

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA (UNESP)
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS
CAMPUS DE DRACENA**

Heberth Paulo dos Santos Silva

Biomédico

**TOXICIDADE DOS HERBICIDAS AMETRINA E
CLOMAZONA, ISOLADOS OU COMBINADOS, EM
MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO**

Dracena

2024

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA (UNESP)
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS
CAMPUS DE DRACENA**

Heberth Paulo dos Santos Silva

Biomédico

**TOXICIDADE DOS HERBICIDAS AMETRINA E
CLOMAZONA, ISOLADOS OU COMBINADOS, EM
MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas – Unesp, Câmpus de Dracena como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Erminio Mingatto

Dracena

2024

FICHA CATALOGRÁFICA
Desenvolvida pela Seção Técnica de Biblioteca e Documentação
Campus de Dracena

S586t

Silva, Heberth Paulo dos Santos

Toxicidade dos herbicidas ametrina e clomazona, isolados ou combinados, em mitocôndrias isoladas de fígado de rato / Heberth Paulo dos Santos Silva. -- Dracena: [s.n.], 2024.
51 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, Dracena. Área do conhecimento: Produção Animal, 2024.

Orientador: Fábio Erminio Mingatto

1. Herbicidas. 2. Toxicologia. 3. Fígado. 4. Bioenergética.
5. Adenosina trifosfato. I. Título.

Bibliotecário Fábio S. Rosas
CRB 8/6665

IMPACTO ESPERADO NA SOCIEDADE

A relação entre herbicidas e seus efeitos em células de órgãos não alvos ainda é pouco compreendida, bem como as interações dos herbicidas isolados ou combinados. Assim, o desenvolvimento de pesquisas é importante para avaliar a segurança em relação a toxicidade associada a esses produtos.

EXPECTED IMPACT ON SOCIETY

The relation between herbicides and their effects on cells in non-target organs is still poorly understood, as are the interactions between herbicides in isolation or in combination. Research is therefore important to assess the safety and toxicity associated with these products.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: TOXICIDADE DOS HERBICIDAS AMETRINA E CLOMAZONA, ISOLADOS OU COMBINADOS, EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO

AUTOR: HEBERTH PAULO DOS SANTOS SILVA

ORIENTADOR: FÁBIO ERMINIO MINGATTO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências, pela Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **FABIO ERMINIO MINGATTO**
Data: 05/03/2024 16:11:53-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Titular FÁBIO ERMINIO MINGATTO (Participação Virtual)
Departamento de Produção Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - FCAT - Unesp - Câmpus de Dracena

Documento assinado digitalmente
 **JAQUELINE DALBELLO BILLER**
Data: 08/03/2024 19:52:20-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profa. Dra. JAQUELINE DALBELLO BILLER (Participação Virtual)
Departamento de Produção Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - FCAT - Unesp - Câmpus de Dracena



Prof. Dr. MARCOS ANTONIO MAIOLI (Participação Virtual)
Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais / Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP - SP

Dracena, 01 de março de 2024.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Heberth Paulo dos Santos Silva, nascido em 21 de fevereiro de 1995, na cidade de Dracena/SP - Brasil, filho de Luciana Paula dos Santos Silva e Pedro Paulo Ribeiro da Silva. Em dezembro de 2016, concluiu a graduação em Biomedicina pela Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, em Presidente Prudente/SP. Em março de 2022, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Animal, em nível de mestrado, área de concentração Produção Animal, na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Programa Interunidades do Câmpus de Dracena e Câmpus de Ilha Solteira, realizando estudos na área de “Bioquímica Metabólica e Toxicológica”, sob a orientação do Prof. Titular Fábio Erminio Mingatto.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha esposa, Fernanda Silva Machado, e meu filho, Arthur Felipe Machado Silva, razões pelas quais dedico minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me proporcionar mais essa grande conquista e me guiar em todos os momentos.

À minha esposa, Fernanda, companheira e incentivadora, e meu filho Arthur Felipe, que ressignificou a minha vida.

Aos meus pais, Pedro e Luciana, e minha irmã, Luana, pela educação e apoio durante minha vida acadêmica.

Aos pais da minha esposa, Elias e Claudenice, e seu irmão, Eduardo, pelo apoio em todos os momentos.

Ao professor, Prof. Dr. Fábio Erminio Mingatto, por aceitar o convite para me orientar durante o mestrado, agradeço a confiança e auxílio.

À colega de mestrado, Camila Araújo Miranda, pelo auxílio nos experimentos.

Aos membros das minhas bancas de Qualificação e Defesa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Obrigado e Deus abençoe!

“Bem-aventurado o homem que põe no Senhor a sua
confiança” (Salmos 40:4).

Comissão de Ética no Uso de Animais

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **"Toxicidade dos herbicidas ametrina e clonazona, isolados ou combinados, em mitocôndrias isoladas de fígados de rato"** (TOXICITY OF THE HERBICIDES AMETRINE AND CLONAZONE, ALONE OR IN COMBINATION, IN MITOCHONDRIA ISOLATED FROM RAT LIVERS), registrada com o nº **16/2022.R1 – CEUA**, sob a responsabilidade do(a) Prof(a). Dr(a). **Fábio Erminio Mingatto** – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **Pesquisa** – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas da UNESP - Câmpus de Dracena, em **28/07/2022**.

Dracena, 10 de agosto de 2022.



Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

RESUMO

Ametrina e a clomazona são dois herbicidas amplamente utilizados na agricultura. Ambos são encontrados em amostras de alimentos e água e existem relatos na literatura de que esses compostos são tóxicos para humanos e animais. Os dados sobre os efeitos da mistura dos dois herbicidas ainda são escassos. Estudos têm demonstrado que a exposição a herbicidas pode causar desordens metabólicas e danos oxidativos em diversos tecidos, entre eles o fígado. O fígado desempenha papel central no metabolismo animal, sendo o principal órgão envolvido na biotransformação de xenobióticos, com capacidade de converter compostos hidrofóbicos em hidrossolúveis, mais facilmente eliminados pelo organismo. Sendo assim, é um alvo potencial de toxicidade no organismo. A mitocôndria é responsável pela síntese da quase totalidade do ATP necessário à manutenção da estrutura e função celular e é alvo de substâncias que podem exercer seu efeito tóxico de várias maneiras, como por exemplo, interferindo com a bioenergética ou alterando o balanço entre o sistema antioxidante e a produção de radicais livres, levando ao estresse oxidativo. O presente estudo avaliou a toxicidade dos herbicidas ametrina e clomazona, isolados ou combinados, em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, focando os efeitos na bioenergética mitocondrial. Os resultados da respiração mitocondrial demonstraram que a ametrina promove a inibição nos complexos I e II da cadeia respiratória mitocondrial enquanto a clomazona inibiu apenas o complexo I. A mistura dos dois herbicidas levou a uma maior diminuição do consumo de oxigênio e da Razão de Controle Respiratório. Observou-se redução significativa do potencial de membrana nas concentrações de 100, 150 e 200 μM dos herbicidas combinados em relação ao controle, utilizando os dois substratos; para ametrina: 100, 150 e 200 μM ; para clomazona: 100, 150 e 200 μM . Os resultados mostraram reduções significativas na quantidade do ATP mitocondrial em relação ao controle; para ametrina e clomazona isolados: 100, 150 e 200 μM ; para combinação, todas as concentrações testadas: 50, 100, 150 e 200 μM . Inibições das atividades das enzimas NADH e Succinato desidrogenases demonstraram interferências diretas na cadeia de transporte de elétrons. Portanto, os resultados do presente estudo indicam que alterações na bioenergética mitocondrial levando à diminuição da síntese de ATP podem estar relacionadas à toxicidade dos herbicidas ametrina e clomazona e que a exposição à mistura dos dois herbicidas potencializa o efeito tóxico de ambos.

Palavras-chave: Herbicidas. Toxicologia. Fígado. Bioenergética. Adenosina trifosfato.

ABSTRACT

Ametrine and clomazone are two herbicides widely used in agriculture. Both are found in food and water samples and there are reports in the literature that these compounds are toxic to humans and animals. Data on the effects of mixing the two herbicides is still scarce. Studies have shown that exposure to herbicides can cause metabolic disorders and oxidative damage in various tissues, including the liver. The liver plays a central role in animal metabolism, being the main organ involved in the biotransformation of xenobiotics, with the ability to convert hydrophobic compounds into water-soluble ones, which are more easily eliminated by the body. As such, it is a potential target for toxicity in the body. Mitochondria are responsible for synthesizing almost all the ATP needed to maintain cell structure and function and are the target of substances that can exert their toxic effect in various ways, such as interfering with bioenergetics or altering the balance between the antioxidant system and the production of free radicals, leading to oxidative stress. The present study evaluated the toxicity of the herbicides ametrine and clomazone, alone or in combination, on isolated rat liver mitochondria, focusing on the effects on mitochondrial bioenergetics. The results of mitochondrial respiration showed that ametrine and promotes inhibition in complexes I and II of the mitochondrial respiratory chain while clomazone inhibited only complex I. The mixture of the two herbicides led to a greater decrease in oxygen consumption and the Respiratory Control Ratio. A significant reduction in membrane potential was observed at concentrations of 100, 150 and 200 μM of the combined herbicides compared to the control, using both substrates; for ametrine: 100, 150 and 200 μM ; for clomazone: 100, 150 and 200 μM . The results showed significant reductions in the amount of mitochondrial ATP compared to the control; for ametrine and clomazone alone: 100, 150 and 200 μM ; for combination, all concentrations tested: 50, 100, 150 and 200 μM . Inhibition of the activities of the enzymes NADH and Succinate dehydrogenases showed direct interference in the electron transport chain. Therefore, the results of this study indicate that alterations in mitochondrial bioenergetics leading to a decrease in ATP synthesis may be related to the toxicity of the herbicides ametrine and clomazone and that exposure to a mixture of the two herbicides potentiates the toxic effect of both.

Keywords: Herbicides. Toxicology. Liver. Bioenergetics. Adenosine triphosphate.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3 REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1 Ametrina.....	16
3.2 Clomazona	17
3.3 Hepatotoxicidade	18
3.4 Mitocôndrias como alvo de toxicidade.....	19
4 MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 Reagentes	21
4.2 Ensaios com mitocôndrias isoladas	21
4.3 Local dos experimentos	21
4.4 Isolamento das mitocôndrias de fígado de rato	21
4.5 Determinação das proteínas mitocondriais	22
4.6 Determinação do consumo de oxigênio mitocondrial	22
4.7 Determinação das atividades das enzimas relacionadas à cadeia respiratória mitocondrial (NADH desidrogenase e Succinato desidrogenase).....	23
4.8 Determinação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$).....	24
4.9 Determinação da concentração de ATP mitocondrial	24
4.10 Análise estatística	25
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1 Efeitos da ametrina e clomazona no consumo de oxigênio mitocondrial ...	26
5.2 Efeitos de ametrina e clomazona sobre as atividades das enzimas relacionadas à cadeia respiratória mitocondrial (NADH desidrogenase e Succinato desidrogenase).....	34
5.3 Efeitos de ametrina e clomazona sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$)	38
5.4 Efeitos da ametrina e clomazona sobre a concentração de ATP mitocondrial	40
6 CONCLUSÃO	44
7 REFERÊNCIAS.....	45

1 INTRODUÇÃO

As substâncias químicas utilizadas para prevenção e combate de formas de vida vegetal ou animal indesejáveis nas culturas agrícolas, na pecuária, nas casas, nos jardins e na saúde pública, recebem várias denominações, dentre elas, defensivos agrícolas, biocidas, praguicidas, agrotóxicos e agroquímicos (MOURA, 2008). Segundo Moragas (2003) os praguicidas podem ser divididos de acordo com as diversas classes de uso, tendo como exemplo: acaricidas (destinados ao controle de ácaros); fungicidas (destinados a eliminar fungos); herbicidas (destinados a eliminar ou impedir o crescimento de ervas daninhas); inseticidas (destinados a eliminar insetos); raticidas (destinados a eliminar ratos, marmotas, toupeiras, preás e camundongos); nematicidas (ação de combate a nematoides); molusquicidas (ação de combate a moluscos).

Entre os praguicidas utilizados na agricultura, aproximadamente 50% correspondem ao grupo dos herbicidas, desta forma esta classe dos praguicidas é a mais representativa no mundo. A maior parte deles apresenta baixa taxa de degradação, com consequente persistência no solo, podendo atingir os lagos e águas subterrâneas, devido à permeação através do solo (Hertwig *et al.*, 1983; Ferracini *et al.*, 2005; Armas *et al.*, 2007). Portanto, se por um lado, eles cumprem o papel de proteger as culturas agrícolas e propiciar maior produtividade e, consequentemente, ampliar a produção de alimentos, por outro, o seu uso indiscriminado e pouco criterioso, traz sérios problemas para o meio ambiente e para a saúde humana e animal.

Uma técnica moderna amplamente utilizada para o controle de plantas daninhas é a associação de dois ou mais herbicidas. Entre as principais vantagens apresentadas estão o aumento do espectro de controle das ervas daninhas, a redução de custos e a prevenção do surgimento de plantas resistentes aos herbicidas (Gressel, 1990; Dekker, 1995; Damalas; Eleftherohorinos, 2001).

O fígado absorve grandes quantidades de nutrientes por meio do trato digestivo e veia porta, sendo capaz de sintetizar e degradar uma variedade de moléculas de forma regulada. As principais funções hepáticas são a captação de aminoácidos, lipídios, carboidratos e vitaminas, com subsequente armazenamento, conversão metabólica e liberação no sangue e bile. Além disso, o fígado é também o principal

órgão envolvido na biotransformação de substâncias exógenas (xenobióticos), com capacidade de converter compostos hidrofóbicos em hidrossolúveis, mais facilmente eliminados pelo organismo (Guillouzo, 1998; Ponce *et al.*, 2018).

Embora as reações de biotransformação estejam associadas ao processo de desintoxicação, em alguns casos o metabolismo do xenobiótico é prejudicial às células devido à produção de metabólitos altamente reativos, mais tóxicos do que o composto de origem, entre eles, eletrófilos, radicais e espécies reativas de oxigênio; estes, por sua vez, podem reagir diretamente com macromoléculas celulares ou iniciar reações em cadeia (Guillouzo, 1998).

A mitocôndria é a organela responsável pela síntese da quase totalidade do ATP necessário à manutenção da estrutura e função celular. Dados experimentais indicam que a mitocôndria representa um alvo preferencial e crítico para a ação de drogas, toxinas e metabólitos reativos. Os efeitos tóxicos sobre as mitocôndrias podem ocorrer por mecanismos diretos e indiretos, levando a disfunções mitocondriais, tais como alterações no transporte de elétrons e fosforilação oxidativa, na permeabilidade da membrana mitocondrial interna, no transporte de cálcio, no estado oxidativo, além de uma série de outros eventos que levam à depleção de ATP (Nadanaciva *et al.*, 2007; Mingatto *et al.*, 2007; Dykens *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2012; Tavares *et al.*, 2015; Bizerra *et al.*, 2018).

Estudos demonstraram que a ametrina pode causar danos ao fígado em animais, incluindo diminuição da atividade de certas enzimas envolvidas no sistema antioxidante e alterações na estrutura do órgão (Santos *et al.*, 2015). Adicionalmente, estudos prévios realizados em nosso laboratório demonstraram que a ametrina afeta o consumo de oxigênio mitocondrial atuando como inibidor da cadeia respiratória (Ortiz, 2021). Em relação ao clomazona, estudos demonstraram que o herbicida pode causar hepatotoxicidade em animais, incluindo alterações estruturais nos hepatócitos com inchamento e lise das cristas mitocondriais e danos oxidativos (Crestani *et al.*, 2007; Cattaneo *et al.*, 2012; Fagundes *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2016).

Baseado nas considerações acima, o presente estudo visou avaliar os efeitos dos herbicidas ametrina e clomazona, isolados ou combinados, sobre mitocôndrias isoladas de fígado de rato, para descrever os mecanismos bioquímicos relacionados aos efeitos tóxicos dessas substâncias sobre o fígado, e ainda, avaliar se a mistura dos dois herbicidas pode causar sinergismo, potencializando a toxicidade de ambos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar as alterações após a exposição aos herbicidas ametrina e clomazona, isolados ou combinados, em mitocôndrias isoladas de fígado de rato e caracterizar alterações metabólicas como forma de contribuir para a compreensão dos mecanismos de ação tóxica desses compostos.

2.1 Objetivos Específicos

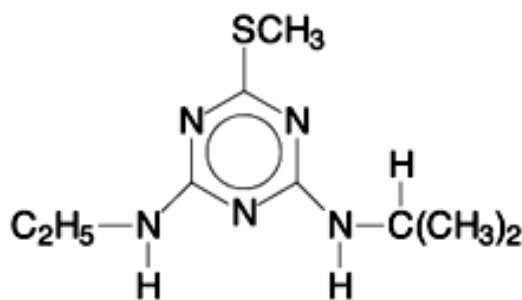
Avaliar a bioenergética em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, por meio de ensaios que avaliem o potencial de membrana mitocondrial, síntese de ATP, consumo de oxigênio e atividades das enzimas relacionadas à cadeia respiratória mitocondrial.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Ametrina

A ametrina (Figura 1) é um herbicida seletivo sistêmico, utilizado no combate de plantas daninhas anuais (folhas estreitas e largas), que está associada, principalmente, às culturas de abacaxi, banana, café, cana-de-açúcar, citros e milho. Por ser pouco estável, ela apresenta uma meia-vida de 20 a 100 dias, tornando-se muito móvel no ambiente e altamente persistente na água e no solo. Há relatos de seus metabólitos encontrados em águas subterrâneas mesmo depois de longos períodos após sua aplicação (Ignjatovic *et al.*, 1998).

Figura 1 - Estrutura química da Ametrina



Fonte: Cabral *et al.* (2002).

A ametrina é um dos herbicidas mais utilizados na cultura da cana-de-açúcar tropical, principal cultura do Estado de São Paulo. É conhecido como poluente difuso, sendo encontrado em águas superficiais e sedimentos de corpos d'água adjacentes aos campos de cultivo (Cerdeira *et al.*, 2005; Jacomini *et al.*, 2009).

Em estudo realizado por Armas *et al.*, (2007) sobre o diagnóstico espaço-temporal da ocorrência de herbicidas no rio Corumbataí, observou-se a presença de resíduos de ametrina nas amostras de água e sedimentos durante o período do estudo. Amplamente utilizada para otimizar a produção de cana-de-açúcar, as triazinas apresentam problema ambiental para organismos não alvos. Por ser uma substância com alta mobilidade, persistência, solubilidade em água e infiltração fraca no solo, a soma desses fatores faz com que o composto se torne facilmente transportado por escoamento superficial e lixiviação.

Conforme descrito por Machado *et al.*, (2017), a poluição de rios próximos a áreas urbanas representa um risco para a saúde humana por conta da exposição direta aos produtos químicos ou ingestão de água e peixes contaminados. Após avaliação de amostras de água e sedimentos do rio Pardo, São Paulo, durante a estação chuvosa foi constatada a presença da ametrina, evidenciando a necessidade de intensificação na fiscalização sobre a utilização deste composto químico nas lavouras.

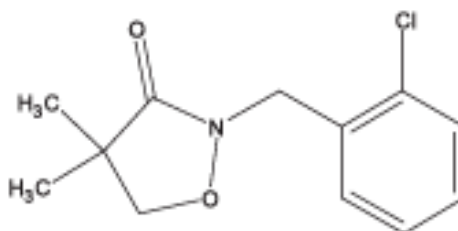
Resíduos de ametrina também foram detectados em forragens e leite de vaca, e concentrações mínimas também foram encontradas em tubérculos, como mandioca e inhame (Asongalem; Akintonwa, 1997).

A avaliação toxicológica dos efeitos da ametrina em ratos Wistar, após tratamento com duas doses sub-letais (15 e 30 mg/kg/dia) por 56 dias, demonstrou que a exposição ao herbicida causou genotoxicidade, alterações na morfologia dos hepatócitos, com redução do diâmetro e volume nuclear, e estresse oxidativo (SANTOS *et al.*, 2015).

3.2 Clomazona

O herbicida clomazona (Figura 2), foi desenvolvido no início de 1980 para o controle de gramíneas anuais e ervas daninhas de folha larga em uma ampla variedade de culturas e localizações (GUNASEKARA *et al.*, 2009).

Figura 2 - Estrutura química da Clomazona



Fonte: SILVA *et al.* (2012).

É considerado um pré-herbicida, uma vez que precisa ser ativado durante sua metabolização na planta em que foi aplicado, a qual transforma a molécula para a forma 5-ceto-clomazona, que é o metabólito com atividade herbicida (Tenbrook; Tjeerdema, 2006). É seletivo, utilizado em pré ou pós-emergência inicial no controle

de várias espécies daninhas (Andres; Machado, 2004) em culturas como a de arroz, soja, mandioca, cana-de-açúcar e algodão.

Zanella *et al.*, (2002) relataram que os resíduos de clomazona podem ser detectados em até 90% dos cursos de água perto de regiões de cultivo de arroz. Portanto esse herbicida pode chegar a rios, lagos e nascentes de água através do vazamento constante de água a partir destas culturas durante o período de plantio e colheita ou pela lixiviação em períodos chuvosos, atingindo assim outros organismos. Abramovic *et al.*, (2013), estudaram a toxicidade do clomazona e de seus intermediários de decomposição em células de hepatoma de rato e pulmão fetal humano, onde foi observado uma redução no desenvolvimento das células de 15 e 17%, respectivamente.

Dados da EFSA (2007), em estudos realizados com a clomazona em curto prazo, onde o fígado foi o órgão-alvo em todas as espécies testadas (rato, camundongo e cão), mostraram aumento do peso absoluto e/ou relativo do órgão, alterações nos hepatócitos (megalocitose) e alterações relacionadas nos parâmetros clínicos (níveis elevados de colesterol). No estudo de teratogenicidade em ratos, a toxicidade materna se manifestou por uma diminuição no consumo de alimentos. Os efeitos fetais apresentaram diminuição do peso corporal, aumento da incidência de ossificações e anormalidades viscerais (hidro ureter, dentro dos dados de controle histórico).

3.3 Hepatotoxicidade

Substâncias capazes de produzir danos aos hepatócitos são denominadas hepatotóxicas. Os hepatotóxicos intrínsecos afetam todos os indivíduos em uma forma dose-dependente e, portanto, previsivelmente, podendo interferir com o metabolismo celular (hepatotóxicos ativos) ou tornarem-se tóxicos após biotransformação (hepatotóxicos latentes). A hepatotoxicidade idiossincrática, por outro lado, é dose-independente, podendo ser uma consequência do metabolismo anormal do xenobiótico em indivíduos susceptíveis (idiossincrasia metabólica) ou ser provocada por lesão hepática mediada pelo sistema imune (hepatite alérgica); nesses casos, mesmo pequenas concentrações de um fármaco podem provocar toxicidade. A atividade do fígado no metabolismo de substâncias exógenas é mediada

principalmente pelo citocromo P450 (CYP). Embora as reações de biotransformação estejam associadas ao processo de desintoxicação, em alguns casos o metabolismo do xenobiótico é prejudicial às células devido à produção de metabólitos altamente reativos, mais tóxicos do que o composto de origem, entre eles, eletrófilos, radicais e ERO; estes, por sua vez, podem reagir diretamente com macromoléculas celulares ou iniciar reações em cadeia (Guillouzo, 1998).

Algumas hepatotoxinas encontradas na natureza são produtos de plantas, metabolismo de fungos e bactérias ou são minerais. Muitos agentes hepatotóxicos são produtos da indústria química ou farmacêutica. Outros ainda são subprodutos ou resíduos de materiais industriais que, por poluir o ambiente, podem ter acesso a humanos e animais. A lesão hepatotóxica pode ter várias formas. Alguns agentes levam à necrose, esteatose, cirrose ou carcinoma (SCHOENTAL, 1963; Tolman; Sirrine, 1998; Zimmerman, 2000). Outros levam apenas a interferências na secreção biliar e icterícia, com pequena ou nenhuma lesão evidente ao parênquima hepático (Rouiller, 1964; Zimmerman, 2000). Alguns produzem lesões degenerativas ou vasculares ou até mesmo ao nível de organelas.

3.4 Mitocôndrias como alvo de toxicidade

A mitocôndria é a organela responsável pela síntese da quase totalidade do ATP necessário à manutenção da estrutura e função celular. Os elétrons doados por substratos oxidáveis à cadeia respiratória na membrana mitocondrial interna, por meio de NADH ou FADH₂, são transferidos ao O₂ reduzindo-o a H₂O (respiração mitocondrial), e a energia livre resultante é utilizada para a síntese de ATP (fosforilação oxidativa). De acordo com a hipótese quimiosmótica de Mitchell em associação com a do acoplamento conformacional de Boyer, o fluxo de elétrons é acompanhado de bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, gerando um gradiente eletroquímico de H⁺. A energia livre liberada no retorno do H⁺ à matriz mitocondrial induz alteração conformacional no componente F₁ da F₀F₁-ATP sintase, liberando o ATP formado a partir de ADP e Pi em seus sítios catalíticos (Mitchell, 1961; Boyer; Cross; Momsen, 1973). Quando a membrana mitocondrial se torna permeável a H⁺ ocorre dissipação do potencial de membrana aumentando a velocidade de respiração; sob essas condições (desacoplamento), a

capacidade da mitocôndria de sintetizar ATP é comprometida (Mitchell, 1961; Nicholls, 1982).

Evidências experimentais indicam que a mitocôndria representa um alvo preferencial e crítico para a ação de drogas e toxinas. Os efeitos tóxicos sobre as mitocôndrias podem ocorrer por mecanismos diretos e indiretos, levando a disfunções mitocondriais, tais como alterações no transporte de elétrons e fosforilação oxidativa, na permeabilidade da membrana mitocondrial interna, no transporte de cálcio, no estado oxidativo, além de uma série de outros eventos que levam à depleção de ATP (Nadanaciva *et al.*, 2007; Mingatto *et al.*, 2007; Dykens *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2012; Tavares *et al.*, 2015; Bizerra *et al.*, 2018). Além do seu papel crítico na síntese de ATP, a mitocôndria também é a maior responsável pela formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Votyakova; Reynolds, 2001; Kowaltowski *et al.*, 2009) e controla a morte celular (Crompton *et al.*, 1999; Kowaltowski; Castilho; Vercesi, 2001; Kim *et al.*, 2003).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes

Os herbicidas ametrina e clomazona foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich Brasil Ltda. Todos os demais reagentes a serem utilizados neste estudo foram adquiridos com o mais alto grau de pureza.

4.2 Ensaios com mitocôndrias isoladas

Os ensaios empregando ratos Wistar propostos neste projeto foram submetidos à aprovação do Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas da Unesp – Câmpus de Dracena, Protocolo nº 16/2022.R1.

4.3 Local dos experimentos

Todos os experimentos foram realizados Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - FCAT/UNESP, Câmpus de Dracena, no Laboratório de Bioquímica Metabólica e Toxicológica (LaBMeT).

4.4 Isolamento das mitocôndrias de fígado de rato

O método da centrifugação diferencial (PEDERSEN et al., 1978) foi aplicado no isolamento das mitocôndrias provenientes de ratos Wistar machos, com 180-200 g. Os animais foram eutanasiados por decapitação em guilhotina e a exposição do fígado ocorrerá mediante incisão bilateral na cavidade abdominal, com remoção imediata, sendo picotado em pequenos fragmentos e imersos rapidamente em 50 mL de meio contendo sacarose 250 mM, ácido etilenoglicol bis(β -aminoetiléter) N,N,N',N'-tetraacético (EGTA) 1 mM e ácido 2-[4(2 hidroxietil) piperazinil(1)] etanossulfônico (HEPES)-KOH 10 mM, pH 7,2, a 4°C. Os fragmentos, após lavagens sucessivas no mesmo meio, foram homogeneizados três vezes por 15 segundos, com intervalos de 1 minuto, em homogeneizador Potter-Elvehjem. A suspensão obtida foi centrifugada

a 770 g durante 5 minutos, a 4°C, e o sobrenadante resultante foi centrifugado a 9.800 g durante 10 minutos, a 4°C. O sedimento obtido foi ressuspense em 10 mL de meio contendo sacarose 250 mM, EGTA 0,3 mM e HEPES-KOH 10 mM, pH 7,2, e centrifugado a 4.500 g durante 15 minutos, a 4°C. O sedimento mitocondrial final resultante foi homogeneizado em 1 mL de meio contendo sacarose 250 M e HEPES-KOH 10 mM, pH 7,2, mantido em temperatura de 4°C e utilizado por um período máximo de 3 horas após o isolamento.

4.5 Determinação das proteínas mitocondriais

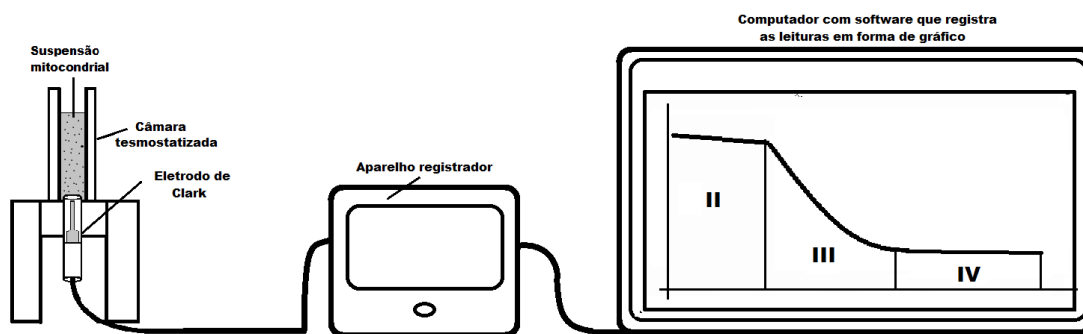
A concentração das proteínas mitocondriais foi determinada empregando-se a reação do biureto, conforme Cain; Skilleter (1987). Uma alíquota de 10 µL da suspensão mitocondrial foi solubilizada em 100 µL de ácido deoxicólico 5% (m/v), seguido de 1390 µL de água Milli-Q® e 1500 µL de reagente Biureto 0,15% (m/v). A concentração de proteína foi determinada em comprimento de onda de 540 nm com o uso do espectrofotômetro do modelo DU-800 (Beckman Coulter, Fullerton, CA), usando a albumina de soro bovino (BSA) como padrão, preparada nas mesmas condições das amostras.

4.6 Determinação do consumo de oxigênio mitocondrial

O consumo de oxigênio pelas mitocôndrias foi monitorado polarograficamente em oxímetro equipado com eletrodo de oxigênio do tipo Clark (Strathkelvin Precision Dissolved Oxygen Respirometer, Strathkelvin Instruments Limited, Glasgow, Scotland, UK) e os parâmetros respiratórios determinados conforme CHANCE WILLIAMS, 1955. As mitocôndrias (1 mg de proteína/mL) foram incubadas sob agitação, em uma câmara fechada e termostatizada a 30°C, no meio de respiração contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM e HEPES-KOH 10 mM, acrescido de EGTA 0,5 mM e K₂HPO₄ 10 mM (pH7,4) e energizadas com glutamato 5 mM + malato 5 mM ou succinato de potássio 5 mM (acrescido de rotenona 50 nM). Diferentes concentrações (50, 100, 150 e 200 µM) de ametrina ou clomazona, ou de uma mistura das duas substâncias, foram adicionadas e as velocidades de consumo de oxigênio nos estados 2, 3 e 4 da respiração foram determinadas por meio do software Strathkelvin Oxygen 782 System (versão 3.0, 2005) e expressas como nmol O₂

consumido/min/mg de proteína. O estado 3 da respiração teve início após a adição de 400 nmols de ADP.

Figura 3 - Representação esquemática do oxímetro utilizado para o monitoramento do consumo de oxigênio pelas mitocôndrias isoladas de fígado de rato e do software usado para registrar e calcular as velocidades de consumo de oxigênio.



Fonte: MAIOLI (2012).

4.7 Determinação das atividades das enzimas relacionadas à cadeia respiratória mitocondrial (NADH desidrogenase e Succinato desidrogenase)

As atividades das enzimas NADH desidrogenase e Succinato desidrogenase foram medidas espectrofotometricamente de acordo com Bracht; Ishii-Iwamoto; Salgueiro-Pagadigorria (2003), utilizando espectrofotômetro modelo DU-800 (Beckman Coulter, Fullerton, CA). O meio de reação (volume final de 1,5 mL) continha Tris 20 mM, pH 7,4 e antimicina A 1 μ M. Mitocôndrias rompidas por congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido (0,2 mg/mL) foram acrescidas, juntamente com as diferentes concentrações das substâncias, NADH 1 mM ou succinato 10 mM e ferricianeto de potássio 0,4 mM, como aceitor de elétrons. A quantidade de ferricianeto reduzido foi determinada pelo decréscimo da absorvância em comprimento de onda de 420 nm e a atividade das enzimas foi representada em nmol/min.mg de proteína, considerando o coeficiente de extinção molar do ferricianeto de 1,04 mM⁻¹.

4.8 Determinação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$)

O potencial de membrana mitocondrial foi determinado em espectrofluorímetro modelo RFPC 5301 (Shimadzu, Tokyo, Japão), monitorando-se as variações de fluorescência promovida pela captação de safranina O, nos comprimentos de onda de 505 e 535 nm para excitação e emissão, respectivamente. As mitocôndrias (1 mg de proteína/mL) foram incubadas a 30°C em meio de reação (volume final de 2 mL) contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM, EGTA 0,5 mM, HEPES-KOH 10 mM, pH 7,4, e o indicador safranina O 4 μ M. Os substratos usados foram glutamato 5 mM + malato 5 mM ou succinato 5 mM (acrescido de rotenona 2,5 μ M). Os resultados foram expressos como porcentagem em relação à fluorescência da amostra controle, ou seja, sem adição dos compostos testados.

4.9 Determinação da concentração de ATP mitocondrial

O método de bioluminescência (sistema luciferina-luciferase de vagalume) foi utilizado na quantificação de ATP mitocondrial, por meio do kit “Bioluminescent Assay Kit” (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em um aparelho Luminômetro modelo Sirius I (Berthold Detection Systems, Pforzheim, Alemanha). O meio de reação (volume final de 1mL) continha sacarose 125 mM, KCl 65 mM, EGTA 0,5 mM, HEPES-KOH 10 mM, pH 7,4, acrescido de glutamato 5 mM mais malato 5 mM como substratos. As diferentes concentrações dos compostos foram adicionadas, além da suspensão mitocondrial (1 mg de proteína/mL). Após homogeneização, as amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, foram centrifugadas a 9.000 *g* durante 5 minutos, a 4°C. Os sedimentos resultantes foram solubilizados em 1 mL de ácido percloroacético 1 M gelado e centrifugados a 12.000 *g* durante 15 minutos, a 4°C. Após a centrifugação, foram coletados 100 μ L de cada amostra e neutralizados (pH 7,0) com KOH 2 M, seguido da adição de Tris-HCl 100 mM, pH 7,8 (volume final de 1 mL) e centrifugação a 12.000 *g*, durante 10 minutos a 4°C. Uma alíquota de 100 μ L de cada sobrenadante resultante foi avaliada em triplicata no Luminômetro, de acordo com as recomendações do fabricante do kit.

4.10 Análise estatística

A significância estatística dos dados experimentais foi avaliada pela análise de variância ANOVA, seguida do Teste de Dunnet e os resultados com valor de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

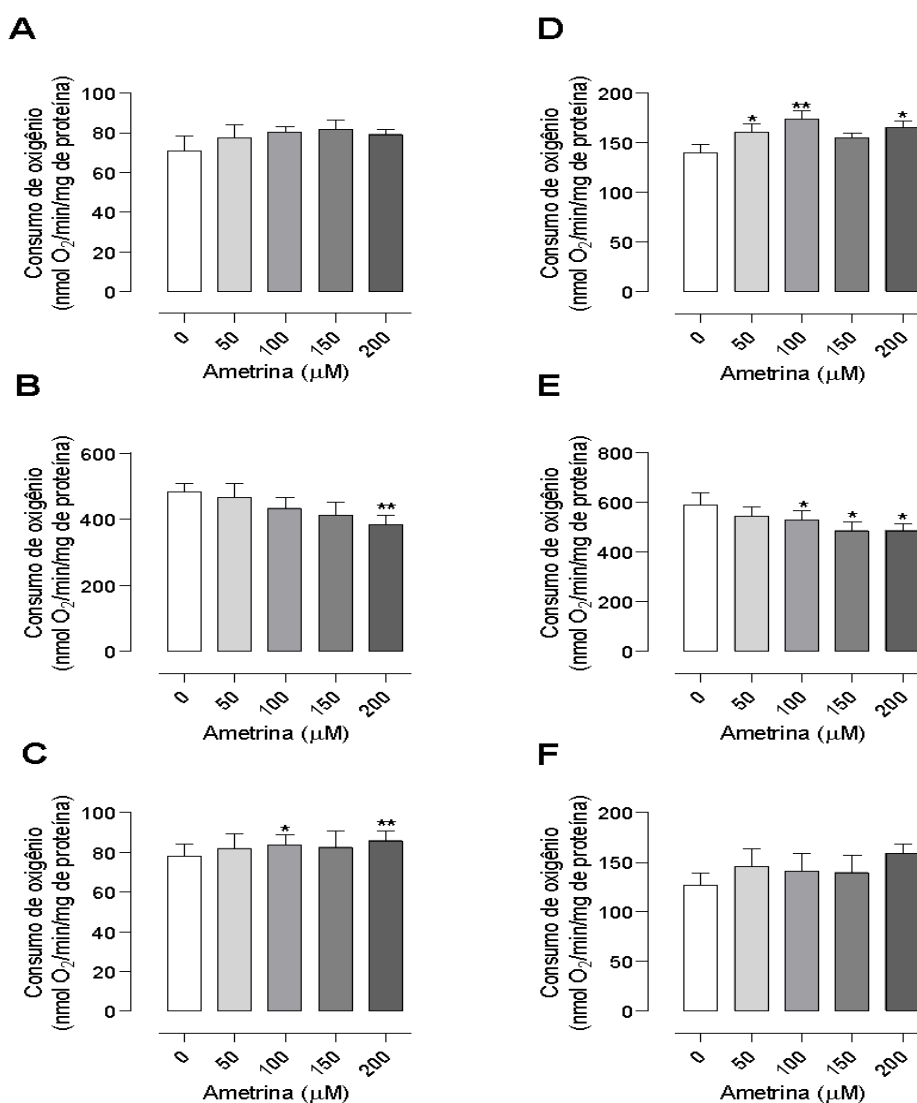
5.1 Efeitos da ametrina e clomazona no consumo de oxigênio mitocondrial

A ametrina inibiu significativamente a velocidade de consumo de oxigênio do estado 3 da respiração mitocondrial na concentração de 200 μM e estimulou o estado 4 nas concentrações de 100 e 200 μM nas mitocôndrias energizadas com glutamato + malato (doadores de elétrons do complexo I). Nas mitocôndrias energizadas com succinato (doador de elétrons do complexo II), a ametrina estimulou significativamente o estado 2 nas concentrações de 50, 100 e 200 μM e inibiu o estado 3 nas concentrações de 100, 150 e 200 μM (Figura 4).

A Figura 5 mostra os efeitos da clomazona sobre a velocidade de consumo de oxigênio dos estados 2, 3 e 4 da respiração mitocondrial. O herbicida inibiu significativamente o estado 3 nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 μM nas mitocôndrias energizadas com glutamato + malato e não afetou o consumo de oxigênio nas mitocôndrias energizadas com succinato.

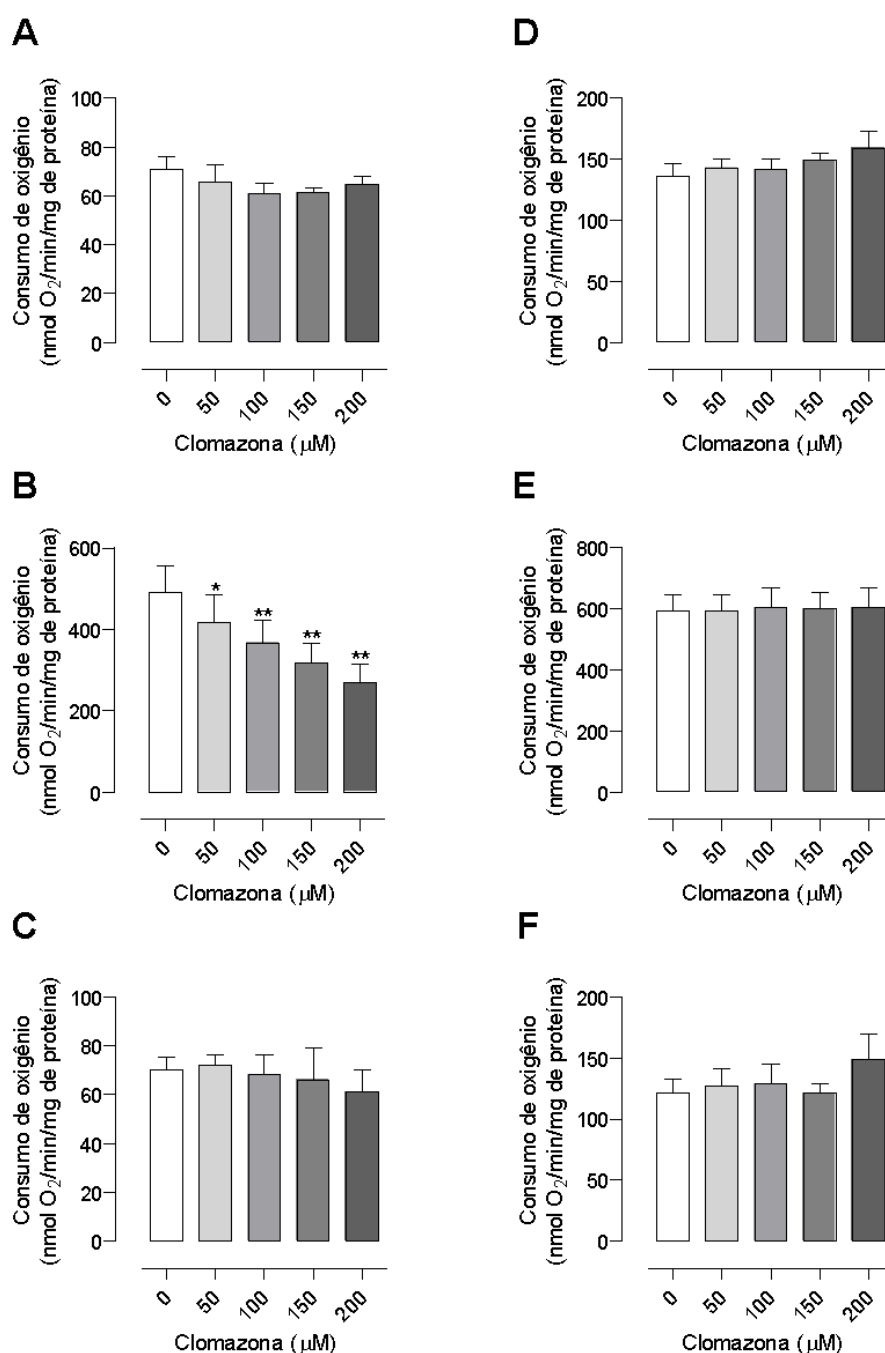
A combinação dos herbicidas apresentou efeito significativo no estado 2 da respiração mitocondrial na concentração de 150 μM , e no estado 3, nas concentrações de 100, 150 e 200 μM em mitocôndrias energizadas com glutamato + malato. Em mitocôndrias energizadas com succinato, houve inibição significativa da respiração de estado 3 apenas na concentração de 150 μM (Figura 6).

Figura 4 - Efeito da ametrina no consumo de oxigênio de mitocôndrias isoladas de fígado de rato: (A) estado 2, (B) estado 3 e (C) estado 4 da respiração em mitocôndrias energizadas com glutamato 5 mM + malato 5 mM; (D) estado 2, (E) estado 3 e (F) estado 4 da respiração em mitocôndrias energizadas com succinato 5 mM (+ rotenona 50 nM). Os valores representam a média $\pm$ EPM de três a quatro experimentos com diferentes preparações mitocondriais. *,**Significativamente diferente do controle, sem adição da Ametrina (*P < 0,05; **P < 0,01).



Fonte: elaborado pelo autor.

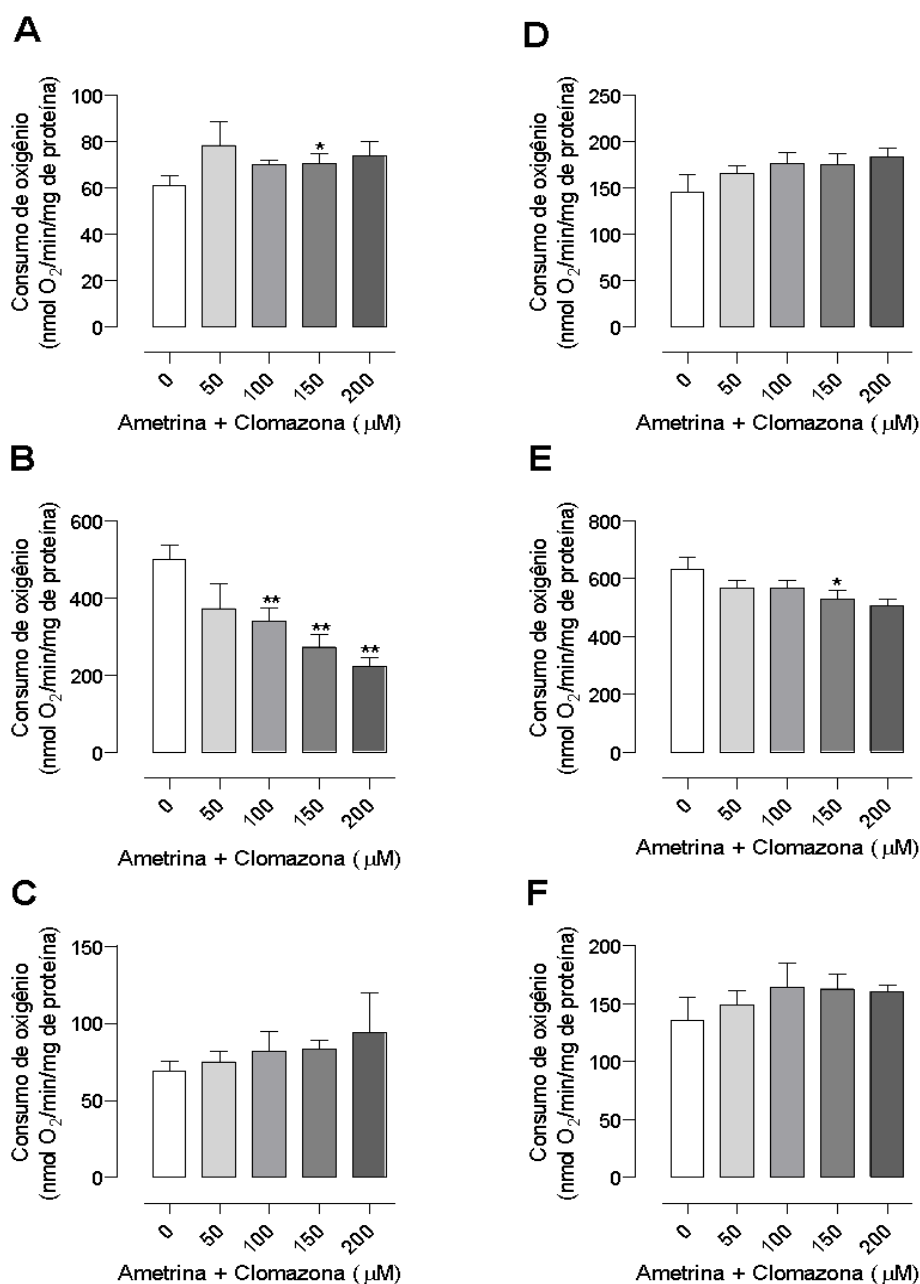
Figura 5 - Efeito da clomazona no consumo de oxigênio de mitocôndrias isoladas de fígado de rato: (A) estado 2, (B) estado 3 e (C) estado 4 da respiração em mitocôndrias energizadas com glutamato 5 mM + malato 5 mM; (D) estado 2, (E) estado 3 e (F) estado 4 da respiração em mitocôndrias energizadas com succinato 5 mM (+ rotenona 50 nM). Os valores representam a média $\pm$ EPM de três a quatro experimentos com diferentes preparações mitocondriais. *, **Significativamente diferente do controle, sem adição da clomazona (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 6 - Efeito da mistura da ametrina + clomazona no consumo de oxigênio de mitocôndrias isoladas de fígado de rato: (A) estado 2, (B) estado 3 e (C) estado 4 da respiração em mitocôndrias energizadas com glutamato 5 mM + malato 5 mM; (D) estado 2, (E) estado 3 e (F) estado 4 da respiração em mitocôndrias energizadas com succinato 5 mM (+ rotenona 50 nM). Os valores representam a média $\pm$ EPM de três a quatro experimentos com diferentes preparações mitocondriais.

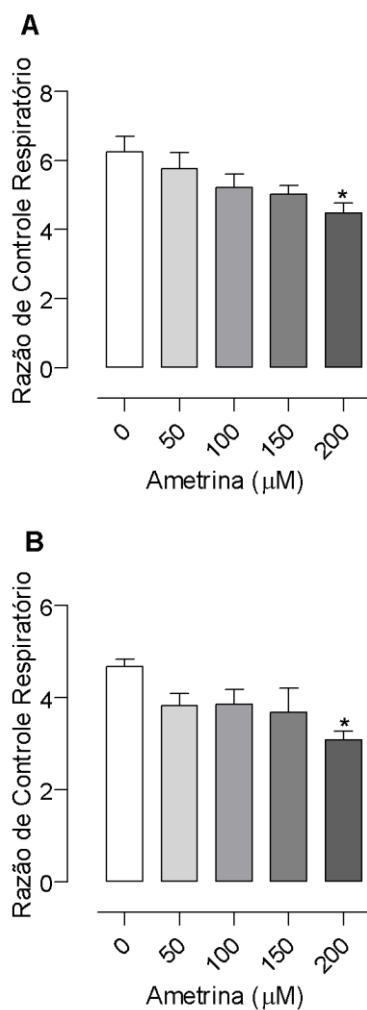
*,**Significativamente diferente do controle, sem adição da mistura da ametrina + clomazona (*P < 0,05; **P < 0,01).



Fonte: elaborado pelo autor.

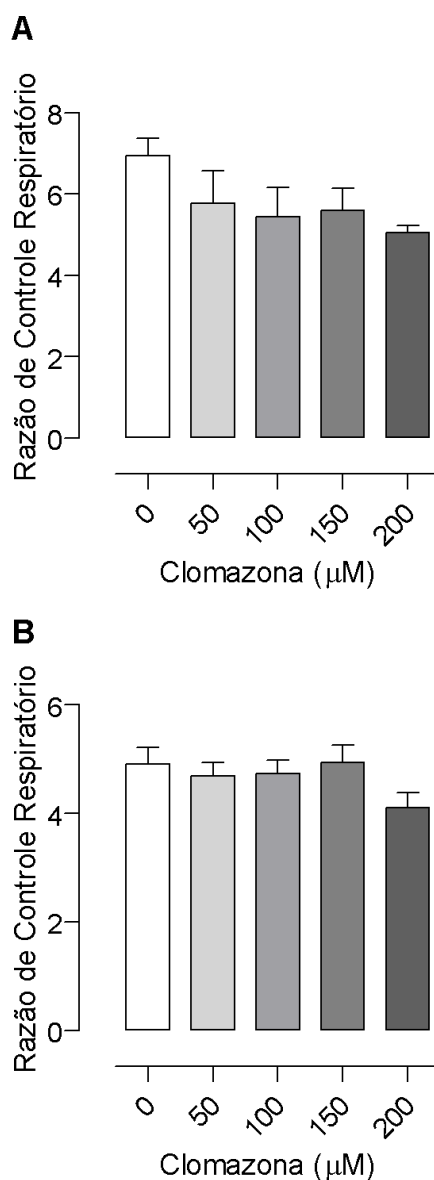
Com relação à atuação dos herbicidas na Razão de Controle Respiratório (Estado 3/Estado 4), efeitos significantes foram observados na concentração de 200 μM de ametrina tanto em mitocôndrias energizadas com glutamato + malato quanto em mitocôndrias energizadas com succinato (Figura 7). Não foram observados efeitos na Razão de Controle Respiratório nos ensaios realizados com clomazona (Figura 8). Entretanto, utilizando a combinação dos herbicidas, alterações significantes foram observadas em todas as concentrações da mistura nas mitocôndrias energizadas com glutamato + malato (Figura 9A) e nas concentrações de 100, 150 e 200 μM em mitocôndrias energizadas com succinato (Figura 9).

Figura 7 - Efeito da ametrina na Razão de Controle Respiratório (Estado 3/Estado 4) em mitocôndrias isoladas de fígado de rato energizadas com glutamato 5 mM + malato 5 mM (A) ou succinato 5 mM (+ rotenona 50 nM) (B). Os valores representam a média $\pm$ EPM de três a quatro experimentos com diferentes preparações mitocondriais. *, **Significantemente diferente do controle, sem adição da ametrina (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).



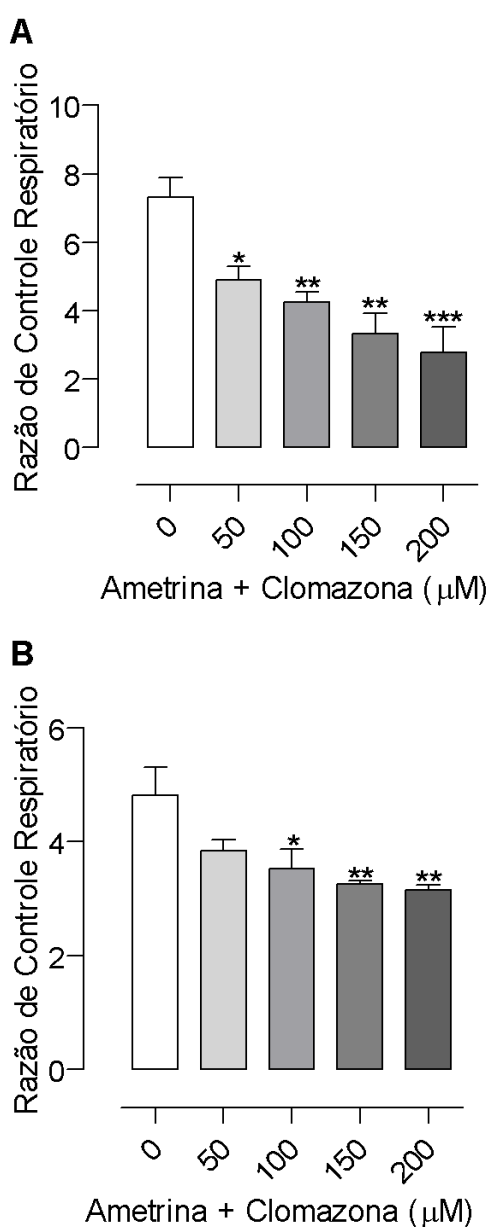
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 8 - Efeito da clomazona na Razão de Controle Respiratório (Estado 3/Estado 4) em mitocôndrias isoladas de fígado de rato energizadas com glutamato 5 mM + malato 5 mM (A) ou succinato 5 mM (+ rotenona 50 nM) (B). Os valores representam a média $\pm$ EPM de três a quatro experimentos com diferentes preparações mitocondriais. *, **Significantemente diferente do controle, sem adição da clomazona (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 9 - Efeito da mistura da ametrina + clomazona na Razão de Controle Respiratório (Estado 3/Estado 4) em mitocôndrias isoladas de fígado de rato energizadas com glutamato 5 mM + malato 5 mM (A) ou succinato 5 mM (+ rotenona 50 nM) (B). Os valores representam a média $\pm$ EPM de três a quatro experimentos com diferentes preparações mitocondriais. *, **, ***Significativamente diferente do controle, sem adição da mistura da ametrina + clomazona (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; $P < 0,001$).



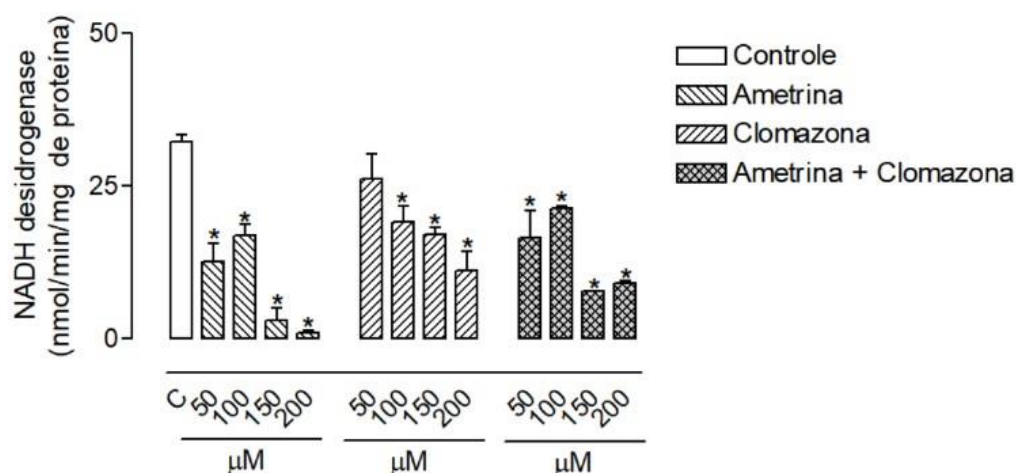
Fonte: elaborado pelo autor.

5.2 Efeitos de ametrina e clomazona sobre as atividades das enzimas relacionadas à cadeia respiratória mitocondrial (NADH desidrogenase e Succinato desidrogenase)

Com relação à atuação dos herbicidas na atividade da enzima NADH desidrogenase, pertencente ao complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, foi observado efeito inibidor em todas as concentrações testadas da ametrina e da mistura ametrina + clomazona, e nas concentrações de 100, 150 e 200 μM para a clomazona (Figura 10).

Quando avaliados os efeitos dos herbicidas sobre a enzima Succinato desidrogenase, localizada no complexo II da cadeia respiratória mitocondrial, observou-se inibição pela ametrina nas concentrações 150 e 200 μM e pela clomazona em todas as concentrações testadas. A combinação dos herbicidas não afetou a atividade da enzima (Figura 11).

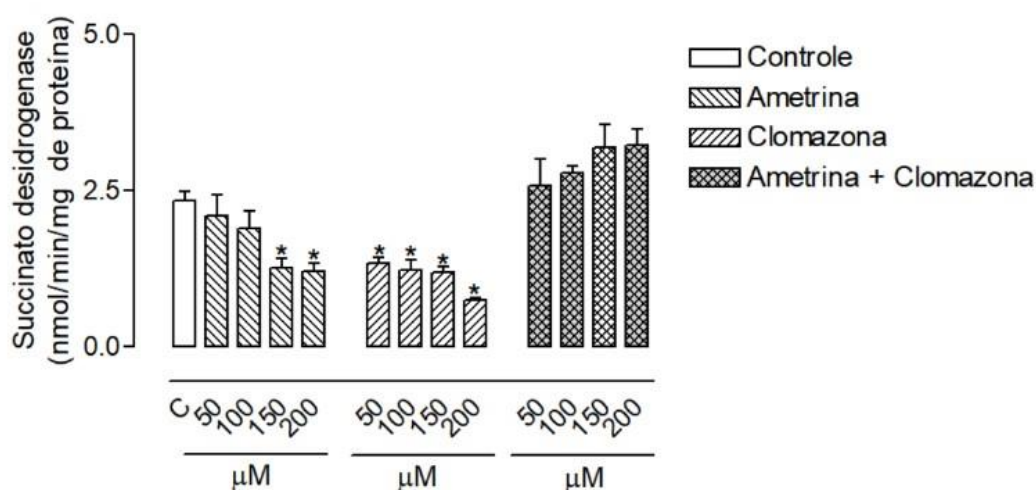
Figura 10 - Efeitos da ametrina e clomazona, isolados ou combinados, na atividade da enzima NADH desidrogenase. Os valores representam a média $\pm$ EPM de quatro experimentos com diferentes preparações mitocondriais. *Significantemente diferente do controle ($P < 0,05$). C = controle, sem adição de ametrina, clomazona ou da mistura dos herbicidas.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 11 - Efeitos da ametrina e clomazona, isolados ou combinados, nas atividades da enzima Succinato desidrogenase. Os valores representam a média $\pm$ EPM de quatro experimentos com diferentes preparações mitocondriais.

Significantemente diferente do controle ($P < 0,05$). C = controle, sem adição de ametrina, clomazona ou da mistura dos herbicidas.

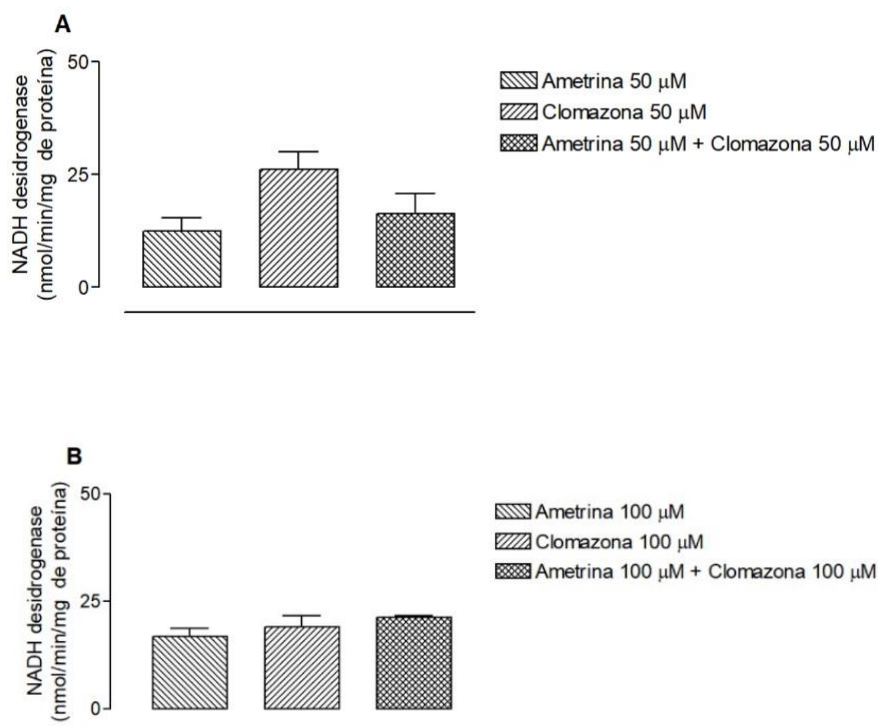


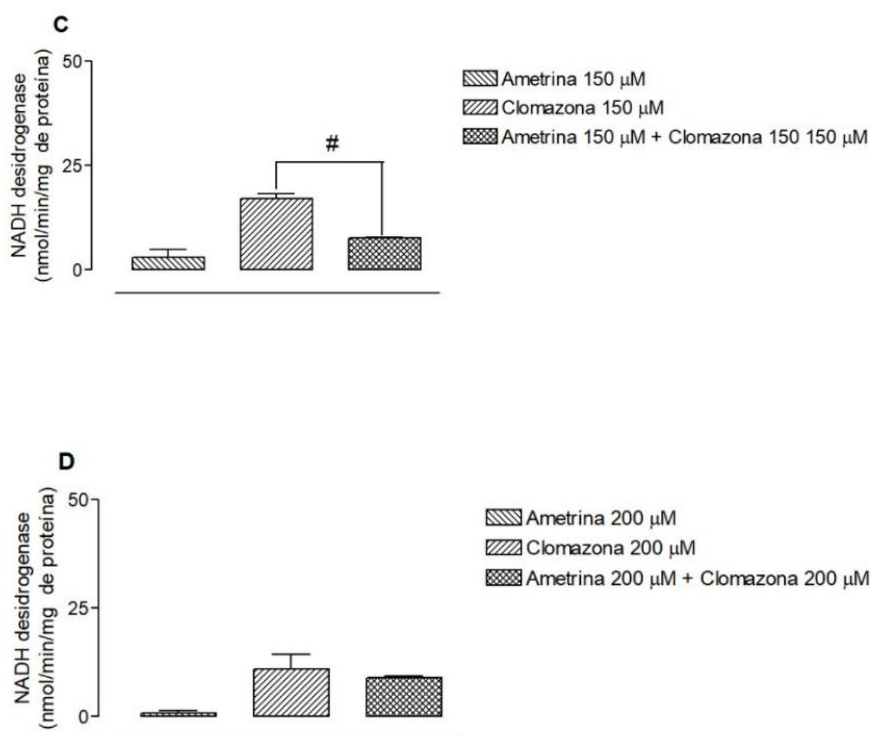
Fonte: elaborado pelo autor.

Na análise comparativa dos efeitos dos herbicidas isolados e a sua combinação, observou-se diferença significativa na atividade da enzima NADH desidrogenase na concentração de 150 µM da mistura em relação à clomazona isolada, indicando efeito sinérgico da mistura (Figura 12). Em relação à atividade da Succinato desidrogenase, foi observada diferença significativa nas concentrações de 150 e 200 µM da ametrina em relação à mistura, e nas concentrações de 100, 150 e 200 µM da clomazona em relação à mistura, ambos indicando efeito antagônico da mistura (Figura 13).

Figura 12 - Análise comparativa dos efeitos da ametrina e clomazona isolados em relação à combinação ametrina + clomazona (A = 50 μ M, B = 100 μ M, C = 150 μ M e D = 200 μ M), na atividade da enzima NADH desidrogenase. Os valores representam a média $\pm$ EPM de quatro experimentos com diferentes preparações mitocondriais.

#Significativamente diferente em relação às substâncias isoladas ($P < 0,05$).

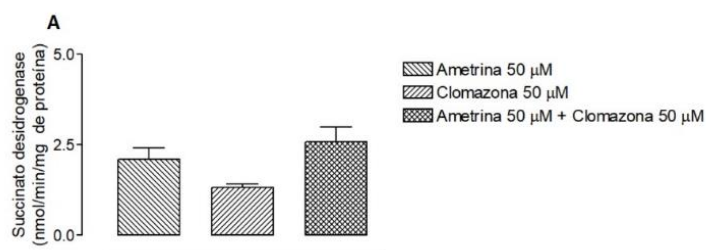


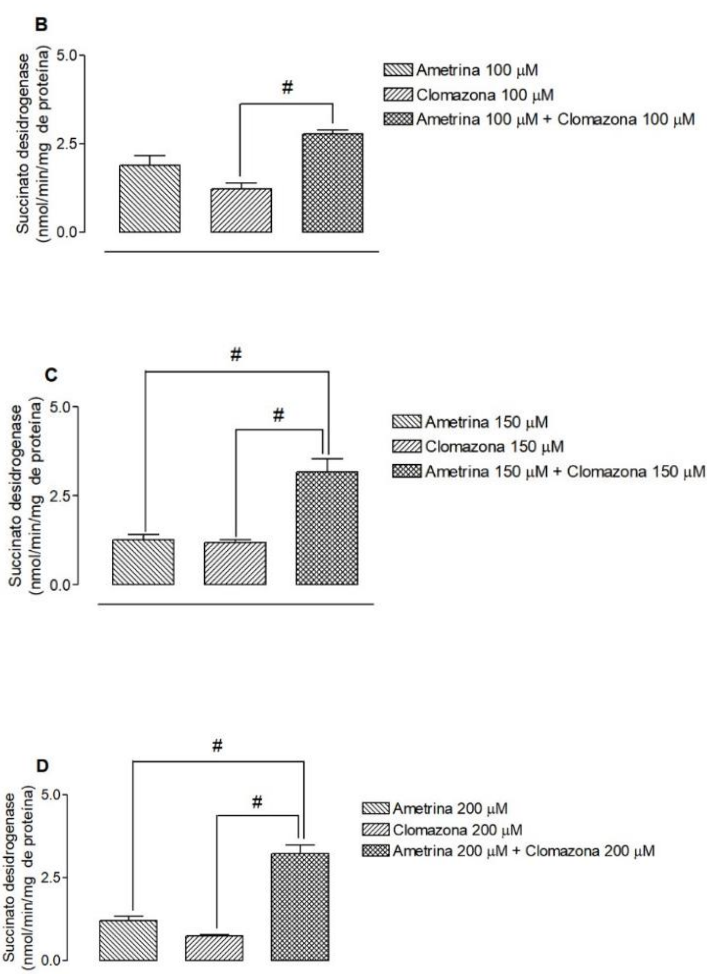


Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 13 - Análise comparativa dos efeitos da ametrina e clomazona isolados em relação à mistura ametrina + clomazona (A = 50 μ M, B = 100 μ M, C = 150 μ M e D = 200 μ M), na atividade da enzima Succinato desidrogenase. Os valores representam a média $\pm$ EPM de quatro experimentos com diferentes preparações mitocondriais.

#Significantemente diferente em relação às substâncias isoladas ($P < 0,05$).



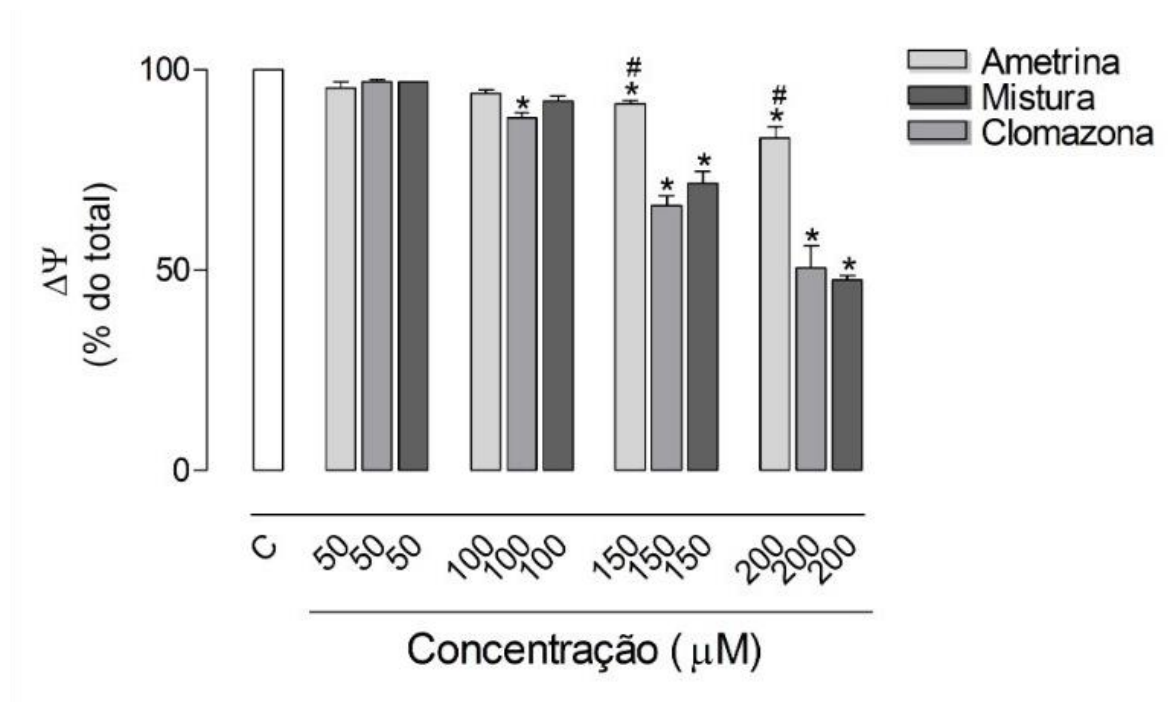


Fonte: elaborado pelo autor.

5.3 Efeitos de ametrina e clomazona sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$)

A Figura 14 mostra os efeitos dos herbicidas sobre o potencial de membrana das mitocôndrias energizadas com glutamato 5 mM + malato 5 mM (doadores de elétrons do complexo I). A ametrina reduziu significativamente o potencial de membrana mitocondrial nas concentrações de 150 e 200 μ M, enquanto a clomazona apresentou efeito inibidor nas concentrações de 100, 150 e 200 μ M. A mistura dos herbicidas apresentou efeito inibidor nas concentrações de 100, 150 e 200 μ M. Na análise comparativa dos efeitos dos herbicidas isolados ou combinados, observou-se menor efeito inibidor da ametrina sobre o potencial de membrana em relação à mistura nas concentrações de 150 e 200 μ M, indicando efeito sinérgico da mistura.

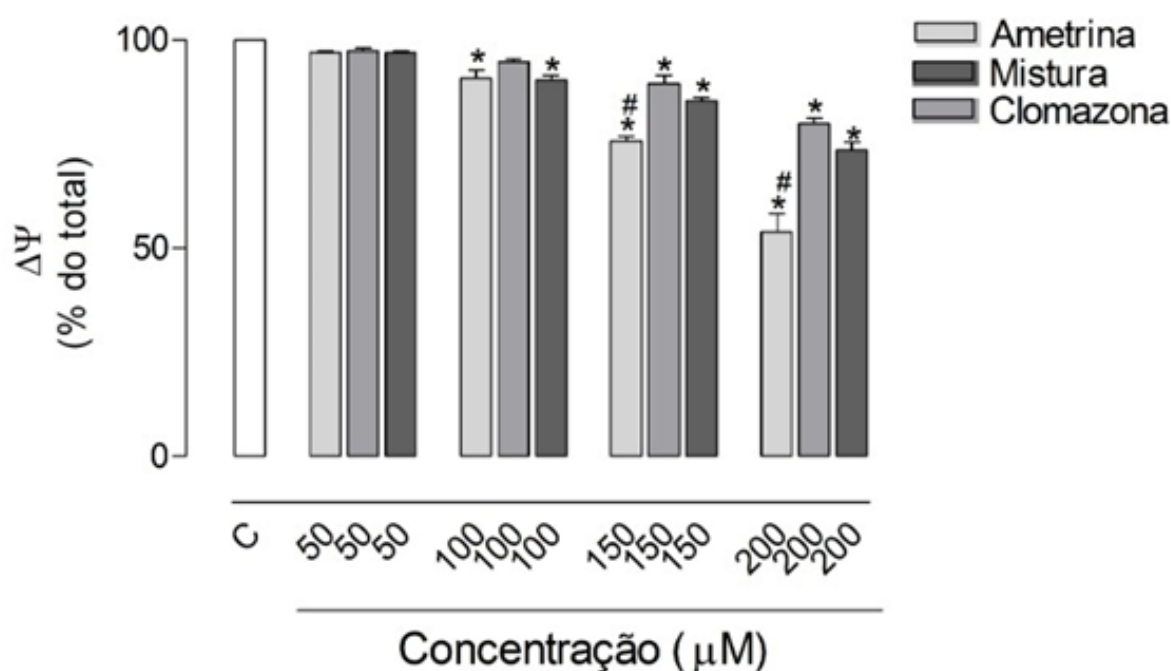
Figura 14 - Efeitos da ametrina e clomazona, isolados ou combinados, no potencial de membrana em mitocôndrias isoladas de fígado de rato energizadas com glutamato 5 mM + malato 5 mM. Os valores representam a média $\pm$ EPM de quatro experimentos com diferentes preparações mitocondriais. *Significantemente diferente do controle ($P < 0,05$). #Significantemente diferente em relação à mistura ($P < 0,05$). C = controle, sem adição dos herbicidas.



Fonte: elaborado pelo autor.

Nas mitocôndrias energizadas com succinato 5 mM (doador de elétrons do complexo II) a ametrina reduziu significativamente o potencial de membrana mitocondrial nas concentrações de 100, 150 e 200 μM, enquanto a clomazona apresentou efeito inibidor nas concentrações de 150 e 200 μM. A mistura dos herbicidas apresentou efeito inibidor nas concentrações de 100, 150 e 200 μM. Na análise comparativa dos efeitos dos herbicidas isolados ou combinados, observou-se maior efeito inibidor da ametrina sobre o potencial de membrana em relação à mistura nas concentrações de 150 e 200 μM, indicando efeito antagônico da mistura (Figura 15).

Figura 15 - Efeitos da ametrina e clomazona, isolados ou combinados, no potencial de membrana em mitocôndrias isoladas de fígado de rato energizadas com succinato 5 mM (+ rotenona 2,5 μ M). Os valores representam a média $\pm$ EPM de quatro experimentos com diferentes preparações mitocondriais. *Significativamente diferente do controle ($P < 0,05$). #Significativamente diferente em relação à mistura ($P < 0,05$). C = controle, sem adição dos herbicidas.



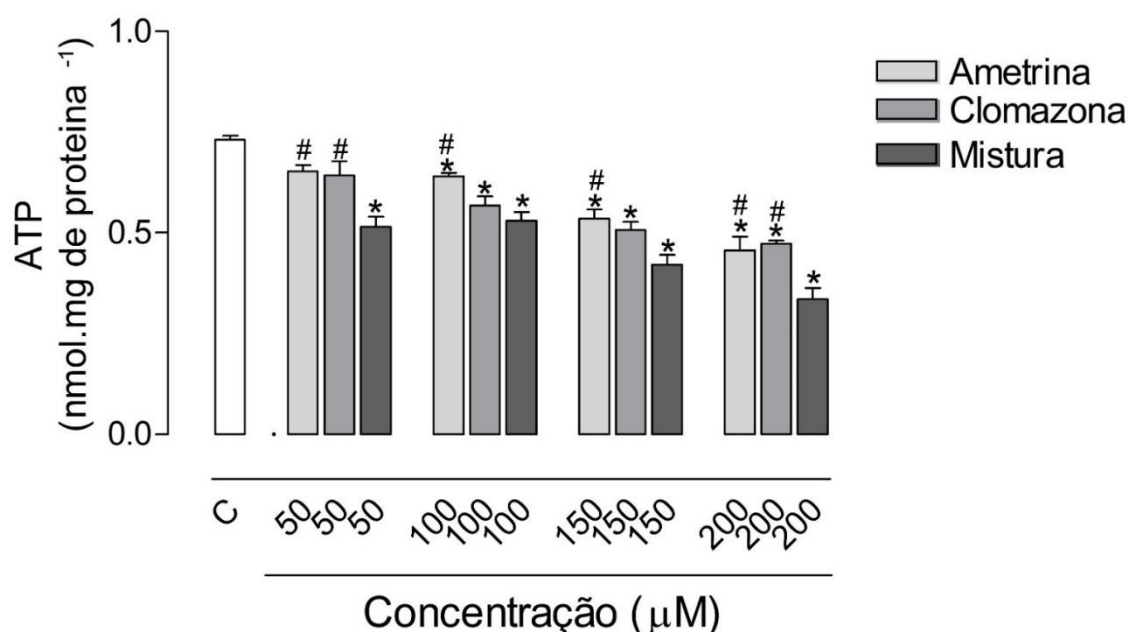
Fonte: elaborado pelo autor.

5.4 Efeitos da ametrina e clomazona sobre a concentração de ATP mitocondrial

Os efeitos dos herbicidas sobre concentração de ATP nas mitocôndrias energizadas com glutamato 5 mM + malato 5 mM (doadores de elétrons do complexo I) estão mostrados na Figura 16. A ametrina e a clomazona isoladas reduziram significativamente a concentração mitocondrial de ATP nas concentrações de 100, 150 e 200 μ M. A mistura dos herbicidas reduziu significativamente os níveis de ATP em todas as concentrações testadas. Na análise comparativa dos efeitos dos herbicidas isolados ou combinados, observou-se menor efeito da ametrina sobre a concentração de ATP em relação à mistura nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 μ M e menor

efeito da clomazona em relação à mistura nas concentrações de 50 e 200 μM , indicando efeito sinérgico da mistura (Figura 16).

Figura 16 - Efeitos da ametrina e clomazona, isolados ou combinados, na concentração de ATP em mitocôndrias isoladas de fígado de rato energizadas com glutamato 5 mM + malato 5 mM. Os valores representam a média $\pm$ EPM de quatro experimentos com diferentes preparações mitocondriais. *Significativamente diferente do controle ($P < 0,05$). #Significativamente diferente em relação à mistura ($P < 0,05$). C = controle, sem adição dos herbicidas.



Fonte: elaborado pelo autor.

O uso indiscriminado de praguicidas pode causar contaminação ambiental no solo, ar, água, plantas e animais com níveis de problemas e perdas ainda não descritos na literatura (Panis *et al.*, 2022). Apesar de passar por uma avaliação antes da comercialização, tem sido cada vez mais frequente a detecção de resíduos de praguicidas no meio ambiente, principalmente pela dificuldade de degradação das substâncias e alta solubilidade em água. As condições climáticas facilitam que os herbicidas aplicados nas culturas para controle de plantas daninhas sejam espalhados para outros ambientes por meio da lixiviação causada após irrigação ou chuva (Li *et al.*, 2022). Os resíduos podem se acumular através das cadeias biológicas e afetar negativamente organismos não alvos, como animais e humanos.

Diariamente, todos os organismos vivos são expostos a diferentes concentrações de produtos químicos por meio de alimentos, ar e água tornando cada vez mais preocupante os efeitos dessas combinações. Apesar dos avanços em relação a essa temática, ainda existe uma quantidade limitada de informações devido à possibilidade de um número quase infinito de combinações, tornando um desafio entender como elas interagem e quais consequências essas associações geram (Bopp *et al.*, 2019). As interações entre compostos acontecem de maneira intencional ou acidental, por isso essa área de estudo representa importância pública para entendimento e busca por ações alternativas para redução dos danos e interrupção dos efeitos toxicológicos. A sinergia é sinônimo de potencialização relacionando-se ao aumento do efeito dos compostos químicos e o antagonismo refere-se à redução dos efeitos tóxicos após interação das substâncias (Martin *et al.*, 2021). Nesse sentido, no presente estudo, avaliamos o possível efeito sinérgico da mistura entre a ametrina e a clomazona.

Relatos da literatura relacionaram os herbicidas ametrina e clomazona a efeitos tóxicos observados no fígado de animais. Portanto, para avaliar o envolvimento mitocondrial na hepatotoxicidade relacionada aos herbicidas ametrina e clomazona, o presente estudo avaliou seus efeitos na bioenergética de mitocôndrias isoladas de fígado de ratos. Os efeitos dos herbicidas ametrina e clomazona sobre a respiração mitocondrial foram monitorados pelo consumo de oxigênio. Os resultados observados na respiração mitocondrial de estado 3, demonstraram que, nas concentrações testadas, os herbicidas interferem no transporte de elétrons do complexo I e do complexo II, o que resulta na diminuição do consumo de oxigênio (Kalbacova *et al.*, 2003).

A interferência dos herbicidas ametrina e clomazona no funcionamento da cadeia de transporte de elétrons, podendo chegar à inibição do transporte de elétrons, resulta na diminuição do potencial de membrana mitocondrial (Kalbacova *et al.*, 2003). Os resultados para potencial de membrana demonstraram esse efeito em mitocôndrias energizadas com os substratos do complexo I e II a partir de 100 μM para ambos os herbicidas e a mistura.

Com a inibição da cadeia de transporte de elétrons e efeitos no potencial de membrana, a redução do ATP mitocondrial era esperada, o que ocorreu em todas as concentrações testando a mistura dos herbicidas, e a partir de 100 μM com ametrina e clomazona isolados. A toxicidade aguda ou crônica expressa por muitos

xenobióticos é relacionado ao mecanismo de redução do ATP mitocondrial (Meyer; Kulkarni, 2001); a interferência no ATP diminui a eficiência dos processos dependentes de energia e transdução de sinais celulares (Eguchi *et al.*, 1997; Skulachev, 2006).

Foram realizados experimentos para medir a atividade das enzimas NADH desidrogenase, localizada no complexo I, e Succinato desidrogenase, localizada no complexo II, para avaliar os possíveis efeitos nos herbicidas sobre as enzimas da cadeia de transporte de elétrons. Os herbicidas inibiram a atividade da enzima NADH desidrogenase em todas as concentrações testadas para ametrina e combinação ametrina + clomazona, além das concentrações 100, 150 e 200 μM para clomazona isolada; na atividade da enzima Succinato desidrogenase, inibição em todas as concentrações testadas com clomazona, apenas nas concentrações 150 e 200 μM para ametrina, porém sem efeitos significativos para a combinação dos herbicidas.

Ortiz (2021) demonstrou que a ametrina foi capaz de afetar a bioenergética de mitocôndrias isoladas de fígado de rato. Lin *et al.* (2018) investigaram os efeitos tóxicos em embriões de zebrafish com o objetivo de entender os mecanismos que originam a toxicidade. Os embriões foram expostos as concentrações de 0, 10 ou 20 $\mu\text{g/mL}$ de ametrina e depois de 24 e 48 horas pós-fecundação foram realizadas as análises proteômicas. Os resultados demonstraram que a exposição à ametrina altera o perfil proteico dos embriões de zebrafish. Essas proteínas estão envolvidas na resposta de espécies reativas de oxigênio, formação de ATP e contração muscular. Os autores concluíram que a ametrina induz à malformação embrionária, resultante da alteração no metabolismo energético e do estresse oxidativo.

Dados na literatura mostram que o herbicida clomazona é capaz de causar danos a mitocôndrias de células animais, em especial a cadeia de transporte de elétrons (Fagundes *et al.*, 2015). Estudo realizado por Fidelis (2022) utilizando mitocôndrias isoladas do tórax de abelhas melíferas demonstrou que a clomazona afetou a bioenergética mitocondrial com a consequente redução na produção de ATP.

Portanto, os resultados do presente estudo corroboram relatos anteriores presentes na literatura e indicam que as alterações na bioenergética mitocondrial podem estar relacionadas à hepatotoxicidade da ametrina e clomazona, com efeitos observados no consumo de oxigênio, no potencial de membrana mitocondrial e ação direta na cadeia de transporte de elétrons, indicando toxicidade mais efetiva no complexo I, mas com resultados importantes também no complexo II. Além disso, este

é o primeiro trabalho a avaliar os efeitos da mistura dos dois herbicidas sobre a bioenergética mitocondrial.

6 CONCLUSÃO

Os herbicidas ametrina e clomazona causam efeitos inibitórios na bioenergética de mitocôndrias isoladas de fígado de rato, alterando a funcionalidade da cadeia respiratória, potencial de membrana e redução dos níveis de ATP. Como a manutenção celular é prejudicada pela inibição do metabolismo energético, é provável que as alterações na produção de energia mitocondrial do fígado descrita neste estudo contribuam para a hepatotoxicidade apresentada pelos herbicidas. E ainda, concluímos que a mistura entre os dois herbicidas apresentou efeito sinérgico, potencializando o efeito tóxico de ambos.

7 REFERÊNCIAS

- ABRAMOVIC, B. F.; DESPOTOVIC, V. N.; SOJIC, D. V.; ORCIC, D. Z.; CSANÁDI, J. J.; CETOJEVIC-SIMIN, D. D. Photocatalytic degradation of the herbicide clomazone in natural water using TiO₂: Kinetics, mechanism, and toxicity of degradation products. **Chemosphere**, v. 93, p.166-171, 2013.
- ANDRES, A.; MACHADO, S. L. O. **Arroz irrigado no Sul do Brasil**. Brasília: Embrapa, 2004.
- ANVISA. **Relatório de Atividades da Gerência Geral de Toxicologia**. 2017. Disponível em <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/agrotoxicos/relatorio-de-atividades-da-gerencia-geral-de-toxicologia-2017.pdf> Acesso em: 06 fev. 2022.
- ARMAS, E. D.; MONTEIRO, R. T. R.; ANTUNES, P. M.; SANTOS, M. A. P. F.; CAMARGO, P. B.; ABAKERLI, R. B. Diagnóstico espaço-temporal da ocorrência de herbicidas nas águas superficiais e sedimentos do Rio Corumbataí e principais afluentes. **Química Nova**, [S.l.], v. 30, n. 5, p. 1119-1127, 2007.
- ASONGALEM, E.A.; AKINTONWA, A. Embryotoxic effects of oral ametryn exposure in pregnant rats. **Environ. Contam. Toxicol.**, v. 58, p. 184-189, 1997.
- BIZERRA, P. F. V.; GUIMARÃES, A. R. J. S.; MAIOLI, M. A.; MINGATTO, F. E. Imidacloprid affects rat liver mitochondrial bioenergetics by inhibiting FoF1-ATP synthase activity. **J. Toxicol. Environ. Health, Part A**, v.81, p.229-239, 2018.
- BLANCO, F.M.G.; VELINI, E.D.; BATISTA-FILHO, A. Persistência do herbicida sulfentrazone em solo cultivado com cana-de-açúcar. **Bragantia**, v. 69, n. 1, p. 71-75, 2010.
- BOYER, P. D.; CROSS, R. L.; MOMSEN, W. A new concept for energy coupling in oxidative phosphorylation based on a molecular explanation of the oxygen exchange reactions. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.70, p.2837-2839, 1973.
- BOPP, S. K.; KIENZLER, A.; RICHARZ, A.-N.; LINDEN, S. C. D; PAINI, A.; PARISSIS, N.; WORTH, A. P. Regulatory assessment and risk management of chemical mixtures: challenges and ways forward. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 49, n. 2, p. 174-189, 2019.
- BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E.L.; SALGUEIRO-PAGADIGORRIA, C.L. Estudo do metabolismo energético em mitocôndrias isoladas de tecido animal. *In*: BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E.L. (ed.). **Métodos de laboratório em bioquímica**. Barueri: Manole, 2003. Cap. 9. p. 227-247.
- CABRAL, M. F.; SOUZA, D.; ALVES, C. R.; MACHADO, S. A. S. Square wave voltammetric study of the electrochemical behavior of the herbicide ametryne. **Eclet. Quím.**, v. 28, n. 2, p. 41-47, 2003.

CAIN, K.; SKILLETER, D.N. Preparation and use of mitochondria in toxicological research. *In*: SNELL, K.; MULLOCK, B. (ed.). **Biochemical toxicology**. Oxford: IRL Press, 1987. p. 217-254.

CALDAS, E. D.; SOUZA, L. C. K. Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, n. 5, p. 529-537, 2000.

CATTANEO, R.; MORAES, B. S.; LORO, V.L.; PRETTO, A.; MENEZES, C.; SARTORI, G. M. S.; CLASEN, B.; AVILA, L. A.; MARCHESAN, E.; ZANELLA, R. Tissue biochemical alterations of *Cyprinus carpio* exposed to commercial herbicide containing clomazone under rice-field conditions. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 62, p. 97-106, 2012.

CERDEIRA, A. L.; SANTOS, N. A. G.; PESSOA, M. C. P. Y.; GOMES, M. A. F.; LANCHOTE, V.L. Herbicide leaching on a recharge area of the Guarany Aquifer in Brazil. **J. Environ. Sci. Health**, Part B, v. 40, n. 1, p. 159-165, 2005.

CHANCE, B.; WILLIAMS, G. R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. **Advances in Enzymology**, v. 17, p. 65-134, 1955.

COLBY, S. R.; LYM, R. G.; HILL, E. R.; MC AVOY, W. J.; KITCHEN, L. M.; PRASAD, R. **Herbicide: handbook of the Weed Science Society of America**. 6. ed. Illinois: [s.n.], 1989.

CRESTANI, M.; MENEZES, C.; GLUSCZAK, L.; MIRON, D. S.; SPANEVELL, R.; SILVEIRA, A.; GONÇALVES, F. F.; ZANELLA, R.; LORO, V. L. Effect of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver catfish (*Rhamdia quelen*) and recovery pattern. **Chemosphere**, v. 67, p. 2305-2311, 2007.

CROMPTON, M.; VIRJI, S.; DOYLE, V.; JOHNSON, N.; WARD, J.M. The mitochondrial permeability transition pore. **Biochem. Soc. Symp.**, v. 66, p. 167-79, 1999.

DAMALAS, C. A.; ELEFTHEROHORINOS, I. G. Dicamba and atrazine antagonism on sulfonylurea herbicides used for Johnsongrass (*Sorghum halepense*) control in corn (*Zea mays*). **Weed Technology**, v. 15, n. 1, p. 62-67, 2001.

DEKKER, J. Development of resistance to modern fungicides and strategies for its avoidance. *In*: LYR., H. (ed.). **Modern selective fungicides: properties, applications, mechanisms of action**. 2. ed. New York: Gustav Fisher, 1995. p. 23-38.

DYKENS, J. A.; JAMIESON, J. D.; MARROQUIN, L. D.; NADANACIVA, S.; XU, J. J.; DUNN, M. C.; SMITH, A. R.; WILL, Y. *In vitro* assessment of mitochondrial dysfunction and cytotoxicity of nefazodone, trazodone and buspirone. **Toxicol. Sci.**, v. 103, p. 335-345, 2008.

EFSA - EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Conclusion on the peer review of clomazone. **EFSA Scientific Report**, v. 109, p. 1-73, 2007.

EGUCHI, Y.; SHIMIZU, S.; TSUJIMOTO, Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. **Cancer Research**, v. 57, p. 1835-1840, 1997.

FAGUNDES, M. Z.; GONÇALVES, M.A.; SOARES, M. P.; MARTINS, M. L.; ZANELLA, R.; RIET-CORREA, F.; ANJOS, B. L. Clinicopathological and toxicological aspects of poisoning by the clomazone herbicide in sheep. **Small Ruminant Research**, v. 124, p. 120-126, 2015.

FERHATOGLU, Y.; BARRET, M. Studies of clomazone mode of action. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 85, n. 1, p. 7-14, 2006.

FERRACINI, V. L.; QUEIROZ, S. C. N.; GOMES, M. A. F.; SANTOS, G. L. Método para a determinação de hexazinona e tebutiuron em água. **Química Nova**, v. 28, p. 380-382, 2005.

FIDELIS, J. P. S. **Alterações na bioenergética de mitocôndrias isoladas do tórax de abelhas melíferas (*Apis mellifera* L.) expostas ao clomazona**. 2022. 50 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Animal) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Dracena, 2022. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/items/2baaaf70-d75b-4ac1-abb7-88f473cab92c>. Acesso em 10 fev. 2023.

GRESSEL, J. Synergizing herbicides. **Reviews of Weed Science**, v. 5, p. 49-82, 1990.

GUILLOUZO, A. Liver cell models in *in vitro* toxicology. **Environm. Health Perspect.**, v. 106, suppl. 2, p. 511-532, 1998.

GUNASEKARA, A. S.; DELA CRUZ, I. D.; CURTIS, M. J.; CLAASSEN, V. P. T.; JEERDEMA, R. S. The behavior of clomazone in the soil environment. **Pest. Manag. Sci.**, v. 65, n. 6, p. 711-716, 2009.

HERTWIG, K. V.; FORSTER, R.; RIBEIRO, L. V.; ARANHA, C.; BARSCH, E.; SANTOS, J. M. F. dos; NOGUEIRA, C.; SUGISAKI, A. **Manual de herbicidas desfolhantes, dessecantes, fitorreguladores e bio-estimulantes**. 2. ed. São Paulo: Agronômica, 1983. p. 28-30.

HISSIN, P.J.; HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Anal. Biochem.**, v. 74, p. 214-226, 1976.

IGNJATOVIC, L. M.; VESELINOVIC, D.; MAARKOVIC, D.; VUKELIC, N. Adsorptive stripping voltammetric determination of the herbicides atrazine and ametryne. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 63, n. 01, p. 75-84, 1998.

INOUE, M. H.; OLIVEIRA JR., R.S.; REGITANO, J.B.; TORMENA, C.A.; TORNISIELO, V.L.; CONSTANTIN, J. Critérios para avaliação do potencial de lixiviação dos herbicidas comercializados no estado do Paraná. **Planta Daninha**, v. 21, p. 313-323, 2003.

JACOMINI, A.E.; CAMARGO, P.B.; AVELAR, W.E.P.; BONATO, P.S. Determination of ametryn in river water, river sediment and bivalve mussels by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 107-116, 2009.

KALBÁČOVÁ, M.; VRBACKÝ, M.; DRAHOTA, Z.; M.; LKOVÁ, Z. Comparison of the effect of mitochondrial inhibitors on mitochondrial membrane potential in two different cell lines using flow cytometry and spectrofluorometry. **Cytometry Part A**, [S.l.], v. 52, n. 2, p. 110-116, 19 mar. 2003.

KHOURI, A. G. **Análise de resíduos de atrazina e simazina em abacaxi no Estado de Goiás**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Produção Sustentável) - Universidade Católica de Goiás, Goiás – GO, 2007.

KIM, J. S.; HE, L.; LEMASTERS, J. J. Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 304, n. 3, p.463-470, 2003.

KOWALTOWSKI, A. J.; CASTILHO, F. R.; VERCESI, A. E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS Lett.**, v. 495, p. 12-15, 2001.

KOWALTOWSKI, A. J.; SOUZA-PINTO, N. C.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 47, p. 333-343, 2009.

KOWALTOWSKI, A. J.; VERCESI, A. E.; CASTILHO, R. F. Mitochondrial membrane protein thiol reactivity with N-ethylmaleimide or mersalyl is modified by Ca^{2+} : correlation with mitochondrial permeability transition. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1318, n. 3, p. 395-402, 1997.

LEE, J.; YU, B.P.; HERLIHY, J.T. Modulation of cardiac mitochondrial membrane fluidity by age and calorie intake. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 26, p. 260-265, 1999.

LI, A.; WANG, M.; KROEZE, C.; MA, L.; STROKAL, M. Past and future pesticide losses to Chinese waters under socioeconomic development and climate change. **Journal of Environmental Management**, v. 317, p. 115361, 2022.

LI, Y.; COUCH, L.; HIGUCHI, M.; FANG, J. L.; GUO, L. Mitochondrial dysfunction induced by sertraline, an antidepressant agent. **Toxicol. Sci.**, v. 127, p. 582-591, 2012.

LIN, H.-D.; HSU, L.-S.; CHIEN, C.-C.; CHEN, S.-C. Proteomic analysis of ametryn toxicity in zebrafish embryos. **Environmental Toxicology**, v. 33, n. 5, p. 579-586, 2018.

MACHADO, C.S. FREGONESI, B. M.; ALVES, R. I. S.; TONANI, K. A. A.; SIERRA, J.; MARTINIS, B. S.; CELERE, B. S.; MARI, M.; SCHUHMACHER, M.; NADAL, M.; DOMINGO, J. L.; SEGURA-MUÑOZ, S. Health risks of environmental exposure to metals and herbicides in the Pardo River, Brazil. **Environ. Sci. Pollut. Res. Int.**, v. 24, p. 20160-20172, 2017.

MACLENNAN, P. A.; DELZELL, E.; SATHIAKUMAR, N.; MYERS, S. L.; CHENG, H.; GRIZZLE, W.; CHEN, V. W.; WU, X. C. Cancer Incidence Among Triazine Herbicide Manufacturing Workers. **Journal Of Occupational And Environmental Medicine**, [S.l.], v. 44, n. 11, p. 1048-1058, nov. 2002.

MAIOLI, M. A. Papel da mitocôndria na citotoxicidade induzida pela abamectina em hepatócitos isolados de rato. 2012. 80 f. (Mestrado) - Unesp – Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba, 2012.

MARTIN, O.; SCHOLZE, M.; ERMLER, S.; MCPHIE, J.; BOPP, S. K.; KIENZLER, A.; PARISSIS, N.; KORTENKAMP, A. Ten years of research on synergisms and antagonisms in chemical mixtures: a systematic review and quantitative reappraisal of mixture studies. **Environment International**, v. 146, p. 106206, 2021.

MARTINS, D.I. **Destilação a vapor e cromatografia em fase gasosa na determinação de resíduos de herbicidas em alimentos**. 1995. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 1995.

MEYER, S. A; KULKARNI, A. P. Hepatotoxicity. *In*: HODGSON, E.; SMART, R.C. (ed.). **Introduction to biochemical toxicology**. 3. ed. New York: John Wiley & Sons, 2001. p.487-507.

MINGATTO, F. E.; DORTA, D. J.; SANTOS, A. B.; CARVALHO, I.; SILVA, C. H. T. P.; SILVA, V. B.; UYEMURA, S. A.; SANTOS, A. C.; CURTI, C. Dehydromonocrotaline inhibits mitochondrial complex I. A potential mechanism accounting for hepatotoxicity of monocrotaline. **Toxicon**., v. 50, p. 724-730, 2007.

MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. **Nature**, v.191, p.144-148, 1961.

MORAGAS, W. M, SCHNEIDER, M. O. Biocidas suas propriedades e seu histórico no Brasil. **Caminhos de Geografia**, v. 3, n. 10, p. 26-40, 2003.

MOURA, A. O. **Síntese e aplicação de magadiíta na liberação controlada de herbicidas**. 2008. Dissertação de mestrado Universidade de Brasília - Instituto de Química, Brasília, DF, 2008.

NADANACIVA, S.; DYKENS, J. A.; BERNAL, A.; CAPALDI, R.A.; WILL, Y. Mitochondrial impairment by PPAR agonists and statins identified via immunocaptured OXPHOS complex activities and respiration. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 223, p. 277-287, 2007.

NICHOLLS, D.G. **In bioenergetics**: an introduction to the chemiosmotic theory. London: Academic Press, 1982. p. 25-96.

OLIVEIRA, C. R.; FRACETO, L. F.; RIZZI, G. M.; SALLA, R. F.; ABDALLA, F.C.; COSTA, M. J.; SILVA-ZACARIN, E. C. Hepatic effects of the clomazone herbicide in both its free form and associated with chitosan-alginate nanoparticles in bullfrog tadpoles. **Chemosphere**, v. 149, p. 304-313, 2016.

ORTIZ, C. **Efeitos da ametrina na bioenergética de mitocôndrias isoladas de fígado de rato**. 2021. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Animal) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Dracena, 2021. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/204571>. Acesso em: 10 fev. 2023.

PANIS, C.; CANDIOTTO, L. Z. P.; GABOARDI, S. C.; GURZENDA, S.; CRUZ, J.; CASTRO, M.; LEMOS, B. Widespread pesticide contamination of drinking water and impact on cancer risk in Brazil. **Environment International**, v. 165, p. 107321, 2022.

PEDERSEN, P. L.; GREENAWALT, J. W.; REYNAFARJE, B.; HULLIHEN, J.; DECKER, G. L.; SOPER, J. W.; BUSTAMENTE, E. Preparation and characterization of mitochondria and submitochondrial particles of rat liver and liver-derived tissues. **Methods in Cell Biology**, p. 411-481, 1978.

PONCE, H. A. G.; SÁNCHEZ, A. R. R.; JUÁREZ, F. J.; MOSHAGE, H. Natural dietary pigments: potential mediators against hepatic damage induced by over-the-counter non-steroidal anti-inflammatory and analgesic drugs. **Nutrients**, v. 10, p. 117, 2018.

QUEIROZ, M. E. C.; LANÇAS, F. M. Study of sorption and desorption of atrazine, ametryn and metolachlor on brazilian soils. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 8, n.1, p. 1-6, 1997.

CONCEA. **Resolução Normativa nº 37 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal**. 2018. Disponível em: https://www.in.gov.br/web/guest/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/4030569/do1-2018-02-22-resolucao-normativa-n-37-de-15-de-fevereiro-de-2018-4030565. Acesso em 15 mai. 2022.

RODRIGUES, B.N.; ALMEIDA, F.S. **Guia de herbicidas**. 5. ed. Londrina: IAPAR, 2005. p. 461-466.

ROUILLER, C. H. Experimental toxic injury of the liver. *In*: ROUILLER, C. H. (ed). **The liver**. v.2. New York: Academic Press, 1964. p. 335-476.

SANCHES, S. M.; SILVA, C. H. T. P.; CAMPOS, S. X.; VIEIRA, E. M. Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. **R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v. 13, p. 53-58, 2003.

SANTOS, T.; CANCIAN, G.; NEODINI, D. N.; MANO, D. R.; CAPUCHO, C.; PREDES, F. S.; BARBIERI, R.; OLIVEIRA, C. A.; PIGOSO, A. A.; DOLDER, H.; SEVERI-AGUIAR, G. D. Toxicological evaluation of ametryn effects in Wistar rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 67, p. 525-532, 2015.

SCHOENTAL, R. Liver disease and "natural" hepatotoxins. **Bull. World Health Organ.**, v. 29, p. 823-833, 1963.

SILVA, M. S.; COCENZA, D. S.; ROSA, A. H.; FRACETO, L. F. Efeito da associação do herbicida clomazone a nanoesferas de alginato/quitosana na sorção em solos. **Quim. Nova**, v. 35, n. 1, p. 102-107, 2012.

SKULACHEV, V. P. Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. **Apoptosis**, v. 11, p. 473-485, 2006.

TAVARES, M.A.; PALMA, I. D.; MEDEIROS, H. C.; GUELF, M.; SANTANA, A. T.; MINGATTO, F. E. Comparative effects of fipronil and its metabolites sulfone and

desulfinyl on the isolated rat liver mitochondria. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 40, p. 206-214, 2015.

TENBROOK, P. L.; TJEERDEMA, R. S. Biotransformation of clomazone in rice (*Oryza sativa*) and early watergrass (*Echinochloa oryzoides*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 85, n. 1, p. 38-45, 2006.

TOLMAN, K. G.; SIRRINE, R. W. Occupational hepatotoxicity. **Clin. Liver Dis.**, v. 2, p. 563, 1998.

TRENTACOSTE, S. V, Atrazine effects on testosterone levels and androgendependent reproductive organs in peripubertal male rats. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 1, p. 142-148, 2001.

VOTYAKOVA, T.V.; REYNOLDS, I. J. $\Delta\psi_m$ -Dependent and independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria. **J. Neurochem.**, v. 79, p. 266-277, 2001.

ZANELLA, R.; PRIMEL, E. G.; MACHADO, S. L. O.; GONÇALVES, F. F. Monitoring of the herbicide clomazone in environmental water samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Chromatographia**, v. 55, p. 573-577, 2002.

ZIMMERMAN, H.J. Drug-induced liver disease. **Clin. Liver Dis.**, v. 4, n. 1, p 73-96, 2000.