



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

**ESTUDO *IN VITRO* DA INTERAÇÃO ENTRE HERBICIDAS E
ESPERMATOZOIDE HUMANO UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA DE
ESPALHAMENTO RAMAN**

TAMIRIS GARBIATTI DE OLIVEIRA

Presidente Prudente – SP

2015

**ESTUDO *IN VITRO* DA INTERAÇÃO ENTRE HERBICIDAS E
ESPERMATOZOIDE HUMANO UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA DE
ESPALHAMENTO RAMAN**

TAMIRIS GARBIATTI DE OLIVEIRA

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

Orientadora: Dr^a Patricia Alexandra Antunes
Co-orientadora: Dr^a Ana Paula Alves Favareto

615.904
O48e

Oliveira, Tamiris Garbiatti de.

Estudo in vitro da interação entre herbicidas e espermatozoide humano utilizando Espectroscopia de Espalhamento Raman / Tamiris Garbiatti de Oliveira – Presidente Prudente, 2015.
98 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2015.

Bibliografia.

Orientadoras: Patricia Alexandra Antunes.

Ana Paula Alves Favareto.

1. 2,4-D. 2. Atrazina. 3. Espermatozoide Humano. 4. Espectroscopia de Espalhamento Raman. I. Título.

TAMIRIS GARBIATTI DE OLIVEIRA

**ESTUDO IN VITRO DA INTERAÇÃO ENTRE HERBICIDAS E
ESPERMATOZOIDE HUMANO UTILIZANDO A ESPECTROSCOPIA DE
ESPALHAMENTO RAMAN**

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

Presidente Prudente, 23 de Março de 2015

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Patricia Alexandra Antunes
Instituição: MMADRE - UNOESTE
Local: Presidente Prudente

Prof. Dr. Carlos José Leopoldo Constantino
Instituição: FCT - UNESP
Local: Presidente Prudente

Prof^a. Dr^a. Rebeca Delatore Simões
Instituição: MMADRE - UNOESTE
Local: Presidente Prudente

DEDICATÓRIA

Dedico a essência da minha vida, à minha mãe Maria de Lourdes Garbiatti Oliveira e ao meu pai Nivaldo Bispo de Oliveira.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Maria de Lourdes Garbiatti Oliveira e Nivaldo Bispo de Oliveira, por não medirem esforços para me ajudar, por todo amor, carinho, cuidado e paciência, por sempre acreditar em mim e serem os principais responsáveis pela minha caminhada. O meu amor por vocês é e sempre será incondicional. À minha irmã Tais Garbiatti, pela força e todo afeto, por sempre estar ao meu lado.

Aos meus tios, tias, primos e primas por serem tão queridos. Aos meus lindos avós, pelo exemplo de Fé e União, por todos os ensinamentos, por fazerem com que eu tenha ânimo para continuar, não tem como esquecer suas sábias palavras... “Isso mesmo filha, estuda! Estuda!”. À minha prima Dani Garbiatti pelas vibrações positivas. A essa minha maravilhosa família, o meu crescimento pessoal foi em função de todo este convívio.

Aos meus amigos, àqueles de longe, àqueles de perto e em especial àqueles que me acompanham e que estiveram presentes durante esta caminhada:

- Aos meus velhos amigos Thiago Miyazaki, Vanessa Ferreira, Thais Cerqueira, Lais Sena, Lilian Otu, Julius Cerqueira e Kerle Leite, Pi e Nando Hirano, por todos os conselhos, desabafos, pelas alegrias, risadas, muitas risadas, agradeço por esta linda amizade.

- Às minhas amigas Lilian Otu e Vera Lúcia, por me receberem de portas abertas aqui em Presidente Prudente, sou eternamente grata a vocês por todo o acolhimento e companheirismo.

- À Mariele, Nikele, Bruna, Éderson, Gabriele, Emilaine, Simone, Michele, Paulinho, Douglas, a vocês meus queridos da graduação, pelo laço desde há algum tempo, por serem tão especiais para mim.

- Ao Sr. Jorge Fumis, Dona Elizete Fumis e Denise Fumis, por todo apoio e carinho. Aos meus padrinhos Florindo e Neuza, pela admiração e por estarem presentes em minha vida.

- Aos membros do “Corujão”, Bruno Magro, Letícia Costa e Rodrigo Coladello, pelas longas noites de estudos, pelas pausas de muitas risadas, por todo o incentivo durante esta caminhada e pelo grande companheirismo.

A todos os professores e funcionários do MMADRE. Aos amigos que conquistei no MMADRE, por todos os momentos que passamos desde angustias a

alegrias. À Deigilam, ao Anderson, Murilo e Ronaldo pelos amigos que se tornaram e por todas as caronas.

Ao pessoal do Laboratório de Filmes Finos e Espectroscopia Raman da UNESP, ao Prof. Carlos Constantino por permitir que o trabalho fosse desenvolvido. Ao Leonardo Furini por me ensinar e acompanhar em uma das etapas do meu trabalho, principalmente por sua amizade.

À Viviane Pereira e Fernanda Rodrigues pelo auxílio das análises biológicas, aos indivíduos/voluntários que participaram desta pesquisa, aos responsáveis e funcionários dos laboratórios da UNOESTE, ao Professor Antônio Fluminhan por disponibilizar o Laboratório de Bioinformática para o desenvolvimento da pesquisa.

À Meire Judai, por estar sempre presente, pelo carinho que não se mede, por toda a confiança e por saber que posso contar com você. Obrigada querida amiga.

Agradeço de coração as minhas orientadoras, sim eu tive duas orientadoras, Ana Paula Favareto e Patricia Antunes, são pessoas incríveis, estavam sempre prontas a ensinar, a aconselhar. Agradeço por cada “luz” que vocês me deram em cada momento de dúvida, pela confiança depositada em mim e pela amizade, me espelho em vocês como profissional.

À UNOESTE e também a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela bolsa concedida.

Ao meu amigo, companheiro, confidente, aquele que está do meu lado, que caminha comigo, que sabe e vê todas as minhas alegrias e também minhas decepções, aquele que me escuta, que me aconselha, me apoia ou fala que eu estou errada, aquele que me abraça e faz graça quando estou triste, que espera eu chorar e me anima, que vibra com minhas conquistas, aquele que tem toda a paciência e calma ao lidar com meus estresses, a você meu “minino” Henrique Fumis meu muito obrigada cheio de amor.

À minha intercessora, à minha mãe, a Nossa Senhora Aparecida, por me guiar e segurar minha mão em todos os momentos que mais precisei, por renovar a minha fé e não deixar que as decepções da vida me impeçam de continuar. E sobre todas as coisas, agradeço a Deus! Obrigada Senhor pela vida, pela saúde, pela oportunidade de aprender, pela esperança que é me proporcionada a cada amanhecer!

“Desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais horas realizando que sonhando, fazendo que planejando, vivendo que esperando porque, embora quem quase morre esteja vivo, quem quase vive já morreu”.

Sarah Westphal

RESUMO

Estudo *in vitro* da interação entre herbicidas e espermatozoide humano utilizando a Espectroscopia de Espalhamento Raman

A utilização desenfreada de praguicidas, além de contribuir com o agravamento da poluição ambiental, também está influenciando de forma negativa a saúde dos seres vivos, inclusive a saúde das pessoas. Muitos estudos mostram a interferência desses produtos químicos no sistema reprodutor de animais e até mesmo do homem, podendo acarretar problemas de infertilidade, que podem ser originados, dentre vários fatores, pela baixa quantidade e qualidade espermática. Este estudo visa à avaliação de parâmetros de qualidade espermática humana e a avaliação química do núcleo do espermatozoide, por meio de Espectroscopia de Espalhamento Raman, após a exposição *in vitro* a diferentes concentrações de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e atrazina. Estes herbicidas são amplamente utilizados em todo o mundo, principalmente no Brasil, em destaque a região do Oeste Paulista, por serem empregados na cana-de-açúcar, cultura significativa da região. Neste contexto, foram selecionadas amostras de espermatozoides de acordo com os parâmetros normais de testes que avaliam a qualidade espermática, como: liquefação, viscosidade, aparência, volume, pH, concentração de espermatozoides, vitalidade, morfologia e motilidade. Amostras de sêmen de 10 doadores saudáveis foram expostas aos herbicidas de estudo, variando o tempo e a concentração. Após as diferentes exposições (0,05; 0,5; 1,0; 5,0 e 125 µg/mL, 30 e 60 min), as análises de motilidade e vitalidade foram novamente avaliadas. Os espectros de Espalhamento Raman foram obtidos das amostras de espermatozoide controle e após a exposição aos herbicidas 2,4-D e atrazina na concentração de 125 µg/mL em 60 min de incubação. A motilidade progressiva e motilidade total diminuíram a partir da concentração 0,5 µg/mL nos tempos 30 e 60 min enquanto que a porcentagem de espermatozoides imóveis aumentou. A vitalidade (espermatozoides viáveis) diminuiu significativamente ($p < 0,05$) a partir da exposição da concentração 0,5 µg/mL para o 2,4-D e a partir de 1,0 µg/mL para a atrazina, nos tempos 30 e 60min, mostrando-se que há uma tendência de alteração funcional do espermatozoide humano após a exposição a estes herbicidas, e esta alteração é intensificada com o fator de tempo de exposição e concentração dos herbicidas testados. Por meio da técnica de Espalhamento Raman foi possível caracterizar o espermatozoide humano normal e os expostos aos herbicidas e verificar a alteração na estrutura molecular nos espermatozoides expostos, evidenciadas pelas alterações nas intensidades relativas das bandas 785, 1095, 1255, 1336, 1374, 1486 e 1575 cm^{-1} do tratado com 2,4-D, e uma diminuição na banda de 1095 após a exposição à atrazina. Estes resultados indicam a alteração das bases nitrogenadas e do grupo fosfato que compõem o DNA presente no núcleo do espermatozoide.

Palavras-chaves: 2,4-D, Atrazina, Espermatozoide Humano, Espectroscopia de Espalhamento Raman

ABSTRACT

***In vitro* Interaction study between herbicides and human sperm using Raman Scattering Spectroscopy**

The unlimited use of pesticides, besides contribute with to increase environmental pollution, is also influencing negatively the health of the living beings, including the people health. Many studies show the result these chemicals in the reproductive system of animals and even same at man, can cause infertility problem, which can originate, among other factors, the low sperm quality and quantity. This is study aimed at evaluating human sperm quality parameters and the chemical evaluation of the core of the sperm trough Raman Scattering Spectroscopy, after *in vitro* exposure to different concentrations of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and atrazine. The choice of the use of the these herbicides was because they are widely use throughout the world, especially in Brazil, highlighted the west Paulista region, used at cane sugar plantation, significant culture of the region. In this context, sperm samples were selected according to the normal testing parameters that evaluate sperm quality, such as liquefaction, viscosity, appearance, volume, pH, sperm, vitality, morphology and motility. Semen samples of 10 healthy donor were exposed to study herbicides varying the concentration and time. After the different exposures (0.05, 0.5, 1.0, 5.0 and 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 30 and 60 min), the analysis of motility and vitality were again evaluated. The Raman Scattering spectra were obtained from samples control sperm and after exposure to the herbicide 2,4-D e atrazine at concentration of 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 60 min incubation. The progressive motility and total motility decreased from the concentration 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ at times 30 and 60 minutes while the percentage of sperm properties increased. The progressive motility and total motility decreased from the concentration 0.5 mg / mL at times 30 and 60 minutes while the percentage of sperm immotile increased. The vitality (viable sperm) decreased significantly ($p < 0.05$) from the exposure concentration 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 2,4-D and from 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ atrazine, at times 30 and 60 minutes, showing that there is a functional change of trend of human sperm after exposure to these herbicides, and this change is intensified with the exposure time factor and concentration of herbicides. Through the Raman Scattering technique allowed us to characterize normal human sperm and exposed to herbicides and verify the change in the molecular structure in the exposed sperm, evidenced by changes in relative intensities of the bands 785, 1095, 1255, 1336, 1374, 1486 and 1575 cm^{-1} treated with 2,4-D and a decrease at 1095 after exposure to atrazine. These results indicate the modification of nitrogenous bases and the phosphate group that make up DNA present in the nucleus of the sperm.

Keywords Palavras-chaves: 2,4-D, Atrazine, Human Sperm, Raman Scattering spectroscopy.

LISTA DE SIGLAS

2,4-D - Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

AGROFIT - Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATP - Adenosina Trifosfato

CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento

DDT – para-diclorodifeniltricloroetano

DNA – ácido desoxirribonucleico

EDR - Escritórios de Desenvolvimento Regional

ER- Espalhamento Raman

IDMAP – *Interactive Document Map*

INPEV - Instituto Nacional de Processamento de Embalagens

MEM - *Minimum Essential Medium Eagle*

p,p'-DDE - p,p'-diclorodifenildicloroetileno

PARA (Anvisa) - Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos

SINITOX - Sistema Nacional de Informação Tóxica Farmacológica

WHO – *World Health Organization*

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Área colhida em hectares dos diversos produtos agrícolas, por Região Metropolitana (RM) e Administrativa (RA) do Estado de São Paulo no ano de 2010.	16
TABELA 2 - Ingredientes ativos mais vendidos no Brasil em 2012.....	18
TABELA 3 - Classe toxicológica e cor da faixa no rótulo de produtos praguicidas ..	20
TABELA 4 - Características químicas e físicas dos herbicidas de estudo.	23
TABELA 5 - Atribuições Raman da molécula de DNA	35

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	13
2	EMBASAMENTO TEÓRICO.....	15
2.1	A cultura representativa no estado de São Paulo	15
2.2	A utilização e ocorrência de praguicidas na cultura representativa do Oeste Paulista	17
2.3	Praguicidas: conceitos, características e impactos ambientais.....	19
2.3.1	Herbicidas de estudo.....	22
2.4	Impactos na saúde causados pelos praguicidas	23
2.5	Espermatozoide humano e suas características.....	27
2.6	Espectroscopia molecular	31
2.6.1	Espectroscopia de Espalhamento Raman (ER)	31
2.6.2	Aplicações da Espectroscopia Raman em estudos biomédicos.....	33
3	ARTIGO	36
4	CONCLUSÕES FINAIS	69
5	PROPOSTAS DE TRABALHOS FUTUROS	70
	REFERÊNCIAS.....	71
	ANEXOS	80
	ANEXO 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	81
	ANEXO 2 - NORMAS DE SUBMISSÃO DA REVISTA ENVIRONMENTAL RESEARCH.....	84

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Atualmente a utilização de praguicidas vem contribuindo com o agravamento dos problemas ambientais e também de saúde humana. Para atender a demanda agroindustrial, produtos são desenvolvidos com o intuito de aumentar ou melhorar a produtividade agrícola, diminuir ou eliminar as interferências causadas por insetos, plantas daninhas, roedores, dentre outros.

Os praguicidas são desenvolvidos com o intuito de eliminar os efeitos nocivos que seres vivos podem causar nas culturas. Porém, a utilização desenfreada destes compostos tem causado diversos impactos, pois apresentam ação inespecífica, não tem seletividade e atingem organismos não-alvo, como animais e o homem (BRASIL, 2002; ALVES, OLIVEIRA-SILVA, 2003; CARSON, 2010). Esses produtos podem afetar a saúde humana, por meio da exposição ocupacional ou atingindo a população de maneira geral, através da cadeia alimentar, consumo de frutas, verduras e água contaminada.

O Brasil é considerado um dos maiores consumidores de praguicidas do mundo, e o estado de São Paulo, e mais especificamente o Oeste Paulista destaca-se neste cenário. A região do Oeste Paulista tem um relevante potencial agroindustrial, evidenciado pelo cultivo de extensas áreas de cana-de-açúcar, o que leva a um grande consumo de insumos agroquímicos.

Este fato, associado à imprudência no manejo e da utilização em larga escala destes produtos, seja na pulverização aérea ou na utilização terrestre, podem ocasionar impactos à saúde humana e ambiental (JUDAI, 2015). Neste contexto, destacam-se dois praguicidas, o 2,4-D e a atrazina, amplamente utilizados na cultura de cana-de-açúcar, e podem contribuir com agravos na saúde do trabalhador envolvido direta ou indiretamente com estes compostos.

Muitos trabalhos demonstram que exposições *in vivo* a diversos praguicidas podem afetar o sistema reprodutivo, outros demonstram que há interferência no espermatozoide após exposição *in vitro* (DALLEGRAVE et al., 2007; SWAN et al., 2003; ABARIKWU et al., 2010; ABDALLAH et al., 2010; HOSSAIN et al., 2010; DEHKHARGANI et al., 2011; PANT et al., 2013). Alguns compostos podem chegar ao sêmen e levar a alterações do desenvolvimento embrionário, afetando os espermatozoides, com diminuição da concentração e motilidade e gerar

danos ao DNA (ARBUCKLE et al., 1999; DEHKHARGNI et al., 2012; PANT et al., 2013).

São muitas as evidências de que estes compostos podem causar alterações na qualidade espermática humana, mas até o momento não se sabe de que forma estes podem influenciar a estrutura do espermatozoide. Tendo isso em vista, Mann et al. (1982) destacaram a importância de estudos da interação entre substâncias químicas no plasma seminal e os espermatozoides ejaculados.

Dessa forma, estudos que avaliem as alterações causadas por produtos químicos, por testes *in vivo* e *in vitro*, são de grande importância para fornecerem informações que podem ser utilizadas como ferramentas para ajudar a compreender a interação dessas substâncias com o organismo. Considerando a presente problemática, a utilização da técnica de Espalhamento Raman é relevante para avaliar o possível mecanismo de interação de compostos dispersos no sêmen com espermatozoides, e conseqüentemente evidenciar se existe uma interação específica espermatozoide-praguicida.

O presente estudo objetivou avaliar os efeitos da exposição *in vitro* dos espermatozoides ao 2,4-D e à atrazina, bem como a interação química espermatozoide-praguicidas utilizando a técnica de Espalhamento Raman. Dessa forma, pretendeu-se: analisar o efeito da incubação *in vitro* de diferentes concentrações de 2,4-D e atrazina sobre a motilidade e vitalidade espermática; analisar o efeito do tempo de incubação *in vitro* de praguicidas sobre a motilidade e vitalidade espermática; obter espectros de amostras espermáticas padrão e amostras expostas ao 2,4-D e à atrazina e determinar pela técnica de Espalhamento Raman a interação química entre espermatozoide e praguicidas.

2 EMBASAMENTO TEÓRICO

2.1 A cultura representativa no estado de São Paulo

Segundo Gleriani (2000), o estado de São Paulo apresenta um quadro diversificado de lavouras comerciais, dentre essas: cana-de-açúcar, cítricos, cereais, leguminosas e oleaginosas. Desde a época da colonização portuguesa, a cana-de-açúcar no Brasil começou a ser explorada para atender a demanda da produção de açúcar exportada para os países europeus. Hoje, a cana-de-açúcar é destinada principalmente para a produção de açúcar e álcool, e seus subprodutos (vinhaça e bagaço) podem ser destinados a fabricação de adubos e ração para o gado, geração de energia elétrica, entre outras aplicações (SACH; MARTINS, 2007).

Na década de 70, a produção de cana-de-açúcar teve um avanço no país. O Brasil era dependente da importação de petróleo e os baixos preços do açúcar no mercado internacional colaboraram para a criação do Programa Nacional do Álcool (Próalcohol) e a partir de então houve um incentivo do governo à produção de cana para a fabricação de álcool combustível. Essa produção se expandiu em todo o território, e o estado de São Paulo rapidamente se tornou um dos grandes produtores (SIMONSEN, 2005; GOLDEMBERG; NIGRO; COELHO, 2008).

A produção de cana em 2008 ocupou cerca de 24% da área de uso agrícola em 2008-2009 do território paulista. Nesse mesmo período, o estado de São Paulo respondeu sozinho por cerca de 60% da produção no Brasil (TORQUATO; MARTINS; TAMOS, 2009). Na Tabela 1 são apresentadas as culturas agrícolas das Regiões Metropolitanas e Administrativas do Estado de São Paulo no ano de 2010, de acordo com Sistema Estadual de Análises de Dados (SEADE, 2013). Observa-se que a cultura de cana-de-açúcar obteve a maior área colhida nesse ano, seguida pelas culturas de milho, laranja e soja. Na Tabela 1 também é possível observar que em 2010, na Região Administrativa de Presidente Prudente, o cultivo de cana-de-açúcar foi responsável por 78,80% da área colhida, seguida pela soja e o milho com 7,02% e 6,57%, respectivamente.

TABELA 1 - Área colhida em hectares dos diversos produtos agrícolas, por Região Metropolitana (RM) e Administrativa (RA) do Estado de São Paulo no ano de 2010.

Cultura	RM São Paulo	RA Registro	RA São José dos Campos	RA Sorocaba	RA Campinas	RA Ribeirão Preto	RA Bauru	RA São José do Rio Preto	RA Araçatuba	RA Presidente Prudente	RA Marília	RA Central	RA Barretos	RA Franca	RM Campinas
Amendoim	-	-	-	25	-	12.361	2.583	5.167	6.136	8.443	14.936	6.350	4.070	2.450	-
Arroz	-	1.197	11.060	3.781	1.093	318	504	583	84	77	1.311	82	58	453	25
Banana	-	33.466	1.951	2.030	990	51	246	4.982	1.913	454	1.688	92	28	2.932	118
Batata-Inglesa	260	-	107	12.962	9.308	-	-	-	-	200	-	500	-	340	70
Borracha	-	50	-	-	415	101	2.157	24.716	5.318	4.309	2.896	999	6.004	192	-
Café	-	3	236	21.141	61.485	14.527	9.357	4.790	2.276	10.006	33.333	2.830	328	41.224	543
Cana-de-Açúcar	-	9	1.936	219.602	500.455	470.640	474.327	730.043	560.396	411.065	378.036	374.155	385.292	480.678	28.391
Feijão	358	405	2.567	77.476	11.957	379	277	2.147	5.233	4.244	3.707	230	3.881	1.524	319
Laranja	28	-	200	67.352	141.821	10.260	27.457	78.449	4.083	106	6.791	114.983	77.664	2.080	10.730
Limão	9	-	12	2.586	2.824	955	477	13.246	609	56	283	4.079	1.079	3	682
Mandioca	161	548	564	6.738	8.194	244	1.097	944	762	4.895	26.770	902	299	137	1.322
Milho	597	365	8.885	250.542	108.043	9.691	23.160	63.023	47.381	34.280	170.801	16.600	13.430	21.961	7.195
Soja	-	-	200	125.738	4.925	10.715	3.517	12.845	26.475	36.624	148.713	4.070	42.127	79.155	396
Sorgo	-	-	6	3.595	151	205	185	2.530	9.070	400	326	-	3.920	11.130	20
Tangerina	245	724	48	2.154	7.912	359	992	2.111	47	67	1.549	1.159	911	2	429
Trigo	-	-	20	48.548	379	-	-	-	-	-	6.298	-	-	108	56
Outras culturas	2.090	0	409	30.804	12.292	3.842	2.084	7.301	3.171	6.435	4.653	4.396	2.098	195	2.536

Fonte: Seade (2013) (adaptado).

No Brasil, a área cultivada com cana-de-açúcar com destino à indústria sucroalcooleira é estimada em 9,13 milhões de hectares para a safra 2014/2015. O estado de São Paulo é o maior produtor com 51,7% (4,69 milhões hectares) da área plantada, seguido por Goiás com 9,3%, Minas Gerais com 8,9%, Mato Grosso do Sul com 7,4%, Paraná com 6,7%, Alagoas com 4,7%, Pernambuco com 3,2%, dentre outros estados com áreas menores (COMPANHIA NACIONAL DE ABSTECIMENTO, 2014). Conforme o levantamento realizado pela Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (2010), a cana-de-açúcar é a cultura com maior representatividade do Oeste do Estado de São Paulo.

Trabalho realizado por Sach e Martins (2007) analisou a cultura de cana-de-açúcar no Estado de São Paulo no período de 1995-2006. Os resultados do trabalho demonstraram que ocorreu um crescimento tanto em área, como em produção, sendo o maior crescimento nas regiões Oeste do estado (Presidente Prudente, Dracena, Andradina, São José do Rio Preto, entre outras). Para Dias, Guimarães e Guimarães (2013) a expansão da cana-de-açúcar no Oeste Paulista é inevitável em função dos altos investimentos. Por outro lado, de acordo com trabalho publicado pelos autores, esta monocultura está contribuindo com vários problemas ambientais relacionados ao solo, ar e recursos hídricos na região.

2.2 A utilização e ocorrência de praguicidas na cultura representativa do Oeste Paulista

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2008) o Brasil alcançou o primeiro lugar no *ranking* de maior consumidor de praguicidas do mundo. Este mercado cresce de 6,6 bilhões de dólares em 2009 para 7,3 bilhões em 2010, sendo as culturas de soja, algodão, cana-de-açúcar e citros as responsáveis por 82% das vendas (SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA AGRÍCOLA, 2011; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2012; PLANO... 2012).

O estado de São Paulo se destacou em 2006 como o maior consumidor brasileiro de praguicidas, representando 20,6% do faturamento total de praguicidas negociados no Brasil. A classe de herbicidas, praguicidas contra plantas daninhas, foi a mais utilizada com cerca de 43,1% do faturamento total do estado. Essas vendas estão destinadas principalmente ao cultivo de cana-de-açúcar, soja e

milho. Dentre as classes mais consumidas têm-se os inseticidas (30,1%), fungicidas (16,6%), acaricidas (7,6%) entre outras classes (2,6%). (FERREIRA; VEGRO; CAMARGO, 2008).

De acordo com o levantamento realizado pela COMPANHIA NACIONAL DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL (2010), da classe de herbicidas, os ingredientes ativos utilizados na cana-de-açúcar no Estado de São Paulo no 1º semestre de 2009 foram: 2,4-D, ametrina, clomazona, hexazinona + diuron, MSMA. Além do fipronil como inseticida, endossulfam como acaricida e inseticida e etefom como regulador de crescimento. Em 2012, de acordo com BRASIL (2013) dentro dos 368 ingredientes ativos apresentados pelas empresas neste ano, apenas 83 foram divulgados, correspondendo um total de vendas de 425.778,99 toneladas (ton) no mercado interno, 89% do valor total das vendas.

Dentro desse valor divulgado, a região Centro-Oeste do Brasil se destaca com a maior venda de praguicidas e afins com 134.756,74 ton, seguida pela região Sudeste com 122.788,64 ton. Porém, o estado de São Paulo continua sendo o maior consumidor (82.796,78 ton de ingredientes ativos) seguido pelo estado de Mato Grosso (71.202,27 ton) e Paraná (55.133,12 ton). Dentro deste contexto de vendas, a classe de herbicidas continua sendo a mais comercializada, sendo responsável por 62,55% das vendas (INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS, 2013). A Tabela 2 apresenta os ingredientes ativos mais comercializados no Brasil no ano de 2012.

TABELA 2 - Ingredientes ativos mais vendidos no Brasil em 2012

Ingrediente Ativo	Toneladas
Glifosato e seus sais	187.777,18
Óleo Mineral	36.962,20
2,4-D	32.163,99
Atrazina	27.139,56
Óleo Vegetal	15.615,22
Acefato	13.080,63
Enxofre	9.678,46
Diurum	8.502,78
Carbendazim	7.999,80
Mancozebe	7.134,82

Fonte: (BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, 2013) (adaptado).

Dentre o total de 425.778,99 ton de ingredientes ativos vendidos em 2012 e divulgados, o glifosato e seus sais são os mais comercializados, representando 44,10% do total de vendas. Na classe dos herbicidas, o glifosato é o mais consumido, seguido pelo 2,4-D (7,55% das vendas) e a atrazina (6,37%) (BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, 2013).

De acordo com o banco de dados do Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento em 2014, no cultivo de cana-de-açúcar foram registrados 85 ingredientes ativos, com destaque para a classe dos herbicidas (BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2014). Santos, Borém e Caldas (2012) relatam que o uso excessivo desses produtos se justifica pelo fato da cultura de cana apresentar um desenvolvimento inicial lento, o que torna longo o período que a cultura precisa estar livre de interferência das plantas daninhas.

2.3 Praguicidas: conceitos, características e impactos ambientais

Um dos fatores que contribuem para o elevado crescimento e manutenção da agricultura é o desenvolvimento de produtos, como no caso os praguicidas. Sua nomenclatura muitas vezes é divergente, podendo ser chamados de 'defensivos agrícolas', termo que privilegia seu uso favorável ao trabalho agrícola, 'agrotóxico' ou praguicida quando destaca sua toxicidade e os riscos implícitos na sua utilização (ALVES, OLIVEIRA-SILVA, 2003).

De acordo com o Decreto 4.074 (BRASIL, 2002), define-se agrotóxico como: Agrotóxicos e afins - produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento.

Os praguicidas podem ser classificados de diversas maneiras. Uma delas é de acordo com o modo de ação do ingrediente ativo no organismo alvo, podendo ser: acaricidas (ação em ácaros), bactericidas (ação em bactérias),

fungicidas (ação em fungos), inseticidas (ação em insetos), herbicidas (ação em plantas daninhas) entre outros. Outra classificação é a toxicológica, que indica se o praguicida possui maior ou menor periculosidade. A Tabela 3 apresenta essa classificação.

TABELA 3 - Classe toxicológica e cor da faixa no rótulo de produtos praguicidas

Classe Toxicológica	Toxicidade do produto	Faixa indicativa de cor
I	Extremamente tóxicos	Vermelha
II	Altamente tóxicos	Amarela
III	Mediamente Tóxicos	Azul
IV	Pouco Tóxicos	Verde

Fonte: (BRASIL. Ministério da Saúde, 1997).

De acordo com a classificação toxicológica, quanto menor a classe maior será o perigo de dano ao meio ambiente. Por determinação legal, todos os produtos devem apresentar nos rótulos faixas que indicam sua classe toxicológica, conforme a Tabela 3.

Outra forma de classificar é pela DL_{50} , definida como dose requerida para matar 50% da população de animais de testes. É uma medida padrão de toxicidade aguda, onde são realizados testes em animais, e de acordo com o modo de exposição (via oral, dérmica ou respiratória). Esses valores podem variar, de acordo com a concentração letal de 50% da população exposta. Quanto menor o valor da DL_{50} maior será a toxicidade e maior risco ao ambiente e aos seres humanos (BAIRD, 2002).

A problemática envolvida com a utilização de praguicidas engloba desde o manuseio, a aplicação até o destino final das embalagens. Por isso é essencial ter conhecimento das características dessas substâncias. Os praguicidas devem ser manipulados com cuidado, deve se conhecer a dose correta de aplicação, utilizar equipamentos de proteção individual, além de destinar as embalagens a locais corretos. A utilização inadequada pode acarretar danos à saúde humana, animal e ambiental.

A dose de aplicação está diretamente relacionada com as contaminações de alimentos consumidos pelas pessoas, podendo causar danos à saúde. Muitas vezes, os produtos são utilizados excessivamente, permanecendo

como resíduos nos alimentos. Alguns possuem os limites máximos de resíduos (LMR) acima do que é estabelecido.

Além disso, muitas substâncias proibidas (restrita naquela cultura, ou no Brasil) são utilizadas em várias culturas, conforme evidenciado pelo Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). A ANVISA avalia regularmente os níveis de resíduos de praguicidas nos alimentos *in natura* que chegam à mesa do consumidor (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013).

Os praguicidas entram nos compartimentos ambientais e seu destino e comportamento estão diretamente relacionados com suas propriedades físico-químicas. A solubilidade em água, coeficiente de partição, hidrofobicidade, biomagnificação, coeficiente de adsorção e toxicidade são propriedades que influenciam a cinética dos praguicidas ao entrarem em contato com solo, subsolo, águas superficiais e subterrâneas, ar, sedimento e a biota (GHISELLI, JARDIM, 2007).

Os praguicidas organoclorados são persistentes no meio ambiente e apresentam características hidrofóbicas, podendo causar a bioacumulação e biomagnificação nos organismos (BAIRD, 2002; SPIRO; STIGLIANI, 2008). Os primeiros relatos envolvendo esta questão ocorreram nos anos 60, quando problemas de reprodução e mortalidade de peixes e pássaros foram associados às concentrações de DDT encontrados no tecido adiposo desses animais. As concentrações dos resíduos gerados aumentavam de nível trófico para o próximo nível. Os pássaros por estarem no nível elevado da cadeia alimentar apresentaram maiores concentrações de DDT (SPACIE; HAMELINK, 1985 apud TOMITA; BEYRUTH, 2002).

Uma das principais formas de contaminação do solo, da água e também do ar é a aplicação aérea dessas substâncias. Segundo Rocha, Rosa e Cardoso (2009) o vento pode influenciar na dispersão do produto em spray, e assim podem atingir áreas distintas do local de aplicação. As águas superficiais e solos podem ser atingidos sem serem o objetivo da aplicação. Outra forma de contaminação do meio ambiente e impacto à saúde humana é a disposição inadequada de embalagens vazias. De acordo com o Instituto Nacional de Processamento de Embalagens (INPEV), a maioria das embalagens é lavável, sendo fundamental a lavagem para a devolução e correta destinação final. Uma das

recomendações é a tríplice lavagem, onde o agricultor faz um prévio tratamento das embalagens, enxaguando três vezes (INSTITUTO NACIONAL DE PROCESSAMENTO DE EMBALAGENS VAZIAS, [2014]).

É evidente que os impactos no meio ambiente têm sido intensificados a partir da modernização da agricultura e o ecossistema antes considerado natural, passa a ser considerado um agrossistema. Desta forma ocorre à expansão das monoculturas, eliminando-se a vegetação natural, reduzindo a diversidade do local, das plantas e animais. Sendo assim, as características de autorregulação dos ecossistemas naturais, que são proporcionados pela biodiversidade, são perdidas (ODUM, 1988). Alves e Oliveira-Silva (2003, p. 137) destacam que por meio da modernização da agricultura e expansão das monoculturas; “o ambiente vem sendo encarado como uma fonte inesgotável de recursos, com capacidade ilimitada para suportar os despejos químicos e as modificações topográficas” em consequência disso há a geração de degradação ambiental e danos à saúde populacional (ALVES; OLIVEIRA-SILVA, 2003, p. 137).

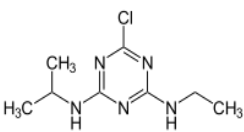
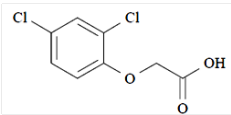
2.3.1 Herbicidas de estudo

Dentre os praguicidas existentes, foram selecionados para este estudo a atrazina e o 2,4-D, da classe dos herbicidas. Eles foram escolhidos por apresentarem um uso significativo na cultura de cana-de-açúcar e por serem possíveis agentes interferentes na saúde reprodutiva das populações envolvidas diretamente ou indiretamente com a aplicação desses produtos. Segundo Camargo (1986), herbicidas são compostos destinados a aplicação em plantas, reagem com seus constituintes morfológicos ou interferem nos seus sistemas bioquímicos, levando a efeitos fisiológicos ou morfológicos e à morte.

As classes da triazina e do ácido fenoxiacético são consideradas herbicidas orgânicos. As triazinas são classificadas como herbicidas heterocíclicos e a atrazina é considerada uma clorotriazina. A classe do ácido fenoxiacético é classificada como herbicidas homocíclicos, constituídos por anéis homocíclicos. O herbicida deste grupo origina-se por substituição de hidrogênio do anel benzênico do ácido fenoxiacético por átomos de grupos específicos que conferem fitotoxicidade a molécula. Dentro desse grupo encontra-se o ácido 2,4-diclorofenoxiacético

A Tabela 4 apresenta as características químicas e físicas dos herbicidas em estudo. De acordo com a classificação toxicológica, o 2,4-D é extremamente tóxico e a atrazina medianamente tóxica, conforme descrito nas Monografias de Produtos Agrotóxicos da ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008).

TABELA 4 - Características químicas e físicas dos herbicidas de estudo.

Nome Comum (Nome químico)	Fórmula Estrutural	Fórmula Molecular	Massa Molecular (g mol ⁻¹)	Solubilidade de (mg L ⁻¹)	DL50 oral em ratos (mgKg ⁻¹)
Atrazina (6-cloro-N2-etil-N4-isopropil-1,3,5-triazina-2,4-diamina)		C ₈ H ₁₄ ClN ₅	215.7	33	maior que 1869
2,4-D (ácido 2,4-diclofenoxiacético)		C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃	221.0	596	639

Fonte: United States Environmental Protection Agency (2005); United States Environmental Protection Agency (2006); Agência Nacional De Vigilância Sanitária (2008).

2.4 Impactos na saúde causados pelos praguicidas

A exposição aos praguicidas pode ser classificada como intencional ou não intencional. A intencional se dá pela voluntariedade do homem como uma tentativa de suicídio, por exemplo. A exposição não intencional inclui ingestão de alimentos, respiração de ar, contato com solos contaminados, ingestão de leite materno de mães expostas ou contaminadas e exposições diretas decorrente do trabalho com os praguicidas (ALMEIDA, 2002).

Os praguicidas podem penetrar no organismo por diferentes vias de exposição, podendo ser dérmica, inalatória ou digestiva. Nestes casos, inicia-se o processo de toxicocinética, que corresponde ao caminho percorrido pelo agente tóxico no organismo. No organismo, os agentes químicos são biotransformados e eliminados, porém dependendo das propriedades das substâncias, da idade e também da suscetibilidade individual podem ocorrer várias alterações fisiológicas e bioquímicas. Como alteração da expressão gênica, alteração química de proteínas específicas, alteração do funcionamento de células excitáveis, prejuízo da síntese de ATP, aumento de cálcio intracelular, indução de estresse oxidativo, acarretando diversos sinais e sintomas de intoxicação (ABDOLLAHI, 2004; GWINN et al., 2005;

BJØRLING-POULSEN; ANDERSEN; GRANDJEAN, 2008; CAO; SHAFER; MURRAY, 2011; ALAVANJA; ROSS; BONNER, 2013).

A intoxicação humana pode ocorrer de 3 maneiras:

- intoxicação aguda; após a exposição excessiva a produtos extremamente ou altamente tóxicos (Classe I ou II); os sintomas aparecem depois de algumas horas, podendo ocorrer de forma leve, moderada ou grave dependendo da quantidade de substância tóxica absorvida. Pode acarretar dermatites, náuseas, cefaleia, vômitos, parestesias, tonturas e coma.

- intoxicação subaguda: exposição a agentes altamente ou mediamente tóxicos (Classe II ou III), exposição moderada ou pequena; os sintomas aparecem mais lentos, podendo ser cefaleia, fraqueza, sonolência, mal-estar, dor de estômago, etc;

- intoxicação crônica: ocorre por exposições frequentes a baixas doses de produtos tóxicos com aparecimento tardio dos sintomas. Os danos irreversíveis, podem ser paralisias, neoplasias, lesões hepáticas e cerebrais, esterilidade masculina, entre outros (BRASIL. Ministério da Saúde, 1997; ALMEIDA, 2002).

No Quadro 1 são apresentados alguns dos principais sinais e sintomas de intoxicação por praguicidas. De acordo com os registros do Sistema Nacional de Informação Tóxica Farmacológica (SINITOX), os praguicidas de uso agrícola foram uns dos principais agentes causadores de intoxicação humana e animal em 2011. De acordo com os dados, este tipo de intoxicação representou 4,85% dos casos de intoxicação, envolvendo também medicamentos (28,08%), domissanitários (10,65%), animais peçonhentos/escorpiões (10,43%), drogas de abuso (6,08%), e produtos químicos industriais (5,85%). Além disso, os praguicidas de uso agrícola são os maiores responsáveis pelos casos de óbitos por intoxicação humana (38,05%), seguido pelos medicamentos (15,63%) e as drogas de abuso (15,04%), registrados em 2011 (SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES TÓXICO-FARMACOLÓGICAS, 2014).

QUADRO 1: Sinais e sintomas de intoxicação por praguicidas

Agudos	Subagudos	Crônicos
Cefaleia	Cefaleia	Alterações do comportamento
Coma	Dor no estômago	Atrofia de nervo óptico
Desorientação	Fraqueza	Atrofia testicular
Dificuldade respiratória	Mal-estar	Catarata
Fasciculação muscular	Sonolência	Dermatite de contato
Hemorragias	Vômito	Distúrbios neuropsicológicos
Hipersensibilidades		Esterilidade masculina
Morte		Lesão cerebral irreversível
Morte fetal		Lesões hepáticas
Náuseas		Neoplasias
Parestesias		Neuropatia periférica
Teratogênese		Neuropatia periférica tardia
Tontura		Pancitopenia
Vômitos		Paresias e Paralisias reversíveis

Fonte: Almeida (2002, p. 48).

Alguns praguicidas são considerados interferentes endócrinos, pois são substâncias que têm a capacidade de alterar o funcionamento do sistema endócrino, prejudicando os sistemas reprodutivos (como exemplo reduzindo a produção e qualidade de espermatozoides), causando câncer e outros efeitos. Podem causar interferência mesmo em baixas concentrações (GHISELLI; JARDIM, 2007).

Os herbicidas também possuem vários efeitos contra a saúde e o ecossistema. A classe das triazinas, tendo a mais conhecida a atrazina, não bioacumula-se de forma significativa, mas é bastante persistente, levando certa preocupação com as correlações entre altas concentrações em água de poço e o câncer e as malformações congênitas. Preocupante também é a relação de agricultores e outras pessoas expostas as altas concentrações deste produto por apresentarem índices de câncer mais elevados e uma maior incidência de defeitos congênitos. (BAIRD, 2002; SPIRO; STIGLIANI, 2008).

De acordo com Arbuckle et al. (1999) e Schrader e Marlow (2014), os contaminantes ambientais, especificamente os praguicidas, podem ocasionar efeitos diretos sobre a produção de espermatozoides através de desequilíbrios hormonais ou de alterações genéticas. Muitas vezes esses produtos químicos, após atingirem a

corrente sanguínea, não apresentam a capacidade de biotransformação e eliminação, e acabam sendo transportados para o leite materno ou mesmo para o sêmen. Sabe-se que o DNA do espermatozoide contribui com metade do material genético para reprodução, e com a exposição a certos produtos químicos, podem exercer efeitos em nível celular ou molecular (MANN et al., 1982; ARBUCKLE et al., 1999; BRETVELD et al., 2007; KUMAR; MISHRA, 2010).

Estudo realizado com a exposição de Diuron em embriões e espermatozoides de ostra apresentaram efeitos embriotóxicos e genotóxicos. Neste caso, houve um aumento significativo de larvas anormais, em concentrações que podem ser encontradas no ambiente (efeitos observados acima de $0,05 \mu\text{gL}^{-1}$). Segundo o autor “como diuron pode provocar defeitos de desenvolvimento, pode afetar significativamente as taxas de recrutamento de ostras, e também causar danos significativos no DNA do espermatozoide” (AKCHA; SPAGNOL; ROUXEL, 2012). Outros estudos mostraram que a exposição de ostras adultas a concentração de $0,3 \mu\text{gL}^{-1}$ de diuron por 11 semanas tiveram efeitos de aneuploidia que persistiu para a próxima geração. Neste caso, foi apresentado dano no material genético, tais como alterações no número de cromossomos (BOUILLY et al. 2007). Resultados semelhantes também foram observados após exposição de ostras à atrazina (BOUILLY et al., 2004).

Avaliação dos efeitos reprodutivos causados por um herbicida derivado de glifosato em ratos Wistar evidenciou a diminuição na produção diária de espermatozoide e um aumento no percentual de espermatozoides anormais (DALLEGRAVE et al., 2007). Outro estudo mostrou que células humanas expostas a herbicidas a base de glifosato apresentaram danos no DNA, identificados pelo ensaio cometa (GASNIER, 2009). Resultados semelhantes foram obtidos por Cavalcante, Martinez e Sofia (2008) que realizaram o teste a avaliação dos efeitos genotóxicos em peixes com a mesma classe de compostos.

Estudos realizados por Dehkhargani et al. (2011) investigaram os efeitos prejudiciais da atrazina no sistema reprodutivo masculino de ratos. Os resultados mostraram que ocorreram anomalias no espermatozoide, quebra no DNA e imaturidade nuclear. Outros trabalhos também avaliaram a genotoxicidade da atrazina (RIBAS et al., 1995; TENNANT; PENG; KLIGERMAN, 2001; ZELJEZIC; GARAJ-VRHOVAC; PERKOVIC, 2006; SANTOS; MARTINEZ, 2012) identificando que este herbicida causa danos ao DNA de peixes, ratos e células humanas. Efeitos

genotóxicos também foram evidenciados por estudos realizados com camundongos e ratos expostos a 2,4-D (VENKOV et al., 2000; AMER; ALY; 2001).

De acordo com o levantamento de Keith (1998); Ghiselli e Jardim (2007); THE LIST... 2005, muitos praguicidas são considerados interferentes endócrinos por várias organizações mundiais. Dentre os compostos, encontram-se a atrazina e o 2,4-D. A atrazina é considerada pela Agência Ambiental do Reino Unido (UKEA), Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA), Agência Ambiental do Japão (JEA) e Organização não Governamental (WWF) e o 2,4-D é considerado interferente endócrino pela USEPA, WWF e União Européia (EU).

2.5 Espermatozoide humano e suas características

Os espermatozoides são originados a partir da puberdade, por meio de um processo complexo denominado espermatogênese. A espermatogênese envolve uma série de etapas de mitose, meiose e diferenciação, controlada pelas atividades hormonais com tempo de duração de 6 a 9 semanas para ser completo. A produção ocorre nos túbulos seminíferos, localizados nos testículos (O'DONNELL, 2006; MCLACHLAN, 2010).

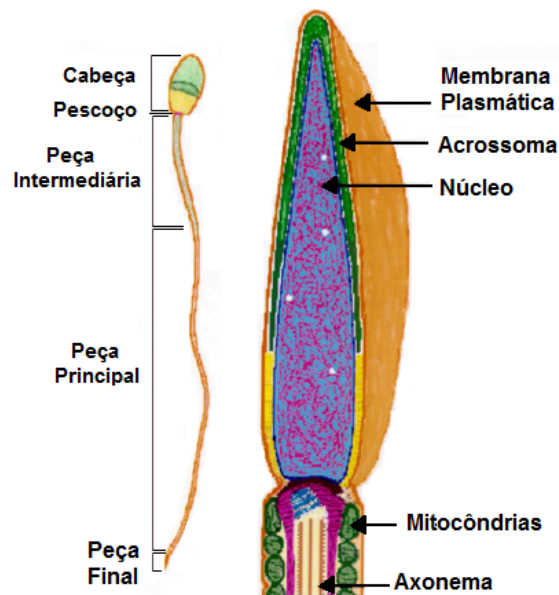
A espermatogênese inicia-se quando as espermatogônias (célula germinativa inicial) começam a se dividir por mitose produzindo sucessivas gerações de células-filhas que seguem dois caminhos; podem continuar se dividindo (chamadas de espermatogônias de tipo A, mantendo-se como células-tronco), ou as células-filhas (chamadas de espermatogônias de tipo B) onde são diferenciadas em espermatócitos primários durante sucessivos ciclos de divisão (O'DONNELL, 2006; ROBERTS, 2010).

Após serem formados, os espermatócitos primários entram na prófase da primeira divisão meiótica, surgem duas células chamadas espermatócitos secundários, que por sua vez permanecem rapidamente em intérfase e em seguida entra na segunda divisão meiótica, cada divisão gera duas células chamadas espermátides. A partir daí, inicia-se a espermiogênese, esse processo inclui a formação do acrossoma, condensação e alongamento do núcleo, desenvolvimento do flagelo e perda da maior parte do citoplasma, fazendo com que as espermátides se transformem em espermatozoides (HANDEL, 2010).

A espermatogênese depende da ação de dois hormônios secretados pela hipófise, que atuam nas células do testículo e controlam a produção dos espermatozoides. Os hormônios responsáveis são hormônio estimulador do folículo (FSH) e luteinizante (LH). O primeiro atua nas células de Sertoli, originando a síntese e a secreção de proteína ligante de andrógeno, e o segundo atua nas células de Leydig, estimulando a produção de testosterona. Após o processo de espermatogênese concluído, os espermatozoides deslocam-se para o epidídimo, onde tornam-se funcionalmente maduros e ficam armazenados (Figura 1) (MCLACHLAN, 2010).

Os espermatozoides são células altamente especializadas para transferir o DNA masculino ao ovócito. É composto por duas partes básicas que são a cabeça e o flagelo, onde respectivamente, um contém componentes essenciais (enzimas acrossômicas) para penetrar a zona pelúcida e fertilizar o ovócito II e o núcleo, e o outro contém mecanismos de produção de energia para provocar a motilidade que o espermatozoide precisa para alcançar sítio de fecundação (EDDY, 2006; WANG, 2010). A Figura 1 apresenta um esquema do espermatozoide humano.

FIGURA 1 - O espermatozoide e seus principais constituintes.



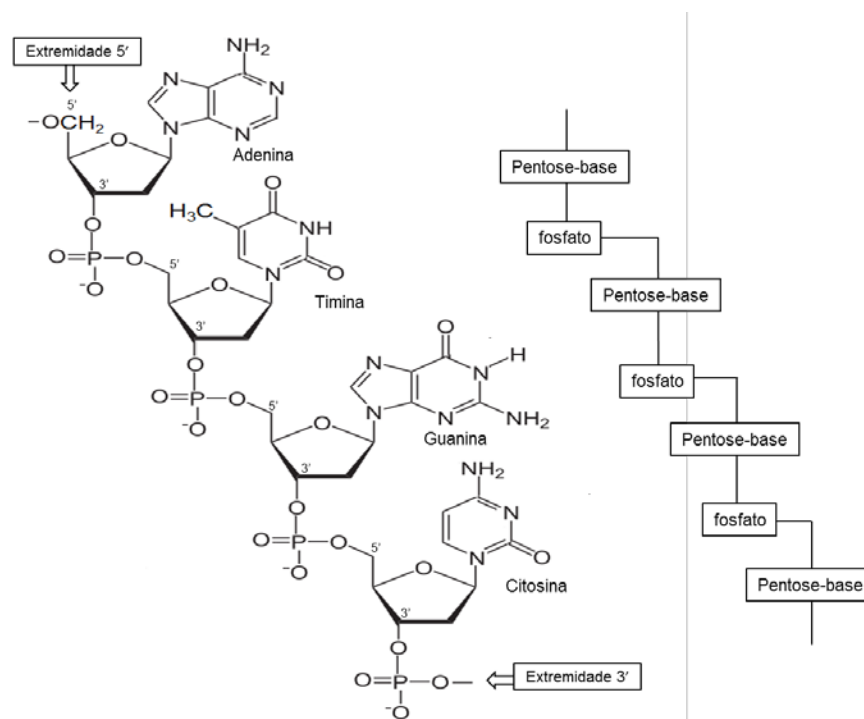
Fonte: Wang (2010, p. 12-1)

A cabeça é constituída pelo núcleo, acrossoma, citoesqueleto e uma pequena quantidade de citoplasma. O acrossoma localizado na parte superior do

espermatozoide é formado por uma vesícula contendo enzimas hidrolíticas, como neuraminidase, hialuronidase, fosfatase ácida e uma protease. O flagelo é dividido em peça intermediária (cauda), principal e final, que são formadas por componentes estruturais; axonema, bainha mitocondrial (onde ocorre a interação de microtúbulos, ATP e uma proteína com atividade de ATPase, resultando o movimento flagelar), fibras densas exteriores e revestimento fibroso. O núcleo contém cromatina altamente condensada, que é formada por um conjunto de cromossomos, cada um deles constituído por uma extensa molécula de DNA integrada a um tipo de proteína chamada histonas (EDDY, 2006; WANG, 2010).

A Figura 2 apresenta a estrutura química de um segmento hipotético de uma única cadeia de DNA. É possível observar que as ligações fosfatos entre as dexorriboses fazem com que o DNA tenha uma cadeia longa não ramificada (espinha dorsal) de unidades de açúcar e de fosfato, com as bases nitrogenadas saindo da cadeia em intervalos regulares (SOLOMONS; FRYHLE, 2009).

FIGURA 2 - Segmento hipotético de uma única cadeia de DNA mostrando as ligações dos grupos fosfatos e os grupos hidroxilas dos açúcares.



Fonte: Solomons; Fryhle (2009, p. 445)

A qualidade espermática humana é analisada por meio de um exame chamado espermograma, onde parâmetros são avaliados por meio de métodos

manuais, que envolvem apenas equipamentos de rotina nos laboratórios andrológicos. Os principais parâmetros avaliados são: volume, pH, aparência, liquefação, concentração, motilidade, morfologia do espermatozoide, entre outros. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, este exame é um dos requisitos que serve como critério importante para avaliar a capacidade reprodutora masculina, uma vez que por meio de achados laboratoriais é possível identificar as alterações na qualidade espermática, que possivelmente causam a infertilidade masculina (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

Porém, algumas vezes, mesmo que os espermatozoides estejam dentro dos padrões considerados normais, podem conter danos no material genético, que por sua vez pode gerar problemas de fertilização, afetar a qualidade do embrião, e não ter sucesso, por exemplo, na fecundação *in vitro*, ou outros efeitos (TANAGHO; McANINH, 1994; ORTEGA; BOSCH, 2010).

A avaliação do sêmen também pode ser realizada por sistema tecnológico automatizado da motilidade e morfologia espermática. Esta avaliação tem como objetivo estabelecer um padrão de exatidão das medidas desses parâmetros, como exemplo o sistema computadorizado CASA (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). Além disso, estudos na área da pesquisa estão sendo desenvolvidos com o intuito de contribuir com a avaliação complementar da estrutura dos espermatozoides humano e de animais, que envolvem a avaliação da localização e expressão de proteínas espermáticas relacionadas à interação espermatozoide-ovócito e fertilização, tais como a avaliação das proteínas: IZUMO, SP22, CRISP, Fertilina, ADAM, entre outras (EVANS, 2001; BUSSO et al. 2005; FAVARETO, 2010; ASHRAFZADEH; KARSANI; NATHAN, 2013).

Outra técnica que vem sendo recentemente utilizada na investigação da estrutura do espermatozoide humano é a Espectroscopia de Espalhamento Raman. Um das primeiras pesquisadas que abordaram essa questão foi o estudo de espermatozoide de salmão (KUBASEK et al., 1986). Com o auxílio desta técnica foi possível identificar danos na integridade do DNA do espermatozoide, além de ser possível verificar as alterações causadas por agentes físicos e químicos na estrutura do espermatozoide (HUSER et al., 2009; MEISTER et al., 2010; MALLIDIS et al., 2011; LI et al., 2014).

2.6 Espectroscopia molecular

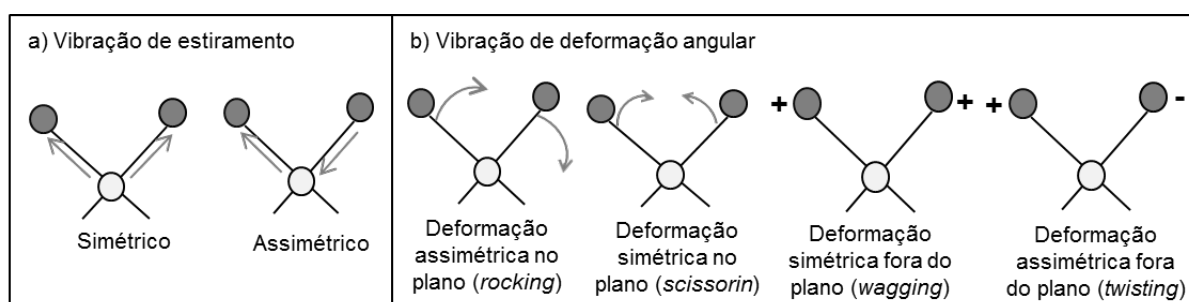
São técnicas que estudam a interação da radiação eletromagnética com a matéria, utilizada para obtenção de informações sobre estrutura molecular, níveis de energia e ligações químicas (átomos e moléculas). A partir do espectro da radiação eletromagnética pode-se inferir o mecanismo envolvido em cada técnica espectroscópica 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 transições em níveis eletrônicos, vibracionais ou rotacionais (SALA, 2008).

2.6.1 Espectroscopia de Espalhamento Raman (ER)

A Espectroscopia de Espalhamento Raman resulta do espalhamento de um feixe da radiação incidente na amostra em todas as regiões. De forma abrangente, a espectroscopia ER refere-se aos modos vibracionais da molécula, tendo o seguinte mecanismo físico: a radiação monocromática incidente, geralmente no visível, é espalhada pela molécula com uma energia ligeiramente diferente da energia da radiação incidente, de forma que a diferença em comprimento de onda entre a radiação visível incidente e a espalhada corresponde a comprimentos de onda na região do infravermelho do espectro (SALA; 1996; HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

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). A Figura 3 apresenta os principais modos vibracionais. A vibração de estiramento está relacionada a variação contínua na distância interatômica ao longo do eixo da ligação entre dois átomos. Já as vibrações de deformação envolvem uma variação no ângulo entre duas ligações e são de quatro tipos: deformação simétrica no plano, deformação assimétrica no plano, deformação simétrica fora do plano e deformação assimétrica fora do plano (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

FIGURA 3 - Modos de vibração moleculares



Fonte: Holler; Skoog; Crouch (2009)

Os modos vibracionais para o Espalhamento Raman são permitidos desde que haja uma variação da polarizabilidade durante a vibração na molécula gerada pela radiação incidente. Cabe salientar que a polarizabilidade descreve uma propriedade molecular relacionada ao grau de deformação de uma ligação (SALA; 1996; HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

A origem dos espectros se dá por meio de uma perturbação dependente do tempo, causada pela incidência da radiação eletromagnética. Essa radiação incidente causa excitação a um nível virtual e subsequente retorno para um nível energético menor ou maior. O espectro de Espalhamento Raman consiste em espalhamento de frequências mais baixas e espalhamento de frequências mais altas. Quando a energia da radiação espalhada é menor que a da radiação incidente, tem-se o espalhamento Raman Stokes, e quando ocorre o contrário, a energia da radiação espalhada é maior que a radiação incidente, tem-se o espalhamento Raman anti-Stokes. Ainda, quando os estados estacionários, final e inicial são os mesmos, diz-se que o efeito da perturbação é o espalhamento Rayleigh, para o qual as frequências das radiações incidente e espalhada são as mesmas (LASERNA, 1996; HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

O espalhamento Raman Stokes é mais intenso que o Raman anti-Stokes a temperatura ambiente, pois sua probabilidade de ocorrer é maior, uma vez que ele se dá para as moléculas situadas no estado fundamental de energia. No caso Raman anti-Stokes, o espalhamento ocorre para moléculas situadas em um estado vibracional excitado, cuja população é menor que no estado vibracional fundamental a temperatura ambiente, daí sua probabilidade de ocorrer ser menor (LASERNA; 1996).

As variações das frequências da radiação são originadas através das vibrações moleculares, e são representadas pelo número de ondas (cm^{-1}) e pela intensidade em número de fótons espalhados. Essas vibrações estão relacionadas com algumas características da molécula, como as conformações moleculares, distribuição dos elétrons nas ligações químicas, com o tipo ligação envolvida, entre outras propriedades.

2.6.2 Aplicações da Espectroscopia Raman em estudos biomédicos

A espectroscopia de Espalhamento Raman vem sendo estudada por diversos pesquisadores que fazem uso desta técnica para análise química relacionadas com a área médica, sendo utilizada como ferramenta analítica para detectar as diferenças bioquímicas das células malignas e tecidos normais. A utilização desta técnica é de extrema importância e através dela poderia levar em tempo real a detecção, o monitoramento e tratamento de patologias humanas (SILVEIRA JUNIOR et al., 2012; BODANESE et al., 2010; BAENA; LENDI, 2004; HAKA et al., 2009; LORINCZ et al., 2004; ELLIS; GOODACRE, 2006).

Esta espectroscopia apresenta várias vantagens em relação a outras técnicas ópticas. Com os avanços recentes da técnica, a sua capacidade de detectar alterações de DNA/RNA, proteínas, lipídios, faz dela uma excelente ferramenta para quantificação de modificações no nível celular (FEN et al., 2011). Além disso, o Espalhamento Raman associado à amplificação de sinal em superfícies metálicas (SERS) tem se mostrado muito eficiente no diagnóstico de câncer (VO-DINH; ALLAIN; STOKES, 2002; AOKI et al. 2013).

Em trabalho realizado com tecidos mamários foram obtidos espectros FT-Raman que levaram a informações relevantes em relação à composição molecular dos tecidos normais e das alterações moleculares no processo da carcinogênese. Neste estudo foi possível identificar as diferenças entre os espectros de mama normal e de carcinomas, sendo essas diferenças baseadas nos deslocamentos e nas variações de intensidades das bandas e achados histopatológicos (CARTER, 2004). Outros estudos semelhantes obtiveram resultados satisfatórios utilizando a espectroscopia de Espalhamento Raman para o diagnóstico como normal, benigno e maligno de tecido mamário (HAKA et al., 2009; CHOWDARY et al., 2006; MORENO, 2006).

A aplicação da espectroscopia de Espalhamento Raman no diagnóstico de câncer de próstata também foi estudada (Silva, 2009). O autor observou diferenças espectrais entre tecidos da próstata normal e com câncer nas faixas atribuídas às proteínas, lipídios e ácido nucléico. Neste caso, a técnica serviu como ferramenta para classificar e identificar mudanças bioquímicas que acontecem no tecido com câncer da próstata quando comparado com normal. Em um levantamento realizado por Fen (et al., 2011) é abordada recentes aplicações *in vivo* da espectroscopia de Espalhamento Raman para diagnóstico de diferentes tipos de câncer em humano, tais como câncer de mama, de pele, estômago, pulmão entre outros.

Por espectros vibracionais, foi possível a detecção e diferenciação de amostras de plasma seminal normal e anormal de humanos já diagnosticados. Os autores destacam que a utilização da técnica associada à análise estatística multivariada é de grande potencial para ser utilizado na avaliação da qualidade do sêmen (HUANG et al., 2011).

Estudos que utilizam a espectroscopia de Espalhamento Raman para a investigação química de espermatozoides estão sendo realizados para verificar a qualidade espermática. Huser et al. (2009) demonstraram a relação de espermatozoides anormais com sua estrutura nuclear, caracterizando o empacotamento do DNA na cromatina sendo diferenciado dos espermatozoides morfológicamente normais, que apresentam um DNA devidamente empacotado.

A caracterização do espermatozoide por Espectroscopia de Espalhamento Raman foi realizada por Meister et al. (2010), Mallidis et al. (2011), Huang et al. (2013), Li et al. (2014). Por meio das caracterizações é possível constatar 3 regiões químicas distintas do espermatozoide: a região do acrossomo, a região do núcleo e a região do flagelo. A Tabela 5 apresenta a caracterização vibracional características do DNA segundo alguns autores.

TABELA 5 - Atribuições Raman da molécula de DNA

Huser et al 2009		Huang et al 2013.		Peticolas 1994		Deng et al. 2000	
(cm ⁻¹)	Atribuições	(cm ⁻¹)	Atribuições	(cm ⁻¹)	Atribuições	(cm ⁻¹)	Atribuições
728	δA	728	A	729	A	728	δA
785	δT, δC, ed.	782	T, C	793	ed., T	785	δC
1092	νPO ₂ ⁻	1094	νPO ₂ ⁻	1094	νPO ₂ ⁻	1092	ed. νPO ₂ ⁻
1255	δA, δC			1255	T,A	1257	δC
1302	δA			1303	A	1305	δA
1335	δA, δG	1331	A, G			1338	δA, δG
1374	δT, δA, δC	1370	T, G, C	1376	A, T	1376	δT
1442	δ(CH ₂)	1450	Proteína			1440	δT
1484	δG, δA	1484	G, A			1490	δG, δA
1575	δG, δA	1575	A, G			1578	δG, δA
1665	δC, δG, δA, δT	1661– 1689	G, C, A, T			1668	δT, νC=O

Onde: C-citosina, T-timina, G-guanina, A-adenina, ed: espinha dorsal, ν=estiramento, δ=deformação
 Fonte: Peticolas (1994); Deng et al. (2000); Huser et al. (2009); Huang et al. (2013).

Apesar das pesquisas envolvendo o Espalhamento Raman e a Andrologia serem recentes, esta técnica tem se apresentado como uma ferramenta importante na elucidação de mecanismos de alterações nas avaliações reprodutivas. Segundo Liu, Zhu e Li (2014) a espectroscopia de Espalhamento Raman pode trazer uma nova era para a área de Andrologia.

3 ARTIGO

O presente estudo deu origem ao artigo “ESTUDO *IN VITRO* DA INTERAÇÃO ENTRE HERBICIDAS E ESPERMATOZÓIDE HUMANO UTILIZANDO A ESPECTROSCOPIA DE ESPALHAMENTO RAMAN.”, que deverá ser submetido ao periódico *Environmental Research*. Esta revista publica artigos originais que descrevem efeitos adversos de agentes poluentes no meio ambiente, na saúde humana e animal.

Estudo *in vitro* da interação entre herbicidas e espermatozóide humano utilizando a Espectroscopia de Espalhamento Raman

Tamiris Garbiatti de Oliveira¹, Ana Paula Alves Favareto¹, Leonardo Furini², Carlos José Leopoldo Constantino², Patricia Alexandra Antunes^{1*}

¹ Mestrado em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional, UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brazil.

² Departamento de Física, Química e Biologia, Faculdades de Ciências e Tecnologia, Unesp, Presidente Prudente, SP, Brazil.

* Corresponding author at: antunes@unoeste.br

Resumo (Abstract)

A utilização excessiva de praguicidas contribui para o agravamento da poluição ambiental e influencia negativamente a saúde dos seres vivos, inclusive das pessoas. Muitos estudos mostram a interferência desses produtos químicos no sistema reprodutor de animais e do homem, podendo acarretar problemas de infertilidade, que podem ser originados, dentre vários fatores, pela baixa quantidade e qualidade espermática. O objetivo deste estudo foi avaliar os parâmetros da qualidade espermática humana e a interação espermatozoide-herbicida, por meio de Espectroscopia de Espalhamento Raman, após a exposição *in vitro* a diferentes concentrações dos herbicidas 2,4-Diclofenoxiacético (2,4-D) e atrazina. Amostras de sêmen (10 doadores) dentro dos padrões de normalidade foram expostas aos herbicidas em diferentes concentrações (0,05; 0,5; 1,0; 5,0 e 125 µg/mL) com tempos de exposição de 30 e 60 min. As análises de motilidade e vitalidade foram realizadas. Os espectros de Espalhamento Raman foram obtidos das amostras de espermatozoide controle e das amostras expostas ao 2,4-D e atrazina na concentração de 125µg/mL e 60min de incubação. A motilidade progressiva e motilidade total diminuíram a partir da concentração 0,5 µg/mL nos tempos 30 e 60 min enquanto que a porcentagem de espermatozoides imóveis aumentou. A vitalidade diminuiu ($p < 0,05$) a partir da exposição da concentração 0,5 µg/mL para o 2,4-D e a partir de 1,0 µg/mL para a atrazina, nos tempos 30 e 60min. Pela técnica de Espalhamento Raman foi possível caracterizar o espermatozoide humano normal e os expostos aos herbicidas e verificar uma modificação na estrutura molecular nos espermatozoides expostos, evidenciadas pelas alterações nas intensidades relativas das bandas 1042, 1095, 1251, 1374 e 1486 cm^{-1} do tratado com 2,4-D, e uma diminuição na intensidade da banda de 1095 após exposição à atrazina. Pelos resultados obtidos é possível verificar que no espermatozoide humano há uma alteração funcional após a exposição *in vitro* aos herbicidas e uma indução de alteração das bases nitrogenadas e do grupo fosfato que compõem o DNA espermático.

Os destaques da pesquisa (Research highlights): - Espermatozoides de homens saudáveis foram incubados *in vitro* a 2,4-D e atrazina. - Após a exposição a motilidade e vitalidade tiveram uma diminuição significativa. - Os espermatozoides foram avaliados pela técnica de Espectroscopia Raman. - Alteração nas intensidades das bandas do núcleo do espermatozoide foi verificada. – Indução de dano na estrutura do espermatozoide após a exposição.

Palavras-chaves: 2,4-D, Atrazina, Espermatozoide Humano, Espectroscopia de Espalhamento Raman.

Introdução

Os problemas ambientais apresentam uma gama de efeitos originados por poluentes. Atualmente a grande utilização de praguicidas associada à imprudência, seja na pulverização aérea ou na utilização terrestre, vem contribuindo para o agravamento de problemas ambientais e também da saúde humana. O Brasil é considerado um dos maiores consumidores de praguicidas do mundo e o estado de São Paulo se destaca neste cenário (BRASIL, 2013). Neste contexto, destacam-se dois herbicidas, 2,4-Diclofenoxiacético (2,4-D) e atrazina, classificados como extremamente e medianamente tóxicos, respectivamente, além de serem amplamente utilizados no Brasil e no mundo (BRASIL, 2008).

Os praguicidas podem causar efeitos deletérios na saúde do homem, especialmente sobre a qualidade espermática, um dos principais fatores envolvidos na capacidade reprodutiva masculina (SHARPE, 2010). Estudos relatam que estes poluentes podem interferir na motilidade, concentração e morfologia espermática, assim como afetar o DNA (ARBUCKLE et al., 1999; SWAN et al., 2003; HOSSAIN, et al. 2010; DEHKHARGNI et al., 2012; PANT et al., 2013; CHIU et al., 2015; MELGAREJO et al., 2015).

Os praguicidas podem afetar a qualidade do espermatozoide por diferentes vias. A molécula dos produtos químicos e/ou seus metabólicos podem interferir na produção e liberação de hormônios sexuais, levando à disfunção reprodutiva (BRETVELD et al., 2007; GHISELLI, JARDIM, 2007; SCHRADER, MARLOW, 2014). Podem, pela corrente sanguínea, atingir diretamente o testículo, alterando as células germinativas, as células de Sertoli e/ou células de Leydig (BRETVELD et al., 2007). Alguns estudos demonstram que estes compostos também podem afetar a produção de fluídos de glândulas sexuais, levando a

alteração no sêmen e no desenvolvimento embrionário. Além disso, podem entrar em contato direto com o sêmen, atingindo diretamente o segmento cabeça-corpo do epidídimo ou armazenamento na cauda epididimária, influenciando a maturação espermática, como a motilidade e podendo gerar possível dano ao DNA (MANN et al., 1982; ARBUCKLE et al., 1999; BRETVELD et al., 2007; KUMAR, MISHRA, 2010; DEHKHARGNI et al., 2012; PANT et al., 2013).

Muitos estudos demonstram que exposições *in vivo* ou *in vitro* a diversos praguicidas podem afetar a reprodução. (DALLEGRAVE, E. et al., 2007; GHISELLI, JARDIM, 2007; GRIZARD et al. 2007; SWAN et al., 2003; ABARIKWU et al., 2010; ABDALLAH et al., 2010; HOSSAIN, et al., 2010; DEHKHARGANI et al., 2011; PANT et al., 2013). Pesquisas demonstram que o herbicida 2,4-D tem a capacidade de ser eliminado por meio do sêmen humano. Estudo de Arbuckle et al. (1999) detectou este composto na faixa de ppb (ng/mL) em 50% das amostras seminais avaliadas em indivíduos com exposição ocupacional recente. Os autores destacam que, como este praguicida pode ser excretado por meio do sêmen, ele pode ser tóxico às células espermáticas e também podem atingir o desenvolvimento embrio-fetal, devido à transferência para o sistema reprodutor feminino no momento da ejaculação.

A atrazina também foi destacada em um estudo de base populacional onde seus efeitos atuavam no sistema reprodutor masculino humano. A identificação de metabólitos deste herbicida em amostras de urina foi associada à baixa qualidade espermática de homens, que moravam em uma cidade onde havia agricultura intensiva e a utilização de diversos praguicidas (SWAN et al., 2003).

Tendo em vista que, as evidências de que estes compostos podem causar alterações na qualidade espermática humana, Mann et al. (1982) destacaram a importância de estudos da interação entre substância químicas no plasma seminal e nos espermatozoides ejaculados. Estes estudos podem trazer informações para melhor compreender a interação entre essas substâncias e o organismo e entender como podem gerar danos à saúde humana.

A Espectroscopia de Espalhamento Raman (ER) é uma técnica que estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria e é utilizada para obtenção de informações sobre estrutura molecular, níveis de energia e ligações químicas de átomos e moléculas (SALA, 2008). Esta técnica permite detectar alterações de DNA/RNA, proteínas, lipídios, fazendo dela uma excelente ferramenta

para quantificação de modificações celulares podendo ser promissora para melhoramento do diagnóstico de diferentes doenças (FEN et al., 2011). Além disso, o Espalhamento Raman associado à amplificação de sinal em superfícies metálicas (SERS) tem se mostrado muito eficiente no diagnóstico de câncer (VO-DINH, ALLAIN, STOKES, 2002; AOKI et al. 2013a)

Considerando a presente problemática, a utilização da técnica de Espalhamento Raman pode avaliar a possível interação dos compostos dispersos no sêmen e evidenciar onde ocorre a interação espermatozoide-herbicida. Esta técnica vem sendo utilizada recentemente em estudos para avaliar a qualidade do espermatozoide após exposição *in vitro* e verificação da qualidade da célula no sêmen, com resultados de caráter importante para a evolução da investigação do DNA do espermatozoide humano (PETICOLAS, 1995; HUSER et al. 2009; MALLIDIS et al. 2011; SÁNCHEZ et al. 2012; HUANG et al. 2013; LANG et al. 2013, LI et al. 2014)

O objetivo do presente trabalho foi verificar se espermatozoides humanos expostos *in vitro* aos herbicidas 2,4-D e atrazina apresentam alterações estruturais e interações moleculares. Para isso, foi utilizada a Espectroscopia de Espalhamento Raman que permitiu identificar as alterações ocorridas nas ligações químicas do DNA do espermatozoide e interações entre os herbicidas e o espermatozoide.

Materiais e Métodos

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética e Pesquisa (CEP), sob protocolo CAAE Nº 21623513.0.0000.5515. As amostras de sêmen foram obtidas a partir de 10 doadores saudáveis, selecionadas de acordo com os critérios de inclusão e exclusão. Os critérios de inclusão foram: homens com idade entre 18 a 45 anos, que estiverem com 2 a 5 dias de abstinência sexual e que aceitaram participar da pesquisa, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Os critérios de exclusão foram: homens fumantes, que estejam fazendo uso de medicamentos, que tenham tido febre nos 3 meses anteriores à coleta ou que apresentarem histórico de infertilidade ou outra alteração reprodutiva.

Uma avaliação para verificar a qualidade espermática foi realizada de acordo com as recomendações da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2010). Os

parâmetros espermáticos avaliados foram: liquefação, viscosidade, aparência, volume, pH, concentração de espermatozoides, motilidade, morfologia e motilidade espermática.

Exposição *in vitro* do sêmen aos herbicidas atrazina e 2,4-D

As amostras foram lavadas com o meio de cultura completo MEM (*Minimum Essential Medium Eagle*, marca Sigma), a fim de eliminar o líquido seminal, e obter somente os espermatozoides. Para isso o sêmen foi depositado em um tubo falcon contendo 3 mL de MEM e centrifugado por 10 min a uma velocidade de 1360 rpm. Em seguida, eliminou-se o sobrenadante, obtendo um *pellet* (concentrado de espermatozoides), que foi novamente lavado e ressuspendido em 2 mL de MEM.

Com o auxílio de uma microplaca de cultura de células de 96 poços foi realizada a incubação em temperatura de 37°C, sobre alta umidade. Foi feito um teste controle (sem herbicidas), onde apenas os espermatozoides diluídos em meio MEM foram incubados. Concomitantemente, os possíveis efeitos tóxicos dos herbicidas foram testados, a partir de alíquotas de espermatozoides em meio MEM incubados *in vitro* nos tempos de 30 e 60 minutos e em diferentes concentrações (0,05; 0,5; 1,0; 5,0 e 125 µg/mL) de atrazina e 2,4-D. A cada concentração e cada período de incubação os espermatozoides foram avaliados quanto à motilidade e à vitalidade.

A motilidade foi realizada em câmara de Neubauer sob microscopia de luz, em meio tampão fosfato PBS (*phosphate buffered saline*) a 37°C, sendo classificados 200 espermatozoides como: motilidade progressiva, motilidade móvel e imóvel. Com o auxílio da coloração eosina/nigrosina, a vitalidade foi realizada por meio da contagem de 200 espermatozoides ao microscópio de luz (objetiva de 100X) em óleo de imersão, sendo classificados como não corados (intactos, vivos, viáveis) e com coloração vermelha (com membrana danificada, inviáveis). Para estas análises foram aplicados os testes estatísticos de Análise de Variância com o teste “a posteriori” de Dunn, sendo considerado como nível de significância estatística o limite de 5% ($p < 0,05$), para esta análise foi utilizado o programa Instat 3.0.

Para os estudos de Espectroscopia Raman, as amostras foram divididas em amostra controle (sem exposição) e amostras expostas aos herbicidas em concentração de 125 µg/mL por 60 min, originando 3 substratos para cada doador. A concentração e o período foram definidos por apresentarem maior significância de alteração espermática funcional e a partir dos quais não houve variação significativa dos possíveis efeitos adversos detectados. Após a exposição as amostras incubadas foram lavadas e centrifugadas com soro fisiológico, a fim da eliminação do meio MEM. Em seguida 15µL da suspensão de espermatozoide lavado foi transferida para lâminas de vidro (substrato) e deixou secar ao ar.

Medidas de Espalhamento Raman

Os espectros Raman de todas as amostras foram obtidos por meio do espectrógrafo micro-Raman Renishaw modelo in-Via equipado com um microscópio Leica série DMLM, detector CCD Peltier, plataforma móvel (xyz) e linhas de laser de Argônio, Hélio-Neônio e Diodo (514, 633 e 780 nm, respectivamente). Possui redes de difração com 1200 e 1800 linhas/mm, que permite resolução de 4 cm⁻¹ e obtenção de espectros ponto-a-ponto com resolução espacial de 1 µm². Os espectros foram obtidos com energia de excitação de 514 nm, tempo de exposição de 10 segundos e 5 acumulações, utilizando lente objetiva de 100x.

A análise de Espectroscopia de Espalhamento Raman foi realizada em 21 lâminas, geradas a partir de amostras de 7 doadores. Inicialmente, espectros das células espermáticas foram coletados de diferentes regiões do espermatozoide (acrossoma, núcleo e cauda). Em uma segunda etapa, foram obtidos espectros dos espermatozoides após o tratamento *in vitro*. Escolheu-se 10 espermatozoides diferentes de um mesmo tratamento, gerando um espectro para cada espermatozoide. Os espectros foram tratados de acordo com o proposto por Sánchez (et al. 2012) e Li (et al. 2014) com adaptações utilizando o software Wire. Determinou-se a média dos espectros de cada grupo e calculou-se a intensidade relativa de cada espectro. Para a análise dos dados foi utilizado a técnica de projeção multidimensional, com aplicação dos métodos não lineares Interactive Document Map (IDMAP). A análise de dados com projeções multidimensionais (técnica de projeção multidimensional) mapeiam instâncias de dados de um espaço multidimensional em elementos gráficos em um espaço visual de forma que a

proximidade entre esses elementos reflita em algum tipo de relacionamento entre as instâncias de dados, normalmente relacionados de similaridade (TEJADA et al. 2003).

Resultados

Caracterização de amostras

Os indivíduos (n=10) apresentaram idade média de 26,3 anos e tempo médio de abstinência de 3,5 dias no momento da coleta. As amostras desses indivíduos apresentaram-se dentro do padrão de normalidade estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2010). Quanto aos parâmetros macroscópicos, o volume seminal médio observado foi de 2,86 mL, aparência, coloração e viscosidade normais, tempo médio de liquefação de 16,70 minutos e pH de 7,5. As amostras apresentaram concentração média de 58×10^6 espermatozoides/mL, e as medianas (percentagem) de $75,40 \pm 1,62$ da motilidade total, $43,06 \pm 2,56$ da motilidade progressiva, $79,73 \pm 5,49$ da vitalidade e $14,86 \pm 3,36$ de patologias espermáticas.

Análises da Motilidade e Vitalidade Após Exposição ao 2,4-D e à Atrazina

A partir da análise estatística do parâmetro da motilidade do espermatozoide humano, é possível verificar que a exposição a partir da concentração C2 com o 2,4-D (Figura 1) e atrazina (Figura 2) em ambos tempos (30 e 60 min) reduziu as motilidades progressivas e total, com conseqüente aumento da percentagem de espermatozoides imóveis. Exceções para estas alterações foram observadas em: motilidade progressiva na concentração C2, após 60 minutos de incubação com 2,4-D e 30 minutos de incubação com atrazina; motilidade total e percentagem de espermatozoides imóveis, na concentração C2 de atrazina, após 30 minutos de incubação.

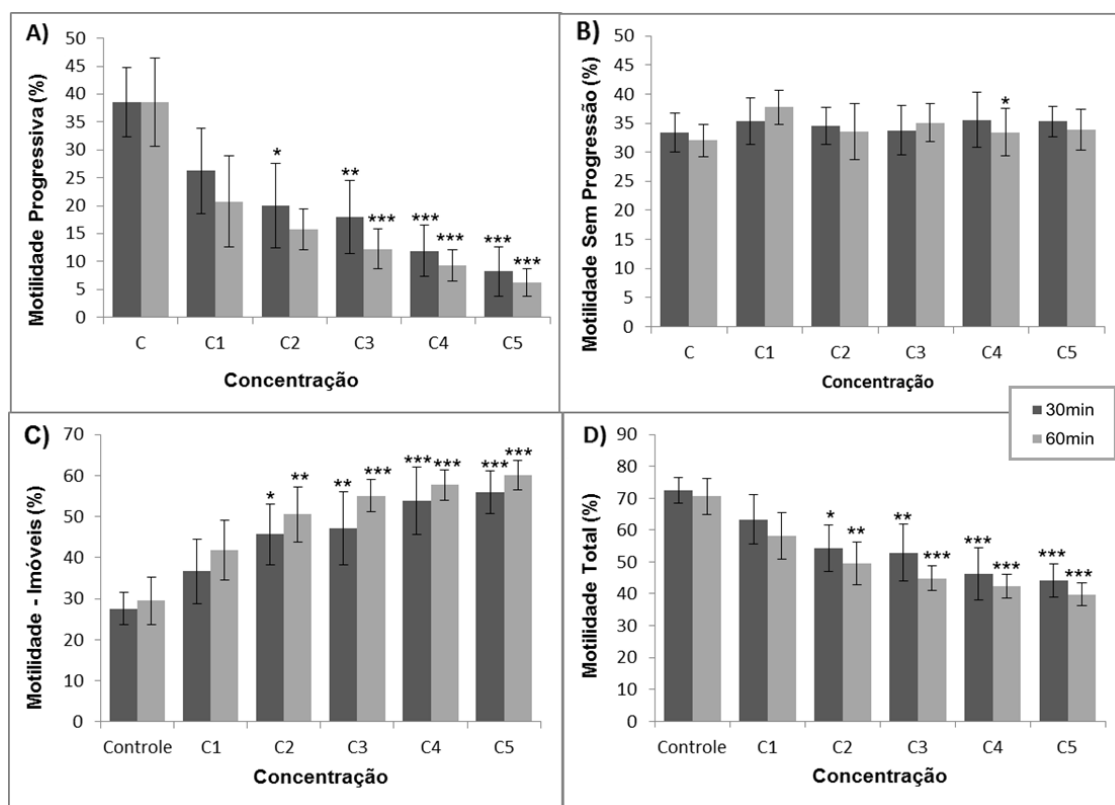


Figura 1 - Motilidade do espermatozoide (%) humano após exposição in vitro ao herbicida 2,4-D em diferentes tempos e concentrações. A) Motilidade Progressiva (%); B) Motilidade Sem Progressão (%); C) Imóveis (%); D) Motilidade Total (%). Valores expressos em mediana \pm desvio-padrão.

Concentrações ($\mu\text{g/mL}$): C1=0,05; C2= 0,5; C3=1,0; C4=5,0 e C5=125.

* Significativo $p < 0,05$; ** significativo $p < 0,01$; *** significativo $p < 0,001$, comparado com o controle (sem herbicida). Teste “a posteriori” de Dunn.

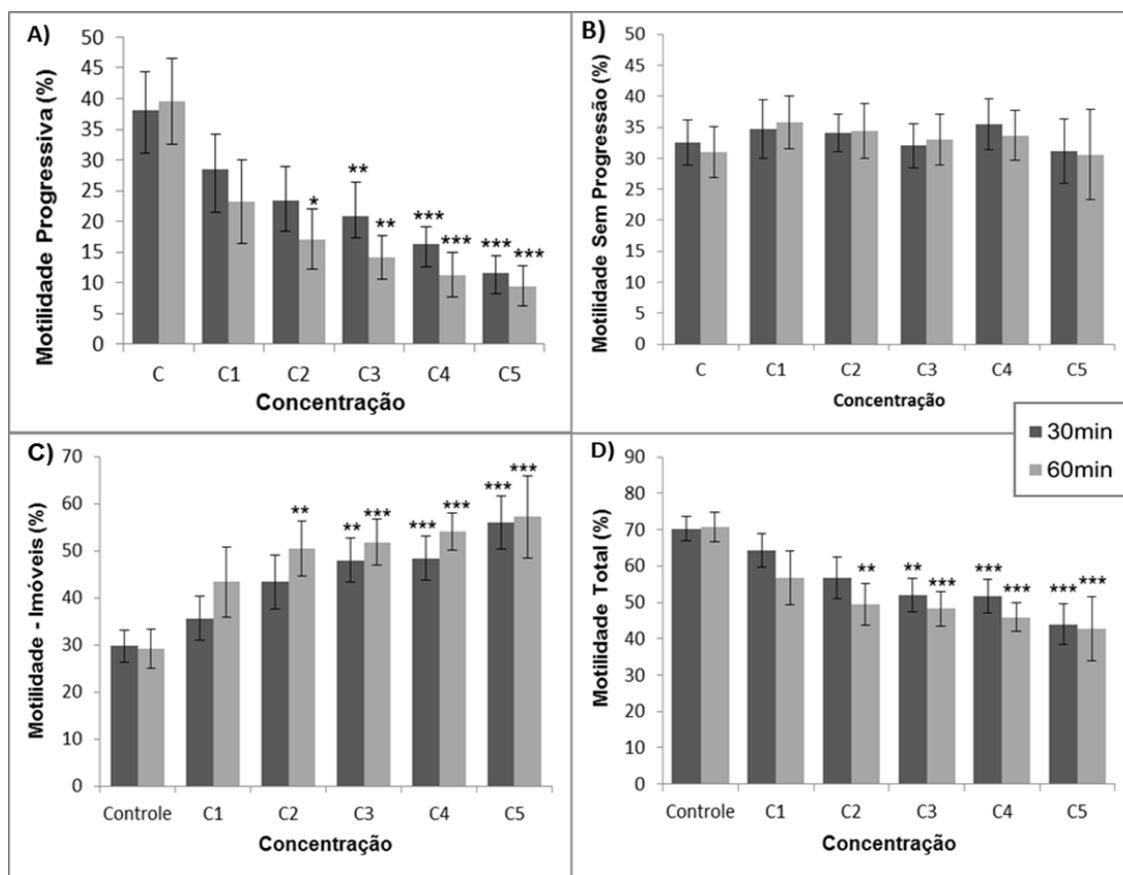


Figura 2 - Motilidade do espermatozoide (%) humano após exposição *in vitro* ao herbicida atrazina em diferentes tempos e concentrações. A) Motilidade Progressiva (%); B) Motilidade Sem Progressão (%); C) Imóveis (%); D) Motilidade Total (%). Valores expressos em mediana±desvio-padrão.

Concentrações ($\mu\text{g/mL}$): C1=0,05; C2= 0,5; C3=1,0; C4=5,0 e C5=125.

* Significativo $p < 0,05$; ** significativo $p < 0,01$; *** significativo $p < 0,001$, comparado com o controle (sem herbicida). Teste “a posteriori” de Dunn.

A vitalidade espermática foi reduzida a partir da concentração C2 de 2,4-D e da concentração C3 de atrazina (Figura 3), em ambos os tempos de incubação.

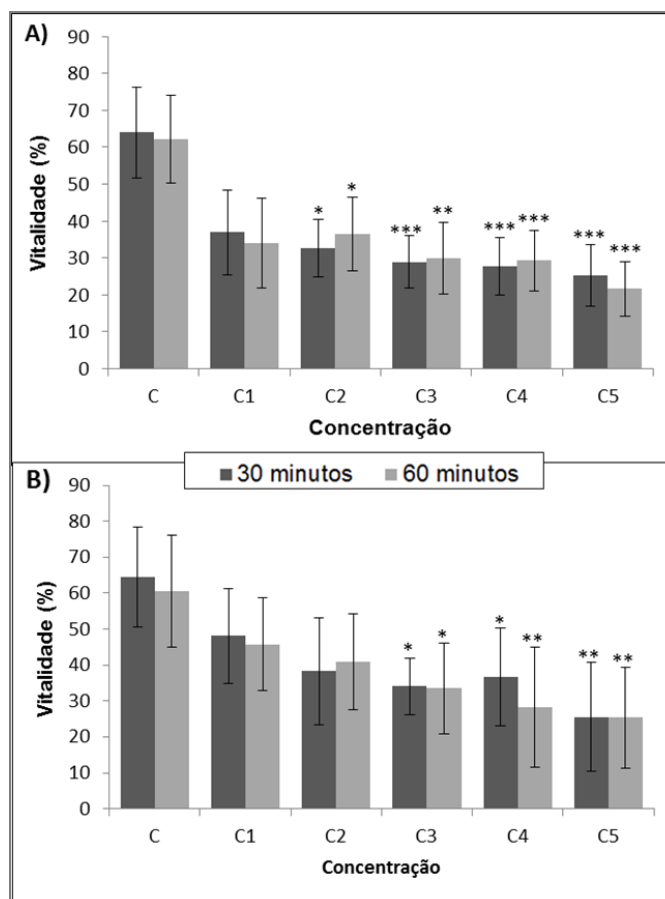


Figura 3 - Vitalidade espermática (% de viáveis) humana após exposição in vitro aos herbicidas A) 2,4-D e B) Atrazina em diferentes tempos e concentrações. Valores expressos em mediana±desvio-padrão.

Concentrações ($\mu\text{g/mL}$): C1=0,05; C2= 0,5; C3=1,0; C4=5,0 e C5=125.

*Significativo $p < 0,05$; ** significativo $p < 0,01$; *** significativo $p < 0,001$, comparado com o controle (sem herbicida). Teste “a posteriori” de Dunn.

Análise por Espectroscopia de Espalhamento Raman

Caracterização dos espermatozoides

A Figura 4-A) apresenta os espectros obtidos das 3 regiões do espermatozoide humano (cauda, acrossoma e núcleo) e o espectro do substrato de vidro. Na Figura 4-B) é mostrada a imagem óptica do espermatozoide humano e as regiões distintas do a) acrossoma, b) núcleo, e c) cauda.

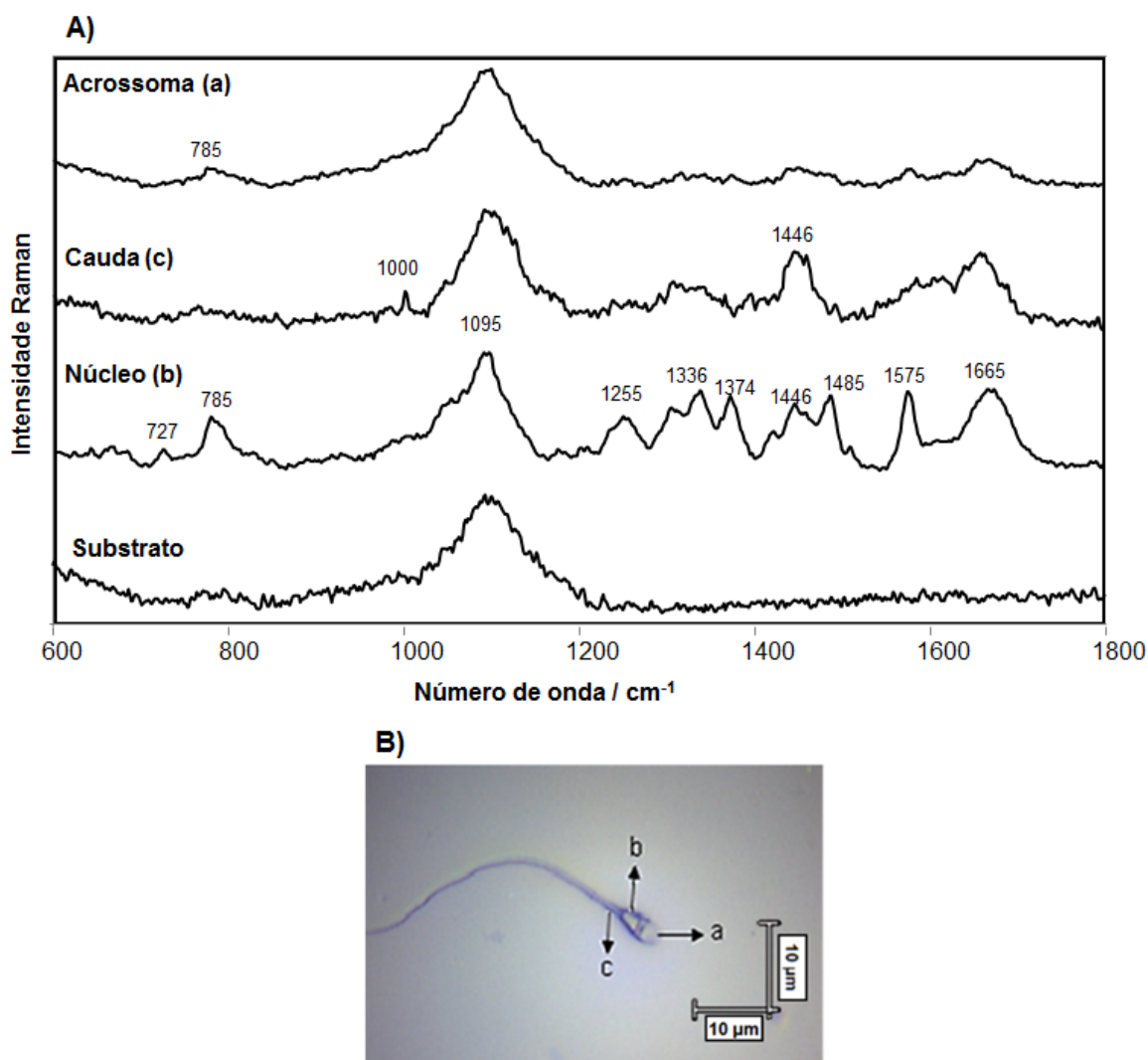


Figura 4 - A) Espectro Espalhamento Raman (ER) das 3 regiões do espermatozoide humano e do substrato de vidro, linha de laser 514 nm, sob condições de tempo de coleta de 10 s e 5 acumulações espectrais. B) Imagem óptica do espermatozoide, aumento de 100x: a) acrossoma, b) núcleo e c) cauda.

Na Figura 5 é mostrado o espectro de ER do núcleo do espermatozoide humano entre 600 a 1800 cm^{-1} . A Tabela 1 apresenta as principais atribuições dadas em função da molécula de DNA presente no núcleo e de acordo como proposto por Peticolas, 1994; Deng et al. (2000); Huser et al. (2009), Huang et al. (2013).

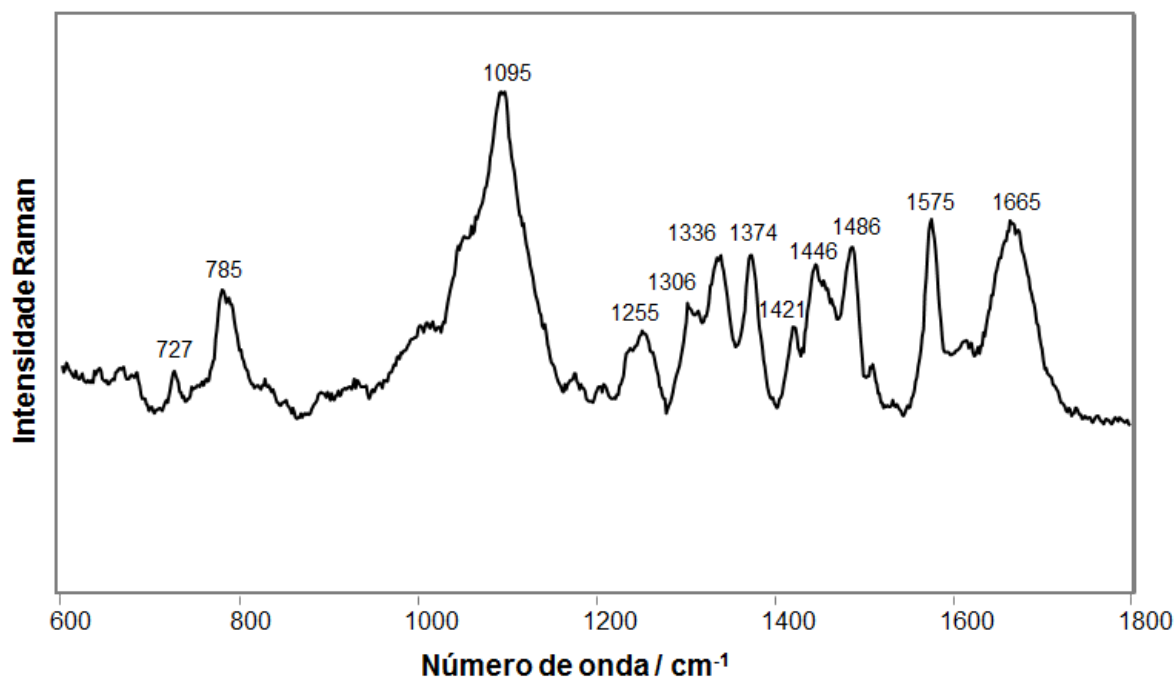


Figura 5 - Espectro de ER do núcleo do espermatozoide humano sobre vidro, linha de laser 514 nm, sob condições de tempo de coleta de 10 s e 5 acumulações espectrais.

Tabela 1 - Principais atribuições das bandas do núcleo do espermatozoide humano

Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuições
727	δA
785	$\delta T, \delta C$
1095	νPO_2^-
1255	$\delta C, \delta A, \delta T$
1306	δA
1336	$\delta A, \delta G$
1374	$\delta T, \delta A, \delta C, \delta G$
1421	δA
1446	δCH_2 (proteína)
1486	$\delta G, \delta A$
1575	$\delta G, \delta A$
1665	$\delta C, \delta G, \delta A, \delta T$ ($\nu C=O$)

Onde: ν =estiramento, δ =deformação angular

Fonte: Peticolas, 1994; Deng et al., 2000; Huser et al., 2009; Huang et al., 2013

Caracterização dos herbicidas

As Figuras 6 e 7 apresentam os espectros do 2,4 D e da atrazina na forma de pó. As Tabelas 2 e 3 apresentam as atribuições dos compostos de acordo com o proposto na literatura.

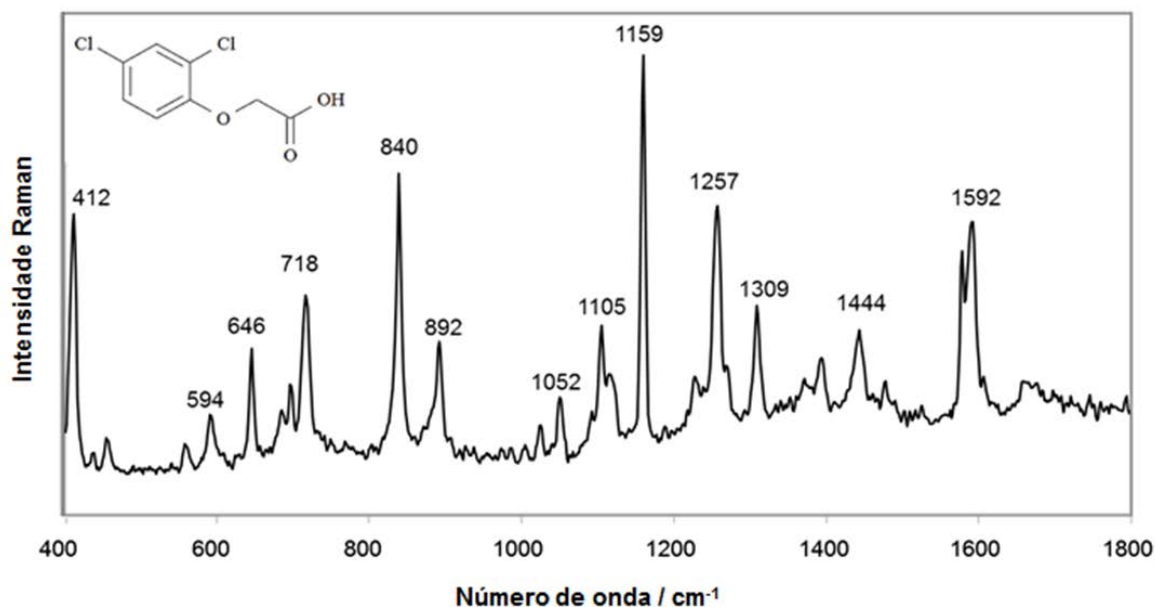


Figura 6 - Espectro ER do 2,4-D na forma de pó, linha de laser 514 nm, sob condições de tempo de coleta de 10 s e 5 acumulações espectrais.

Tabela 2 - Atribuição das principais bandas do herbicida 2,4-D

Número de onda (cm ⁻¹)	I.R.	Atribuições
412	56,2	$\nu(\text{CC})_{\text{ring}} + \nu(\text{C-Cl})$
594	11,3	$\delta(\text{CC})_{\text{ring out of plane}}$
646	28,3	$\nu(\text{CC})_{\text{ring}} + \nu(\text{C-Cl})$
718	34,0	$\delta(\text{COO}^-) + \nu(\text{CC})_{\text{ring}}$
840	66,5	$\nu(\text{CC})_{\text{ring}} + \nu(\text{C-O}) + \nu(\text{C-Cl})$
892	28,3	$\nu(\text{C-COO}^-)$
1052	17,3	$\nu(\text{CC})_{\text{ring}} + \nu(\text{CO}) + \delta(\text{CH})_{\text{ring}}$
1105	31,8	$\nu(\text{CC})_{\text{ring}} + \nu(\text{C-Cl})$
1159	100,0	$\delta(\text{CH})_{\text{ring}}$
1257	51,4	$\delta(\text{CH})_{\text{ring}} + \nu(\text{CO})$
1309	29,5	$\nu(\text{CC})_{\text{ring}}$
1444	22,3	$\delta_s(\text{CH}_2) + \delta\text{COH}$
1592	45,5	$\nu(\text{CC})_{\text{ring}} + \nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$

Onde: ν =estiramento, δ =deformação angular

Fonte: SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2007; COSTA et al. (2009)

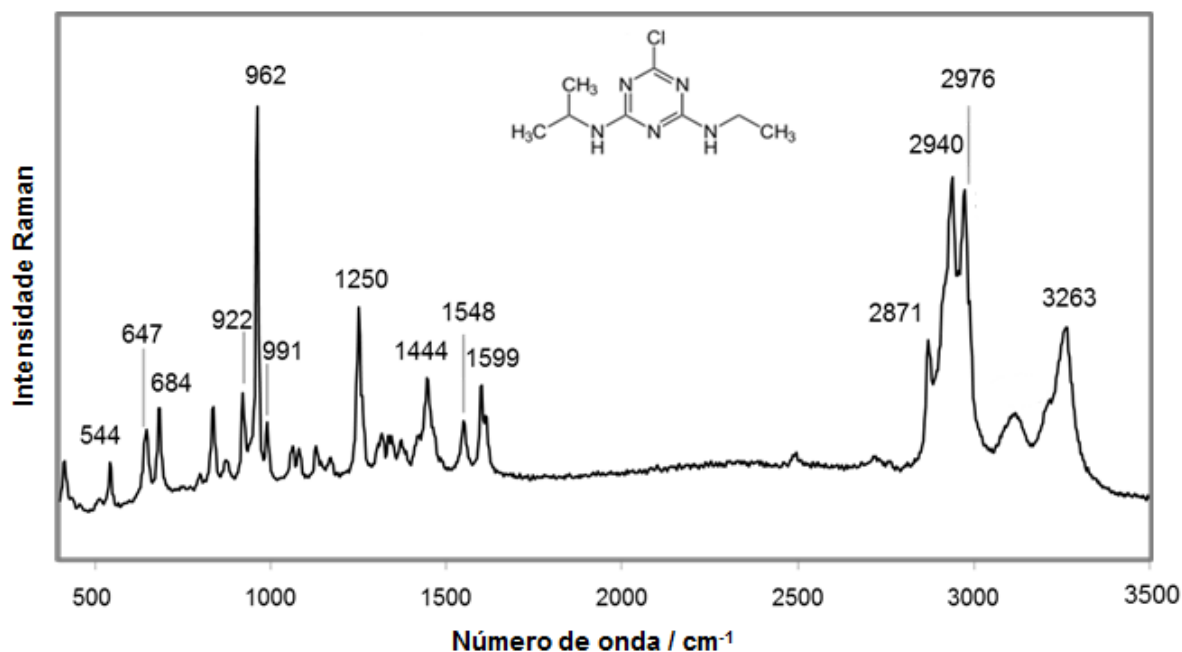


Figura 7 - Espectro Raman da atrazina na forma de pó, linha de laser 514 nm, sob condições de tempo de coleta de 10 s e 5 acumulações espectrais.

Tabela 3 - Atribuição das principais bandas da atrazina

Número de onda (cm ⁻¹)	I.R.	Atribuição
544	12,6	$\delta_{as}(\text{CH}_3\text{-CH}_2) + \delta(\text{CH}_3\text{-CH-CH}_3)$
647	19,5	$\delta_{as}(\text{N-C-N}) + \delta_{as}(\text{C-N-C})$
684	25,2	$\delta(\text{N-C-N}) + \delta(\text{C-N-C})_{\text{ring out of plane}}$
922	28,2	$\nu(\text{C-Cl})$
962	100,0	$\nu(\text{CC})_{\text{ring}}$
991	21,6	$\delta(\text{N-C-H})$ ou $\delta(\text{C-C-H})$
1250	48,5	$\nu\text{Cl}_{\text{ring}}$
1444	31,3	$\delta(\text{CH}_3)_{\text{ring}}$
1548	21,6	$\nu(\text{C-N}) + \delta(\text{C-N-H})$
1599	29,8	$\delta(\text{C-N-H})_{\text{ring}}$
2871	39,8	$\nu\text{s}(\text{C-H})$ e CH_3
2940	75,2	$\nu\text{s}(\text{C-H})$
2976	72,9	$\nu\text{a}(\text{C-H})$
3263	41,9	$\nu\text{s}(\text{N-H})$

Onde: ν =estiramento, δ =deformação angular, I. R.: Intensidade Relativa

Fonte: COSTA et al., 2009, BONORA et al., 2013

Caracterização dos espermatozoides expostos aos herbicidas

Pelos resultados obtidos nos ensaios de motilidade e vitalidade definiu-se como concentração de exposição 125 $\mu\text{g/mL}$ e tempo de exposição 60 minutos para ambos os herbicidas. Sendo assim, para um melhor entendimento serão referenciados como “controle”, os espermatozoides sem exposição aos herbicidas, e “tratados”, os espermatozoides expostos aos herbicidas, nesta concentração e tempo de incubação.

As Figuras 8 e 9 apresentam os espectros dos espermatozoides controle e tratados com o 2,4-D e atrazina. Os espectros apresentados foram obtidos da média dos espectros de um único doador. A Tabela 4 apresenta a média das Intensidades Relativas das principais bandas obtidas dos espectros dos espermatozoides do grupo controle e expostos ao 2,4-D e atrazina de um doador (doador 7).

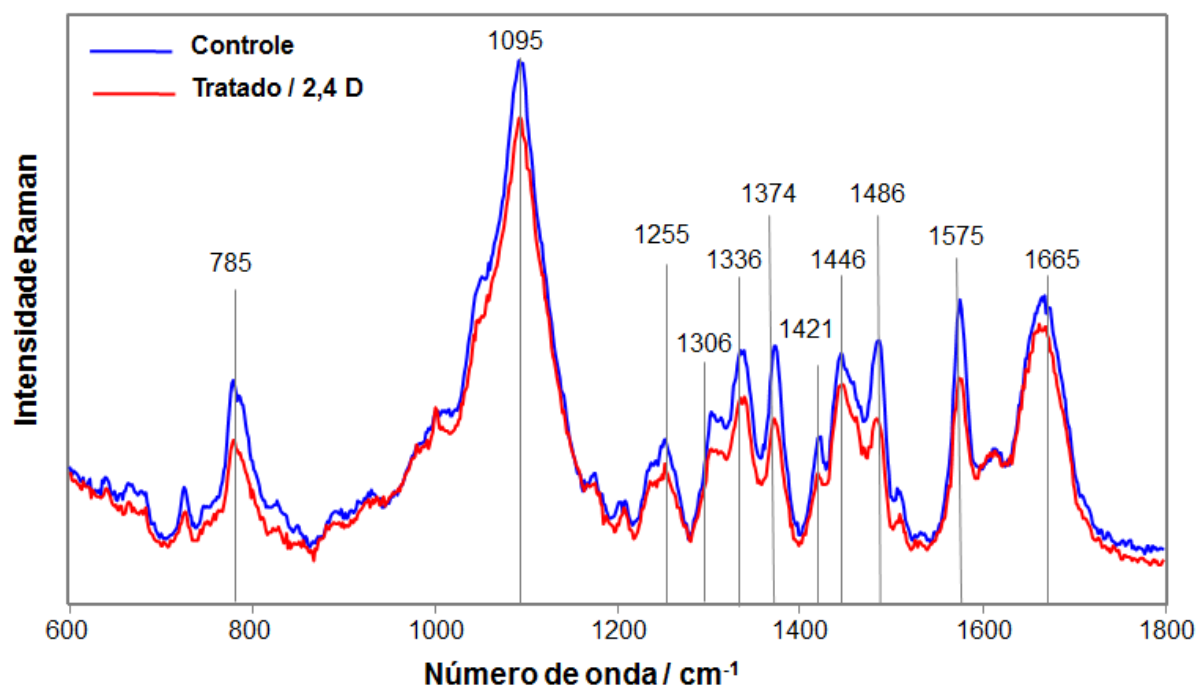


Figura 8 - Espectros de ER obtidos na região do núcleo do espermatozoide humano controle e tratado com o 2,4-D de um único doador, linha de laser 514 nm, sob condições de tempo de coleta de 10 s e 5 acumulações espectrais.

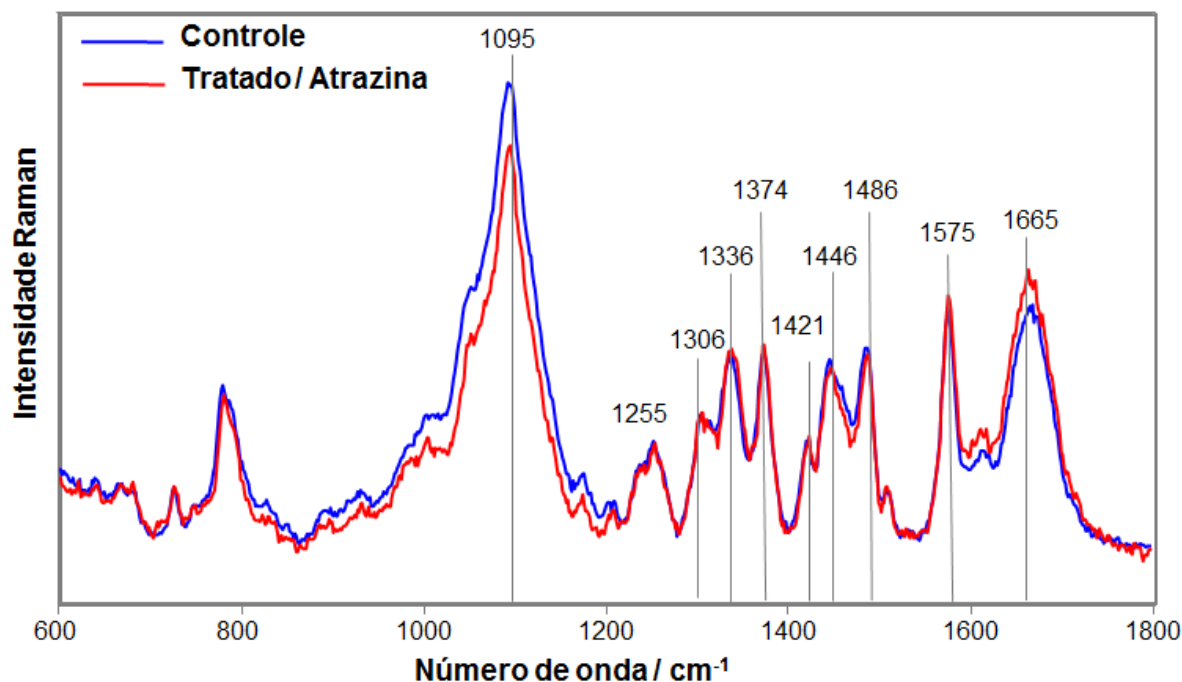


Figura 9 - Espectros de ER obtidos na região do núcleo do espermatozoide humano controle e tratado com a atrazina de um único doador, linha de laser 514 nm, sob condições de tempo de coleta de 10 s e 5 acumulações espectrais.

Tabela 4 - Média das Intensidades Relativas das principais bandas obtidas dos espectros dos espermatozoides do grupo controle e expostos (2,4-D e atrazina) de um doador (doador 7).

Número de onda (cm ⁻¹)	I.R. Controle	I. R. 2,4-D	I. R. Atrazina	Atribuições
727	21,0	16,8	25,6	δA
785	37,1	30,1	43,2	δT, δC
1095	100,0	100,0	100,0	νPO ₂ ⁻
1255	29,2	25,5	35,0	δC, δA, δT
1306	34,4	29,7	41,7	δA
1336	45,9	40,1	54,4	δA, δG
1374	47,7	35,9	56,5	δT, δA, δC, δG
1421	30,3	24,2	34,9	δA
1446	46,2	43,7	50,8	δCH ₂ (proteína)
1486	48,4	36,5	53,9	δG, δA
1575	54,2	45,4	63,8	δG, δA
1665	56,7	55,4	69,6	δC, δG, δA, δT (νC=O)

Onde: ν=estiramento, δ=deformação, I. R.: Intensidade Relativa

Fonte: Peticolas, 1994; Deng et al., 2000; Huser et al., 2009, Huang et al., 2013

Pelos espectros obtidos observa-se que há comportamentos diferentes entre os espermatozoides expostos e não expostos, e diferenças nos espectros expostos ao 2,4-D e atrazina.

A Figura 10 apresenta os gráficos onde as médias das intensidades relativas das principais bandas (727, 785, 1255, 1306, 1336, 1374, 1421, 1446, 1486, 1575 e 1664 cm^{-1}) dos espermatozoides não expostos e expostos foram tratadas utilizando a projeção multidimensional IDMAP.

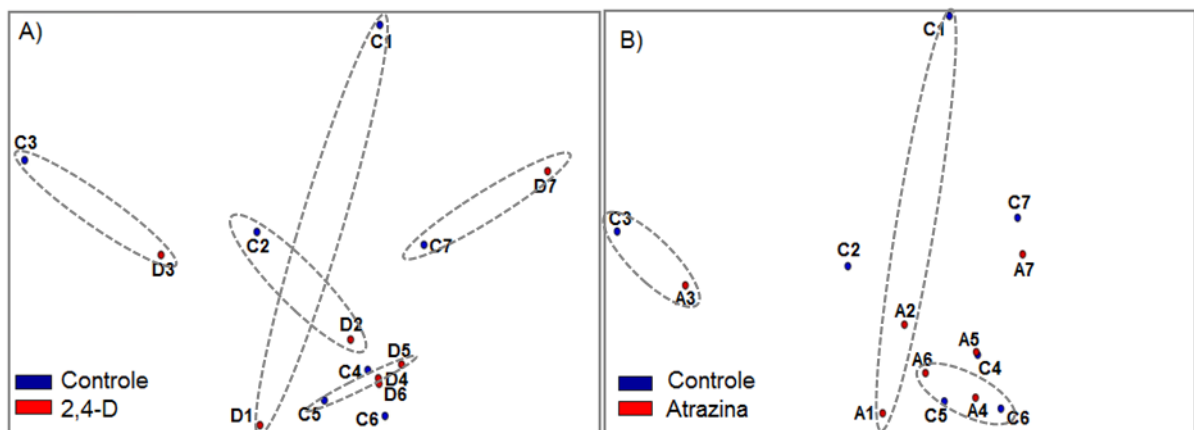


Figura 10 - Gráfico da projeção multidimensional IDMAP para as médias das intensidades relativas das principais bandas obtidas da média dos espectros de amostras (7 doadores) de espermatozoides não expostos aos herbicidas. A) Controle e 2,4-D, B) Controle e atrazina.

As Figuras 11 e 12 apresentam os gráficos das intensidades relativas das principais bandas dos espermatozoides não expostos e expostos de cada doador separadamente, utilizando a projeção multidimensional IDMAP.

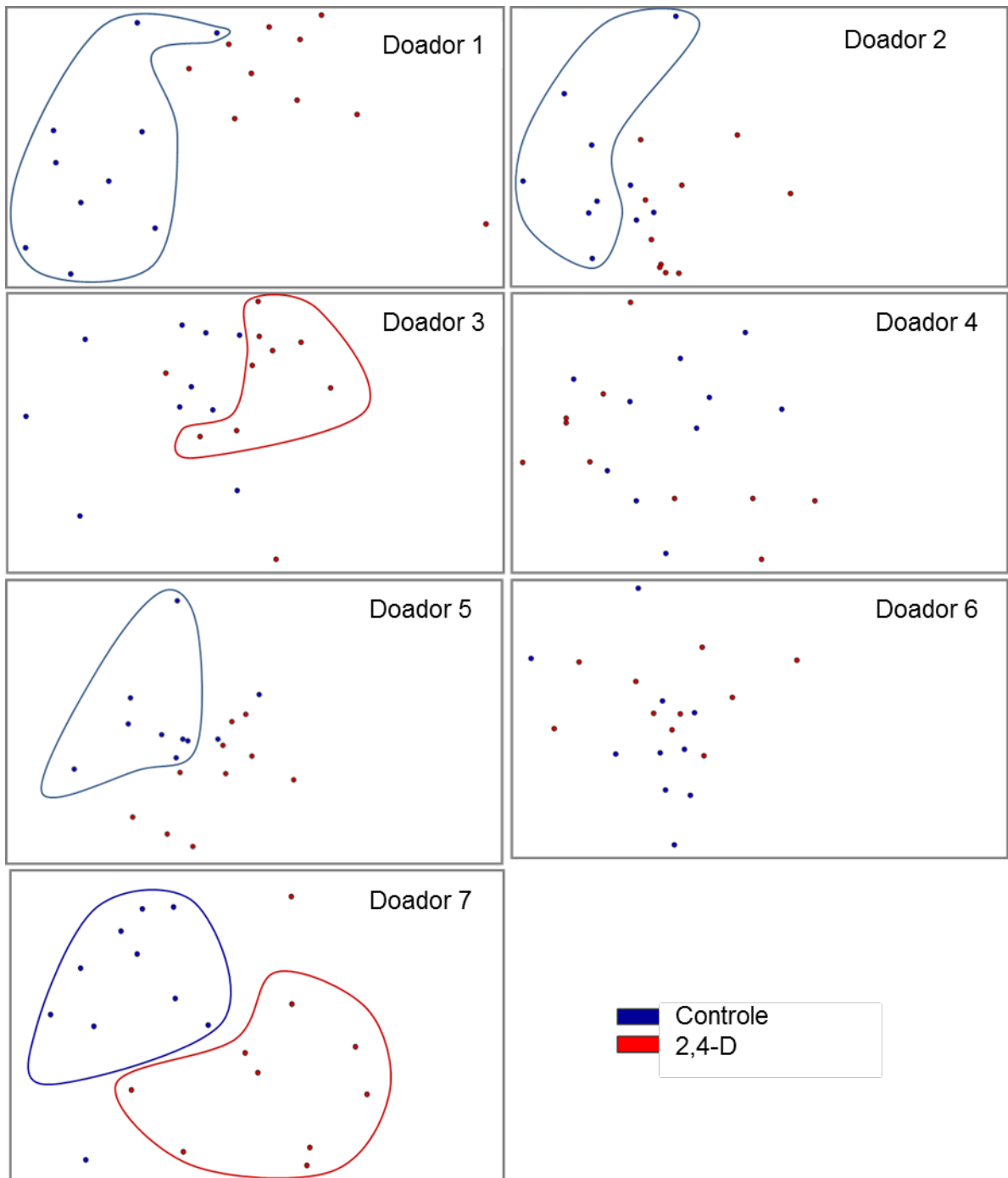


Figura 11 - Gráfico da projeção multidimensional IDMAP das intensidades relativas das principais bandas obtidas a partir dos 10 espectros de cada amostra obtida de 7 doadores. Espermatozoides não expostos (marcações em azul) e expostos ao 2,4-D (marcações em vermelho).

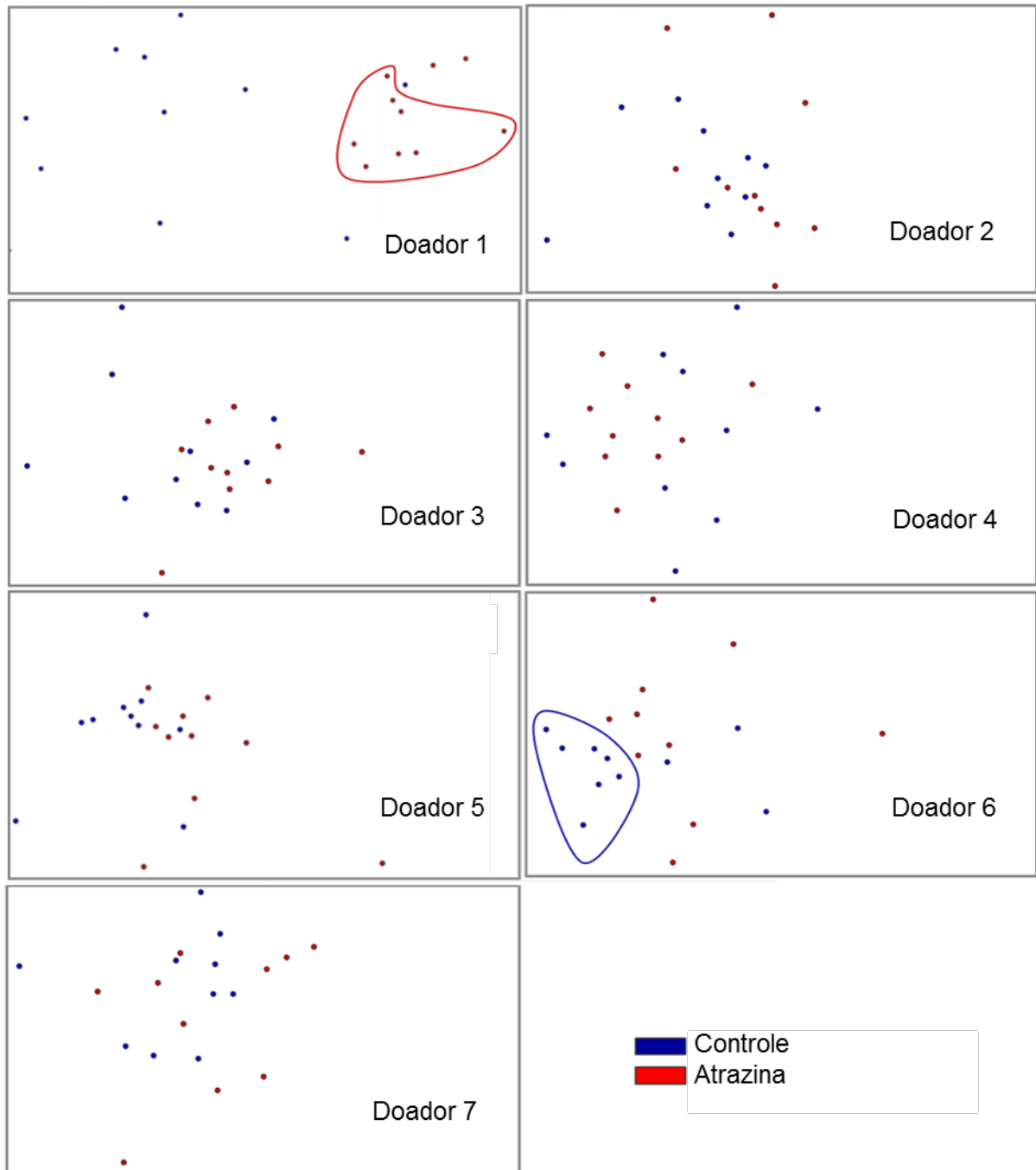


Figura 12 - Gráfico da projeção multidimensional IDMAP das intensidades relativas das principais bandas obtidas a partir dos 10 espectros de cada amostra obtida de 7 doadores. Espermatozoides não expostos (marcações em azul) e expostos a atrazina (marcações em vermelho).

Nas Figuras 11 e 12 é possível observar que há uma tendência de aproximação entre as marcações de um mesmo grupo, indicando a similaridade entre os grupos não expostos ao 2,4-D e atrazina. Nas projeções da Figura 11,

doadores 1, 2, 3, 5 e 7, observa-se também uma separação nas projeções das intensidades relativas entre os espermatozoides do grupo controle (marcações em azul) e os expostos ao 2,4-D (marcações em vermelho). Nas projeções da Figura 12, a separação entre o grupo controle (marcação em azul) e o tratado com a atrazina (marcação em vermelha) é observada apenas para os doadores 1 e 6.

Discussões

No presente estudo foi verificada a ação dos herbicidas 2,4-D e atrazina diretamente no espermatozoide humano, mostrando que estes compostos são capazes de causar alteração, tanto na motilidade, quanto na vitalidade após exposições *in vitro*. Nas condições de concentração utilizadas, 0,5; 1,0; 5,0 e 125 µg/mL e tempo de exposição de 30 e 60 minutos, foi possível observar que há interação desses compostos com o sêmen humano, podendo causar interferências na qualidade do espermatozoide. De acordo com a literatura, o 2,4-D tem a capacidade de ser eliminado no sêmen humano e a atrazina de ser eliminada na urina embora em baixa concentração, mas com a diminuição na qualidade seminal de homens que a utilizaram (ARBUCKLE et al. 1999; SWAN et al., 2003).

Trabalho realizado por Grizard et al. (2007) demonstrou que após a exposição *in vitro* de espermatozoide humano a diferentes concentrações do herbicida alacloro e em diferentes tempos de incubação foi possível verificar uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na motilidade dos espermatozoides, com destaque para a motilidade progressiva. De acordo com as Figuras 1A e 1B, a motilidade progressiva também foi diminuída significativamente ($p < 0,05$) após a exposição *in vitro* ao 2,4-D e atrazina. Observa-se na Figura 1A uma diminuição de 78,73% da motilidade dos espermatozoides expostos a 125 µg/mL do 2,4-D no tempo de 30 min e 83,90% no tempo de 60 min quando comparado ao controle. Para os expostos a atrazina (Figura 2A), ocorreu uma diminuição de 65,75% em 30 min e 76,08% em 60 min, corroborando os resultados do estudo de Grizard (et al. 2007).

Em exposição *in vitro*, espermatozoides de suínos foram incubados em concentrações de 25, 50 e 250 µg/mL de atrazina por 1 hora e tiveram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) da vitalidade (21%) e motilidade total (89%) nas concentrações de 50 e 250 µg/mL em relação ao grupo controle (BETANCOURT et al., 2006). Do mesmo modo, em estudo realizado por Abdallah et al. (2010) foi constatado um diminuição significativa ($p < 0,05$) da motilidade total e da vitalidade de

espermatozoides de ratos após exposição *in vitro* ao inseticida deltametrina em diferentes concentrações por 3h. Os resultados mostraram que esses parâmetros foram sensíveis ao composto utilizado. Pelos resultados obtidos (Figura 3B) também foi possível verificar uma diminuição significativa ($p < 0,05$) de espermatozoides viáveis (com membrana intacta) e na motilidade total (junção de espermatozoides com progressão e sem progressão) após incubação de espermatozoides humano à atrazina. Em concentração de 125 µg/mL com a exposição de 60 minutos ocorreu a queda de 39,55% na motilidade total e de 58,15% na vitalidade.

Abarikwu et al. (2010) estudaram os efeitos da atrazina sobre as funções reprodutivas de ratos expostos por via oral a diferentes doses (0, 120, 200 mg/kg do peso corporal) durante 7 e 16 dias. Os resultados sugeriram que este herbicida prejudica a função reprodutiva e provoca destruição no sistema de defesa antioxidante do testículo e epidídimo, levando ao aumento do estresse oxidativo. Sugere também que em altas doses do herbicida, ocorre um efeito adverso sobre a produção diária e motilidade espermática e aumento de espermatozoides mortos e morfologicamente anormais.

Segundo Aitken e De Iulius (2010), o estresse oxidativo é um dos mecanismos de surgimento de efeitos adversos sobre os espermatozoides, pois danifica a membrana espermática e conseqüentemente interrompe e/ou diminui o movimento flagelar. A motilidade dos espermatozoides depende em grande parte da geração sustentada de ATP por meio das vias oxidativas, porém quando há interferência nas reações oxidativas mitocondriais, há uma produção excessiva de espécies reativas de oxigênio e radicais livres, mecanismos que por sua vez afetam as funções normais da motilidade (MANDANI, DESAI, HIGHLAND; 2013). O estresse oxidativo pode ser associado à função espermática defeituosa, ao ataque da integridade da membrana plasmática e ser responsável por criar danos ao DNA, efeitos que podem ser ocasionados por diversos fatores, dentre eles a exposição à xenobióticos (AITKEN, 1999; AITKEN, DE IULIIS, 2010).

O efeito dos herbicidas sobre a motilidade e vitalidade dos espermatozoides segundo Betancourt et al. (2006) pode ser explicado pela possível ação adversa sobre a cadeia respiratória da bainha mitocondrial, que é essencial para o fornecimento de energia para o batimento flagelar e para a sobrevivência espermática. Esta relação também é destacada por Grizard et al. (2007) e Tavares (et al. 2014), onde a alteração na fisiologia da mitocôndria levou a deficiência da

motilidade do espermatozoide após exposição *in vitro* com alacloro e p,p'-DDE (p,p'-diclorodifenildicloroetileno), respectivamente.

Estudos mostram a capacidade do herbicida 2,4-D em produzir espécies reativas de oxigênio em rim de peixes (Ozcan Oruc, Sevgiler, Uner; 2004), fígado de ratos (Tayeb et al., 2010) e em eritrócitos humanos após exposição *in vitro* (Bukowska, 2003). Também é mostrado que a atrazina produz espécies reativas de oxigênio como mostrado na interferência na qualidade espermática de roedores (Dehkhargani et al., 2011; Dehkhargani et al., 2012), em fígado de peixes (Jin et al., 2010) e eritrócitos de ratos (Singh, Sandhir, Kiran; 2010). Estes estudos mostram a capacidade de indução de estresse oxidativo causado pela toxicidade dos herbicidas utilizados neste estudo. No presente estudo não se utilizou nenhuma técnica de determinação de estresse oxidativo, porém a interferência na motilidade e vitalidade dos espermatozoides tratados *in vitro* pode estar relacionada a este mecanismo de toxicidade dos herbicidas 2,4-D e atrazina.

A partir dos resultados de Espectroscopia de Espalhamento Raman, na Figura 4, observa-se que os espectros das 3 regiões distintas do espermatozoides possuem bandas não coincidentes (727, 1255, 1336, 1374, 1421, 1446, 1486, 1575, 1665 cm^{-1}) e bandas coincidentes (1095, 1575, 1446-1447 cm^{-1}). Mallidis (et al., 2011) caracteriza a região da cauda por bandas em 1000 cm^{-1} e 1447 cm^{-1} atribuídas, respectivamente, a penilalina e a deformação do metileno, indicando a presença de proteína. Os mesmos autores caracterizam a região do acrossoma e do núcleo com bandas em 785 cm^{-1} , enquanto Huang (2013) em 783 cm^{-1} e Meister (2010) em 788 cm^{-1} . Estes autores atribuem estas bandas às bases nitrogenadas timina, citosina e a espinha dorsal do DNA. Além disso, eles destacam que a região do núcleo é caracterizada pelas bandas 728 cm^{-1} e 1092-1094 cm^{-1} atribuídas a vibração da adenina e à espinha dorsal do grupo PO_4^{-3} respectivamente (HUSER et al., 2009; MALLIDIS et al., 2011; Huang et al., 2013). Outra banda característica na região do núcleo é em 1575 cm^{-1} que está associada ao modo de vibração das bases adenina e guanina, que caracterizam a presença do DNA segundo Mallidis et al. (2011).

A Figura 5 apresenta o espectro ER do núcleo do espermatozoide humano entre 600 e 1800 cm^{-1} e a Tabela 1 as principais atribuições. Segundo Thomas e George (1999), esta região espectral é a mais importante por conter praticamente toda informação vibracional da molécula de ácido nucléico. Em função

desta informação, para o acompanhamento das possíveis alterações do espermatozoide após a exposição aos herbicidas, foram selecionadas bandas do núcleo do espermatozoide em: 785 cm^{-1} (timina e citosina), 1095 cm^{-1} (deformação fosfato), 1255 cm^{-1} (citosina, guanina, adenina e timina), 1336 cm^{-1} (adenina e guanina), 1374 cm^{-1} (citosina, guanina, adenina, timina), 1486 cm^{-1} (guanina e adenina) e 1575 cm^{-1} (guanina e adenina). De acordo com o espectro na Figura 5 e atribuições apresentadas na Tabela 1, observaram-se pequenas variações nas bandas atribuídas quando comparadas com trabalhos de Peticolas (1994), Deng (2000), Huser (2009) e Huang (2013). Estas diferenças não são significativas, uma vez que estão presentes no intervalo de resolução do equipamento (4 cm^{-1}).

A Figura 6 apresenta o espectro de ER do 2,4-D. O que caracteriza a molécula do 2,4-D é o grupo do ácido carboxílico (C-COO^-) e as ligações de cloro e carbono. Duas bandas provenientes da deformação axial (estiramento) de C-O e da deformação angular (deformação) de C-O-H são características dos ácidos carboxílicos e aparecem entre 1210 cm^{-1} e 1320 cm^{-1} e entre 1395 cm^{-1} e 1440 cm^{-1} , respectivamente (SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2007; BONORA et al., 2013). Estas duas vibrações são evidenciadas em 1257 cm^{-1} e 1444 cm^{-1} . As ligações de C-H do anel sofrem deformação angular no plano e aparecem entre $1000\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$, sendo possível ressaltar na Figura 6 as bandas características desta ligação em 1052 , 1105 , 1159 , 1309 cm^{-1} . Outra característica evidenciada neste tipo de composto são as ligações de deformação axial C=C do anel que se encontram entre $1500\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$, localizada em 1592 cm^{-1} (SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2007; BONORA et al., 2013).

A ligação de cloro também é de fundamental importância para a caracterização do composto. A ligação C-Cl é encontrada entre 600 e 800 cm^{-1} , atribuída as vibrações de deformação axial da ligação carbono-halogênio, sendo possível evidenciar esta ligação em 412 , 840 cm^{-1} de acordo com a Tabela 2. Nos cloro-benzenos as bandas de deformação axial da ligação C-Cl estão entre 1089 e 1096 cm^{-1} , sendo evidenciada em 1105 cm^{-1} (SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2007; BONORA et al., 2013).

Para as atribuições da atrazina são destacadas as ligações de cloro e grupos amina e metila. As aminas apresentam uma deformação angular no plano de N-H entre 1580 cm^{-1} . No espectro obtido (Figura 7) pode-se ressaltar essa vibração em 1599 cm^{-1} . Os heteroátomos que contêm um grupo N-H mostram absorção de

deformação axial de N-H na região 3220-3500 cm^{-1} , onde é possível observar no espectro (Figura 7) em 3263 cm^{-1} . (SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2007). De acordo com BONORA et al. (2013), a banda em 1250 cm^{-1} está relacionada ao modo de estiramento entre o anel e o átomo de cloro. A vibração de deformação assimétrica do CH_3 está próxima de 1450 cm^{-1} e foi localizada em 1444 cm^{-1} . A vibração da cadeia é atribuída à banda 962 cm^{-1} .

A Figura 8 apresenta os espectros obtidos do espermatozoide humano sem exposição e expostos ao 2,4 D em concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$ e tempo de exposição de 60 min. Comparando os dois espectros observa-se diminuição na intensidade relativa das principais bandas como é possível notar na Tabela 4 (I.R. 2,4-D). Nota-se também alteração na intensidade relativa de algumas bandas quando comparada a banda 1095 cm^{-1} , a de maior intensidade do espectro. Dentre estas bandas destacam-se as 785, 1255, 1336, 1374, 1486 e 1575 cm^{-1} .

A banda em 1486 cm^{-1} é atribuída à vibração de deformação das bases purina (adenina e guanina) e a banda 785 cm^{-1} é atribuída à vibração de deformação das bases pirimidinas (citosina e timina). Pelo espectro da Figura 8, observa-se que há uma diminuição na intensidade relativa destas bandas, quando comparada com intensidade relativa da banda 1095 cm^{-1} , indicando alteração na ligação destas bases após exposição ao 2,4-D. Situação similar ocorre com a banda 1255, 1336, 1374 e 1575 cm^{-1} atribuídas as vibrações das bases nitrogenadas que compõem o DNA (δA , δC , δA , δT) (HUSER et al., 2009).

Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Li et al. (2014) após a exposição *in vitro* de espermatozoides humano ao ácido maleico em diferentes concentrações por 45 minutos. Os autores constataram que as intensidades das bandas Raman correspondentes ao DNA, tais como 787, 1094, 1337 e 1421, tiveram uma redução em comparação ao controle, destacando que estas mudanças indicam a destruição do DNA.

A Figura 9 apresenta os espectros obtidos do espermatozoide humano controle e exposto à atrazina em concentração 125 $\mu\text{g/mL}$ e tempo de exposição de 60 min. Para este tratamento não foi possível verificar uma alterações significativa nas intensidades relativas das bandas atribuídas às vibrações das bases nitrogenadas. No entanto, de acordo com a intensidade relativa calculada (Tabela 4 I.R. atrazina) observa-se que há um aumento das intensidades relativas das bandas atribuídas as bases nitrogenadas dos espermatozoides quando comparada ao

controle. Este aumento pode estar associado a alteração na intensidade relativa na banda em 1095 cm^{-1} . A relação entre as bandas I (785 cm^{-1}) / I (1095 cm^{-1}) é maior nos espectros dos tratados com atrazina (0,43) do que dos espectros do controle (0,37) indicando uma diminuição da intensidade da banda 1095 cm^{-1} como é evidenciado na Figura 9. Esta diminuição da banda 1095 cm^{-1} está de acordo com resultados obtidos por Li et al. (2014).

Por outro lado, observa-se um aumento da intensidade relativa da banda em 1095 cm^{-1} após a exposição ao herbicida 2,4-D. Para melhor evidência do aumento da intensidade, verifica-se que a relação entre a banda 785 e 1095 cm^{-1} no controle é de 0,37 e no tratado de 0,30, porém este resultado também pode ser um indicativo de alteração no grupo fosfato após a exposição *in vitro*. Li et al. (2014) evidenciam uma alteração na parte intermediária do espermatozoide, indicando que as bandas em 1250, 1374, 1421 e 1583 cm^{-1} relacionados com o DNA mitocondrial sofrem uma diminuição ou mesmo desaparecem em comparação ao controle, sugerindo um dano no DNA da mitocôndria. De acordo com os resultados obtidos é possível identificar alterações similares nas bandas 1255 e 1374 cm^{-1} que correspondem à adenina, citosina, timina e guanina do DNA nuclear do espermatozoide, mostrando assim que há uma alteração estrutural após a exposição ao 2,4-D.

A variação na banda 1255 cm^{-1} também foi observada por Lang et al. (2013) após análise *in vivo* de espermatozoide de homens que tiveram problemas com infecção no trato urinário por *Escherichia Coli*, em relação ao controle (amostras de homens sem a infecção). Os autores constataram que agentes biológicos, assim como químicos, também interferem na qualidade e estrutura do espermatozoide. Uma alteração também na banda de 1092 cm^{-1} foi constatada por Mallidis et al. (2011), porém isso foi evidenciado após exposição dos espermatozoides a radiação UV-B. Os autores destacam o deslocamento da banda para 1042 cm^{-1} atribuído ao grupo PO_2^- da espinha dorsal do DNA. Explicaram essa diferença pelas mudanças vibracionais modificadas da dimerizações de bases de nucleotídeos causados pela radiação, evidenciando assim um dano no DNA.

Sánchez et al. (2012) avaliaram o núcleo do espermatozoide humano após incubação de 30 minutos em diferentes concentrações do reagente de Fenton, a fim de induzir o estresse oxidativo. Pelas técnicas de Espectroscopia de Espalhamento Raman, Espectroscopia Transformada de Fourier e citometria de

fluxo de fragmentação do DNA, os autores evidenciaram diferenças entre as amostras controle e tratadas. Nos espectros Raman observaram um aumento gradual da banda a 1050 cm^{-1} coincidindo com uma diminuição da banda em 1095 cm^{-1} , região que corresponde a espinha dorsal do grupo PO_2^- do DNA, indicando uma fragmentação do DNA do espermatozoide.

No presente estudo foi observado em espectros de espermatozoides expostos ao 2,4-D o surgimento da banda em 1050 cm^{-1} , embora não seja evidenciado na média final dos espectros. No entanto, o espectro do 2,4-D puro apresenta a banda 1052 cm^{-1} atribuída a vibração de estiramento CO. Este resultado pode ser um indicativo da interação entre o herbicida e os espermatozoides após exposição *in vitro*. Considerando que este composto pode causar um estresse oxidativo (Ozcan Oruc, Sevgiler, Uner; 2004; Tayeb et al., 2010; Bukowska, 2003), as alterações nas bandas do espectro de Espalhamento Raman estão de acordo com os obtidos por Sánchez et al. (2012) e Mallidis et al. (2011).

A atrazina também é capaz de induzir o estresse oxidativo (Abarikwu et al., 2010; Dehkhargani et al., 2011; Dehkhargani et al., 2012), porém o espectro obtido da média do controle e tratado com este herbicida não apresentou uma alteração como para o 2,4-D. Observou-se apenas uma diminuição da intensidade relativa da banda 1095 cm^{-1} , o que pode ser um indicativo de alteração da estrutura do DNA pela exposição *in vitro*. Contudo Dehkhargani et al. (2012) utilizando o método de avaliação do núcleo do espermatozoide por coloração laranja de acridina, evidenciaram uma desintegridade do DNA, assim como um empacotamento anormal do DNA após a exposição subcutânea de atrazina em ratos.

Após o tratamento dos espectros com a projeção multidimensional IDMAP, é possível perceber que há uma distinção entre os pontos do controle e tratado para cada doador, verificado pelo distanciamento entre eles (Figura 10-A) Doadores 1, 2, 3, 5 e 7 e (Figura 10-B) Doador 1, 3 e 6. É possível constatar na Figura 10-A e B, que não há um agrupamento entre os pontos do mesmo grupo. Acredita-se que isto é devido à variabilidade da própria amostra, por se tratar de células de indivíduos diferentes. Vale salientar que a variabilidade individual pode contribuir com a diferença dentro do próprio controle (CAMPBELL, RUDAN, 2002). Outro fator, que pode influenciar é a quantidade de moléculas (proteínas) presentes no núcleo do espermatozoide que pode variar de acordo com Huser et al. (2009). Além disso, o fato das análises serem realizadas em dias distintos, pode contribuir

com o não agrupamento, como observou Aoki et al. (2013b), em análises de filmes finos por espectroscopia de impedância.

A Figura 11 mostra as intensidades relativas após serem tratadas com a projeção IDMAP para os controles e os tratados com 2,4-D (círculos vermelhos) para cada doador. É possível constatar (doador 1, 2, 3, 5 e 7) que há uma suave semelhança entre os grupos controles, visto que os marcadores (círculos azuis) estão mais próximos uns dos outros. A Figura 12 apresenta o tratamento com a projeção IDMAP para o grupo controle e o grupo exposto a atrazina para cada doador. Para este caso, o distanciamento entre os grupos controle e expostos é evidenciado apenas para os doadores 1 e 6. Nos dois casos existe uma tendência de agrupamento dos controles e tratados diferenciando dos grupos.

As diferenças encontradas nos espectros de ER de espermatozoides expostos ao 2,4-D e atrazina, associadas aos resultados de motilidade e vitalidade dos espermatozoides expostos, é possível concluir que o 2,4-D pode causar um efeito mais intenso sobre a qualidade e estrutura espermática do que a atrazina. Este fato pode ser explicado pelo 2,4-D ser considerado extremamente tóxico (Classe I) enquanto a atrazina mediamente tóxico (Classe III). Por meio da técnica de projeções multidimensional utilizada foi possível observar que os efeitos do 2,4-D são mais evidentes em uma maior quantidade de doadores, quando comparada a atrazina.

Sendo assim, como a espectroscopia de Espalhamento Raman é uma técnica de obtenção das frequências de vibrações de uma molécula, e alguns modos normais de vibração de polipeptídeos, proteínas, RNA e DNA são conformacionalmente sensíveis, podendo mudar em qualquer frequência ou intensidade (ou em ambos) de acordo com a mudança da conformação de macromoléculas (Peticolas, 1994). A identificação das alterações no presente estudo pode ser um indicativo de que os herbicidas 2,4-D e atrazina interferem na estrutura do DNA do espermatozoide humano. Podendo induzir uma possível quebra das ligações covalentes entre os grupos fosfato e pentoses e/ou uma quebra das ligações covalentes entre as bases nitrogenadas e pentoses, como Li et al. (2014) sugerem.

Conclusão

A exposição *in vitro* de espermatozoide humano aos herbicidas 2,4-D e atrazina produziu uma redução da motilidade e vitalidade espermática, sendo estas alterações dependentes da concentração e tempo de exposição. A técnica de Espalhamento Raman permitiu evidenciar que após a exposição aos herbicidas houve uma alteração nas bandas características do núcleo do espermatozoide humano. Observou-se uma mudança em 785, 1095, 1255, 1336, 1374, 1486 e 1575 cm^{-1} , após exposição *in vitro* ao herbicida 2,4-D. Em relação a atrazina, foi possível verificar apenas uma diminuição nas intensidades relativas em 1095 cm^{-1} . Estas alterações nas bandas que caracterizam o DNA do espermatozoide, relacionadas aos modos vibracionais do grupo fosfato, bases nitrogenadas, timina, adenina, citosina e guanina, pode ser um indicativo de alteração do DNA do espermatozoide humano após exposição *in vitro*.

Agradecimentos

Reconhecemos o suporte financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES

Referências Bibliográficas

- ABARIKWU, S. O. et al. Changes in sperm characteristics and induction of oxidative stress in the testis and epididymis of experimental rats by a herbicide, atrazine. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 58, n. 3, p. 874-882, 2010.
- ABDALLAH, F. B. et al. An *in vitro* study on reproductive toxicology of deltamethrin on rat spermatozoa. **Andrologia**, v. 42, n. 4, p. 254-259, 2010.
- AITKEN, R. J. The Amoroso Lecture The human spermatozoon—a cell in crisis?. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 115, n. 1, p. 1-7, 1999.
- AITKEN, R. J.; DE IULIIS, G. N. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. **Molecular human reproduction**, v. 16, n. 1, p. 3-13, 2010.
- AOKI, P. H. B. et al. Molecularly Designed Layer-by-Layer (LbL) Films to Detect Catechol Using Information Visualization Methods. **Langmuir**, v. 29, n. 24, p. 7542-7550, 2013b.

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. 32, n. 1, p. 55-76, 2013a.

ARBUCKLE, T. E. et al. 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid residues in semen of Ontario farmers. **Reproductive Toxicology**, v. 13, n. 6, p. 421-429, 1999.

BETANCOURT, M. et al. Effect of two insecticides and two herbicides on the porcine sperm motility patterns using computer-assisted semen analysis (CASA) in vitro. **Reproductive Toxicology**, v. 22, n. 3, p. 508-512, 2006.

BONORA, Sergio et al. Raman and SERS study on atrazine, prometryn and simetryn triazine herbicides. **Journal of Molecular Structure**, v. 1040, p. 139-148, 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Monografia de Produtos Agrotóxicos**, 2008. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Monografias+de+Agrotoxicos/Monografias>> Acesso em 26 jun. 2014.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA. **Relatórios de Comercialização de Agrotóxicos-Boletim Anual de Produção**, Importação, Exploração e Vendas de Agrotóxicos no Brasil, 2013. Disponível em:<<http://www.ibama.gov.br/areas-tematicas-qa/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos/pagina-3>>. Acesso em 30 jun. 2014.

BRETVELD, R. et al. Influence of pesticides on male fertility. **Scandinavian journal of work, environment & health**, p. 13-28, 2007.

BUKOWSKA, B. Effects of 2, 4-D and its metabolite 2, 4-dichlorophenol on antioxidant enzymes and level of glutathione in human erythrocytes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 135, n. 4, p. 435-441, 2003.

CAMPBELL, H.; RUDAN, I. Interpretation of genetic association studies in complex. **The pharmacogenomics journal**, v. 2, p. 349-360, 2002.

CHIU, Y. H. et al. Fruit and vegetable intake and their pesticide residues in relation to semen quality among men from a fertility clinic. **Human Reproduction**. p. 1-10, 2015.

COSTA, J. C. S. et al. High performance gold nanorods and silver nanocubes in surface-enhanced Raman spectroscopy of pesticides. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 11, n. 34, p. 7491-7498, 2009.

DALLEGRAVE, E. et al. Pre- and postnatal toxicity of the commercial glyphosate formulation in Wistar rats. **Archives of Toxicology**, v. 81, n. 9, p. 665-673, 2007.

DEHKHARGANI, S. F. et al. Atrazine in sub-acute exposure results in sperm DNA disintegrity and nuclear immaturity in rats. **Veterinary Research Forum**. V. 3, n. 1, p. 19-26, 2012.

DEHKHARGANI, S. F. et al. Detrimental effect of atrazine on testicular tissue and sperm quality: implication for oxidative stress and hormonal alterations. **Iran J Toxicol**, v. 5, p. 426-435, 2011.

DENG, H. et al. Structural basis of polyamine–DNA recognition: spermidine and spermine interactions with genomic B-DNAs of different GC content probed by Raman spectroscopy. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 17, p. 3379-3385, 2000.

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 mai. 1013.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Quím. Nova**, v. 30, n. 3, p. 695-706, 2007.

GRIZARD, G. et al. In vitro alachlor effects on reactive oxygen species generation, motility patterns and apoptosis markers in human spermatozoa. **Reproductive toxicology**, v. 23, n. 1, p. 55-62, 2007.

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

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.

JIN, Y. et al. Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (< i> Danio rerio</i>). **Chemosphere**, v. 78, n. 7, p. 846-852, 2010.

KUMAR, S.; MISHRA, V. V. Review: Toxicants in reproductive fluid and in vitro fertilization (IVF) outcome. **Toxicology and industrial health**, 2010.

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.

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.

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.

MANDANI, P.; DESAI, K.; HIGHLAND, H. Cytotoxic Effects of Benzene Metabolites on Human Sperm Function: An In Vitro Study. **ISRN toxicology**, v. 2013, 2013.

MANN, T. et al. Passage of chemicals into human and animal semen: mechanisms and significance. **CRC Critical Reviews in Toxicology**, v. 11, n. 1, p. 1-14, 1982.

MEISTER, K. et al. Confocal Raman microspectroscopy as an analytical tool to assess the mitochondrial status in human spermatozoa. **Analyst**, v. 135, n. 6. P. 1370-1374, 2010.

MELGAREJO, María et al. Associations between urinary organophosphate pesticide metabolite levels and reproductive parameters in men from an infertility clinic. **Environmental Research**, v. 137, p. 292-298, 2015.

OZCAN ORUC, E.; SEVGILER, Y.; UNER, N. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2, 4-D and azinphosmethyl. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 137, n. 1, p. 43-51, 2004.

PANT, N. et al. Semen quality of environmentally exposed human population: the toxicological consequence. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 11, p. 8274-8281, 2013.

PETICOLAS, Warner L. Raman spectroscopy of DNA and proteins. **Methods in Enzymology**, v. 246, p. 389-416, 1994.

SALA, O. **Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho**. 2. ed. São Paulo: Editora da 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. e3, 2012.

SCHRADER, S. M.; MARLOW, K. L. Assessing the reproductive health of men with occupational exposures. **Asian journal of andrology**, v. 16, n. 1, p. 23-30, 2014.

SHARPE, R. M. Environmental/lifestyle effects on spermatogenesis. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 365, n. 1546, p. 1697-1712, 2010.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. LTC editora, 2007

SINGH, M.; SANDHIR, R.; KIRAN, R. Oxidative stress induced by atrazine in rat erythrocytes: Mitigating effect of vitamin E. **Toxicology mechanisms and methods**, v. 20, n. 3, p. 119-126, 2010.

SWAN, S. H. et al. Semen quality in relation to biomarkers of pesticide exposure. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, n. 12, p. 1478, 2003.

TAVARES, R. S. et al. In vitro exposure to the organochlorine p,p'-DDE affects functional human sperm parameters. **Chemosphere**, v. 120, p. 443-446, 2014.

TAYEB, W. et al. Hepatotoxicity induced by sub-acute exposure of rats to 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid based herbicide "Désormone lourde". **Journal of hazardous materials**, v. 180, n. 1, p. 225-233, 2010.

TEJADA E, MINGHIM R, NONATO L G, On Improved Projection Techniques to Support Visual Exploration of Multi-Dimensional Data Sets. *Information Visualization*. n. 2, p. 218-31, 2003.

THOMAS JR, George J. Raman spectroscopy of protein and nucleic acid assemblies. **Annual review of biophysics and biomolecular structure**, v. 28, n. 1, p. 1-27, 1999.

VO-DINH, T.; ALLAIN, L. R.; STOKES, D. L. Cancer gene detection using surface-enhanced Raman scattering (SERS). **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 33, n. 7, p. 511-516, 2002.

World Health Organization. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human sêmen. ed. 5, 2010.

4 CONCLUSÕES FINAIS

A exposição *in vitro* de espermatozoide humano aos herbicidas 2,4-D e atrazina, gera alterações na motilidade e vitalidade espermática. Estes parâmetros são influenciados pela concentração dos herbicidas e tempo de exposição. Após a exposição ao 2,4-D e atrazina a motilidade diminuiu quando comparado ao controle de até $p < 0,001$ na motilidade total. Na vitalidade há uma diminuição significativa de $p < 0,001$ e $p < 0,01$ para o 2,4-D e atrazina respectivamente. Estas alterações podem ser um indicativo que a interação desses compostos com o sêmen humano, podem causar interferências na qualidade do espermatozoide humano. Com a técnica de Espalhamento Raman foi possível evidenciar que após a exposição *in vitro* aos herbicidas há uma alteração nas bandas características do núcleo do espermatozoide humano. Para o 2,4-D observou-se uma mudança na intensidade relativa das bandas 1095, 1255, 1374 e 1486 cm^{-1} . Para a atrazina, não foi possível verificar uma alteração da intensidade relativa nas bandas, apenas na banda em 1095 cm^{-1} . As variações observadas são aquelas que caracterizam o DNA do espermatozoide e estão relacionadas aos modos vibracionais do grupo fosfato, bases nitrogenadas, timina, adenina, citosina e guanina, pode ser um indicativa de alteração do DNA do espermatozoide humano após exposição *in vitro* aos herbicidas.

5 PROPOSTAS DE TRABALHOS FUTUROS

- Realizar as análises de investigação de Espectroscopia de Espalhamento Raman após a exposição a agentes químicos, também nas áreas do acrossoma e cauda;
- Realizar as análises de Espectroscopia de Espalhamento Raman em mais indivíduos;
- Aumentar a concentração dos agentes químicos expostos e acompanhar as alterações via Espalhamento Raman;
- Investigar a produção de espécies reativas de oxigênio por meio de análises que identifiquem a indução do estresse oxidativo;
- Definir um mecanismo de interação dos herbicidas-espermatozoides.

REFERÊNCIAS

- ABARIKWU, S. O. et al. Changes in sperm characteristics and induction of oxidative stress in the testis and epididymis of experimental rats by a herbicide, atrazine. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 58, n. 3, p. 874-882, 2010.
- ABDALLAH, F. B. et al. An in vitro study on reproductive toxicology of deltamethrin on rat spermatozoa. **Andrologia**, v. 42, n. 4, p. 254-259, 2010.
- ABDOLLAHI, M. et al. Pesticides and oxidative stress: a review. **Med Sci Monit.**, v. 10, n. 6, p. 141-147, 2004.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA)**. Relatório de Atividades de 2011 e 2012. Brasília, 2013. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Programa+de+Analise+de+Residuos+de+Agrotoxicos+em+Alimentos>> Acesso em: 3 set. 2014.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Monografia de produtos Agrotóxicos**, 2008. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Monografias+de+Agrotoxicos/Monografias>> Acesso em 26 jun. 2014.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Seminário volta a discutir mercado de agrotóxicos em 2012**. abr. 2012. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/menu+-+noticias+anos/2012+noticias/seminario+volta+a+discutir+mercado+de+agrotoxicos+em+2012>> Acesso em: 12 jun. 2014.
- AKCHA, F.; SPAGNOL, C.; ROUXEL, J. Genotoxicity of diuron and glyphosate in oyster spermatozoa and embryos. **Aquatic Toxicology**, v. 106-107, p. 104-113, 2012.
- ALAVANJA, M. C. R.; ROSS, M. K.; BONNER, M. R. Increased Cancer Burden Among Pesticide Applicators and Others Due to Pesticide Exposure. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 63, n. 2, p. 120-142, mar. 2013.
- ALMEIDA, P. J. **Intoxicação por agrotóxicos**: informações selecionadas para abordagem clínica e tratamento. 1. ed. São Paulo: Andrei, 2002.
- ALVES, S. R.; OLIVEIRA-SILVA, J. J. Avaliação de ambientes contaminados por agrotóxicos. In: PERES, F.; MOREIRA, J. C. **É veneno ou é remédio?**: agrotóxicos, saúde e ambiente. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2003. cap. 7.
- AMER, S. M.; ALY, F. A. E. Genotoxic effect of 2, 4-dichlorophenoxy acetic acid and its metabolite 2, 4-dichlorophenol in mouse. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 494, n. 1, p. 1-12, 2001.

- 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. 32, n. 1, p. 55-76, 2013.
- ARBUCKLE, T. E. et al. 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid residues in semen of Ontario farmers. **Reproductive Toxicology**, v. 13, n. 6, p. 421-429, 1999.
- ASHRAFZADEH, A.; KARSANI, S. A.; NATHAN, S. Mammalian sperm fertility related proteins. **International Journal of Medical Sciences**, v. 10, n. 12, p. 1649-1657, 2013.
- BAENA, J. R.; LANDI, B. Raman spectroscopy in chemical bioanalysis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 8, n. 5, p. 534-539, 2004.
- BAIRD, C. **Química ambiental**. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. cap. 6
- BJØRLING-POULSEN, M.; ANDERSEN, H. R.; GRANDJEAN, P. Potential developmental neurotoxicity of pesticides used in Europe. **Environmental Health**, v. 7, n. 50, p. 1-22, 2008.
- BODANESE, B. M. D. et al. Differentiating Normal and Basal Cell Carcinoma Human Skin Tissues In Vitro Using Dispersive Raman Spectroscopy: A Comparison Between Principal Components Analysis and Simplified Biochemical Models. **Photomedicine and Bodanese Surgery**, v. 28, n. 1, p. S119-S127, 2010.
- BOUILLY, K. et al. Impact of diuron on aneuploidy and hemocyte parameters in pacific oyster, *Crassostrea gigas*. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 52, n. 1, p. 58-63, 2007.
- BOUILLY, K. et al. Persistence of atrazine impact on aneuploidy in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. **Marine Biology**, v. 145, n. 4, p. 699-705, 2004.
- BRASIL. Lei nº 7.802 de 11 de julho de 1989 - Decreto n.º 4.074, de 4 de janeiro de 2002. 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. **Diário Oficial**, 08 jan. 2002.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT)**. 2014. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 18 jun. 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Divisão de Meio Ambiente e Ecologia Humana. **Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos**. Brasília: Organização Pan-americana da Saúde/OMS, 1997. Disponível em: <<http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/livro2.pdf>>. Acesso em 12 abr. 2013.
- BRETVELD, R. et al. Influence of pesticides on male fertility. **Scandinavian Journal Of Work, Environment & Health**, p. 13-28, 2007.

BUSSO, D. et al. Human testicular protein TPX1/CRISP-2: localization in spermatozoa, fate after capacitation and relevance for gamete interaction. **Molecular Human Reproduction**, v. 11, n. 4, p. 299-305, 2005.

CAMARGO, P. N. **Herbicidas orgânicos**: fundamentos químicos-estruturais. São Paulo: Manole, 1986.

CAO, Z.; SHAFER, T. J.; MURRAY, T. F. Mechanisms of pyrethroid insecticide-induced stimulation of calcium influx in neocortical neurons. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 336, n. 1, p. 197-205, 2011.

CARSON, R. **Primavera silenciosa**. 1 ed. São Paulo: Gaia, 2010.

CARTER, R. A. B.; **Estudo de tecido mamário humano por espectroscopia ft-raman**. 2004. 114 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos.

CAVALCANTE, D. G. S. M.; MARTINEZ, C. B. R.; SOFIA, S. H. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. **Mutation Research**, Amsterdam; v. 655, n. 1-2, p. 41-46, 2008.

CHOWDARY, M. V. et al. Discrimination of Normal, Benign, and Malignant Breast Tissues by Raman Spectroscopy. **Biopolymers**, v. 83, n. 5, p. 556-569, 2006.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Proposta para derivação de critérios para contaminantes ambientais da agricultura**. 2010. São Paulo: Cetesb, 2010. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/laboratorios/publicacoes/relatorio-tecnico/2010-Proposta-Derivacao-Agricultura.pdf>>. Acesso em: 19 mar. 2013.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira**, primeiro levantamento, abril/2014. Brasília: CONAB, 2014. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_04_15_15_44_37_bol_etim_cana_portugues_-_1o_lev_-_14.pdf> Acesso em: 2 jun. 2014.

DALLEGRAVE, E. et al. Pre- and postnatal toxicity of the commercial glyphosate formulation in Wistar rats. **Archives of Toxicology**, v. 81, n. 9, p. 665-673, 2007.

DEHKHARGANI, S. F. et al. Atrazine in sub-acute exposure results in sperm DNA disintegrity and nuclear immaturity in rats. **Veterinary Research Forum**, v. 3, n. 1, p. 19-26, 2012.

DEHKHARGANI, S. F. et al. Detrimental effect of atrazine on testicular tissue and sperm quality: implication for oxidative stress and hormonal alterations. **Iran J Toxicol**, v. 5, p. 426-435, 2011.

DENG, H. et al. Structural basis of polyamine–DNA recognition: spermidine and spermine interactions with genomic B-DNAs of different GC content probed by Raman spectroscopy. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 17, p. 3379-3385, 2000.

DIAS, L. S.; GUIMARÃES, E. M. A.; GUIMARÃES, R. B. Reflexões dos impactos ambientais na paisagem causadas pela cultura da cana-de-açúcar no Oeste

Paulista, São Paulo, Brasil. ENCUENTRO DE GEÓGRAFOS DE AMÉRICA LATINA, 14., 2013, Lima. **Reencuentro de saberes territoriales latino-americanos**. Lima, Perú: [s.n.], 2013. Disponível em: <http://www.egal2013.pe/wp-content/uploads/2013/07/Tra_Leonice-Eliana-Raul.pdf> Acesso em: 13 jun. 2014.

EDDY E. M. The spermatozoon. In: KNOBIL E.; NEIL, J. D. **The physiology of reproduction**. 3. ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2006. v. 1, cap. 1

ELLIS, D. I.; GOODACRE, R. Metabolic fingerprinting in disease diagnosis: biomedical applications of infrared and Raman spectroscopy. **Analyst**, v. 131, n. 8, p. 875-885, 2006.

EVANS, P. J. Fertilin B and other ADMs as integrin ligands: insights into cell adhesion and fertilization. **BioEssay**. v. 23, n. 7, p. 628-639, 2001.

FAVARETO, A. P. A., et al. Identification of the SP22 sperm protein in Santa Inês and Dorper Rams. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 45, p. 323-330, 2010

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 mai. 2013.

FERREIRA, C. R. R. P.; VEGRO, C. L. R.; CAMARGO, M. L. B. Defensivos agrícolas: rumo a uma retomada sustentável. **Análises e Indicadores de Agronegócio**, v. 3, n. 2, 2008.

GASNIER, C. Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. **Toxicology**, v. 262, n. 3, p. 184-191, aug. 2009.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Quím. Nova**, v. 30, n. 3, p. 695-706, 2007.

GLERIANI, J. M. **Concordância da aptidão agrícola das terras do Estado de São Paulo elaborada nos anos setenta com os dados do Censo Agropecuário do IBGE Ano 95/96**. [S.l.]: INPE, 2000. 33 p. Disponível em: <<http://www.dpi.inpe.br/cursos/ser300/Trabalhos/marinaldo.pdf>>. Acesso em 29 mai. 2014.

GOLDEMBERG, J. N.; NIGRO, F. E. B.; COELHO, S. T. **Bioenergia no Estado de São Paulo: situação atual: perspectivas, barreiras e propostas**. São Paulo: Imprensa Oficial do Estado, 2008.

GWINN, M. R. et al. Differential gene expression in normal human mammary epithelial cells treated with malathion monitored by DNA Microarrays. **Environmental Health Perspectives**, v. 113. n. 8, p. 1046-1051, 2005.

HAKA, A. S. et al. Diagnosing breast cancer using Raman spectroscopy: prospective analysis. **Journal of Biomedical Optics**, v. 14, n. 5, oct. 2009. Disponível em: <<http://biomedicaloptics.spiedigitallibrary.org/article.aspx?articleid=1103143>> Acesso em: 7 mai. 2013.

HANDEL, M. A. What unique chromosomal events lead to the formation of a haploid male germ cell? In: Robaire, B.; CHAN, P. **Handbook of Andology**. 2. ed.

Lawrence, Kansas: American Society of Andrology, 2010. cap. 7. Disponível em: <http://www.andrologysociety.com/docs/handbook-2nd/Handbook-of-Andrology-Second-Edition-English.aspx> Acesso em: 23 fev. 2015.

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, oct. 2011. Disponível em: <<http://biomedicaloptics.spiedigitallibrary.org/article.aspx?articleid=1167091>> Acesso em: 17 mai. 2013.

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.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. Relatórios de comercialização de agrotóxicos. **Boletim Anual de Produção, Importação, Exploração e Vendas de Agrotóxicos no Brasil**, 2013. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/areas-tematicas-qa/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos/pagina-3>>. Acesso em 30 jun. 2014.

INSTITUTO NACIONAL DE PROCESSAMENTO DE EMBALAGENS VAZIAS. **Responsabilidade do agricultor**. São Paulo, [2014]. Disponível em: <http://www.campanha.inpev.org.br/responsabilidades/triplice_lavagem/responsabilidade_de_agricultor/responsabilidade_agricultor.asp>. Acesso em: 5 ago. 2014

JUDAI, M. A. **Estudo dos limiares auditivos em frequências convencionais e altas frequências de moradores e trabalhadores expostos a praguicidas na região do Pontal do Paranapanema, estado de São Paulo, Brasil**. 2015. 161 f. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional) – Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente.

KEITH, L. H. Environmental endocrine disruptors. **Pure & Appl. Chem.**, v. 70, n. 12, p. 2319-2326, 1998.

KUBASEK, W. L. et al. Raman spectra of the model B-DNA oligomer d (CGCGAATTCGCG) 2 and of the DNA in living salmon sperm show that both have very similar B-type conformations. **Biochemistry**, v. 25, n. 23, p. 7440-7445, 1986.

KUMAR, S.; MISHRA, V. V. Review: Toxicants in reproductive fluid and in vitro fertilization (IVF) outcome. **Toxicology and Industrial Health**, 2010.

LASERNA, J.J. **Modern techniques in raman spectroscopy**. Toronto: J. Wiley, 1996.

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.

LIU, Y.; ZHU, Y.; LI, Z. Application of Raman spectroscopy in Andrology: non-invasive analysis of tissue and single cell. **Translational Andrology and Urology**, v. 3, n. 1, p. 125-133, 2014

LORINCZ, A. et al. Raman spectroscopy for neoplastic tissue differentiation: a pilot study. **Journal Pediatric Surgery**, v. 39, n. 6, p. 953-956, 2004.

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.

MANN, T. et al. Passage of chemicals into human and animal semen: mechanisms and significance. **CRC Critical Reviews in Toxicology**, v. 11, n. 1, p. 1-14, 1982.

MCLACHLAN, R. I. How is the production of spermatozoa regulated? In: Robaire, B.; CHAN, P. **Handbook of Andrology**. 2. ed. Lawrence, Kansas: American Society of Andrology, 2010, cap. 8. Disponível em: <http://www.andrologysociety.com/docs/handbook-2nd/Handbook-of-Andrology-Second-Edition-English.aspx> Acesso em: 23 fev. 2015.

MEISTER, K. et al. Confocal Raman microspectroscopy as an analytical tool to assess the mitochondrial status in human spermatozoa. **Analyst.**, v. 135, n. 6, p. 1370-1374, 2010.

MORENO, M. **Espectroscopia Raman em câncer de mama**. 2006. 142 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos.

O'Donnell, L. et al. Endocrine regulation of spermatogenesis. In: KNOBIL, E.; NEIL, J. D. **The physiology of reproduction**. 3 ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2006. v. 1, cap. 21.

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

ORTEGA, N. M.; BOSCH, P. Methods for sperm selection for in vitro fertilization. In: FRIEDLER, S. **In Vitro fertilization: innovative clinical and laboratory aspects**. [S.l.]: InTech. 2010. cap. 4.

PANT, N. et al. Semen quality of environmentally exposed human population: the toxicological consequence. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 11, p. 8274-8281, 2013.

PETICOLAS, Warner L. Raman spectroscopy of DNA and proteins. **Methods in Enzymology**, v. 246, p. 389-416, 1994.

PLANO Nacional de Resíduos Sólidos. [S.l.]: [s.n.], ago. 2012.

PROCÓPIO, S. O. et al. Manejo de Plantas Daninhas. In: SANTOS, F.; BORÉM, A; CALDAS, C. **Cana-de-açúcar: bioenergia, açúcar e etanol, tecnologias e perspectivas**. 2. ed. Viçosa, MG: Ed. do Autor, 2011. p. 182.

RIBAS, G. et al. Herbicide-induced DNA damage in human lymphocytes evaluated by the single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay. **Mutation Research**, v. 344, n. 1-2, p. 41-54, 1995.

ROBERTS, K. P. What are the componentes of the male reproductive system? Robaire, B.; CHAN, P. **Handbook of andrology**. 2. ed. Lawrence, Kansas: American Society of Andrology, 2010. cap. 1. Disponível em: <http://www.andrologysociety.com/docs/handbook-2nd/Handbook-of-Andrology-Second-Edition-English.aspx> Acesso em: 23 fev. 2015.

ROCHA, J. C.; ROSA, A. H.; CARDOSO, A. A. **Introdução à química ambiental**. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

SACHS, R.; MARTINS, V. A. Análise da cultura da cana-de-açúcar, por escritório de desenvolvimento rural, Estado de São Paulo, 1995-2006. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 37, n. 9, p. 41-52, set. 2007.

SALA, O. **Fundamentos da espectroscopia Raman e no infravermelho**. São Paulo, Ed. da Unesp, 1996. p.223.

SALA, O. **Fundamentos da espectroscopia Raman e no infravermelho**. 2. ed. São Paulo, Ed. da Unesp, 2008.

SANTOS, T. G.; MARTINEZ, C. B. Atrazine promotes biochemical changes and DNA damage in a neotropical fish species. **Chemosphere**, v. 89, n. 9, p. 1118-1125, 2012.

SCHRADER, S. M.; MARLOW, K. L. Assessing the reproductive health of men with occupational exposures. **Asian Journal of Andrology**, v. 16, n. 1, p. 23-30, 2014.

SEADE. **Anuário Estatístico do Estado de São Paulo**: fundação sistema estadual de análise de dados. 2013. Disponível em: <<http://www.seade.gov.br/produtos/anuario/>>. Acesso em: 20 mai. 2014

SILVA, M. A. S. R. **Aplicação da espectroscopia Raman no diagnóstico do Câncer de Próstata. Estudo *in vitro***. 2009. 49 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos.

SILVEIRA JUNIOR, L. et al. Discriminating model for diagnosis of basal cell carcinoma and melanoma in vitro based on the Raman spectra of selected biochemicals. **Journal of Biomedical Optics**, v. 17, n. 7, jul., 2012. Disponível em: <<http://biomedicaloptics.spiedigitallibrary.org/journal.aspx>> Acesso em: 10 mai. 2013

SIMONSEN, Roberto Cochrane. **História econômica do Brasil, 1500-1820**. 4. ed São Paulo, Ed. Nacional, 2005. v. 34. cap. 5: O ciclo do açúcar, p. 118-161.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA AGRÍCOLA. **Conexão SINDAG**. 2011. Disponível em: <http://www.sindag.com.br/conexao/anteriores/conexao_n29.pdf>. Acesso em: 18 nov. 2013

SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES TÓXICO-FARMACOLÓGICAS.

Estatística anual de casos de intoxicação e envenenamento: Brasil, 1991. Rio de Janeiro: SINITOX; Fundação Oswaldo Cruz, 2014. Acesso em: <http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=386> Acesso em: 13 ago. 2014.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química orgânica**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2009. v. 1. cap. 25.

SPIRO, T. G.; STIGLIANI, W. M. **Química ambiental**. 2. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2008.

SWAN, S. H. et al. Semen quality in relation to biomarkers of pesticide exposure. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, n. 12, p. 1478, 2003.

TANAGHO, E. A.; McANINCH, J. W.; ARAÚJO, C. L. C. Smith: urologia geral. 13. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1994. cap. 44.

TENNANT, A. H.; PENG, B.; KLIGERMAN, A. D. Genotoxicity studies of three triazine herbicides: in vivo studies using the alkaline single cell gel (SCG) assay. **Mutation Research**, v. 493, n. 1-2, p. 1-10, jun. 2001.

THE LIST of lists: a catalogue of lists of pesticides identifying those associated with particularly harmful health or environmental impacts. **Briefing paper**, London, 2005.

TOMITA, R. Y.; BEYRUTH, Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambientes aquáticos. **O Biológico**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 135-142, 2002.

TORQUATO, S. A.; MARTINS, R.; RAMOS, S. F. Cana-de-açúcar no Estado de São Paulo: eficiência econômicas das regionais novas e tradicionais de produção. **Informações Econômicas**, v. 39, n. 5, 2009.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Pesticides registration. **Registration eligibility decision for 2,4-D**. 2005. Disponível em: <http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/24d_red.pdf> Acesso em: 25 jun. 2014.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Pesticides registration. **Decision documents for Atrazine**. 2006. Disponível em: <<http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs>. Acesso em: 25 set. 2014.

VENKOV, P. et al. Genotoxic effect of substituted phenoxyacetic acids. **Archives of Toxicology**, v. 74, n. 9, p. 560-566, 2000.

VO-DINH, T.; ALLAIN, L. R.; STOKES, D. L. Cancer gene detection using surface-enhanced Raman scattering (SERS). **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 33, n. 7, p. 511-516, 2002.

WANG, C. How does semen analysis assist in understanding the reproductive status of the male? In: Robaire, B.; CHAN, P. **Handbook of andrology**. 2. ed. Lawrence, Kansas: American Society of Andrology, 2010, cap. 12. Disponível em: <http://www.andrologysociety.com/docs/handbook-2nd/Handbook-of-Andrology-Second-Edition-English.aspx> Acesso em: 23 fev. 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO laboratory manual for the examination and processing of human sêmen. 5. ed. [S.l.], 2010.

ZELJEZIC, D.; GARAJ-VRHOVAC, V.; PERKOVIC, P. Evaluation of DNA damage induced by atrazine and atrazine-based herbicide in human lymphocytes in vitro using a comet and DNA diffusion assay. **Toxicol. In Vitro**, v. 20, n. 6, p. 923-935, 2006.

ANEXOS

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: **ESTUDO IN VITRO DA INTERAÇÃO HERBICIDAS E ESPERMATOZÓIDE HUMANO UTILIZANDO A ESPECTROSCOPIA RAMAN**

Nome da Pesquisadora: **TAMIRIS GARBIATTI DE OLIVEIRA**

Nome da Orientadora: **PATRICIA ALEXANDRA ANTUNES**

Nome da Co-orientadora: **ANA PAULA ALVES FAVARETO**

1. **Natureza da pesquisa:** Gostaríamos de convidá-lo a participar como voluntário desta pesquisa. Trata-se de uma pesquisa experimental realizada pelo Curso de Mestrado em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional da UNOESTE, que tem como objetivo estudar as interações químicas entre agrotóxicos e espermatozoide, identificando as possíveis alterações causadas a partir destas interações.
2. **Participantes da pesquisa:** Participarão deste estudo 10 homens com faixa etária entre 18 a 45 anos, que aceitem participar da pesquisa, mediante assinatura deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Não poderão participar da pesquisa, pessoas fumantes, que estiverem fazendo uso de medicamentos, que tenham tido febre nos 3 meses anteriores à coleta do sêmen ou apresentarem histórico de infertilidade ou outra alteração reprodutiva, pois estes fatores podem interferir nos resultados do estudo.
3. **Envolvimento na pesquisa:** Você tem a liberdade de se recusar a participar e ainda se recusar a continuar participando em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer prejuízo a sua pessoa. Sempre que quiser poderá pedir mais informações sobre a pesquisa através do telefone da pesquisadora, e se necessário através do telefone do Comitê de Ética em Pesquisa.
4. **Coleta de material:** A coleta do sêmen será realizada em uma sala reservada no Laboratório de Análises Clínicas da UNOESTE, por masturbação, em um frasco limpo, cedido pelos pesquisadores, após 2 a 5 dias de abstinência sexual. Serão dadas instruções aos participantes sobre limpeza das mãos e do pênis antes da coleta e com relação a qualquer perda de material ou outras dúvidas.
5. **Riscos e desconforto:** A participação nesta pesquisa não infringe as normas legais e éticas e nenhum dos procedimentos usados oferece risco a sua saúde ou dignidade. Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução no. 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde.
6. **Confidencialidade:** Todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente a pesquisadora e sua orientadora e co-orientadora terão conhecimento de sua identidade e nos comprometemos a mantê-la em sigilo ao publicar os resultados dessa pesquisa.
7. **Benefícios:** ao participar desta pesquisa você não terá nenhum benefício direto. Entretanto, esperamos que este estudo traga informações importantes sobre os possíveis danos que os agrotóxicos podem causar na estrutura do espermatozóide humano. A pesquisadora se compromete a divulgar os resultados

obtidos, respeitando-se o sigilo das informações coletadas, conforme previsto no item anterior.

8. **Pagamento:** Os pesquisadores garantem que não terá nenhum tipo de despesas para o participante desta pesquisa, também não haverá qualquer tipo de compensação financeira relacionada à sua participação.

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa. Portanto preencha, por favor, os itens que se seguem: Confiro que recebi cópia deste termo de consentimento, e autorizo a execução do trabalho de pesquisa e a divulgação dos dados obtidos neste estudo. Obs: Não assine esse termo se ainda tiver dúvida a respeito.

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Tendo em vista os itens acima apresentados, eu, de forma livre e esclarecida, manifesto meu consentimento em participar da pesquisa “**ESTUDO IN VITRO DA INTERAÇÃO HERBICIDAS E ESPERMATOZÓIDE HUMANO UTILIZANDO A ESPECTROSCOPIA RAMAN**”.

Nome do Participante da Pesquisa

RG ou CPF do Participante

Assinatura do Participante da Pesquisa

Assinatura da Pesquisadora

Assinatura da Orientadora

Pesquisador: Tamiris Garbiatti de Oliveira (18) 9608-3369

Orientador: Patricia Alexandra Antunes (18) 32291098

Ana Paula Favareto (18) 32292077

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa: Profa. Dra. Gisele Alborgheti Nai

Vice-Coodenadora: Profa. Dra. Rosa Maria Barilli Nogueira

Telefone do Comitê de Ética: (18) 3229-2077 - E-mail cep@unoeste.br

ANEXO 2

**NORMAS DE SUBMISSÃO DA REVISTA
ENVIRONMENTAL RESEARCH**



ENVIRONMENTAL RESEARCH

A Multidisciplinary Journal of Environmental Sciences, Ecology, and Public Health

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

•	Description	p. 1
•	Impact Factor	p. 1
•	Abstracting and Indexing	p. 1
•	Editorial Board	p. 2
•	Guide for Authors	p. 3



ISSN: 0013-9351

DESCRIPTION

Environmental Research publishes original reports describing studies of the adverse effects of environmental agents on humans and animals. The principal aim of the journal is to assess the impact of chemicals and microbiological pollutants on human health. Both *in vivo* and *in vitro* studies, focused on defining the etiology of environmentally induced illness and to increase understanding of the mechanisms by which environmental agents cause disease, are especially welcome. Investigations on the effects of global warming/climate change on the environment and public health, as well as those focused on the effects of anthropogenic activities on climate change are also of particular interest.

Although *Environmental Research* is opened to all subjects directly related with this field, areas of special interest include:

- Air, soil, and water pollutants and health
- Biomonitoring and adverse human health effects
- Environmental and occupational medicine
- Environmental epidemiology
- Environmental microbiology
- Environmental toxicology
- Environmental transport and fate of pollutants
- Global warming/climate change
- Nanomaterials in the environment and nanotoxicology
- Risk analysis, risk assessment and risk management, and public health
- Waste treatment and disposal
- Water and wastewater management, and sewage

IMPACT FACTOR

2013: 3.951 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2014

ABSTRACTING AND INDEXING

MEDLINE®

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief:

J.L. Domingo, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Catalonia, Spain

Associate Editor:

D. Boyd Barr, Emory University, Atlanta, Georgia, USA

J. Dórea, University of Brasilia, Brasilia, DF, Brazil

N. Mai, Chinese Academy of Sciences (CAS), Guangzhou, China

Editor Emeritus:

P.J. Landrigan

Editorial Board Members:

J.M. Antó Boqué, CREAL, Barcelona, Spain

Y. Aoki, National Institute for Environmental Studies, Ibaraki, Japan

J. Baumgartner, McGill University, Montreal, Quebec, Canada

M. S. Bloom, State University of New York (SUNY) at Albany, Rensselaer, New York, USA

C. Borrego, Universidade de Aveiro, Glória, Aveiro, Portugal **J. Burger**, Rutgers University, Piscataway, New Jersey, USA **M.E. Cebrián**, Cinvestav, Mexico D.F., Mexico

A. Covaci, Universiteit Antwerpen, Wilrijk-Antwerpen, Belgium

C. Curriero, Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, USA

M. Dusinska, Norwegian Institute for Air Research, Kjeller, Norway

K.L. Ebi, ClimAdapt, Los Altos, California, USA

B. Eskenazi, University of California at Berkeley, Berkeley, California, USA

A.R. Flegal, University of California at Santa Cruz, Santa Cruz, California, USA

S.J.S. Flora, Ministry of Defence, Government of India, Gwalior, India

A.L. Frank, University of Texas, Tyler, Texas, USA

J.P. Giesy, University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan, Canada

M.S. Goldberg, McGill University, Montreal, Quebec, Canada

L.R. Goldman, Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, USA **P. Grandjean**, University of Southern Denmark, Odense C, Denmark **M. Hatzopoulou**, McGill University, Montreal, Quebec, Canada

G. Hoek, Utrecht University, Utrecht, Netherlands

M. Horvat, Jožef Stefan Institute, Ljubljana, Slovenia

M. Ikeda, Kyoto Industrial Health Association, Kyoto, Japan

M. Jerrett, University of California at Berkeley, Berkeley, California, USA

K. Kannan, State University of New York (SUNY) at Albany, Albany, New York, USA

R.J. Letcher, National Wildlife Research Center, Ottawa, Ontario, Canada

C. Loffredo, Georgetown University, Washington, District of Columbia, USA

M.P. Longnecker, National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS), Research Triangle Park, North Carolina, USA

L.Q. Ma, University of Florida, Gainesville, Florida, USA

D. Mergler, Université du Québec à Montreal (UQAM), Montreal, Quebec, Canada

A. Mutti, Università degli Studi di Parma, Parma, Italy

J. Namieśnik, Technical University of Gdansk, Gdansk, Poland

A. Navas-Acien, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland, USA

I. Rusyn, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina, USA

M. Sakamoto, National Institute for Minamata Disease, Kumamoto, Japan

B. Shomar, Qatar Environment and Energy Research Institute (QEERI), Doha, Qatar

E.K. Silbergeld, Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, USA

A. Sweetman, Lancaster University, Lancaster, England, UK

S. Tong, Queensland University of Technology, Kelvin Grove, Queensland, Australia

A.M. Tsatsakis, University of Crete, Heraklion, Greece **M. Vahter**, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden **B.**

van Bavel, Örebro University, Örebro, Sweden

P. Villeneuve, Carleton University, Ottawa, Ontario, Canada

X. Wang

M.S. Wolf, Mount Sinai School of Medicine, New York, New York, USA

GUIDE FOR AUTHORS

Your Paper Your Way

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

To find out more, please visit the Preparation section below.

INTRODUCTION

A Multidisciplinary Journal of Environmental Sciences, Ecology, and Public Health

Environmental Research: A Multidisciplinary Journal of Environmental Sciences, Ecology, and Public Health publishes original reports describing studies of the toxic effects of environmental agents and conditions in humans and animals, including both experimental subjects and ecosystems. The principal aims of the journal are to increase understanding of the etiology of preventable disease and environmental impairments, and to increase understanding of the mechanisms by which environmental agents cause disease and ecological effects. Human impact on the biosphere is considerable and, thus, an additional aim of the journal is to explore the means by which the adverse effects of anthropocentric activities can be minimized through new initiatives or changes in policy, at the local, regional, national, and international scales.

The study of environmental health is inherently multidisciplinary and international. Therefore, the journal welcomes relevant articles in epidemiology, risk analysis and policy, environmental medicine, exposure assessment, geosciences and environmental chemistry, and wildlife biology and ecotoxicology, and ecology. Reports that bridge one or more of these disciplines are particularly encouraged, as are studies employing biological markers of exposure and/or effect.

The focus of the journal generally excludes papers that report results of toxicology studies or industrial exposures, unless these papers have clear relevance to environmental topics. The journal does not generally consider reports of a specific site or source (such as an assessment of releases or environmental contamination) unless these reports present novel or generalizable information. However, short papers can be submitted to the Journal as a "Report from the Field" (see below). Papers reporting on studies of human subjects must provide written assurance that the research was reviewed and approved by an appropriate institutional review board (or ethics committee) for the protection of human subjects. *Environmental Research*, in common with international practice in science, requires that all authors must, in denoting measures, utilize the metric system and SI derived units (e.g., degrees Centigrade rather than Fahrenheit; [Click here](#)). Authors are encouraged to contact the editors-in-chief, prior to a full submission, to determine the appropriateness of a paper (e.g., sending a short abstract or letter to the editorial office: er@elsevier.com).

Reports from the Field

The Journal welcomes short articles on topics of interest to environmental researchers and practitioners. Appropriate "Reports from the Field" include articles on environmental conditions, new methods for detection or analysis, updates, and case reports of human or ecosystem exposures and effects. Articles from around the world are particularly encouraged.

"Reports from the Field" should not exceed 2000 words and need not be divided into sections, although subheadings may help the reader and are encouraged. Authors must provide a short abstract (less than 75 words) and no more than two figures or illustrations, no more than 2 tables, and no more than 15 references. These papers will be peer-reviewed.

Contact Details for Submission

Authors should submit their article via the Elsevier Editorial System (EES), at <http://ees.elsevier.com/er>. You will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files. Use the following guidelines to prepare your article. For any further information please contact the Author Support Department at authorsupport@elsevier.com

BEFORE YOU BEGIN

Article Content

We are expecting articles of the highest scientific quality. Editorials on what the Journal is expecting in manuscripts are described in: "On multiple comparisons and on the design and interpretation of epidemiological studies of many associations" [Click here](#). Authors are also referred to the STROBE Statement [Click here](#).

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Policy and ethics

You are requested to provide information on funding sources supporting the work described in the manuscript. For all papers dealing with research or studies on human subjects or experimental animals, evidence must be provided of review and approval by an appropriately constituted committee for human subjects or animal research.

The work described in your article must have been carried out in accordance with *The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans* <http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>; *EC Directive 86/609/EEC for animal experiments* <http://europa.eu.int/scadplus/leg/en/s23000.htm>; *Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals* <http://www.nejm.org/general/text/requirements/1.htm>. This must be stated at an appropriate point in the article.

If this information is not provided upon submission, the paper will be returned without review.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Suggestion for Reviewers

Authors must suggest 4-5 names of potential reviewers who should have no conflict of interests with their work or that of their co-authors, including not working at their institution. For each suggested reviewer, authors must include: Full name and title, professional affiliation, and professional email address (avoiding yahoo, hotmail, gmail, etc. addresses). Please make sure that the email addresses you provide us with are valid and up-to-date. Give also at least one reason why the author is recommending her/his name as possible reviewer.

Please note that the journal may not use your suggestions. However, your help is appreciated and may speed up the selection of appropriate reviewers.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must

follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. More information about this can be found here: <http://www.elsevier.com/authors/article-transfer-service>.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information on author rights for (a) subscription articles please see <http://www.elsevier.com/journal-authors/author-rights-and-responsibilities>; (b) for open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. To learn more about existing agreements please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf e.g. by their research funder or institution

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs (<http://www.elsevier.com/access>).
- No open access publication fee payable by authors.

Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **\$2500**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Submission of Manuscripts

Authors are requested to submit their papers electronically by using online manuscript submission available at <http://ees.elsevier.com/er>. This site will guide authors stepwise through the submission process. Authors can upload their articles as Microsoft (MS) Word, WordPerfect, or LaTeX files. It is also possible to submit an article in PostScript or Adobe Acrobat PDF format, but if the article is accepted, the original source files will be needed. Zipped files containing individual files (letter to editor, manuscript, tables, figures) can also be downloaded and the online system will extract the files and allow them to be viewed and labeled. If you submit a word processing file, the system generates an Adobe Acrobat PDF version of the article for the reviewing process. Authors, reviewers, and editors send and receive all correspondence by e-mail and no paper correspondence is necessary. The manuscript will be edited according to the style of the journal, and authors must read the proofs carefully.

Online submissions require:

Cover Letter: Document (Word, WordPerfect, RTF, PDF, LaTeX) containing your cover letter to the Editors. The following statement should be included in the letter to the editor: " All of the authors have read and approved the paper and it has not been published previously nor is it being considered by any other peer-reviewed journal."

Response to Reviews (Resubmissions Only): Document (Word, WordPerfect, RTF, PDF, LaTeX) detailing your response to the reviewers' and editor's comments of a previously rejected manuscript that you are re-submitting.

Manuscript: Single word processing (Word, WordPerfect, RTF) or LaTeX file consisting of the title page, abstract, manuscript text, and any figure/table legends.

Manuscript file should include page numbers. Please do not include line numbering as this is automatically imposed by the editorial system.

Tables: Tables should be separate from the manuscript text, and can be uploaded individually or consolidated into a single file. The file description you input below when uploading your table must include the table number or range (e.g. Table 1, Tables 2-4).

Figures: Figures should be uploaded individually as TIF or EPS files. While other figure formats are allowed by the system (GIF, JPEG, Postscript, PICT, PDF, Excel and PowerPoint), they will delay the production process, should your manuscript be accepted. The file description you input when uploading your figure must include the figure number (e.g., Fig. 2A).

Manuscripts must be written in English. There are no submission fees or page charges. Manuscripts are accepted for review with the understanding that no substantial portion of the study has been published or is under consideration for publication elsewhere and that its submission for publication has been approved by all of the authors and by the institution where the work was carried out; further, that any person cited as a source of personal communication has approved such a citation. Written authorization may be required at the Editor's discretion. All papers reporting on studies involving human subjects must include documentation that the study was reviewed and approved, prior to its conduct, by an appropriate institutional review board for human subjects research. No exceptions will be made to this requirement. Manuscripts that do not meet the general criteria or standards for publication in *Environmental Research* will be immediately returned to the authors without detailed review.

Environmental Research does not publish proceedings or abstracts from scientific meetings. However, the journal welcomes submissions of papers from a specific meeting under the following conditions:

- 1) all papers must be peer-reviewed by the journal;
- 2) the decision of the editors for publishing papers is final;
- 3) proposals for publishing such papers must be submitted in advance of the meeting;
- 4) the proposers must undertake preliminary review and selection of papers for submission to the Journal; and
- 5) these papers must be submitted as a group or within a period of three months to ensure timely and coordinated publication.

Letters to the Editor

The journal encourages thoughtful and appropriate correspondence related to any published article. In such cases, the letter will be submitted to the corresponding author of the original article for response. Both the letter and the response will be published together.

PREPARATION

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

Please ensure your paper has consecutive line numbering - this is an essential peer review requirement.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file.

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

LaTeX

You are recommended to use the Elsevier article class *elsarticle.cls* (<http://www.ctan.org/tex-archive/macros/latex/contrib/elsarticle>) to prepare your manuscript and BibTeX (<http://www.bibtex.org>) to generate your bibliography.

For detailed submission instructions, templates and other information on LaTeX, see <http://www.elsevier.com/latex>.

Article structure

For original full-length and short communications:

Introduction should be as concise as possible, without subheadings.

Materials and methods should be sufficiently detailed to enable the experiments to be reproduced.

Results and Discussion may be combined and may be organized into subheadings.

For commentaries and articles related to environmental policy, alternate formats will be accepted but should include an Introduction describing the problem in terms that a general reader will understand. All statements of fact need to be referenced and papers that make use of newly acquired data must include a Materials and methods section as well as a Results and Discussion section.

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Please note that the Journal's online editorial system (EES) now offers automatic line numbering.

Page 1 should contain the article title, the names and affiliations of all authors, and the name, telephone and fax numbers, e-mail address, and complete mailing address of the person to whom all correspondence should be sent.

Page 2 should contain an abstract and five descriptive keywords.

Page 3 provides information on funding sources supporting the work described in the manuscript. For all papers dealing with research or studies on human subjects or experimental animals, evidence must be provided of review and approval by an appropriately constituted committee for human subjects or animal research. **If this information is not provided upon submission, the paper will be returned without review.**

For original full-length and short communications:

Introduction should be as concise as possible, without subheadings.

Materials and methods should be sufficiently detailed to enable the experiments to be reproduced or the study design to be understood fully.

Results and Discussion may be combined and may be organized into subheadings.

For commentaries and articles related to environmental policy, alternate formats will be accepted but should include an Introduction describing the problem in terms that a general reader will understand. All statements of fact need to be referenced and papers that make use of newly acquired data must include a Materials and methods section as well as a Results and Discussion section.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 ×

13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 5 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Abbreviations should follow the usage established by *Chemical Abstracts*. Please restrict the use of acronyms, especially non-standard ones, as much as possible.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Acknowledgments should be brief and should precede the references. In agreement with the Commission on Publication Ethics, authors must submit full information on sources of funding and other support for their work that is presented in their paper.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork *Electronic artwork General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
 - Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
 - Number the illustrations according to their sequence in the text.
 - Use a logical naming convention for your artwork files.
-
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
 - For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
 - Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files. A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications that can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

References should be cited in the text by the author's name and year of publication. References should be listed alphabetically in an unnumbered list at the end of the paper in the following style:

Baecklund, M., Pedersen, N.L., Bjorkman, L., Vahter, M., 1999. Variation in blood concentrations of cadmium and lead in the elderly. *Environ. Res.* 80, 222-230.

Letourneau, D.K., 1997. Plant-arthropod interactions in agroecosystems. In: Jackson, L.E.(Ed.), *Ecology in Agriculture*. Academic Press, San Diego, pp. 239-290.

Morgan, W.K.C., Seaton, A. (Eds.), 1995. *Occupational Lung Diseases*, 3rd ed. Saunders, Philadelphia, pp. 308-373.

References drawn from the worldwide web must include the date in which the material was accessed. The names of journals should be abbreviated according to the latest available edition of *Index Medicus* or *Chemical Abstracts Service Source Index*. Only articles that have been published or are in press should be included in the references. "Manuscript in preparation," "personal communication," and "unpublished observation" should be cited as such in the text.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations: <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

Only articles that have been published or are in press should be included in the references. "Manuscript in preparation," "personal communication," and "unpublished observation" should be cited as such in the text.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Data at PANGAEA

Electronic archiving of supplementary data enables readers to replicate, verify and build upon the conclusions published in your paper. We recommend that data should be deposited in the data library PANGAEA (<http://www.pangaea.de>). Data are quality controlled and archived by an editor in standard machine-readable formats and are available via Open Access. After processing, the author receives an identifier (DOI) linking to the supplements for checking. As your data sets will be citable you might want to refer to them in your article. In any case, data supplements and the article will be automatically linked as in the following example: [doi:10.1016/0016-7037\(95\)00105-9](https://doi.org/10.1016/0016-7037(95)00105-9). Please use PANGAEA's web interface to submit your data (<http://www.pangaea.de/submit/>).

Interactive plots

This journal encourages you to include data and quantitative results as interactive plots with your publication. To make use of this feature, please include your data as a CSV (comma-separated values) file when you submit your manuscript. Please refer to <http://www.elsevier.com/interactiveplots> for further details and formatting instructions.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes) Further considerations
- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white

- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.
- For reproduction in black-and-white, please supply black-and-white versions of the figures for printing purposes.

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their

full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

AUTHOR INQUIRIES

You can track your submitted article at http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/89/p/8045/.

You can track your accepted article at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>