

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS
CÂMPUS DE DRACENA

Josiéli Magalhães Rigazo
Farmacêutica

INFLUÊNCIA DA BIOENERGÉTICA NA CITOTOXICIDADE
CAUSADA PELOS HERBICIDAS AMETRINA E
CLOMAZONA, ISOLADOS E ASSOCIADOS, EM CÉLULAS
HEPG2

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS
CÂMPUS DE DRACENA

Josiéli Magalhães Rigazo

Farmacêutica

INFLUÊNCIA DA BIOENERGÉTICA NA CITOTOXICIDADE
CAUSADA PELOS HERBICIDAS AMETRINA E
CLOMAZONA, ISOLADOS E ASSOCIADOS, EM CÉLULAS
HEPG2

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

2026

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

R566i

Rigazo, Josiélli Magalhães

Influência da bioenergética na citotoxicidade causada pelos herbicidas ametrina e clomazona, isolados e associados, em células HepG2 [recurso eletrônico] / Josiélli Magalhães Rigazo. -- Dracena: [s.n.], 2026.

109 f. ; PDF.

Recurso educacional derivado de dissertação em Ciência e Tecnologia Animal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, Dracena. Orientada por Fábio Erminio Mingatto. Área do conhecimento: Produção Animal, 2026.

1. Hepatotoxicologia. 2. Células Hepáticas. 3. Bioenergética. 4. Herbicidas. 5. Agricultura sustentável. I. Título.

Bibliotecário Fábio S. Rosas
CRB 8/6665

IMPACTO ESPERADO NA SOCIEDADE

A avaliação da ametrina e da clomazona, isoladas e em associação, mostra que interações entre herbicidas podem modificar a toxicidade, afetando a bioenergética mitocondrial e a viabilidade hepática. Esses achados reforçam a importância de considerar exposições combinadas na avaliação de risco à saúde e ao ambiente.

EXPECTED IMPACT ON SOCIETY

The evaluation of ametryn and clomazone, individually and in combination, shows that interactions between herbicides can modify toxicity, affecting mitochondrial bioenergetics and hepatic viability. These findings highlight the importance of considering combined exposures in health and environmental risk assessment.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Influência da bioenergética na citotoxicidade causada pelos herbicidas ametrina e clomazona, isolados e associados, em células HepG2

AUTORA: JOSIÉLLI MAGALHÃES RIGAZO

ORIENTADOR: FABIO ERMINIO MINGATTO

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

Documento assinado digitalmente
 **FABIO ERMINIO MINGATTO**
Data: 24/02/2026 16:59:02-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Titular FABIO ERMINIO MINGATTO (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / UNESP / Câmpus de Araraquara - IQAr

Documento assinado digitalmente
 **DANIEL JUNQUEIRA DORTA**
Data: 26/02/2026 15:00:52-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. DANIEL JUNQUEIRA DORTA (Participação Virtual)
Departamento de Química / Faculdade de Filosofia, Ciência e Letras de Ribeirão Preto - USP

Documento assinado digitalmente
 **PAULO FRANCISCO VEIGA BIZERRA**
Data: 03/03/2026 16:28:33-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Dr. PAULO FRANCISCO VEIGA BIZERRA (Participação Virtual)
VIB-UGent Center for Inflammation Research / Ghent University

Dracena, 23 de fevereiro de 2026.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Josiéli Magalhães Rigazo, nascida em 06 de agosto de 1987, na cidade de Tupi Paulista. Possui graduação em Farmácia pelas Faculdades Adamantinenses Integradas, de Adamantina, concluída em janeiro de 2010. Atua na área de farmácia magistral desde 2005, com experiência prática e técnica em laboratório de manipulação, função que exerce até o momento presente. Em agosto de 2023, iniciou sua atuação como professora no curso técnico em Farmácia, no Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza – ETEC Carmelina Barbosa, localizado no município de Dracena. Em janeiro de 2024, ingressou no Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Animal, em nível de mestrado, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Programa Interunidades dos Câmpus de Dracena e Ilha Solteira, desenvolvendo estudos na área de Bioquímica Metabólica e Toxicológica, sob orientação do Prof. Dr. Fábio Erminio Mingatto.

"Dedico esta dissertação a Deus, à minha família e a todos que acreditam que é possível construir um futuro com amor, fé e propósito, mesmo nos dias mais difíceis."

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, que sustenta cada passo meu, me fortalece nos dias difíceis e me inspira a seguir mesmo quando o caminho parece longo demais.

Aos meus filhos, que vocês cresçam sabendo que sua mãe nunca desistiu dos seus sonhos.

Ao meu marido, companheiro de vida, com quem aprendo diariamente os desafios e as belezas do amor.

À minha família, especialmente minha irmã e meus pais, por serem meu porto seguro, minha base firme e meu exemplo de coragem e fé.

À Camila, um verdadeiro anjo, e minha mentora no laboratório, que me guiou com paciência, dedicação e generosidade. Sem você, este trabalho não teria acontecido.

Ao Professor Fábio Mingatto, meu orientador, por acreditar em mim desde o início, me acompanhar com tanto cuidado e atenção em cada etapa deste mestrado, revisar com rigor e dedicação cada detalhe do meu trabalho, e por ser um exemplo de eficiência, disciplina e de alguém que nunca se acomoda, estando sempre em busca de crescimento e excelência.

Aos meus professores, que com seu conhecimento, inspiração e dedicação abriram caminhos e despertaram em mim a paixão pelo aprendizado e pela pesquisa.

Ao programa de pós-graduação, pelo suporte e estrutura oferecidos ao longo desta trajetória, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio institucional à pesquisa no Brasil.

A todos os meus alunos, por quem luto todos os dias para ser exemplo de que é possível estudar, trabalhar e ainda assim sonhar e tornar sonhos em realidade.

E a mim mesma, por não desistir, por levantar a cabeça quando tudo parecia demais, por ser forte e nunca perder a fé.

"Tudo posso naquele que me fortalece."

Filipenses 4:13

RESUMO

O uso intensivo de herbicidas na agricultura moderna, como a ametrina (AMT) e a clomazona (CLZ), tem despertado crescente preocupação quanto aos seus impactos ambientais e à saúde humana e animal. A exposição a esses compostos pode ocasionar efeitos tóxicos em diferentes órgãos e sistemas de organismos não-alvo. Após a ingestão ou contato de animais e seres humanos com herbicidas, essas substâncias podem ser absorvidas e distribuídas pela corrente sanguínea, atingindo diversos tecidos, com destaque para o fígado, principal órgão de metabolização de xenobióticos. Neste contexto, o presente estudo avaliou a hepatotoxicidade da AMT e da CLZ, isoladas e em associação, utilizando células HepG2 como modelo experimental *in vitro*. As células foram expostas às concentrações de 50, 100, 150 e 200 μM , e a citotoxicidade foi avaliada por meio de ensaios de proliferação celular, viabilidade metabólica, integridade de membrana e liberação de enzimas hepáticas (ALT, AST e ALP). Adicionalmente, foram conduzidas análises da bioenergética mitocondrial, incluindo a avaliação do potencial de membrana mitocondrial, massa mitocondrial, atividade mitocondrial e níveis intracelulares de ATP, com o objetivo de elucidar o envolvimento da mitocôndria na toxicidade celular. Os resultados demonstraram que a exposição isolada aos herbicidas promoveu redução significativa da viabilidade celular e comprometimento da função mitocondrial em células HepG2. A clomazona apresentou maior citotoxicidade, com redução significativa da proliferação celular e da atividade metabólica a partir de 100 μM após 24 h, intensificando-se nas concentrações de 150 e 200 μM após 48 h de exposição. A ametrina apresentou toxicidade intermediária, com diminuição significativa da viabilidade celular principalmente nas concentrações de 150 e 200 μM , sendo os efeitos mais evidentes após 48 h. Esses achados foram acompanhados por alterações na bioenergética mitocondrial, incluindo redução do potencial de membrana mitocondrial e diminuição dos níveis intracelulares de ATP, especialmente nas maiores concentrações testadas (150 e 200 μM). Observou-se ainda aumento significativo da liberação das enzimas hepáticas ALT, AST e ALP nas exposições isoladas à clomazona e à ametrina, particularmente nas concentrações de 150 e 200 μM após 48 h, indicando lesão celular e comprometimento da integridade hepatocelular. Em contraste, a exposição combinada à AMT e à CLZ resultou em efeitos citotóxicos e bioenergéticos menos intensos do que aqueles observados para cada composto isoladamente, caracterizando um efeito antagônico, especialmente nas concentrações de 150 e 200 μM e após 48 horas de exposição, com menor redução da viabilidade celular, menor comprometimento mitocondrial e menor liberação de enzimas hepáticas quando comparado aos tratamentos individuais. O estudo demonstrou que, embora a AMT e a CLZ apresentem potencial hepatotóxico quando aplicadas isoladamente, sua associação atenuou os efeitos citotóxicos e mitocondriais em células HepG2, possivelmente em decorrência de interações metabólicas que modulam a resposta celular. Esses achados contribuem para o entendimento da toxicidade da mistura desses herbicidas e reforçam a importância de abordagens experimentais que considerem exposições combinadas na avaliação de riscos ambientais e à saúde de animais e seres humanos.

Palavras-chave: Hepatotoxicologia. Células Hepáticas. Bioenergética. Herbicidas. Agricultura sustentável.

ABSTRACT

The intensive use of herbicides in modern agriculture, such as ametryn (AMT) and clomazone (CLZ), has raised increasing concern regarding their environmental impacts and risks to human and animal health. Exposure to these compounds may cause toxic effects in different organs and systems of non-target organisms. After ingestion or contact in animals and humans, these substances can be absorbed and distributed through the bloodstream, reaching various tissues, particularly the liver, the main organ responsible for xenobiotic metabolism. In this context, the present study evaluated the hepatotoxicity of AMT and CLZ, individually and in combination, using HepG2 cells as an *in vitro* experimental model. Cells were exposed to concentrations of 50, 100, 150, and 200 μM , and cytotoxicity was assessed through assays of cell proliferation, metabolic viability, membrane integrity, and the release of hepatic enzymes (ALT, AST, and ALP). Additionally, mitochondrial bioenergetic analyses were performed, including the assessment of mitochondrial membrane potential, mitochondrial mass, mitochondrial activity, and intracellular ATP levels, aiming to elucidate the involvement of mitochondria in cellular toxicity. The results demonstrated that isolated exposure to the herbicides promoted a significant reduction in cell viability and impairment of mitochondrial function in HepG2 cells. Clomazone showed greater cytotoxicity, with a significant decrease in cell proliferation and metabolic activity starting at 100 μM after 24 h, intensifying at 150 and 200 μM after 48 h of exposure. Ametryn exhibited intermediate toxicity, with a significant decrease in cell viability mainly at concentrations of 150 and 200 μM , with more pronounced effects after 48 h. These findings were accompanied by alterations in mitochondrial bioenergetics, including a reduction in mitochondrial membrane potential and decreased intracellular ATP levels, particularly at the highest concentrations tested (150 and 200 μM). A significant increase in the release of hepatic enzymes ALT, AST, and ALP was also observed following isolated exposure to clomazone and ametryn, particularly at 150 and 200 μM after 48 h, indicating cellular injury and impairment of hepatocellular integrity. In contrast, combined exposure to AMT and CLZ resulted in less intense cytotoxic and bioenergetic effects compared to those observed for each compound individually, characterizing an antagonistic effect, especially at concentrations of 150 and 200 μM and after 48 hours of exposure, with lower reduction in cell viability, reduced mitochondrial impairment, and decreased release of hepatic enzymes compared to individual treatments. The study demonstrated that although AMT and CLZ exhibit hepatotoxic potential when applied individually, their combination attenuated cytotoxic and mitochondrial effects in HepG2 cells, possibly due to metabolic interactions that modulate the cellular response. These findings contribute to the understanding of the toxicity of mixtures of these herbicides and reinforce the importance of experimental approaches that consider combined exposures in environmental and human and animal health risk assessment.

Keywords: Hepatotoxicology. Hepatic cells. Bioenergetics. Herbicides. Sustainable agriculture.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do herbicida ametrina	25
Figura 2 - Estrutura química do herbicida clomazona	26
Figura 3 - Representação da visão superior da câmara de Neubauer, da lamínula e da grade de contagem	38
Figura 4 - Visão microscópica das células HepG2	38
Figura 5 - Esquema representativo do cultivo celular	39
Figura 6 - Proliferação celular de células HepG2 após exposição à AMT, CLZ e associação (AMT + CLZ) após 24h e 48h.....	51
Figura 7 - Comparação entre os efeitos da ametrina, clomazona e a mistura dos dois herbicidas sobre a Proliferação celular nas células HepG2 expostas por 24 horas...	52
Figura 8 – Comparação entre os efeitos da ametrina, clomazona e a mistura dos dois herbicidas sobre a Proliferação celular nas células HepG2 expostas por 48 horas ...	53
Figura 9 – Atividade metabólica de células HepG2 após exposição à AMT, CLZ e associação (AMT + CLZ) após 24h e 48h.....	55
Figura 10 – Comparação entre os efeitos da ametrina, clomazona e a mistura dos dois herbicidas sobre a Atividade metabólica nas células HepG2 expostas por 24 horas.....	56
Figura 11 - Comparação entre os efeitos da ametrina, clomazona e a mistura dos dois herbicidas sobre a Atividade metabólica nas células HepG2 expostas por 48 horas...	57
Figura 12 – Atividade de LDH em HepG2 após exposição à AMT, CLZ e associação (AMT + CLZ) após 24h e 48h.....	59
Figura 13 – Comparação entre os efeitos da ametrina, clomazona e a mistura dos dois herbicidas sobre a Atividade de LDH extracelular nas células HepG2 expostas por 24 horas.....	60
Figura 14 - Comparação entre os efeitos da ametrina, clomazona e a mistura dos dois herbicidas sobre a Atividade de LDH extracelular nas células HepG2 expostas por 48h horas.....	61
Figura 15 - Células HepG2 viáveis após exposição à AMT, CLZ e à associação (AMT + CLZ) por 24 h e 48 h, avaliada pelo ensaio de exclusão do azul de tripan.....	63
Figura 16 - Comparação entre os efeitos da ametrina, clomazona e a mistura dos dois herbicidas sobre as Células HepG2 viáveis, avaliada por exclusão do azul de tripan, após exposição por 24 horas.....	64

Figura 17 - Comparação entre os efeitos da ametrina, clomazona e a mistura dos dois herbicidas sobre as Células HepG2 viáveis, avaliada por exclusão do azul de tripan, após exposição por 48 horas.....	65
Figura 18 - Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) das células HepG2 expostas à ametrina, clomazona ou à mistura dos dois herbicidas por 24 e 48 horas.....	67
Figura 19 - Comparação entre os efeitos da ametrina, clomazona e a mistura dos dois herbicidas sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) das células HepG2 expostas por 24 horas.....	68
Figura 20 - Comparação entre os efeitos da ametrina, clomazona e a mistura dos dois herbicidas sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) das células HepG2 expostas por 48 horas.....	69
Figura 21 – Microscopia de fluorescência do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em células HepG2 após 24 h de exposição.....	70
Figura 22 - Microscopia de fluorescência do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em células HepG2 após 48 h de exposição.....	71
Figura 23 - Massa mitocondrial nas células HepG2 expostas à ametrina, clomazona ou à mistura dos dois herbicidas por 24 e 48 horas.....	73
Figura 24 - Comparação entre os efeitos da ametrina, clomazona e a mistura dos dois herbicidas sobre a massa mitocondrial nas células HepG2 expostas por 24 horas.....	74
Figura 25 - Comparação entre os efeitos da ametrina, clomazona e a mistura dos dois herbicidas sobre a massa mitocondrial nas células HepG2 expostas por 48 horas.....	75
Figura 26 - Massa mitocondrial em células HepG2 avaliada por microscopia de fluorescência utilizando MitoTracker™ Green após 24 h de exposição.....	76
Figura 27 - Massa mitocondrial em células HepG2 avaliada por microscopia de fluorescência utilizando MitoTracker™ Green após 48 h de exposição.....	77
Figura 28 - Atividade mitocondrial nas células HepG2 expostas à ametrina, clomazona ou à mistura dos dois herbicidas por 24 e 48 horas.....	79
Figura 29 - Comparação entre os efeitos da ametrina, clomazona e a mistura dos dois herbicidas sobre a massa mitocondrial nas células HepG2 expostas por 24 horas.....	80
Figura 30 - Comparação entre os efeitos da ametrina, clomazona e a mistura dos dois herbicidas sobre a atividade mitocondrial nas células HepG2 expostas por 48 horas.....	81
Figura 31 - Atividade mitocondrial em células HepG2 avaliada por microscopia de fluorescência com MitoTracker™ Orange após 24 h de exposição.....	82

Figura 32 - Atividade mitocondrial em células HepG2 avaliada por microscopia de fluorescência com MitoTracker™ Orange após 48 h de exposição.....	83
Figura 33 - Níveis de ATP das células HepG2 expostas à ametrina, clomazona ou à mistura dos dois herbicidas por 24 e 48 horas.....	84
Figura 34 - Comparação entre os efeitos da ametrina, clomazona e a mistura dos dois herbicidas sobre os níveis de ATP das células HepG2 expostas por 24 horas.....	85
Figura 35 - Comparação entre os efeitos da ametrina, clomazona e a mistura dos dois herbicidas sobre os níveis de ATP das células HepG2 expostas por 48 horas.....	86
Figura 36 - Atividade das enzimas ALT em células HepG2 após exposição à AMT, CLZ e à associação (AMT + CLZ) por 24 h e 48 h.....	88
Figura 37 - Comparação entre os efeitos da AMT, CLZ e a mistura dos dois herbicidas sobre Atividade das enzimas ALT em células HepG2 após exposição por 24 h.....	89
Figura 38 - Comparação entre os efeitos da AMT, CLZ e a mistura dos dois herbicidas sobre Atividade das enzimas ALT em células HepG2 após exposição por 48 h.....	90
Figura 39 - Atividade das enzimas AST em células HepG2 após exposição à AMT, CLZ e à associação (AMT + CLZ) por 24 h e 48 h.....	91
Figura 40 - Comparação entre os efeitos da AMT, CLZ e a mistura dos dois herbicidas sobre Atividade das enzimas AST em células HepG2 após exposição por 24 h.....	92
Figura 41 - Comparação entre os efeitos da AMT, CLZ e a mistura dos dois herbicidas sobre Atividade das enzimas AST em células HepG2 após exposição por 48 h.....	93
Figura 42 - Atividade das enzimas ALP em células HepG2 após exposição à AMT, CLZ e à associação (AMT + CLZ) por 24 h e 48 h.....	94
Figura 43 - Comparação entre os efeitos da AMT, CLZ e a mistura dos dois herbicidas sobre Atividade das enzimas ALP em células HepG2 após exposição por 24 h.....	95
Figura 44 - Comparação entre os efeitos da AMT, CLZ e a mistura dos dois herbicidas sobre Atividade das enzimas ALP em células HepG2 após exposição por 48 h.....	96
Figura 45 - Sumarização dos efeitos da ametrina, clomazona e da mistura (AMT + CLZ) em células HepG2 após 24 e 48 h, em comparação ao controle.....	97
Figura 46 - Sumarização dos efeitos da ametrina e da clomazona em células HepG2 após 24 e 48 h, em comparação com a mistura dos herbicidas.....	98

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVO	21
2.1 Objetivo Geral	21
2.2 Objetivos Específicos	21
3 HIPÓTESE	22
4 REFERENCIAL TEÓRICO	23
4.1 Herbicidas	23
4.2 Ametrina	25
4.3 Clomazona	26
4.4 Mistura de Herbicidas	28
4.5 Toxicologia	29
4.6 Toxicidade em Organismos Não Alvos	30
4.7 O Fígado como Alvo Principal dos Xenobióticos	31
4.8 Células HepG2: Modelo de Estudo <i>In Vitro</i>	32
4.9 Bioenergética Mitocondrial	34
5 MATERIAL E MÉTODOS	37
5.1 Reagentes	37
5.2 Cultura das Células HepG2	37
5.3 Ensaio Citotoxicológicos	39
5.3.1 Ensaio de proliferação celular	39
5.3.2 Ensaio de viabilidade celular.....	39
5.3.2.1 MTT: Avaliação da atividade metabólica	40
5.3.2.2 LDH: Avaliação da integridade da membrana	41
5.3.2.3 Teste de exclusão do azul de tripan	42
5.3.3 Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)	43
5.3.4 Quantificação da massa mitocondrial (MTG)	44
5.3.5 Quantificação da atividade mitocondrial (MTO)	45
5.3.6 Determinação dos níveis intracelulares de ATP	46
5.3.7 Avaliação das alterações enzimáticas	47
6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
7 RESULTADOS	50

7.1 Ensaios de Citotoxicidade	50
7.2 Ensaios de Atividade Mitocondrial	66
7.2 Ensaios de Alterações Enzimáticas	87
8 SUMARIZAÇÃO DOS RESULTADOS	97
9 DISCUSSÃO	99
10 CONCLUSÃO	102
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103

1 INTRODUÇÃO

O uso indiscriminado de praguicidas na agricultura moderna tem causado preocupações crescentes quanto à contaminação ambiental e aos impactos sobre a saúde humana e ecossistêmica. Esses compostos, amplamente empregados no controle de organismos indesejáveis e na maximização da produtividade agrícola, podem ocasionar danos ao solo, ao ar, aos recursos hídricos, à flora e à fauna (Melo *et al.*, 2010). A aplicação frequente e concomitante de diferentes praguicidas favorece o acúmulo de resíduos no ambiente, sua mobilização em corpos d'água e a transferência ao longo das cadeias tróficas, potencializando efeitos tóxicos sobre organismos não alvo. Apesar da relevância do tema, a magnitude desses impactos e suas repercussões de longo prazo ainda não estão plenamente elucidadas, evidenciando a necessidade de investigações que subsidiem a avaliação de risco ambiental e o risco toxicológico de seres não-alvo. (Vieira *et al.*, 2017; Panico *et al.*, 2022).

A ametrina (AMT) integra a lista divulgada em 2018 pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) como um dos 20 praguicidas mais utilizados no Brasil entre 2012 e 2017 (IBAMA, 2018), sendo amplamente empregada no controle de plantas daninhas em diferentes culturas agrícolas. Em virtude de sua elevada persistência ambiental e potencial de bioacumulação, a ametrina pode desencadear efeitos crônicos em organismos expostos (Santos Júnior *et al.*, 2021). A clomazona (CLZ), por sua vez, é um herbicida destinado ao controle de gramíneas anuais e plantas daninhas de folhas largas, geralmente aplicado em pré-plantio e pré-emergência. A elevada solubilidade em água da CLZ está associada à sua alta mobilidade em matrizes ambientais e facilidade de absorção por organismos, enquanto sua meia-vida prolongada reflete resistência aos processos de degradação. Essas características, em conjunto, favorecem sua persistência ambiental e aumentam o risco de exposição crônica, podendo contribuir para processos de bioacumulação, especialmente sob condições de exposição contínua (Wang *et al.*, 2022).

Evidências experimentais indicam que a exposição a praguicidas pode comprometer processos metabólicos essenciais, destacando-se alterações na função mitocondrial, redução da produção de ATP, incremento da geração de espécies reativas de oxigênio e indução de citotoxicidade. A mitocôndria é reconhecida como

um dos principais alvos celulares de xenobióticos, exercendo papel central nos mecanismos de toxicidade hepática. Estudos demonstram que a CLZ é capaz de induzir disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e resposta inflamatória em modelos celulares, sugerindo que o comprometimento da bioenergética celular constitui um evento-chave na toxicidade desse composto (Tavares *et al.*, 2014).

De forma semelhante, evidências experimentais também demonstram que a ametrina interfere diretamente na bioenergética mitocondrial. Estudos conduzidos com mitocôndrias isoladas evidenciaram que a AMT promove alterações na respiração mitocondrial, com comprometimento da cadeia transportadora de elétrons e redução da eficiência da fosforilação oxidativa. Essas alterações foram acompanhadas por diminuição da produção de ATP e aumento da geração de espécies reativas de oxigênio, indicando que a mitocôndria constitui um importante alvo da toxicidade induzida por esse herbicida. Além disso, a ametrina foi capaz de promover alterações no potencial de membrana mitocondrial, sugerindo comprometimento da integridade funcional da organela e prejuízo na homeostase energética celular. Resultados recentes obtidos pelo grupo de pesquisa utilizando mitocôndrias isoladas reforçam esse mecanismo, demonstrando que a exposição à ametrina e à clomazona promove disfunção bioenergética mitocondrial, caracterizada por alterações na respiração mitocondrial, redução da produção de ATP e aumento do estresse oxidativo. O estudo também evidenciou que a associação entre os herbicidas pode modular esses efeitos, indicando a ocorrência de interações metabólicas complexas que influenciam a extensão do dano mitocondrial. Esses achados destacam a mitocôndria como alvo central na toxicidade induzida pela AMT e pela CLZ e reforçam a relevância da avaliação da bioenergética mitocondrial para a compreensão dos mecanismos de hepatotoxicidade associados à exposição isolada e combinada a esses herbicidas (Miranda *et al.*, 2025).

Adicionalmente, a avaliação de misturas de praguicidas tem evidenciado que interações químicas podem resultar em respostas celulares amplificadas ou inesperadas. Em modelo HepG2, Conte *et al.* (2022) demonstraram que a associação de fipronil, glifosato e imidacloprida promoveu efeitos citotóxicos de natureza sinérgica, com redução do potencial de membrana mitocondrial, aumento da produção de espécies reativas e elevação de enzimas hepáticas, ultrapassando as previsões dos modelos clássicos de aditividade. Esses resultados reforçam que a exposição

concomitante a xenobióticos pode intensificar o comprometimento da bioenergética celular e da homeostase hepática.

De forma complementar, estudos *in vivo* também apontam para efeitos relevantes da associação entre AMT e CLZ. Miranda *et al.* (2025) observaram, em zebrafish expostos a concentrações ambientalmente relevantes desses herbicidas, alterações significativas em biomarcadores de lesão hepática, bem como modulação das respostas biológicas quando a AMT e CLZ foram administrados em mistura, evidenciando a complexidade das interações toxicológicas.

A utilização de modelos *in vitro*, como as células HepG2, constitui ferramenta essencial para a investigação da toxicidade hepática e para a elucidação dos mecanismos celulares subjacentes aos efeitos de praguicidas. Essas células, derivadas de hepatocarcinoma humano, preservam diversas funções especializadas dos hepatócitos normais, incluindo a capacidade metabólica e de biotransformação de xenobióticos, sendo amplamente empregadas em estudos toxicológicos.

Apesar da ampla utilização agrícola da AMT e da CLZ, a literatura científica ainda apresenta lacunas no que se refere à avaliação integrada dos efeitos combinados desses compostos sobre a citotoxicidade e a bioenergética mitocondrial em modelos celulares hepáticos. Embora existam evidências *in vivo* de alterações hepáticas induzidas por esses herbicidas (Miranda *et al.*, 2025), são escassos os estudos que investigam, de forma sistemática, parâmetros como potencial de membrana mitocondrial, integridade mitocondrial e níveis intracelulares de ATP em condições de coexposição. Nesse sentido, o estudo recentemente publicado por dos Santos Silva *et al.* (2025), utilizando mitocôndrias isoladas, representa um avanço significativo ao demonstrar, de maneira direta, os alvos mitocondriais específicos da AMT e CLZ. A integração desses achados mecanísticos com os resultados obtidos no presente estudo em células HepG2 reforça a relevância da mitocôndria como elo central entre a exposição a esses herbicidas e o desenvolvimento de hepatotoxicidade, além de evidenciar a importância de abordagens complementares, envolvendo modelos subcelulares e celulares para a avaliação dos riscos associados à exposição isolada e combinada a esses compostos. A maioria das investigações disponíveis concentra-se em modelos *in vivo* ou em outras linhagens celulares, como THP-1, nas quais a CLZ demonstrou induzir disfunção mitocondrial, produção de espécies reativas de oxigênio e resposta inflamatória (IL-8) (Tavares *et al.*, 2014).

Diante desse contexto, o presente estudo avaliou os efeitos tóxicos dos herbicidas AMT e CLZ, isolados e em associação, com o objetivo de compreender os mecanismos celulares envolvidos na citotoxicidade e na disfunção bioenergética induzidas por esses compostos. A investigação buscou contribuir para o entendimento dos processos de toxicidade associados à exposição a herbicidas, fornecendo subsídios científicos relevantes para a avaliação de riscos à saúde humana e animal. De forma complementar, os resultados obtidos podem auxiliar, ainda que de maneira indireta, na discussão sobre práticas agrícolas mais seguras e sustentáveis.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os mecanismos da hepatotoxicidade da AMT e CLZ e da associação das duas substâncias em células HepG2.

2.2 Objetivos Específicos

I) Avaliar a citotoxicidade dos herbicidas AMT e CLZ, isolados e em associação, em células HepG2, por meio de ensaios de proliferação celular, viabilidade metabólica, integridade de membrana e viabilidade celular.

II) Investigar se a associação AMT e CLZ apresenta efeito sinérgico ou antagônico.

III) Investigar o envolvimento da mitocôndria na toxicidade dos herbicidas por meio da avaliação do potencial de membrana mitocondrial, produção de ATP, atividade e massa mitocondrial em células HepG2 expostas aos herbicidas.

3 HIPÓTESE

Os herbicidas ametrina e clomazona alteram processos metabólicos essenciais, promovendo hepatotoxicidade por meio da disfunção mitocondrial e da indução de citotoxicidade em células HepG2. A exposição associada a ambos os compostos pode potencializar esses efeitos, sugerindo uma ação sinérgica que intensifica o comprometimento da bioenergética mitocondrial e a perda da viabilidade celular.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 Herbicidas

A utilização de compostos para maximizar a produção agrícola e pecuária tem se tornado algo cada vez mais comum ao longo dos anos. Apesar de demonstrarem eficiência no controle de pragas, a presença desses compostos representa risco para o meio ambiente e organismos não alvos com efeitos colaterais ainda não descritos pela literatura (Miranda *et al.*, 2020)

O manual com orientações e principais procedimentos para registro de praguicidas, divulgado em 2012 com base na Lei 7.802, de 1989, e no Decreto 4.074, de 2002, descreve que para um produto ser comercializado ele precisa passar por avaliação técnica da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), do MAPA e do IBAMA e durante a análise dos órgãos reguladores, são considerados os riscos à saúde humana, perigos e consequências para o meio ambiente, além da eficácia do composto sobre redução de pragas e doenças. A rigidez e evolução da legislação e do sistema de registro garantem que os produtos colocados à disposição do usuário sejam seguros, quando bem utilizados. Porém, os praguicidas podem ser tóxicos devido ao uso inadequado e sua toxicidade depende das propriedades dos ingredientes ativos e inertes do produto (Tavella *et al.*, 2011).

Outro fator a ser considerado é a presença de resíduos nos alimentos que chegam para o consumidor final. Pensando nisso a ANVISA criou em 2001 um projeto para análise de resíduos em alimentos e a partir de 2003 foi institucionalizado como Programa de Análise de Resíduos de Praguicidas em Alimentos (PARA) através da Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 119, de 19 de maio de 2003. O programa tem como objetivo o monitoramento de resíduos de praguicidas em alimentos para avaliar os riscos da ingestão desses compostos pela dieta (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019).

O Brasil possui condições favoráveis para o agronegócio, o clima e abundância de terras faz com que anualmente os investimentos em pesquisa e tecnologia agropecuária aumentem significativamente, e apesar da boa perspectiva de renda nacional para manter a alta produtividade se torna necessária a utilização de compostos químicos e em 2021 o Brasil foi o maior importador de praguicidas do mundo (Gonçalves; Delabona, 2022).

Os praguicidas podem ser classificados de acordo com o organismo-alvo ou com sua finalidade de uso, sendo divididos principalmente em inseticidas, herbicidas, fungicidas, acaricidas, nematicidas e rodenticidas. Os inseticidas são utilizados no controle de insetos-praga; os fungicidas atuam contra fungos fitopatogênicos; os herbicidas são empregados no controle de plantas daninhas; enquanto acaricidas, nematicidas e rodenticidas são destinados ao controle de ácaros, nematoides e roedores, respectivamente. Entre essas classes, os herbicidas representam uma das categorias mais amplamente utilizadas na agricultura moderna, devido à necessidade de controle eficiente da competição entre culturas agrícolas e plantas invasoras, contribuindo para o aumento da produtividade e da eficiência dos sistemas agrícolas. No entanto, o uso intensivo desses compostos também tem sido associado a riscos ambientais e toxicológicos, especialmente em organismos não alvo, destacando a importância da avaliação de seus efeitos biológicos (Damalas; Eleftherohorinos, 2011; Carvalho, 2017).

Quando se trata da escolha do herbicida, algumas questões devem ser levadas em consideração como: seletividade - seletivos ou não seletivos; absorção pela planta - herbicidas de solo e foliares; tipos de ação - sistêmicos ou de contato; tempo de aplicação - pré-plantio, pré-emergente ou pós-emergente.

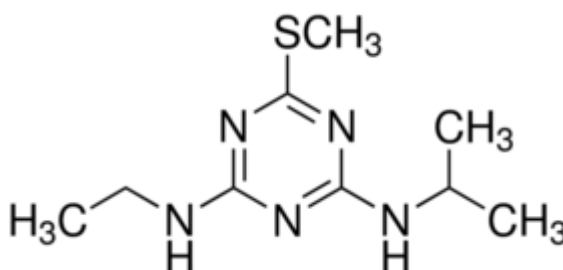
Uma técnica amplamente utilizada para o controle de plantas daninhas é a associação de dois ou mais herbicidas. Entre as principais vantagens apresentadas estão o aumento do espectro de controle das ervas daninhas, a redução de custos e a prevenção do surgimento de plantas resistentes aos herbicidas (Gressel, 1990; Dekker, 1995; Damalas; Eleftherohorinos, 2001). A associação dos herbicidas ametrina e clomazona pode ser encontrada no mercado com os nomes comerciais: SINERGE EC (FMC), MegaBR-Duo (Ourofino) e Crossover (Ourofino).

Esses herbicidas cumprem o papel de proteger as culturas agrícolas e propiciar maior produtividade e, consequentemente, ampliar a produção de alimentos, mas o seu uso indiscriminado pode trazer sérios problemas para o meio ambiente e para a saúde humana e animal. Tendo em vista que em 2020 o Brasil comercializou mais de 685 milhões de toneladas de praguicidas comumente utilizados em plantações de cana-de-açúcar, algodão, café, soja e outras culturas, a contaminação por resíduos dessas substâncias em alimentos, água e intoxicação aguda ou crônica torna esse um problema de saúde pública (Gonçalves; Delabona, 2022).

4.2 Ametrina

A Ametrina (Figura 1) é um herbicida que compõe uma s-triazina formada por um grupo tiometil, um grupo etil e um grupo isopropil, formando a estrutura que leva o nome de 2-N-etil-4-N-isopropil-6-tiometil-1,3,5-triazina-2,4-diamino. Ela é um herbicida seletivo sistêmico com classificação II sendo considerada altamente tóxica e utilizada 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 (Júnior *et al.*, 2021).

FIGURA 1 - Estrutura química do herbicida ametrina.



(Fonte: Adaptado de PubChem)

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).

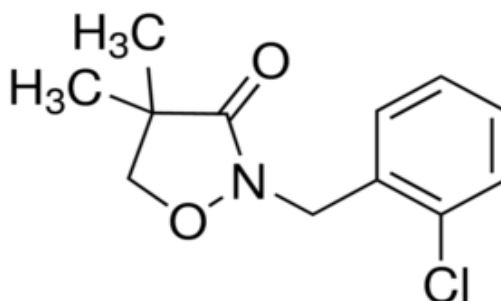
Após avaliação de amostras de água e sedimentos do rio Pardo, São Paulo, durante a estação chuvosa foi constatada a presença da ametrina, evidenciando a necessidade de intensificação na fiscalização sobre a utilização deste composto químico nas lavouras, conforme descrito por Machado *et al.* (2017), a poluição de rios próximos a áreas urbanas representam um risco para a saúde humana por conta da exposição direta aos produtos químicos ou ingestão de água e peixes contaminados. Stefano *et al.* (2022) realizaram estudo em Porto Alegre para identificar a ocorrência de contaminação por praguicidas em águas subterrâneas, pois na zona sul da cidade é onde se predomina a agricultura e a água oriunda de poções e nascentes são utilizadas para abastecer aproximadamente 25% da população da cidade. Em mais de 90% das amostras foram detectados resíduos de praguicidas, incluindo ametrina, e grande parte dessas amostras foram contaminadas após lixiviação ou dispersão do ar durante o processo de aplicação na lavoura.

Além da contaminação ambiental, a exposição à ametrina também pode ocorrer por meio da ingestão de alimentos contendo resíduos desse herbicida. Estudos reportam a presença de ametrina em produtos agrícolas, como abacaxi e cenoura, com concentrações detectáveis em níveis de até 0,16 mg/kg em base seca, evidenciando que culturas alimentares podem atuar como importante via de exposição para organismos não alvo, incluindo seres humanos. Esses achados reforçam a preocupação quanto ao consumo crônico de alimentos contaminados e destacam a necessidade de avaliações toxicológicas que considerem a ingestão dietética como uma rota relevante de exposição à ametrina (Dos Santos Silva *et al.*, 2025)

4.3 Clomazona

O herbicida Clomazona 2-(2-clorofenil) metil-4,4-dimetil-3-isoxazolidinona (Figura 2), representante da classe isoxazolidinona, foi desenvolvido no início de 1980 para o controle de gramíneas anuais e ervas daninhas de folhas largas em uma ampla variedade de culturas e localizações (GUNASEKARA *et al.*, 2009).

FIGURA 2 - Estrutura química do herbicida clomazona.



(Fonte: Adaptado de PubChem)

É considerado um herbicida seletivo, utilizado em pré ou pós-emergência inicial no controle de várias espécies daninhas em culturas como a de arroz, soja, mandioca, cana-de-açúcar e algodão (Andres; Machado, 2004). No Brasil já foi comercializado com os nomes de Gamit StarR e Gamit 500 ECR, ambos formulados como concentrado emulsionável, na concentração de 800 e 500 g de ingrediente ativo de clomazona por litro, respectivamente. Atualmente é comercializado com o nome de Gamit 360 CSR.

Apesar de ser bastante efetivo, a clomazona provoca ampla contaminação ambiental devido à sua elevada solubilidade em água (1.100 mg.L⁻¹), além da meia-

vida média de 28 a 84 dias, sendo que seus resíduos podem permanecer por até 130 dias no ambiente (Zanella *et al.*, 2002).

A clomazona é um potencial poluente dos recursos hídricos por ser amplamente utilizada na agricultura. López-Piñeiro *et al.* (2022) avaliaram a eficiência da adição de biocarvão de azinheira para correção orgânica do solo nas propriedades produtoras de arroz. Eles observaram que a presença do biocarvão aumentou a persistência de clomazona no solo irrigado por aspersão, possibilitando que um maior índice de clomazona sofresse lixiviação independente de como havia sido o preparo do solo antes do plantio.

Além da contaminação ambiental, a exposição à clomazona também pode ocorrer por meio da ingestão de alimentos contendo resíduos desse herbicida. Estudos de avaliação de risco dietético demonstraram a presença de clomazona em culturas agrícolas, como soja e soja verde, com níveis quantificáveis após aplicação em condições de boas práticas agrícolas, indicando que alimentos podem atuar como via relevante de exposição humana. De forma semelhante, análises de resíduos em grãos de arroz detectaram a presença de clomazona em concentrações dentro dos limites estabelecidos pelo Codex Alimentarius (0,1 mg/kg), evidenciando a ocorrência desse herbicida em produtos destinados ao consumo humano. Esses achados reforçam a importância do monitoramento de resíduos em alimentos e da avaliação toxicológica considerando a ingestão dietética como uma rota potencial de exposição à clomazona (Pang *et al.*, 2020; Dors *et al.*, 2011).

O modo de ação da clomazona em organismos segue sendo estudado para desvendar o mecanismo de toxicidade causada pela presença do composto. Fagundes *et al.* (2015) relataram o primeiro surto de intoxicação causada em um rebanho de ovelhas. A contaminação da pastagem e dos animais se deu após aplicação aérea da clomazona em um arrozal próximo à localização da fazenda, e após 10 dias os animais apresentaram os primeiros sinais de intoxicação com fraqueza, dificuldade de locomoção, anorexia e respiração acelerada. Resíduos do herbicida foram encontrados nas amostras de solo, vegetação e no fígado, rim e músculo esquelético das ovelhas mortas.

4.4 Mistura de Herbicidas

O emprego de misturas de herbicidas constitui uma prática amplamente adotada na agricultura moderna, visando ampliar o espectro de controle de plantas daninhas, retardar o desenvolvimento de resistência e otimizar a eficiência agrônômica. Em sistemas vegetais, essas associações frequentemente resultam em efeito sinérgico, decorrente da atuação simultânea sobre diferentes alvos metabólicos e da inibição dos mecanismos de detoxificação, o que favorece o acúmulo intracelular dos compostos e a intensificação da fitotoxicidade.

Entretanto, em modelos biológicos não vegetais, o comportamento toxicológico das misturas pode divergir significativamente. Estudos conduzidos com ametrina e clomazona em zebrafish demonstraram que, embora os herbicidas isolados tenham promovido alterações enzimáticas compatíveis com hepatotoxicidade (aumento de AST, ALT e ALP) e neurotoxicidade (inibição da atividade da acetilcolinesterase), a associação entre ambos apresentou comportamento predominantemente antagonista em parâmetros fisiológicos e bioquímicos, com atenuação de danos em relação aos tratamentos individuais. Observou-se, por exemplo, preservação da inflação da bexiga natatória e mitigação da inibição da AChE nas exposições combinadas, evidenciando modulação da toxicidade da mistura (Miranda *et al.*, 2025).

Do ponto de vista mecanístico, a toxicidade de misturas depende da convergência de alvos moleculares, da toxicocinética e da capacidade adaptativa do sistema biológico. Conceitos contemporâneos de avaliação de misturas descrevem que o sinergismo tende a ocorrer quando diferentes substâncias compartilham o mesmo mecanismo de ação ou quando um composto atua como potencializador da biodisponibilidade ou da toxicidade de outro. Em contrapartida, quando os compostos atuam em vias moleculares distintas e são eficientemente metabolizados, os efeitos combinados tendem a ser aditivos ou até antagonistas, refletindo a atuação de mecanismos compensatórios e limites fisiológicos de resposta celular (Bloch *et al.*, 2023).

Em modelos celulares humanos, como células HepG2, a elevada capacidade metabólica hepática favorece a ocorrência de interações metabólicas complexas. Embora existam relatos de sinergismo em misturas de pesticidas capazes de induzir concomitantemente estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, redução do potencial de membrana mitocondrial e aumento da citotoxicidade, esse comportamento não é

universal e depende fortemente da natureza química dos compostos e de sua interação metabólica (Conte *et al.*, 2022).

Esses achados reforçam a importância de avaliar misturas químicas em modelos biológicos distintos, uma vez que extrapolações diretas entre sistemas vegetais e humanos podem conduzir a interpretações equivocadas sobre risco toxicológico. Além disso, destacam a relevância da bioenergética mitocondrial como eixo central na compreensão dos efeitos celulares de herbicidas, uma vez que alterações na produção de ATP, no potencial de membrana mitocondrial e na dinâmica mitocondrial podem atuar tanto como mecanismos de toxicidade quanto como respostas adaptativas frente à exposição combinada.

4.5 Toxicologia

A toxicologia é a ciência que estuda substâncias químicas, investigando suas propriedades químicas e físicas, bem como seus efeitos fisiológicos e comportamentais nos organismos vivos. Toxinas são substâncias que, quando ingeridas ou em contato com a pele em quantidades suficientes, podem causar doenças ou morte (Langman & Kapur, 2006).

Conforme descrito por Kaplan e Pesce (1984), a toxicologia abrange diversas áreas, sendo dividida em:

- I) Toxicologia Ambiental: Foca na avaliação dos efeitos nocivos de compostos químicos no meio ambiente, examinando como essas substâncias interagem através das cadeias biológicas e afetam os ecossistemas.
- II) Toxicologia Clínica: Relaciona-se ao uso de produtos químicos para o tratamento de patologias, analisando os efeitos adversos que esses produtos podem ter em órgãos ou sistemas não relacionados ao tratamento.
- III) Toxicologia Forense: Dedicar-se aos aspectos nocivos de produtos químicos ou venenos, investigando casos de intoxicação para propósitos legais.

A toxicologia é uma ciência multidisciplinar crucial para entender os riscos associados à exposição a substâncias químicas. Através de bioensaios e estudos em diversos organismos, os toxicologistas podem identificar os perigos potenciais e desenvolver estratégias para mitigar os riscos, protegendo tanto a saúde humana quanto a ambiental.

4.6 Toxicidade em Organismos Não Alvos

A toxicidade em organismos não-alvos é um tema de crescente preocupação devido ao uso intensivo de produtos químicos, como pesticidas e herbicidas, na agricultura e na indústria. Esses compostos, embora eficazes no controle de pragas e ervas daninhas, podem ter efeitos adversos significativos em organismos que não são o alvo pretendido. A exposição a esses químicos pode ocorrer de diversas maneiras, incluindo a contaminação do solo, da água e do ar, resultando em impactos ambientais e de saúde pública. Apesar de demonstrarem eficiência no controle de pragas, a presença desses compostos representa risco para o meio ambiente e organismos não alvos com efeitos colaterais ainda não descritos totalmente pela literatura.

A utilização desses compostos, especialmente na agricultura, expõe os trabalhadores a riscos de contaminação direta ou indireta de resíduos oriundo das aplicações. Conforme relatado por Silva et al. (2005), além do processo de preparação e aplicação das substâncias é preciso considerar fatores externos como temperatura e quantidade de esforço físico necessário para os procedimentos, pois: (I) substâncias químicas + temperaturas elevadas aumentam a volatilização dos compostos tornando-os disponíveis para inalação e/ou absorção cutânea e (II) substâncias químicas + esforço físico aumentam a ventilação pulmonar fazendo com que maiores quantidade de compostos sejam inaladas com o ar gerando assim quadros de intoxicação aguda ou crônica.

A maioria das intoxicações se dá pelas vias respiratória e dérmica e em menor quantidade pela via oral, a aplicação incorreta dos produtos associada a não utilização dos equipamentos de proteção individual aumentam significativamente as chances de problemas a curto e longo prazo. A exposição por um curto período causa efeitos agudos como tontura, vômito e desorientação, já a exposição prolongada a baixas concentrações causa efeitos crônicos como alterações imunológicas e reduções na eficiência do sistema respiratório (Silva *et al.*, 2005; Scharmach, Silva, Campos, 2020).

Em 2010, foi relatado um surto de intoxicação por inseticidas organofosforados e piretroides em vacas leiteiras no município de Cuiabá, Mato Grosso. Este incidente resultou na morte de onze vacas de um total de 25 animais expostos. Os principais sinais clínicos observados incluíram apatia, anorexia, sialorreia, diarreia escura com estrias de sangue, tremores musculares, incoordenação e dificuldade respiratória. As

necropsias revelaram edema pulmonar, enfisema subpleural e hemorragias em vários órgãos. (Mendonça *et al.*, 2010). Um relato na literatura descreve a intoxicação de bovinos causada pela ingestão de água contaminada com mancozebe (fungicida) e forato (inseticida, acaricida e nematicida). Em um incidente documentado por Oliveira-Filho *et al.* (2010), 20 dos 49 bovinos em uma propriedade vieram a óbito poucas horas após apresentarem sinais clínicos de agressividade, tremores musculares, diarreia e alterações na coordenação motora. Este episódio destaca os riscos de contaminação ambiental por pesticidas e a necessidade de manejo adequado desses produtos na agricultura para evitar danos a organismos não-alvo.

Animais, tanto domésticos quanto selvagens, são vulneráveis aos efeitos tóxicos dos praguicidas. Exemplos de impactos incluem:

- I) Abelhas: A exposição a neonicotinóides tem sido ligada ao declínio das populações de abelhas, afetando a polinização e a biodiversidade.
- II) Pássaros e Mamíferos: Praguicidas podem causar mortalidade direta e afetar a reprodução e comportamento alimentar.
- III) Peixes e Organismos Aquáticos: Praguicidas que contaminam corpos d'água são altamente tóxicos para a vida aquática, causando mortalidade e disfunções reprodutivas.

Embora os praguicidas sejam fundamentais para a agricultura, é crucial equilibrar seus benefícios com os riscos para organismos não alvos.

4.7 O Fígado como Alvo Principal dos Xenobióticos

O fígado desempenha um papel crucial na biotransformação e eliminação de xenobióticos, substâncias estranhas ao organismo, incluindo fármacos, toxinas ambientais e praguicidas. Este processo converte substâncias hidrofóbicas em hidrossolúveis facilitando na eliminação pelo organismo (Guillouzo, 1998; Ponce *et al.*, 2018). Devido à sua localização estratégica no sistema porta-hepático, rica vascularização e intensa atividade metabólica, o fígado é frequentemente exposto a altos níveis de xenobióticos.

O fígado é o principal órgão envolvido no processo de biotransformação e metabolismo de xenobióticos, dessa forma, torna-se o principal alvo dos mecanismos de toxicidade dessas substâncias. A exposição a esses compostos pode levar a uma série de eventos adversos, incluindo hepatite, necrose hepatocelular, cirrose e até

mesmo o desenvolvimento de câncer de fígado. Devido às desvantagens dos estudos em modelos *in vivo*, como por exemplo a influência de várias substâncias endógenas sobre as exógenas, os sistemas hepáticos *in vitro* representam uma melhor abordagem experimental para rastrear potenciais compostos hepatotóxicos e investigar mecanismos pelos quais as substâncias químicas induzem as lesões hepáticas (Guillouzo, 1998; Carvalho *et al.*, 2013).

4.8 Células HepG2, Modelo de Estudo *In Vitro*

Diversos modelos celulares hepáticos estão disponíveis para pesquisa, cada um com suas próprias vantagens e desvantagens. Hepatócitos isolados e culturas primárias de hepatócitos são considerados os modelos celulares hepáticos mais próximos da fisiologia hepática *in vivo*.

As células HepG2 constituem um modelo amplamente utilizado em estudos toxicológicos *in vitro*; entretanto, apresentam limitações importantes que devem ser consideradas na interpretação dos resultados. Por se tratarem de células derivadas de carcinoma hepatocelular humano, não reproduzem completamente a complexidade funcional dos hepatócitos normais, especialmente no que se refere à regulação metabólica e à resposta a xenobióticos. Alterações genéticas e fenotípicas inerentes à sua origem tumoral podem influenciar vias de sinalização celular, proliferação e mecanismos de resposta ao estresse (Wilkening; Sturm; Hengstler, 2003; Donato *et al.*, 2015).

Outra limitação relevante está relacionada à capacidade reduzida de metabolização de xenobióticos. As células HepG2 apresentam expressão e atividade significativamente menores de enzimas do sistema citocromo P450 (CYPs), quando comparadas a hepatócitos primários humanos. Essa deficiência pode comprometer a avaliação de compostos que dependem de bioativação metabólica para exercer toxicidade, levando à subestimação ou interpretação incompleta dos efeitos tóxicos (Guo *et al.*, 2011; Donato *et al.*, 2015).

Além disso, as células HepG2 não reproduzem adequadamente a arquitetura tridimensional do fígado nem a interação com outros tipos celulares hepáticos, como células de Kupffer, células estreladas e células endoteliais sinusoidais. Essa ausência de microambiente hepático limita a avaliação de respostas inflamatórias, fibrogênicas e imunológicas, que são fundamentais em processos de hepatotoxicidade *in vivo*.

(Godoy *et al.*, 2013). Outro ponto relevante é que, devido ao seu perfil proliferativo elevado, típico de células tumorais, as HepG2 podem apresentar respostas celulares diferentes daquelas observadas em hepatócitos quiescentes, o que pode impactar a interpretação de ensaios de viabilidade, proliferação e morte celular, especialmente em estudos de exposição crônica (Hornsby *et al.*, 2009).

Por fim, embora apresentem boa reprodutibilidade, as células HepG2 podem sofrer alterações fenotípicas ao longo de sucessivas passagens em cultura, o que pode afetar a consistência dos resultados experimentais. Dessa forma, o número de passagens deve ser cuidadosamente controlado, e os resultados obtidos com esse modelo devem, sempre que possível, ser complementados com outros sistemas experimentais, a fim de garantir maior robustez e relevância biológica (Hengstler *et al.*, 2002; Pan *et al.*, 2009).

Apesar dessas limitações, as células HepG2 apresentam vantagens importantes que justificam seu amplo uso como modelo experimental. Essa linhagem celular apresenta facilidade de cultivo, elevada estabilidade fenotípica e alta reprodutibilidade entre diferentes experimentos. Além disso, são células metabolicamente ativas, capazes de manter diversas funções hepáticas, permitindo a avaliação de múltiplos alvos celulares e metabólicos envolvidos na toxicidade de xenobióticos (Kazama *et al.*, 2022). Outra característica importante é que são capazes de simular a função hepática de um organismo *in vitro*, sendo possível identificar múltiplos alvos metabólicos e moleculares em toxicidades induzidas por xenobióticos.

As células HepG2 possuem morfologia semelhante ao parênquima hepático e mantêm as características e a maioria das funções especializadas dos hepatócitos normais, embora derivadas de um hepatoblastoma, as células HepG2 são consideradas não tumorigênicas em modelos de pesquisa *in vitro*. Isso significa que elas não formam tumores quando injetadas em modelos animais, tornando-as seguras para uma variedade de estudos laboratoriais sem o risco de induzir crescimento tumoral inadvertido. Além da ausência de tumorigenicidade que as tornam seguras para o estudo, as células HepG2 apresentam diversas características que as tornam ideais para estudos *in vitro*:

I) Crescimento em Monocamada e Agregados: As células HepG2 aderem à superfície do cultivo e proliferam em monocamada, formando uma camada uniforme de células.

Em algumas condições, podem formar agregados tridimensionais, imitando parcialmente a organização espacial do fígado *in vivo*.

II) Aderência à Superfície: A aderência à superfície do cultivo facilita a manipulação e análise das células, permitindo a realização de diversos experimentos, como ensaios de citocinas, testes de toxicidade e estudos de migração celular.

III) Facilidade de Manipulação: As células HepG2 são facilmente transfectadas com plasmídeos e vetores virais, permitindo a introdução de genes específicos para estudos de função gênica e expressão de proteínas recombinantes.

IV) Alta Reprodutibilidade: As células HepG2 apresentam alta reprodutibilidade entre diferentes lotes e laboratórios, facilitando a comparação de resultados e a validação de experimentos.

Essas características tornam esse modelo particularmente útil para estudos mecanísticos, especialmente aqueles voltados à investigação da disfunção mitocondrial e da viabilidade celular. Dessa forma, apesar das limitações inerentes ao modelo, as células HepG2 constituem uma ferramenta experimental adequada e amplamente consolidada para avaliação da hepatotoxicidade induzida por xenobióticos, incluindo herbicidas.

4.9 Bioenergética Mitocondrial

A bioenergética mitocondrial desempenha papel central na toxicidade hepática induzida por xenobióticos, especialmente no contexto da exposição a praguicidas. Estudos em células HepG2 demonstram que diferentes pesticidas são capazes de alterar parâmetros mitocondriais, incluindo redução do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), diminuição da produção de ATP e aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO). Por exemplo, a exposição ao fungicida kresoxim-methyl promoveu comprometimento da respiração mitocondrial em células HepG2 após 24 h, evidenciando prejuízo na capacidade bioenergética celular. De forma semelhante, pesticidas organoclorados, como p,p'-DDE e β -HCH, reduziram o potencial de membrana mitocondrial, os níveis de ATP e a taxa de consumo de oxigênio, confirmando disfunção mitocondrial como mecanismo de citotoxicidade hepática. Além disso, inseticidas organofosforados como o clorpirifós também induziram estresse oxidativo e disfunção mitocondrial em células HepG2, reforçando

que a mitocôndria constitui um alvo sensível à toxicidade induzida por praguicidas (Vandensande *et al.*, 2024; Liu *et al.*, 2017; Montanarí *et al.*, 2024).

Além disso, substâncias como a piraclostrobina também induziram disfunção mitocondrial, aumento de ERO, liberação de citocromo c e ativação de caspases, caracterizando apoptose mediada por mitocôndrias (Li *et al.*, 2023).

Em um contexto molecular mais amplo, praguicidas como imidacloprido e imazalil demonstraram reduzir o $\Delta\Psi_m$ em células HepG2, promovendo aumento de ROS e apoptose, reforçando a estreita relação entre disfunção mitocondrial e morte celular (Zhang *et al.*, 2022).

Esses achados, embora realizados com diferentes classes de praguicidas, evidenciam que a perturbação da bioenergética mitocondrial caracterizada por redução do potencial de membrana, diminuição da produção de ATP e aumento do estresse oxidativo, constitui um mecanismo recorrente de citotoxicidade em células hepáticas, reforçando a relevância de investigar esses parâmetros no contexto específico da ametrina e da clomazona.

Além disso, a mitocôndria é um dos principais alvos de xenobióticos devido ao seu papel central na fosforilação oxidativa e na regulação do metabolismo energético celular. A interferência na cadeia transportadora de elétrons (CTE), especialmente nos complexos I e III, pode levar ao vazamento de elétrons e à formação excessiva de ERO, desencadeando danos oxidativos a lipídios, proteínas e DNA mitocondrial (mtDNA), o que compromete ainda mais a eficiência bioenergética (Nunes *et al.*, 2018; Wallace, 2012).

Outro aspecto relevante é que o comprometimento da bioenergética mitocondrial pode ativar vias de morte celular tanto apoptóticas quanto necróticas, dependendo da intensidade do dano. A perda do $\Delta\Psi_m$ está diretamente associada à abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (mPTP), promovendo liberação de fatores pró-apoptóticos, como o citocromo c, e ativação da cascata de caspases (Green; Reed, 1998; Ott *et al.*, 2007). Em situações de dano mais severo, a depleção de ATP pode direcionar a célula para necrose, ampliando o dano tecidual.

Adicionalmente, alterações na bioenergética mitocondrial estão intimamente relacionadas à modulação do metabolismo hepático e à capacidade de detoxificação celular. A disfunção mitocondrial pode comprometer processos como β -oxidação de

ácidos graxos e metabolismo de xenobióticos, exacerbando o acúmulo de metabólitos tóxicos e intensificando a lesão hepática (Pessayre; Frost; Mansouri, 2012).

No contexto de misturas químicas, como a associação entre ametrina e clomazona, os efeitos sobre a bioenergética mitocondrial podem ser ainda mais complexos, envolvendo interações do tipo aditiva, sinérgica ou antagônica. Essas interações podem modular a extensão do dano mitocondrial e, conseqüentemente, a resposta celular, destacando a importância de estudos que avaliem não apenas compostos isolados, mas também suas combinações (Backhaus; Faust, 2012).

Diante desse panorama, torna-se evidente a importância de avaliar a influência da bioenergética mitocondrial em células HepG2 expostas aos herbicidas ametrina e clomazona, tanto isoladamente quanto em associação. Ao investigar parâmetros como potencial de membrana mitocondrial, integridade mitocondrial e produção de ATP, este estudo busca preencher uma lacuna relevante na literatura e contribuir para a compreensão dos mecanismos de toxicidade hepática induzida por herbicidas, especialmente no contexto de exposições combinadas.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios experimentais foram realizados no Laboratório de Bioquímica Metabólica e Toxicológica (LaBMeT) da Unesp, Câmpus de Dracena, por meio de estudos em células HepG2. Todos os ensaios, realizados em triplicata, contaram com controles positivos (máximo efeito tóxico) e controles negativos (ausência de efeito tóxico).

5.1 Reagentes

Os herbicidas AMT (45321) e CLZ (46120) foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich Brasil Ltda. Todos os demais reagentes utilizados neste estudo foram adquiridos com o mais alto grau de pureza.

5.2 Cultura das Células HepG2

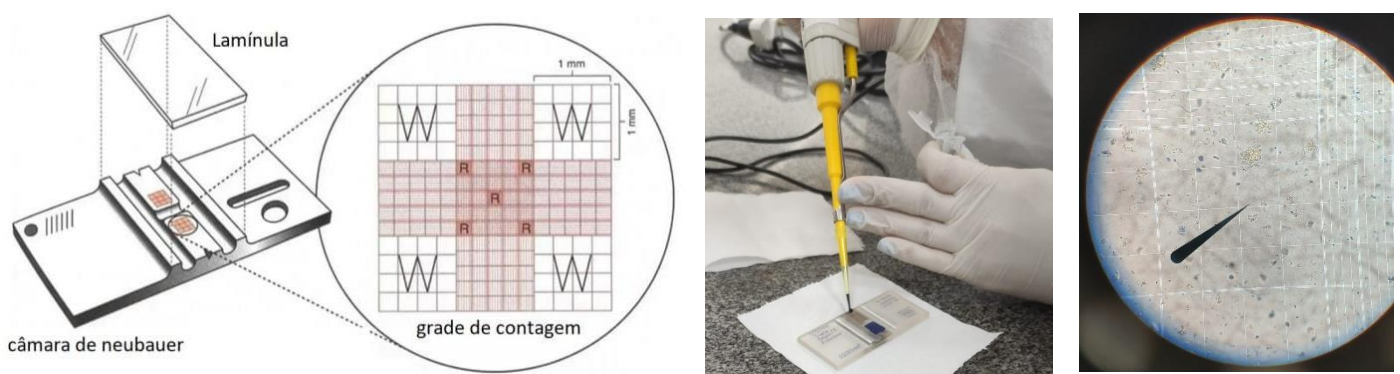
As células HepG2 utilizadas neste estudo foram disponibilizadas pelo Prof. Dr. Daniel J. Dorta, da Universidade de São Paulo (USP), campus Ribeirão Preto. Esta linhagem celular humana (American Type Culture Collection – ATCC, n.º HB8065) foi originalmente isolada em 1975, a partir de tecido hepático de um paciente pediátrico argentino de 15 anos, diagnosticado com carcinoma hepatocelular diferenciado. As células HepG2 entre a 10ª e a 15ª passagens, foram cultivadas em meio Minimum Essential Medium (MEM), suplementado com aminoácidos não essenciais (0,1 mM), piruvato de sódio (1 mM), L-glutamina (2 mM) e sais de Earle. Adicionalmente, o meio foi enriquecido com 10% de soro bovino fetal (SBF), penicilina G (100 UI/mL) e estreptomicina (100 µg/mL), para garantir condições ideais de crescimento.

O cultivo foi realizado em frascos de cultura mantidos em estufa climatizada, sob atmosfera umidificada com 5% de CO₂, à temperatura constante de 37 °C (Figura 5). Após um período médio de 4 a 5 dias, necessário para o completo crescimento e adesão das células ao fundo dos frascos, a viabilidade celular foi avaliada por meio do teste de exclusão com azul de tripan (0,25%).

A contagem celular foi realizada utilizando câmara de Neubauer (Figura 3), sob microscópio óptico (Carl Zeiss, Alemanha), com objetiva de aumento de 10x. Apenas culturas que apresentaram viabilidade $\geq 90\%$ foram consideradas aptas para os experimentos.

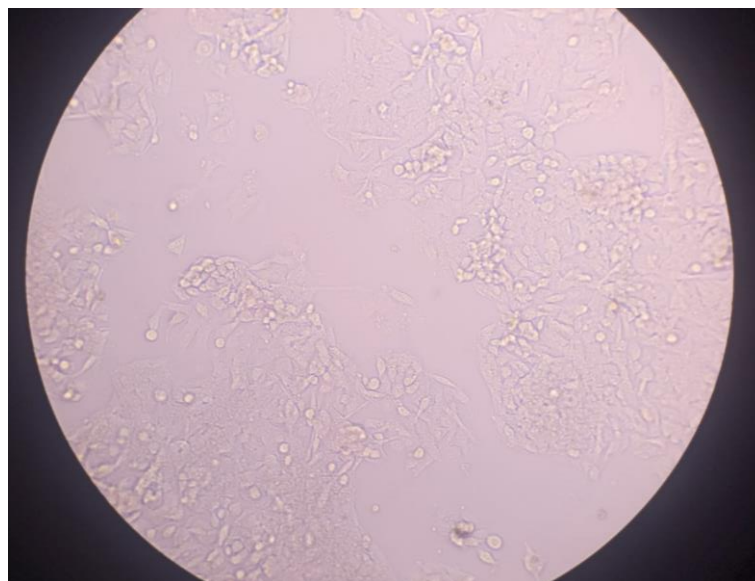
As células viáveis foram, então, plaqueadas em densidades apropriadas conforme o tipo de análise, sendo incubadas novamente por 24 horas, em estufa a 37 °C e atmosfera com 5% de CO₂ (Figura 4 e 5), a fim de garantir adequada adesão celular antes do início das exposições aos herbicidas e dos ensaios subsequentes (Strober, 2015).

FIGURA 3 - Representação da visão superior da câmara de Neubauer, da lamínula e da grade de contagem.



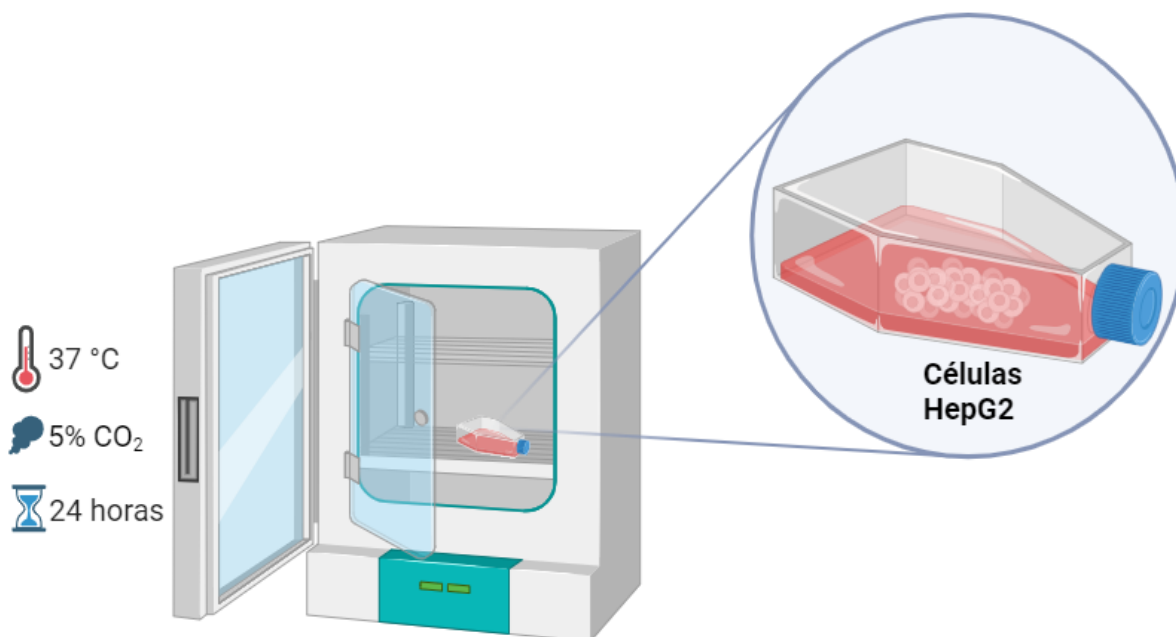
Fonte: Adaptado de Moura et al. (2008).

FIGURA 4 - Visão microscópica das células HepG2 (utilizando objetiva com aumento 10x). As células estão aderidas à placa de cultivo após incubação a 37°C e sob atmosfera com 5% de CO₂.



Fonte: Elaborado pela autora.

FIGURA 5 - Esquema representativo do cultivo celular.



Fonte: Elaborada pela autora com uso do BioRender.com.

5.3 Ensaios Citotoxicológicos

5.3.1 Ensaio de proliferação celular

A avaliação da proliferação celular das células HepG2 foi realizada por meio do ensaio colorimétrico com Sulforodamina B (SRB), conforme metodologia proposta por Skehan et al. (1990). Para o experimento, as células foram semeadas em densidade de 1×10^5 células/mL, utilizando meio MEM completo, em placas de 24 poços.

As placas foram incubadas por 24 horas em estufa climatizada a 37 °C, sob atmosfera com 5% de CO₂, para permitir a adesão celular. Após esse período, as células aderidas foram expostas às diferentes concentrações dos herbicidas ametrina e clomazona, isoladamente e em combinação (50, 100, 150 e 200 µM). Os grupos controles incluíram: controle negativo (dimetilsulfóxido – DMSO a 0,1% v/v) e controle positivo (terc-butil hidroperóxido a 100 µM).

As culturas foram então mantidas em estufa por 24 e 48 horas, sob as mesmas condições de temperatura e CO₂. Ao final de cada tempo experimental, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com solução tampão fosfato (PBS, 10 mM, pH 7,4). Em seguida, as células aderidas foram fixadas com metanol 100%, por 2 horas, lavadas novamente com PBS estéril e então coradas com SRB a 0,5% (m/v),

diluída em solução de ácido acético a 1% (v/v), permanecendo em incubação por 60 minutos.

Após o tempo de coloração, o excesso de corante foi retirado com lavagens sucessivas com ácido acético a 1%. O corante fixado às proteínas celulares foi então solubilizado com tampão Tris 10 mM (pH 10). A absorbância da solução obtida foi lida a 540 nm, em leitor de placas espectrofotométrico (EZ Read 2000, Biochrom, Cambridge, USA). Os dados foram expressos como a redução percentual da absorbância em relação ao controle negativo, refletindo a inibição da proliferação celular.

Princípio: O ensaio com Sulforodamina B (SRB) baseia-se na capacidade desse corante aniônico de se ligar de forma estequiométrica aos resíduos de aminoácidos básicos presentes nas proteínas celulares. Essa propriedade permite que ele seja amplamente utilizado para avaliar a proliferação celular, já que a intensidade da coloração retida pelas células ao final do experimento é diretamente proporcional à quantidade de proteínas totais — e, conseqüentemente, ao número de células viáveis aderidas ao substrato (Skehan *et al.*, 1990).

5.3.2 Ensaios de viabilidade celular

5.3.2.1 MTT: Avaliação da atividade metabólica das células HepG2

A atividade metabólica celular foi determinada por meio do ensaio de redução do corante 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), conforme metodologia descrita por Denizot; Lang (1986). Para isso, células da linhagem HepG2 foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de 2×10^4 células/mL, utilizando meio MEM completo.

Após 24 horas de incubação para adesão celular, as culturas foram expostas às diferentes concentrações dos herbicidas ametrina e clomazona, aplicados isoladamente e em associação, nas doses de 50, 100, 150 e 200 μ M, com três repetições independentes para cada condição experimental. As células permaneceram em incubação por 24 e 48 horas, em estufa climatizada a 37 °C com atmosfera contendo 5% de CO₂.

Ao término de cada período de exposição, foi adicionada ao meio de cultura uma solução de MTT a 0,5% (5 mg/mL), com nova incubação por 3 horas, sob as mesmas condições. Após a formação dos cristais de formazan, o meio foi descartado e os cristais foram solubilizados em uma mistura de dimetilsulfóxido (DMSO) e tampão glicina 0,2 M, pH 10,2. A leitura da absorbância foi realizada em 570 nm utilizando um leitor de microplacas EZ Read 2000 (Biochrom, Cambridge, UK). Os resultados obtidos foram expressos como percentual de variação na absorbância em relação ao grupo controle (células não tratadas).

Princípio: O corante MTT é reduzido por oxidoredutases ou desidrogenases dependentes de NADPH de células viáveis em formazan de cor púrpura, que pode então ser solubilizado para análise espectrofotométrica. A quantidade total de formazan produzida pela redução do MTT é diretamente proporcional ao número de células viáveis na cultura.

5.3.2.2 LDH: Avaliação da integridade da membrana celular das células HepG2

A integridade da membrana plasmática das células HepG2 foi analisada por meio da quantificação da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) liberada para o meio extracelular, como marcador de dano celular. Para esse ensaio, as células foram cultivadas em placas de 24 poços, na densidade de 1×10^5 células/mL, utilizando meio DMEM livre de vermelho de fenol. Após período de adesão, as culturas foram tratadas com os herbicidas ametrina e clomazona, tanto isoladamente quanto em associação, nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 μ M, com três repetições independentes para cada condição experimental.

Como controle positivo, foi utilizada uma solução de Triton X-100 a 0,2% (v/v), aplicada por 15 minutos a 37 °C, promovendo lise total das células. As exposições aos herbicidas ocorreram por 24 e 48 horas, sob atmosfera controlada com 5% de CO₂ a 37 °C.

Ao término do tempo de exposição, foram coletadas alíquotas de 50 μ L do sobrenadante de cada poço, previamente mantidas em gelo, e adicionadas a cubetas termostatizadas a 37 °C, contendo 1 mL do reagente substrato, conforme instruções do kit comercial (Laborclin, Brasil). A variação da absorbância foi medida em 340 nm durante 4 minutos, utilizando o espectrofotômetro DU800 (Beckman, Fullerton, EUA).

A atividade enzimática da lactato desidrogenase (LDH) foi calculada utilizando a fórmula de conversão fornecida pelo fabricante, considerando a variação de absorbância ao longo do tempo de leitura e o fator de conversão fornecido pelo kit.

Atividade (LDH) = [(Abs inicial – Abs final) / tempo de leitura] × fator de conversão

Os valores obtidos refletem o grau de dano na membrana celular causado pelos herbicidas em diferentes condições de exposição.

Princípio: O ensaio LDH mede a atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH), normalmente presente no citoplasma das células. Com a perda da integridade da membrana celular, a enzima LDH é liberada no meio de cultivo e sua atividade é então mensurada. Se a atividade da LDH está aumentada no meio, significa que há perda de integridade da membrana celular e consequentemente está diminuída a viabilidade das células HepG2. A quantidade de LDH no meio de cultura é, portanto, um indicador indireto da morte celular e citotoxicidade.

5.3.2.3 Teste de exclusão do azul de tripan

A viabilidade celular foi determinada pelo teste de exclusão do azul de tripan. Após a obtenção da suspensão celular, uma alíquota da amostra foi misturada, em proporção adequada, à solução de azul de tripan, para a coloração, foram misturados 50 µL da suspensão celular com 50 µL da solução de azul de tripan (0,5%). Em seguida, a mistura foi aplicada em câmara de Neubauer para contagem celular em microscópio óptico. As células viáveis, que não absorveram o corante, foram distinguidas das células inviáveis, que apresentaram coloração azul, permitindo o cálculo da porcentagem de viabilidade celular.

O percentual de viabilidade celular foi determinado com base na razão entre o número de células viáveis e o total de células contadas (Altman *et al.*, 1993).

Princípio: O ensaio de exclusão com azul de tripan é um método amplamente utilizado para avaliar a viabilidade celular com base na integridade da membrana plasmática. Esse princípio se baseia no fato de que células viáveis, com membranas íntegras, não permitem a entrada do corante azul de tripan, permanecendo incolores. Em

contrapartida, células danificadas ou mortas, com membranas comprometidas, permitem a penetração do corante, adquirindo coloração azul. A análise quantitativa é realizada por meio da contagem das células coradas (não viáveis) e não coradas (viáveis) em uma câmara de Neubauer, utilizando microscopia óptica (Strober, 2015).

5.3.3 Ensaio potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$)

Neste experimento, o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) foi analisado como um dos marcadores da bioenergética celular. Após o cultivo das células HepG2 na densidade de aproximadamente 1×10^5 células/mL, as mesmas foram expostas às diferentes concentrações de ametrina e clomazona, tanto isoladamente quanto em associação, nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 μ M, por 24 e 48 horas. Ao final dos períodos de exposição, as células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS), submetidas à digestão enzimática com tripsina e, posteriormente, incubadas com tetrametilrodamina metil éster (TMRM) na concentração de 6,6 μ M, a 37 °C por 30 minutos, conforme metodologia adaptada de Imberti *et al.* (1993).

Após essa etapa, as amostras celulares foram lisadas com solução de Triton X-100 a 0,1% (v/v), permitindo a liberação da TMRM previamente acumulada nas mitocôndrias. A fluorescência correspondente ao corante foi mensurada por meio de espectrofluorímetro RFPC 5301 (Shimadzu, Tóquio, Japão), com excitação em 485 nm e emissão em 590 nm. Os dados de fluorescência foram expressos em porcentagem relativa ao grupo controle (DMSO), refletindo a variação do potencial mitocondrial frente à exposição aos herbicidas.

Princípio: Esse ensaio baseia-se na detecção de variações na fluorescência emitida pelo corante tetrametil rodamina metil éster (TMRM), uma molécula catiônica e lipofílica que atravessa facilmente a membrana celular e se acumula de forma seletiva nas mitocôndrias funcionais. Esse acúmulo é diretamente proporcional ao potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), de modo que níveis elevados de polarização mitocondrial resultam em maior intensidade de fluorescência registrada (Imberti *et al.*, 1993).

5.3.4 Ensaio de quantificação da massa mitocondrial com MitoTracker™ Green (MTG)

A quantificação da massa mitocondrial foi realizada utilizando o corante fluorescente MitoTracker™ Green FM (MTG) (Invitrogen), para a realização do ensaio, as células HepG2 foram plaqueadas em densidade de 1×10^5 células/mL em placas de 24 poços, por 24 horas. Após esse período, o meio foi substituído por novo meio contendo os tratamentos com ametrina, clomazona, isoladas e combinadas, nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 μ M, com três repetições para cada condição experimental.

Após os tempos estabelecidos de exposição (24 h e 48 h), o meio de cultura foi coletado em tubos Falcon de 15 mL devidamente identificados. As células foram lavadas com 1 mL de PBS (não estéril), tripsinizadas com 500 μ L de tripsina por 6 minutos a 37 °C, e a reação foi interrompida com a adição do meio recolhido anteriormente. As suspensões celulares foram então centrifugadas a 1500 rpm por 6 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado, e as células foram lavadas com meio completo sem vermelho de fenol, seguidas por nova centrifugação sob as mesmas condições.

As células foram então ressuspensas em 999,3 μ L de meio sem vermelho de fenol contendo 0,7 μ L de solução estoque de MTG (74,4 μ M em DMSO), obtendo uma concentração final de 50 nmol/L. A mistura foi incubada por 30 minutos a 37 °C, protegida da luz. Após o período de incubação, a fluorescência foi quantificada utilizando leitor de placas com excitação em 490 nm e emissão em 516 nm. Os valores obtidos foram expressos em porcentagem relativa à fluorescência do grupo controle (DMSO).

Princípio: O ensaio de quantificação da massa mitocondrial com o corante MitoTracker™ Green (MTG) baseia-se na capacidade desse corante fluorescente de se ligar especificamente aos lipídios presentes na membrana das mitocôndrias de células vivas. Ao penetrar nas células, o MTG se acumula nas mitocôndrias de forma proporcional à quantidade total dessas organelas, refletindo, assim, a massa mitocondrial presente. A intensidade da fluorescência emitida pelo corante, medida por meio de técnicas de fluorescência, permite a avaliação quantitativa da massa mitocondrial, possibilitando o monitoramento de variações relacionadas ao número,

tamanho ou integridade das mitocôndrias em resposta a diferentes condições experimentais. Dessa forma, o MTG é uma ferramenta eficiente e sensível para investigar alterações na biogênese e morfologia mitocondrial em estudos celulares.

5.3.5 Ensaio de quantificação da atividade mitocondrial com MitoTracker™ Orange (MTO)

A atividade mitocondrial foi avaliada por meio da coloração com a sonda fluorescente M7511 – MitoTracker Laranja CM-H₂TMRos (554/576 nm) (Invitrogen), para o experimento, as células HepG2 foram semeadas em placas de 24 poços na concentração de 1×10^5 células/mL em meio de cultura completo e incubadas a 37 °C com 5% de CO₂ por 24 horas, garantindo adequada adesão celular. Em seguida, o meio foi substituído e os tratamentos com ametrina, clomazona, isoladas e associadas, foram aplicados nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 µM, em triplicata para cada condição. Como controle positivo de inibição mitocondrial, utilizou-se oligomicina a 15 µM.

Após 24 e 48 horas de exposição, as células foram coletadas conforme protocolo: o meio de cultura foi transferido para tubos Falcon de 15 mL previamente identificados; as células foram lavadas com 1 mL de PBS (não estéril), tripsinizadas com 500 µL de tripsina por 6 minutos a 37 °C e a ação da tripsina foi inativada pela adição do meio previamente coletado. A suspensão celular foi centrifugada a 1500 rpm por 6 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado, as células lavadas com meio completo sem vermelho de fenol, centrifugadas novamente e ressuspensas em 997,9 µL de meio completo sem vermelho de fenol acrescido de 2,1 µL da solução de MTO (11,7 µM em DMSO), totalizando concentração final de 25 nmol/L. As amostras foram incubadas à 37 °C por 30 minutos, protegidas da luz.

Posteriormente, a fluorescência das células foi medida em espectrofluorímetro com excitação a 554 nm e emissão a 576 nm. Os valores de fluorescência obtidos foram expressos como porcentagem em relação ao grupo controle (DMSO), refletindo alterações na atividade mitocondrial induzidas pelos tratamentos.

Princípio: O ensaio de quantificação da atividade mitocondrial com o corante MitoTracker Laranja CM-H₂TMRos (MTO) baseia-se na capacidade desse corante fluorescente de se acumular preferencialmente nas mitocôndrias ativas que

apresentam potencial de membrana mitocondrial intacto. Diferentemente de sondas que marcam a massa mitocondrial total, o MTO é um marcador sensível à funcionalidade mitocondrial, pois sua captação depende do estado eletroquímico da membrana mitocondrial. Assim, a intensidade da fluorescência vermelha emitida pelo corante está diretamente relacionada à atividade metabólica das mitocôndrias, permitindo a avaliação da saúde e função mitocondrial em células vivas por meio de técnicas fluorométricas.

5.3.6 Ensaio de determinação dos níveis intracelulares de ATP

Para quantificar os níveis de ATP nas células HepG2, foi utilizado o sistema luciferina-luciferase, que consome ATP para emitir luz, por meio do kit comercial ATP Bioluminescent Assay Kit (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), conforme orientações do fabricante. Aproximadamente 1×10^5 células HepG2 foram cultivadas em placas de 24 poços e expostas a diferentes concentrações dos herbicidas ametrina e clomazona, isolados e associados, nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 μM , por períodos de 24 e 48 horas. Ao término do tratamento, as culturas foram lavadas com PBS, tripsinizadas e centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram submetidas à extração com 1 mL de ácido perclórico (HClO_4) 1 M mantido a 4 °C. A mistura foi centrifugada a $2000 \times g$ por 10 minutos em temperatura refrigerada, e uma alíquota de 100 μL do sobrenadante foi coletada para neutralização com solução de KOH 2 M e Tris-HCl 100 mM, pH 7,8, totalizando 1 mL. Após nova neutralização, a amostra foi centrifugada a $15.000 \times g$ por 10 minutos, e 100 μL do sobrenadante clarificado foi utilizado para quantificação do ATP por bioluminescência, empregando um luminômetro Sirius I (Berthold Detection Systems, Pforzheim, Alemanha), seguindo as instruções do kit. Os resultados foram expressos em nmol de ATP por 10^6 células.

Princípio: O método é baseado no sistema enzimático luciferina-luciferase, onde a luciferase catalisa a oxidação da luciferina na presença de ATP, resultando na emissão de luz proporcional à quantidade de ATP presente na amostra. A intensidade da bioluminescência gerada pode ser medida por um luminômetro, permitindo uma quantificação altamente sensível e específica dos níveis de ATP (Buc-calderon; Frélin, 1994; Tomashevsky *et al.*, 2016).

5.3.7 Avaliação das alterações enzimáticas em células HepG2

Para investigar possíveis alterações nos níveis das enzimas hepáticas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP), células HepG2 (1×10^5 células/mL) foram expostas aos herbicidas, tanto de forma isolada quanto combinada, em diferentes concentrações (50, 100, 150 e 200 μM), durante os períodos de 24 e 48 horas. Após o tratamento, os sobrenadantes das culturas foram coletados para análise bioquímica.

As atividades das enzimas AST, ALT e ALP foram quantificadas por meio de kits colorimétricos comerciais específicos (Bioclin, Belo Horizonte, Brasil), conforme as instruções do fabricante. As reações enzimáticas foram monitoradas espectrofotometricamente, e os resultados foram expressos em unidades por litro (U/L).

A presença de alterações significativas nos níveis dessas enzimas pode indicar dano hepático funcional ou citotoxicidade, uma vez que tais biomarcadores são amplamente utilizados como indicadores de integridade celular e função metabólica hepática (Wang et al., 2021; Ozer et al., 2008). A AST e a ALT estão principalmente envolvidas no metabolismo de aminoácidos, sendo marcadores sensíveis para dano hepatocelular. Já a ALP está relacionada à função de membrana plasmática e alterações no metabolismo da bile.

Princípio: As enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP) são marcadores bioquímicos fundamentais liberados no meio extracelular quando ocorre dano na membrana plasmática ou alterações na função celular, principalmente em hepatócitos. O princípio do ensaio consiste na quantificação da atividade dessas enzimas no sobrenadante do meio de cultura, após exposição das células a substâncias potencialmente tóxicas, utilizando kits colorimétricos comerciais. A intensidade da reação enzimática, geralmente baseada na conversão de substratos específicos em produtos detectáveis por espectrofotometria, reflete o grau de dano celular.

5.4 Microfotografias Fluorescentes relacionadas ao Potencial de Membrana Mitocondrial (TMRM), Massa Mitocondrial (MTG) e Atividade Mitocondrial (MTO)

1 × 10⁵ células/mL foram cultivadas em lamínulas e expostas os herbicidas ametrina e clomazona, isolados ou combinados, por 24 e 48h. Após o tempo de incubação as células foram lavadas com PBS e posteriormente, incubadas com TMRM 6,6 µM, MTG 50 nmol/L ou MTO 25 nmol/L à 37 °C por 30 minutos. Após o período de incubação, as células foram lavadas com PBS e as lamínulas transferidas para as respectivas lâminas. As microfotografias foram registradas com o auxílio do microscópio Nexcope NE700 com fluorescência Prime Life Science MF-BGU-LED-N e câmera Tucsen FL20BW utilizando o filtro azul para MTG e verde para MTO e TMRM, no aumento de 40x. As imagens foram adquiridas com o software Software Mosaic 3.0.

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos foram conduzidos com pelo menos 3 repetições biológicas de cada modelo experimental. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), obtidos a partir de três experimentos independentes.

Para as análises em que os tratamentos foram comparados exclusivamente ao grupo controle negativo (DMSO 0,1% v/v), foi aplicada análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Dunnett, considerando a média do controle como referência. As diferenças estatisticamente significativas foram indicadas por asterisco (*), adotando-se nível de significância de $p < 0,05$.

Para as análises comparativas entre todos os grupos experimentais, incluindo os tratamentos isolados e a associação (AMT + CLZ), foi utilizada análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey para comparações múltiplas. Nessas análises, as diferenças estatisticamente significativas foram indicadas pelo símbolo jogo da velha (#), considerando $p < 0,05$.

As análises estatísticas foram realizadas separadamente para os períodos de 24 h e 48 h de exposição, utilizando o software GraphPad Prism (versão 5.0, GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

7 RESULTADOS

7.1 Ensaios de Citotoxicidade:

7.1.1 Efeito da ametrina e clomazona na proliferação celular de células HepG2

A proliferação das células HepG2 foi avaliada por meio da quantificação da proteína celular total, utilizando o ensaio com o corante Sulforodamina B (SRB), que permite estimar indiretamente o número de células viáveis aderidas ao substrato. A redução na quantidade de proteína está relacionada à inibição da proliferação celular ou à perda de viabilidade. As células foram expostas às substâncias AMT e CLZ, de forma isolada e combinada, nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 μM , pelos períodos de 24 e 48 horas. Os resultados representam a média de três repetições experimentais independentes.

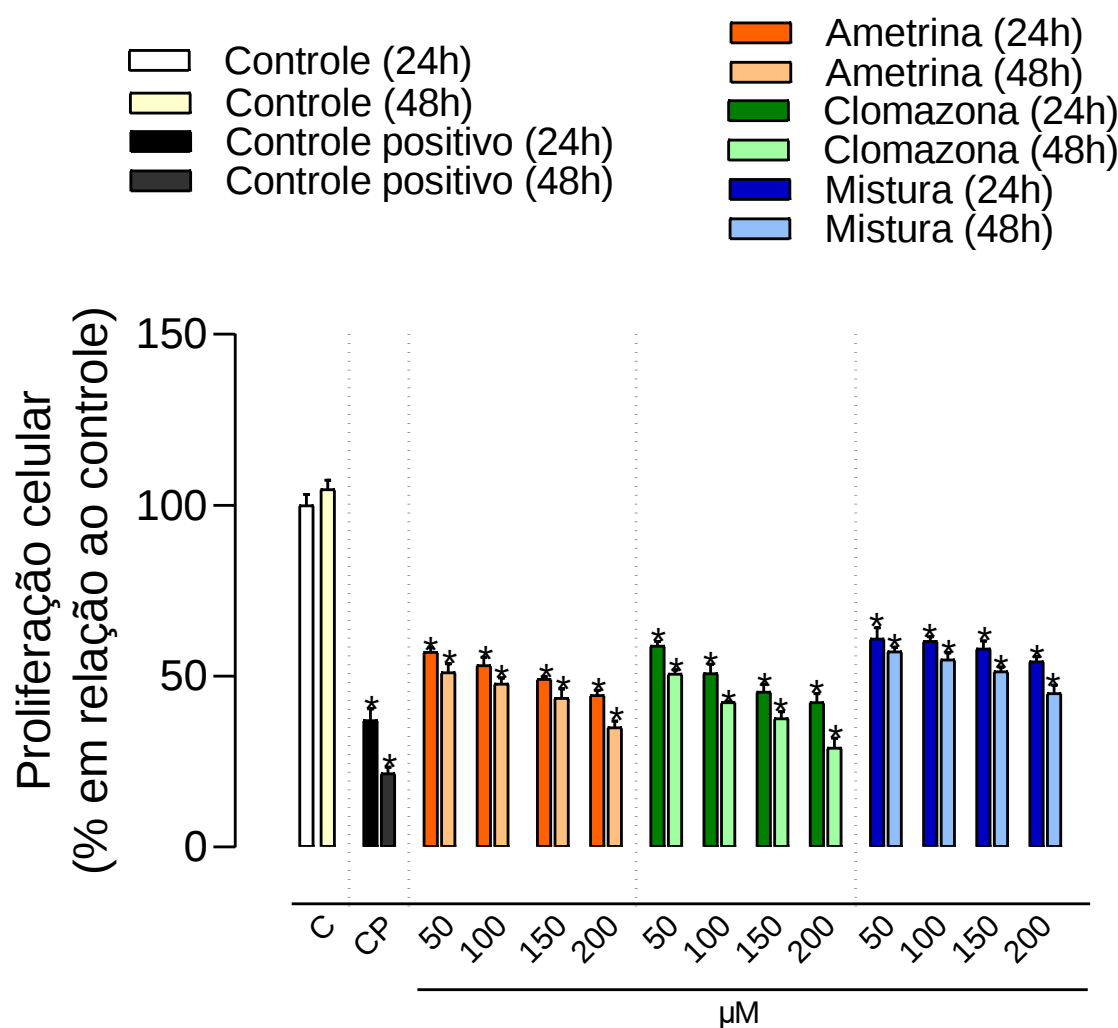
Após 24 horas de exposição, observou-se redução significativa da proliferação celular em todos os tratamentos em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), evidenciando efeito citotóxico dos herbicidas. De modo geral, verificou-se uma tendência de resposta dependente da dose, com maior inibição da proliferação à medida que aumentaram as concentrações. No entanto, os tratamentos com a associação de ametrina (AMT) e clomazona (CLZ) apresentaram menor impacto sobre a proliferação celular quando comparados às exposições isoladas, sugerindo um possível efeito antagonista entre os compostos. A clomazona isolada promoveu maior inibição nas concentrações mais elevadas, enquanto a ametrina apresentou efeito mais moderado no mesmo período de exposição.

Após 48 horas, o efeito inibitório foi ainda mais pronunciado. A associação dos dois herbicidas levou a uma redução acentuada na proliferação. Tanto a ametrina quanto a clomazona, mesmo de forma isolada, causaram reduções significativas na densidade celular nas concentrações de 100 μM em diante, reforçando a influência do tempo de exposição sobre a toxicidade.

Esses resultados indicam que a exposição às substâncias testadas compromete significativamente a proliferação das células HepG2 de forma dose- e tempo-dependente, sendo a associação entre ametrina e clomazona a que apresentou maior potencial citotóxico nesse modelo experimental.

FIGURA 6 - Proliferação celular de células HepG2 após exposição à AMT, CLZ e associação (AMT + CLZ) após 24h e 48h, avaliada pelo ensaio de sulforodamina B (SRB). Os dados são expressos como média $\pm$ EPM obtidos a partir de três experimentos independentes realizados com diferentes populações de células.

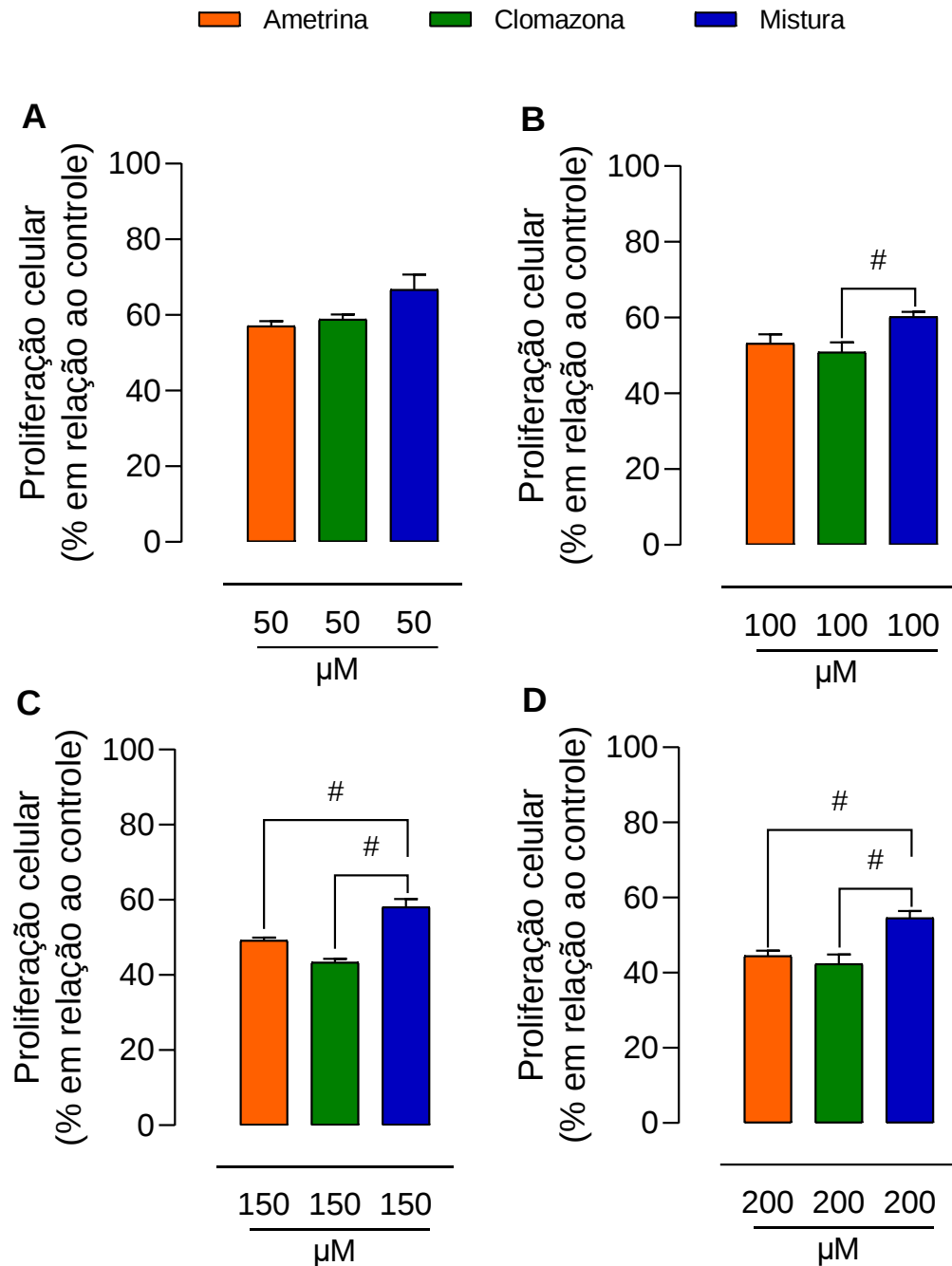
*Estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). C = controle, apenas 0,1% de DMSO; CP = controle positivo com adição T-butil 100 μ M.



Fonte: Elaborado pela autora.

FIGURA 7 - Comparação entre os efeitos da ametrina, clomazona e a mistura dos dois herbicidas sobre a Proliferação celular nas células HepG2 expostas por 24 horas.

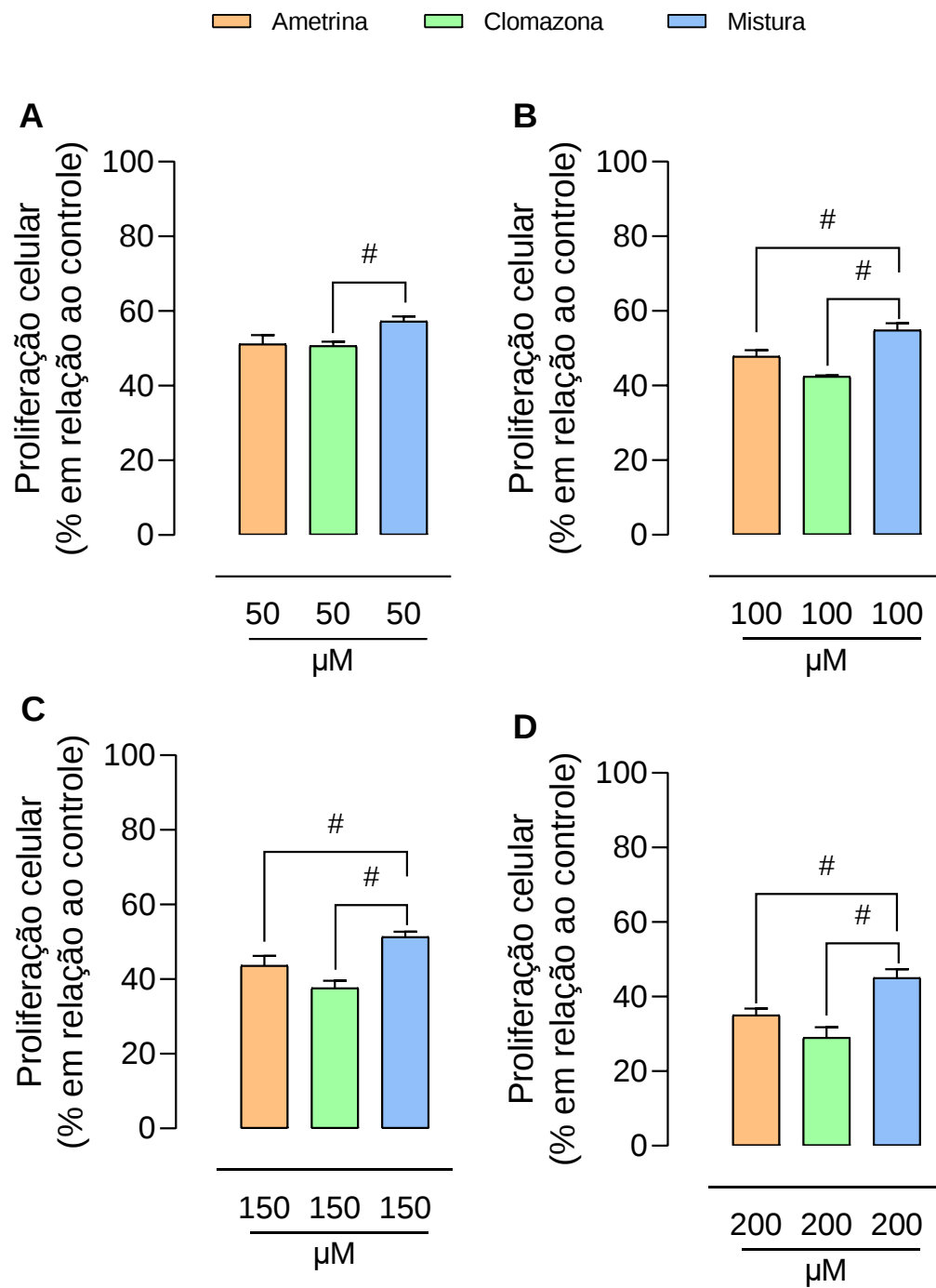
#Estatisticamente significativo em relação a mistura dos herbicidas ($p < 0,05$).



Fonte: Elaborado pela autora.

FIGURA 8 - Comparação entre os efeitos da ametrina, clomazona e a mistura dos dois herbicidas sobre a Proliferação celular nas células HepG2 expostas por 48 horas.

#Estatisticamente significativo em relação a mistura dos herbicidas ($p < 0,05$).



Fonte: Elaborado pela autora.

7.1.2 Atividade metabólica celular avaliada pelo ensaio de MTT

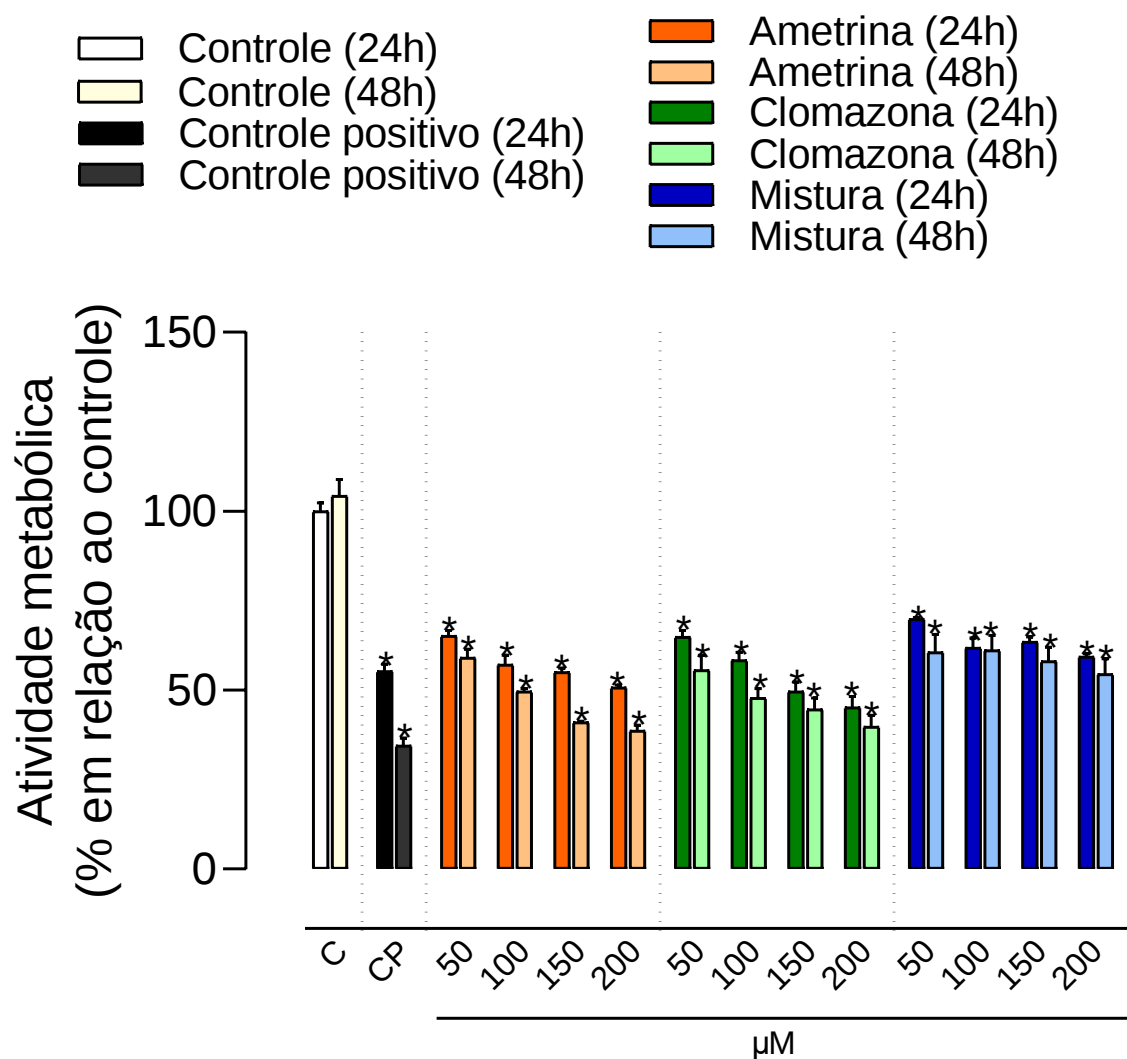
O ensaio de MTT é uma técnica bastante utilizada para estimar a viabilidade e a atividade metabólica das células em cultura. Esse método se baseia na capacidade das mitocôndrias das células vivas de reduzir o corante MTT, um sal de tetrazólio de coloração amarela, transformando-o em formazan, um composto insolúvel de cor roxa. Essa conversão ocorre por meio de enzimas ativas no metabolismo celular, especialmente na cadeia respiratória mitocondrial. Apenas as células metabolicamente íntegras conseguem promover essa reação, o que torna o teste um marcador confiável de viabilidade. O acúmulo de formazan é diretamente relacionado ao número de células viáveis na amostra. Após a formação dos cristais, estes são solubilizados com um reagente apropriado (como o DMSO) e sua absorbância é mensurada por espectrofotometria, permitindo a quantificação. Assim, valores elevados de absorbância indicam maior número de células vivas, enquanto níveis reduzidos de formazan apontam para comprometimento celular, seja por morte celular ou inibição metabólica causada por substâncias testadas.

As células foram tratadas com ametrina (AMT), clomazona (CLZ) e a associação (AMT + CLZ) nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 μM , e incubadas por 24 e 48 horas, com três repetições para cada condição experimental.

Após 24 horas, observou-se uma redução significativa na atividade metabólica nas concentrações mais altas, principalmente no grupo tratado com a associação dos herbicidas, que apresentou queda acentuada na conversão de MTT a partir de 150 μM . A clomazona isolada também reduziu a atividade mitocondrial de forma dose-dependente, enquanto a ametrina isolada teve efeito mais leve nas mesmas condições.

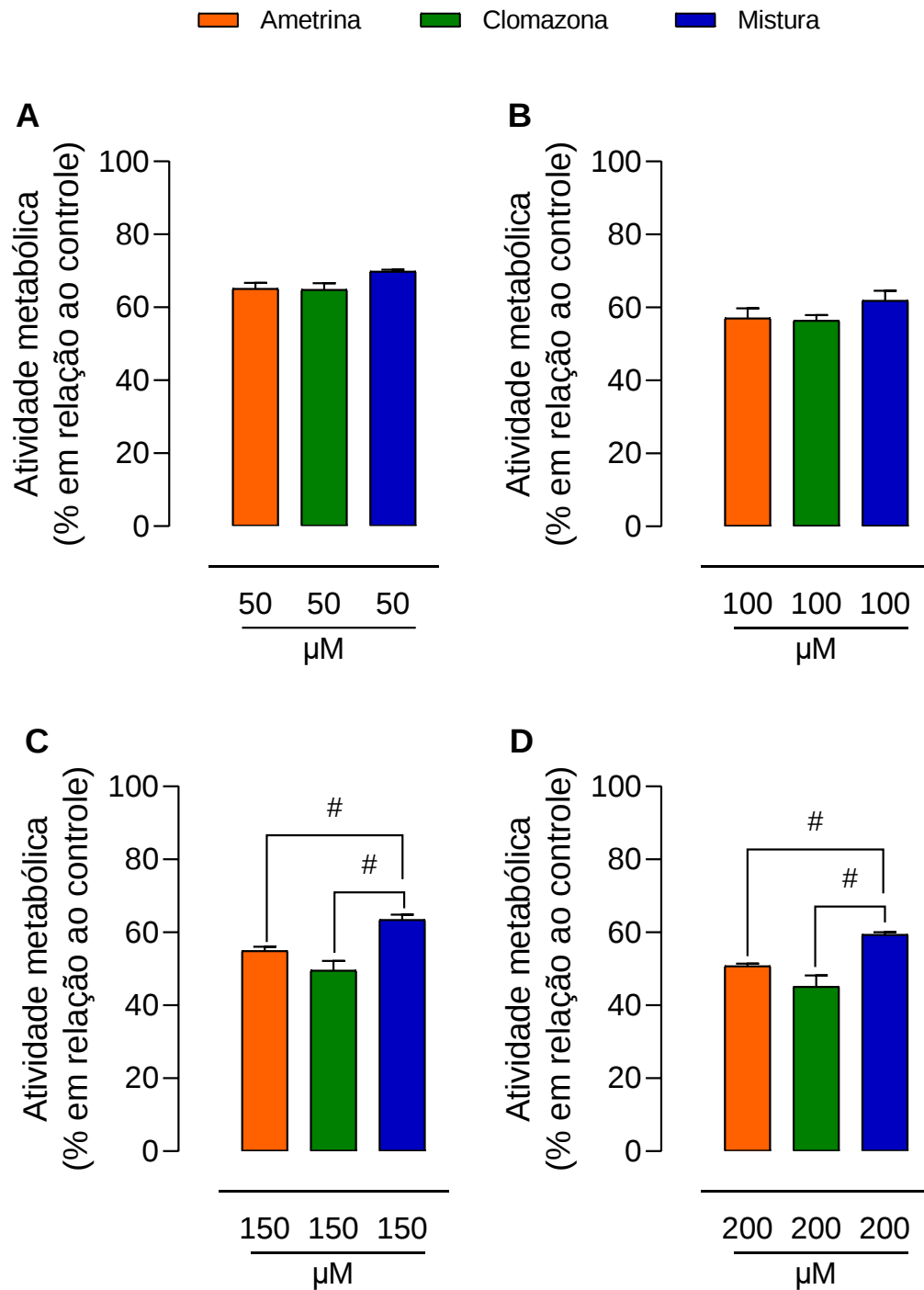
Após 48 horas de exposição, os efeitos citotóxicos tornaram-se mais evidentes. A associação entre AMT + CLZ causou reduções significativas de viabilidade celular em todas as concentrações, com destaque para as doses de 150 e 200 μM . Esses achados indicam uma ação sinérgica entre os dois herbicidas, intensificando os efeitos deletérios sobre a função mitocondrial. A queda na atividade do MTT demonstra que a exposição prolongada compromete seriamente a viabilidade celular, de maneira tempo- e dose-dependente.

Figura 9 – Atividade metabólica de células HepG2 após exposição à AMT, CLZ e associação (AMT + CLZ) após 24h e 48h. Os dados são expressos como média $\pm$ EPM obtidos a partir de três experimentos independentes realizados com diferentes populações de células. *Estatisticamente significativo em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). C = controle, apenas 0,1% de DMSO; CP = controle positivo com adição CCCP 10 μ M.



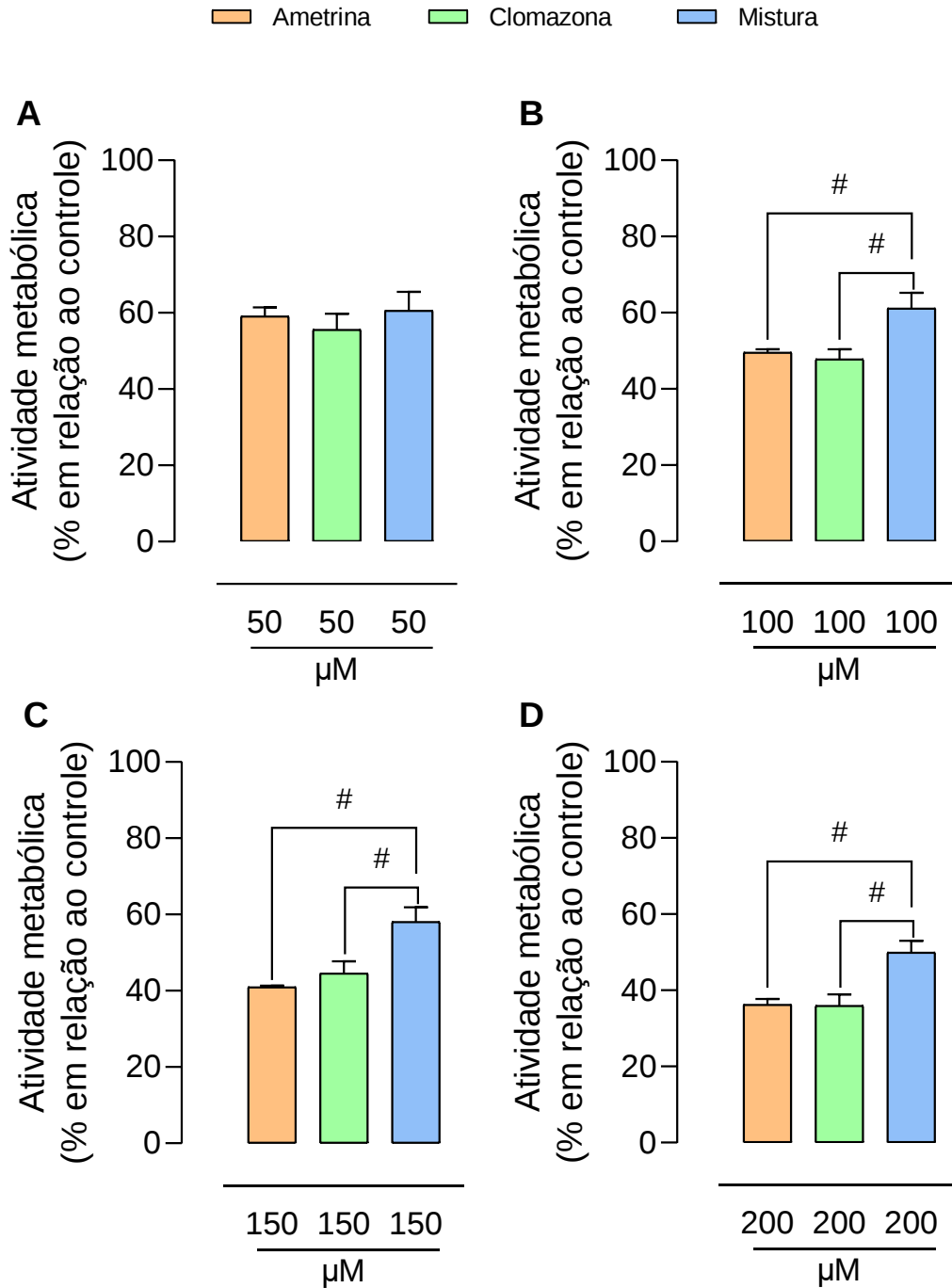
Fonte: Elaborado pela autora.

FIGURA 10 - Comparação entre os efeitos da ametrina, clomazona e a mistura dos dois herbicidas sobre a Atividade metabólica nas células HepG2 expostas por 24 horas. #Estatisticamente significativo em relação a mistura dos herbicidas ($p < 0,05$).



Fonte: Elaborado pela autora.

FIGURA 11 - Comparação entre os efeitos da ametrina, clomazona e a mistura dos dois herbicidas sobre a Atividade metabólica nas células HepG2 expostas por 48 horas. #Estatisticamente significativo em relação a mistura dos herbicidas ($p < 0,05$).



Fonte: Elaborado pela autora.

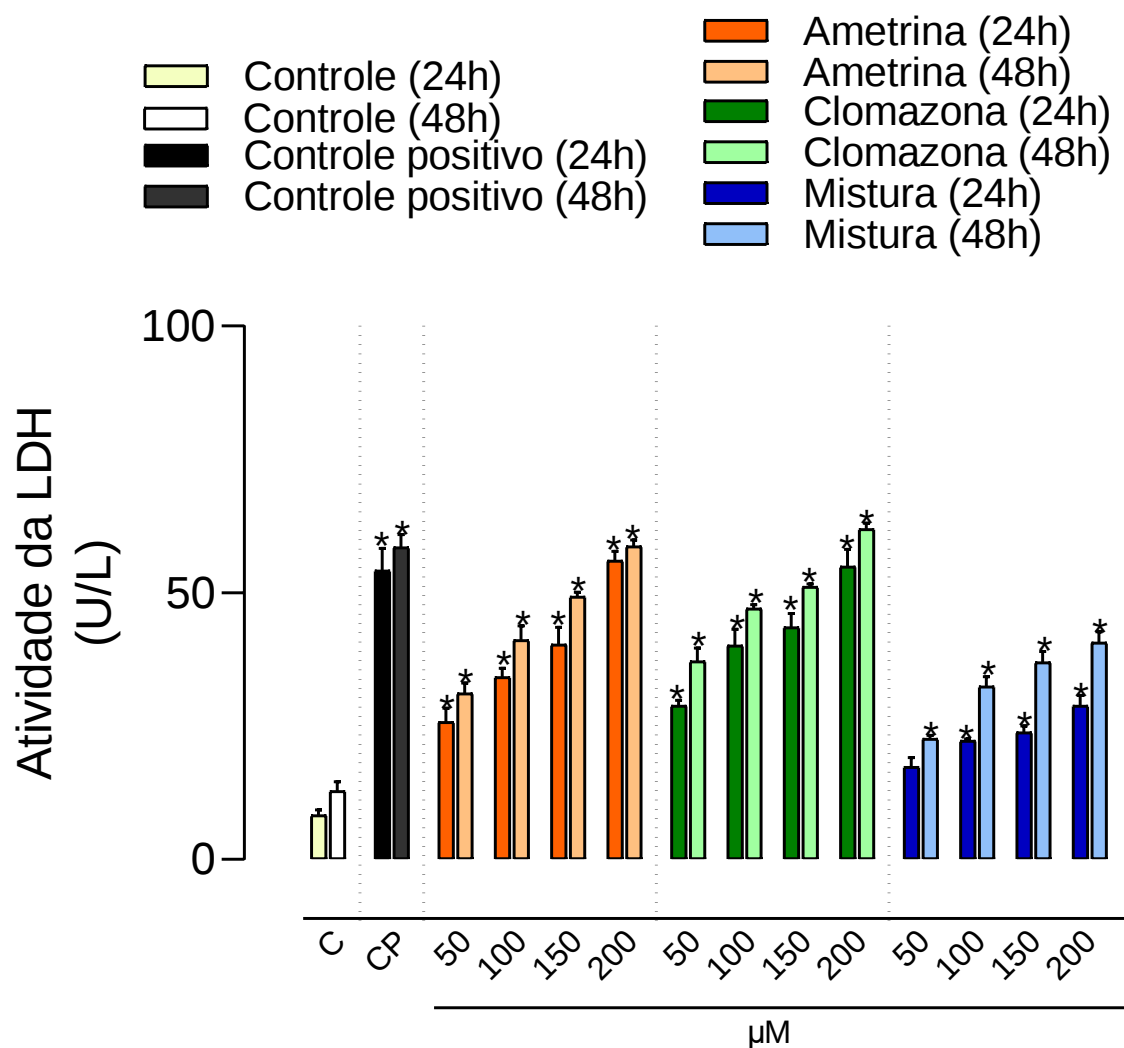
7.1.3 Atividade da lactato desidrogenase (LDH) como indicador de dano celular

A integridade da membrana plasmática das células HepG2 foi avaliada por meio da liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) no meio de cultura após exposição aos herbicidas ametrina (AMT) e clomazona (CLZ), aplicados isoladamente e em combinação, nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 μM , durante 24 e 48 horas. A liberação extracelular da LDH é um marcador confiável de citotoxicidade e lesão de membrana, uma vez que sua presença no meio extracelular indica comprometimento da estrutura celular.

Após 24 horas de exposição, observou-se um aumento discreto e dose-dependente da atividade de LDH nos grupos tratados, principalmente nas amostras expostas à clomazona isolada e à associação entre AMT + CLZ, nas doses de 150 e 200 μM , embora nem todos os aumentos tenham sido estatisticamente significativos em relação ao grupo controle. A ametrina isolada apresentou efeitos mais sutis nesse intervalo de tempo.

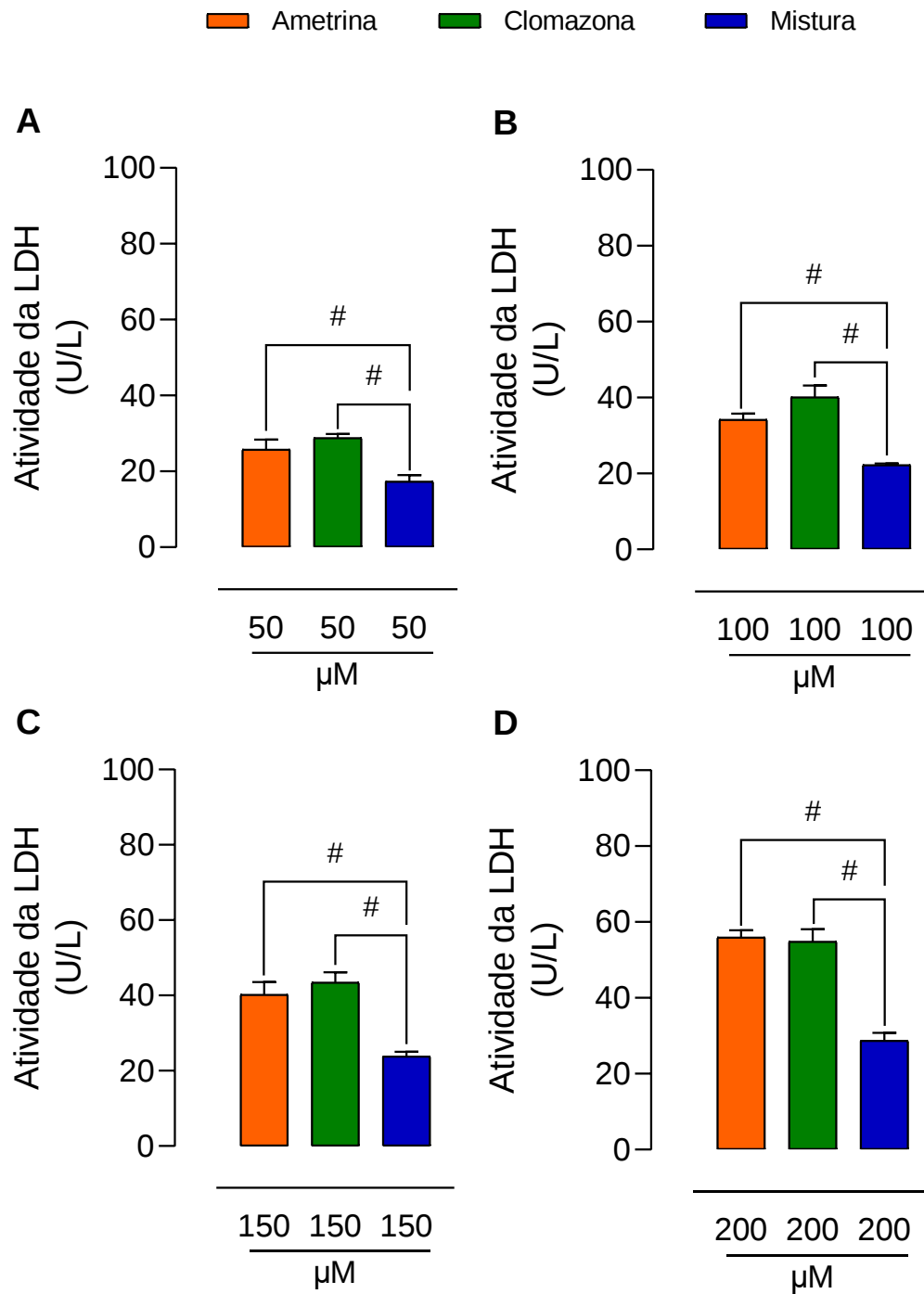
Com 48 horas de exposição, o perfil de liberação de LDH tornou-se mais acentuado, especialmente nas amostras tratadas com a combinação dos herbicidas, que mostraram aumento significativo da atividade de LDH nas doses de 100 μM em diante. Esse padrão sugere que a associação entre AMT e CLZ promove maior dano à membrana celular do que as substâncias isoladas, indicando possível efeito sinérgico na citotoxicidade. Os resultados demonstram uma resposta tempo- e dose-dependente, com os níveis mais elevados de LDH liberada observados na condição combinada de 200 μM após 48 horas.

FIGURA 12 - Atividade de LDH em HepG2 após exposição à AMT, CLZ e associação (AMT + CLZ) após 24h e 48h. Os dados são expressos como média $\pm$ EPM obtidos a partir de três experimentos independentes realizados com diferentes populações de células. *Estatisticamente significativo em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). C = controle, apenas 0,1% de DMSO; CP = controle positivo com adição Triton x-100 0,2%.



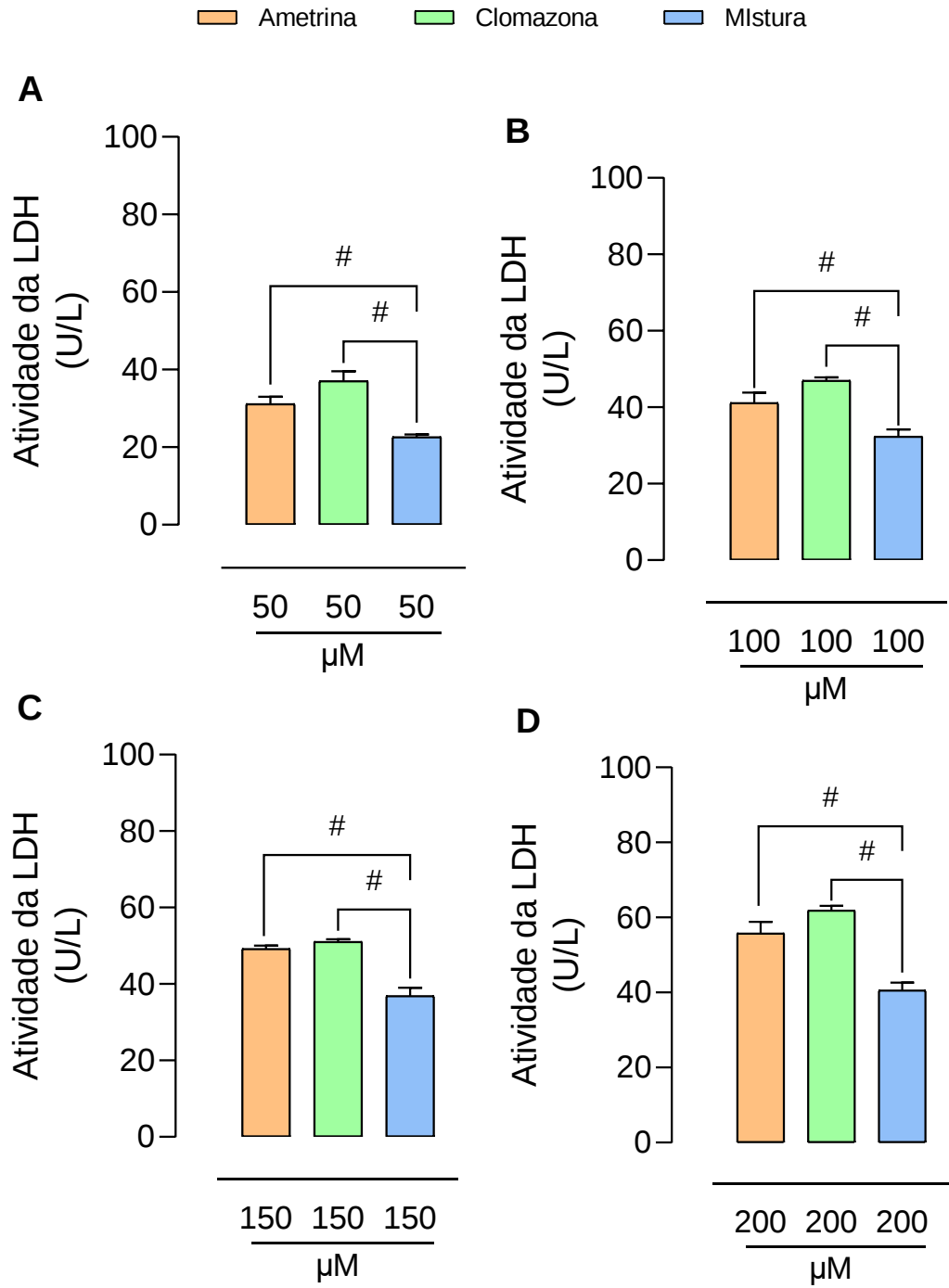
Fonte: Elaborado pela autora.

FIGURA 13 - Comparação entre os efeitos da ametrina, clomazona e a mistura dos dois herbicidas sobre a Atividade de LDH extracelular nas células HepG2 expostas por 24 horas. #Estatisticamente significativo em relação a mistura dos herbicidas ($p < 0,05$).



Fonte: Elaborado pela autora.

FIGURA 14 - Comparação entre os efeitos da ametrina, clomazona e a mistura dos dois herbicidas sobre a Atividade de LDH extracelular nas células HepG2 expostas por 48 horas. #Estatisticamente significativo em relação a mistura dos herbicidas (p<0,05).



Fonte: Elaborado pela autora.

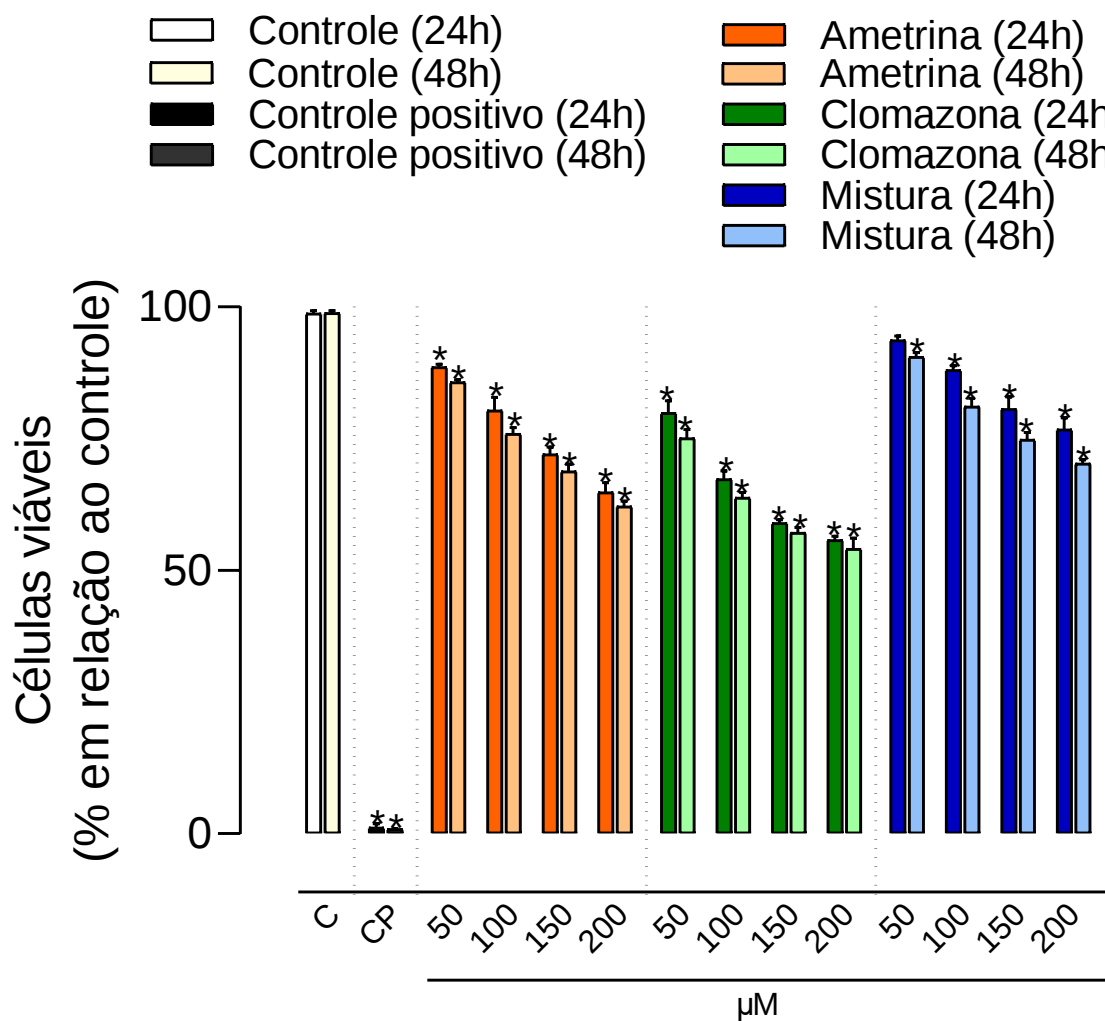
7.1.4 Viabilidade celular avaliada pelo ensaio de exclusão de azul de tripan

A viabilidade celular das células HepG2 foi analisada utilizando o ensaio de exclusão de azul de tripan, um método clássico baseado na integridade da membrana celular. Células viáveis, com membranas íntegras, são capazes de excluir o corante, permanecendo incolores, enquanto células mortas ou com membranas danificadas absorvem o azul, adquirindo coloração visível ao microscópio. As células foram expostas aos herbicidas ametrina (AMT), clomazona (CLZ) e à combinação de ambos, nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 μM , por 24 e 48 horas, com três repetições para cada condição experimental.

Após 24 horas de exposição, observou-se uma redução moderada na viabilidade celular, especialmente nos grupos tratados com clomazona isolada e com a associação AMT + CLZ, nas concentrações de 150 e 200 μM , indicando aumento na proporção de células coradas, ou seja, inviáveis. A ametrina isolada, por sua vez, apresentou menor impacto sobre a integridade celular nesse mesmo período.

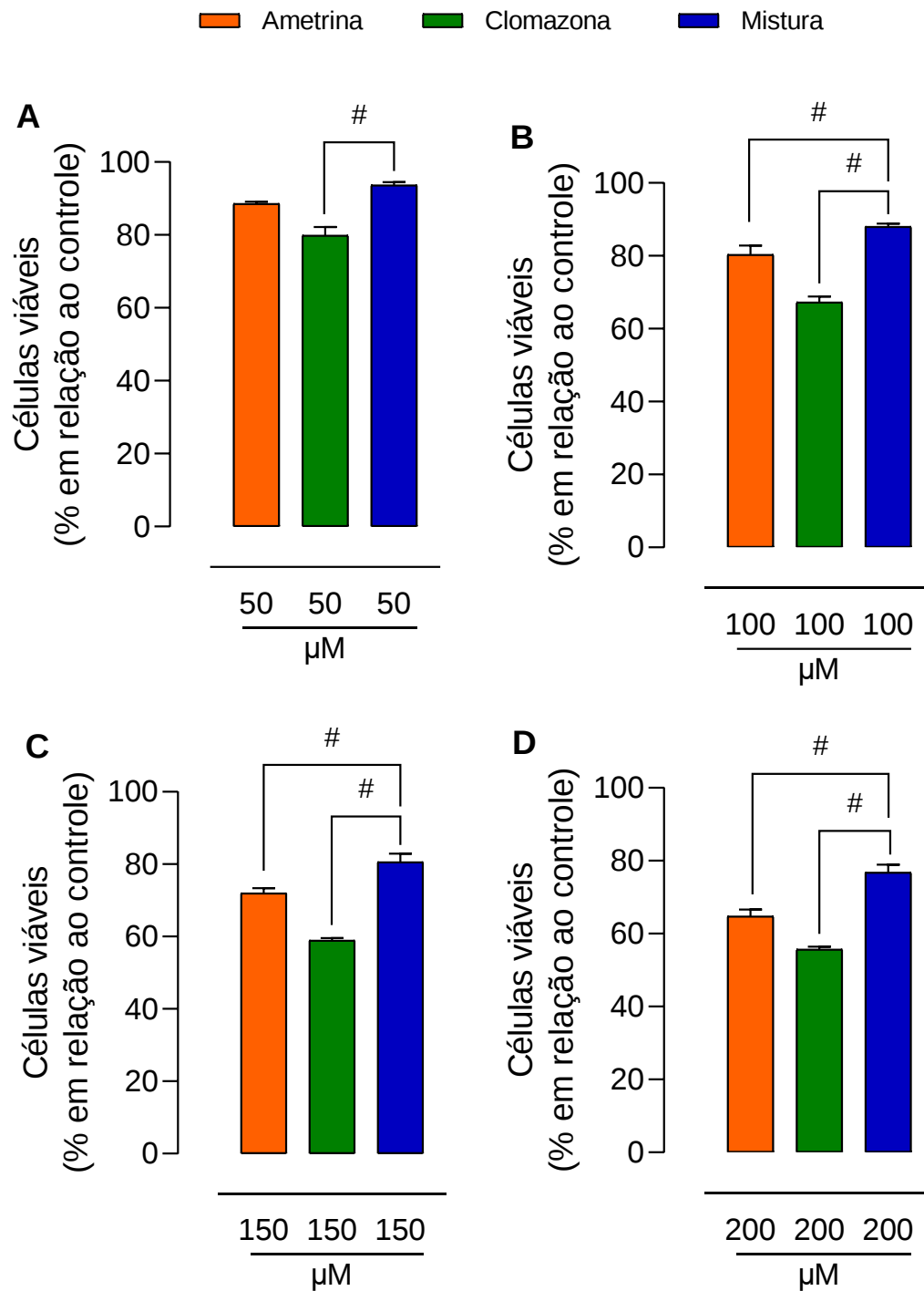
No entanto, após 48 horas, os efeitos citotóxicos foram mais expressivos. A associação dos herbicidas promoveu uma diminuição significativa na viabilidade celular em todas as concentrações testadas, com destaque para os grupos de 150 e 200 μM , que apresentaram a maior proporção de células coradas com azul de tripan. Esses resultados reforçam o efeito tempo- e dose-dependente da toxicidade induzida, além de indicar um possível efeito sinérgico quando os herbicidas são combinados.

FIGURA 15 - Células HepG2 viáveis após exposição à AMT, CLZ e à associação (AMT + CLZ) por 24 h e 48 h, avaliada pelo ensaio de exclusão do azul de tripan. Os dados são expressos como média $\pm$ EPM obtidos a partir de três experimentos independentes realizados com diferentes populações de células. *Estatisticamente significativo em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). C = controle, apenas 0,1% de DMSO; CP = controle positivo com adição Triton x-100 0,2%.



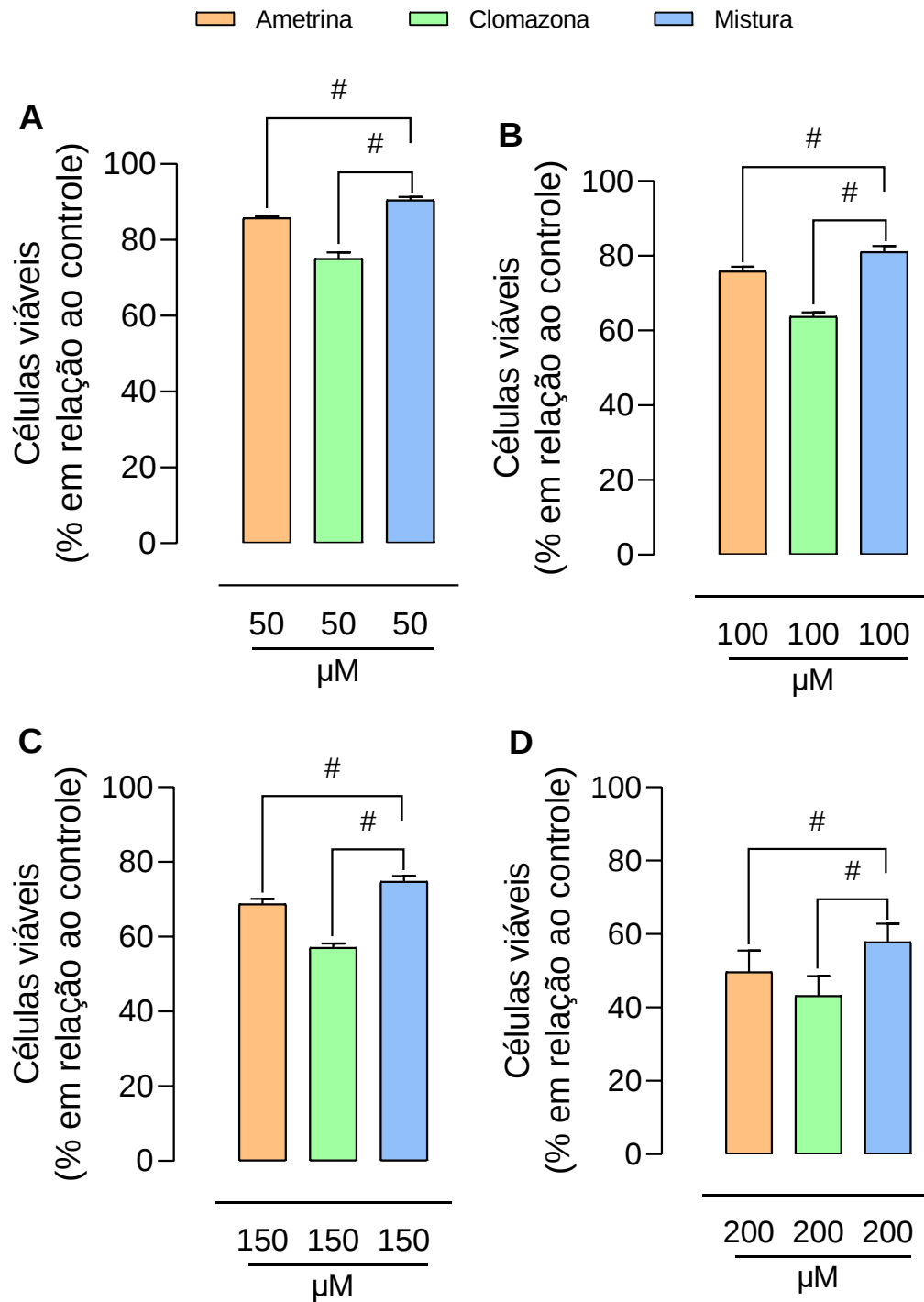
Fonte: Elaborado pela autora.

FIGURA 16 - Comparação entre os efeitos da ametrina, clomazona e a mistura dos dois herbicidas sobre as Células HepG2 viáveis, avaliada por exclusão do azul de tripan, após exposição por 24 horas. #Estatisticamente significativo em relação a mistura dos herbicidas ($p < 0,05$).



Fonte: Elaborado pela autora.

FIGURA 17 - Comparação entre os efeitos da ametrina, clomazona e a mistura dos dois herbicidas sobre as Células HepG2 viáveis, avaliada por exclusão do azul de tripan, após exposição por 48 horas. #Estatisticamente significativo em relação a mistura dos herbicidas ($p < 0,05$).



Fonte: Elaborado pela autora.

7.2 Ensaios de Atividade Mitocondrial

7.2.1 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) com TMRM

O potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) foi avaliado nas células HepG2 utilizando a sonda fluorescente TMRM (tetrametilrodamina metil éster), a qual se acumula seletivamente nas mitocôndrias de células com membranas mitocondriais polarizadas. Reduções na fluorescência do TMRM indicam despolarização mitocondrial, fenômeno associado a disfunções mitocondriais e processos iniciais de morte celular. As células foram expostas aos herbicidas ametrina (AMT), clomazona (CLZ) e à associação AMT + CLZ, nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 μM , por 24 e 48 horas, em triplicata.

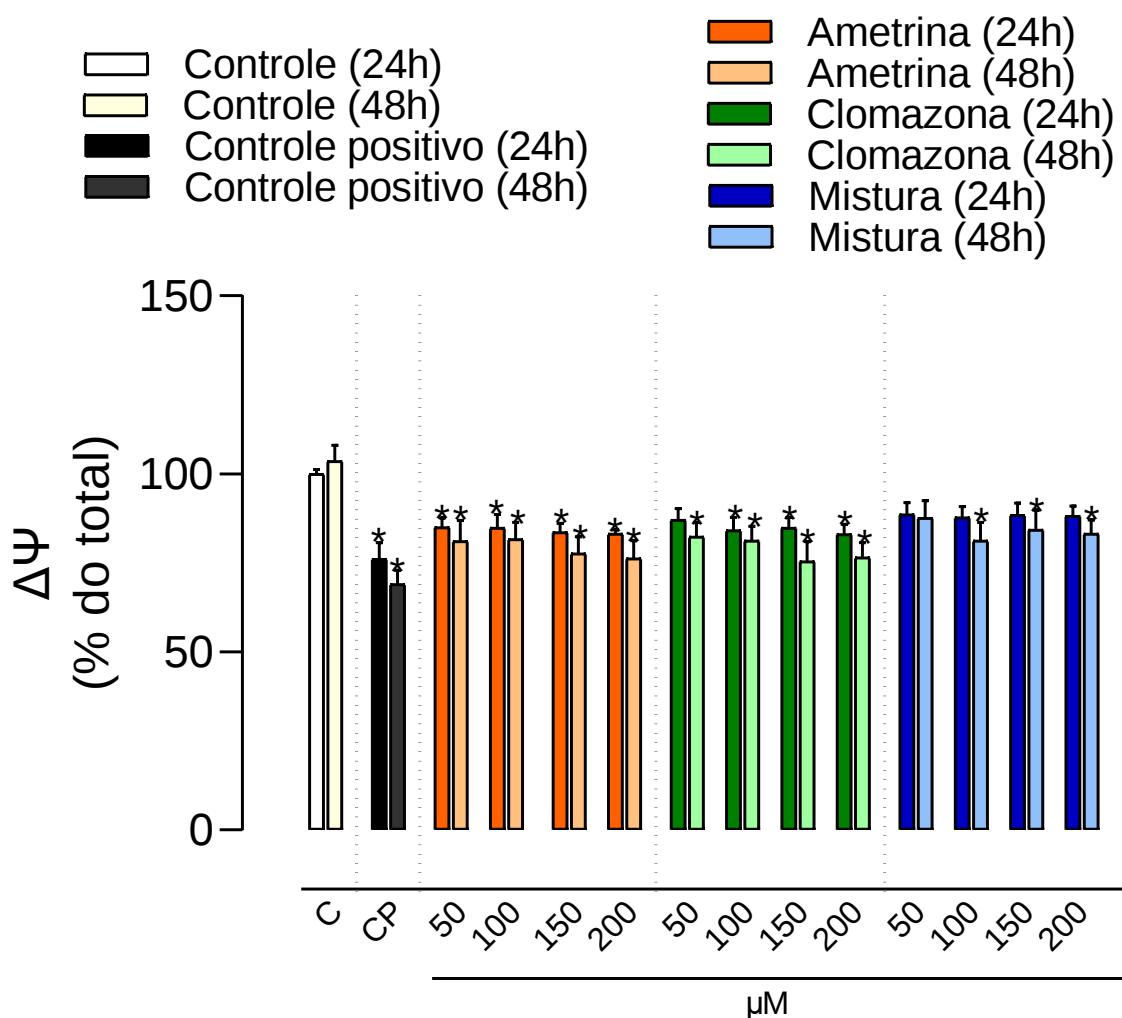
Tanto AMT quanto CLZ promoveram a redução do $\Delta\Psi_m$ em relação ao grupo controle, com efeitos significantes a partir de 50 μM (Figura 18). A mistura dos herbicidas reduziu o efeito em relação aos compostos isolados, sendo que não foram observados efeitos significantes em nenhuma concentração da mistura após 24 horas e no tempo 48 horas o efeito significativo só foi observado a partir de 100 μM .

A comparação entre os efeitos das substâncias isoladas com as correspondentes misturas não mostrou diferença estatística em nenhuma das concentrações e nenhum dos tempos de incubação (Figura 19 e Figura 20).

As imagens representativas de microscopia de fluorescência (Figura 21 e Figura 22) demonstram diferenças qualitativas claras no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) entre os grupos experimentais. No grupo controle, observa-se intensa fluorescência mitocondrial, distribuída de forma homogênea no citoplasma, compatível com mitocôndrias polarizadas e funcionalmente íntegras. Em contraste, as células expostas aos tratamentos com os herbicidas, isolados ou combinados, apresentam redução evidente da intensidade de fluorescência da TMRM, acompanhada por perda do padrão mitocondrial característico, indicando despolarização parcial ou completa da membrana mitocondrial interna. Esse efeito sugere comprometimento da bioenergética mitocondrial, possivelmente associado à disfunção da cadeia respiratória e à diminuição da capacidade de manutenção do gradiente eletroquímico de prótons. Portanto, as alterações qualitativas observadas nas Figuras 21 e 22 corroboram os dados quantitativos de fluorescência apresentados

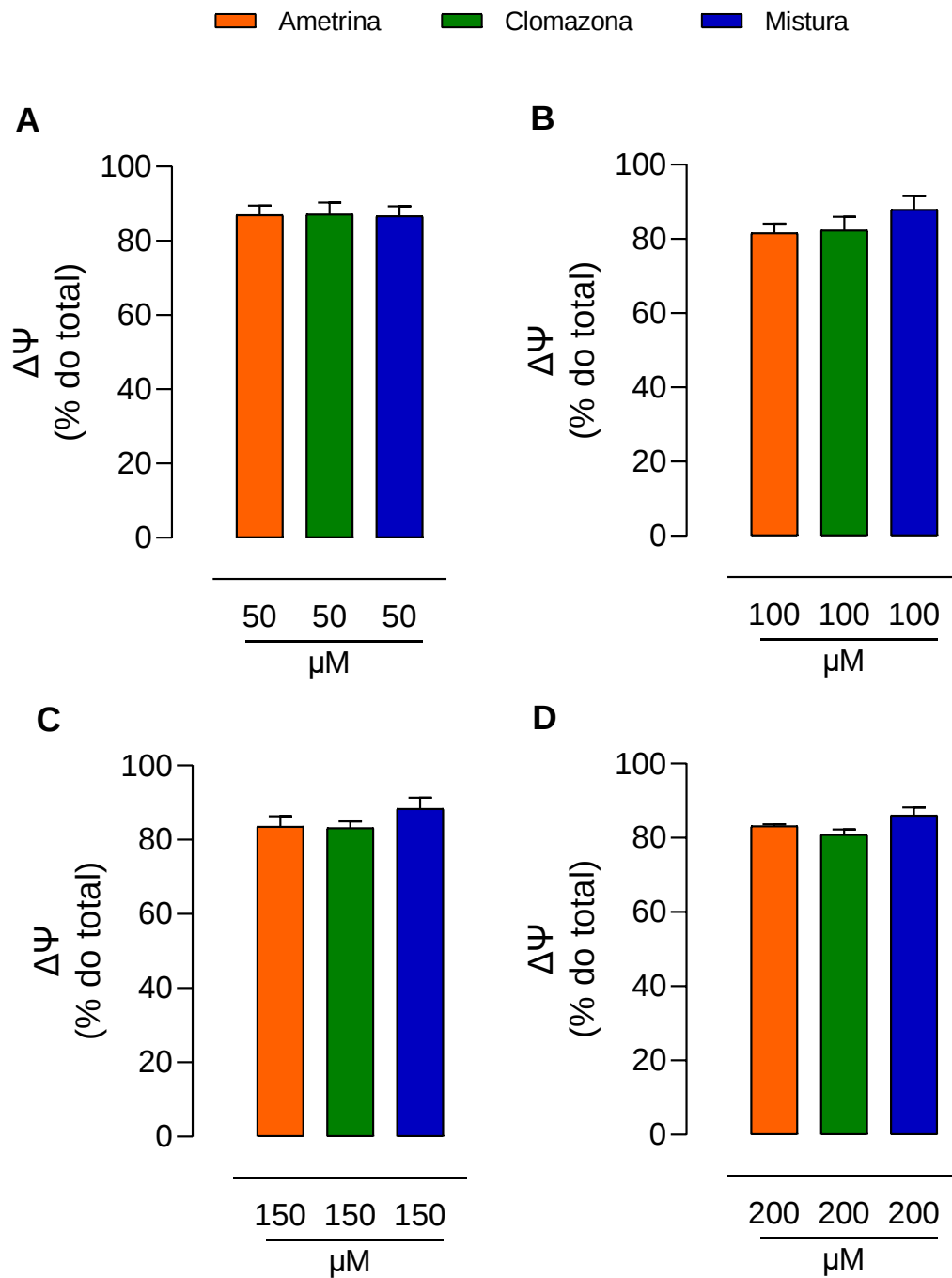
na Figura 18, reforçando a hipótese de que os herbicidas AMT e CLZ induzem toxicidade mitocondrial.

FIGURA 18 - Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) das células HepG2 expostas à ametrina, clomazona ou à mistura dos dois herbicidas por 24 e 48 horas. Os dados são expressos como média $\pm$ EPM obtidos a partir de três experimentos independentes realizados com diferentes populações de células. *Estatisticamente significativo em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). C = controle, apenas 0,1% de DMSO; CP = controle positivo com adição de CCCP (cianeto de carbonil m-clorofenil-hidrazona) 25 μ M.



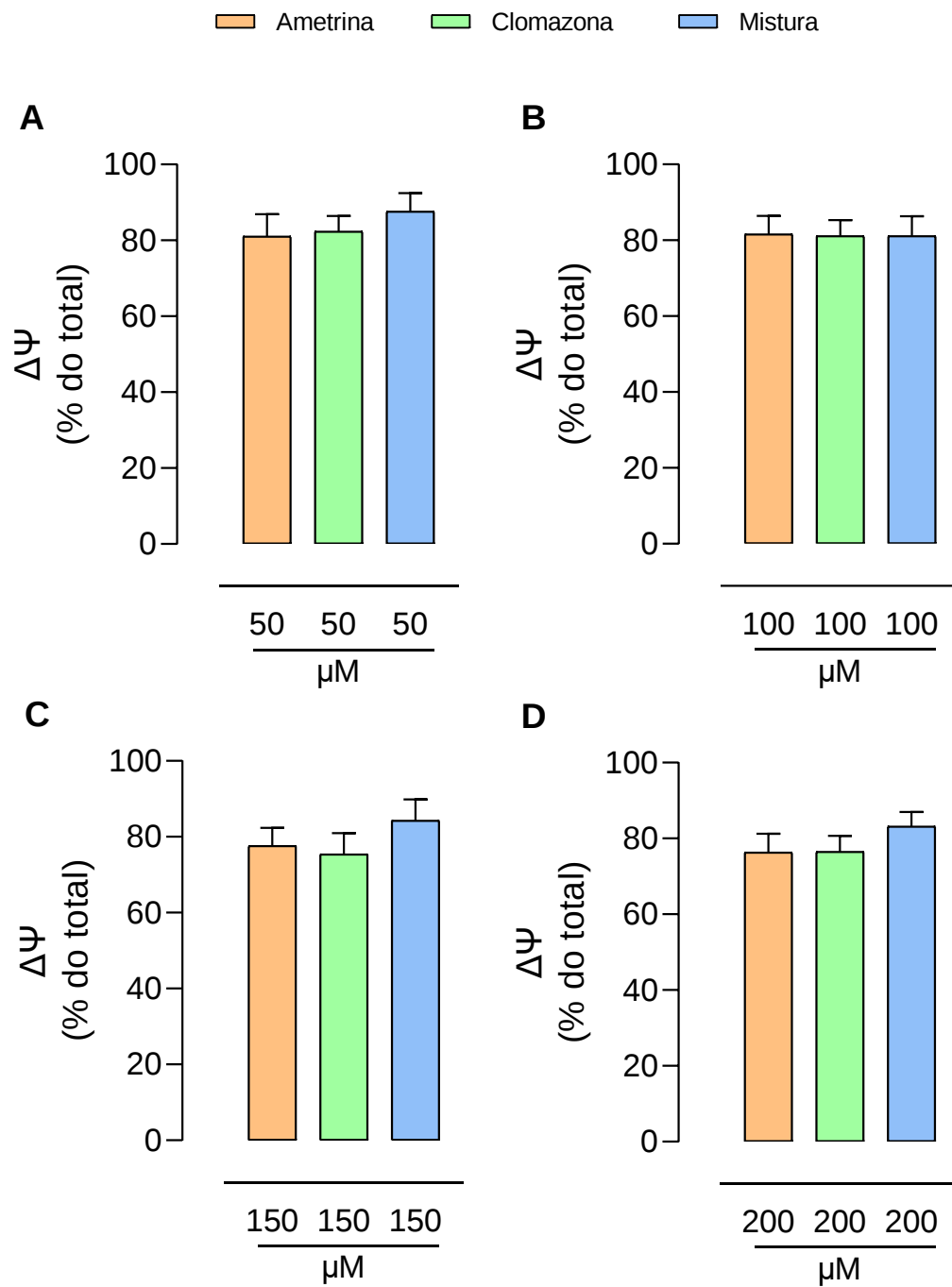
Fonte: Elaborado pela autora.

FIGURA 19 - Comparação entre os efeitos da ametrina, clomazona e a mistura dos dois herbicidas sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) das células HepG2 expostas por 24 horas. #Estatisticamente significativo em relação a mistura dos herbicidas ($p < 0,05$).



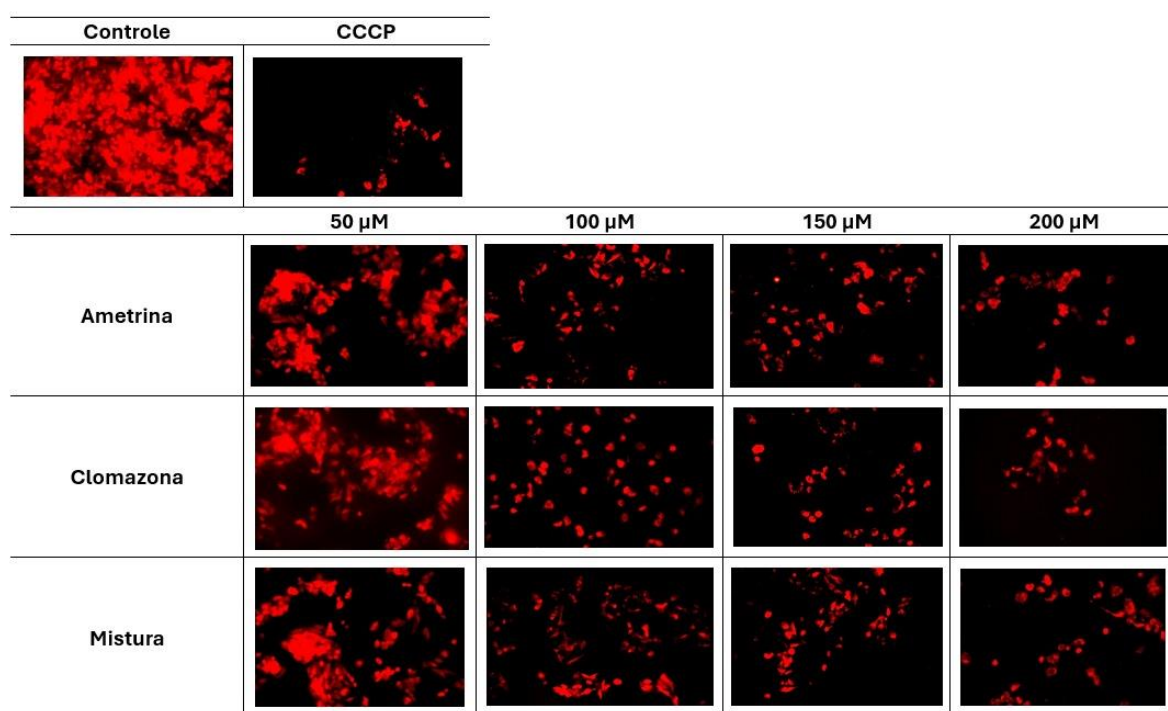
Fonte: Elaborado pela autora.

FIGURA 20 - Comparação entre os efeitos da ametrina, clomazona e a mistura dos dois herbicidas sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) das células HepG2 expostas por 48 horas. #Estatisticamente significativo em relação a mistura dos herbicidas ($p < 0,05$).



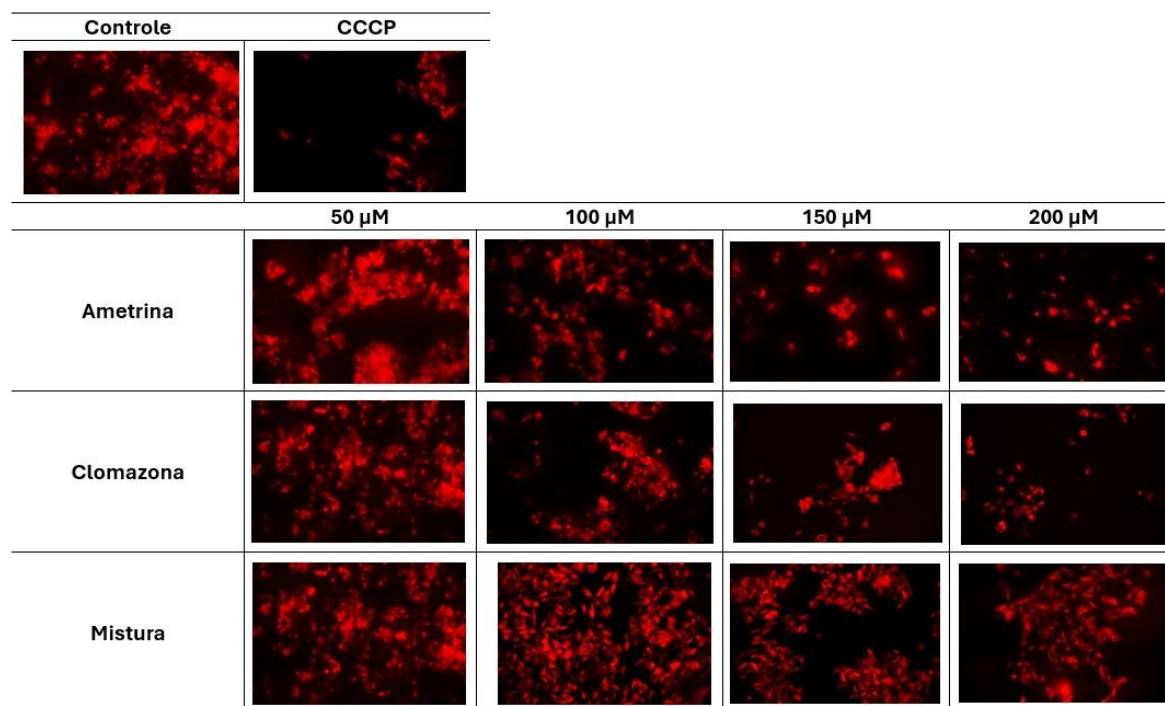
Fonte: Elaborado pela autora.

FIGURA 21 - Microscopia de fluorescência do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em células HepG2 após 24 h de exposição, no aumento de 40x. As células foram submetidas aos tratamentos controle, controle positivo com CCCP, e às exposições aos herbicidas ametrina, clomazona e e mistura (AMT + CLZ). A fluorescência vermelha representa mitocôndrias polarizadas, indicando a integridade do $\Delta\Psi_m$.



Fonte: Elaborado pela autora.

FIGURA 22 - Microscopia de fluorescência do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em células HepG2 após 48 h de exposição, no aumento de 40x. As células foram submetidas aos tratamentos controle, controle positivo com CCCP, e às exposições aos herbicidas ametrina, clomazona e e mistura (AMT + CLZ). A fluorescência vermelha representa mitocôndrias polarizadas, indicando a integridade do $\Delta\Psi_m$.



Fonte: Elaborado pela autora.

7.2.2 Avaliação da massa mitocondrial com MitoTracker™ Green (MTG)

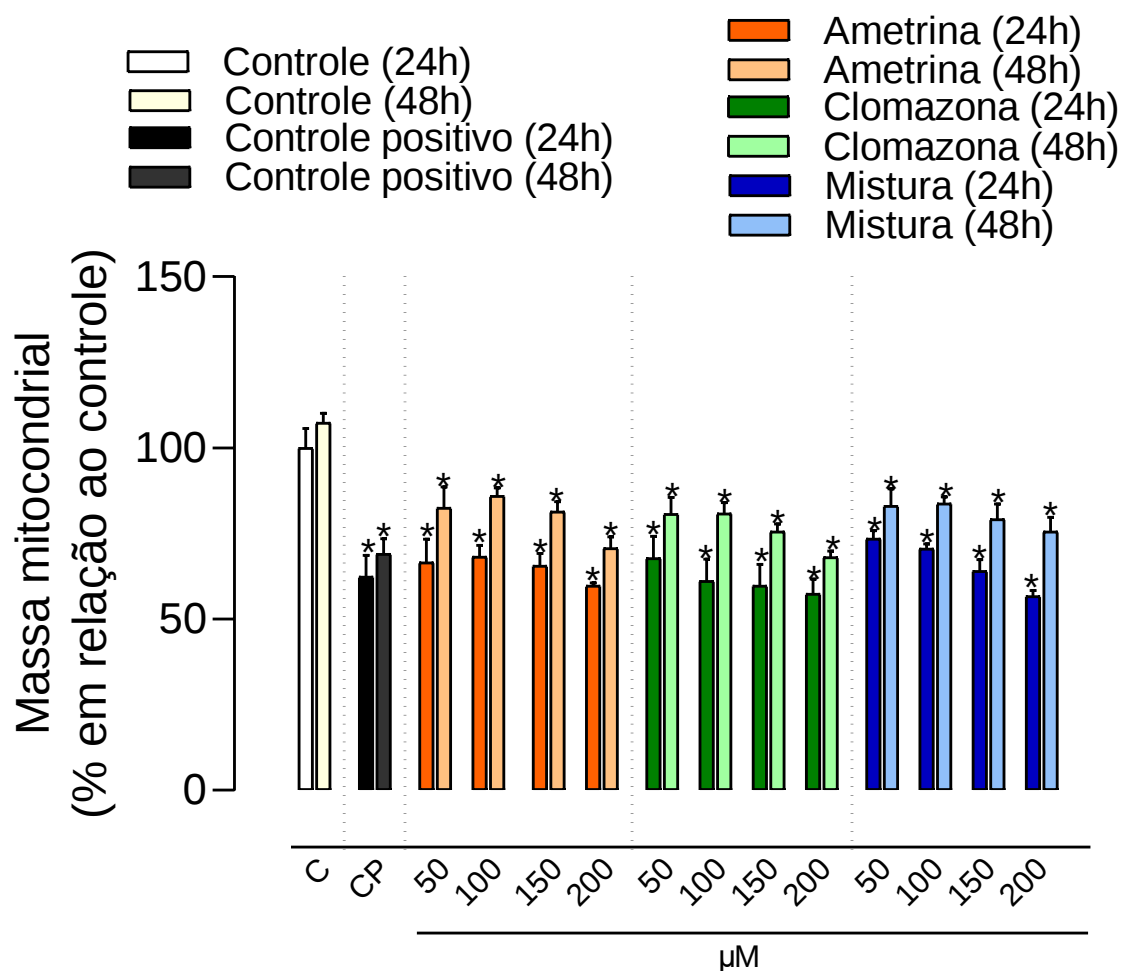
A massa mitocondrial das células HepG2 foi quantificada utilizando a sonda fluorescente MitoTracker™ Green FM (MTG), que se liga de forma específica aos lipídios da membrana mitocondrial independentemente do potencial de membrana, sendo amplamente empregada como marcador do número e volume total de mitocôndrias em células vivas. O ensaio permite detectar alterações na biogênese mitocondrial ou inchaço mitocondrial decorrente de processos tóxicos. As células foram tratadas com os herbicidas ametrina (AMT), clomazona (CLZ) e a combinação AMT + CLZ em quatro concentrações (50, 100, 150 e 200 μ M) e incubadas por 24 e 48 horas, com três repetições para cada condição.

A massa mitocondrial das células HepG2 foi significativamente reduzida em relação ao grupo controle em todas as concentrações testadas da AMT e da CLZ tanto após 24 horas quanto após 48 horas de incubação (Figura 23). A mistura dos herbicidas também reduziu a massa mitocondrial em todas as concentrações e em ambos os tempos de incubação testados.

A comparação entre os efeitos das substâncias isoladas com as correspondentes misturas sobre a massa mitocondrial não mostrou diferença estatística em nenhuma das concentrações e nenhum dos tempos de incubação (Figura 24 e Figura 25).

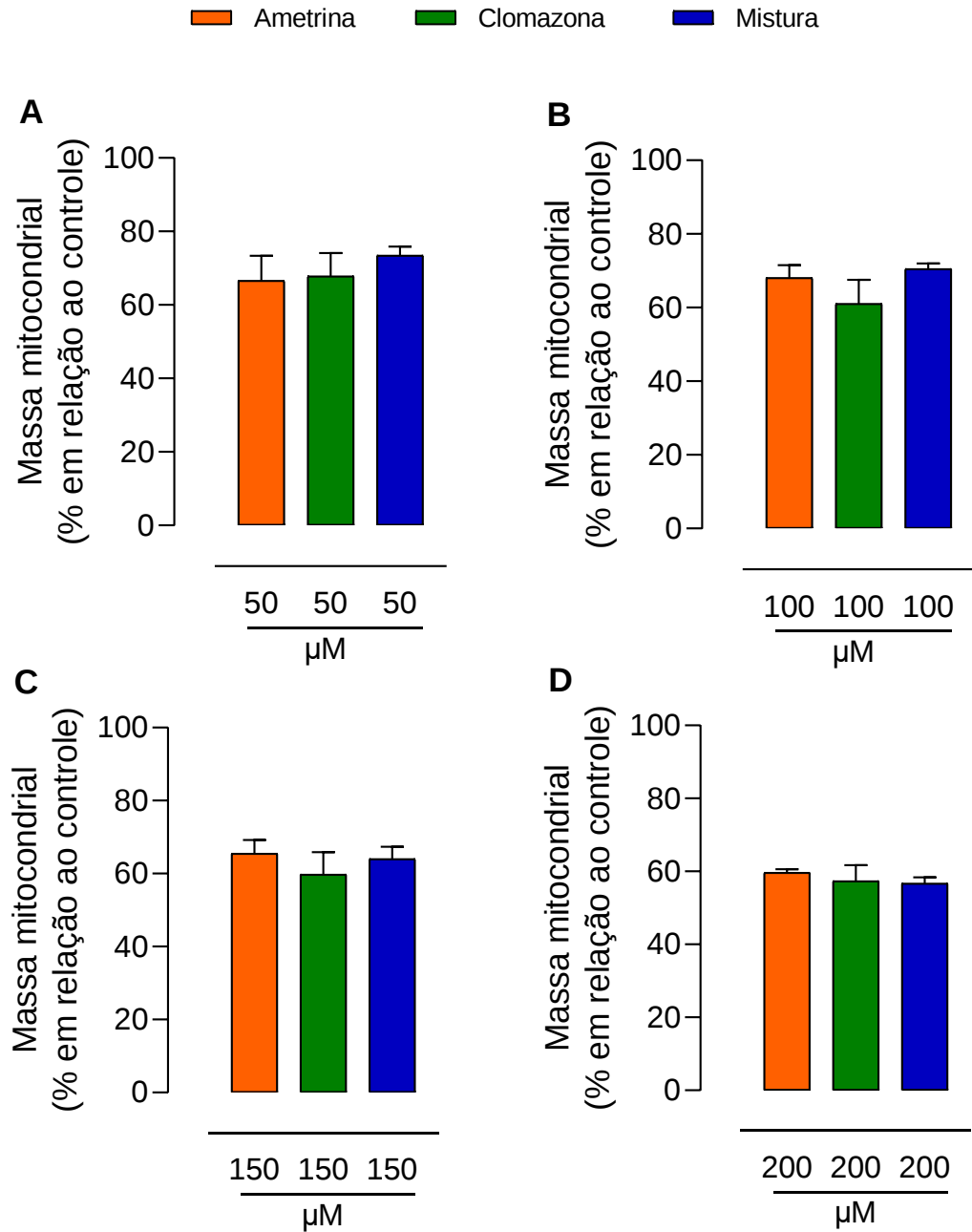
As imagens representativas de microscopia de fluorescência obtidas com a sonda MitoTracker™ Green (MTG) (Figura 26 e Figura 27) evidenciam diferenças qualitativas na massa mitocondrial entre os grupos experimentais. No grupo controle, observa-se fluorescência mitocondrial intensa e uniformemente distribuída no citoplasma, refletindo uma massa mitocondrial preservada e organização estrutural compatível com células metabolicamente ativas. Já as células submetidas aos tratamentos com os herbicidas, isolados ou combinados, apresentam redução aparente da intensidade do sinal fluorescente da MTG, acompanhada de alterações no padrão de distribuição mitocondrial, sugerindo diminuição da massa mitocondrial e/ou desorganização da rede mitocondrial. Tais alterações podem estar associadas a processos de mitofagia, inibição da biogênese mitocondrial ou dano estrutural induzido pelos herbicidas. Os achados qualitativos observados nas Figura 26 e 27 corroboram os dados quantitativos apresentados na Figura 23, indicando que os tratamentos interferem de forma significativa na homeostase mitocondrial.

FIGURA 23 - Massa mitocondrial nas células HepG2 expostas à ametrina, clomazona ou à mistura dos dois herbicidas por 24 e 48 horas. Os dados são expressos como média $\pm$ EPM obtidos a partir de três experimentos independentes realizados com diferentes populações de células. *Estatisticamente significativo em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). C = controle, apenas 0,1% de DMSO; CP = controle positivo com adição de oligomicina 1 $\mu\text{g/mL}$.



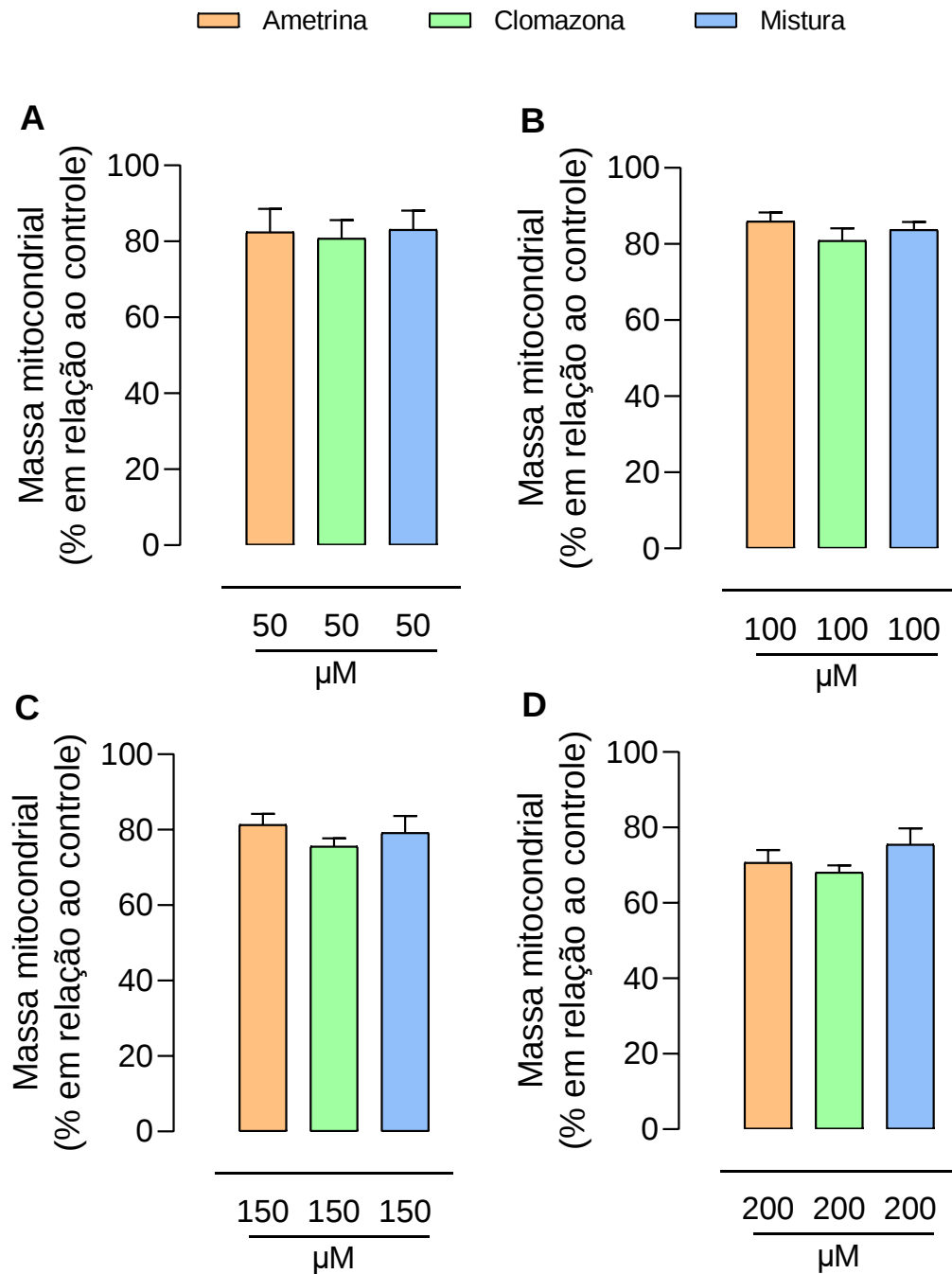
Fonte: Elaborado pela autora.

FIGURA 24 - Comparação entre os efeitos da ametrina, clomazona e a mistura dos dois herbicidas sobre a massa mitocondrial nas células HepG2 expostas por 24 horas. #Estatisticamente significativo em relação a mistura dos herbicidas ($p < 0,05$).



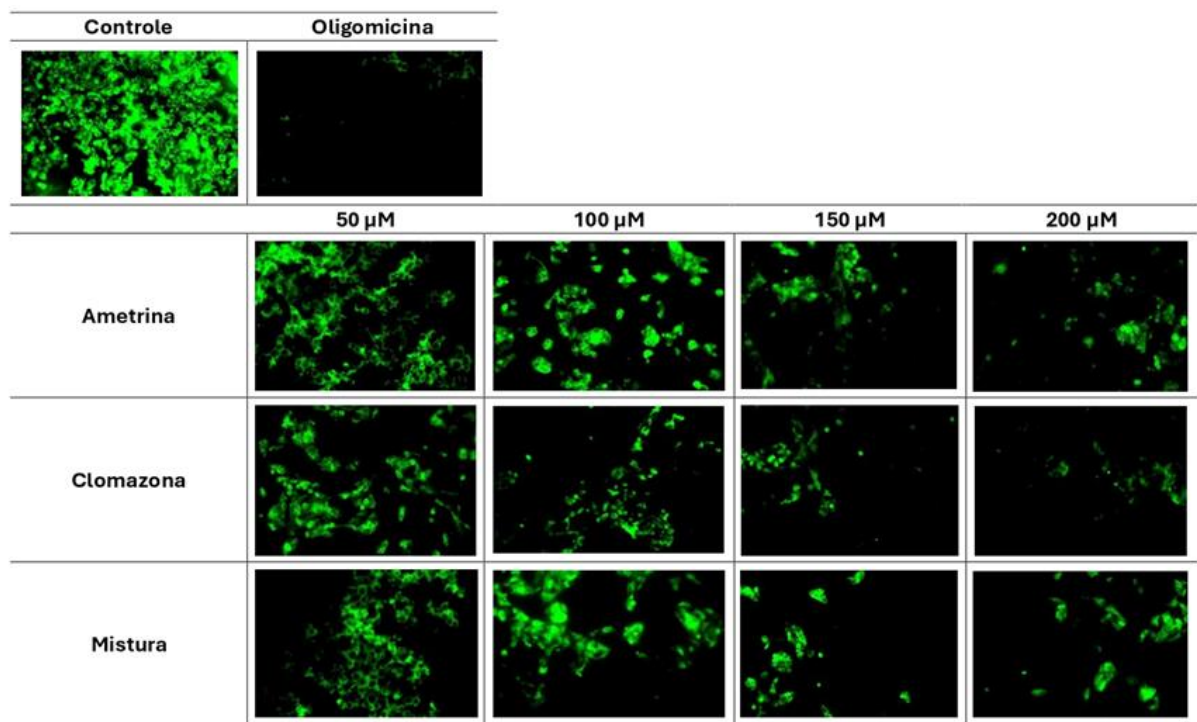
Fonte: Elaborado pela autora.

FIGURA 25 – Comparação entre os efeitos da ametrina, clomazona e a mistura dos dois herbicidas sobre a massa mitocondrial nas células HepG2 expostas por 48 horas. #Estatisticamente significativo em relação a mistura dos herbicidas ($p < 0,05$).



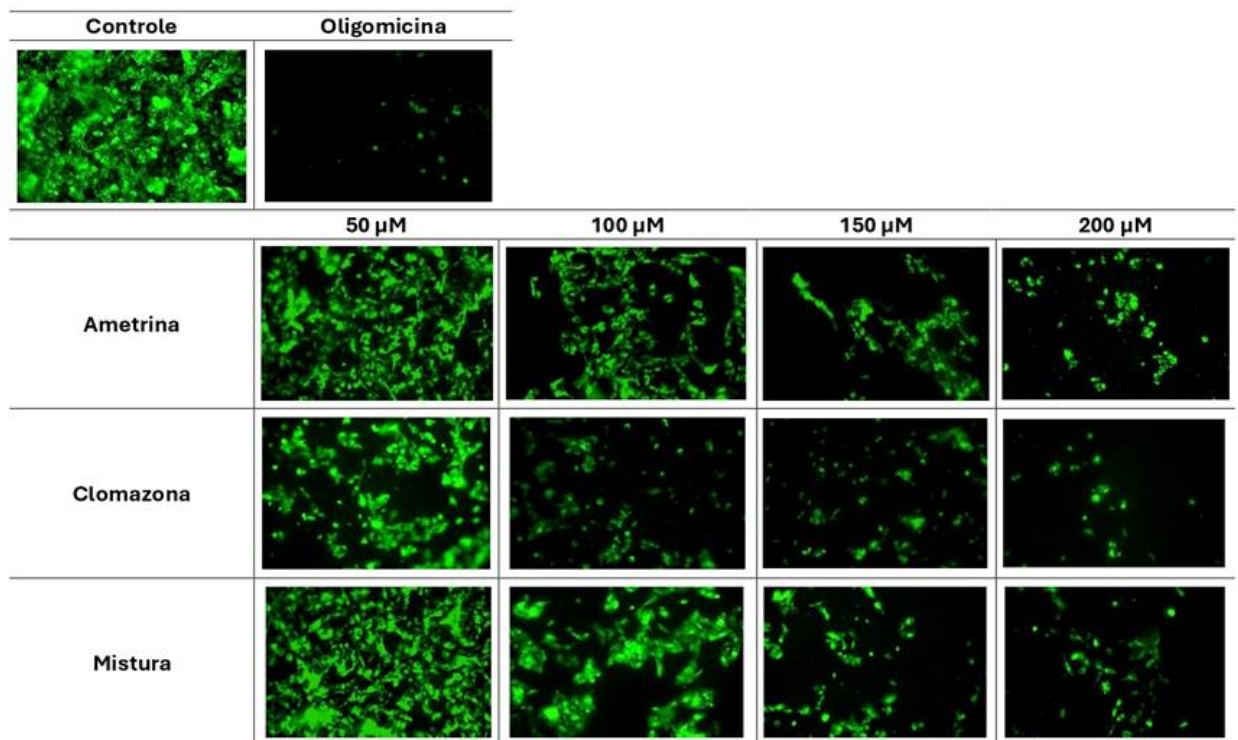
Fonte: Elaborado pela autora.

FIGURA 26 – Massa mitocondrial em células HepG2 avaliada por microscopia de fluorescência utilizando MitoTracker™ Green após 24 h de exposição aos tratamentos controle, controle positivo com oligomicina e aos herbicidas ametrina, clomazona e mistura (AMT + CLZ). A fluorescência verde indica o conteúdo mitocondrial celular, independentemente do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).



Fonte: Elaborado pela autora.

FIGURA 27 – Massa mitocondrial em células HepG2 avaliada por microscopia de fluorescência utilizando MitoTracker™ Green após 48 h de exposição aos tratamentos controle, controle positivo com oligomicina e aos herbicidas ametrina, clomazona e mistura (AMT + CLZ). A fluorescência verde indica o conteúdo mitocondrial celular, independentemente do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).



Fonte: Elaborado pela autora.

7.2.3 Avaliação da atividade mitocondrial com MitoTracker™ Orange (MTO)

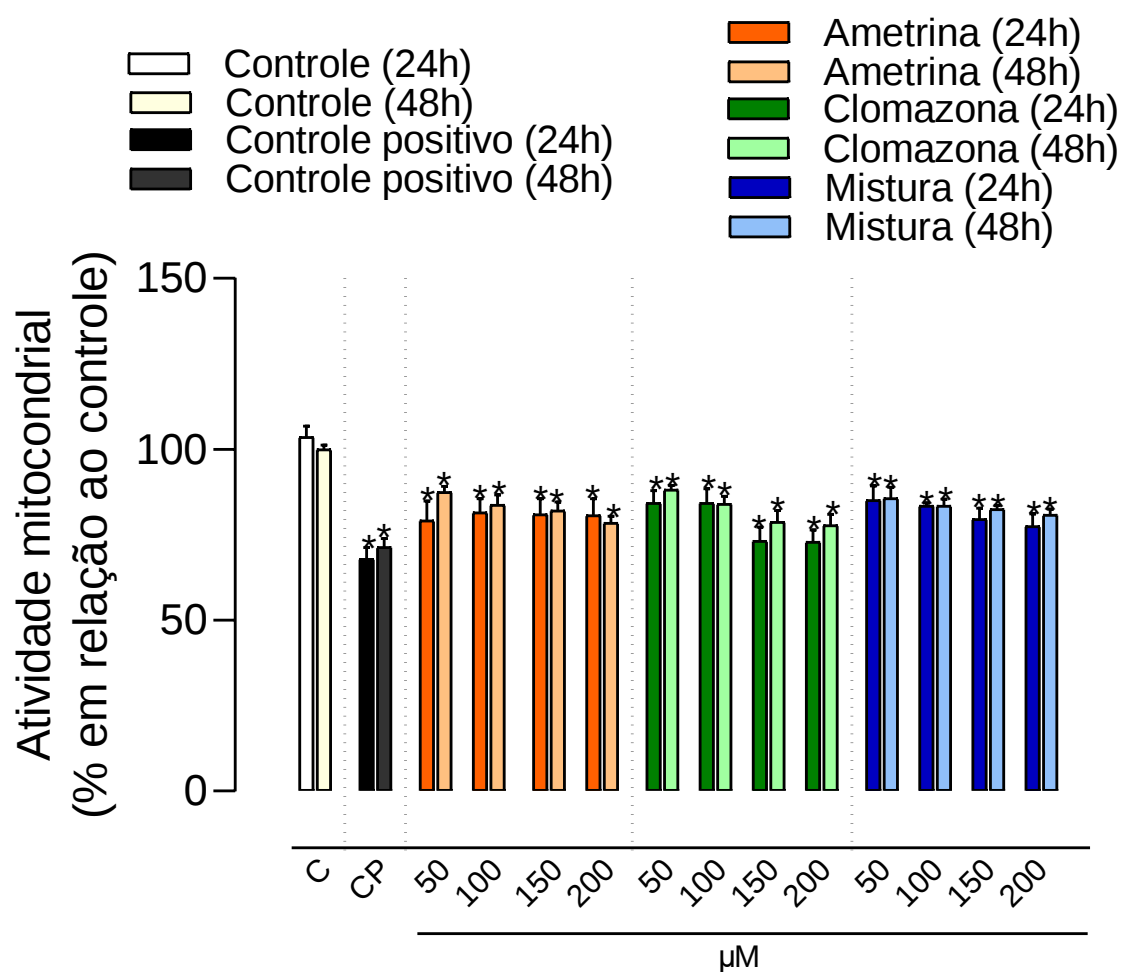
A atividade mitocondrial nas células HepG2 foi avaliada utilizando a sonda fluorescente MitoTracker™ Orange CM-H₂TMRos (MTO), que se acumula nas mitocôndrias de células vivas de forma dependente do potencial de membrana mitocondrial. Assim, a intensidade de fluorescência emitida é um indicador direto da atividade mitocondrial funcional, sendo sensível a alterações precoces na bioenergética celular. As células foram expostas aos herbicidas ametrina (AMT), clomazona (CLZ) e à combinação de ambos (AMT + CLZ) nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 µM, durante 24 e 48 horas, com três repetições para cada condição.

A atividade mitocondrial foi significativamente afetada em relação ao grupo controle em todas as concentrações testadas da AMT e da CLZ tanto após 24 horas quanto após 48 horas de incubação (Figura 28). A mistura dos herbicidas também reduziu os níveis de ATP em todas as concentrações e em ambos os tempos de incubação testados.

A comparação entre os efeitos das substâncias isoladas com as correspondentes misturas não mostrou diferença estatística em nenhuma das concentrações e nenhum dos tempos de incubação (Figura 29 e Figura 30).

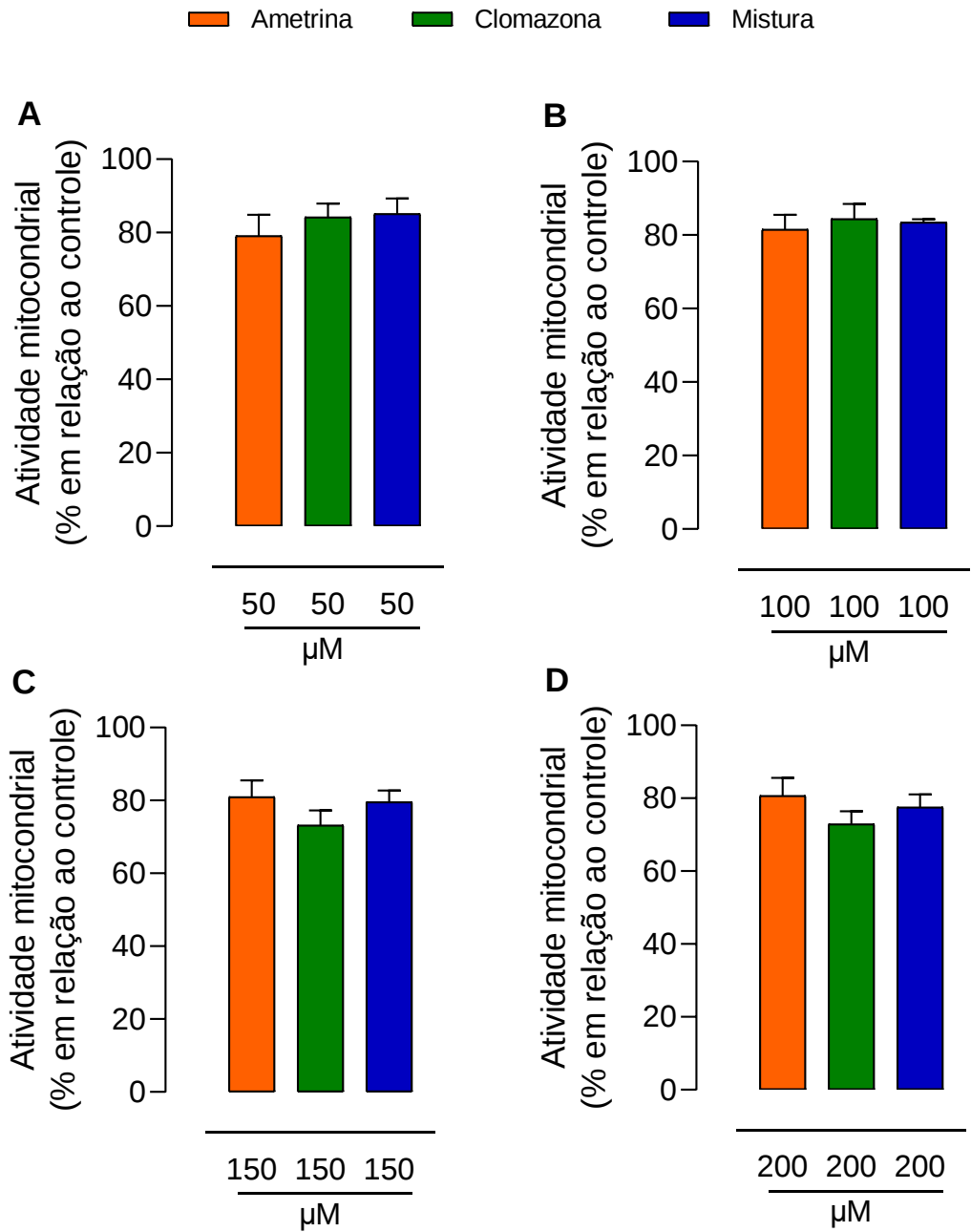
A análise por microscopia de fluorescência utilizando a sonda MitoTracker™ Orange (MTO) (Figura 31 e Figura 32) evidenciou alterações relevantes no estado funcional das mitocôndrias após a exposição aos tratamentos experimentais. As células do grupo controle apresentaram sinal fluorescente bem definido e distribuído de maneira consistente ao longo do citoplasma, refletindo elevada atividade mitocondrial e adequado funcionamento dos processos oxidativos. Por outro lado, nos grupos tratados com AMT e CLZ, isolados ou combinados, observou-se atenuação progressiva da fluorescência da MTO, acompanhada por perda da definição estrutural do padrão mitocondrial. Essas alterações indicam redução da fração de mitocôndrias funcionalmente ativas, sugerindo prejuízo na eficiência bioenergética celular. Considerando que a retenção da MTO depende do estado funcional mitocondrial, a diminuição do sinal fluorescente observada é indicativa de comprometimento da atividade respiratória e da capacidade oxidativa das mitocôndrias. Assim, os achados visuais apresentados nas Figuras 31 e 32 estão em consonância com os dados obtidos nas análises quantitativas (Figura 28), reforçando a evidência de disfunção mitocondrial induzida pelos herbicidas.

FIGURA 28 - Atividade mitocondrial nas células HepG2 expostas à ametrina, clomazona ou à mistura dos dois herbicidas por 24 e 48 horas. Os dados são expressos como média $\pm$ EPM obtidos a partir de três experimentos independentes realizados com diferentes populações de células. *Estatisticamente significativo em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). C = controle, apenas 0,1% de DMSO; CP = controle positivo com adição de oligomicina 1 $\mu\text{g/mL}$.



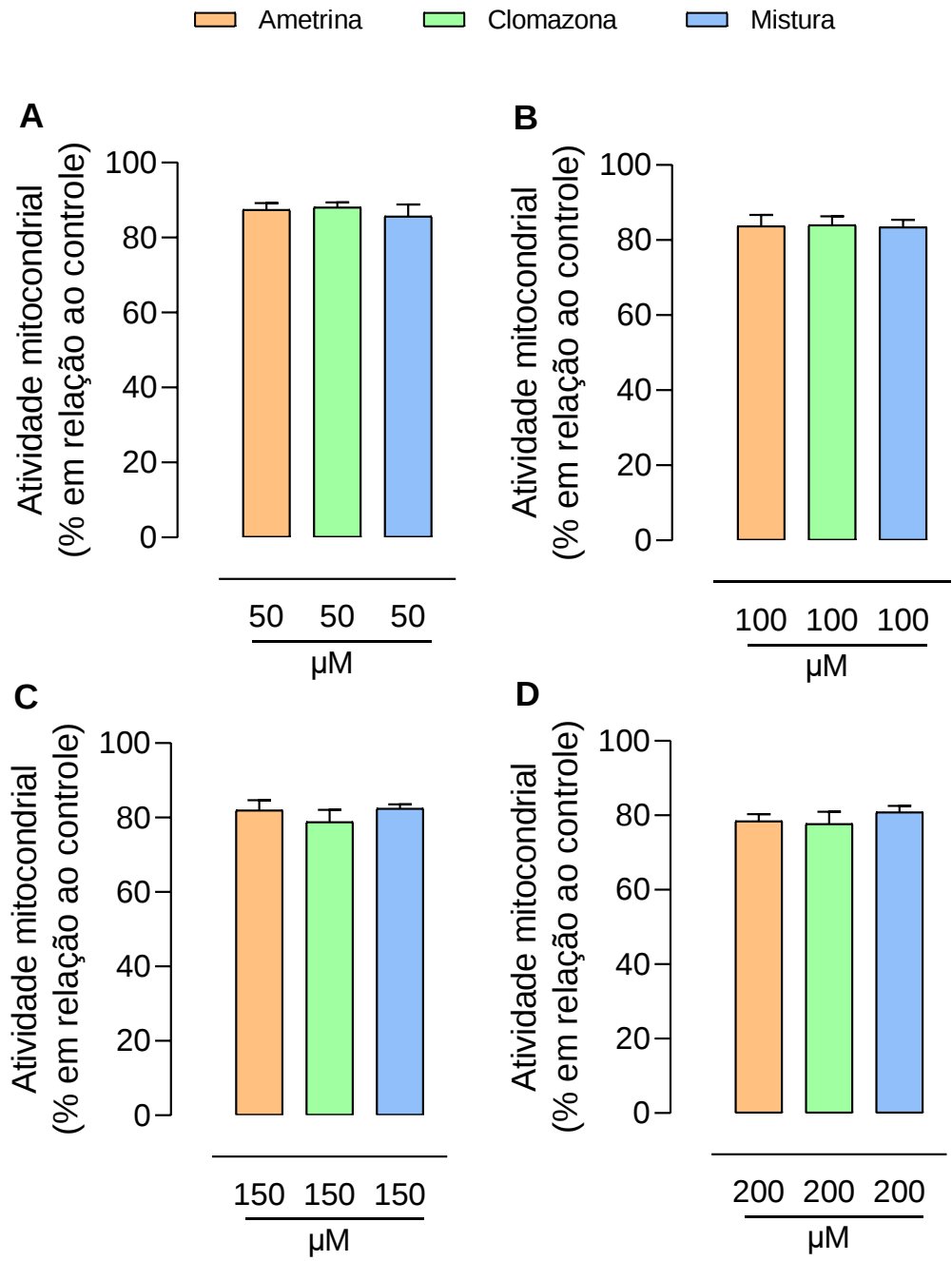
Fonte: Elaborado pela autora.

FIGURA 29 - Comparação entre os efeitos da ametrina, clomazona e a mistura dos dois herbicidas sobre a massa mitocondrial nas células HepG2 expostas por 24 horas. #Estatisticamente significativo em relação a mistura dos herbicidas ($p<0,05$).



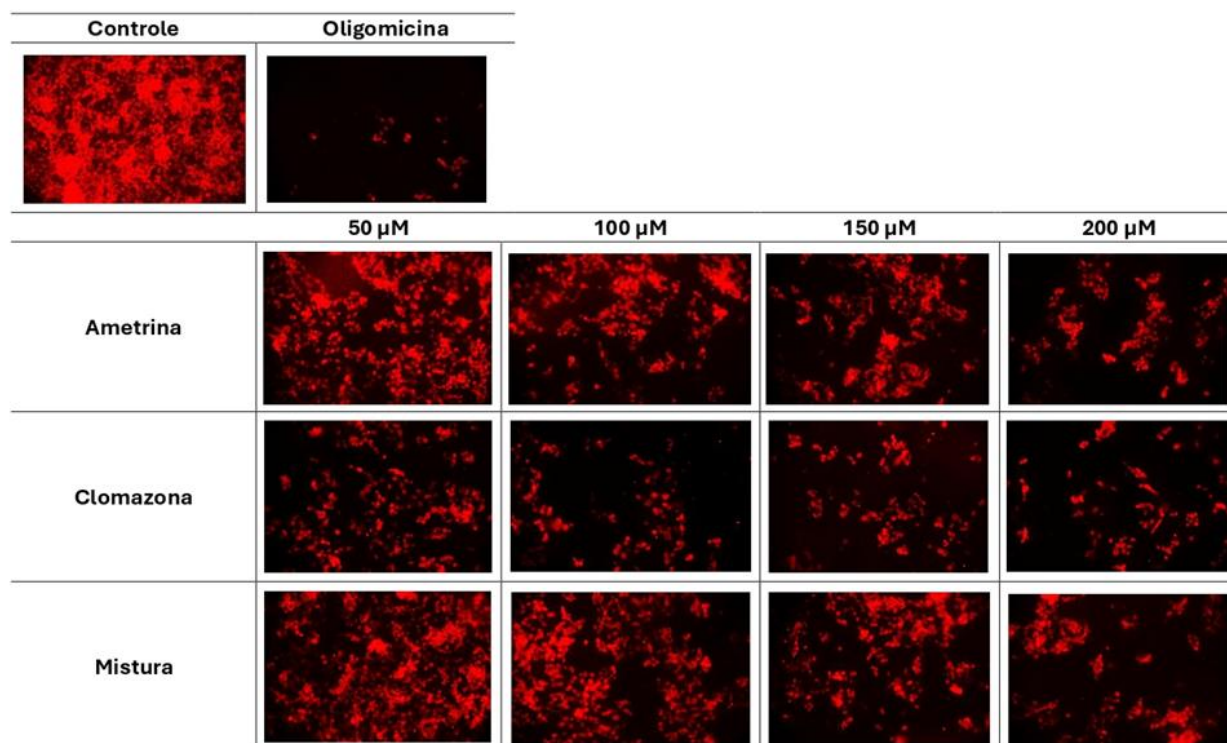
Fonte: Elaborado pela autora.

FIGURA 30 - Comparação entre os efeitos da ametrina, clomazona e a mistura dos dois herbicidas sobre a atividade mitocondrial nas células HepG2 expostas por 48 horas. #Estatisticamente significativo em relação a mistura dos herbicidas (p<0,05).



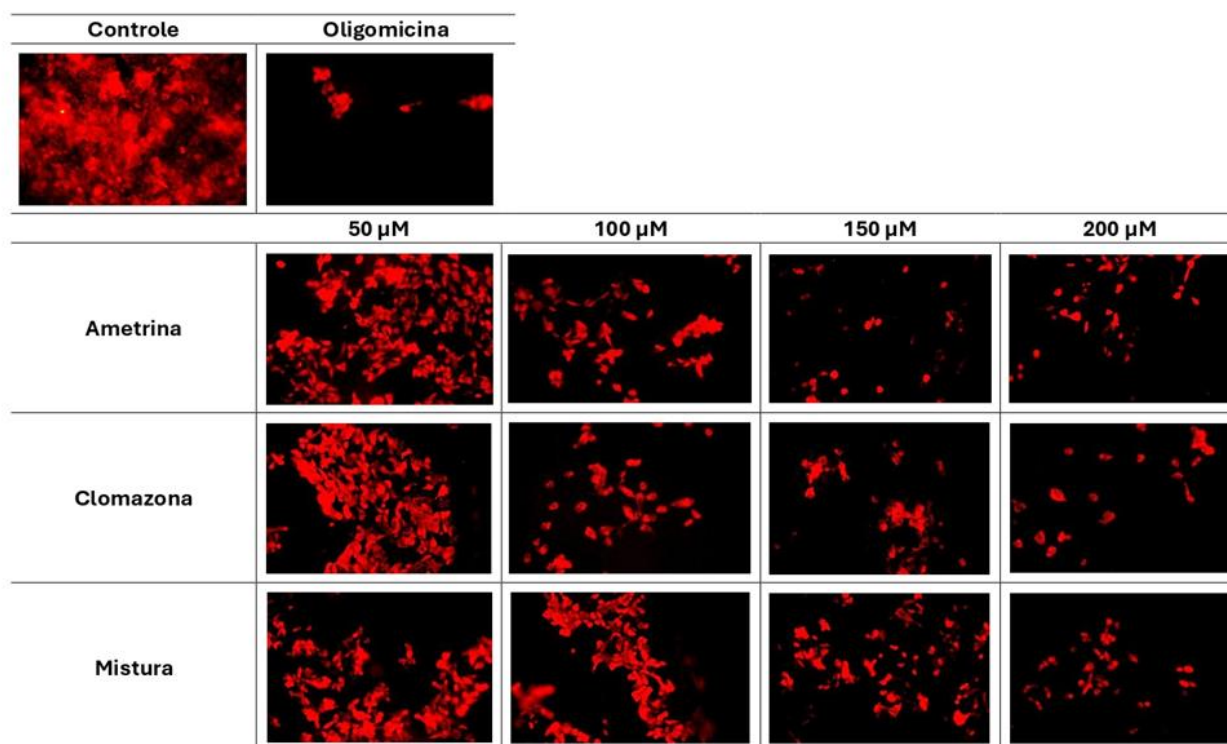
Fonte: Elaborado pela autora.

FIGURA 31 - Atividade mitocondrial em células HepG2 avaliada por microscopia de fluorescência com MitoTracker™ Orange após 24 h de exposição aos tratamentos controle, controle positivo com oligomicina e aos herbicidas ametrina, clomazona e mistura (AMT + CLZ). A fluorescência vermelha indica mitocôndrias metabolicamente ativas.



Fonte: Elaborado pela autora.

FIGURA 32 - Atividade mitocondrial em células HepG2 avaliada por microscopia de fluorescência com MitoTracker™ Orange após 48 h de exposição aos tratamentos controle, controle positivo com oligomicina e aos herbicidas ametrina, clomazona e mistura (AMT + CLZ). A fluorescência vermelha indica mitocôndrias metabolicamente ativas.



Fonte: Elaborado pela autora.

7.2.4 Quantificação dos níveis intracelulares de ATP

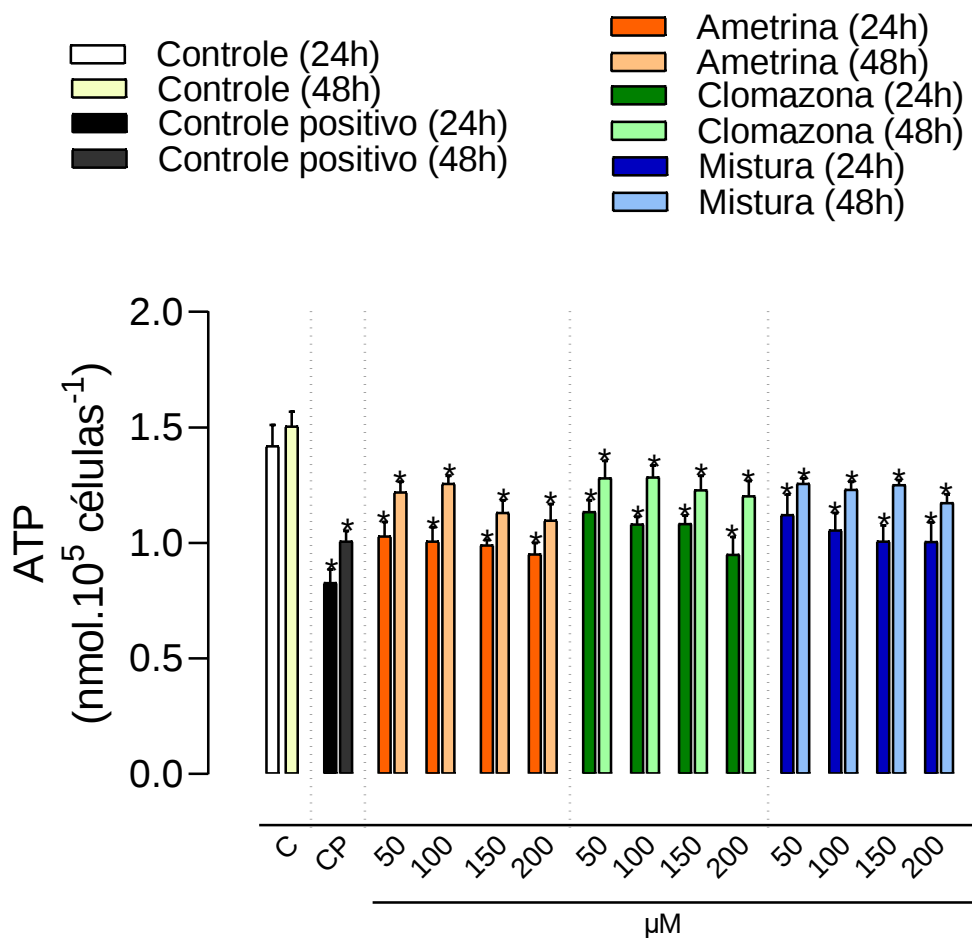
A produção de adenosina trifosfato (ATP) foi avaliada nas células HepG2 como parâmetro de função bioenergética, por meio de ensaio bioluminescente baseado no sistema luciferina-luciferase, cuja emissão de luz é diretamente proporcional à quantidade de ATP presente na amostra. A depleção de ATP é considerada um dos principais eventos associados à citotoxicidade mitocondrial e à indução de morte celular. As células foram expostas aos herbicidas ametrina (AMT), clomazona (CLZ) e à associação AMT + CLZ, nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 µM, durante 24 e 48 horas, em três repetições para cada amostra.

Os níveis intracelulares de ATP foram significativamente afetados em relação ao grupo controle em todas as concentrações testadas da AMT e da CLZ tanto após

24 horas quanto após 48 horas de incubação (Figura 33). A mistura dos herbicidas também reduziu os níveis de ATP em todas as concentrações e em ambos os tempos de incubação testados.

A comparação entre os efeitos das substâncias isoladas com as correspondentes misturas não mostrou diferença estatística em nenhuma das concentrações e nenhum dos tempos de incubação (Figura 34 e Figura 35).

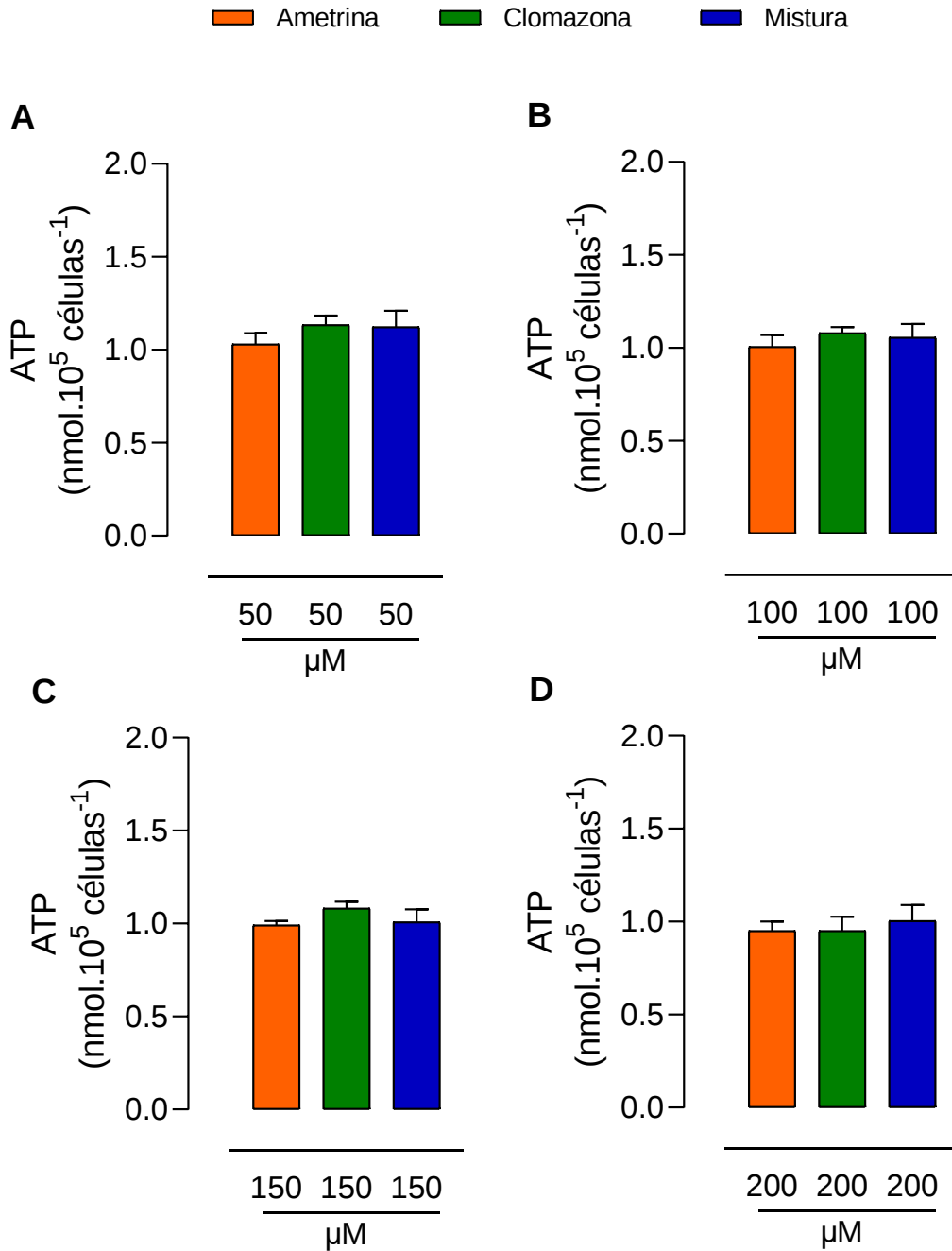
FIGURA 33 - Níveis de ATP das células HepG2 expostas à ametrina, clomazona ou à mistura dos dois herbicidas por 24 e 48 horas. Os dados são expressos como média $\pm$ EPM obtidos a partir de três experimentos independentes realizados com diferentes populações de células. *Estatisticamente significativo em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). C = controle, apenas 0,1% de DMSO; CP = controle positivo com adição de oligomicina 1 $\mu\text{g/mL}$.



Fonte: Elaborado pela autora.

FIGURA 34 - Comparação entre os efeitos da ametrina, clomazona e a mistura dos dois herbicidas sobre os níveis de ATP das células HepG2 expostas por 24 horas.

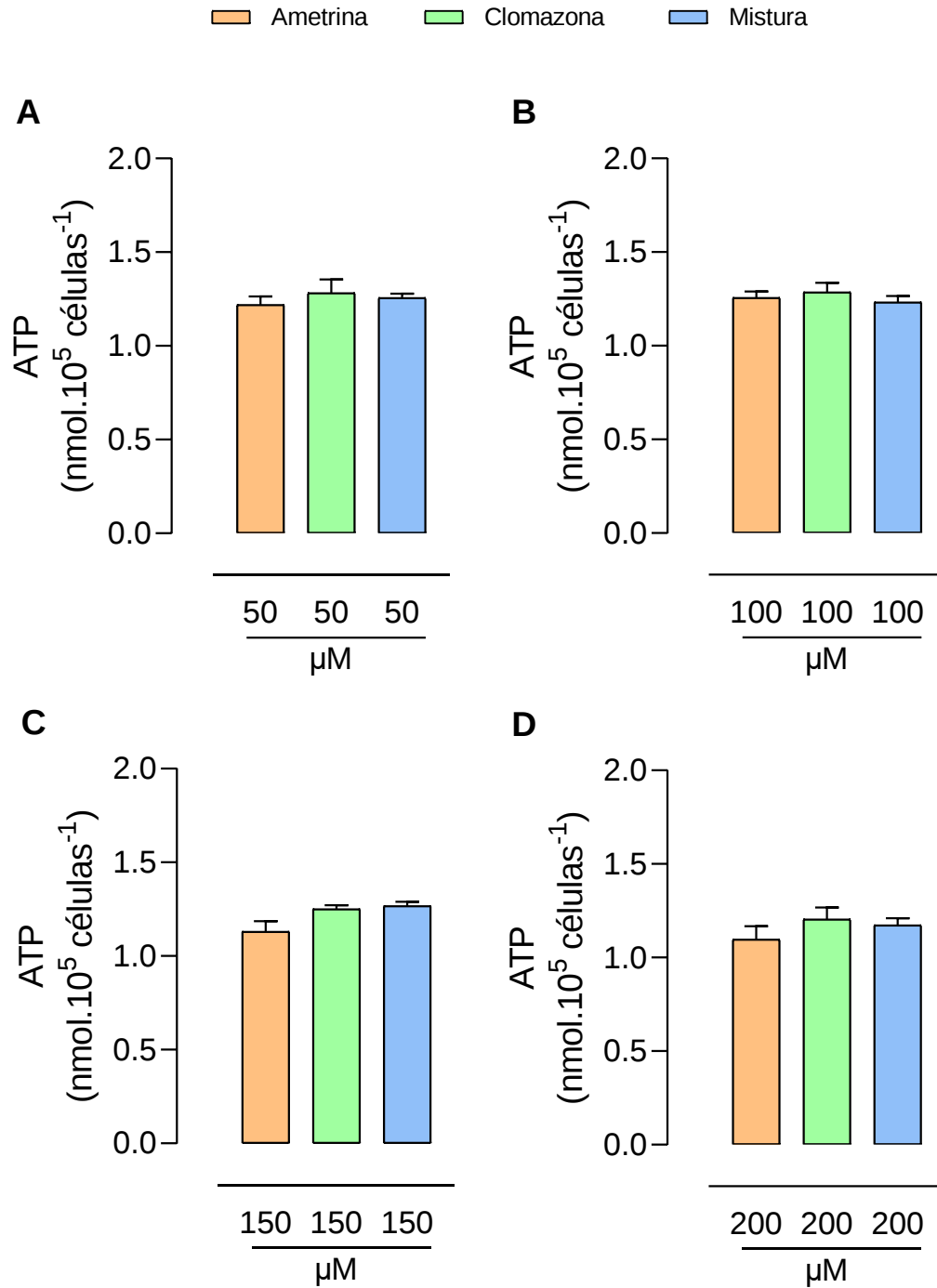
#Estatisticamente significativo em relação a mistura dos herbicidas ($p < 0,05$).



Fonte: Elaborado pela autora.

FIGURA 35 - Comparação entre os efeitos da ametrina, clomazona e a mistura dos dois herbicidas sobre os níveis de ATP das células HepG2 expostas por 48 horas.

#Estatisticamente significativo em relação a mistura dos herbicidas ($p < 0,05$).



Fonte: Elaborado pela autora.

7.3 Ensaios de Alterações Enzimáticas

7.3.1 Atividade das enzimas ALT, AST e ALP em células HepG2

As enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (ALP) foram dosadas nos sobrenadantes das culturas de células HepG2 expostas a ametrina (AMT), clomazona (CLZ) e à combinação AMT + CLZ, nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 μM , durante 24 e 48 horas, com três repetições para cada amostra. A liberação dessas enzimas para o meio extracelular indica dano celular e perda da integridade da membrana, sendo marcadores clássicos de citotoxicidade hepática.

ALT (Alanina Aminotransferase)

Após 24 horas de exposição, observou-se um aumento significativo da ALT nas concentrações mais elevadas de clomazona isolada (150 e 200 μM), seguido por ametrina isolada, enquanto a associação AMT + CLZ apresentou alterações menos expressivas. O mesmo padrão foi observado após 48 horas: os valores de ALT permaneceram mais baixos nos grupos da associação, indicando menor lesão celular. Esse comportamento sugere que a combinação entre os herbicidas promove efeito antagônico, atenuando a liberação da enzima.

AST (Aspartato Aminotransferase)

A atividade de AST também aumentou com os herbicidas isolados, especialmente com CLZ nas maiores concentrações, enquanto a associação provocou aumentos mais brandos, mesmo após 48 horas. A AST, sendo parcialmente mitocondrial, pode refletir disfunção energética, mas novamente o grupo combinado mostrou níveis mais baixos de alteração, reforçando a hipótese de antagonismo.

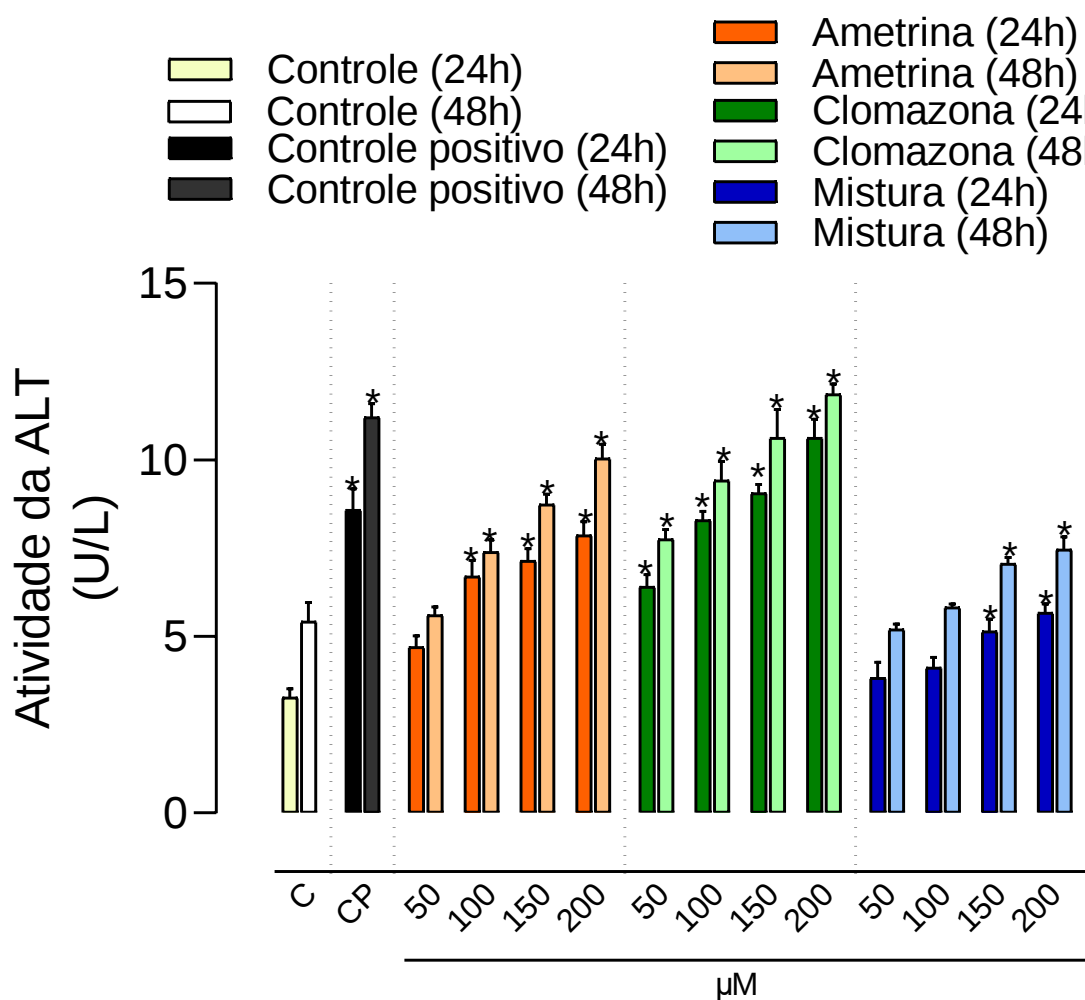
ALP (Fosfatase Alcalina)

A atividade da ALP apresentou variações discretas após 24 h., Contudo, com 48 horas de exposição, tanto AMT quanto CLZ isoladamente elevaram a atividade da enzima em concentrações mais altas, enquanto a associação apresentou os menores valores em todos os pontos, sugerindo menor comprometimento da via hepatobiliar.

Os dados mostram que, diferentemente do esperado, a exposição combinada de ametrina e clomazona reduziu os efeitos tóxicos sobre as enzimas hepáticas, em comparação com os compostos administrados isoladamente. Isso caracteriza um

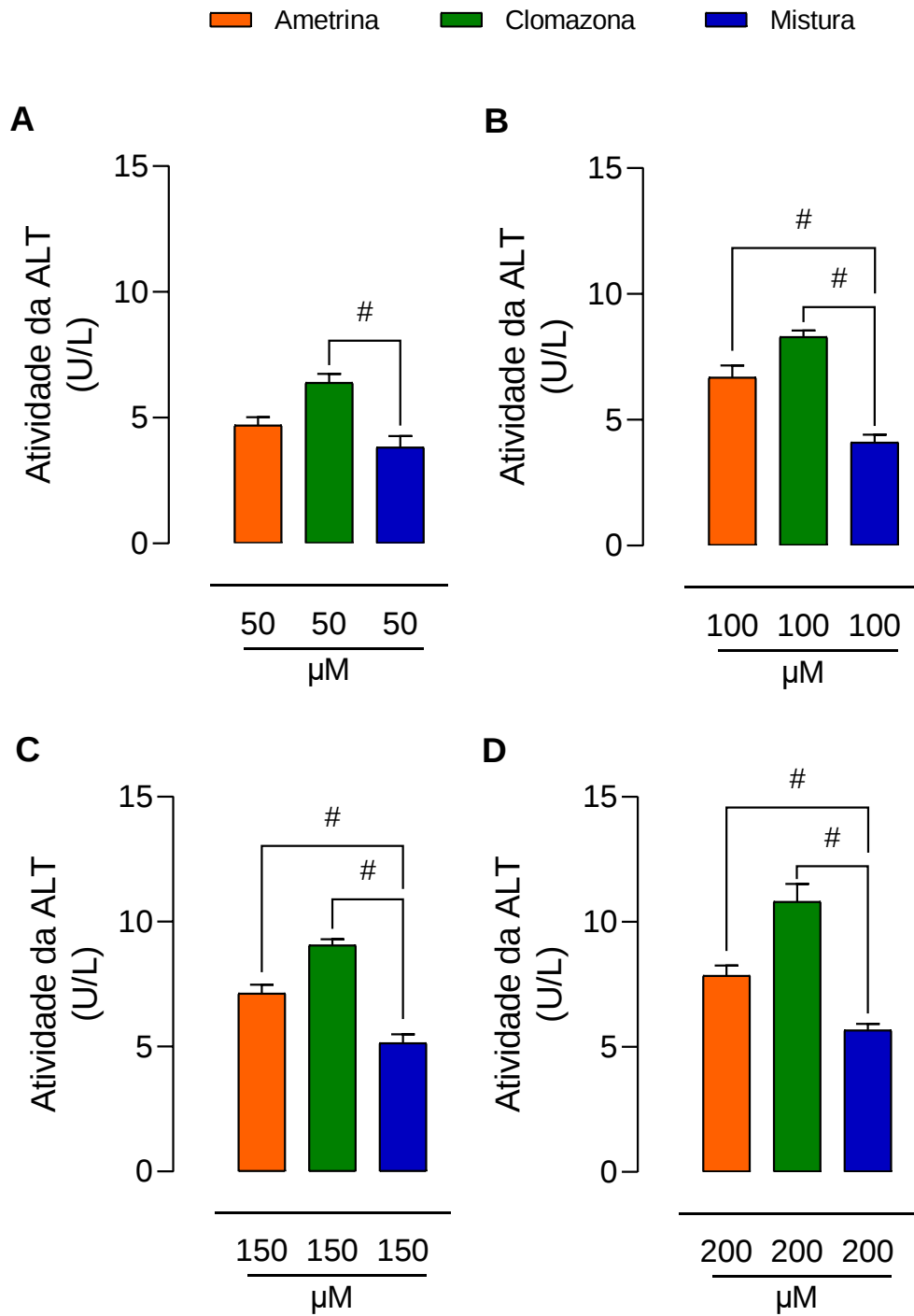
efeito antagônico, possivelmente associado a interações entre os compostos que mitigam a toxicidade individual. Tal antagonismo foi mais evidente nas dosagens mais altas e no tempo de 48 horas.

FIGURA 36 - Atividade das enzimas ALT em células HepG2 após exposição à AMT, CLZ e à associação (AMT + CLZ) por 24 h e 48 h. Os dados são expressos como média $\pm$ EPM obtidos a partir de três experimentos independentes realizados com diferentes populações de células. *Estatisticamente significativo em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). C = controle, apenas 0,1% de DMSO; CP = controle positivo com adição Triton x-100 0,2%.



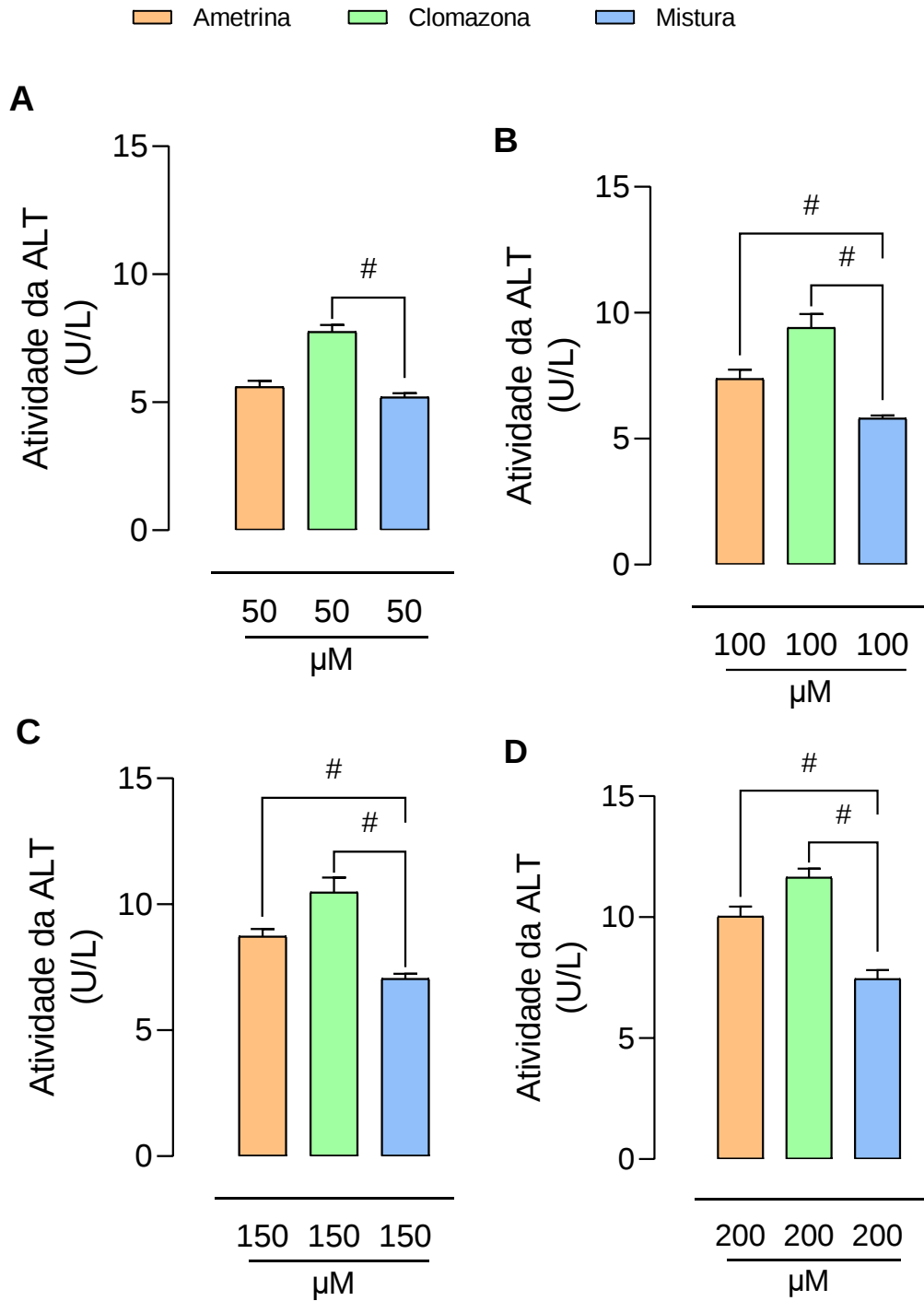
Fonte: Elaborado pela autora.

FIGURA 37 - Comparação entre os efeitos da ametrina, clomazona e a mistura dos dois herbicidas sobre Atividade das enzimas ALT em células HepG2 após exposição por 24 h. #Estatisticamente significativo em relação a mistura dos herbicidas ($p < 0,05$).



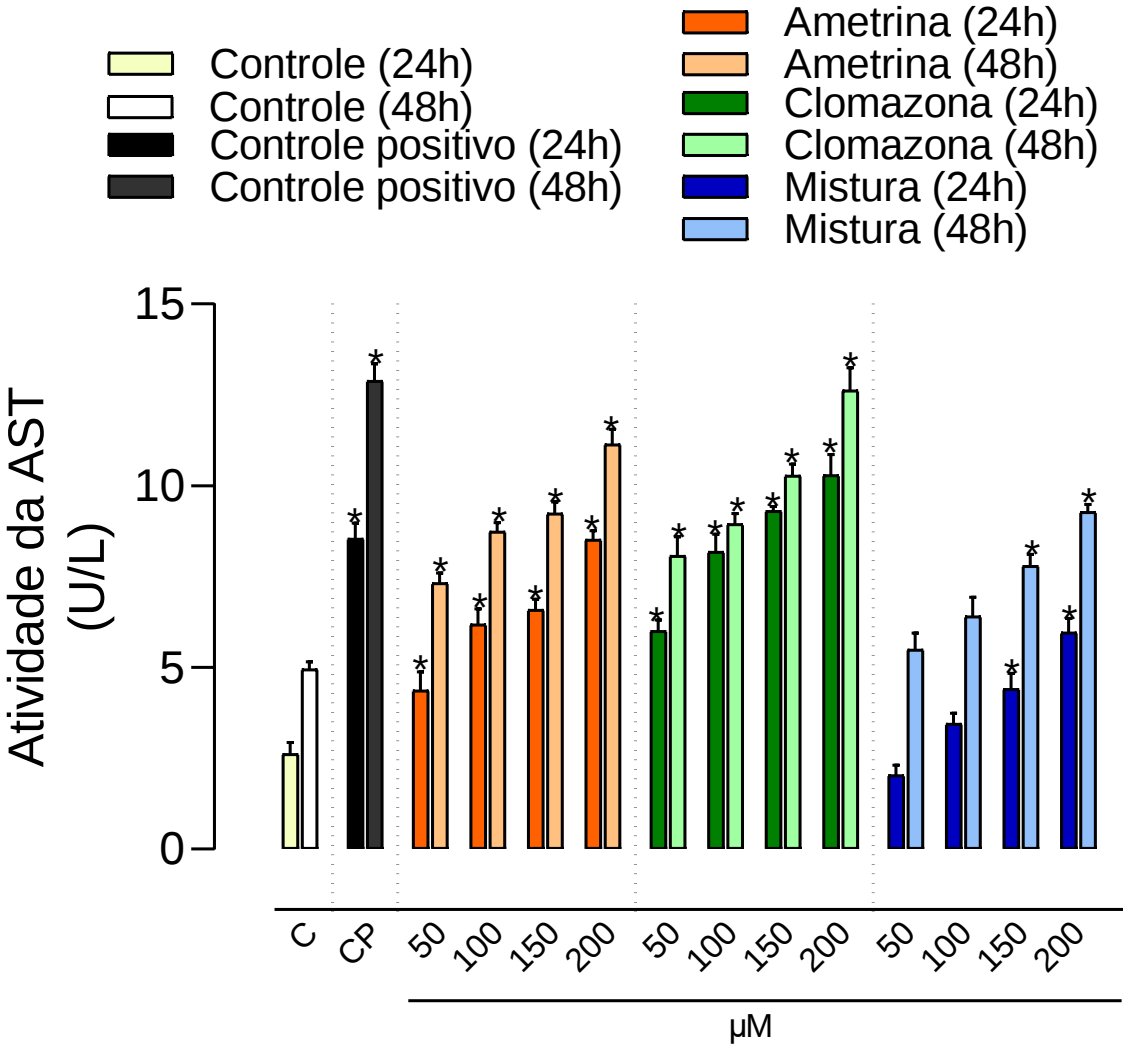
Fonte: Elaborado pela autora.

FIGURA 38 - Comparação entre os efeitos da ametrina, clomazona e a mistura dos dois herbicidas sobre Atividade das enzimas ALT em células HepG2 após exposição por 48 h. #Estatisticamente significativo em relação a mistura dos herbicidas ($p < 0,05$).



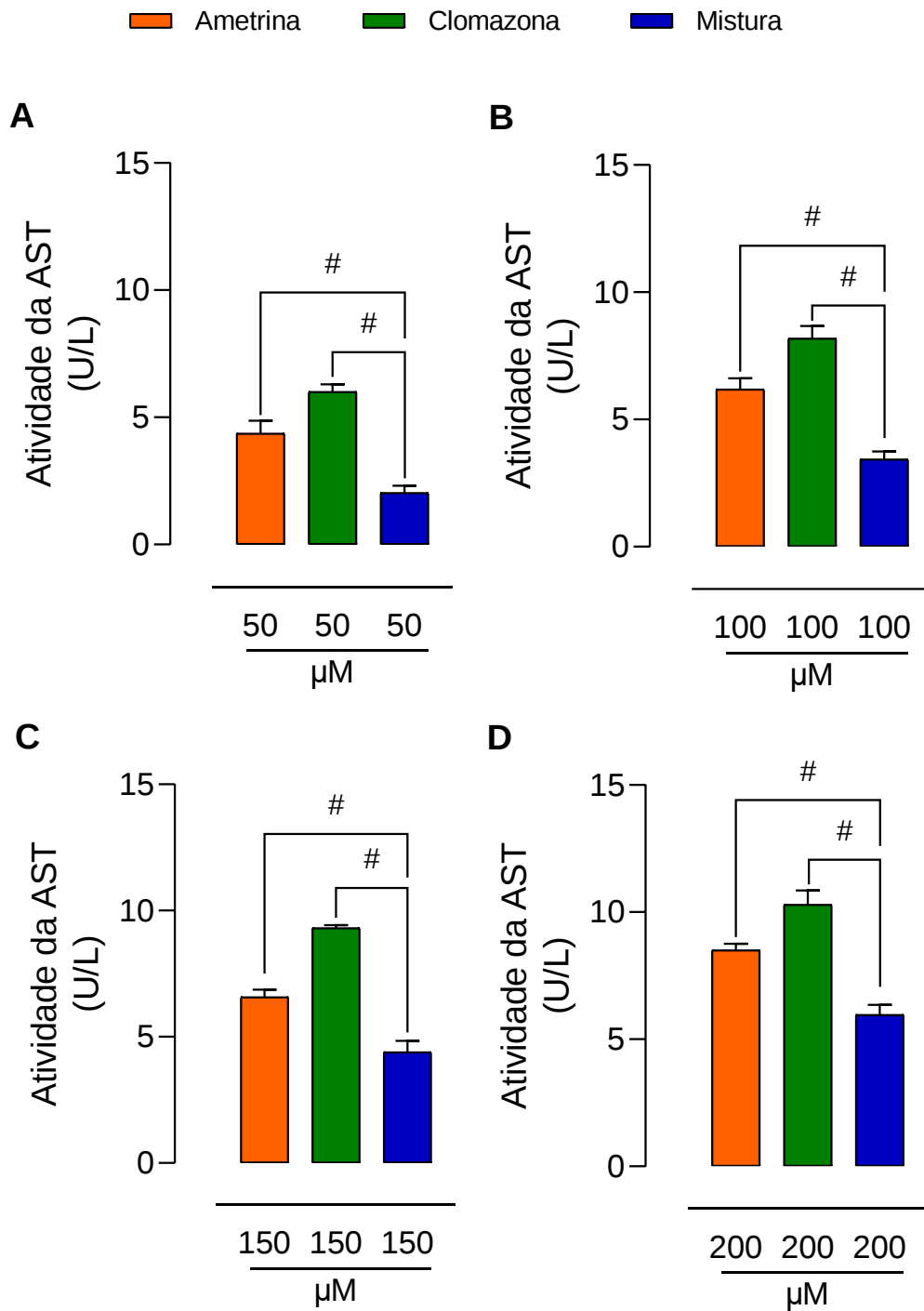
Fonte: Elaborado pela autora.

FIGURA 39 - Atividade das enzimas AST em células HepG2 após exposição à AMT, CLZ e à associação (AMT + CLZ) por 24 h e 48 h. Os dados são expressos como média ± EPM obtidos a partir de três experimentos independentes realizados com diferentes populações de células. *Estatisticamente significativo em relação ao grupo controle ($p<0,05$). C = controle, apenas 0,1% de DMSO; CP = controle positivo com adição Triton x-100 0,2%.



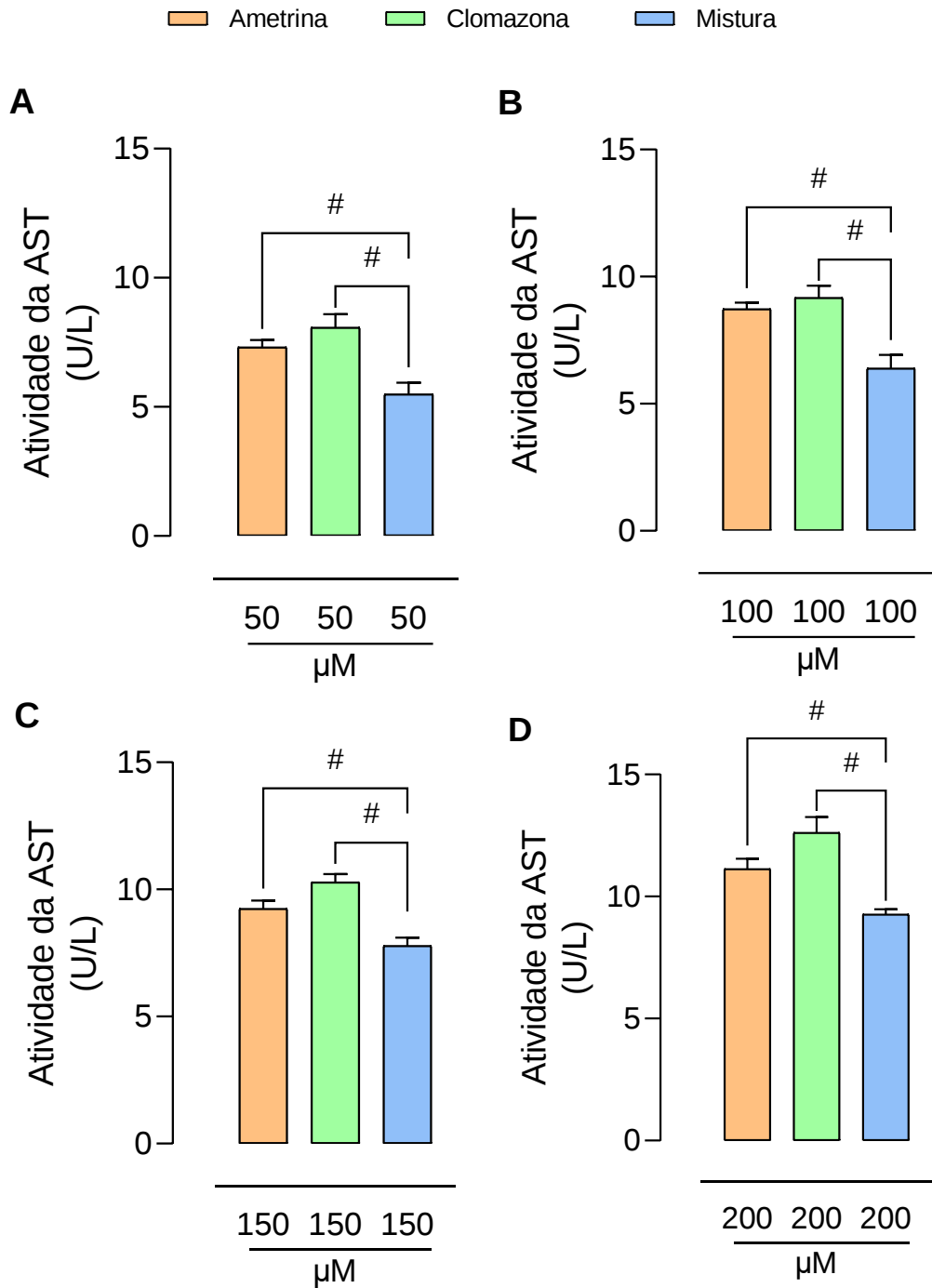
Fonte: Elaborado pela autora.

FIGURA 40 - Comparação entre os efeitos da ametrina, clomazona e a mistura dos dois herbicidas sobre Atividade das enzimas AST em células HepG2 após exposição por 24 h. #Estatisticamente significativo em relação a mistura dos herbicidas ($p < 0,05$).



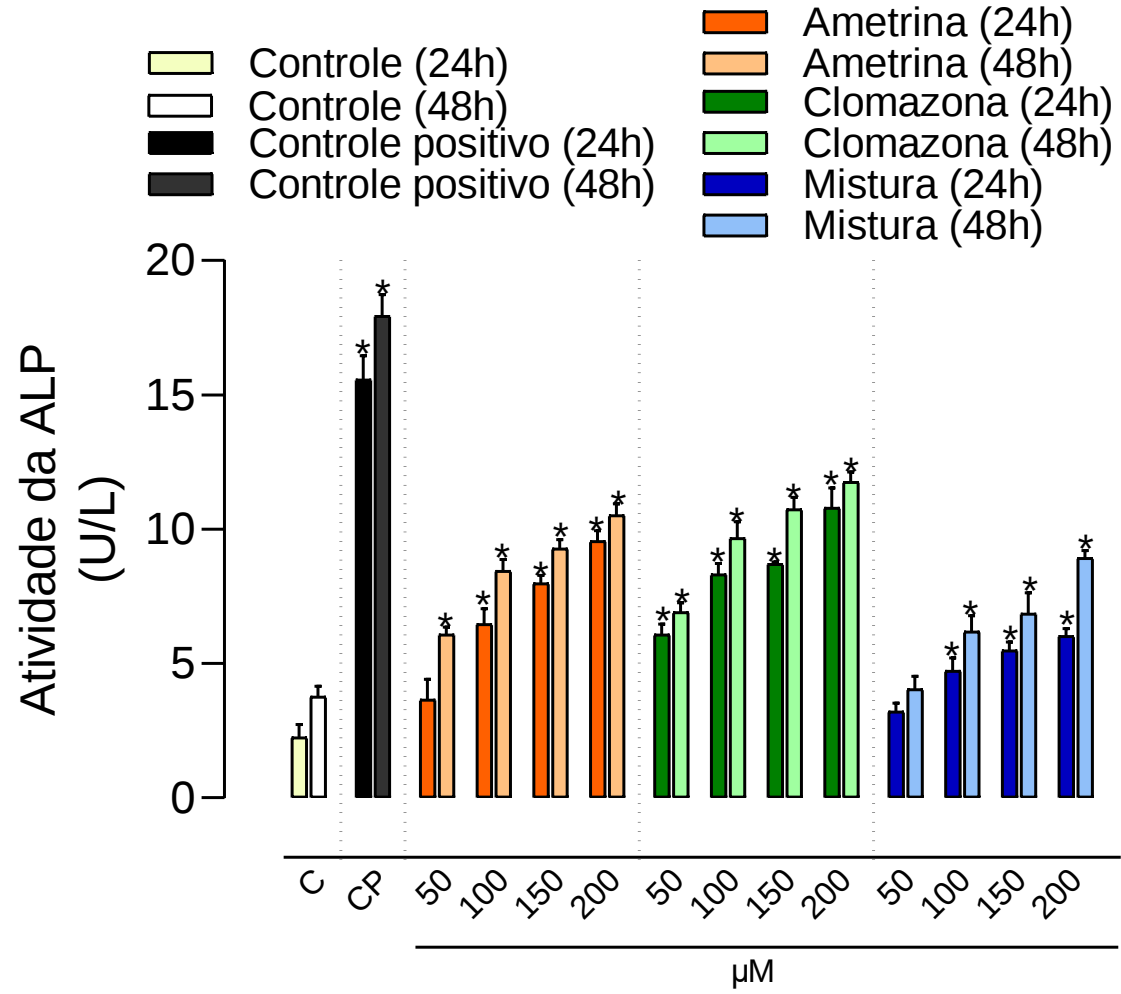
Fonte: Elaborado pela autora.

FIGURA 41 - Comparação entre os efeitos da ametrina, clomazona e a mistura dos dois herbicidas sobre Atividade das enzimas AST em células HepG2 após exposição por 48 h. #Estatisticamente significativo em relação a mistura dos herbicidas ($p < 0,05$).



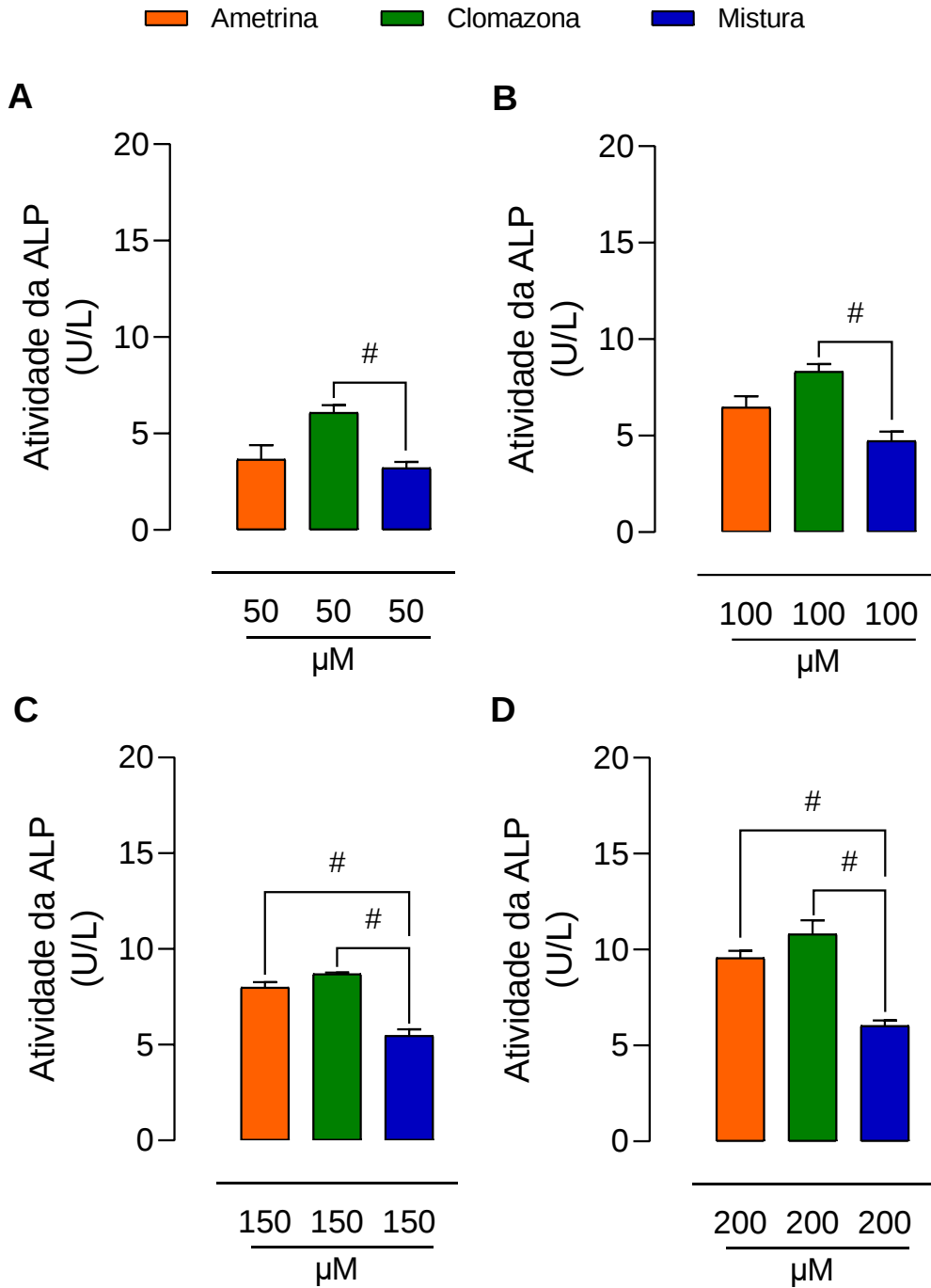
Fonte: Elaborado pela autora.

FIGURA 42 - Atividade das enzimas ALP em células HepG2 após exposição à AMT, CLZ e à associação (AMT + CLZ) por 24 h e 48 h. Os dados são expressos como média $\pm$ EPM obtidos a partir de três experimentos independentes realizados com diferentes populações de células. *Estatisticamente significativo em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). C = controle, apenas 0,1% de DMSO; CP = controle positivo com adição Triton x-100 0,2%.



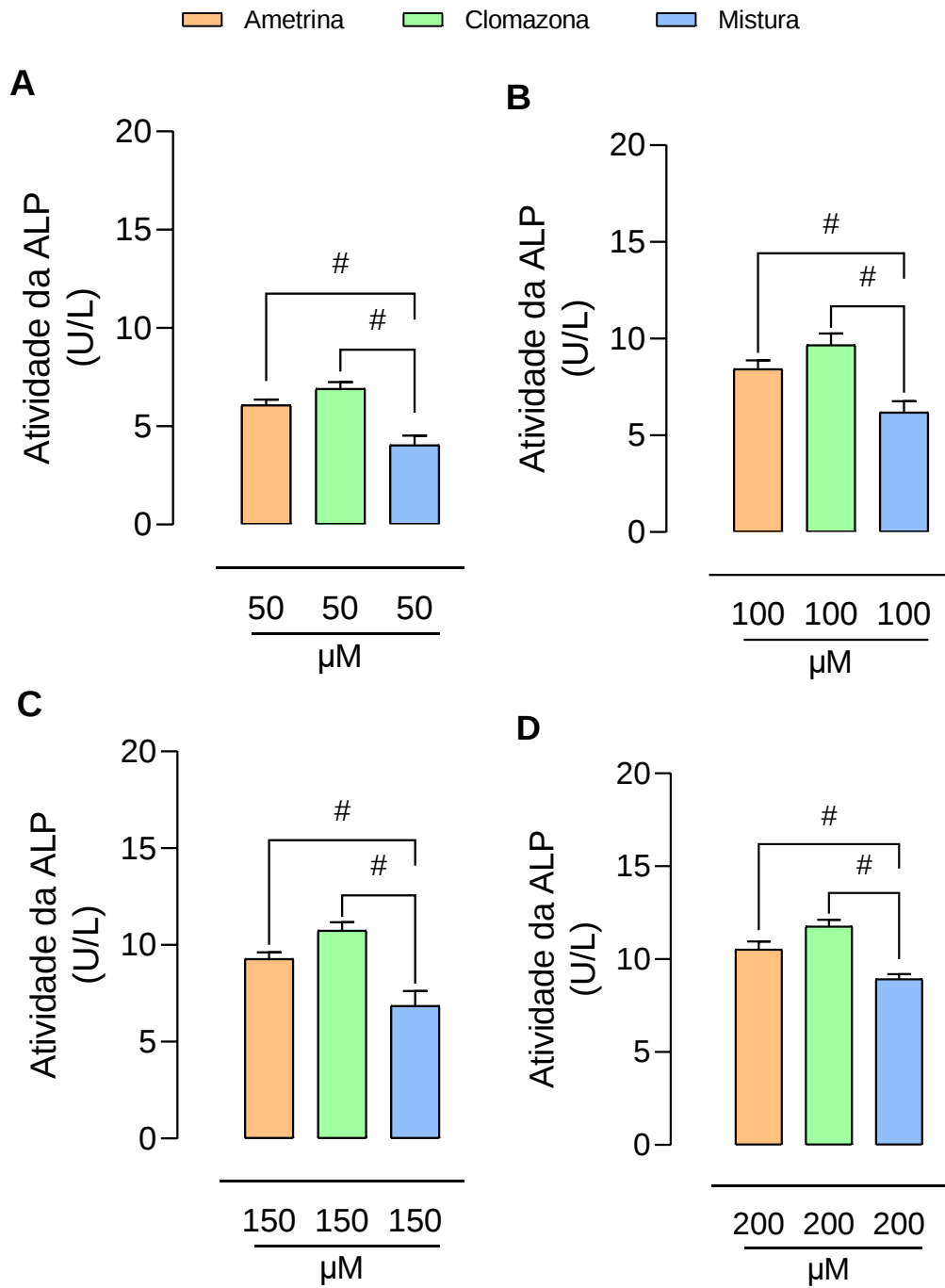
Fonte: Elaborado pela autora.

FIGURA 43 - Comparação entre os efeitos da ametrina, clomazona e a mistura dos dois herbicidas sobre Atividade das enzimas ALP em células HepG2 após exposição por 24 h. #Estatisticamente significativo em relação a mistura dos herbicidas ($p < 0,05$).



Fonte: Elaborado pela autora.

FIGURA 44 - Comparação entre os efeitos da ametrina, clomazona e a mistura dos dois herbicidas sobre Atividade das enzimas ALP em células HepG2 após exposição por 48 h. #Estatisticamente significativo em relação a mistura dos herbicidas ($p < 0,05$).



Fonte: Elaborado pela autora.

FIGURA 45 - Sumarização dos efeitos da ametrina, clomazona e da mistura (AMT + CLZ) em células HepG2 após 24 e 48 h de exposição (50–200 μ M), em comparação ao controle. Foram avaliados parâmetros de viabilidade, metabolismo, integridade celular, enzimas hepáticas e função mitocondrial.

Ametrina Clomazona Mistura			Comparação entre o controle e os tratamentos											
			24 horas				48 horas							
			50 μM	100 μM	150 μM	200 μM	50 μM	100 μM	150 μM	200 μM				
Proliferação celular														
Atividade metabólica														
Lactato desidrogenase														
Exclusão do azul de tripan														
Aspartato aminotransferase (AST)														
Alanina aminotransferase (ALT)														
Fosfatase alcalina (ALP)														
Massa mitocondrial														
Atividade mitocondrial														
Potencial de membrana mitocondrial														
Níveis intracelulares de ATP														

Fonte: Elaborado pela autora.

FIGURA 46 - Sumarização dos efeitos da ametrina e da clomazona em células HepG2 após 24 e 48 h de exposição (50–200 μ M), em comparação com a mistura dos herbicidas (AMT + CLZ). Foram avaliados parâmetros de viabilidade, metabolismo, integridade celular, enzimas hepáticas e função mitocondrial.

Ametrina Clomazona		Comparação entre as substâncias isoladas e a mistura							
		24 horas				48 horas			
		50 μM	100 μM	150 μM	200 μM	50 μM	100 μM	150 μM	200 μM
Proliferação celular									
Atividade metabólica									
Lactato desidrogenase									
Exclusão do azul de tripan									
Aspartato aminotransferase (AST)									
Alanina aminotransferase (ALT)									
Fosfatase alcalina (ALP)									
Massa mitocondrial									
Atividade mitocondrial									
Potencial de membrana mitocondrial									
Níveis intracelulares de ATP									

Fonte: Elaborado pela autora.

8 DISCUSSÃO

De modo geral, os resultados obtidos demonstram que os herbicidas ametrina e clomazona promoveram alterações significativas na viabilidade celular, na integridade de membrana, na liberação de enzimas hepáticas e, sobretudo, na função bioenergética mitocondrial das células HepG2. Os efeitos tóxicos foram mais pronunciados quando os herbicidas foram administrados de forma isolada, enquanto a exposição combinada resultou em respostas celulares menos intensas, evidenciando um comportamento antagônico entre as substâncias. Esses achados indicam que a toxicidade dos herbicidas não depende apenas da concentração ou do tempo de exposição, mas também da interação entre as substâncias no ambiente celular, o que reforça a complexidade das respostas toxicológicas associadas à coexposição a xenobióticos.

A redução da proliferação celular e da viabilidade metabólica, associada ao aumento da liberação de lactato desidrogenase (LDH) e à diminuição da exclusão do azul de tripan, confirma o potencial citotóxico dos herbicidas avaliados. Esses efeitos foram acompanhados por alterações expressivas na bioenergética mitocondrial, caracterizadas pela diminuição do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), da massa mitocondrial, da atividade mitocondrial e dos níveis intracelulares de ATP, especialmente nos tratamentos com herbicidas isolados. A mitocôndria é amplamente reconhecida como um dos principais alvos de xenobióticos hepatotóxicos, sendo a disfunção mitocondrial um evento central na indução de morte celular, estresse oxidativo e comprometimento metabólico em hepatócitos (Zhang *et al.*, 2012; Wallace, 2018).

Nesse contexto, os resultados obtidos no presente estudo encontram forte respaldo nos dados apresentados por dos Santos Silva *et al.* (2025), que demonstraram, em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, que tanto a ametrina quanto a clomazona promovem disfunção bioenergética mitocondrial por mecanismos diretos. Esses autores observaram inibição da respiração mitocondrial por ambos os herbicidas, bem como redução do potencial de membrana mitocondrial e da síntese de ATP. Além disso, a clomazona apresentou um perfil de toxicidade mitocondrial mais amplo, inibindo tanto o complexo I quanto o complexo II da cadeia respiratória, além de comprometer a atividade da ATP sintase, enquanto a ametrina apresentou um efeito mais restrito, predominantemente associado ao complexo I. Esses achados

mecanísticos ajudam a explicar, em nível subcelular, as alterações observadas no modelo HepG2, no qual a perda do $\Delta\Psi_m$ e a redução dos níveis de ATP refletem diretamente a disfunção da fosforilação oxidativa descrita no modelo de mitocôndrias isoladas.

A clomazona apresentou maior impacto sobre os parâmetros avaliados no presente estudo, promovendo maior comprometimento da função mitocondrial e maior liberação de enzimas hepáticas quando comparada à ametrina. Esse comportamento é consistente com os dados de dos Santos Silva *et al.* (2025), que demonstraram que a clomazona inibe simultaneamente múltiplos pontos da cadeia respiratória mitocondrial, incluindo os complexos I e II, além da ATP sintase. Essa interferência múltipla compromete de forma mais acentuada o fluxo de elétrons, a manutenção do potencial eletroquímico da membrana mitocondrial e a produção de ATP, levando a um colapso bioenergético mais severo. Adicionalmente, estudos prévios indicam que a clomazona pode aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) como consequência da disfunção da cadeia respiratória, contribuindo para a perda da homeostase celular e para a amplificação do dano mitocondrial (Li *et al.*, 2019; Pereira *et al.*, 2021).

A ametrina, por sua vez, demonstrou efeitos citotóxicos intermediários, compatíveis com relatos que associam esse herbicida à indução de estresse oxidativo e alterações metabólicas em células hepáticas (Campos *et al.*, 2019; Gadelha *et al.*, 2020). De acordo com os dados mecanísticos obtidos em mitocôndrias isoladas, a toxicidade da ametrina está associada principalmente à inibição do complexo I, sem interferência significativa no complexo II, o que resulta em uma disfunção bioenergética mais restrita e menos intensa quando comparada à clomazona. Essa diferença no espectro de ação mitocondrial explica, de forma coerente, a menor redução do $\Delta\Psi_m$, da produção de ATP e da viabilidade celular observada nas células HepG2 expostas à ametrina isoladamente.

Em contraste, a associação entre ametrina e clomazona resultou em menor comprometimento da viabilidade celular, da função mitocondrial e da liberação de enzimas hepáticas, caracterizando um efeito antagônico. Embora muitos estudos relatem efeitos aditivos ou sinérgicos decorrentes da exposição a misturas de praguicidas, interações antagônicas também são descritas na literatura e podem estar relacionadas à competição por alvos mitocondriais, à modulação do fluxo de elétrons

na cadeia respiratória ou à ativação de mecanismos compensatórios celulares, como vias de detoxificação e adaptação metabólica (Buc-calderon; Frélin, 1994; Hernández *et al.*, 2017).

Os achados de Silva *et al.* (2024) reforçam essa interpretação, ao demonstrarem que a exposição de zebrafish a misturas de praguicidas resultou em menor toxicidade hepática em comparação à exposição aos compostos isolados, efeito atribuído à modulação das enzimas do citocromo P450 e à ativação de vias de defesa celular. Esses autores também observaram menor dano mitocondrial e menor indução de estresse oxidativo nas exposições combinadas, corroborando a hipótese de que a interação entre diferentes xenobióticos pode desencadear respostas adaptativas capazes de atenuar os efeitos tóxicos. Esses resultados estão em consonância com os dados do presente estudo, que evidenciam preservação parcial da bioenergética mitocondrial e menor liberação de enzimas hepáticas na associação entre ametrina e clomazona.

As alterações observadas nos níveis de AST, ALT e ALP reforçam essa interpretação. O aumento dessas enzimas é amplamente reconhecido como marcador de lesão hepática e comprometimento da integridade celular em modelos *in vitro* (Ozer *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2021). No presente estudo, a menor liberação enzimática nos tratamentos associados sugere que a coexposição reduziu o dano hepático em comparação aos herbicidas isolados, possivelmente em decorrência da modulação da função mitocondrial e da indução de mecanismos de proteção celular.

Portanto, os resultados obtidos ampliam a compreensão sobre os efeitos de misturas de herbicidas em sistemas biológicos, demonstrando que a toxicidade combinada nem sempre resulta em efeitos aditivos ou sinérgicos. A evidência de um efeito antagônico entre ametrina e clomazona destaca a complexidade das interações químicas em nível celular e reforça a importância da avaliação integrada de parâmetros citotóxicos e bioenergéticos em estudos toxicológicos. Considerando o uso extensivo desses herbicidas em culturas agrícolas e a crescente exposição ambiental e humana a múltiplos praguicidas, os achados do presente estudo contribuem de forma relevante para a avaliação de risco e para o entendimento dos mecanismos envolvidos na hepatotoxicidade associada à exposição a xenobióticos.

9 CONCLUSÃO

Conclui-se que, embora os praguicidas avaliados individualmente tenham promovido redução significativa da viabilidade celular, alterações na bioenergética mitocondrial e aumento de biomarcadores de lesão hepática, a associação entre ametrina e clomazona resultou em efeitos toxicológicos menos pronunciados, caracterizando uma interação de natureza antagônica, observada de forma consistente nos diferentes ensaios e tempos de exposição (24 e 48 h); assim, os achados evidenciam que a toxicidade de misturas não é necessariamente aditiva ou sinérgica, contribuindo para a compreensão das interações entre xenobióticos na bioenergética celular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA**. Brasília: Anvisa 2019.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Monitora resíduos de agrotóxicos em alimentos**: relatório 2021. Brasília: Anvisa, 2021.

ALTMAN, S. A.; RANDERS, L.; RAO, G. Comparison of trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations. **Biotechnology Progress**, v. 9, n. 6, p. 671–674, nov./dez. 1993. DOI 10.1021/bp00024a017

ANDRES, A.; MACHADO, S. L. O. **Arroz irrigado no sul do Brasil**. Brasília: Embrapa, 2004.

ARMAS, E. D.; MONTEIRO, R. T. R.; ANTUNES, P. M.; SANTOS, M. A. P. F.; CAMARGO, P. B. Diagnóstico espaço-temporal da ocorrência de herbicidas nas águas superficiais e sedimentos do Rio Corumbataí e principais afluentes. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1119-1127, 2007.

BRITO, R. G. human exposure to pesticide mixtures: an integrative review of biomonitoring studies. **Environmental Research**, v. 204, p. 111984, 2022.

BLOCH. D.; DIEL, P.; EPE. B.; HELLWIG. M.; LAMPEN. A.; MALLY. A.; MARKO. D.; VILLAR FERNÁNDEZ. M.A.; GUTH S.; ROTH. A.; MARCHAN. R.; GHALLAB. A.; CADENAS. C.; NELL. P.; VARTAK. N.; VAN THRIEL. C.; LUCH. A.; SCHMEISSER. S.; HERZLER. M.; LANDSIEDEL. R.; LEIST. M.; MARX-STOELTING. P.; TRALAU. T.; HENGSTLER, J. G. Basic concepts of mixture toxicity and relevance for risk evaluation and regulation. **Archives of Toxicology**, v. 97, p. 3005–3017, 2023.

BUC-CALDERON, P.; FRÉLIN, C. Regulation of intracellular ATP levels in cultured cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1187, n. 3, p. 199–204, 1994.

BUC-CALDERON, P.; FRÉLIN, C. Role of mitochondrial metabolism in the cytotoxicity of xenobiotics. **Toxicology in Vitro**, v. 8, n. 1, p. 3–9, 1994.

CAMPOS, E. V. R. Use of botanical insecticides for sustainable agriculture: future perspectives. **Ecological Indicators**, v. 105, p. 483–495, 2019.

CAMPOS, L. M.; SILVA, R. A.; OLIVEIRA, M. M.; SANTOS, A. P. Oxidative stress and cytotoxicity induced by ametryn in hepatic cells. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 67, p. 34–41, 2019.

CARVALHO, F. P. Pesticides, environment, and food safety. **Food and Energy Security**, v. 6, n. 2, p. 48–60, 2017.

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, n. 1, p. 97-106, 2011.

CEDERGREEN, N. Quantifying a systematic review of mixture toxicity studies within environmental toxicology. **Plos One**, v. 9, n. 5, p. 96580-96581, 2014.

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. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 40, p. 159-165, 2005.

CHOI, J. M.; OH, S. J.; LEE, S. Y.; IM, J. H.; OH, J. M.; RYU, C. S.; KWAK, H. C.; LEE, J. Y.; KANG, K. W.; KIM, S. K. HepG2 cells as an in vitro model for evaluation of cytochrome P450 induction by xenobiotics. **Archives Of Pharmacal Research**, Seoul, v. 38, n. 5, p. 691-704, 2014.

CRHISTOFFOLETI, P. J.; OVEJERO, R. F. L.; CARVALHO, J. C. **Aspectos de Resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 2. ed. Campinas. HRAC-BR, 2004.

CHRISTIE, A. E. Use of fluorescent dyes to monitor mitochondrial membrane potential in live cells: a comparative study. **Journal of Cellular Physiology**, v. 229, n. 5, p. 660–670, 2014. DOI 10.1002/jcp.24534.

CONTE, F. M.; CESTONARO, L. V.; PITON, Y. V.; GUIMARÃES, N.; GARCIA, S. C.; DIAS DA SILVA, D.; ARBO, M. D. Toxicity of pesticides widely applied on soybean cultivation: synergistic effects of fipronil, glyphosate and imidacloprid in HepG2 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 84, p. 105446, 2022.

DAMALAS, C. A.; ELEFTHEROHORINOS, I. G. Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 8, p. 1402–1419, 2011.

DEMARTELAERE, A. C. F.; COUTINHO, P. W. R.; SILVA, T. P. P.; ESTEVES JUNIOR, F. C.; SILVA, N. S. G.; SILVA, A. P.; SOUZA, J. B.; MATA, T. C.; LORENZETTI, E.; CONCEIÇÃO, A. G. Cu. Damage caused environment, animals and man with the use pesticides: bibliographic review. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 9, p. 94668-94695, 2021.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunological Methods**, v. 89, n. 2, p. 271–277, 1986.

DORS, G. C. Distribution of pesticide residues in rice grain and in its processing fractions. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2011.

DOS SANTOS SILVA, H. P.; ORTIZ, C.; MIRANDA, C. A.; VEIGA BIZERRA, P. F.; PALMEIRA, C. M.; MINGATTO, F. E. Ametryn and clomazone disrupt mitochondrial bioenergetics in rat liver: evidence for inhibition of complexes I and II and ATP synthase. **Toxics**, Basel, v. 13, n. 9, p. 784, 2025. DOI: 10.3390/toxics13090784.

FAGUNDES, M. Z.; GONÇALVES, M. A.; SOARES, M. P.; MARTINS, M. L.; ZANELLA, R.; RIET-CORREA, F.; ANJOS, B.L. Clinico-pathological 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.

GADELHA, I. C. N. Toxic effects of pesticides on reproduction and development. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 74, p. 103303, 2020.

GADELHA, D. S.; COSTA, J. P.; LIMA, M. R.; FERREIRA, J. V. Hepatotoxic effects of ametryn exposure in vitro. **Chemosphere**, v. 248, p. 125–132, 2020.

GODOY, P. Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. **Archives of Toxicology**, v. 87, n. 8, p. 1315–1530, 2013. DOI 10.1007/s00204-013-1078-5.

GONÇALVES, C. R.; DELABONA, P. S. Strategies for bioremediation of pesticides: challenges and perspectives of the brazilian scenario for global application a review. **Environmental Advances**, v. 8, p. 100220, Jul. 2022.

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

GUILLOUZO, A. Liver cell models in vitro toxicology. Environmental Health
GUILLOUZO, C. Hepatotoxicity. *In*: BALISTERI, M. J.; GOULD, S. S.; MARTÍNEZ, J. (Eds.). **Pharmacology: a human perspective**. 5. Ed. New York: McGraw-Hill, 1998. p. 557-574.

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

HERNÁNDEZ, A. F.; GIL, F.; LACASAÑA, M. Toxicological interactions of pesticide mixtures. **Toxicology**, v. 373, p. 21–32, 2017.

IMBERTI, R. Mitochondrial dysfunction in toxic cell injury induced by drugs and xenobiotics. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 67, n. 1–3, p. 85–98, 1993. DOI 10.1016/0378-4274(93)90044-J

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.

JAESCHKE, H.; MCGILL, M. R. Cytotoxicity and mechanisms of liver injury. **Toxicological Sciences**, v.147, n.1, p.276-278, 2015.

Santos Júnior, A. B. C. **Herbicidas: princípios e práticas de uso**. São Paulo: Editora UFV, 2021. 320 p.

KAMALIAN, L. The application of in vitro cell-based assays to support drug safety assessment: a case study using ATP, respirometry and LDH assays. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 1, p. 211–218, 2015. DOI 10.1016/j.tiv.2014.09.014.

KAZAMA, R. FUJITA, S.; SAKAI, S. Cell Dome as an evaluation platform for organized HepG2 cells. **Cells**, v. 12, n. 1, p. 69, 23 dez. 2022.

LENGERICH, J. A. Mitochondrial mass governs the extent of human T cell senescence. **Aging Cell**, v. 12, n. 3, p. 421–429, 2020. DOI 10.1111/ace.13115.

LENGERICH, A.; GUIROU, D.; HENDERSHOT, M. Mitochondrial dynamics and cellular susceptibility to toxic stress. **Cell Death & Disease**, v. 11, n. 5, p. 1–13, 2020.

LENGERICH, J. A. Mitochondrial mass governs the extent of human T cell senescence. **Aging Cell**, v. 19, n. 3, p. e13079, 2020.

LI, F.; WANG, L.; JI, C.; WU, H.; ZHAO, J.; TANG, J. Toxicological effects of tris(2-chloropropyl) phosphate in human hepatic cells. **Chemosphere**, v. 187, p. 88-96, 2017.

LI, X.; ZHANG, Y.; WANG, Y. Clomazone-induced mitochondrial dysfunction and oxidative stress in hepatocytes. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 158, p. 120–128, 2019.

LI, X.; WANG, Y.; ZHANG, Q.; LIU, J.; CHEN, H.; WANG, L. Toxicological effects of clomazone exposure in HepG2 cells: oxidative stress, apoptosis, and mitochondrial dysfunction. **Chemosphere**, v. 330, p. 139732, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.139732>. Acesso em: 20 jul. 2025

LÓPEZ-PIÑEIRO, A.; SÁNCHEZ-TERRÓN, J.; MARTÍN-FRANCO, C.; PEÑA, D.; VICENTE, L. A.; GÓMEZ, S.; FERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, D.; ALBARRÁN, Á. Impacts of fresh and aged holm-oak biochar on clomazone behaviour in rice cropping soils after transition to sprinkler irrigation. **Geoderma**, v. 413, p. 115768, 2022.

MELO, R. F.; BRITO, L. T. L.; GIONGO, V.; ANGELOTTI, F.; MIGUEL, A. A. Pesticidas e seus impactos no ambiente. In: BRITO, L. T. L.; MELO, R. F.; GIONGO, V. (Org.). **Impactos ambientais causados pela agricultura no Semiárido brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2010. p. 101–136.

MENDONÇA, F. S.; FREITAS, S. H.; DÓRIA, R. G. S.; CAMARGO, L. M.; EVÊNCIO-NETO, J. Intoxicação por diclorvós e cipermetrina em bovinos no Mato Grosso – relato de caso. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 3, p. 1-3, 2010.

MIRANDA, C. A.; BERETTA, E. M.; FERREIRA, L. A.; DA SILVA, E. S. ; COIMBRA, B. Z. ; PEREIRA, P. T. ; MIRANDA, R. G. ; DORTA, D. J. ; RODRIGUES, F. T. V. ; MINGATTO, F. E. Role of biotransformation in the diazinon-induced toxicity in HepG2 cells and antioxidant protection by tetrahydrocurcumin. **Toxicology Reports**, v. 10, p. 32-39, 2023.

MIRANDA, C. A.; PEIXOTO, P. V. L.; VIRIATO, C.; AGGIO, L.; PEREIRA, L. C.; MINGATTO, F. E. Toxicity of ametryn and clomazone in zebrafish: environmentally

relevant concentrations induce developmental and enzymatic alterations. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 116, p. 104721, 2025.

OLIVEIRA-FILHO, J. C.; CARMO, P. M. S.; PIEREZAN, F.; TOCHETTO, C.; LUCENA, R. B.; RISSI, D. R.; BARROS, C. S. L. Intoxicação por organofosforado em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 10, p. 803-806, 2010.

ÖZER, J.; RATNER, M.; MINAMYIA, Y.; CARLSON, R. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. **Toxicology**, v. 245, n. 3, p. 194–205, 2008. DOI 10.1016/j.tox.2007.11.021

PANG, K. Simultaneous analysis and dietary exposure risk assessment of fomesafen, clomazone and clethodim in soybean ecosystem. **Food Chemistry**, 2020.

PENDERGRASS, W. Efficacy of MitoTracker Green™ and CMXRosamine to measure changes in mitochondrial membrane potentials in living cells and tissues. **Cytometry Part A**, v. 61, n. 2, p. 162–169, out. 2004. DOI 10.1002/cyto.a.20033

PEREIRA, A. C.; SOUZA, L. M.; RIBEIRO, R. F.; Oxidative and mitochondrial effects of clomazone exposure in liver cells. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 12, p. 15240–15252, 2021.

RUTKOWSKI, D. T. Cellular stress responses and metabolic reprogramming. **Molecular Cell**, v. 40, n. 2, p. 177–189, 2010. DOI 10.1016/j.molcel.2010.10.012.

SANTANA, M. S.; MELO, G. D.; SANDRINI-NETO, L.; DOMENICO, M.; PRODOCIMO, M. M. A meta-analytic review of fish antioxidant defense and biotransformation systems following pesticide exposure. **Chemosphere**, p. 132730, 2021.

SKEHAN, P. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107–1112, 1990. DOI 10.1093/jnci/82.13.1107.

SILVA, J. M.; NOVATO-SILVA, E.; FARIA, H. P.; PINHEIRO, T. M. M. Agrotóxico e trabalho: uma combinação perigosa para a saúde do trabalhador rural. **Ciência e Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 4, p. 891-903, 2005.

SILVA, R. A. Ametrina e clomazona causam toxicidade mitocondrial *in vitro* em fígado de zebrafish. **Revista Unesp de Ciências Biomédicas**, v. 5, n. 1, p. 22–31, 2024.

SILVA, R. T.; ALMEIDA, P. R.; COSTA, M. E. Modulation of cytochrome P450 and hepatotoxicity in zebrafish exposed to pesticide mixtures. **Aquatic Toxicology**, v. 264, p. 106–115, 2024.

SOUZA, F. R.; BESSA, M. M.; FERNANDES, M. Y. P.; OLIVEIRA, D. P. Clomazone induces hepatotoxicity in human liver cells: involvement of oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and apoptosis. **Molecular Membrane Biology**, v. 41, n. 1, p. 1-12, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/13510002.2024.2424677>. Acesso em: 20 jul. 2025.

STEFANO, P. H. P.; ROISENBERG, A.; SANTOS, M. R.; DIAS, M. A.; MONTAGNER, C. C. Unraveling the occurrence of contaminants of emerging concern in groundwater

from urban setting: a combined multidisciplinary approach and self-organizing maps. **Chemosphere**, v. 299, p. 134395, 2022.

STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Current Protocols in Immunology**, v. 111, n. 1, p. A3.B.1–A3.B.3, 2015. DOI 10.1002/0471142735.ima03bs111.

TAVARES, D. C. Investigation of cytotoxic, genotoxic, and oxidative effects of the herbicide Clomazone in human lymphocytes and HepG2 cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, e112271, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112271>. Acesso em: 20 jul. 2025.

TOMASHEVSKY, A. ATP assay for assessing cellular viability and cytotoxicity. *Journal of Visualized Experiments*, v. 111, e54059, 2016. DOI 10.3791/54059

TOMASHEVSKY, M. Gene expression profiles reveal mitochondrial dysfunction in response to complex chemical mixtures. **Environmental Science & Technology**, v. 50, n. 11, p. 5608–5616, 2016.

VARGAS-MENDOZA, N.; MORALES-GONZÁLEZ, Á.; MADRIGAL-SANTILLÁN, E.; ANGUIANO-ROBLEDO, L.; GARCÍA-PINEDA, J. A.; MORALES-GONZÁLEZ, J. A. Hepatotoxicity by clomazone and protective effects of natural antioxidants: a review. **Antioxidants**, v. 12, n. 4, p. 885, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antiox12040885>. Acesso em: 20 jul. 2025.

WALLACE, K. B. Mitochondrial targets of drug toxicity. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 58, p. 395–418, 2018.

WANG, D. Protective role of Nrf2 against oxidative stress induced by herbicides in liver cells. **Chemosphere**, v. 267, p. 128889, 2021.

WANG, Z.; ZHANG, Y.; LIU, H.; SUN, Y. Hepatotoxicity assessment of environmental chemicals using human hepatoma HepG2 cells: A systematic review of in vitro studies. **Chemosphere**, v. 263, 127921, 2021. DOI 10.1016/j.chemosphere.2020.127921

WANG, Y., ZHANG, Y., ZHOU, R., LIU, Y., & LIU, G. (2021). Assessment of hepatotoxicity by quantifying AST and ALT in HepG2 cells: implications drug-induced liver injury. **Toxicology in Vitro**, v.75, 105177, 2021. DOI 10.1016/j.tiv.2021.105177

WANG, P.; XU, X.; SONG, S.; AIHONG; LIU, L.; KUANG, H.; XU, C.. Rapid and sensitive detection of clomazone in potato and pumpkin samples using a gold nanoparticle-based lateral-flow strip. **Food Chemistry**, v. 375, p. 131888, 2022.

WILKENING, S.; STAHL, F. BADER, A. HepG2 as a human hepatic cell model for the in vitro cytochrome P450 induction and cytotoxicity screening of drugs and drug-like substances. **Chemico-Biological Interactions**, v.142, n.3, p.321-333, 2023.

YANG, X.; ZHAO, W.; WANG, Z.; HUANG, Y.; LEE, S.M.Y.; TAO, Z.; WANG, R. Toxicity of hemimethyl-substituted cucurbit[7]uril. **Food and Chemical Toxicology**, v. 108, p. 510-518, 2017.

YOULE, R. J.; VAN DER BLIEK, A. M. Mitochondrial fission, fusion, and stress. **Science**, v. 337, n. 6098, p. 1062–1065, 2012.

ZANELLA, R.; PRIMEL, E.G.; MACHADO, S.L.O. 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.

ZHANG, L.; WANG, X.; LI, Y.; LI, X.; ZHANG, X.; ZHANG, Q. Clomazone-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human liver cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 15, p. 8107, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms23158107>. Acesso em: 20 jul. 2025.

ZHANG, Y. Mitochondrial dynamics regulates hepatocyte apoptosis and autophagy in liver diseases. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 34, n. 2, p. 563–574, 2014. DOI 10.1159/000366047.

ZHANG, X. Use of MitoTracker Green FM to measure mitochondrial mass in HepG2 cells. **Cellular Physiology**, v. 8, n. 4, p. 255–263, 2004.