espalhamento Raman Amplificado em Superfície (SERS)**

Para a realização das medidas de Espectroscopia de Espalhamento Raman foi preparada uma solução coloidal de nitrato de prata (Grabar et al. 1995; Aroca et al. 2005) e aplicada a todas as lâminas analisadas, a fim de obter a intensificação do sinal. Desta forma, a análise realizada foi de Espalhamento Raman Amplificado em Superfície (SERS). Os espectros foram obtidos a partir de lâminas com os espermatozoides obtidos do ducto deferente direito dos ratos dos grupos controle e exposto a 50 mg/Kg/dia de difenoconazol (DC). Além disso, também foram analisadas lâminas com o fungicida difenoconazol e apenas a lâmina de vidro recoberta com os coloides de Ag.

As análises foram obtidas por meio do espectrógrafo micro-Raman Renishaw modelo in-Via equipado com um microscópio Leica série DMLM para focar as amostras, detector CCD Peltier, e plataforma móvel (xyz). O espectrógrafo é equipado com lasers de Argônio e Hélio-Neônio com comprimentos de onda em 514, 633 e 780 nm, respectivamente, possui redes de difração com 1200 e 1800 linhas/mm, que permite resolução de  $4 \text{ cm}^{-1}$  e obtenção de espectros ponto-a-ponto com resolução espacial de  $1 \mu\text{m}^2$ . Todos os espectros foram obtidos em iguais condições: laser de 514 nm, tempo de exposição de 10 segundos e 1 acumulação, utilizando lente objetiva de 50x. Antes da obtenção dos espectros o laser foi calibrado com silício, banda  $520 \text{ cm}^{-1}$ .

A fim de comparar as mudanças espectrais, no mínimo 10 espectros foram obtidos para cada amostra de espermatozoide controle (n=5) e DC (n=6 animais). A média espectral foi obtida por meio do programa Microsoft Excell para Windows.

### **Algoritmos de classificação**

As análises de aprendizagem de máquina foram realizadas por intermédio de diferentes algoritmos de reconhecimento de padrões (*Artificial Neural Network* (ANN), *Bayes Classifier* (BAY), *K-Nearest Neighbors* (K-NN) e *Support Vector Machine* (SVM)), de modo a verificar a existência de padrões nos diferentes dados coletados. Para o reconhecimento de padrões foram utilizados os seguintes parâmetros: consumo de água e ração, peso corpóreo final, peso dos órgãos reprodutivos, fígado e rins, motilidade e morfologia espermática, integridade da membrana plasmática, integridade acrossomal 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). Os métodos de classificação utilizam 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 (C, DA, DB e DC rótulos anteriormente conhecidos por seus tipos de exposição). Para investigar a taxa de aprendizagem dos algoritmos e os conjuntos de dados, usamos cinco diferentes

tamanhos de conjunto de treinamento considerando 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90% da totalidade do conjunto de dados, o restante dos dados foi usado para o teste.

Para os experimentos computacionais, consideramos quatro classes (C, DA, DB, e DC). 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.

No intuito de manter a clareza e facilitar a discussão dos resultados, foi realizada 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**

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  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

### **Toxicidade geral**

Os animais dos diferentes grupos experimentais não apresentaram sinais clínicos de intoxicação durante o período de exposição. Apesar das diferenças observadas no consumo diário de água nos grupos DA em relação aos grupos DB e DC (Figura 1B) e ração nos grupos DB e DC em relação ao controle (Figura 1C), estas não comprometeram a evolução (Figura 1A) e o ganho de peso corpóreo (Figura 1D) dos animais. Além disso, os pesos dos órgãos reprodutores, fígado e rins não foram afetados pela exposição ao fungicida (Tabela 1).

### **Análises espermáticas clássicas**

A motilidade espermática foi alterada pela exposição ao difenoconazol de forma dose-dependente. A porcentagem de espermatozoides com motilidade progressiva foi significativamente reduzida ( $p < 0,05$ ) nos animais dos grupos DB e DC em relação ao grupo controle. Além disso, este parâmetro foi menor ( $p < 0,05$ ) no grupo DC em relação ao grupo DA (Figura 2A). Conseqüentemente, a porcentagem de espermatozoides móveis, mas sem progressão (Figura 2B) e de imóveis (Figura 2C) foram significativamente aumentadas ( $p < 0,05$ ) nos ratos dos grupos DB e DC em relação ao grupo controle. A porcentagem de espermatozoides sem progressão de movimento também foi maior ( $p < 0,05$ ) nos grupos DB e DC em relação ao controle.

A vitalidade foi reduzida ( $p < 0,05$ ) no grupo exposto à maior dose em relação aos animais do grupo controle (Figura 2D). Além disso, houve uma redução ( $p < 0,05$ ) da porcentagem de espermatozoides morfológicamente normais nos grupos DB e DC em relação ao grupo controle. Nestes grupos expostos às duas maiores doses, ocorreram alterações morfológicas na cabeça e no grupo de maior dose alterações na cauda espermática (Tabela 2).

A integridade da membrana acrossomal (Tabela 2) foi reduzida ( $p < 0,05$ ) nos grupos DB e DC em relação ao grupo controle. O número de espermatozoides no testículo e a produção diária espermática foram reduzidos ( $p < 0,05$ ) de forma dose-dependente, sendo que todos os grupos experimentais foram diferentes entre si (Tabela 3).

O número de espermatozoides por grama de testículo, a PDE relativa, os números absoluto e relativo de espermatozoide no segmento cabeça-corpo e o número relativo de espermatozoides na cauda do epidídimo foram reduzidos ( $p < 0,05$ ) nos três grupos expostos em relação ao grupo controle (Tabela 3). No entanto, o número absoluto de espermatozoides presentes na cauda epididimária e o tempo de trânsito nos diferentes segmentos do epidídimo não foram alterados ( $p > 0,05$ ) pela exposição ao difenoconazol (Tabela 3).

## **Análise espermática por Espectroscopia de Espalhamento Raman Amplificado em Superfície (SERS)**

A Figura 3 apresenta os Espectros de Espalhamento Raman Amplificado em Superfície das amostras de espermatozoides de animais do grupo controles (A), espectros das amostras de espermatozoides de animais expostos ao difenoconazol (grupo DC) (B) e difenoconazol puro (C). A Tabela 4 mostra as principais atribuições do difenoconazol de acordo com Huang et al. (2016), e dos espermatozoides de animais controle e expostos de acordo com Shivanoor e David (2015); Amaral et al. (2018).

As principais atribuições ocorreram entre 600 e 1800  $\text{cm}^{-1}$  e são associadas principalmente as bases nitrogenadas e grupo fosfato dos ácidos nucleicos (Chen et al. 2015; Shivanoor e David 2015; Amaral et al. 2018). O difenoconazol é caracterizado pela presença de grupos C-C, C=C, C-O, C-N, C-Cl, C-H e C=N, grupos caracterizados por bandas em 700, 810, 1011, 1092, 1138, 1165, 1200, 1363, 1447, 1586 e 1605  $\text{cm}^{-1}$  (Huang et al. 2016).

### **Algoritmos de classificação**

O teste *ANN* apresentou menor índice de acurácia entre os algoritmos avaliados. Os testes *BAY*, *KNN* e o *SVM* apresentaram bons valores de acurácia, sendo que o *SVM* foi o que apresentou melhores valores, usando diferentes porcentagens dos conjuntos de dados para o treinamento (Figura 4). Desta forma, este teste foi usado para a análise de matriz de confusão (Tabela 4).

Ao analisar a matriz de confusão com quatro classes, em 70% do conjunto de treinamento, verificou-se uma maior precisão nos resultados referentes à classe C (97% de acurácia). As classes DA e DC apresentaram acurácia com 80% de precisão e a classe DB obteve 83% (Tabela 5). Os resultados indicam que a análise computacional conseguiu identificar as diferenças dos parâmetros avaliados entre estas classes com êxito a partir de 70% e definir um padrão para os dados coletados, ressaltando as diferenças entre os grupos de exposição ao difenoconazol.

## DISCUSSÃO

Apesar da preocupação sobre os potenciais riscos à saúde, causados pela exposição ao fungicida difenoconazol, à maioria dos estudos de toxicologia reprodutiva abordam os seus efeitos sobre a fertilidade feminina e viabilidade de desenvolvimento embrionário em modelos aquáticos. Não foram encontrados, até o momento, estudos sobre os possíveis efeitos da exposição a este fungicida sobre o sistema reprodutor masculino em modelo experimental mamífero.

No presente estudo, não foram observados sinais clínicos de toxicidade geral durante o período de exposição dos animais a diferentes doses do fungicida difenoconazol. Este resultado concorda com estudo de Costa et al. (2015) que avaliou os efeitos da exposição aguda ao triazol propiconazol em ratos nas concentrações de 4 e 20 mg/Kg.

A avaliação da evolução do peso corpóreo, bem como do estado nutricional, é extremamente importante para obtenção de informações sobre a saúde geral de animais expostos a xenobióticos. Estes dados levam a melhor interpretação de possíveis impactos diretos ou indiretos causados ao sistema reprodutor (Clegg et al. 2001). No presente estudo, a exposição a diferentes doses de difenoconazol não afetou o peso corpóreo dos animais, concordando com estudos de exposição a fungicidas triazóis de Tully et al. (2006) e Costa et al. (2015). Este resultado indica que os efeitos reprodutivos causados pelo difenoconazol estão relacionados à ação direta do composto.

Apesar do consumo de ração e água ter sido menor em alguns dias, nos grupos expostos às duas maiores doses de difenoconazol, estas diferenças não permaneceram até o final do período de exposição. Goetz et al. (2006) não observaram diferenças significativas no consumo de ração, após a exposição oral de ratos aos fungicidas miclobutanil e propiconazol (100 e 500 ppm), do período gestacional até o dia 120 pós-natal (PND). No entanto, os ratos expostos a 2000 ppm de miclobutanil tiveram uma taxa de consumo de alimento reduzida durante a primeira e segunda semanas de lactação. Enquanto isso, os animais expostos ao triadimefon (1800 ppm) tiveram uma taxa de consumo de alimento reduzida a partir da primeira semana de exposição (Goetz et al. 2006).

Os pesos dos órgãos reprodutivos, fígado e rins também não foram afetados pela exposição ao fungicida. No entanto, Costa et al. (2015) relataram aumento na

vesícula seminal (cheia e vazia) e dos ductos deferentes em ratos expostos a 4 mg/Kg de propiconazol.

Os parâmetros espermáticos analisados no presente estudo demonstraram que o fungicida difenoconazol é capaz de alterar a qualidade espermática. A motilidade progressiva foi significativamente reduzida (DA= 10,94%, DB= 18,44% e DC= 26,88%) em relação ao grupo controle. Consequentemente a porcentagem de espermatozoides móveis, mas sem progressão e imóveis foram aumentadas. Esta alteração observada corrobora com estudo de Tully et al. (2006), que relatou um declínio significativo de 9,61% na motilidade espermática geral nos animais expostos ao miclobutanil, quando comparado ao grupo de animais controle. No entanto, segundo estes autores os ratos expostos ao fungicida triadimefon tiveram uma redução numérica na motilidade espermática, mas não significativa. El-Medany et al. (2002) relataram uma diminuição significativa no volume de sêmen, contagem e porcentagem de espermatozoides móveis após a exposição oral de fluconazol (50 mg / kg) em coelhos adultos durante um período de 30 dias consecutivos.

A capacidade de fertilização de um espermatozoide está diretamente ligada a sua motilidade e ao fato de possuir uma membrana plasmática intacta (vitalidade) (Khaki et al. 2014). Por isso a maioria dos ensaios de viabilidade espermática avalia se a membrana plasmática está intacta ou não (Hossain et al. 2011). No presente estudo, foi observada uma diminuição significativa na vitalidade espermática nos grupos DB= 4,62% e DC= 8,42%.

A porcentagem de espermatozoides morfolologicamente normais apresentou redução de DA= 4,15%, DB= 4,41% e DC= 5,71% em relação aos ratos do grupo controle. Estas alterações observadas corroboram com Tully et al. (2006), que relataram um declínio de 3,55% na porcentagem de espermatozoides morfolologicamente normais após a exposição de ratos ao fluconazol. Costa et al. (2015) também relataram um aumento de anormalidades de cauda em ratos expostos ao composto propiconazol (4mg/Kg/dia). Segundo Goetz et al. (2006) ratos expostos aos fungicidas miclobutanil e triadimefon tiveram sua fertilidade reduzida, mas a morfologia e motilidade espermática não foram significativamente alteradas.

Os animais expostos ao fungicida difenoconazol apresentaram uma redução significativa na integridade da membrana acrossomal nos grupos (DB = 4,06% e DC = 9,28%) em relação ao controle. Essa diminuição no número de espermatozoides

com membrana acrossomal íntegra, assim como, anormalidades morfológicas ou no tamanho do acrossoma, pode diminuir a capacidade do espermatozoide de se ligar a zona pelúcida, comprometendo o processo de fertilização (Menkveld et al. 1996; Garrett; Liu e Baker 1997).

O número de espermatozoides por grama de testículo, a PDE relativa, os números absoluto e relativo de espermatozoide no segmento cabeça-corpo foram significativamente reduzidos. O número relativo de espermatozoides na cauda do epidídimo também foi reduzido significativamente (DA= 10,62%, DB= 17,72% e DC= 13,39%) nos animais expostos ao fungicida difenoconazol. O mesmo não foi relatado por Costa et al. (2015) após a exposição de ratos Wistar ao fungicida propiconazol (4 e 20 mg/Kg).

Foram realizadas medidas de SERS na cabeça do espermatozoide. Pelas medidas de SERS é possível observar que há diferença nas intensidades relativas das bandas entre as amostras controle e exposta. As alterações são evidenciadas pela variação na intensidade relativa e pequenos deslocamentos das bandas 675, 682, 992, 1051, 1074, 1203, 1209, 1357, 1363, 1364, 1389, 1404, 1443, 1447, 1448, 1483 e 1500-1576  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas a estiramento do  $\text{PO}_2^{-2}$ , deformação da adenina, deformação de  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$  de colágenos, lipídeos e carboidratos ou deformações de bases nitrogenadas, deformação de  $\text{-C=C}$  de fenilalanina, deformações de citosina e tirosina e, deformações de  $\text{-C=C}$  de lipídeos e amidas ou das bases nitrogenadas adenina, timina, guanina e citosina do DNA espermático (Huser et al. 2009; Chen et al. 2015; Huang et al. 2013; Talari et al. 2015; Amaral et al. 2018).

A maioria dos estudos já realizados também se concentra na região da cabeça espermática. As bandas aproximadas 728, 782, 1004, 1062, 1094, 1180, 1373, 1420, 1483, 1509 e 1576  $\text{cm}^{-1}$  são comuns em várias espécies (humano, macaco, camundongo, bovino e ouriço-do-mar) e atribuídas principalmente ao DNA. As bases nitrogenadas são atribuídas às bandas aproximadas 1180, 1483, 1509, e 1576  $\text{cm}^{-1}$ , enquanto o grupo fosfato é atribuído à 1062 e 1094  $\text{cm}^{-1}$  (Huser et al. 2009; Mallidis et al. 2011; Lang et al. 2013; Liu et al. 2013; Huang et al. 2014; Talari et al. 2015; Amaral et al. 2018). Além do DNA, algumas bandas também são atribuídas a proteína e lipídios como é o caso das bandas aproximadas 1373, 1420 e 1483 (Huser et al. 2009; Liu et al. 2013; Huang et al. 2014; Li et al 2014; Talari et al. 2015; Amaral et al. 2018).

Diferenças nos espectros da cabeça de espermatozoides humanos expostos *in vitro* a ácido maleico (Li et al. 2014) e de espermatozoides de indivíduos com infecção no trato urinário por *Escherichia coli* (Lang et al. (2013) também têm sido relatadas. Shivanoor e David (2015) avaliaram os efeitos da exposição de ratos a cianetos e observaram alterações nas principais bandas do grupo fosfato e das bases nitrogenadas que caracterizam o DNA espermático, por meio da Espectroscopia Vibracional de Absorção da Região do Infravermelho (FT-IR). As alterações espectrais observadas após a exposição ao difenoconazol corroboram estes estudos.

No presente estudo, foi utilizado o reconhecimento de padrões, uma das funcionalidades mais importantes da inteligência artificial (Papa et al. 2012). Vários estudos (Patel et al. 2009; Al-Shayea e Al-Shayea 2014; Albuquerque et al. 2016; Pereira et al. 2016; Yilmaz, et al. 2016; Albuquerque et al. 2017; Pereira et al. 2017; Pereira et al. 2018; Tomiazzi et al. 2018;) tem demonstrado a eficiência do procedimento de classificação por algoritmos na área médica e biológica.

Os algoritmos foram usados como ferramenta para identificar um padrão nas alterações reprodutivas observadas para cada grupo experimental. Foi identificado um padrão na distribuição das alterações entre os grupos a partir de 70% da fração de conjunto de dados, confirmando a diferença significativa entre os grupos experimentais. O teste SVM foi o teste mais eficiente para identificação da presença de padrão (acurácia  $\geq 80\%$ ), corroborando com o estudo de Tomiazzi et al. (2018). Este classificador foi eficiente na identificação de um padrão, mesmo quando treinado em um conjunto de dados (número amostral) relativamente pequeno.

## **CONCLUSÃO**

A exposição de ratos machos a partir da puberdade a diferentes doses do fungicida difenoconazol levou a alterações funcionais em vários parâmetros espermáticos e na produção de espermatozoides. Desta forma, os resultados indicam que o difenoconazol pode reduzir a qualidade espermática, com possível impacto sobre a fertilidade. As medidas de SERS indicam que a exposição dos espermatozoides ao difenoconazol sofrem influências gerando mudanças químicas em suas estruturas. Além disso, o uso de aprendizagem de máquina mostrou-se eficiente no reconhecimento de padrões e diferenciação dos animais não expostos e expostos as diferentes doses do fungicida difenoconazol.

## AGRADECIMENTOS

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

## REFERENCIAS

Abd-Alrahman SH, Elhalwagy MEA, Kotb GA, et al (2014) Exposure to difenoconazole, diclofop-methyl alone and combination alters oxidative stress and biochemical parameters in albino rats. *Int J Clin Exp Med* 7:3637–3646.

Albuquerque VHC, Nunes TM, Pereira DR, et al (2016) Robust automated cardiac arrhythmia detection in ECG beat signals. *Neural Comput Appl* 29:679-693.

Albuquerque VHC, Papa J, Pereira DR (2017) Automatic identification of epileptic EEG signals through binary magnetic optimization algorithms. *Neural Comput Appl* 1:1-13.

Al-Shayea QK, Al-Shayea TK (2014) Customer Behavior on RFMT Model Using Neural Networks. *Proceedings of the World Congress on Engineering* 1:1-4.

Amaral S, et al (2018) Raman micro-espectroscopy abalysis of diferente sperm regions: a species comparison. *Molecular Human Reproction* 24:185-202.

Aroca RF, Alvarez-Puebla RA, Pieczonka N, et al (2005) Surface-enhanced Raman Scattering em colloidal nanostructures. *Advances in Colloid and Interface Science* 116:45–6146.

Barton HA, Tang J, Sey YM, et al (2006) Metabolism of myclobutanil and triadimefon by human and rat cytochrome P450 enzymes and liver microsomes. *Xenobiotica* 36:793–806.

Banerjee K, Oulkar DP, Patil SH, et al (2008) Degradation kinetics and safety evaluation of tetraconazole and difenoconazole residues in grape. *Pest Manag Sci* 64:283–289.

Christian MS (2001) Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. In: Hayes, W. *Method of toxicology*. Philadelphia: Taylor & Francis 29:1301-1381.

Clegg ED, Perreault SD, Klinefelter GR (2001) Assessment of Male Reproductive Toxicology. In:Wallace H. (Ed). *Principles and Methods of Toxicology*. Philadelphia: Taylor & Francis 4:1263-99.

Constantino CJL, Lemma T, Antunes PA, et al (2003) Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering: Single Molecule Detection in a Langmuir-Blodgett Monolayer. *Applied Spectroscopy* 57:649-654.

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

Costa NO, Vieira ML, Sgarioni VP (2015) Evaluation of the reproductive toxicity of fungicide prpiconazole in male rats. *Toxicology* 335:55-61.

El-Medany AH, Hagar HH (2002) Effect of fluconazole on the fertility of male rabbits. *Arzneimittel-Forschung/Drug Res* 52:636-640.

Fernandes GSA, Arena AC, Fernandez CDB, et al (2007) Reproductive effects in male rats exposed to diuron. *Reprod Toxicol* 23:106-112.

Filler, R. (1993). Methods for evaluation of rat epididymal sperm morphology. In R.E. Chapin, J.H. Heindel (ed.). *Methods in toxicology: Male reproductive toxicology*. San Diego CA: Academic Press, pp 334-343.

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

Goetz AK, Ren H, Schmid JE, et al (2006) Disruption of testosterone homeostasis as a mode of action for the reproductive toxicity of triazole fungicides in the male rat. *Toxicol Sci* 95:227-239.

Grabar KC, Freeman RG, Hommer MB, et al (1995) Preparation and Characterization Monolayers. *Analytical Chemistry* 67:735-743.

Grote K, Niemann L, Selzsam B, et al (2008) Epoxiconazole causes changes in testicular histology and sperm production in the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Environ Toxicol Chem* 27:2368-2374.

Hinfray N, Porcher JM, Brion F (2006) Inhibition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) P450 aromatase activities in brain and ovarian microsomes by various environmental substances. *Comp Biochem Physiol - C Toxicol Pharmacol* 144:252-262.

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

Huang Z, Chen X, Chen Y et al (2013) Raman spectroscopic characterization and differentiation of seminal plasma. *Journal of Biomedical Optics* 16:1-4.

Huang S, Yan W, Liu M, et al (2016) Detection of difenoconazole pesticides in packchoi by Surface-enhanced Raman Scattering Spectroscopy coupled with gold nanoparticles. *Analytical Methods* 8:4755-4761.

Kjærstad MB, Taxvig C, Nellemann C, et al (2010) Endocrine disrupting effects in vitro of conazole antifungals used as pesticides and pharmaceuticals. *Reprod Toxicol* 30:573-582.

Khaki A, Khaki AA, Hajhosseini L, et al (2014) *Diabetes Rats* . 11:1-8.

Lang T, Dechant M, Sanchez V et al (2013) Structural and Functional Integrity of spermatozoa is Compromised as a Consequence of Acute Uropathogenic E.coli-Associated Epididymitis. *Biology of reproduction* 89:1-10.

Latiff KA, Bakar NKA, Isa NM (2010) Preliminary study of difenoconazole residues in rice paddy watersheds. *Malays. J. Sci.* 29: 73–79.

Li N, Chen D, Xu Y, et al (2014) Confocal Raman micro-spectroscopy for rapid and label-free detection of maleic acid-induced variations in human sperm. *Biomedical optics express* 5:1690-1699).

Liang X, et al (2015) Exposure to difenoconazole causes changes of thyroid hormone and gene expression levels in zebrafish larvae. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 40:983-987.

Mallidis C, Wistuba J, Bleisteiner B, et al (2011) In situ visualization of damaged DNA in human sperm by Raman microspectroscopy. *Human Reproduction* 26:1641-1649.

Menkveld R, Rhemrev JPT, Franken DR, et al (1996) Acrosomal morphology as a novel criterion for male fertility diagnosis: relation with acrosin activity, morphology (strict criteria), and fertilization in vitro. *Fertil Steril* 65:637–644.

Monod G, Rime H, Bobe J, et al (2004) Agonistic effect of imidazole and triazole fungicides on in vitro oocyte maturation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mar. Environ. Res.* 58:143–146.

Mu X, Chai T, Wang K, et al (2015) Occurrence and origin of sensitivity toward difenoconazole in zebrafish (*Danio reio*) during different life stages. *Aquat Toxicol* 160:57–68.

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

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

Pereira CR, Pereira DR, Silva FA, et al (2016) A new computer vision-based approach to aid the diagnosis of Parkinson's disease. *Comput Methods Programs Biomed* 136:79-88.

Pereira DR, Pisani RJ, Souza AN, et al (2017) An ensemble-based stacked sequential learning algorithm for remote sensing imagery classification. *IEEE J Sel Top Appl Earth Obs Remote Sens* 10(4): 525-1541.

Pereira DR, Papa JP, Saraiva GFR, et al (2018) Automatic classification of plant electrophysiological responses to environmental stimuli using machine learning and interval arithmetic. *Comput Electron Agric* 145:35-42.

Pope CE, Zhang YZ, Dresser BL (1991). A simple staining method for evaluating acrossomal status of cat spermatozoa. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 35:1991.

Reuveni M, Sheglov D (2002) Effects of azoxystrobin, difenoconazole, polyoxin B (polar) and trifloxystrobin on germination and growth of *Alternaria alternata* and decay in red delicious apple fruit. *Crop Prot* 21:951–955.

Robb GW, Amann RP, Killian GJ (1978) Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J Reprod Fertil* 54:103–107.

Sanchez VB, Redman K, Wistuba J, et al (2012) Oxidative DNA damage in human sperman can be detected by Raman microspectroscopy. *Fertility and Sterility* 98:1124-1129.

Satapornvanit K, Baird DJ, Little DC, et al (2004) Risks of Pesticide Use in Aquatic Ecosystems Adjacent to Mixed Vegetable and Monocrop Fruit Growing Areas in Thailand. *Australas J* 10:85–95.

Score (2013) Syngenta Crop Protection Monthey S.A.: Rue de l'Île-au-Bois,. Bula do fungicida.

Seed J, Chapin RE, Clegg ED, et al (1996) Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report. *Reprod Toxicol* 10:237–244.

Shivanoor SMS, David M (2015) Fourier transform infrared (FT-IR) study on cyanide induced biochemical and structural changes in rat sperm. *Toxicology Reports* 2:1347-1356.

Sun C, Cang T, Wang Z, et al (2015) Degradation of three fungicides following application on strawberry and a risk assessment of their toxicity under greenhouse conditions. *Environ Monit Assess* 187:303.

Talari ACS, Movasaghi Z, Rehman S, et al (2015) Raman Spectroscopy of Biological Tissues. *Applied Spectroscopy Reviews* 50:46-111.

Taxvig C, Hass U, Axelstad M, et al (2007) Endocrine-disrupting activities In Vivo of the fungicides tebuconazole and epoxiconazole. *Toxicol Sci* 100:464–473.

Teng M, Qi S, Zhu W, et al (2018) Effects of the bioconcentration and parental transfer of environmentally relevant concentrations of difenoconazole on endocrine disruption in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Pollut* 233:208–217.

Teng M, Qi S, Zhu W, et al (2018) Effects of the bioconcentration and parental transfer of environmentally relevant concentrations of difenoconazole on endocrine disruption in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Pollut* 233:208–217.

Teló GM, Marchesan E, Zanella R, et al (2015) Residues of Fungicides and Insecticides in the Rice Field. *American Society of Agronomy* 107:851-863.

Thom E, Ottow JCG, Benckiser G (1997) Degradation of the fungicide difenoconazole in a silt loam soil as affected by pretreatment and organic amendment. *Environ Pollut* 96:409–414.

Tomiazzi JS, Judai MA, Nai GA, et al (2018) Evaluation of genotoxic effects in Brazilian agricultural workers exposed to pesticides and cigarette smoke using machine-learning algorithms. *Environ Sci Pollut Res Int* 25:1259-1269.

Tully DB, Bao W, Goetz AK, et al (2006) Gene expression profiling in liver and testis of rats to characterize the toxicity of triazole fungicides. *Toxicol Appl Pharmacol* 215:260–273.

Wang K, Wu JX, Zhang HY (2012) Dissipation of difenoconazole in rice, paddy soil, and paddy water under field conditions. *Ecotoxicol Environ Saf* 86:111–115.

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.

**Tabela 1.** Pesos de órgãos dos animais dos grupos controle e expostos ao difenoconazol.

<b>Pesos</b>	<b>Controle</b>	<b>DA</b>	<b>DB</b>	<b>DC</b>
Testículo (g)	1,41 ± 0,15	1,52 ± 0,13	1,47 ± 0,13	1,43 ± 0,11
Epidídimo (mg)	488,60 ± 0,06	542,90 ± 0,07	486,40 ± 0,14	491,90 ± 0,06
Ducto deferente (mg)	96,8 ± 0,02	101,30 ± 0,02	112,00 ± 0,03	104,60 ± 0,03
Próstata ventral (mg)	318,60 ± 0,05	343,90 ± 0,09	320,10 ± 0,10	304,00 ± 0,07
Vesícula seminal cheia (mg)	883,30 ± 0,26	1007,40 ± 0,40	753,10 ± 0,23	790,60 ± 0,28
Vesícula seminal vazia (mg)	490,90 ± 0,20	556,10 ± 0,13	469,60 ± 0,16	478,00 ± 0,23
Fígado (g)	13,35 ± 2,14	14,20 ± 2,46	13,90 ± 2,52	14,72 ± 2,22
Rim direito (g)	1,27 ± 0,20	2,07 ± 0,22	1,94 ± 0,30	1,25 ± 0,11
Rim esquerdo (g)	1,26 ± 0,18	2,05 ± 2,21	1,97 ± 2,28	1,24 ± 0,13

Valores expressos como média. ANOVA ( $p > 0,05$ ). DA = 5mg/Kg/dia. DB = 10mg/Kg/dia. DC = 50mg/Kg/dia.

**Tabela 2.** Morfologia espermática e integridade do acrossoma dos animais dos grupos controle e expostos ao difenoconazol.

<b>Parâmetros espermáticos</b>	<b>Controle</b>	<b>DA</b>	<b>DB</b>	<b>DC</b>
<b>Morfologia</b>				
Espermatozoides normais (%)	96,25 (94,75-96,5)a	92,25 (91,62-93,37)ab	92,00 (91,12-93,50)b	90,75 (89,62-91,5)b
Anormalidades na cabeça (%)	1,50 (1,12-2,00)a	3,25 (2,12-5,00)ab	3,50 (3,12-4,37)b	4,25 (3,62-04,87)b
Anormalidades na cauda (%)	2,25 (2,00-3,50)a	3,75 (2,75-4,37)ab	3,50 (3,00-4,75)ab	5,00 (4,50-5,87)b
<b>Integridade acrossomal</b>				
Íntegros (%)	98,60 (98,12-99,00)a	96,55 (95,50-97,50)ab	94,60 (94,00-95,37)bc	89,45 (89,00-90,37)c

Valores expressos em mediana (Q1 - Q3). Kruskal–Wallis, com teste *a posteriori* Dunn. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). DA= 5mg/Kg/dia. DB= 10mg/Kg/dia. DC=50mg/Kg/dia.

**Tabela 3.** Contagens espermáticas em testículo e epidídimo dos animais dos grupos controle e expostos ao difenoconazol.

<b>Parâmetro</b>	<b>Controle</b>	<b>DA</b>	<b>DB</b>	<b>DC</b>
<b>Contagens espermáticas no testículo</b>				
Número de espermatozoides no testículo ( $\times 10^6$ )	155,31 $\pm$ 15,25a	134,69 $\pm$ 18,56b	109,54 $\pm$ 10,03c	90,62 $\pm$ 9,08d
Número de espermatozoides/g de testículo ( $\times 10^6$ /g)	127,24 $\pm$ 11,43a	100,61 $\pm$ 10,65b	86,39 $\pm$ 13,55b	76,26 $\pm$ 9,34b
PDE ( $\times 10^6$ /testículo/dia)	25,46 $\pm$ 2,50a	22,08 $\pm$ 3,04b	17,95 $\pm$ 1,64c	14,85 $\pm$ 1,48d
PDEr ( $\times 10^6$ /dia/g)	20,86 $\pm$ 1,87a	16,49 $\pm$ 1,74b	14,16 $\pm$ 2,22bc	12,50 $\pm$ 1,53c
<b>Contagens espermáticas no epidídimo (cabeça/corpo)</b>				
Espermatozoides na região do epidídimo ( $\times 10^6$ )	103,20 $\pm$ 17,79a	78,13 $\pm$ 12,46b	71,04 $\pm$ 17,75b	71,50 $\pm$ 9,31b
Número de espermatozoides/g da região do epidídimo ( $\times 10^6$ /g)	400,14 $\pm$ 17,97a	280,25 $\pm$ 21,57b	250,55 $\pm$ 50,90b	276,02 $\pm$ 41,70b
Tempo de trânsito (dias)	3,87 $\pm$ 0,60	3,44 $\pm$ 0,95	3,79 $\pm$ 0,93	4,81 $\pm$ 0,84
<b>Contagens espermáticas no epidídimo (cauda)</b>				
Espermatozoides na região do epidídimo ( $\times 10^6$ )	137,56 $\pm$ 20,92	125,14 $\pm$ 28,83	109,17 $\pm$ 25,84	104,99 $\pm$ 22,49
Número de espermatozoides/g da região do epidídimo ( $\times 10^6$ /g)	793,75 $\pm$ 52,63a	709,38 $\pm$ 35,86b	653,13 $\pm$ 65,64c	687,50 $\pm$ 53,36bc
Tempo de trânsito (dias)	5,37 $\pm$ 0,71	4,71 $\pm$ 1,29	4,95 $\pm$ 1,31	4,98 $\pm$ 1,28

Valores expressos em média  $\pm$  DP. ANOVA com teste *a posteriori* de Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). DA= 5mg/Kg/dia. DB= 10mg/Kg/dia. DC=50mg/Kg/dia.

**Tabela 4.** Média das Intensidades relativas (IR) das principais bandas obtidas dos Espalhamento Raman Amplificado das amostras de espermatozoides de animais do grupo controles (A), espectros das amostras de espermatozoides de animais expostos ao difenoconazol (grupo DC) (B) e Difenoconazol puro (C). Linha Laser 514 nm, tempo de coleta 10 s e 1 acumulação.

Número de onda / $\text{cm}^{-1}$	IR A	IR B	IR C	Atribuições
654		5		C-C modo de torção de tirosina e fenilalanina, Vibração da base citosina
675	7			Vibração do anel Guanina
682		6		
700			70	$\nu$ (3-Cloro-4-Fenil-4 Clorofenil éter)
730	6			Ácidos nucleicos, vibração das bases do DNA/RNA, C-S(proteína), $\text{CH}_2$ , $\nu$ C-C, lipídeos, vibração do triptofano
786	7			U, T, C (vibração das bases do DNA/RNA) <i>backbone</i> O-P-O
801		8		Vibração da Uracila, dexoxiribomononucleotídeos
810			84	$\nu$ (3-Cloro-4-Fenil-4 Clorofenil éter)
830	9			Fosfodiéster, $\nu$ O-P-O do DNA/RNA, vibração da tirosina, prolina, hidroxiprolina
857		8		$\nu$ (aminoácidos, valina e polissacarídeos), prolina, hidroxiprolina, tirosina, vibração de tirosina, glicogênio
992	20	15		$\delta$ Fenilalanina, ligação NADH
1011			70	$\nu_{\text{as}}$ (C-O-C) do Clorofenil Eter, $\nu$ (3-Cloro-4-Fenil)
1051	25			
1074		21		$\nu$ ( $\text{PO}_2$ ): DNA/RNA, $\nu$ (C-C): lipídeos, C-O, $\nu$ (C-C): carboidratos, $\nu$ (C-N), $\nu$ (C-C) <i>backbone</i> , $\nu$ (C-O) <i>backbone</i> do DNA, (C-H), ( $\text{PO}_2$ ): DNA <i>backbone</i>
1094			81	$\nu$ (Cl-Cl) do Clorofenil, $\nu$ (4-Cloro-Fenil) $\nu_{\text{s}}$ ( $\text{PO}_2$ ): ácidos nucleicos, $\nu$ (C-N): proteínas
1138			73	$\nu$ (C-N), $\rho$ (C-H)
1165			74	$\nu$ (C-O) e $\rho$ (C-H) do 4-Clorofenil
1200			85	$\nu_{\text{s}}$ (C-O-C), $\nu$ (3-Cloro-4-Fenil-4-Clorofenil Eter)
1203		43		Tirosina, $\nu$ (C- $\text{C}_6\text{H}_5$ ), aminoácidos de proteína, A, T
1209	44			(vibração das bandas do DNA/RNA), amida III (proteína), $\nu$ (C- $\text{C}_6\text{H}_5$ ): tirosina e fenilalanina, vibração da Citosina, $\delta$ (CH, CO)
1357		72		G, Triptofan, Citocromo C, $\nu$ (C=N), $\nu$ (C-N), $\rho$ (C-H),
1363			72	$\tau$ ( $\text{CH}_2$ ), T, A, C,
1364	82			
1389		76		$\nu_{\text{s}}$ (COO):ácidos graxos
1404	78			
1422		73		$\delta$ ( $\text{CH}_2$ , $\text{CH}_3$ ), $\delta$ ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), C-H: proteína e lipídeos,
1443	79			Flexão do $\text{CH}_2$ do DNA, $\delta$ ( $\text{CH}_2$ ): timina, vibração da
1447			71	guanina (C=C)

<b>1448</b>		74	
<b>1483</b>	88	76	Amida II, G e A (vibração das bases purinas), $\delta(\text{CH})$ , (C-H)
<b>1500</b>	89		(~1500-1576)
<b>1534</b>		96	Citosina, A (vibração das bases do DNA), Ácido
<b>1537</b>	99		nucléicos, vibração das bases G e A, Ligação NADH,
<b>1562</b>	99,7		8-Oxiguanosina
<b>1570</b>		98	
<b>1586</b>		85	$\nu(\text{C}=\text{C})$ , $\nu(\text{C}-\text{C})$
<b>1595</b>	100		C, Tirosina, $\delta(\text{CC}, \text{CN}, \text{CO})$ , $\nu(\text{C}=\text{C})$ : tirosina
<b>1605</b>		100	$\nu(\text{C}=\text{C})$ , $\nu(\text{C}-\text{C})$
<b>1613</b>		100	C, Tirosina, $\delta(\text{CC}, \text{CN}, \text{CO})$ , $\nu(\text{C}=\text{C})$ : tirosina

$\nu$ =estiramento,  $\delta$ =deformação, s-simétrico, as-assimétrico,  $\tau$ -estiramento fora do plano,  $\rho$ -estiramento no plano, A=adenina, T=timina, C=citocina e G=Guanina.

Fonte: Huang, 2016; Shivanoor e David (2015); Amaral et al. (2018).

**Tabela 5.** Matriz de confusão, usando o teste SVM e 70% das amostras para conjunto de treinamento.

Classificado como (%)	Classe Verdadeira (%)			
	C	DA	DB	DC
<b>C</b>	<b>97</b>	3	0	0
<b>DA</b>	0	<b>80</b>	20	0
<b>DB</b>	0	17	<b>83</b>	0
<b>DC</b>	0	0	20	<b>80</b>

Resultados apresentados em porcentagem. Classes referentes aos grupos de estudo: C = controle, DA = 5mg/kg/dia, DB = 10mg/kg/dia, DC = 50mg/kg/dia.

## LEGENDA DA FIGURA

**Figura 1:** Peso corpóreo (A), consumo de água (B), consumo de ração (C) e ganho de peso (D) dos animais dos grupos controle e expostos ao difenoconazol. A, B, C) Valores expressos em média. ANOVA com teste *a posteriori* de Tukey. D) Valores expressos em mediana (Q1 – Q3). Kruskal–Wallis, com teste *a posteriori* Dunn. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). C = controle, DA = 5mg/Kg/dia, DB = 10 mg/Kg/dia e DC = 50 mg/Kg/dia.

**Figura 2:** Motilidade progressiva (A), motilidade sem progressão (B), imóveis (C) e vitalidade dos animais (D) dos grupos controle e expostos ao difenoconazol. Valores expressos em mediana (Q1 – Q3). Kruskal–Wallis, com teste *a posteriori* Dunn. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). C = controle, DA = 5mg/Kg/dia, DB = 10 mg/Kg/dia e DC = 50 mg/Kg/dia.

**Figura 3:** Espectros de Espalhamento Raman Amplificado em Superfície das amostras de espermatozoides de animais do grupo controles (A), espectros das amostras de espermatozoides de animais expostos ao difenoconazol (grupo DC) (B) e Difenoconazol puro (C). Linha Laser 514 nm, tempo de coleta 10 s e 1 acumulação.

**Figura 4:** Efeito do treinamento sobre o desempenho de classificação por grupo de exposição. Frequência 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*. C = controle, DA = 5mg/Kg/dia, DB = 10 mg/Kg/dia e DC = 50 mg/Kg/dia.

FIGURA 1

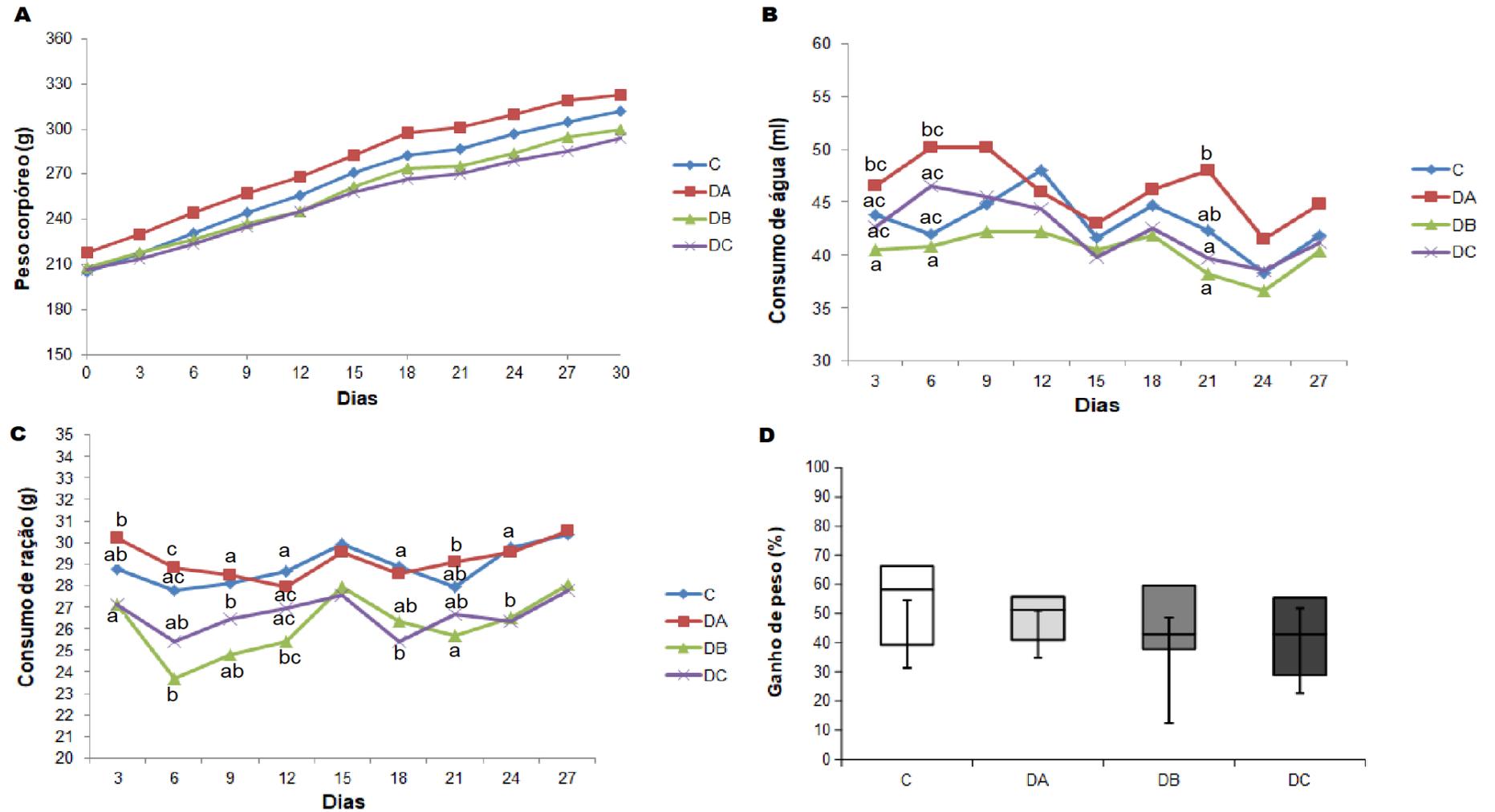


FIGURA 2

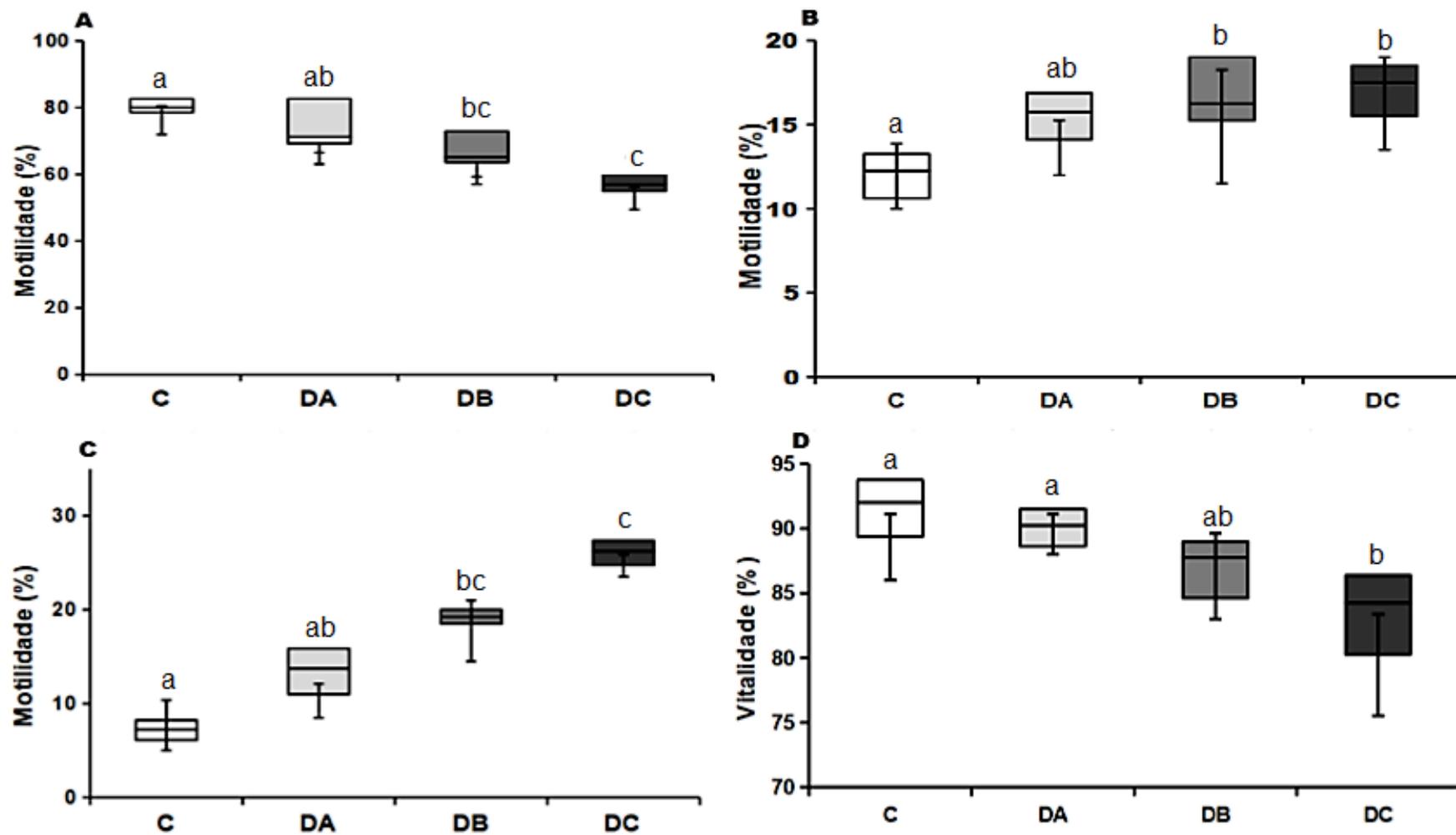


FIGURA 3

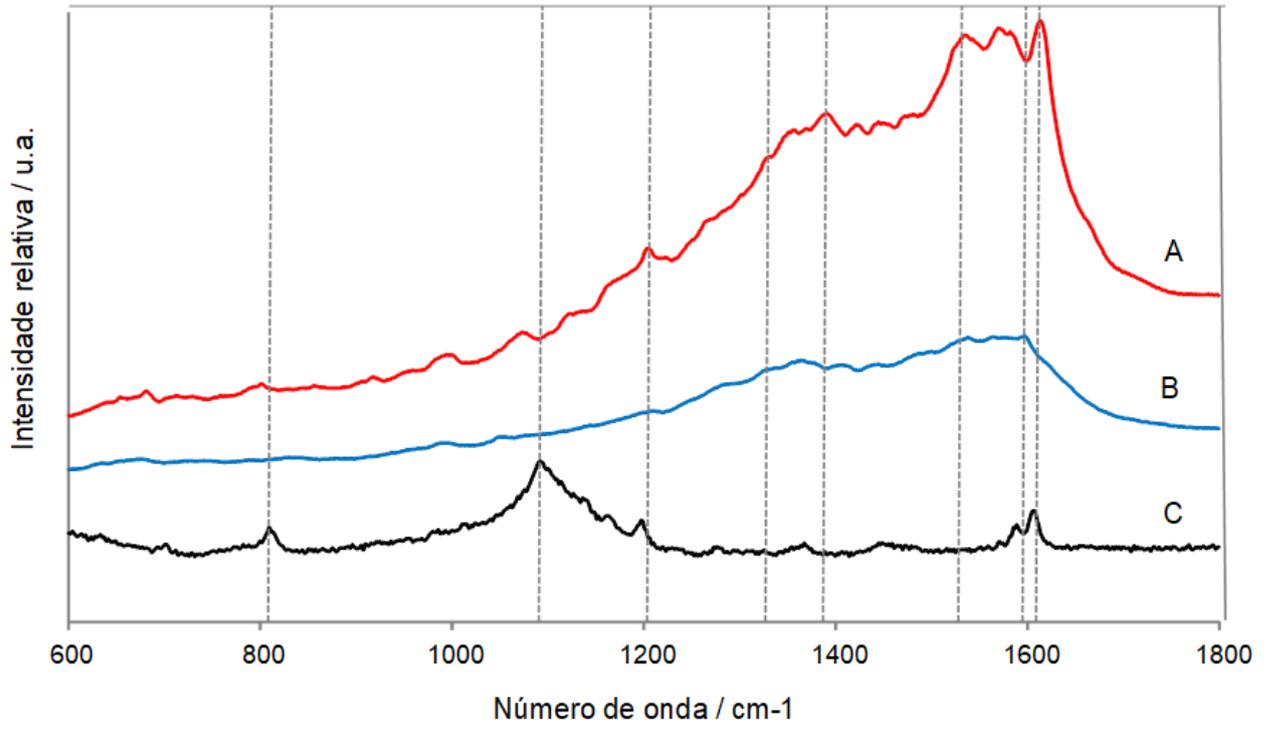
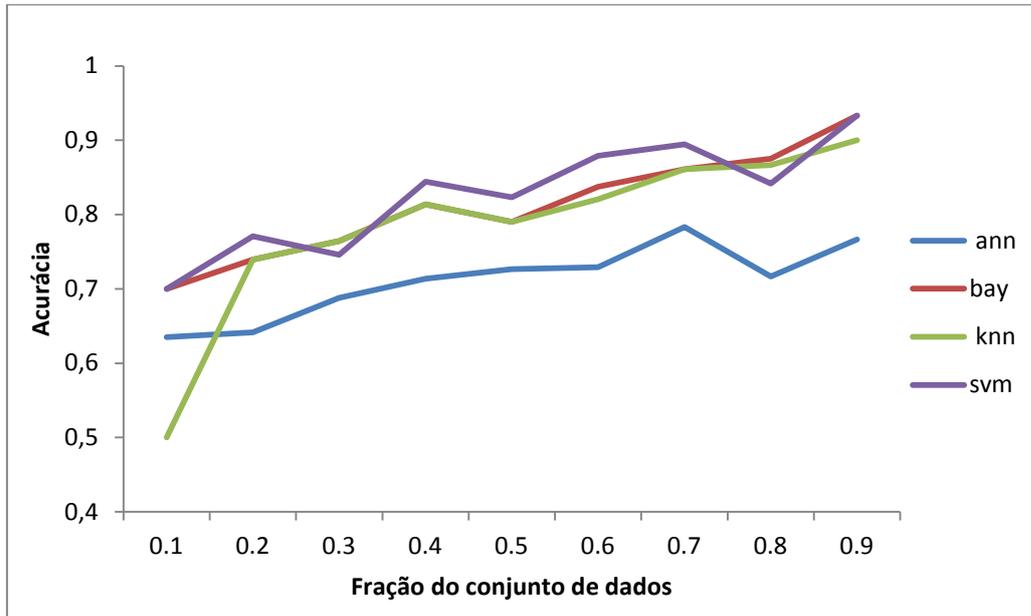


FIGURA 4



## REFERÊNCIAS

ABD-ALRAHMAN, S. H. et al. Exposure to difenoconazole, diclofop-methyl alone and combination alters oxidative stress and biochemical parameters in albino rats. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 7, n. 10, p. 3637–3646, out. 2014.

ABRAPA. Associação Brasileira dos Produtores de Algodão. Câmara Temática de Insumos Agropecuários – CTIA. Brasília, 2017.

BNDES. **O setor de agroquímicos**. Rio de Janeiro, n. 24, p. 69-96, set. 2006.

ALBUQUERQUE, V. H. C. et al. Robust automated cardiac arrhythmia detection in ECG beat signals. **Neural Comput Appl.**, v. 29, n. 1, p. 679-693, 2016.

ALBUQUERQUE, V. H. C.; PAPA, J.; PEREIRA, D.R. Automatic identification of epileptic EEG signals through binary magnetic optimization algorithms. **Neural Comput Appl**, v. 1, n. 0, p. 1-13, 2017.

ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

AL-SHAYEA, Q. K.; AL-SHAYEA, T. K. Customer Behavior on RFMT Model Using Neural Networks. **Proceedings of the World Congress on Engineering**, v. 1, n. 0, p.1-4, 2014.

AMARAL, S. et al. Raman micro-espectroscopy analysis of diferente sperm regions: a species comparison. **Molecular Human Reproduction**, v.24, n.4, p.185-202, 2018.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA)**. Relatório de Atividades de 2001. Brasília, 2008. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117818/relatorio%2B2001%2B2007.pdf/460433e6-3d66-400b-8e93-48413ea8203f>>. Acesso em: 23 abr. 2018.

ANVISA. **Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos - PARA**. Nota Técnica para divulgação dos resultados do PARA de 2008. Brasília, 2009. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117818/nota%2Btecnica%2B-%2Bresultados%2Bpara%2B2008.pdf/78967b71-4df4-4b47-b5b3-6d71de54b392>>. Acesso em: 23 abr. 2018.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxico em Alimentos (PARA)**. Relatório de Atividades de 2009. Brasília, 2010. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117818/RELATORIO\\_PARA\\_2009.pdf/8a6a6722-f009-442e-9760-569bc5279c8d](http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117818/RELATORIO_PARA_2009.pdf/8a6a6722-f009-442e-9760-569bc5279c8d)>. Acesso em: 23 abr. 2018.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxico em Alimentos (PARA)**. Relatório de Atividades de 2010.

Brasília, 2011. Disponível em:

<<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117818/Relat%25C3%25B3rio%2BPARA%2B2010%2B-%2BVers%25C3%25A3o%2BFinal.pdf/f568427b-c518-4a68-85b9-dd7680e55e07>>. Acesso em: 23 abr. 2018.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxico em Alimentos (PARA)**. Relatório de Atividades de 2011 e 2012. Brasília, 2013. Disponível em:

<[http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117818/Relat%25C3%25B3rio%252BPARA%252B2011-12%252B-%252B30\\_10\\_13\\_1.pdf/d5e91ef0-4235-4872-b180-99610507d8d5](http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117818/Relat%25C3%25B3rio%252BPARA%252B2011-12%252B-%252B30_10_13_1.pdf/d5e91ef0-4235-4872-b180-99610507d8d5)>. Acesso em: 23 abr. 2018.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) 2013 – 2015**. Brasília, nov. 2016. Disponível em:

<[http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/0/Relat%C3%B3rio+PARA+2013-2015\\_VERS%C3%83O-FINAL.pdf/494cd7c5-5408-4e6a-b0e5-5098cbf759f8](http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/0/Relat%C3%B3rio+PARA+2013-2015_VERS%C3%83O-FINAL.pdf/494cd7c5-5408-4e6a-b0e5-5098cbf759f8)>. Acesso em: 23 abr. 2018.

AOKI, P. H. B. et al. Incorporation of Ag nanoparticles into membrane mimetic systems composed by phospholipid layer-by-layer (LbL) films to achieve surface-enhanced Raman scattering as a tool in drug interaction studies. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 41, p. 40-48, 2010.

AOKI, P. H. B. et al. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) applied to cancer diagnosis and detection of pesticides, explosives, and drugs. **Reviews in Analytical Chemistry**, v. 31, p. 55-76, 2013.

AROCA, R. F. et al. Surface-enhanced Raman Scattering em colloidal nanostructures. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 116, n. 0, p. 45–6146, 2005.

BARRETO, M.J. **Territorialização das agroindústrias canavieiras no Pontal do Paranapanema e os desdobramento para o trabalho**. 2013, 244f. Dissertação (Mestrado em Geografia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências e Tecnologia – Presidente Prudente, SP, 2013.

BEUREN, I. M. **Como elaborar trabalhos monográficos em contabilidade**. 3. ed. São Paulo: Atlas, 2010.

BOMBARDI, L. M. **Intoxicação e morte por agrotóxicos no Brasil: a nova versão do capitalismo oligopolizado**. Departamento de Geografia – USP, São Paulo, 2011.

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

DF, 12 jun. 1989. Seção 1, p. 11459. Disponível em:  
<[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/l7802.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l7802.htm)>. Acesso em: 20 ago. 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento-MAPA. **Informativo de economia agrícola de 2013**. Disponível em:  
<<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/estatisticas>>. Acesso em 20 jul. 2017.

BAIRD, C. **Química ambiental**. 2 ed. Porto Alegre: Bookman, 2006.

BARONE, L. A.; MELAZZO, E. S.; SILVA, A. A. **Célula do Pontal do Paranapanema - SP: acompanhamento e informação para o desenvolvimento rural**. Presidente Prudente, 2011. p. 1–116.

BARTON, H. A. et al. Metabolism of myclobutanil and triadimefon by human and rat cytochrome P450 enzymes and liver microsomes. **Xenobiotica**, v. 36, n. 9, p. 793–806, set. 2006.

BEDUSCHI-FILHO, L.C. **Sociedade, Natureza e reforma agrária: assentamentos rurais e unidades de conservação na região do Pontal do Paranapanema**. 2002. 97f. Dissertação (Mestrado em Ciência Ambiental) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

BANERJEE, K. et al. Degradation kinetics and safety evaluation of tetraconazole and difenoconazole residues in grape. **Pest Manag Sci**, v.64, n. 3, p. 283–289, Mar. 2008.

CARNEIRO, F. F. et al. **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro: ABRASCO, 2012.

CARRARO, G. **Agrotóxico e meio ambiente: uma proposta de ensino de ciências e de química**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1997. (Série Química e Meio Ambiente).

CHEN, J. et al. Rare earths exposure and male infertility: the injury mechanism study of rare earths on male mice and human sperm. **Environ Sci Pollut Res**, v.22, p.2076-2086, 2015.

CHRISTIAN, M. S. Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. cap. 29. In: HAYES, W. **Method of toxicology**. Philadelphia: Taylor & Francis, 2001. p.1301-1381.

CONSTANTINO, C. J. L. et al. Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering: Single Molecule Detection in a Langmuir-Blodgett Monolayer. **Applied Spectroscopy**, v. 57, n.6, p. 649-654, 2003.

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

CORNWALL, G. A. New insights into epididymal biology and function. **Human Reproduction Update**, v. 15, n. 2, p. 213–227, Mar. 2009.

COSTA, N. O. et al. Evaluation of the reproductive toxicity of fungicide propiconazole in male rats. **Toxicology**, v. 335, p. 55–61, Jun. 2015.

CLEGG, E. D.; PERREAULT, S. D.; KLINEFELTER, G. R. Assessment of Male Reproductive Toxicology. **Principles and Methods of Toxicology**, v. 4, p. 1263-99, 2001.

CLERMONT, Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. **Physiol. Rev.**, v.52, n.1, p.198-236, Jan. 1972.

D'AMICO, F. et al. Oxidative damage in DNA base revealed by UV Resonant Raman spectroscopy. **Analyst**, v. 140, p. 1477-1485, 2015.

DE SANTANA, H.; DIMAS, A. M. Z. Preparação e caracterização de substratos SERS ativos: Um estudo da adsorção do cristal violeta sobre nanopartículas de prata. **Química Nova**, n. 29, n. 2, p. 194-199, 2006.

EL-MEDANY, A. H.; HAGAR, H. H. Effect of fluconazole on the fertility of male rabbits. **Arzneimittel-Forschung/Drug Research**, v. 52, n. 8, p. 636-640, 2002.

FARIA, D. L. A. Entenda o que é espectroscopia Raman. **Química Viva**. 2011.

FEN, M. B. et al. Raman Spectroscopy for Clinical Oncology. **Advances in Optical Technologies**, v. 2011, May/Ago. 2011. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/aot/2011/213783/>>. Acesso em: 15 maio 2017.

FERNANDES, G. S. A. et al. Reproductive effects in male rats exposed to diuron. **Reproductive Toxicology**, v. 23, n. 1, p. 106–112, Sept. 2007.

FILLER, R. Methods for evaluation of rat epididymal sperm morphology. In CHAPIN, R. E.; HEINDEL, J. H. (Eds). **Methods in toxicology: Male reproductive toxicology**. San Diego, CA: Academic Press, 1993. p. 334-343.

FISCH, H. et al. Semen analyses in 1,283 men from the United States over a 25-year period: no decline in quality. **Fertility and Sterility**, v. 65, n. 5, p. 1009-1014, 1996.

FRANÇA, L. R.; AVELAR, G. F.; ALMEIDA, F. F. L. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. **Theriogenology**, v. 63, n. 2, p. 300–318, 2005.

FRANÇA, L. R.; GODINHO, C. L. Testis Morphometry, Seminiferous Epithelium Cycle Length, and Daily Sperm Production in Domestic Cats (*Felis catus*). **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 5, p. 1554–1561, Nov. 2002.

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.

GILBERT, S. F. The morphogenesis of evolutionary developmental biology. **The International journal of developmental biology**, v. 47, n. 7–8, p. 467–477, 2003.

GIONGO, C. R. Desenvolvimento, saúde e meio ambiente: contradições na construção de hidrelétricas. **Serv. Soc. Soc.**, São Paulo, n. 123, p. 501-522, jul./set. 2015.

GLERIANI, J. M. **Concordância da optidão agrícola das terras do Estado de São Paulo elaborada nos anos setenta com os dados do Censo Agropecuário do IBGE Ano 95/96**. 2000. Dissertação (Sensoriamento Remoto) - Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. São José dos Campos, 2000.

GOMES, M. A. F.; BARIZON, R. R. M. Panorama da Contaminação Ambiental por Agrotóxicos e Nitrato de origem Agrícola no Brasil: Cenário 1992/2011. Documentos 98. EMBRAPA, maio, 2014. ISSN 1517-5111

GOETZ, A. K. et al. Disruption of testosterone homeostasis as a mode of action for the reproductive toxicity of triazole fungicides in the male rat. **Toxicological Sciences**, v. 95, n. 1, p. 227–239, Jan. 2006.

GOETZ, A. K. et al. Inhibition of rat and human steroidogenesis by triazole antifungals. **Systems biology in reproductive Medicine**, v. 55, n. 5–6, p. 214–26, Nov. 2009.

GRABAR, K. C. et al. Preparation and Characterization Monolayers. **Analytical Chemistry**, v. 67, p. 735-743, 1995.

GROTE, K. et al. Epoxiconazole causes changes in testicular histology and sperm production in the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, n. 11, p. 2368–2374, maio 2008.

HAFEZ, E.S.E. **Técnicas de reprodução e reprodução para animais de laboratório**. Filadélfia: Lea Fabiger, 1970. p. 10-31.

HELENO, F. F. et al. Otimização, validação e aplicação de método para determinação da concentração residual de difenoconazol em morangos após múltiplas aplicações. **Química Nova**, v. 37, n. 1, set. 2013.

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/Plenum Publisher, 2002. p.81-102.

HINFRAY, N.; PORCHER, J. M.; BRION, F. Inhibition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) P450 aromatase activities in brain and ovarian microsomes by various environmental substances. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 144, n. 3, p. 252–262, Sept. 2006.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de análise instrumental**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009, cap. 18.

HOSSAIN, F. et al. Effects of pesticide use on semen quality among farmers in rural areas of Sabah, Malaysia. **Journal of occupational health**, v. 52, n. 6, p. 353-360, 2010.

HUANG, Z. et al. Raman spectroscopic characterization and differentiation of seminal plasma. **Journal of Biomedical Optics**, v. 16, n. 11, p. 1-4, 2011.

HUANG, Z. F. et al. Characterization and differentiation of normal and abnormal spermatozoa via micro-Raman spectroscopy. **Laser Physics Letters**, n. 10, p.1-6, 2013.

HUANG. S. et al. Detection of difenoconazole pesticides in packchoi by Surface-enhanced Raman Scattering Spectroscopy coupled with gold nanoparticles. **Analytical Methods**, v. 8, p. 4755–4761, 2016.

HUSER, T. et al. Raman spectroscopy of DNA packaging in individual human sperm cells distinguishes normal from abnormal cells. **Journal of Biophotonics**, v. 2, n. 5, p. 322-332, 2009.

IBAMA - INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS 2013. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/>>. Acesso em: 13 jan. 2018.

IBGE – Ministério do planejamento e orçamento. **Produção agrícola de 2015**. 2015.

IBGE – Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LSPA). **Pesquisa Mensal de Previsão e Acompanhamento das Safras Agrícolas no Ano Civil**. Rio de Janeiro, v.30, n.1, p. 1-81, jan. 2017.

KASMI, S. et al. Modulatory effects of quercetin on liver histopathological, biochemical, hematological, oxidative stress and DNA alterations in rats exposed to graded doses of score 250. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v.0, n. 0, p. 1–11, jul. 2017.

KITA, D. H. **Efeitos do pesticida roudup® sobre o sistema reprodutor de ratos wistar**. 2004. Monografia (Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

KJAERSTAD, M.B. et al. Endocrine disrupting effects in vitro of conazole antifungals used as pesticides and pharmaceuticals. **Reprod Toxicol**, v.30, n.4, p.573-582, ago. 2010.

KHAKI, A. et al. The anti-oxidant effects of ginger and cinnamon on spermatogenesis dysfunction of diabetes rats. **Afr J Tradit Complement Altern Med.**, v.11, n. 4, p.1-8, 2014.

KNEIPP, K. et al. Single Molecule Detection Using Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS). **The American Physical Society**, v. 78, n. 9, p. 1667-1670, 1997.

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

KOIFMAN, S.; HATAGIMA, A. Disruptores endócrinos no ambiente: efeitos biológicos potenciais. **Revista Brasileira de Mastologia**, v.13, n.1, p.9-11, 2003.

LANG, T. et al. Structural and Functional Integrity of Spermatozoa Is Compromised as a Consequence of Acute Uropathogenic E. coli-Associated Epididymitis. **Biology of reproduction.**, v. 89, n. 3, p. 1-10, 2013.

LASERNA, J. J. **Modern Techniques in Raman Spectroscopy**. Toronto: John Wiley, 1996.

LATIFF, K. A. et al. Preliminary study of difenoconazol residues in rice paddy watersheds. **Jornal da Malásia**, v. 29, n. 1, p. 73-79, Abr. 2010.

LI, N. et al. Confocal Raman micro-spectroscopy for rapid and label-free detection of maleic acid-induced variations in human sperm. **Biomedical optics express**. v. 5, n. 5, 2014.

LIANG, X. et al. Exposure to difenoconazole causes changes of thyroid hormone and gene expression levels in zebrafish larvae. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 40, p. 983-987, 2015.

LIMA, G D. A. **Fertilidade e morfofisiologia epididimária de ratos wistar submetidos a ingestão de arsenato e arsenito de sódio**. 2013. 60f. Dissertação (Biologia Celular) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

MALLIDIS, C. et al. In situ visualization of damaged DNA in human sperm by Raman microspectroscopy. **Human Reproduction**, v. 26, n. 7, p. 1641-1649, 2011.

MALLIDIS, C. et al. Raman microspectroscopy: shining a new light on reproductive medicine. **Human Reproduction Update**, v. 0, n. 0, p. 1–12, 2013.

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, mar. 1996.

MENON, A. G. et al. Associations between sperm abnormalities, breed, age, and scrotal circumference in beef bulls. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 75, n. 4, p. 241–247, nov. 2010.

MONOD et al. Agonistic effect of imidazole and triazole fungicides on in vitro oocyte maturation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Marine Environmental Research**, v. 58, n. 0, p. 143–146, 2004.

MORRIS, I. D. et al. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. **Human Reproduction**, v. 17, n. 4, p. 990-998, 2002.

MU, X. et al. Evaluation of acute and developmental effects of difenoconazole via multiple stage zebrafish assays. **Environmental Pollution**, v. 175, p. 147–157, jan. 2013.

MU, X. et al. Occurrence and origin of sensitivity toward difenoconazole in zebrafish (*Danio reio*) during different life stages. **Aquatic Toxicology**, v. 160, p. 57–68, jan. 2015.

ODUM, E. P., BARRET, G. W. Fundamentos de ecologia. **Cengage Learning**. São Paulo, v. 5, p. 612. 2008.

OJEDA, S. R. et al. Recent advances in the endocrinology of puberty. **Endocrine Reviews**, v. 1, n. 3, p. 228–257, 1980.

OLDENHOF, H. et al. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of sperm chromatin structure and DNA stability. **Andrology**, v. 4, p. 430–441, 2016.

OLIVEIRA, T. G. **Estudo in vitro da interação herbicidas e espermatozoide humano utilizando a Espectroscopia Raman**. 2015. 99f. Dissertação (Mestrado em meio Ambiente e Desenvolvimento Regional) - Universidade do Oeste Paulista-UNOESTE. Presidente Prudente, 2015.

OPAS (Organização Pan-americana da Saúde). **Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos**. Brasília: Organização Pan-americana da Saúde/OMS, 1997. Disponível em: <<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/livro2.pdf>>. Acesso em: 20 jul. 2017.

OSTERBERG, C. E. et al. Identification of Spermatogenesis in a Rat Sertoli-Cell Only model using Raman Spectroscopy: A Feasibility Study. **The Journal of Urology**, v. 192, p. 607-612, 2014.

PAPA, J. P. et al. Supervised pattern classification based on optimum-path forest. **Int J Imaging Syst Technol**, v. 19, n. 2, p. 120–131, 2009.

PATEL, V. L. et al. The coming of age of artificial intelligence in medicine. **Artif Intell Med**, v. 46, n. 1, p. 5–17, 2009.

PEREIRA, C. R. et al. A new computer vision-based approach to aid the diagnosis of Parkinson's disease. **Comput Methods Programs Biomed**, v. 136, n.0, p. 79-88, 2016.

PELLUCCI, P. R. S. et al. Utilização de técnicas de Aprendizado de Máquina no Reconhecimento de Entidades nomeadas no Português. **E-xacta**, v. 4, n. 1, p. 73-81, 2011.

PEREIRA, D. R. et al. An ensemble-based stacked sequential learning algorithm for remote sensing imagery classification. **IEEE J Sel Top Appl Earth Obs Remote Sens**, v. 10, n. 4, p. 525-1541, 2017.

PEREIRA, D. R. et al. Automatic classification of plant electrophysiological responses to environmental stimuli using machine learning and interval arithmetic. **Comput Electron Agric**, v. 145, n.1, p. 35-42, 2018.

- PERES, F.; MOREIRA, J. C.; DUBOIS, G. S. Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema. In: PERES, F. e MOREIRA, J. C. **É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro: Ed. FIOCRUZ. 2003. p. 21-41.
- PIERZYNSKI, G.M.; SIMS, J.T.; VANCE, G.F. **Soils and environmental quality**. 3. ed. Londres: CRC Press,1994.
- POPE, C. E.; ZHANG, Y. Z.; DRESSER, B. L. A simple staining method for evaluating acrossosomal status of cat spermatozoa. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 22, n. 1, p.87-95, 1991.
- PRATI, R. C. **Novas abordagens em aprendizado de máquina para a geração de regras, classes desbalanceadas e ordenação de casos**. 2006. 197f. Tese (Doutorado em Ciências de Computação e Matemática Computacional) – Universidade de São Paulo. São Carlos, 2006.
- REUVENI, M.; SHEGLOV, D. Effects of azoxystrobin, difenoconazole, polyoxin B (polar) and trifloxystrobin on germination and growth of *Alternaria alternata* and decay in red delicious apple fruit. **Crop Protection**, v. 21, n. 10, p. 951–955, Apr. 2002.
- ROBAIRE B, VIGER RS. Regulation of epididymal epithelial cell functions. **Reprod Biol**, v. 52, n.2, p. 226-36, 1995.
- ROBB, G. W.; AMANN, R. P.; KILLIAN, G. J. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. **Journal of reproduction and fertility**, v. 54, n. 1, p. 103–107, 1978.
- RODRIGUEZ J.A.; FAVARETTO A.L.V. Sistema reprodutor. In: Aires M.M. (Ed). **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p.877-917
- SALA, O. **Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho**. 2. ed. São Paulo: Ed. Universidade Estadual Paulista, 2008.
- SÁNCHEZ, V. et al. Oxidative DNA damage in human sperm can be detected by Raman microspectroscopy. **Fertility and sterility**, v. 98, n. 5, p. 1124-1129, 2012.
- SATAPORNVANIT, K. et al. Risks of Pesticide Use in Aquatic Ecosystems Adjacent to Mixed Vegetable and Monocrop Fruit Growing Areas in Thailand. **Australasian Journal of Ecotoxicology**, v. 10, n. 2, p. 85–95, Jul. 2004.
- SAVOY, V. L. T. Classificação dos Agrotóxicos. **Instituto Biológico**. São Paulo, v.73, n.1, p.91-91, 2011.
- SÃO PAULO (Estado). Governo do Estado de São Paulo. Secretaria de Planejamento e Desenvolvimento Regional. **Caracterização socioeconômico de São Paulo: Região Administrativa de Presidente Prudente...** São Paulo, 2013.
- SCORE. Syngenta Crop Protection Monthey S.A.: Rue de l'Île-au-Bois, 2013. Bula do fungicida.

SEED, J. et al. Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report. **Reproductive Toxicology**, v. 10, n. 3, p. 237–244, nov. 1996.

SHIVANOOR, S. M. S.; DAVID, M. Fourier transform infrared (FT-IR) study on cyanide induced biochemical and structural changes in rat sperm. **Toxicology Reports**, v.2, p.1347-1356, 2015.

SHUM, W.W. et al. Regulation of luminal acidification in the male reproductive tract via cell-cell crosstalk. **Journal Experimental Biology**, v. 212, p. 1753-61, 2009.

SILVA, J. M. **Desenvolvimento e validação de método para determinação de agrotóxicos em sedimento por cromatografia gasosa monodimensional bidimensional abrangente com micro detector por captura de elétrons**. 2009. 147f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

SILVA, V.C. **Levantamento dos agrotóxicos usados por citricultores dos municípios de Alto Paraná, Guairaçá e Paranavaí-Paraná, no período de 2008-2009**. 2011. 79f. Monografia (Especialização Gestão em Defesa Sanitária Vegetal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

SINDAG - Sindicato Nacional das Empresas de Aviação Agrícola. **Cartilha Técnica da Aviação Agrícola**, p. 1–40, 2013.

SINITOX. Sistema Nacional de Informações Tóxicos Farmacológicos. Disponível em: <[http://www.fiocruz.br/sinitox\\_novo/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=105&sid=107](http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=105&sid=107)> . Acesso em: 29 out. 2017.

SINDIVEG. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal. Setor de Defensivos Agrícolas. Faculdades Integradas Cantareira. São Paulo, 2017.

SKINNER, M.K.; GRISWOLD, M.D. **Sertoli Cell Biology**. Washington: Elsevier Science, 2005.

SUN, C. et al. Degradation of three fungicides following application on strawberry and a risk assessment of their toxicity under greenhouse conditions. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 187, n. 5, apr. 2015.

STOPPELLI, I. M. de B. S.; MAGALHÃES, C. P. Saúde e segurança alimentar: a questão dos agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 10, p. 91-100, 2005.

STÜTZER, G.; GUIMARÃES, G. Aspectos toxicológicos e ambientais relacionados com o uso de produtos fitossanitários. In: ZAMBOLIM, L. **O que os engenheiros agrônomos devem saber para orientar o uso de produtos fitossanitários**. Viçosa: UFV, 2003. p.69-84.

SYNGENTA. Syngenta Proteção de Cultivos Ltda. Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico-FISPQ. 2002.

TALARI A. C. S. et al. Raman Spectroscopy of Biological Tissues. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 50, p. 46-111, 2015.

TAXVIG, C. et al. Endocrine-disrupting activities In Vivo of the fungicides tebuconazole and epoxiconazole. **Toxicological Sciences**, v. 100, n. 2, p. 464–473, set. 2007.

TENG, M. et al. Sex-specific effects of difenoconazole on the growth hormone endocrine axis in adult zebrafish (*Danio rerio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 144, p. 402–408, jun. 2017a.

TENG, M. et al. Effects of the bioconcentration and parental transfer of environmentally relevant concentrations of difenoconazole on endocrine disruption in zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Pollution**, v. 233, p. 208–217, out. 2017b.

TELÓ, G. M. et al. Residues of Fungicides and Insecticides in the Rice Field. **American Society of Agronomy**, v.107, n. 3, p. 851-863, fev. 2015.

THOM, E.; OTTOW, J. C. G.; BENCKISER, G. Degradation of the fungicide difenoconazole in a silt loam soil as affected by pretreatment and organic amendment. **Environmental Pollution**, v. 96, n. 3, p. 409–414, mar. 1997.

TOLAIEB, B.; CONSTANTINO, C. J. L.; AROCA, R. F. Surface-enhanced Resonance Raman Scattering as an Analytical Tool for Single Molecule Detection. **Analyst (London)**, v. 129, n.4, p. 337-341, 2004.

TOMIAZZI, J. S. et al. Evaluation of genotoxic effects in Brazilian agricultural workers exposed to pesticides and cigarette smoke using machine-learning algorithms. **Environ Sci Pollut Res Int**, v. 25, n. 0, p.1259-1269, 2018.

TULLY, D. B. et al. Gene expression profiling in liver and testis of rats to characterize the toxicity of triazole fungicides. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 215, n. 3, p. 260–273, Apr. 2006.

VERGES, N.M. **Crítica à noção de multifuncionalidade rural em assentamentos de reforma agrária no Pontal do Paranapanema – SP**. 2013. 134f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências e Tecnologia. Presidente Prudente, 2013.

VERSTEGEN J, IGUER-OUADA M, ONCLIN K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, p.149-179, 2002.

VIEIRA, M. L. et al. Chronic exposure to the fungicide propiconazole: Behavioral and reproductive evaluation of F1 and F2 generations of male rats. **Toxicology**, v. 389, n. 3, p. 85–93, jul. 2017.

VIRGENS, A. C.; CASTRO, R. L.; CRUZ, Z. M. A. Alterações histológicas em brânquias de *Oreochromis niloticus* (Tilapia-do-Nilo) expostas o Acefato, Difenconazol e Sulfluramida. **Natureza Onile**, fev. 2015.

VOLPATI, D. et al. Molecular and Morphological Characterization of Bis Benzimidazo Perylene Films and Surface-Enhanced Phenomena. **Journal of Physical Chemistry**, v. 112, n. 0, p. 3894-3902, 2008.

WANG, K.; WU, J. X.; ZHANG, H. Y. Dissipation of difenoconazole in rice, paddy soil, and paddy water under field conditions. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 86, p. 111–115, out. 2012.

WISNIEWSKI, P. **Função espermática e reprodutiva em ratos Wistar expostos ao bisfenol A no período pré-adulto**. 2013. 81f. Dissertação (Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO), Guarapuava, 2013.

WU, Y. S.; LEE, H. K.; LI, S. F. Y.; J. High performance chiral separation of fourteen triazole fungicides by capillary electrophoresis mediated by sulfated beta-cyclodextrin. **Chromatography**, v. 912, p. 171, mar. 2001.

YILMAZ, A.; ARI, S.; KOCABIÇAK, U. Risk analysis of lung cancer and effects of stress level on cancer risk through neuro-fuzzy model. **Comput Methods Prog Biomed**, v. 137, p. 35–46, 2016.

ZANATO, V. F. et al. Sexual development of male Wistar rats. **Braz J Med Biol Res**. v.27, p.1273-80, jun.1994.

ZULAUF, W. E. O meio ambiente e o futuro. **Estudos Avançados**, v. 14, n. 39, p. 85–100, 2000.

## **ANEXOS**

## ANEXO A – PARECER FINAL

---

**UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista**


---

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

FPG - 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 "EXPOSIÇÃO AO FUNGICIDA DIFENOCONAZOL E SEUS EFEITOS SOBRE A QUALIDADE ESPERMÁTICA EM MODELO EXPERIMENTAL", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 3407 e tendo como participante(s) PATRICIA ALEXANDRA ANTUNES (responsável), ANA PAULA ALVES FAVARETO (docente), DANIEL ANGELO MACENA (técnico Participante), VITOR PEREIRA RIBAS (discente), VIVIANE RIBAS PEREIRA (discente), foi avaliado e APROVADO pelo COMITÊ ACESSOR 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 07/12/2016.

Vigência do projeto: 09/2016 a 06/2018.

Espécie/Linhagem	Nº de Animais	Peso	Idade	Sexo	Origem
Rato da linhagem Wistar	40	300 gramas	75 dias	M	Biotério da Universidade

Presidente Prudente, 13 de Dezembro de 2016.




---

Prof. Dr. Luiz Rodrigo Garcia Jr.  
 Coordenador Científico da CPDI




---

Prof. Ms. Adriana Fúlido Brito  
 Coordenadora da CEUA - UNOESTE

## **ANEXO B - GUIA PARA AUTORES**

### **Environmental Science and Pollution Research**

Link:

[http://www.springer.com/environment/journal/11356?detailsPage=pltc\\_1060392](http://www.springer.com/environment/journal/11356?detailsPage=pltc_1060392)