



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO  
DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA**

**Lucas Roberto Ferreira Polido**

**Efeitos do ácido 2,4-diclorofenoxiacético isolado e em  
produto formulado nos parâmetros funcionais de  
mitocôndrias hepáticas isoladas**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio  
de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para  
obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Lílian Cristina Pereira

**Botucatu  
2023**

Lucas Roberto Ferreira Polido

Efeitos do ácido 2,4-diclorofenoxiacético isolado e em  
produto formulado nos parâmetros funcionais de  
mitocôndrias hepáticas isoladas

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina, Universidade Estadual Paulista  
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de  
Botucatu, para obtenção do título de  
Mestre em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Lílian Cristina Pereira

Botucatu  
2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Polido, Lucas Roberto Ferreira.

Efeitos do ácido 2,4-diclorofenoxiacético isolado e em produto formulado nos parâmetros funcionais de mitocôndrias hepáticas isoladas / Lucas Roberto Ferreira Polido. - Botucatu, 2023

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Lílían Cristina Pereira

Capes: 40105008

1. Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético. 2. Bioquímica. 3. Mitocôndrias. 4. Toxicologia.

Palavras-chave: 2,4-D; Bioquímica; Mitocôndrias; Toxicologia.

**ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE LUCAS ROBERTO FERREIRA POLIDO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA, DA FACULDADE DE MEDICINA.**

Aos 20 dias do mês de dezembro do ano de 2023, às 09:30 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de LUCAS ROBERTO FERREIRA POLIDO, intitulada **Efeitos do ácido 2,4-diclorofenoxiacético isolado e em produto formulado nos parâmetros funcionais de mitocôndrias hepáticas isoladas**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. LÍLIAN CRISTINA PEREIRA (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Depto. de Bioprocessos e Biotecnologia / FCA/Botucatu - Unesp, Prof. Dr. MARCOS ROBERTO DE OLIVEIRA (Participação Virtual) do(a) ICBS/Porto Alegre - UFRGS, Profa. Dra. LYVIA LINTZMAIER PETIZ (Participação Virtual) do(a) Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular / Curitiba - UFPR. Após a exposição pelo mestrando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: APROVADO. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Profa. Dra. LÍLIAN CRISTINA PEREIRA

## **Impacto potencial desta pesquisa**

### **Título: Efeitos do ácido 2,4-diclorofenoxiacético isolado e em produto formulado nos parâmetros funcionais de mitocôndrias hepáticas isoladas**

Impacto científico esperado: Aprofundamento do conhecimento do potencial tóxico do herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) isolado, em comparação com a atividade de uma formulação comercial contendo 2,4-D, em mitocôndrias – organelas celulares.

Impacto social: A bioatividade de muitos herbicidas ainda não está completamente elucidada, bem como as diferenças entre as atividades dos ingredientes ativos e dos produtos formulados; portanto, novas abordagens metodológicas adicionam segurança à aplicação e à avaliação do risco destes produtos.

Impacto econômico: Por possuir baixo custo e boa eficácia, o 2,4-D é amplamente empregado na agricultura brasileira, tornando desejável o conhecimento de seus mecanismos íntimos de ação e de toxicidade.

## **Potential impact of this research**

### **Title: Effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, isolated and in a formulated product, on the functional parameters of isolated rat liver mitochondria**

Expected scientific impact: Deepening knowledge of the toxicity of the highly herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), in comparison with the activity of a commercial formulation containing 2,4-D, in mitochondria – cell organelles.

Social impact: The bioactivity of several herbicides has not yet been completely elucidated, as well as the differences between the activities of active ingredients and formulated products; therefore, new methodological approaches add security to the application and risk assessment of these products.

Economic impact: Due to its low cost and good effectiveness, 2,4-D is widely used in Brazilian agriculture, making knowledge of its intimate mechanisms of action and toxicity desirable.

## **Dedicatória**

### **À minha mãe**

À “dona Denise”, razão para as atitudes tomadas em meus bons caminhos.

### **À minha família**

Por me apoiarem, independentemente das muitas adversidades, sobrepujando as limitações e o sistema, apesar dos recursos limitados.

### **Aos meus amigos**

Por pintarem a aquarela dos meus dias.

## **Agradecimentos**

Agradeço à minha orientadora, doutora Lílian Cristina Pereira, antes pela aposta em meu potencial, e então pelos ensinamentos, pela compreensão, pelo apoio, pela oportunidade e pelo exemplo a ser seguido.

Agradeço ao doutor Danilo França por ter sido apoio em momentos difíceis. Nós somos o resultado da soma dos nossos esforços: as origens e os desafios não importam quando a vontade de vencer é maior.

Agradeço aos meus amigos, doutores Elaine Camargo e Tony Grassi, pela amizade, pela humanidade e pelo altruísmo que sempre demonstraram.

Agradeço aos ex-colegas do Centro de Farmacomетria e Análises Toxicológicas (CFAT), da Unesp de Araraquara, especialmente meus amigos Leonardo Pinto e Jonata Oliveira.

Agradeço aos meus amigos, incluindo, mas não se limitando a: Alessandra Carolina, Fernanda Paiva, Mariana Zampin, Murilo Pazin, Rafael Guilen e Renata Gerassi, pelo apoio e pelo importante papel cumprido em minha trajetória.

Agradeço ao técnico de laboratório, Paulo Roberto Cardoso, à professora Daisy Salvadori e aos funcionários e colaboradores da Faculdade de Medicina de Botucatu, com ênfase na Unidade de Pesquisa Experimental (Unipex), que direta ou indiretamente viabilizaram este trabalho.

Por fim, agradeço aos demais colegas e ex-colegas de laboratório pelo grande papel cumprido no meu crescimento, profissional e também pessoal.

## Epígrafe

### Kingdom of Heaven (A New Age Dawns - Part V)

Reino do Céu (Uma Nova Era Desponta - Parte V)



(IV. *Paragons of Perfection*)

(IV. Padrões de Perfeição)

[...]

[...]

*We are linked in every way  
And we're strong as our weakest  
fragment  
Every word that we convey  
Is an act with consequences*

Estamos ligados em todos os sentidos  
E somos tão fortes quanto o nosso  
fragmento mais fraco  
Cada palavra que transmitimos  
É um ato com consequências

(V. *The Harsh Return*)

(V. O Árduo Retorno)

*Light creates us all  
Pride will make us fall  
Life is meaningful  
Life delights us all*

A luz cria a todos nós  
O orgulho nos fará cair  
A vida é significativa  
A vida deleita a todos nós



**Epica**

Tradução livre. Álbum “*Design Your Universe*”, 2009

## Resumo

A utilização de herbicidas tem aumentado substancialmente, devido ao papel significativo destes no desenvolvimento econômico do setor agrícola. Os herbicidas podem ser categorizados em diferentes classes, com diferentes mecanismos de ação e modos de toxicidade; os mimetizadores de auxina, por exemplo, possuem ação análoga às auxinas, fitormônios presentes nas células vegetais. Considerando que a mitocôndria é uma organela fundamental na manutenção de diversos processos biológicos, como equilíbrio energético e morte celular, este estudo objetiva investigar os mecanismos de toxicidade do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (ácido 2,4-D), um mimetizador de auxinas e um dos herbicidas mais utilizados na agricultura, em mitocôndrias hepáticas isoladas. Para essa finalidade, foram avaliados efeitos relacionados à bioenergética e à estrutura de mitocôndrias hepáticas isoladas de ratos Wistar jovens, expostas *in vitro* às concentrações de 0,4 a 200  $\mu\text{mol/L}$  de ácido 2,4-D isolado e ao produto formulado DMA 806 BR em concentrações equivalentes de ácido 2,4-D. Essa faixa compreende concentrações encontradas no ambiente, para melhor compreensão da relevância ambiental; e altas concentrações, com o intuito de investigar a participação da mitocôndria no mecanismo de toxicidade desses compostos como evento-chave inicial (*key event*) em correlação com os desfechos finais (*outcome pathways*) descritos na literatura. Os resultados demonstraram que a exposição *in vitro* de mitocôndrias hepáticas isoladas a até 200  $\mu\text{mol/L}$  das substâncias testadas não induz a formação de espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio e não oxida os nucleotídeos de piridina, além de não oxidar os grupos sulfidril das proteínas das membranas mitocondriais de maneira significativa, indicando ausência de desregulação redox ou de sobrecarga das defesas antioxidantes. A espectrofotometria indicou que não houve alteração na turbidez do meio contendo mitocôndrias isoladas após exposição, o que refletiria *swelling* mitocondrial; e essa observação foi corroborada pela análise das estruturas mitocondriais por microscopia eletrônica. A exposição às concentrações avaliadas não alterou os parâmetros de respiração mitocondrial – razão de controle respiratório (RCR), velocidade dos estados 3 e 4 (V3 e V4) e razão de ADP fosforilado por molécula de oxigênio consumida (ADP/O). No entanto, concentrações a partir de 100  $\mu\text{mol/L}$  do ácido 2,4-D isolado, superiores às geralmente encontradas no ambiente, foram capazes de dissipar o potencial de membrana e induzir o efluxo de cálcio em mitocôndrias isoladas; enquanto a exposição ao produto formulado testado foi capaz de fazê-lo a partir de 200  $\mu\text{mol/L}$ . Nossa hipótese é a de que, para exposições a concentrações iguais ou superiores a 100  $\mu\text{mol/L}$ , os efeitos toxicológicos iniciais do ácido 2,4-D nas mitocôndrias isoladas são interações químicas com as membranas mitocondriais, considerando a presença de funções importantes como o grupo ácido carboxílico, que o torna quimicamente semelhante a muitos ácidos graxos naturais, que são componentes das membranas lipídicas; e como os átomos de cloro presentes no anel, que contribuem para a polaridade e eletronegatividade da molécula e podem interagir com elementos de membrana, como os fosfatos. Os mecanismos de toxicidade do ácido 2,4-D e os efeitos de suas formulações devem ser investigados em outros modelos experimentais, para elucidar os principais eventos toxicológicos.

**Palavras-chave:** 2,4-D; Mitocôndrias; Toxicologia.

## Resumo acessível

O uso de produtos para controlar pragas tem aumentado bastante porque eles são muito importantes para a agricultura do Brasil. Esses produtos ajudam a ter mais alimentos nas plantações e protegem as plantas, mas também podem ser perigosos para o ambiente e para a saúde das pessoas se não forem usados corretamente. Os cientistas fazem testes em animais e em outros seres vivos para entender o quanto esses produtos são perigosos. Nós estamos estudando um produto químico chamado “ácido 2,4-diclorofenoxiacético”, ou “2,4-D”, que é usado nas plantações no Brasil para combater ervas daninhas. Queremos saber como esse produto afeta uma parte muito importante das células, chamada mitocôndria, que faz com que as células tenham energia para funcionar. Testamos esse produto diretamente em mitocôndrias de ratos e encontramos alguns efeitos: quando usamos quantidades altas do produto, a mitocôndria perde algumas funções importantes. Também, o efeito pode ser diferente se for usado o produto sozinho, em vez de misturado com outros componentes, como acontece quando é feita a compra para aplicação. Este estudo serve para ajudar a garantir que os produtos que usamos sejam seguros para as pessoas, para os animais e para o ambiente.

## Abstract

The use of herbicides has increased substantially, due to their significant role in the economic development of the agricultural sector. Herbicides can be categorized into different classes, with different mechanisms of action and modes of toxicity; synthetic auxins, for example, may act as auxins, phytohormones present in plant cells. Considering that mitochondria is an organelle fundamental to the maintenance of several biological processes, such as energy balance and cell death, this study aims to investigate the toxicity mechanisms of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), a synthetic auxin and one of the most widely used herbicides in agriculture, in isolated liver mitochondria. For this purpose, effects related to bioenergetics and the structure of hepatic mitochondria, isolated from young Wistar rats and exposed in vitro to concentrations of 0.4 to 200  $\mu\text{M}$  of isolated 2,4-D and to the formulated product DMA 806 BR in equivalent concentrations of 2,4-D were evaluated. This range of doses comprises concentrations already found in the environment, for a better understanding of environmental relevance; and high concentrations, aiming to investigate the role of mitochondria in the toxicity mechanism of these compounds as a key event, correlating with the final outcome pathways described in the literature. The results show that in vitro exposure of isolated liver mitochondria to up to 200  $\mu\text{M}$  of the tested substances does not induce the formation of reactive oxygen or nitrogen species and does not oxidize pyridine nucleotides, in addition to not oxidizing the sulfhydryl groups of mitochondrial membrane proteins significantly, indicating the absence of redox dysregulation or overload of antioxidant defenses. Spectrophotometry experiments indicated that there was no change in the turbidity of the medium containing isolated mitochondria after exposure, which would reflect mitochondrial swelling; and this observation was corroborated by the analysis of mitochondrial structures by transmission electron microscopy. Additionally, exposure to the evaluated concentrations did not alter mitochondrial respiration parameters – respiratory control ratio (RCR), speed of states 3 and 4 (S3 and S4) and phosphorylated ADP per oxygen molecule consumed ratio (ADP/O). However, concentrations from 100  $\mu\text{M}$  of isolated 2,4-D, higher than those generally found in the environment, were able to dissipate the membrane potential and to induce calcium efflux in isolated mitochondria; while exposure to the tested formulated product was able to do so from 200  $\mu\text{M}$ . Our hypothesis is that, for exposures to concentrations equal to or greater than 100  $\mu\text{M}$ , the initial toxicological effects of 2,4-D on isolated mitochondria are chemical interactions with mitochondrial membranes, considering the presence of important chemical functions such as the carboxyl, which makes it chemically similar to many natural fatty acids, components of lipid membranes; and such as the chlorine atoms present in the ring, which contribute to the polarity and electronegativity of the molecule and can interact with membrane elements, such as phosphates. The toxicity mechanisms of 2,4-D and the effects of its formulations should be further investigated in other experimental models to elucidate the main toxicological events.

**Keywords:** 2,4-D; Mitochondria; Toxicology.

## **Lista de ilustrações**

### **Capítulo 1: Revisão da literatura**

|                                                                                                                |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Figura 1 - Países que mais utilizaram praguicidas na agricultura em 2020, em milhares de toneladas.....</b> | <b>19</b> |
| <b>Figura 2 - Estrutura molecular do ácido indolacético .....</b>                                              | <b>20</b> |
| <b>Figura 3 - Mecanismo molecular de ação das auxinas .....</b>                                                | <b>22</b> |
| <b>Figura 4 - Estrutura molecular do ácido 2,4-diclorofenoxiacético .....</b>                                  | <b>23</b> |
| <b>Figura 5 - Potencial desacoplador de ácidos fenoxiacéticos.....</b>                                         | <b>27</b> |
| <b>Figura 6 - Estrutura básica de uma mitocôndria .....</b>                                                    | <b>28</b> |
| <b>Figura 7 - Esquematisação da fosforilação oxidativa .....</b>                                               | <b>31</b> |

### **Capítulo 2: Artigo científico**

|                                                                                                                                                                   |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Figure 1 - Formation and accumulation of RONS in isolated mitochondria after exposure to isolated and formulated 2,4-D .....</b>                               | <b>52</b> |
| <b>Figure 2 - NAD(P)H levels in isolated mitochondria after exposure to isolated and formulated 2,4-D .....</b>                                                   | <b>53</b> |
| <b>Figure 3 - Effects on the oxidation of sulfhydryl groups of mitochondrial proteins exposed to isolated and formulated 2,4-D .....</b>                          | <b>54</b> |
| <b>Figure 4 - Analysis of the membrane potential of mitochondria exposed to isolated and formulated 2,4-D .....</b>                                               | <b>55</b> |
| <b>Figure 5 - Analysis of calcium movement in mitochondria exposed to isolated and formulated 2,4-D.....</b>                                                      | <b>56</b> |
| <b>Figure 6 - Assessment of swelling of mitochondria exposed to isolated and formulated 2,4-D by spectrophotometry .....</b>                                      | <b>57</b> |
| <b>Figure 7 - Structural analysis of mitochondria exposed to the isolated and the formulated product containing 2,4-D by Transmission Electron Microscopy ...</b> | <b>58</b> |
| <b>Figure 8 - Oxygen consumption by isolated mitochondria exposed to 2,4-D ....</b>                                                                               | <b>59</b> |
| <b>Figure 9 - Oxygen consumption by isolated mitochondria exposed to formulated 2,4-D .....</b>                                                                   | <b>60</b> |
| <b>Figure 10 - Respiratory parameters of isolated mitochondria after exposure to 2,4-D .....</b>                                                                  | <b>61</b> |

|                                                                                                                               |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Figure 11 - Respiratory parameters of isolated mitochondria exposed to the formulated product containing 2,4-D.....</b>    | <b>62</b> |
| <b>Figure 13 - Summary of results observed after exposure of isolated mitochondria to isolated and formulated 2,4-D .....</b> | <b>68</b> |

## **Lista de abreviaturas e siglas**

**2,4,5-PT:** ácido 2-(2,4,5-triclorofenoxi)propiónico

**2,4,5-T:** ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético

**2,4-D:** (ácido) 2,4-diclorofenoxiacético

**Acetil-CoA:** acetilcoenzima A

**ADP/O:** razão de ADP fosforilado/oxigênio reduzido

**ADP:** difosfato de adenosina

**ANOVA:** análise de variância

**AREs:** elementos de resposta a auxina, do inglês *Auxin Response Elements*

**ARFs:** fatores de resposta à auxina, do inglês *Auxin Response Factors*

**ATP:** adenosina trifosfato

**Aux/IAA:** auxina/ácido indolacético

**CaCl<sub>2</sub>:** cloreto de cálcio

**CAS RN:** número de registro no Serviço de Resumos Químicos (*Chemical Abstracts Service Registry Number*)

**CCCP:** carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona

**CEMIB:** Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica

**CETESB:** Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

**CEUA:** Comissão de Ética no Uso de Animais

**Cl:** cloro

**CL<sub>50</sub>:** Concentração Letal mediana

**CME:** Centro de Microscopia Eletrônica

**COOH:** carboxila

**DCF:** diclorofluoresceína

**DCFDA:** diacetato de diclorodi-hidrofluoresceína

**DCFH:** diclorodi-hidrofluoresceína

**DMSO:** dimetilsulfóxido

**DNA:** ácido desoxirribonucleico

**DNAmt:** DNA mitocondrial

**DTNB:** ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico

**EGTA:** ácido etilenoglicol bis(2-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetra-acético

**ERONs:** Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio

**EROs:** Espécies Reativas de Oxigênio

**EUA:** Estados Unidos da América

**FADH<sub>2</sub>:** dinucleotídeo de flavina e adenina reduzido

**FMB:** Faculdade de Medicina de Botucatu

**H<sup>+</sup>:** íon de hidrogênio

**H<sub>2</sub>DCFDA:** diacetato de 2',7'-diclorodi-hidrofluoresceína

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** peróxido de hidrogênio

**HEPES:** ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico

**IAA:** ácido indolacético, do inglês *indol-3-acetic acid*

**IARC:** Agência Internacional para a Pesquisa em Câncer, do inglês *International Agency for Research on Cancer*

**KOH:** hidróxido de potássio

**MCPA:** ácido 4-cloro-2-metilfenoxiacético

**MET:** Microscopia Eletrônica de Transmissão

**NAD(P)<sup>+</sup>:** nucleotídeo de piridina oxidado

**NAD(P)H:** nucleotídeo de piridina reduzido

**NADH:** dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido

**NO:** óxido nítrico

**O<sub>2</sub>:** oxigênio molecular

**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>:** íons superóxido

**ONOO<sup>-</sup>:** peroxinitrito

**ONU:** Organização das Nações Unidas

**Pi:** fosfato inorgânico

**PTPM:** poro(s) de transição da permeabilidade mitocondrial

**q.s.p.:** quantidade suficiente para

**RCR:** razão de controle respiratório, do inglês *Respiratory Control Ratio*

**RNA:** ácido ribonucleico

**SIPE:** Sistema de Informação de Pesquisa e Experimentação

**SOD:** superóxido dismutase

**SP:** São Paulo

**TCA:** ácido tricloroacético

**TIR1/AFB:** complexo proteico de Resposta ao Inibidor de Transporte 1/F-Box de Sinalização de Auxina, do inglês *Transport Inhibitor Response 1/Auxin Signaling F-Box*

**TOXICAM:** Núcleo de Avaliação do Impacto Ambiental sobre a Saúde Humana

**Unesp:** Universidade Estadual Paulista

**Unicamp:** Universidade Estadual de Campinas

## Sumário

### Capítulo 1: Revisão da literatura

|                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------|----|
| Revisão da literatura .....                                       | 18 |
| A importância dos praguicidas para a agricultura .....            | 18 |
| Herbicidas mimetizadores de auxinas .....                         | 20 |
| O ácido 2,4-diclorofenoxiacético .....                            | 22 |
| As mitocôndrias como importantes indicadores em Toxicologia ..... | 28 |
| Referências bibliográficas .....                                  | 34 |

### Capítulo 2: Artigo científico

|                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------|----|
| 1 Introduction .....                                              | 43 |
| 2 Materials and methods.....                                      | 45 |
| 2.1 Materials, mitochondrial isolation and data processing .....  | 45 |
| 2.1.1 Samples.....                                                | 45 |
| 2.1.2 Animals.....                                                | 45 |
| 2.1.3 Mitochondrial isolation .....                               | 46 |
| 2.1.4 Dosage of mitochondrial proteins .....                      | 47 |
| 2.1.5 Statistical analysis .....                                  | 47 |
| 2.2 Experimental procedures .....                                 | 47 |
| 2.2.1 Formation of reactive oxygen and nitrogen species.....      | 47 |
| 2.2.2 Assessment of the redox state of pyridine nucleotides ..... | 48 |
| 2.2.3 Mitochondrial levels of protein sulfhydryl groups .....     | 48 |
| 2.2.4 Mitochondrial membrane potential.....                       | 49 |
| 2.2.5 Calcium efflux .....                                        | 49 |
| 2.2.6 Mitochondrial swelling.....                                 | 50 |
| 2.2.7 Structural analysis of mitochondria .....                   | 50 |
| 2.2.8 Mitochondrial respiration.....                              | 51 |

|                                                |    |
|------------------------------------------------|----|
| 3 Results.....                                 | 51 |
| 4 Discussion .....                             | 62 |
| 5 Conclusions .....                            | 69 |
| Conflicts of interest .....                    | 69 |
| References .....                               | 70 |
| Conclusão .....                                | 77 |
| Anexo: Certificado de aprovação pelo CEUA..... | 78 |

# Capítulo 1: Revisão da literatura

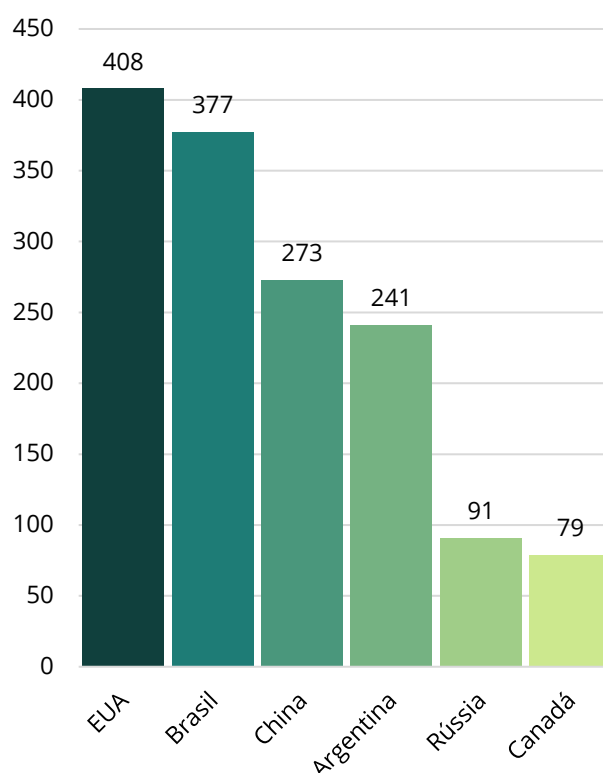
## Revisão da literatura

### A importância dos praguicidas para a agricultura

A população humana, estimada em mais de 8 bilhões de pessoas em 2023, continua a crescer. De acordo com projeções da Organização das Nações Unidas (ONU), seremos cerca de 8,5 bilhões de pessoas em 2030, e 9,7 bilhões em 2050 (1). Esses dados descrevem um cenário de preocupação quanto à insegurança alimentar, que demanda a criação e o melhoramento de estratégias de produção, estabilidade e disponibilidade de alimentos (2). O aumento da produtividade da agricultura é uma das possíveis intervenções e, nesse contexto, o manejo eficaz de pragas se faz essencial – considerando que entre 20% a 40% da produção agrícola mundial pode ser perdida anualmente devido à ação de pragas (3). Em países tropicais, como o Brasil, as perdas na agricultura são ainda mais preocupantes, uma vez que suas condições de temperatura e umidade favorecem o crescimento e o desenvolvimento dos mais variados tipos de infestação (4).

Uma das principais ferramentas de controle desses organismos é o uso de praguicidas, substâncias aplicadas intencionalmente ao ambiente para eliminar determinados organismos vivos. Alguns exemplos de praguicidas são os herbicidas, que controlam o crescimento de ervas daninhas; os inseticidas, que controlam a população de insetos; e os fungicidas, para controle de fungos (5). Segundo dados da FAO, em 2020, os Estados Unidos da América (EUA) lideravam o *ranking* de maiores utilizadores de praguicidas, com 408 mil toneladas de praguicidas aplicados na agricultura (figura 1). A seguir, em ordem decrescente, estavam o Brasil (377 mil toneladas), China (273 mil toneladas), Argentina (241 mil toneladas), Rússia (91 mil toneladas) e Canadá (79 mil toneladas) (6).

**Figura 1 - Países que mais utilizaram praguicidas na agricultura em 2020, em milhares de toneladas**



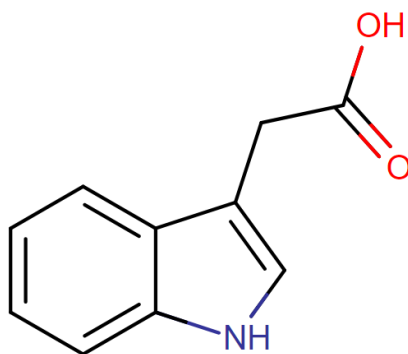
Em 2020, os Estados Unidos da América lideravam o *ranking* de maiores utilizadores de praguicidas, com 408 mil toneladas aplicadas na agricultura. O Brasil estava em segundo lugar, com um consumo estimado em 377 mil toneladas. Fonte: Elaborado pelo autor, adaptado de FAO (2022) (6).

Assim como as outras classes de praguicidas, os herbicidas são classificados em diferentes grupos com base em sua composição química e modo de ação. O glifosato, por exemplo, é um herbicida de amplo espectro que inibe uma enzima essencial para o crescimento das plantas (7). As sulfonilureias, como o sulfometuron-metil, interrompem a produção de aminoácidos essenciais nas plantas (8). Triazinas como atrazina e simazina interferem no processo de fotossíntese das plantas, mais precisamente no fotossistema II (9). Finalmente, os herbicidas do grupo fenoxi, como o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (ácido 2,4-D) mimetizam o hormônio vegetal auxina, causando crescimento descontrolado, desequilíbrio hormonal e, eventualmente, a morte da planta (10). Estas são apenas algumas dentre as diversas classes conhecidas de herbicidas.

## Herbicidas mimetizadores de auxinas

Outra importante classe de herbicidas compreende as moléculas cujo mecanismo de ação se dá pela atividade similar às auxinas, fitormônios com atividade onipresente nas plantas, representadas principalmente pelo ácido indol-3-acético (IAA, do inglês *indol-3-acetic acid*, figura 2). Conhecido como ácido indolacético, trata-se de um fitormônio que orchestra inúmeras funções no controle da divisão, da expansão e da diferenciação das células vegetais (10).

**Figura 2 - Estrutura molecular do ácido indolacético**



Fonte: DrugBank Online (2022) (11).

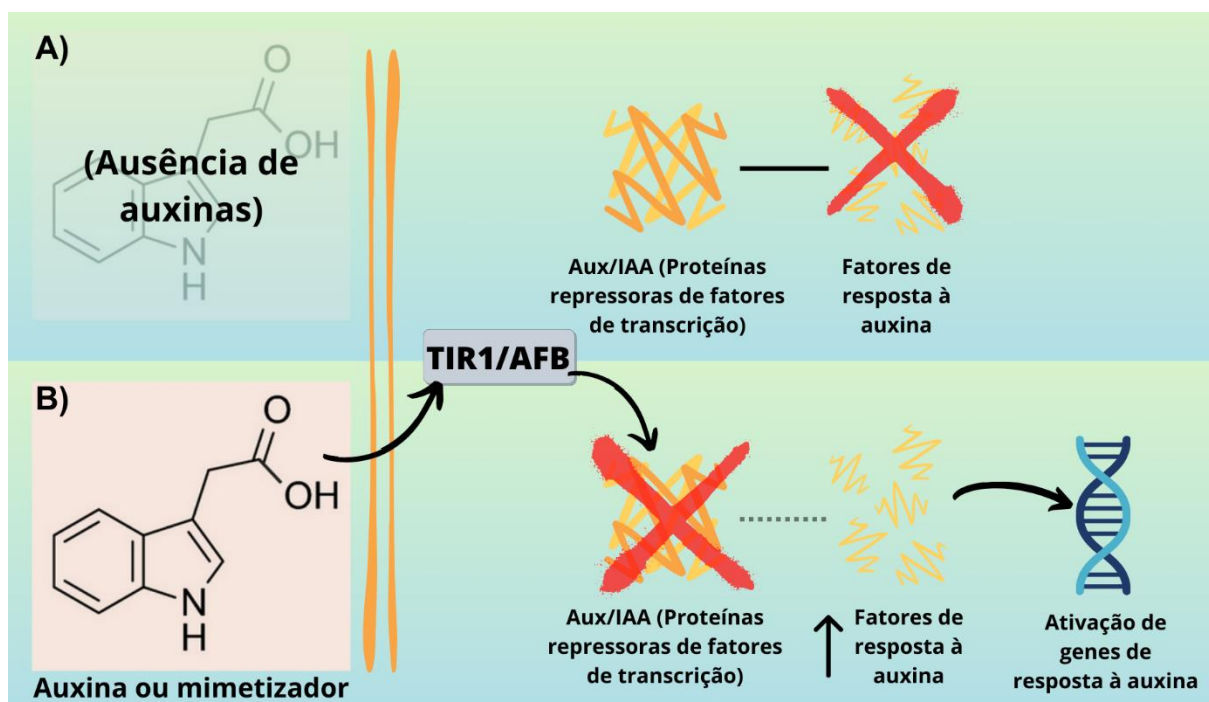
A classe de herbicidas auxínicos é extensa e inclui: ácidos benzoicos; ácidos fenoxiacéticos, como o ácido 2,4-D e o 2,4,5-T (ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético); e derivados de pirimidina, como o picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridinocarboxílico) e o triclopir (ácido [(3,5,6-tricloro-2-piridinil)oxi]acético). A relação estrutura-atividade dessa ampla classe de moléculas tem sido consistentemente estudada, em busca da elucidação da configuração molecular que evoca suas atividades (12).

As características físico-químicas sugerem que ligações reversíveis, envolvendo forças de van der Waals e interações hidrofóbicas e eletrostáticas provavelmente estão envolvidas na atividade das auxinas. Destaca-se o grupo carboxila fortemente negativo, separado de uma carga positiva mais fraca no anel aromático, porém, outros fatores como a lipofilicidade nuclear da molécula e os efeitos

estereoquímicos também podem participar dessa dinâmica (13,14). O mecanismo molecular de ação dos mimetizadores de auxina envolve a interação com receptores de auxina e elementos responsivos das células vegetais por similaridade e a subsequente modulação da expressão gênica (15).

O principal receptor envolvido na sinalização da auxina é o complexo proteico de Resposta ao Inibidor de Transporte 1/F-Box de Sinalização de Auxina (TIR1/AFB, do inglês *Transport Inhibitor Response 1/Auxin Signaling F-Box*), cuja ligação desencadeia uma alteração conformacional que permite o recrutamento e a ligação das proteínas adicionais Aux/IAA (Auxina/Ácido indolacético), que são marcadas para degradação por meio da via ubiquitina-proteassoma (15,16). Na ausência de auxina, as proteínas Aux/IAA interagem com fatores de transcrição chamados “fatores de resposta à auxina” (ARFs, do inglês *Auxin Response Factors*), inibindo-os (figura 3A); mas sua degradação por ocasião da atividade de auxinas permite que os ARFs livres desempenhem suas funções. Os ARFs se translocam ao núcleo e se ligam a sequências específicas de DNA denominadas “elementos de resposta a auxina” (AREs, do inglês *Auxin Response Elements*) dentro das regiões promotoras dos genes-alvo, ativando-as ou reprimindo-as (figura 3B) (14,16).

**Figura 3 - Mecanismo molecular de ação das auxinas**



**A)** Na ausência de auxinas, as proteínas Aux/IAA inibem os fatores de resposta à auxina. **B)** A ligação de auxinas ou mimetizadores ao complexo TIR1/AFB marca as proteínas Aux/IAA para degradação; assim, os fatores de resposta à auxina se translocam ao núcleo e se ligam aos elementos responsivos no DNA, ativando-os ou reprimindo-os (14–16). Fonte: Elaborado pelo autor.

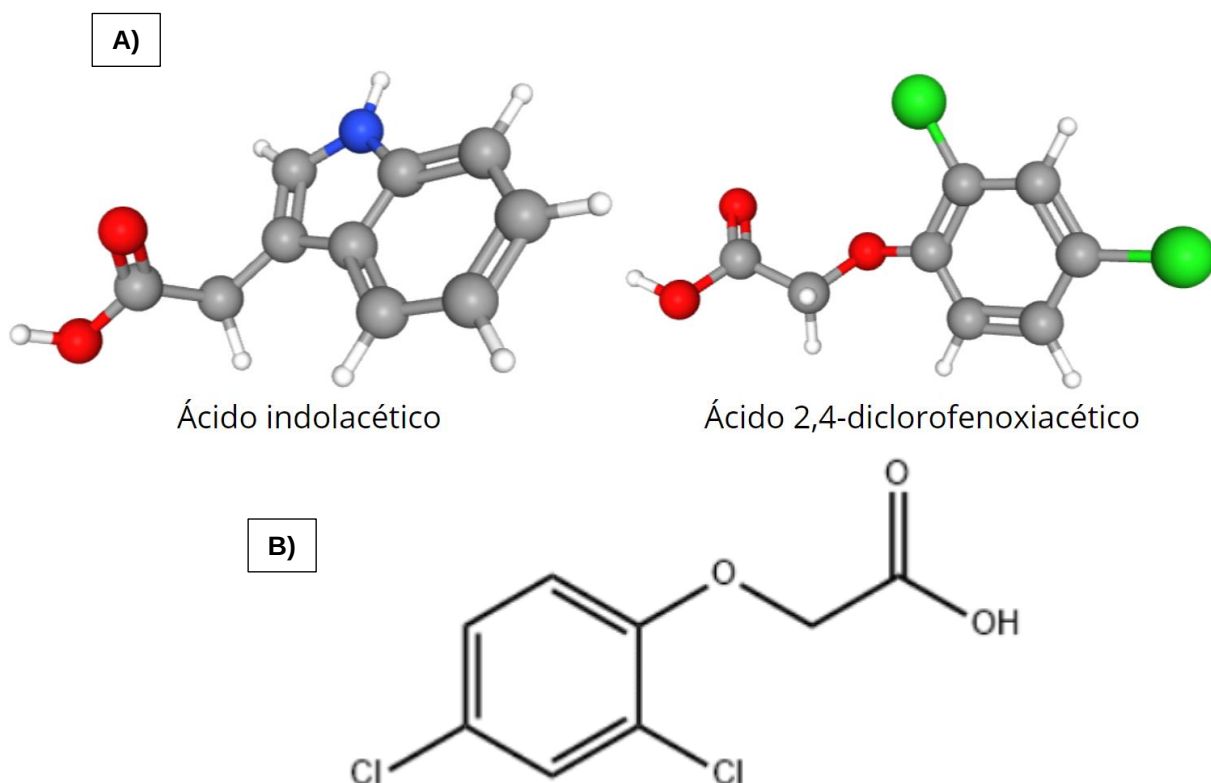
Esses padrões alterados de expressão gênica resultam em várias respostas fisiológicas nas plantas, como indução do alongamento celular, inibição de brotamentos laterais e desequilíbrio hormonal. Tal interrupção dos processos normais de crescimento da planta geralmente leva a um crescimento descontrolado, desequilíbrio e, por fim, à morte de plantas sensíveis a esse mecanismo de ação (14).

### O ácido 2,4-diclorofenoxiacético

O grupo das auxinas, que inclui moléculas como o ácido indolacético, possui mimetizadores que demonstram alta potência herbicida e boa estabilidade, a exemplo do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (figura 4A). Essas moléculas têm sido amplamente empregadas desde meados do século 20 como reguladores do crescimento das plantas (17). O ácido 2,4-D (CAS RN 94-75-7) é o segundo

ingrediente ativo agroquímico mais utilizado no Brasil, atrás apenas do glifosato e seus sais, somando mais de 62 mil toneladas vendidas em 2021 (18). Possui fórmula molecular  $C_8H_6Cl_2O_3$ , peso molecular de 221,04 g/mol, solubilidade em água de 900 mg/L a 25 °C (19) e é solúvel em solventes orgânicos como etanol e acetona. Em temperatura ambiente, apresenta-se como cristais incolores ou pó branco; o coeficiente de partição octanol/água é igual a 2,81 (20). Na representação estrutural da molécula, é possível observar dois átomos de cloro (Cl) ligados a um anel benzênico, e o grupo carboxila (COOH) ligado a um átomo de carbono adjacente (figura 4B):

**Figura 4 - Estrutura molecular do ácido 2,4-diclorofenoxiacético**



**A)** Representação espacial da notável semelhança estrutural entre a molécula de ácido indolacético, principal representante do grupo das auxinas, e a molécula de ácido 2,4-D, um mimetizador desse grupo. **B)** Representação bidimensional tradicional da molécula de ácido 2,4-D. Fonte: Adaptado de ChemicalBook (2017); Torii *et al.* (2018); PubChem (2023) (12,21–23).

O ácido 2,4-D é usado para controle de ervas daninhas de folhas largas em ambientes terrestres e aquáticos. Além de terras agrícolas, os principais locais de aplicação incluem pastagens, gramados e estradas. Culturas tratadas com ácido 2,4-D incluem milho, soja, cana-de-açúcar e cevada (24). Na célula, o ácido 2,4-D não é um substrato favorável para transportadores de efluxo de auxina, o que aumenta seu tempo de atividade celular e contribui para sua alta eficácia (17). Embora possua ação semelhante à das auxinas, as plantas não metabolizam o ácido 2,4-D com a mesma facilidade que metabolizam as auxinas, e essa dinâmica contribui para a atividade herbicida (25).

A meia-vida do ácido 2,4-D no ambiente pode passar de 300 dias, dependendo das condições da área. Devido a características como o baixo coeficiente de adsorção e a alta solubilidade em água, o ácido 2,4-D pode atingir águas superficiais facilmente (26). Os valores dos padrões de qualidade ambiental das águas para o ácido 2,4-D variam bastante entre os países; por exemplo, já foram relatados como 0,1 µg/L na França e na Alemanha (cerca de 0,0005 µmol/L), mas também como 26 µg/L na Holanda (cerca de 0,12 µmol/L) (27). Em Ontário (Canadá), uma concentração máxima de 10 µg/L (cerca de 0,05 µmol/L) de ácido 2,4-D foi detectada em amostras de águas tratadas superficiais e subterrâneas, coletadas entre 2006 e 2013 (28). A concentração mais alta de ácido 2,4-D encontrada nas águas superficiais desde que o Departamento de Agricultura de Minnesota (EUA) começou a monitorar esse parâmetro foi de 30,5 partes por bilhão (0,14 µmol/L) (29). De acordo com a Portaria GM/MS n.º 888, de 4 de maio de 2021, o valor máximo permitido de ácido 2,4-D em água potável é de 30 µg/L (cerca de 0,14 µmol/L) (30). No entanto, Lima *et al.* (2020) detectaram a presença desse herbicida no Rio Guaporé, no estado do Rio Grande do Sul, na quantidade aproximada de 88 µg/L (cerca de 0,4 µmol/L de ácido 2,4-D) (31); e o relatório da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) sobre a qualidade das águas em 2017 relata concentrações de até 366 µg/L (cerca de 1,66 µmol/L) (32).

Em 2015, com base em dados pré-clínicos, a Agência Internacional para a Pesquisa em Câncer (IARC, do inglês *International Agency for Research on Cancer*) classificou o ácido 2,4-D como “possivelmente carcinogênico” para humanos, o que significa que há algumas evidências de que pode causar câncer, mas atualmente isso

está “longe de ser conclusivo” (20). Inúmeras instituições juntam esforços para comprovar a segurança do 2,4-D dentro das boas práticas da agricultura, a exemplo da *Industry Task Force II On 2,4-D Research Data*, iniciativa da indústria que compila diversos dados que argumentam em favor da aplicação segura do praguicida, com base em estudos de toxicidade desenvolvimental e reprodutiva, epidemiologia, genotoxicidade e muitas outras características (33). Nesse sentido, fazem-se necessárias investigações da atividade biológica do ácido 2,4-D, com o intuito de compreender os mecanismos íntimos de seu modo de ação em sistemas biológicos.

Martins *et al.* (2021) avaliaram o potencial hepatotóxico do ácido 2,4-D em larvas de peixes-zebra (*Danio rerio*) e relataram que este reduziu a sobrevivência das larvas (Concentração Letal mediana, CL<sub>50</sub>, de 15,010 mg/L em 96 horas de exposição), alterou a atividade enzimática e aumentou a atividade de biomarcadores de dano hepático. A histopatologia revelou vacuolização do citosol, núcleos celulares excêntricos e perda da arquitetura tecidual e celular (34).

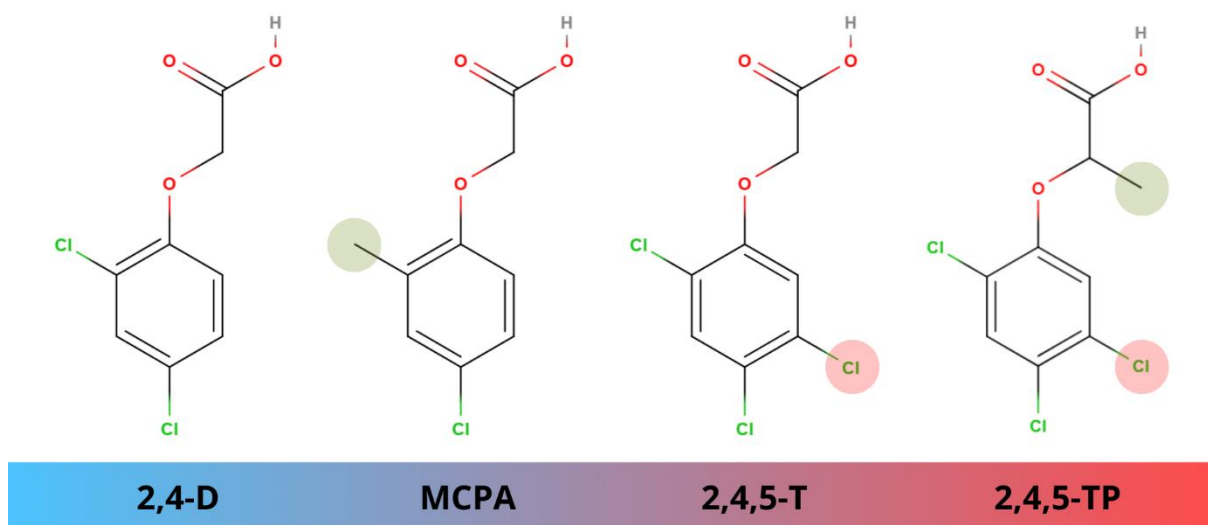
Ao investigar os efeitos na função hepática de ratos Wistar fêmeas adultas e em suas progênies, Troudi *et al.* (2012) concluíram que o ácido 2,4-D induz hepatotoxicidade. Os animais do grupo ao qual era ofertada água com 600 partes por milhão (ppm) de ácido 2,4-D (2714,4 µM) exibiam menor atividade antioxidante, como por exemplo, alteração nos níveis das enzimas de superóxido dismutase (SOD), catalase, e glutathione peroxidase em relação aos controles; enquanto os níveis de malondialdeído estavam aumentados. Também eram significativamente maiores os níveis séricos de bilirrubina, albumina e enzimas hepáticas como aminotransferases. Esses e outros resultados foram ainda correlacionados a análises histopatológicas (35). Salla *et al.* (2019) caracterizaram a ação do ácido 2,4-D no metabolismo hepático e sua distribuição celular no fígado isolado de rato perfundido, demonstrando inibição incompleta da gliconeogênese do lactato e diminuição dos níveis celulares de ATP (adenosina trifosfato). Os autores concluíram que a inibição do metabolismo energético pode ser importante componente da toxicidade por ácido 2,4-D, destacando potenciais interações com a bicamada lipídica (36).

Os estudos de Ganguli, Choudhury e Chakrabarti (2014) em células pulmonares experimentais humanas demonstraram que a exposição ao ácido 2,4-D pode afetar o funcionamento celular, pois este possui afinidade pelas redes de

microtúbulos celulares pulmonares, perturbando o citoesqueleto e gerando Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) em exposições a partir de 75  $\mu\text{mol/L}$  por 72 horas. Em exposições a partir de 100  $\mu\text{mol/L}$  por 72 horas, a exposição induziu apoptose por via mitocondrial em células pulmonares por meio da alteração da razão BAX:BCL-2 e da clivagem da pró-caspase-3 (37,38).

Em mitocôndrias isoladas, alguns herbicidas da classe dos ácidos fenoxiacéticos são indicados na literatura como potenciais desacopladores da fosforilação oxidativa. Além do ácido 2,4-D, o ácido 4-cloro-2-metilfenoxiacético (MCPA), que difere do ácido 2,4-D apenas pela existência de um substituinte metil no lugar do átomo de cloro; o ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T), que difere por um átomo de cloro adicional no anel aromático; e o ácido 2-(2,4,5-triclorofenoxi)-propiónico (2,4,5-TP), que difere do 2,4,5-T por um radical metil na cadeia lateral foram avaliados por Zychlinkski *et al.* (1990) na respiração e na fosforilação oxidativa em mitocôndrias isoladas de fígado de rato em concentrações de 100 a 4000  $\mu\text{mol/L}$ . A exposição alterou o metabolismo energético das mitocôndrias pelo desacoplamento da fosforilação oxidativa, na seguinte ordem crescente de potência: ácido 2,4-D, MCPA, 2,4,5-T e 2,4,5-TP (39). De acordo com esses dados, uma análise dinâmica da relação estrutura-atividade sugere que a quantidade e a posição de substituintes no anel aromático e o número de ramificações na cadeia lateral podem aumentar o potencial desacoplador da molécula em mitocôndrias isoladas (figura 5).

**Figura 5 - Potencial desacoplador de ácidos fenoxiacéticos**



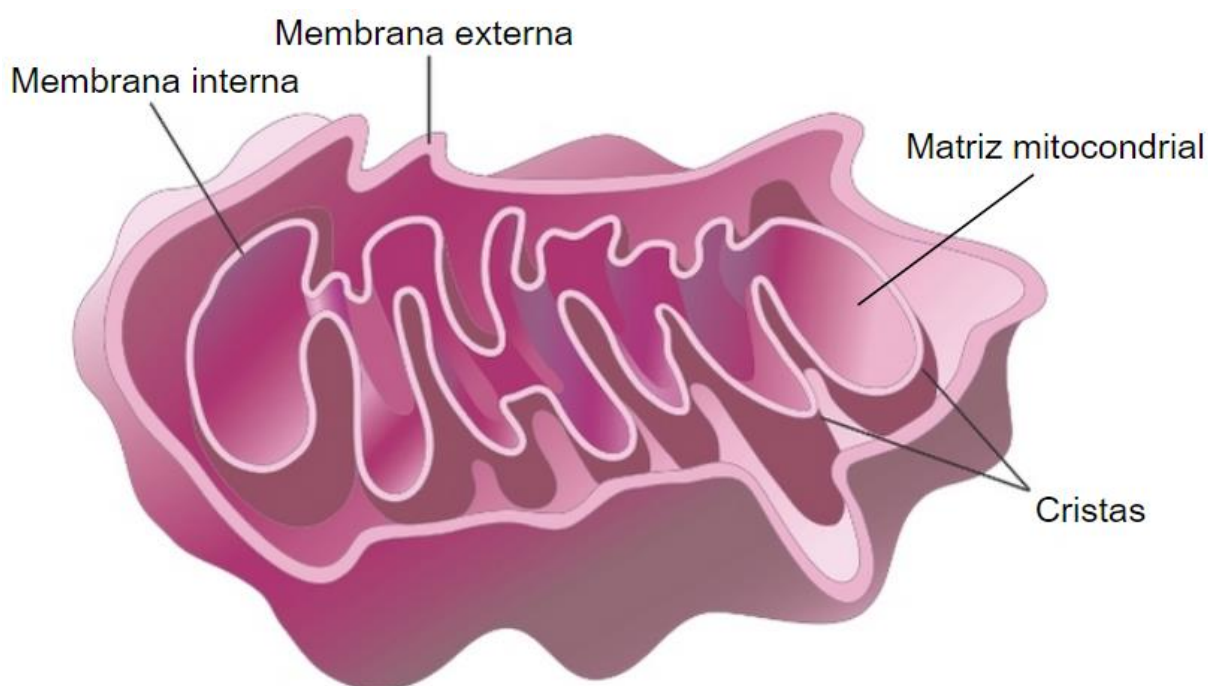
Alguns herbicidas da classe dos ácidos fenoxiacéticos em ordem crescente de potencial desacoplador em mitocôndrias hepáticas isoladas. O destaque em verde nas diferenças estruturais em relação ao ácido 2,4-D indica a adição de/substituição por radical metil; o destaque vermelho indica a adição de átomo de cloro. 2,4-D = ácido 2,4-diclorofenoxiacético. MCPA = ácido 4-cloro-2-metilfenoxiacético. 2,4,5-T = ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético. 2,4,5-TP = ácido 2-(2,4,5-triclorofenoxy)-propiónico. Fonte: Elaborado pelo autor, adaptado de Zychlinkski *et al.* (1990) (39).

Diversos pesquisadores têm avaliado o perfil de toxicidade de herbicidas em mitocôndrias isoladas. O dinoseb (6-sec-butil-2,4-dinitrofenol), um herbicida da família dos dinitrofenóis, já demonstrou agir de maneira similar a alguns ionóforos no desacoplamento mitocondrial, ao diminuir o potencial de membrana após energização da mitocôndria (40). A trifluralina, um herbicida do grupo das dinitroanilinas, pode perturbar a respiração mitocondrial por mecanismos não relacionados à indução de estresse oxidativo (41). Conforme mencionado anteriormente, estudos prévios com herbicidas do grupo dos ácidos fenoxiacéticos, como 2,4,5-T, MCPA e 2,4,5-PT já demonstraram impactos na capacidade de respiração mitocondrial e atividades desacopladoras da fosforilação oxidativa *in vitro* (39). A partir do exposto, nota-se que as vias mitocondriais constituem um caminho promissor para a investigação mecanística da toxicidade por herbicidas como o ácido 2,4-D.

### **As mitocôndrias como importantes indicadores em Toxicologia**

As mitocôndrias são organelas de dupla membrana, encontradas no citoplasma de células eucarióticas e conhecidas como as "casas de força" da célula devido à capacidade de geração de moléculas de ATP – uma espécie de “moeda de troca” para inúmeros processos celulares. O tamanho e a forma das mitocôndrias variam muito de acordo com características como o tipo celular e a demanda metabólica, mas elas geralmente medem cerca de 0,5 a 1,0  $\mu\text{m}$  de largura e até 10  $\mu\text{m}$  de comprimento (42). A membrana mitocondrial externa é mais uniforme, enquanto a membrana interna, que separa a matriz mitocondrial do espaço intermembranas, possui algumas “dobras” denominadas cristas mitocondriais (figura 6) (43).

**Figura 6 - Estrutura básica de uma mitocôndria**



A mitocôndria é uma organela de dupla membrana, encontrada no citoplasma de células eucarióticas. A membrana externa é mais uniforme, enquanto a membrana interna, que separa a matriz mitocondrial do espaço intermembranas, possui algumas “dobras” denominadas cristas mitocondriais (42,43).  
Fonte: Adaptado de Scitable (2014) (44).

A membrana mitocondrial externa permite a permeabilidade de moléculas pequenas e a troca de metabólitos e íons entre a organela e o citoplasma. Sua principal finalidade é a atuação como uma barreira seletiva, garantindo a manutenção da função e da integridade mitocondriais. É composta por uma dupla camada de moléculas fosfolipídicas (bicamada fosfolipídica), crivada de proteínas de membrana. Dentre estas, merecem destaque as porinas – grandes estruturas proteicas que formam canais para a passagem de moléculas com peso molecular de até aproximadamente 5.000 Daltons (45). A membrana externa também contém várias proteínas envolvidas no transporte de proteínas e na troca de lipídios, íons e outras moléculas com o retículo endoplasmático liso, outra organela envolvida na sinalização de cálcio e na síntese de lipídeos (46).

O cálcio, por sua vez, desempenha um papel essencial para as mitocôndrias ao estimular a atividade de enzimas como a piruvato desidrogenase e a isocitrato desidrogenase, que estão envolvidas no ciclo de Krebs (também conhecido como ciclo do ácido cítrico) e enzimas envolvidas na fosforilação oxidativa. O cálcio também atua como um segundo mensageiro em muitas vias de sinalização envolvidas na comunicação entre o citosol e as mitocôndrias. Alterações nos níveis celulares de cálcio podem ser sinalizadas para as mitocôndrias, influenciando eventos relacionados ao metabolismo, à homeostase e à morte celular (47).

O aumento dos níveis de cálcio nas mitocôndrias pode levar à abertura dos poros de transição da permeabilidade mitocondrial (PTPM), canais da membrana mitocondrial interna que regulam a passagem de moléculas e íons. Esse poro, composto por uma série de complexos proteicos, quando fechado, torna a membrana impermeável à maioria dos íons e moléculas polares. No entanto, certos xenobióticos são capazes de induzir sua abertura (42). A modulação do PTPM afeta o potencial de membrana e permite a liberação de fatores pró-apoptóticos, o que desencadeia eventos de sinalização que levam à apoptose (morte celular programada) (48). Com a abertura do poro, o potencial eletroquímico da membrana colapsa, a fosforilação oxidativa é afetada e a diferença de osmolaridade entre a matriz mitocondrial e o citosol possibilita o influxo de água e o inchamento da organela (42).

O espaço intermembranas, como o nome sugere, é o estreito intervalo entre as membranas interna e externa. A composição única de proteínas, lipídios, íons

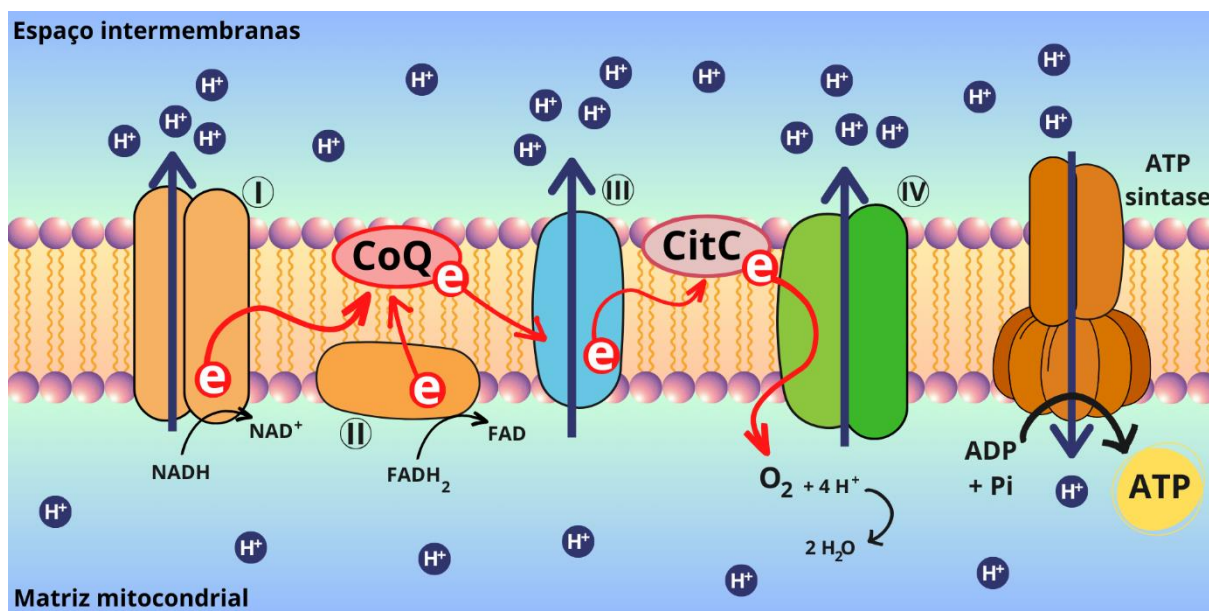
e moléculas desempenha papéis importantes nas funções desse espaço, que incluem a regulação redox a partir de proteínas que participam do transporte de elétrons e de vias de sinalização celular; o transporte intermediário de metabólitos e de proteínas precursoras sintetizadas no citosol; e a regulação da apoptose (49). O papel das mitocôndrias em processos apoptóticos se dá quando certas proteínas liberadas do espaço intermembranas ativam cascatas de eventos moleculares que culminam na morte celular. Essas proteínas, como o citocromo *c* (um componente essencial da cadeia de transporte de elétrons), participam da formação do complexo multiproteico pró-apoptótico conhecido como apoptossomo (48).

A membrana mitocondrial interna possui permeabilidade seletiva e desempenha um papel vital em vários processos celulares, particularmente aqueles envolvidos na produção de energia. É altamente dobrada em estruturas chamadas cristas, que aumentam muito a área superficial, potencializando a capacidade de realizar reações químicas que dependem dos elementos ali presentes. Assim como a membrana externa, a membrana interna é uma bicamada fosfolipídica crivada de proteínas de membrana (43). Sua configuração impossibilita a entrada da maioria dos íons e das moléculas polares, mas existem proteínas de transporte que facilitam o movimento de espécies de interesse e de metabólitos, a exemplo do piruvato e do fosfato (45). Ainda, a membrana interna abriga complexos proteicos que compõem a cadeia transportadora de elétrons, uma série de reações redox de transferência de elétrons que gera um gradiente de prótons. Esses complexos proteicos incluem a NADH desidrogenase (Complexo I), a succinato desidrogenase (Complexo II), a citocromo *c* redutase (Complexo III), a citocromo *c* oxidase (Complexo IV) e a ATP sintase (Complexo V) (50).

O processo começa com a ação de doadores de elétrons, como o NADH e o FADH<sub>2</sub> (formas reduzidas de dinucleotídeos de nicotinamida e adenina e de flavina e adenina) vindos do ciclo de Krebs, para os primeiros transportadores de elétrons da membrana mitocondrial interna (Complexos I e II). Por meio de uma série de reações redox, que envolve intermediários como a coenzima Q e o citocromo *c* e os Complexos III e IV, a passagem dos elétrons por esses transportadores permite que íons H<sup>+</sup> (basicamente prótons) sejam bombeados da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, gerando um gradiente eletroquímico com maior carga positiva fora

da matriz mitocondrial. O fluxo dos prótons de volta à matriz movimenta a ATP sintase, que atua como uma espécie de motor molecular, usando a energia liberada pelo fluxo de prótons para adicionar fosfato inorgânico (Pi) ao difosfato de adenosina (ADP), convertendo-o em ATP (fosforilação do ADP) (51). Ao final do processo, o oxigênio molecular ( $O_2$ ) atua como oceptor final de elétrons, combinando-se ainda com prótons e gerando moléculas de água ( $H_2O$ ) (44). Essa etapa final de destinação garante o fluxo contínuo de elétrons e prótons, o gradiente eletroquímico e a produção de ATP. Assim, a cadeia transportadora de elétrons gera a energia para o processo chamado fosforilação oxidativa, por meio do qual as células obtêm ATP (figura 7).

**Figura 7 - Esquematização da fosforilação oxidativa**



A cadeia transportadora de elétrons gera energia para a fosforilação oxidativa, por meio da qual as células obtêm ATP. Moléculas de NADH e  $FADH_2$  doam elétrons para os Complexos I e II, iniciando uma cadeia de transporte por proteínas que bombeiam íons  $H^+$  para fora da matriz mitocondrial e criam um gradiente eletroquímico. Ao final do processo, o  $O_2$  atua como oceptor final de elétrons, garantindo o fluxo contínuo de cargas. O fluxo dos prótons de volta à matriz movimenta a ATP sintase, que fosforila o ADP. As setas em azul indicam o movimento dos prótons e as setas em vermelho indicam o movimento dos elétrons. ATP: adenosina trifosfato; I a IV: Complexos I a IV; CoQ: coenzima Q; CitC: citocromo c; NAD: dinucleotídeo de nicotinamida e adenina; NADH: dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido; FAD: dinucleotídeo de flavina e adenina;  $FADH_2$ : dinucleotídeo de flavina e adenina reduzido; ADP: adenosina difosfato; Pi: fosfato inorgânico. Fonte: Elaborado pelo autor.

Assim, a fosforilação oxidativa pode ser entendido como a manutenção de um gradiente eletroquímico na membrana mitocondrial interna, que acopla o fluxo de elétrons por meio da cadeia de transporte de elétrons, com a geração de ATP pela ATP sintase. A finalidade do processo é a conversão da energia oriunda da oxidação de moléculas como glicose ou ácidos graxos em ATP – basicamente, a energia para o funcionamento celular (45).

Por fim, a matriz mitocondrial contém proteínas, enzimas e outras moléculas essenciais para várias etapas de reações metabólicas. Dentro da matriz, ocorre o ciclo de Krebs – uma série de reações químicas que oxidam o acetil-CoA, molécula derivada da degradação da glicose, de ácidos graxos ou de certos aminoácidos. O ciclo de Krebs produz ATP e equivalentes redutores na forma de NADH e FADH<sub>2</sub>, imprescindíveis para a cadeia transportadora de elétrons (51). Na matriz, também é possível encontrar o DNA mitocondrial (DNAm), um pequeno genoma circular exclusivo, que independe do DNA contido no núcleo da célula e codifica algumas proteínas essenciais e moléculas de RNA envolvidas na produção de energia (52).

As mitocôndrias são, também, uma grande fonte de EROs na célula. Naturalmente ou por ação de agentes toxicantes, alguns elétrons podem escapar durante a fosforilação oxidativa, levando à formação de íons superóxido (O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>) (53). O íon superóxido é capaz de participar de diversas reações, como transferência de elétrons, desprotonação e substituição nucleofílica. Estas espécies radicais estão implicadas em vários processos biológicos prejudiciais, como a desnaturação de proteínas e a peroxidação lipídica (54). A geração de superóxido nas mitocôndrias constitui uma importante fonte de outros radicais livres nocivos, a partir dos quais outras EROs são formadas e capazes de induzir inúmeros efeitos, que vão da perda da homeostase a doenças mitocondriais (55). A molécula sinalizadora óxido nítrico (NO) pode reagir com esses íons superóxido e formar peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) (56).

As mitocôndrias também podem gerar EROs ao transferir elétrons para as moléculas de oxigênio no processamento de substratos metabólicos para fins de obtenção de energia, como ácidos graxos e aminoácidos (57). Além disso, a membrana mitocondrial externa contém monoamina oxidases, enzimas que metabolizam neurotransmissores e geram peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) no processo

(58). A exposição a toxinas ambientais, poluentes, metais pesados, radiação e certos medicamentos também pode aumentar a produção de EROs (42). Por fim, o envelhecimento também está associado à disfunção mitocondrial e ao aumento do estresse oxidativo: com o tempo, a eficiência da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial e dos sistemas de defesa antioxidante pode diminuir (59).

As EROs são subprodutos naturais do metabolismo celular e até desempenham um papel na sinalização celular normal (53). Para neutralizar os efeitos dessas espécies reativas, as mitocôndrias contam com sistemas próprios de defesa antioxidante. As vitaminas C e E obtidas da dieta e enzimas endógenas como SOD e glutathione peroxidase ajudam a neutralizar as EROs. No entanto, a produção excessiva de EROs ou o comprometimento das defesas antioxidantes pode incorrer no estresse oxidativo – situação de desequilíbrio entre a produção e o controle destas espécies, que pode ter efeitos prejudiciais nas mitocôndrias e nos componentes celulares, como proteínas, lipídios e DNA (42).

A mitocôndria tem sido amplamente utilizada como ferramenta para esclarecer o mecanismo de toxicidade de xenobióticos (60). A depender do agente toxicante, o processo de morte celular pode ser iniciado em diferentes etapas, estruturas e vias de sinalização. Assim, a mitocôndria possui papel crucial na homeostasia e no processo de morte celular, sendo seu controle de qualidade, sua distribuição e sua atividade fundamentais para a manutenção das funções celulares (61). Posto que a regulação da atividade mitocondrial é importante para a manutenção de diversos processos biológicos, a interação de substâncias potencialmente tóxicas em diversos pontos desse sistema pode resultar em disfunção mitocondrial e citotoxicidade (42,62).

## Referências bibliográficas

1. United Nations. World Population Prospects 2022 Summary of Results [Internet]. 2022 [citado 4 de fevereiro de 2023]. Disponível em: <https://www.un.org/development/desa/pd/content/World-Population-Prospects-2022>
2. Food and Agriculture Organization. How to Feed the World in 2050 [Internet]. 2009 [citado 14 de novembro de 2023]. Disponível em: [https://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert\\_paper/How\\_to\\_Feed\\_the\\_World\\_in\\_2050.pdf](https://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf)
3. Unites States National Institute of Food and Agriculture. Researchers Helping Protect Crops From Pests | National Institute of Food and Agriculture [Internet]. 2023 [citado 11 de outubro de 2023]. Disponível em: <https://www.nifa.usda.gov/about-nifa/blogs/researchers-helping-protect-crops-pests>
4. Abhilash PC, Singh N. Pesticide use and application: An Indian scenario. J Hazard Mater. 15 de junho de 2009;165(1–3):1–12.
5. Kim KH, Kabir E, Jahan SA. Exposure to pesticides and the associated human health effects. Science of the Total Environment [Internet]. 2017;575:525–35. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.009>
6. Food and Agriculture Organization. Pesticides use, pesticides trade and pesticides indicators [Internet]. 2022 [citado 11 de outubro de 2023]. Disponível em: <https://www.fao.org/documents/card/en?details=cc0918en>
7. Duke SO. The history and current status of glyphosate. Pest Manag Sci [Internet]. 1º de maio de 2018 [citado 10 de junho de 2023];74(5):1027–34. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28643882/>
8. Devendar P, Yang GF. Sulfur-Containing Agrochemicals. Top Curr Chem (Cham) [Internet]. 1º de dezembro de 2017 [citado 10 de junho de 2023];375(6). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28993992/>

9. Müller F, Applebyki AP. Weed Control, 2. Individual Herbicides. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry [Internet]. 15 de outubro de 2011 [citado 10 de junho de 2023]; Disponível em: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/14356007.o28\\_o01](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/14356007.o28_o01)
10. Paque S, Weijers D. Q&A: Auxin: The plant molecule that influences almost anything. BMC Biol [Internet]. 10 de agosto de 2016 [citado 19 de fevereiro de 2023];14(1):1–5. Disponível em: <https://bmcbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12915-016-0291-0>
11. DrugBank. Indoleacetic acid: Uses, Interactions, Mechanism of Action | DrugBank Online [Internet]. 2022 [citado 17 de junho de 2023]. Disponível em: <https://go.drugbank.com/drugs/DB07950>
12. Torii KU, Hagihara S, Uchida N, Takahashi K. Harnessing synthetic chemistry to probe and hijack auxin signaling. New Phytologist [Internet]. 1º de outubro de 2018 [citado 19 de fevereiro de 2023];220(2):417–24. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/nph.15337>
13. Farrimond JA, Elliott MC, Clack DW. Charge separation as a component of the structural requirements for hormone activity. Nature [Internet]. 1978 [citado 19 de fevereiro de 2023];274(5669):401–2. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/274401a0>
14. Ferro N, Bredow T, Jacobsen HJ, Reinard T. Route to novel auxin: Auxin chemical space toward biological correlation carriers. Chem Rev [Internet]. 11 de agosto de 2010 [citado 19 de fevereiro de 2023];110(8):4690–708. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr800229s>
15. Grossmann K. Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action. Pest Manag Sci [Internet]. fevereiro de 2010 [citado 19 de fevereiro de 2023];66(2):113–20. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19823992/>
16. Woodward AW, Bartel B. Auxin: regulation, action, and interaction. Ann Bot [Internet]. 2005 [citado 10 de junho de 2023];95(5):707–35. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15749753/>

17. Quareshy M, Prusinska J, Li J, Napier R. A cheminformatics review of auxins as herbicides. *J Exp Bot* [Internet]. 4 de janeiro de 2018 [citado 19 de fevereiro de 2023];69(2):265–75. Disponível em: <https://academic.oup.com/jxb/article/69/2/265/4106940>
18. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Painéis de informações de agrotóxicos [Internet]. 2022 [citado 10 de junho de 2023]. Disponível em: <https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/paineis-de-informacoes-de-agrotoxicos/paineis-de-informacoes-de-agrotoxicos>
19. Kennepohl E, Munro IC, Bus JS. Phenoxy Herbicides (2,4-D). *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology*. 1º de janeiro de 2010;1:1829–47.
20. International Agency for Research on Cancer. 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid IARC Monograph. 2018 [citado 10 de junho de 2023]; Disponível em: <https://monographs.iarc.who.int/wp-content/uploads/2018/07/mono113-03.pdf>
21. ChemicalBook. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid | 94-75-7 [Internet]. 2023 [citado 17 de junho de 2023]. Disponível em: [https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB8762041.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB8762041.htm)
22. PubChem. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid | C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>3</sub> | CID 1486 - PubChem [Internet]. 2023 [citado 24 de junho de 2023]. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1486>
23. PubChem. Indole-3-acetic acid | C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub> | CID 802 [Internet]. 2023 [citado 24 de junho de 2023]. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/802>
24. National Pesticide Information Center. 2,4-D Technical Fact Sheet [Internet]. 2008 [citado 10 de junho de 2023]. Disponível em: <http://npic.orst.edu/factsheets/archive/2,4-DTech.html>
25. Song Y, Cheng Y. Insight into the mode of action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) as an herbicide. *J Integr Plant Biol* [Internet]. 1º de fevereiro de 2014 [citado 10 de junho de 2023];56(2):106–13. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jipb.12131>

26. Moreira RA, Rocha GS, da Silva LCM, Goulart BV, Montagner CC, Melão M da GG, et al. Exposure to environmental concentrations of fipronil and 2,4-D mixtures causes physiological, morphological and biochemical changes in *Raphidocelis subcapitata*. *Ecotoxicol Environ Saf*. 15 de dezembro de 2020;206:111180.
27. Waters. Determination of Acidic Herbicides in Water Using Liquid Chromatography-Tandem Quadrupole Mass Spectrometry | Waters [Internet]. 2018 [citado 30 de junho de 2023]. Disponível em: <https://www.waters.com/nextgen/in/en/library/application-notes/2018/acidic-herbicides-water-liquid-chromatography-tandem-quadrupole-mass-spectrometry.html>
28. Government of Canada. 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in drinking water: Guideline technical document for public consultation - Canada.ca [Internet]. 2020 [citado 30 de junho de 2023]. Disponível em: <https://www.canada.ca/en/health-canada/programs/consultation-review-guideline-technical-document-2-4-d-drinking-water/document.html>
29. Minnesota Department of Agriculture. Health Risk Assessment Unit 2,4-D and Drinking Water. 2016 [citado 30 de junho de 2023]; Disponível em: <http://www.mda.state.mn.us/chemicals/pesticides/useandsales.aspx>
30. Brasil. Portaria GM/MS nº 888, de 4 de maio de 2021 [Internet]. maio 4, 2021. Disponível em: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2021/prt0888\\_07\\_05\\_2021.html](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2021/prt0888_07_05_2021.html)
31. de Castro Lima JAM, Labanowski J, Bastos MC, Zanella R, Prestes OD, de Vargas JPR, et al. “Modern agriculture” transfers many pesticides to watercourses: a case study of a representative rural catchment of southern Brazil. *Environmental Science and Pollution Research* [Internet]. 1º de abril de 2020 [citado 17 de junho de 2023];27(10):10581–98. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-019-06550-8>
32. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Publicações e Relatórios – Águas Interiores » Águas Interiores [Internet]. 2017 [citado 30 de junho de 2023].

Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/aguas-interiores/publicacoes-e-relatorios/>

33. 24D.org. 2,4-D | Selective Herbicide | Protects Crops & Infrastructure [Internet]. [citado 11 de outubro de 2023]. Disponível em: <https://24d.org/>
34. Martins RX, Vieira L, Souza JACR, Silva MGF, Muniz MS, Souza T, et al. Exposure to 2,4-D herbicide induces hepatotoxicity in zebrafish larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 1º de outubro de 2021;248:109110.
35. Troudi A, Ben Amara I, Samet AM, Zeghal N. Oxidative stress induced by 2,4-phenoxyacetic acid in liver of female rats and their progeny: Biochemical and histopathological studies. *Environ Toxicol* [Internet]. 1º de março de 2012 [citado 16 de junho de 2023];27(3):137–45. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/tox.20624>
36. Bueno Franco Salla G, Bracht L, Valderrama Parizotto A, Comar JF, Peralta RM, Bracht F, et al. Kinetics of the metabolic effects, distribution spaces and lipid-bilayer affinities of the organo-chlorinated herbicides 2,4-D and picloram in the liver. *Toxicol Lett*. 1º de outubro de 2019;313:137–49.
37. Ganguli A, Choudhury D, Chakrabarti G. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid induced toxicity in lung cells by disruption of the tubulin-microtubule network. *Toxicol Res (Camb)* [Internet]. 11 de fevereiro de 2014 [citado 17 de junho de 2023];3(2):118–30. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2014/tx/c3tx50082a>
38. Islam F, Wang J, Farooq MA, Khan MSS, Xu L, Zhu J, et al. Potential impact of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on human and ecosystems. *Environ Int*. 1º de fevereiro de 2018;111:332–51.
39. Zychlinski L, Zolnierowicz S. Comparison of uncoupling activities of chlorophenoxy herbicides in rat liver mitochondria. *Toxicol Lett*. 1º de junho de 1990;52(1):25–34.

40. Palmeira CM, Moreno AJ, Madeira VMC. Interactions of Herbicides 2,4-D and Dinoseb with Liver Mitochondrial Bioenergetics. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1º de julho de 1994;127(1):50–7.
41. de Oliveira B, Pereira LC, Pazin M, Franco-Bernanrdes MF, Dorta DJ. Do trifluralin and tebuthiuron impair isolated rat liver mitochondria? *Pestic Biochem Physiol*. 1º de fevereiro de 2020;163:175–84.
42. Pereira LC. Mitocôndria como Alvo para avaliação de toxicidade de xenobiótico [Internet]. 2012 [citado 17 de junho de 2023]. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/279912311\\_Mitochondria\\_como\\_Alvo\\_para\\_avaliacao\\_de\\_toxicidade\\_de\\_xenobiotico](https://www.researchgate.net/publication/279912311_Mitochondria_como_Alvo_para_avaliacao_de_toxicidade_de_xenobiotico)
43. Freya TG, Mannellab CA. The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci* [Internet]. 1º de julho de 2000 [citado 24 de junho de 2023];25(7):319–24. Disponível em: <http://www.cell.com/article/S0968000400016091/fulltext>
44. Scitable. Contents of Cell Biology for Seminars | Learn Science at Scitable [Internet]. 2014 [citado 24 de junho de 2023]. Disponível em: <https://www.nature.com/scitable/ebooks/cell-biology-for-seminars-14760004/129391449/>
45. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. The Mitochondrion. 2002 [citado 24 de junho de 2023]; Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26894/>
46. Zhang P, Konja D, Zhang Y, Wang Y. Communications between Mitochondria and Endoplasmic Reticulum in the Regulation of Metabolic Homeostasis. *Cells* [Internet]. 25 de agosto de 2021 [citado 24 de junho de 2023];10(9):2195. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/10/9/2195/htm>
47. Pinton P, Romagnoli A, Rizzuto R, Giorgi C. Ca<sup>2+</sup> Signaling, Mitochondria and Cell Death. *Curr Mol Med*. 4 de março de 2008;8(2):119–30.
48. Wang C, Youle RJ. The Role of Mitochondria in Apoptosis. *Annual Reviews* [Internet]. 17 de novembro de 2009 [citado 24 de junho de 2023];43:95–118.

Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-genet-102108-134850>

49. Herrmann JM, Riemer J. The Intermembrane Space of Mitochondria. *Antioxid Redox Signal* [Internet]. 21 de setembro de 2010 [citado 24 de junho de 2023];13(9):1341–58. Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ars.2009.3063>
50. Sousa JS, D’Imprima E, Vonck J. Mitochondrial respiratory chain complexes. *Subcell Biochem* [Internet]. 2018 [citado 24 de junho de 2023];87:167–227. Disponível em: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-10-7757-9\\_7](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-10-7757-9_7)
51. Nolfi-Donagan D, Braganza A, Shiva S. Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. *Redox Biol*. 1º de outubro de 2020;37:101674.
52. Roubicek DA, de Souza-Pinto NC. Mitochondria and mitochondrial DNA as relevant targets for environmental contaminants. *Toxicology*. 1º de novembro de 2017;391:100–8.
53. Frantz MC, Wipf P. Mitochondria as a target in treatment. *Environ Mol Mutagen* [Internet]. 1º de junho de 2010 [citado 17 de junho de 2023];51(5):462–75. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/em.20554>
54. Hayyan M, Hashim MA, Alnashef IM. Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications. *Chem Rev* [Internet]. 9 de março de 2016 [citado 11 de outubro de 2023];116(5):3029–85. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.chemrev.5b00407>
55. Liu S Sen. Generating, Partitioning, Targeting and Functioning of Superoxide in Mitochondria. *Biosci Rep* [Internet]. 1º de junho de 1997 [citado 11 de outubro de 2023];17(3):259–72. Disponível em: </bioscirep/article/17/3/259/54070/Generating-Partitioning-Targeting-and-Functioning>
56. Brown GC, Borutaite V. Inhibition of mitochondrial respiratory complex I by nitric oxide, peroxynitrite and S-nitrosothiols. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 23 de julho de 2004;1658(1–2):44–9.

57. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal* [Internet]. 1º de janeiro de 2009 [citado 24 de junho de 2023];417(Pt 1):1. Disponível em: [/pmc/articles/PMC2605959/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19244983/)
58. Edmondson D. Hydrogen Peroxide Produced by Mitochondrial Monoamine Oxidase Catalysis: Biological Implications. *Curr Pharm Des*. 21 de janeiro de 2014;20(2):155–60.
59. Sun N, Youle RJ, Finkel T. The Mitochondrial Basis of Aging. *Mol Cell* [Internet]. 3 de março de 2016 [citado 24 de junho de 2023];61(5):654. Disponível em: [/pmc/articles/PMC4779179/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26828411/)
60. Li Y, Couch L, Higuchi M, Fang JL, Guo L. Mitochondrial Dysfunction Induced by Sertraline, an Antidepressant Agent. *Toxicological Sciences* [Internet]. 1º de junho de 2012 [citado 17 de junho de 2023];127(2):582–91. Disponível em: [https://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfs100](https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs100)
61. Zhu J, Wang KZQ, Chu CT. After the banquet: Mitochondrial biogenesis, mitophagy, and cell survival. *Autophagy* [Internet]. 2013 [citado 17 de junho de 2023];9(11):1663–76. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/auto.24135>
62. Pereira LC, De Souza AO, Dorta DJ. Polybrominated Diphenyl Ether Congener (BDE-100) Induces Mitochondrial Impairment. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* [Internet]. 1º de junho de 2013 [citado 17 de junho de 2023];112(6):418–24. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/bcpt.12046>

## Capítulo 2: Artigo científico<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Revista sugerida: *Toxicology Letters*

# **Effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, isolated and in a formulated product, on the functional parameters of isolated rat liver mitochondria**

## **1 Introduction**

Strategies aimed at production, stability and availability of food include effective pest management, considering that between 20% and 40% of global agricultural production can be lost annually due to the action of pests (United States National Institute of Food and Agriculture, 2023). Among the available tools, synthetic auxin herbicides mimic the activity of phytohormones with ubiquitous activity, which orchestrate numerous functions in controlling plant cell processes (Paque and Weijers, 2016). The molecular mechanism of action of synthetic auxins, such as 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), involves their interaction with specific receptors and responsive elements and the subsequent modulation of gene expression (Grossmann, 2010). Consequently, auxin response factors bind to specific DNA sequences called “auxin response elements” (Ferro et al., 2010; Woodward and Bartel, 2005). These altered gene expression patterns result in various physiological responses in plants. Disruption of normal processes often leads to uncontrolled growth, imbalance, and ultimately death of plants susceptible to this mechanism of action (Ferro et al., 2010).

In Brazil, the presence of 2,4-D was detected in the Guaporé River, in the state of Rio Grande do Sul, at a concentration of approximately 88 µg/L (about 0.4 µM) (de Castro Lima et al., 2020). Despite being the second most used agrochemical active ingredient in Brazil, totalizing more than 62 thousand tons sold in 2021 (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 2022), we still have little information about the amounts of this herbicide in waters. In this sense, investigations into the biological activity of 2,4-D are necessary, aiming to the understanding of its mode of action in biological systems.

The hepatotoxic potential of 2,4-D was assessed in zebrafish larvae (*Danio rerio*) and it was reported that it reduced the survival of larvae (LC<sub>50</sub> of 15.010 mg/L in

96 hours of exposure), altered the enzyme activity and increased the activity of biomarkers of liver damage (Martins et al., 2021). In another study, 6 pregnant rats were treated with 600 ppm of 2,4-D (equivalent to 126 mg/kg/day), orally (drinking water), from the 14th gestational day until the 14th day after birth. Based on changes in weight and levels of hepatic antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase), which could be correlated with other biochemical (plasma aminotransferases) and histopathological parameters, the authors concluded that exposure to 2,4-D induces hepatotoxicity (Troudi et al., 2012). The characterization of the activity and distribution of 2,4-D in isolated perfused rat liver showed that the exposure decreased cellular ATP (adenosine triphosphate) levels, indicating that inhibition of energy metabolism may be an important component of the toxicity mechanism, highlighting potential interactions with the lipid bilayers (Bueno Franco Salla et al., 2019). Taken together, the data present in literature indicate that mitochondrial pathways constitute a promising path for the mechanistic investigation of 2,4-D toxicity.

Mitochondria have been widely used as a tool to understand the mechanism of xenobiotic toxicity (Li et al., 2012). Depending on the toxicant, the cell death process can be initiated in different structures and signaling pathways (Zhu et al., 2013). This work is an *in vitro* investigation of the effects of a highly relevant pesticide for anthropic activity on isolated mitochondria, aiming to elucidate its toxicity as an isolated compound and as a component of a formulated product – the form in which the substance can be found in the environment, due to agricultural activity. To this end, the effects observed in isolated mitochondria exposed to isolated 2,4-D will be studied and compared with the effects observed after exposure to a commercial product that contains this active ingredient. This approach will enhance our understanding of the effects of a commercially relevant herbicide and the excipients that are often formulated together.

## **2 Materials and methods**

This work was developed at the TOXICAM laboratory – Center for Evaluation of Environmental Impact on Human Health, located at Unesp – Botucatu Medical School, in the state of São Paulo, Brazil. The exposure of liver mitochondria after isolation from Wistar rats was carried out in vitro.

### **2.1 Materials, mitochondrial isolation and data processing**

#### **2.1.1 Samples**

In addition to the brand-formulated product DMA 806 BR (2,4-D-dimethylamine salt: 806 g/L, equivalent to 670 g/L of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; other ingredients: 420 g/L; Corteva Agriscience) (Corteva, 2023), standard solutions of the isolated active ingredient, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, were used ( $C_8H_6Cl_2O_3$ , CAS RN 94-75-7), acquired from Sigma-Aldrich (code D70724) (PubChem, 2023). The range of doses from 0.4 to 200  $\mu$ M of 2,4-D (0.08841 to 44.21 ppm), used in the experiments, comprises concentrations found in the environment (0.4  $\mu$ M) (de Castro Lima et al., 2020; World Health Organization, 2017) and in studies with isolated mitochondria at TOXICAM (1 to 200  $\mu$ M) (de Oliveira et al., 2020; Pereira et al., 2018). For the formulated product, the concentration was calculated so that the equivalent 2,4-D concentration desired was achieved, thus making the exposure to 2,4-D per se the same in both experimental conditions – the difference would be the excipients added to the formulated product. The diluent used in stock solutions was dimethyl sulfoxide (DMSO, Dinâmica Química Contemporânea LTDA., code 1582), at a final concentration  $\leq 1\%$ , considered acceptable for exposure of isolated mitochondria (Ma et al., 2018). In preliminary tests with the solvent and in all tests conducted, the same volume of DMSO was added to the controls and no effect was observed.

#### **2.1.2 Animals**

Young male Wistar rats, around 45 days old and weighing approximately 180 g, provided by the Multidisciplinary Center for Biological Research (CEMIB) at Unicamp – State University of Campinas, were acquired. The animals were maintained under controlled conditions in the vivarium of the Pathology Department of Botucatu

Medical School, in a temperature of  $21 \pm 3$  °C and a constant relative humidity of  $50 \pm 20\%$ , with four daily air exhaustion cycles and a period of 12/12 hours light/dark for about a week, until the day of the experiment. Water, basal diet and environmental enrichment were provided ad libitum.

The animals were euthanized by decapitation, without anesthesia, carried out by a trained and experienced professional or researcher. This method was chosen in order to avoid changes in the bioenergetic parameters of mitochondria. The procedure was carried out in accordance with São Paulo State Law No. 11977 (São Paulo, 2005). The project was registered in the Research and Experimentation Information System (SIPE) of Botucatu Medical School (Protocol SIPE-55/2021), approved by the Institution's Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) under protocol CEUA-1382 (Annex 1).

### **2.1.3 Mitochondrial isolation**

For each experiment, liver mitochondria were isolated by differential centrifugation, following procedures already established in the literature (de Oliveira et al., 2020; Pereira et al., 2013). After euthanasia, the liver was removed (approximately 15 g) and minced with the aid of sanitized scissors in 50 mL of Homogenization Medium (sucrose 250 mM, EGTA 1 mM and HEPES-KOH 10 mM, at pH 7.2), in a refrigerated environment. Next, the sample was washed with the same medium, enough to remove excess blood, and homogenized in three cycles of 15 seconds with 1-minute intervals in a Potter-Elvehjem homogenizer.

In a refrigerated centrifuge (Eppendorf Centrifuge 5804R), the homogenate was centrifuged at 770 *g* for 5 minutes at 4 °C. The supernatant, which contained the mitochondria, was then poured into another tube, in order to discard the sediment – which contained cells or cellular debris – and centrifuged at 9,800 *g* for 10 minutes. The pellet was resuspended with 10 mL of Wash Medium (250 mM sucrose, 0.3 mM EGTA and 10 mM HEPES-KOH at pH 7.2) and then centrifuged at 4,500 *g* for 15 minutes. The supernatant was then discarded and the final sediment (fraction rich in mitochondria) was resuspended with 1 mL of Resuspension Medium (250 mM sucrose

and 10 mM HEPES-KOH at pH 7.2) and kept on ice to be used in an experiment within a maximum of 3 hours.

#### **2.1.4 Dosage of mitochondrial proteins**

The following step in mitochondrial isolation is the determination of the mitochondrial protein concentration. The measurement of mitochondrial proteins after resuspension was performed using the biuret reaction (Pedersen et al., 1978). A 10  $\mu$ L aliquot of the suspension was added to 100  $\mu$ L of a 5% (w/v) deoxycholic acid solution and purified water, final volume of 1.5 mL. To this mixture, 1.5 mL of biuret reagent was added. Absorbance was monitored in a spectrophotometer (UV-1600PC, VWR) at 540 nm and a calibration curve was constructed using bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, code A7906) as standard. The protein concentration was determined from the ratio between the average absorbances of the samples and standards.

#### **2.1.5 Statistical analysis**

After each experiment, statistical evaluation was performed using analysis of variance (ANOVA), followed by Dunnett's test to compare the conditions with their respective controls, using the GraphPad Prism program (San Diego, USA) for Windows. A significant difference was assumed when  $p \leq 0.05$ .

### **2.2 Experimental procedures**

#### **2.2.1 Formation of reactive oxygen and nitrogen species**

The formation of Reactive Oxygen and Nitrogen Species (RONS) was monitored by spectrofluorimetry on the Synergy HTX equipment (Biotek), using the fluorescent probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCFDA, CAS RN 4091-99-0, Invitrogen, code C6827) at wavelengths of 503 nm for excitation and 529 nm for emission. Mitochondria (1.0 mg protein/mL) were incubated in Reaction Medium (125 mM sucrose, 65 mM potassium chloride, 10 mM HEPES-KOH, pH 7.2), added of 2.5  $\mu$ M rotenone (Sigma-Aldrich, code 45656) and 2  $\mu$ M H<sub>2</sub>DCFDA and energized by the addition of 5 mM potassium succinate. The exposure time was of 5 minutes. A

positive control induced by 300  $\mu$ M tert-butylhydroperoxide (Merck, code 8.14006.0250) was performed. DCFDA is a molecule that, after crossing biological membranes, is hydrolyzed by esterases, releasing the non-fluorescent molecule DCFH. However, in the presence of Reactive Oxygen Species (ROS), DCFH is quickly oxidized and transformed into DCF, which presents a high quantum yield of fluorescence when excited at 503 nm. Thus, the increase in fluorescence is directly proportional to the production of ROS by mitochondria, which also impacts the formation of RONS (Cathcart et al., 1983; de Oliveira et al., 2020).

### **2.2.2 Assessment of the redox state of pyridine nucleotides**

The redox state of pyridine nucleotides (NAD(P)H/(NAD(P)<sup>+</sup>) was monitored by fluorimetry using the Synergy HTX equipment (Biotek), at 366 nm for excitation and 450 nm for emission (de Oliveira et al., 2020). Mitochondria (1.0 mg protein/mL) were incubated in Reaction Medium plus 2.5  $\mu$ M rotenone and energized by the addition of 5 mM potassium succinate for 10 minutes. A positive control induced by 50  $\mu$ M iron plus 2 mM citrate was performed. Reduced pyridine nucleotides (NAD(P)H) are fluorescent, while oxidized ones (NAD(P)<sup>+</sup>) are not. Thus, changes in fluorescence intensity reflect changes in the redox state of pyridine nucleotides.

### **2.2.3 Mitochondrial levels of protein sulfhydryl groups**

Mitochondria (0.4 mg/mL) were pre-incubated in 1 mL of Swelling Medium (125 mM sucrose, 65 mM potassium chloride, 10 mM HEPES-KOH at pH 7.2, added of 2.5  $\mu$ M rotenone, 5 mM potassium succinate and 10  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub> [Dinâmica Química Contemporânea, code 1506]). The positive control was 50  $\mu$ M iron plus 2 mM citrate. After 30 minutes of exposure, 300  $\mu$ L of 30% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) were added, and the samples were centrifuged at 7400 *g* at 25 °C for 15 minutes. The supernatant was discarded and 1 mL of 0.5 M potassium phosphate buffer at pH 7.6 was added to the tube to solubilize the precipitate with the aid of a homogenizer. Samples were incubated at room temperature for 10 minutes. Then, 10 mM 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB, Sigma-Aldrich, code D8130) were added and the samples were vortexed, left at rest for 5 minutes at room temperature and centrifuged

for 2 minutes at 7400 *g*. DTNB reacts quickly with sulfhydryl groups, forming mixed disulfides and the p-nitrothiophenol anion, which is yellow, in an intensity proportional to the amount of sulfhydryl groups (Haugaard, 2000). The reading was performed at a wavelength of 412 nm. The concentration of protein sulfhydryl groups was calculated from the molar extinction coefficient ( $\epsilon = 13,600 \text{ mol/L/cm}$ ) (Jocelyn, 1987).

#### **2.2.4 Mitochondrial membrane potential**

The mitochondrial membrane potential was determined by spectrofluorimetry, using the Synergy HTX equipment (Biotek) (de Oliveira et al., 2020; Pereira et al., 2018), monitoring changes in the fluorescence of safranin-o (Sigma-Aldrich, code S2255), a cationic fluorescent dye that distributes by electrophoresis in the mitochondrial matrix in response to the negative charge of the inner membrane. Excitation wavelengths of 495 nm and emission wavelengths of 586 nm were applied. Mitochondria (1.0 mg of protein/mL) were incubated in the Reaction Medium, plus 10  $\mu\text{M}$  safranin-o and 2.5  $\mu\text{M}$  rotenone, in a final volume of 2 mL and energized by the addition of potassium 5 mM succinate. The experiment time was of 10 minutes. To entirely collapse the membrane potential, at the end of the experiment, 5  $\mu\text{L}$  of 1 mM m-chlorophenylhydrazone carbonylcyanide (CCCP, Sigma-Aldrich, code C2759) were used. The decrease in membrane potential observed by the electrogenic influx of the cation correlates with the increase in the fluorescence intensity of the dye as it is released from the mitochondria.

#### **2.2.5 Calcium efflux**

Extramitochondrial free calcium was monitored using the Calcium Green 5N probe (Molecular Probes) (Rajdev and Reynolds, 1993). 10  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ , 2  $\mu\text{M}$  rotenone and 150 nM Calcium Green 5N (Invitrogen, code C3737) were added to the Reaction Medium, in a final volume of 2 mL. Mitochondria (1.0 mg protein/mL) were energized with 5 mM potassium succinate and fluorescence was monitored at 37 °C by spectrofluorimetry, using excitation and emission wavelengths of 506 and 531 nm, respectively. The experiment time was of 10 minutes. Calcium efflux was performed

using 1 mM CCCP. As Calcium Green is taken up by the mitochondria, a decrease in the fluorescence of the medium is observed, allowing the monitoring of  $\text{Ca}^{+2}$  efflux.

### **2.2.6 Mitochondrial swelling**

Mitochondrial swelling was monitored by observing the decrease in the absorbance of the mitochondria suspension (1 mg of protein/mL), incubated for 10 minutes in 3 mL of the Swelling Medium, energized with 5 mM potassium succinate and examined at a wavelength of 520 nm, using a spectrophotometer (Shimadzu, model UV-1800). The swelling of mitochondria is accompanied by a decrease in the turbidity of the suspension and a proportional decrease in absorbance (Castilho et al., 1997; Fernandes et al., 2014; Lemasters et al., 1987). The process of mitochondrial swelling can be observed by spectrophotometry because the swollen matrix has a lower refractive index than the condensed form, making structural changes noticeable (Zoratti and Szabò, 1995).

### **2.2.7 Structural analysis of mitochondria**

Transmission Electron Microscopy (TEM) analysis of slides containing hepatic mitochondria was carried out in the Electron Microscopy Center of the Biosciences Institute of Botucatu. Mitochondria (1 mg/mL) were exposed for 30 minutes to 200  $\mu\text{M}$  of 2,4-D, isolated or in the formulated product, in Reaction Medium. After another centrifugation at 4,500  $g$  and 4  $^{\circ}\text{C}$  for 15 minutes, a new mitochondrial pellet was obtained, resuspended and sent for analysis. Similarly, negative controls (without addition of test substances) and positive controls (inorganic phosphate) were examined. The samples were fixed in Karnovsky solution (Karnovsky, 1964) for 24 hours, washed 3 times for 5 minutes in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.3) and post-fixed in 1% osmium tetroxide in the same buffer for 2 hours at room temperature. They were then washed 3 times for 10 minutes in distilled water and contrasted in blocks in 0.5% uranyl acetate for 2 hours at room temperature; these were dehydrated in a growing acetone solution, soaked in acetone solution and Araldite resin for 24 hours and embedded in Araldite. Ultrathin sections were counterstained with uranyl acetate and lead citrate (Reynolds, 1963). The material was examined using a Tecnai Spirit

Transmission Electron Microscope (FEI Company) at 80 kv. Analysis of photomicrographs was performed using ImageJ 1.54D software (NIH, USA).

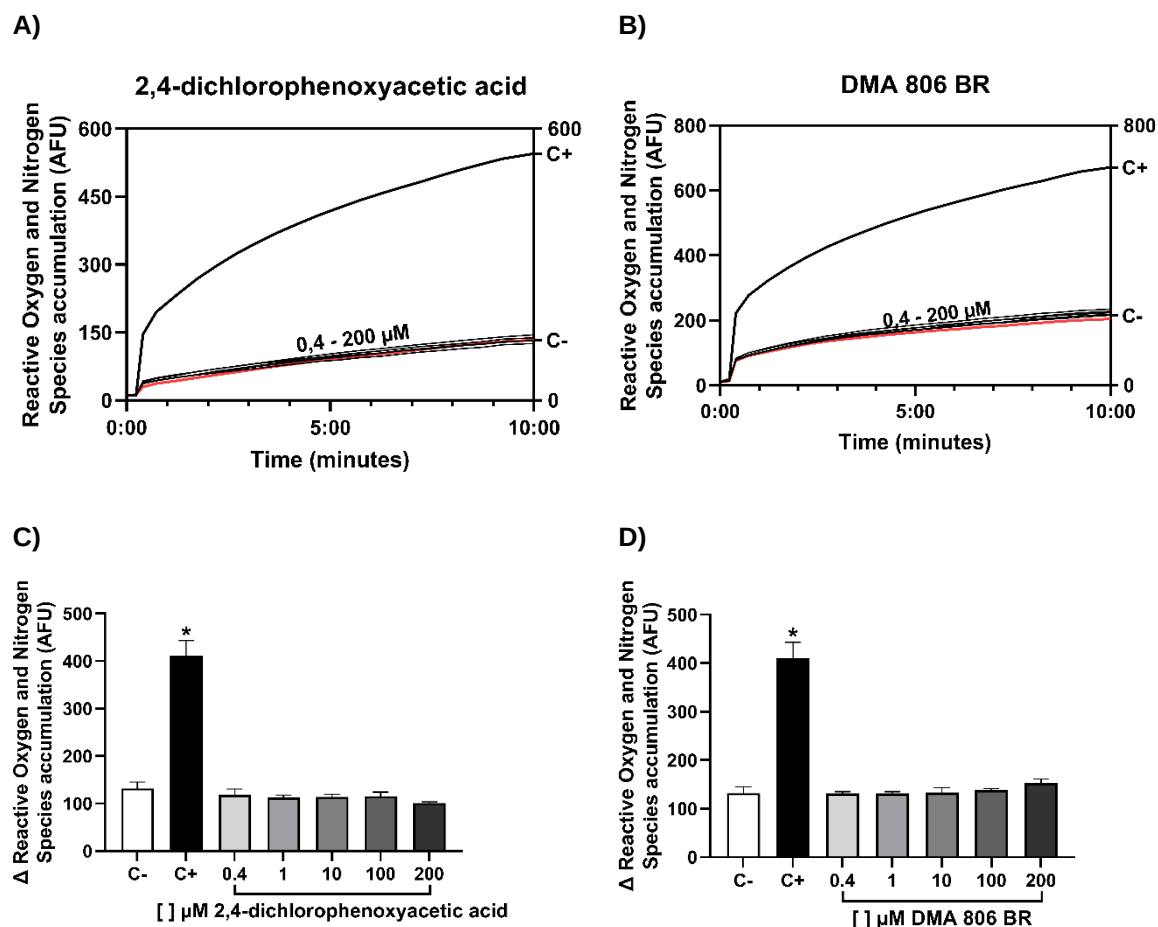
### **2.2.8 Mitochondrial respiration**

Oxygen consumption by mitochondria was monitored in an oxygraph equipped with a Clark electrode (Model Hansatech Oxygraph+, England) (Chance and Williams, 2006) after energization with potassium 5  $\mu$ M succinate (de Oliveira et al., 2020). Mitochondria (1.0 mg protein/mL) were incubated in 1 mL of Respiration Medium (250 mM sucrose, 65 mM potassium chloride, 10 mM HEPES-KOH, 10 mM potassium phosphate and 0.3 mM EGTA) (Fernandes et al., 2014; Pedersen et al., 1978). State III respiration was initiated with 400 nmol adenosine diphosphate (ADP). The experiment time was of 5 minutes. The respiratory control ratio (RCR) was determined by dividing the speed of oxidative consumption (S3) by the return to the basal state of mitochondria (S4). To determine the ratio of ADP per oxygen molecule (ADP/O), the amount of ADP inserted (400 nmol) was divided by the oxygen consumption during the oxidative consumption stage.

## **3 Results**

The formation of RONS and their subsequent attack on components of the mitochondrial membrane (lipoperoxidation) can promote the formation of pores, the transition of mitochondrial permeability and, consequently, cell death. However, for both the formulated 2,4-D and the 2,4-D, the formation and accumulation of RONS were not observed at any of the concentrations evaluated using the H<sub>2</sub>DCFDA probe (figure 1). The line graphs present a representative result among the three experimental days. Bar graphs represent the range or variation of results at the end of the experiment.

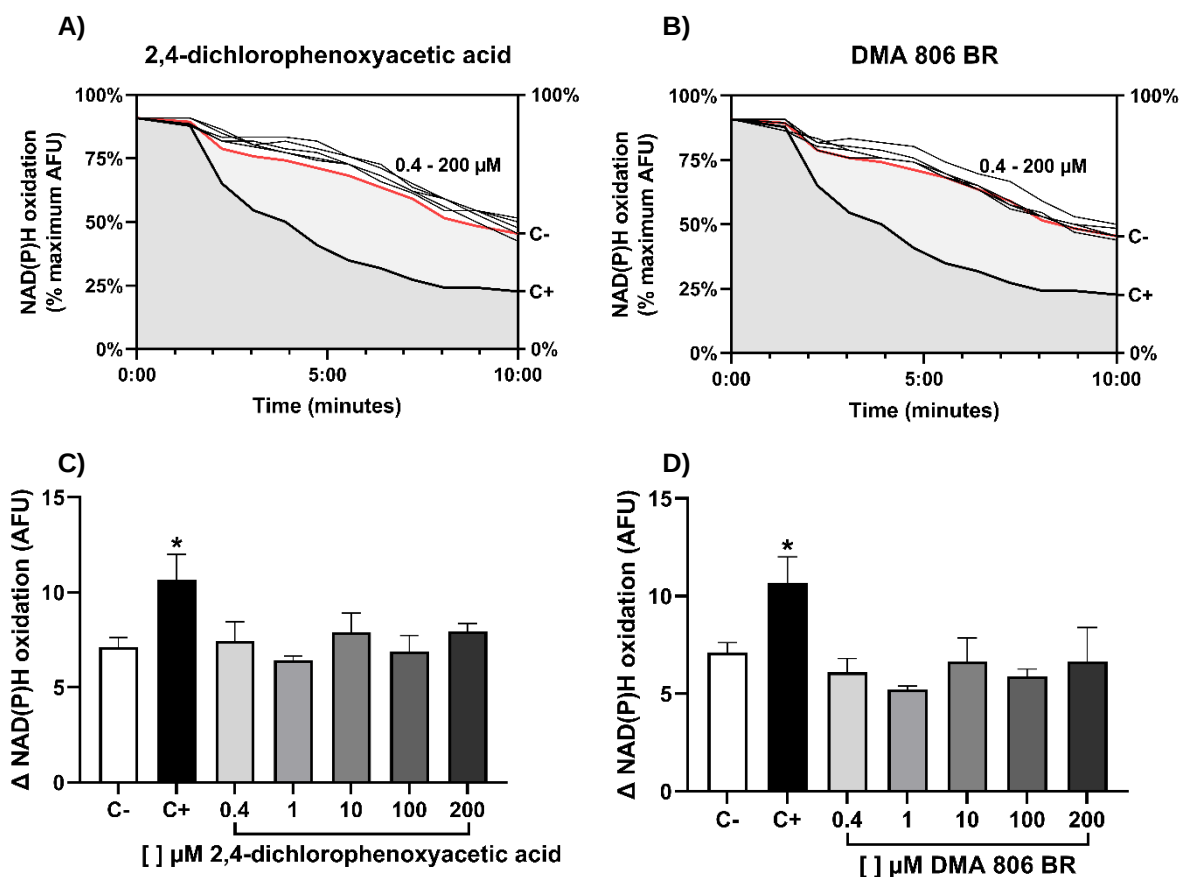
**Figure 1 - Formation and accumulation of RONS in isolated mitochondria after exposure to isolated and formulated 2,4-D**



Mitochondria (1.0 mg of protein/mL) incubated for 10 minutes in Reaction Medium, added of 5 mM potassium succinate + 2.5 μM rotenone and 2 mM H<sub>2</sub>DCFDA in a final volume of 1 mL. The positive control was induced with 300 μM t-butylhydroperoxide. Top row: Representative trace of the formation and accumulation of RONS for **A)** isolated and **B)** formulated 2,4-D. Bottom row: Mean and standard deviation of the fluorescence variation of three different mitochondrial preparations for **C)** isolated and **D)** formulated 2,4-D. AFU = Arbitrary Fluorescence Unit. C- = negative control. C+ = positive control. \* = significant for  $p \leq 0.05$  when compared to the negative control. RONS = Reactive Oxygen and Nitrogen Species.

To confirm the results observed in the RONS formation analysis, the effect of the substances on the oxidation of pyridine nucleotides (NAD(P)H) was evaluated (figure 2). However, for both the formulated and the isolated 2,4-D, there was no significant oxidation of NAD(P)H.

**Figure 2 - NAD(P)H levels in isolated mitochondria after exposure to isolated and formulated 2,4-D**

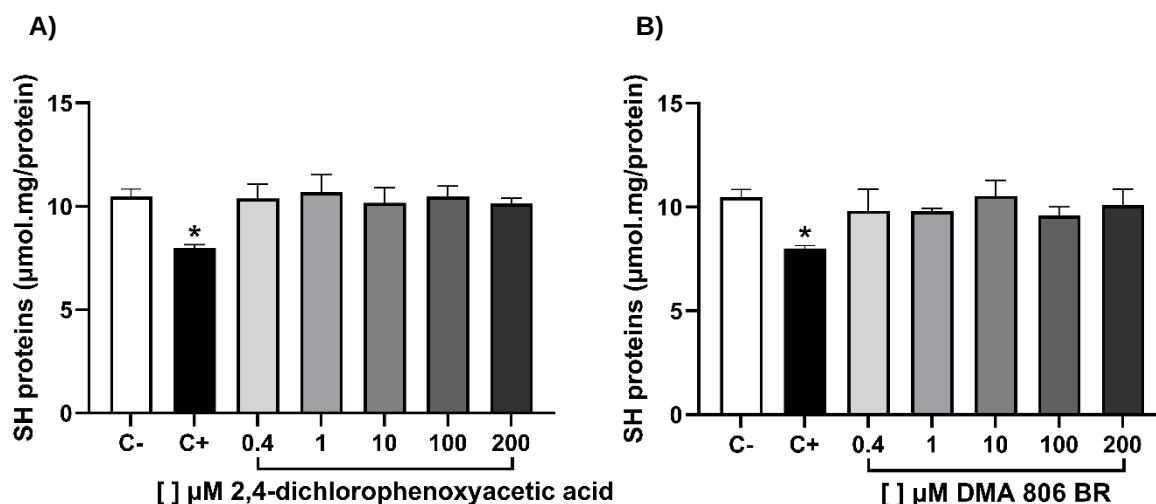


Mitochondria (1.0 mg of protein/mL) incubated for 10 minutes in Reaction Medium, added of 5 mM potassium succinate + 2.5  $\mu$ M rotenone in a final volume of 1 mL. The positive control was induced with 50  $\mu$ M iron and 2 mM citrate. Top row: Representative trace of NAD(P)H oxidation in mitochondria exposed to **A)** isolated and **B)** formulated 2,4-D. Bottom row: Mean and standard deviation of the fluorescence variation of three different mitochondrial preparations for **C)** isolated and **D)** formulated 2,4-D. AFU = Arbitrary Fluorescence Unit. C- = negative control. C+ = positive control. \* = significant for  $p \leq 0.05$  when compared to the negative control. NAD(P)H = reduced pyridine nucleotides.

As shown, no changes in the formation of RONS or changes in the redox state of pyridine nucleotides were observed. To collaborate with the results regarding the mitochondrial redox state, the levels of sulfhydryl groups of proteins were monitored (figure 3) to check the possibility of some stage of exposure culminating in the oxidation of thiol groups of mitochondrial membrane proteins. However, none of

the concentrations significantly induced the oxidation of thiol groups when compared to the negative control.

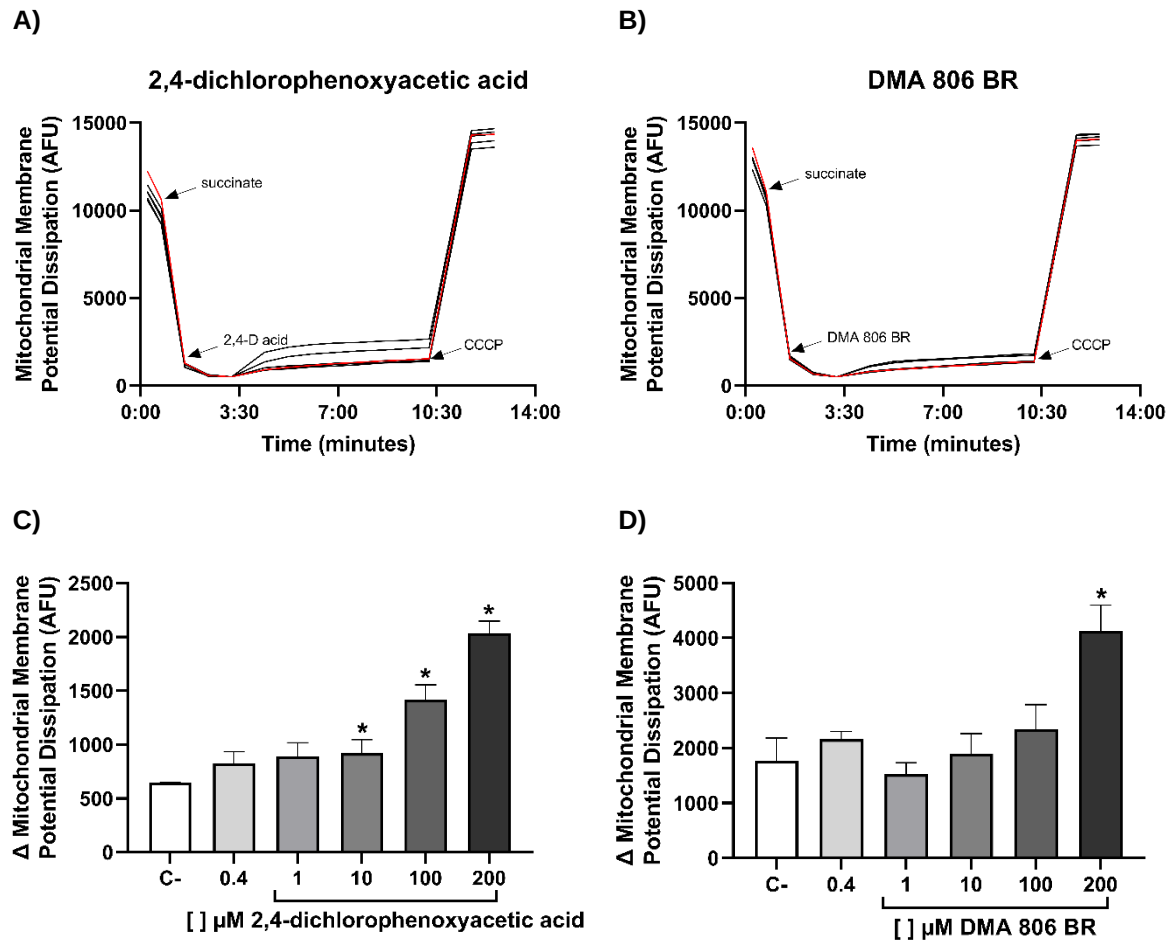
**Figure 3 - Effects on the oxidation of sulfhydryl groups of mitochondrial proteins exposed to isolated and formulated 2,4-D**



Mitochondria (1.0 mg of protein/mL) incubated for 30 minutes in Reaction Medium, added of 5 mM potassium succinate + 2.5 µM rotenone in a final volume of 1 mL. Oxidation of sulfhydryl groups in positive controls was induced with 300 µM t-butylhydroperoxide. Mean and standard deviation of the variation of three different mitochondrial preparations for **A)** isolated and **B)** formulated 2,4-D. SH = sulfhydryl. C- = negative control. C+ = positive control. \* = significant for  $p \leq 0.05$  when compared to the negative control.

Next, the ability of the substances to dissipate the mitochondrial membrane potential was evaluated (figure 4). The formulated 2,4-D was only able to dissipate the membrane potential at the highest concentration, 200 µM. The isolated 2,4-D, in turn, was able to dissipate the membrane potential in the three highest concentrations tested (10, 100 and 200 µM), specially in the last two.

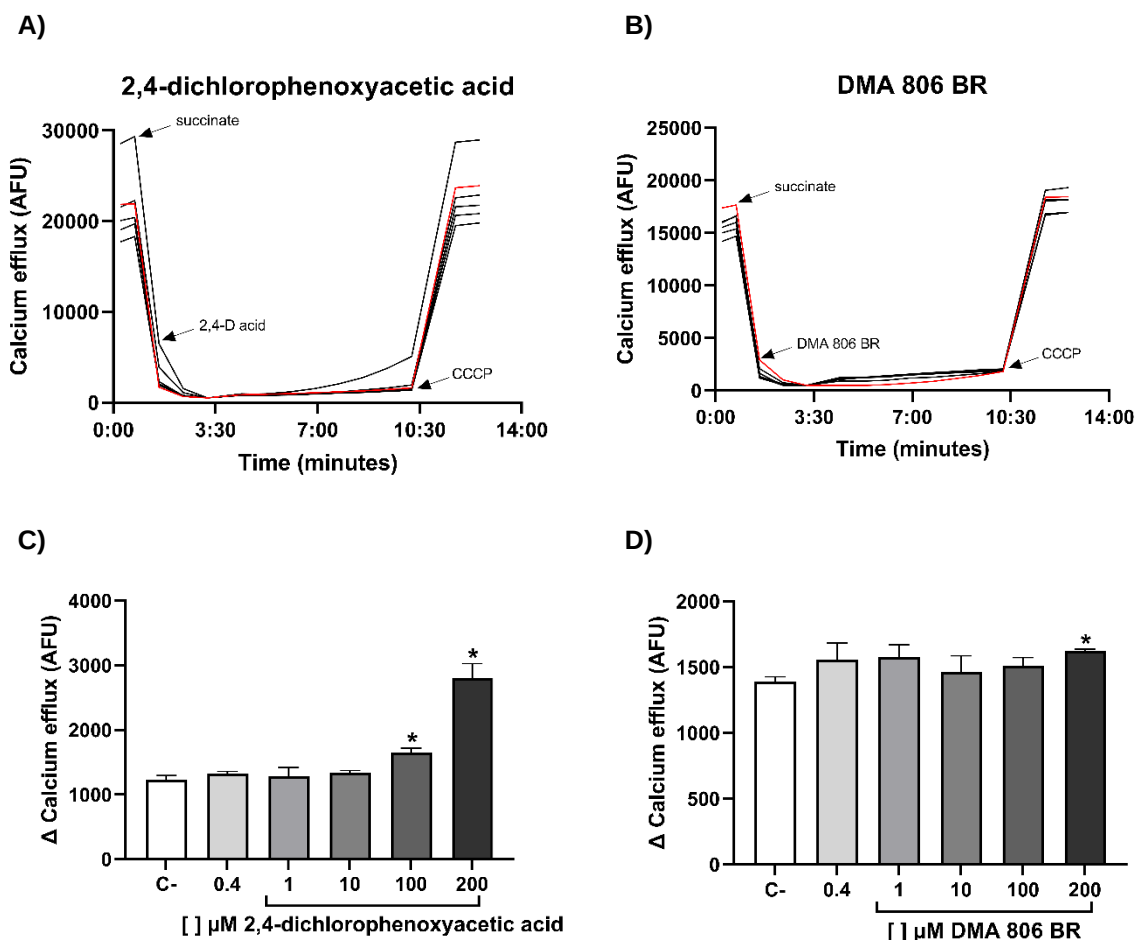
**Figure 4 - Analysis of the membrane potential of mitochondria exposed to isolated and formulated 2,4-D**



Mitochondria (1.0 mg protein/mL) incubated for 10 minutes in Reaction Medium, plus 10  $\mu\text{M}$  safranin-o, in a final volume of 1 mL and energized by the addition of 5 mM potassium succinate + rotenone 2.5  $\mu\text{M}$ . At the end of the experiment, the membrane potential was dissipated with 1 mM CCCP. Top row: Representative trace of membrane potential in mitochondria exposed to **A)** isolated and **B)** formulated 2,4-D. Bottom row: Mean and standard deviation of the fluorescence variation of three different mitochondrial preparations for **C)** isolated and **D)** formulated 2,4-D. AFU = Arbitrary Fluorescence Unit. C- = negative control. \* = significant for  $p \leq 0.05$  when compared to the negative control. CCCP = carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazone.

Effects on membrane potential may reflect changes in calcium movement, considering the electropositivity of  $\text{Ca}^{+2}$  and the activity of transport channels. To monitor the efflux of calcium from the interior of mitochondria to the surroundings, an analysis of calcium uptake and efflux was performed (figure 5).

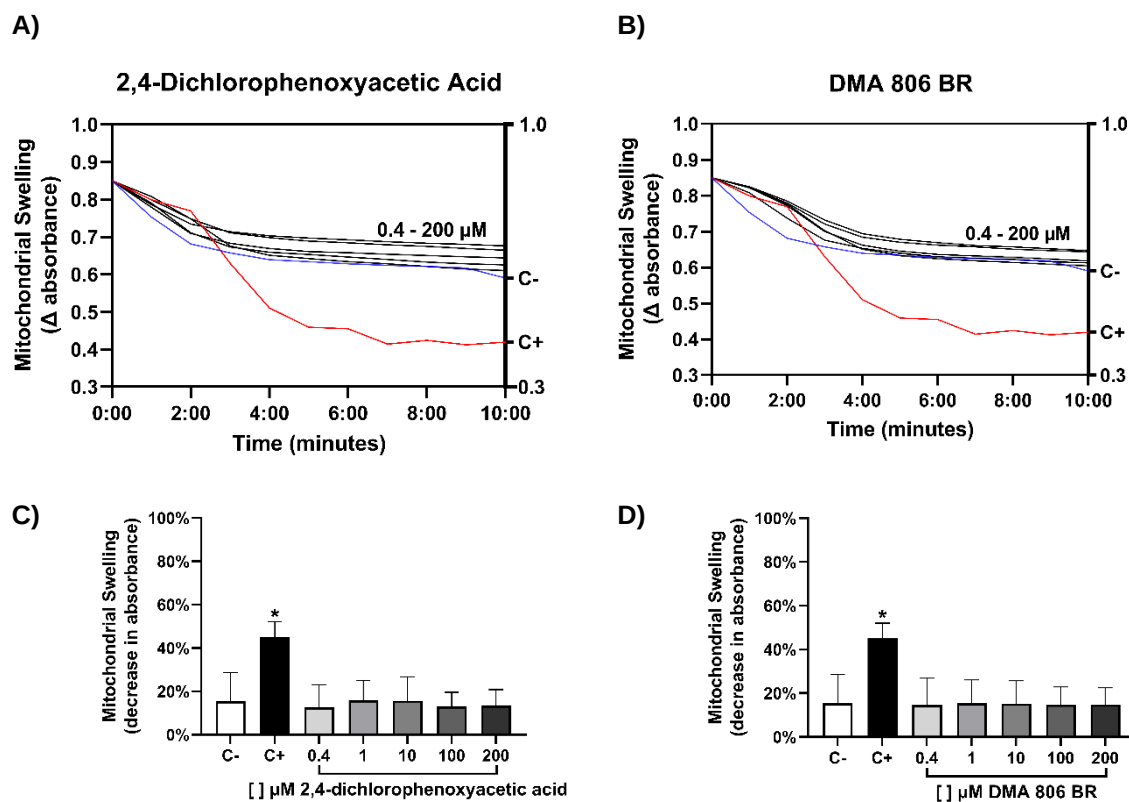
**Figure 5 - Analysis of calcium movement in mitochondria exposed to isolated and formulated 2,4-D**



Mitochondria (1.0 mg protein/mL) incubated for 10 minutes in Reaction Medium, added of 2.5 μM rotenone and 150 nM Calcium Green 5N, in a final volume of 1 mL and energized by the addition of 5 mM potassium succinate. At the end of the experiment, calcium efflux was induced by 1 mM CCCP. Top row: Representative trace of calcium efflux in mitochondria exposed to **A)** isolated and **B)** formulated 2,4-D. Bottom row: Mean and standard deviation of the fluorescence variation of three different mitochondrial preparations for **C)** isolated and **D)** formulated 2,4-D. AFU = Arbitrary Fluorescence Unit. C- = negative control. \* = significant for  $p \leq 0.05$  when compared to the negative control. CCCP = carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazone.

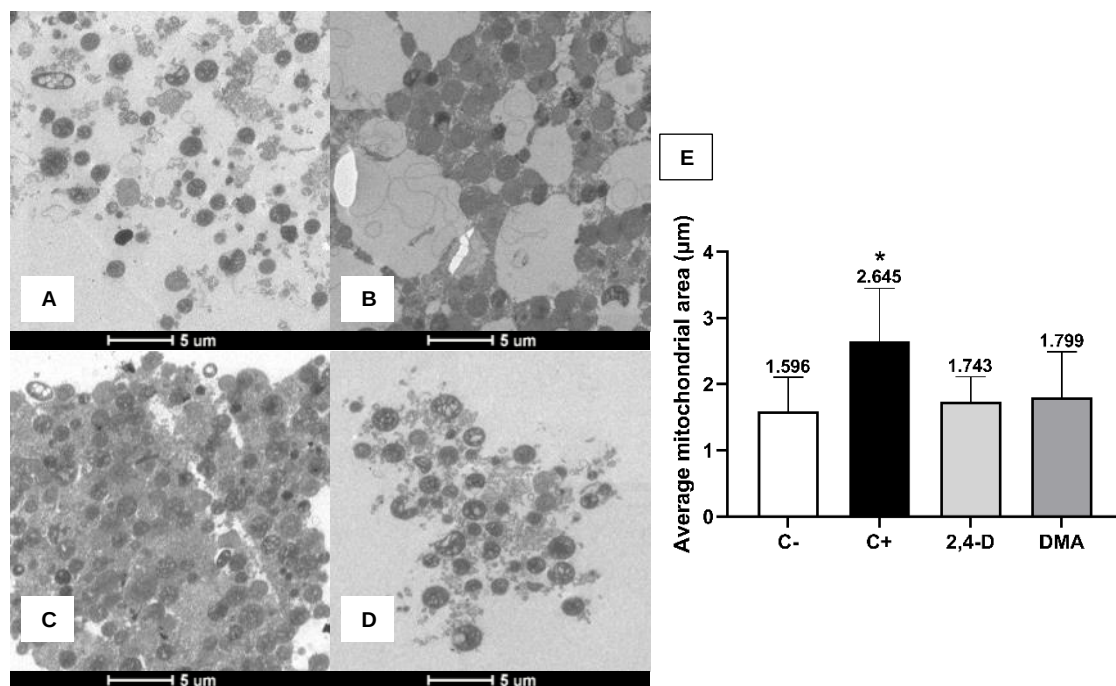
Understanding the effects of the substances analyzed on the mitochondrial structure benefited from evaluation by spectrophotometry and transmission electron microscopy (figures 6 and 7). General characteristics were evaluated, observing swelling or effects on the area or integrity after exposure.

**Figure 6 - Assessment of swelling of mitochondria exposed to isolated and formulated 2,4-D by spectrophotometry**



Mitochondria (0.4 mg of protein/mL) incubated for 10 minutes in Swelling Medium, added of 2.5  $\mu\text{M}$  rotenone, in a final volume of 3 mL and energized by the addition of 5 mM potassium succinate. The cuvettes were read spectrophotometrically at a wavelength of 520 nm. Swelling was induced using 300  $\mu\text{M}$  t-butylhydroperoxide and 100  $\mu\text{M}$  calcium chloride. Top row: Representative trace of swelling in mitochondria exposed to **A)** isolated and **B)** formulated 2,4-D. Bottom row: Mean and standard deviation of the absorbance variation of three different preparations for **C)** isolated and **D)** formulated 2,4-D. C- = negative control. C+ = positive control. \* = significant for  $p \leq 0.05$  when compared to the negative control.

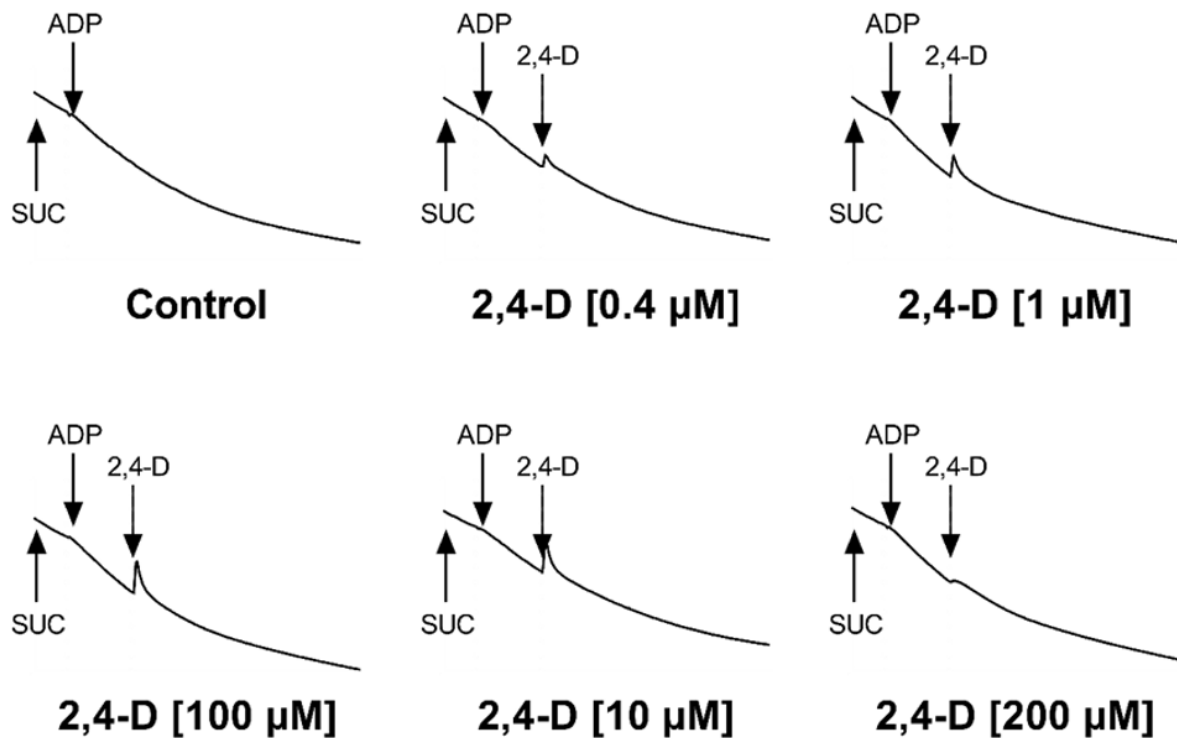
**Figure 7 - Structural analysis of mitochondria exposed to the isolated and the formulated product containing 2,4-D by Transmission Electron Microscopy**



Mitochondria (2 mg/mL) were exposed for 30 minutes to 200 μM of isolated or formulated 2,4-D, in Reaction Medium. The material was examined using a Tecnai Spirit Transmission Electron Microscope (FEI Company) at 80 kv. Representative photomicrographs of isolated mitochondria exposed to **A)** no additional substance (negative control); **B)** 1 mM inorganic phosphate (positive control); **C)** 200 μM 2,4-D; and **D)** 2,4-D formulated at 200 μM. **E)** Means and standard deviations of the two-dimensional areas of mitochondria, obtained by representative evaluation in each of the conditions using ImageJ software. C- = negative control. C+ = positive control. \* = significant for  $p \leq 0.05$  when compared to the negative control. 2,4-D = 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. DMA = DMA 806 BR formulated product.

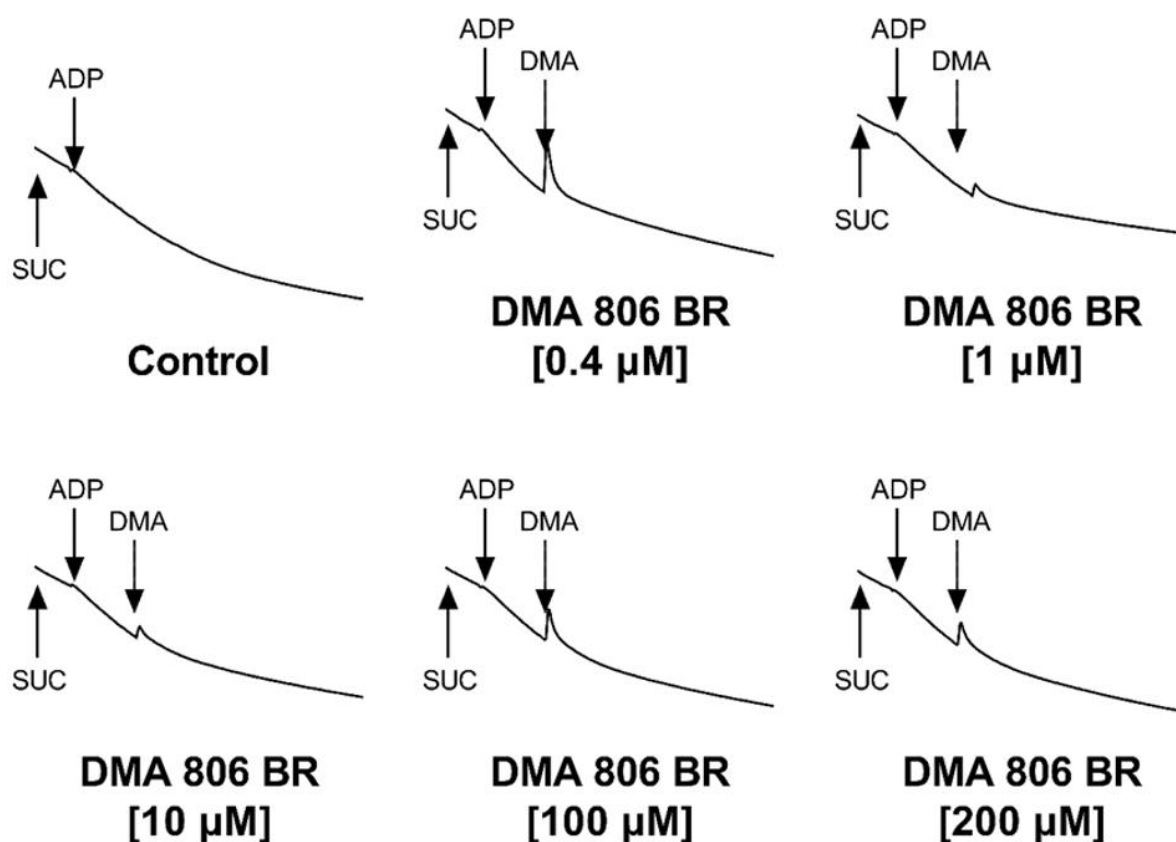
The influence on respiratory parameters was assessed with an oxygraph. Individually, a pattern of oxygen consumption similar to that observed in the control was observed for all conditions, as follows (figures 8 and 9).

**Figure 8 - Oxygen consumption by isolated mitochondria exposed to 2,4-D**



Mitochondria (1.0 mg protein/mL) incubated for 5 minutes in Respiration Medium, added of 2.5 μM rotenone and energized with 5 μM potassium succinate in a final volume of 1 mL. State III respiration was initiated with 400 nmol ADP. Individual representative trace of oxygen consumption in mitochondria exposed to 2,4-D. Data are represented as nmol/L of O<sub>2</sub> molecules. SUC = potassium succinate. ADP = adenosine diphosphate. 2,4-D = 2,4-dichlorophenoxyacetic acid.

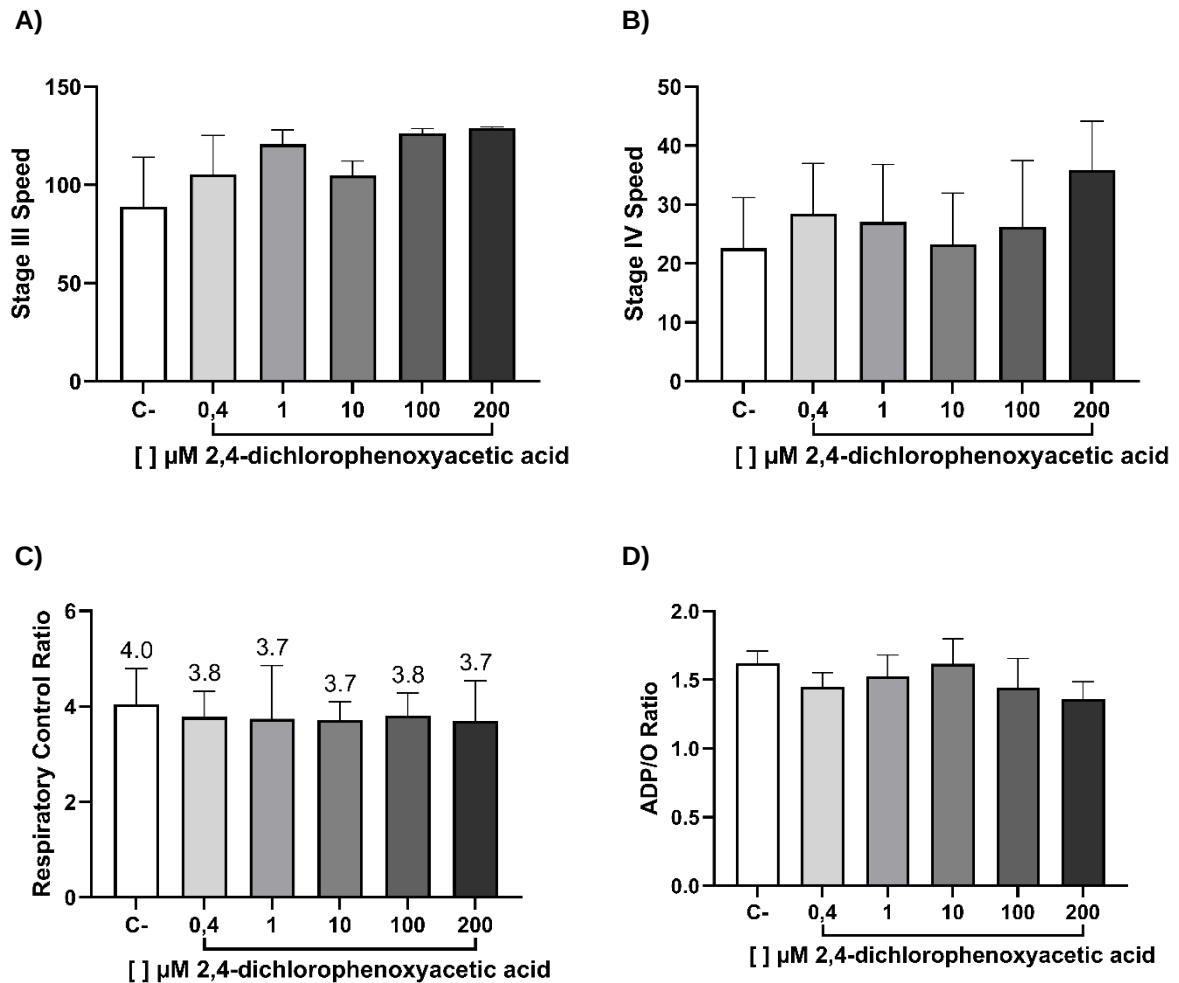
**Figure 9 - Oxygen consumption by isolated mitochondria exposed to formulated 2,4-D**



Mitochondria (1.0 mg protein/mL) incubated for 5 minutes in Respiration Medium, added of 2.5  $\mu\text{M}$  rotenone and energized with 5  $\mu\text{M}$  potassium succinate in a final volume of 1 mL. State III respiration was initiated with 400 nmol ADP. Individual representative trace of oxygen consumption in mitochondria exposed to the formulated product containing 2,4-D. Data are represented as nmol/L of  $\text{O}_2$  molecules. SUC = potassium succinate. ADP = adenosine diphosphate. DMA = DMA 806 BR formulated product.

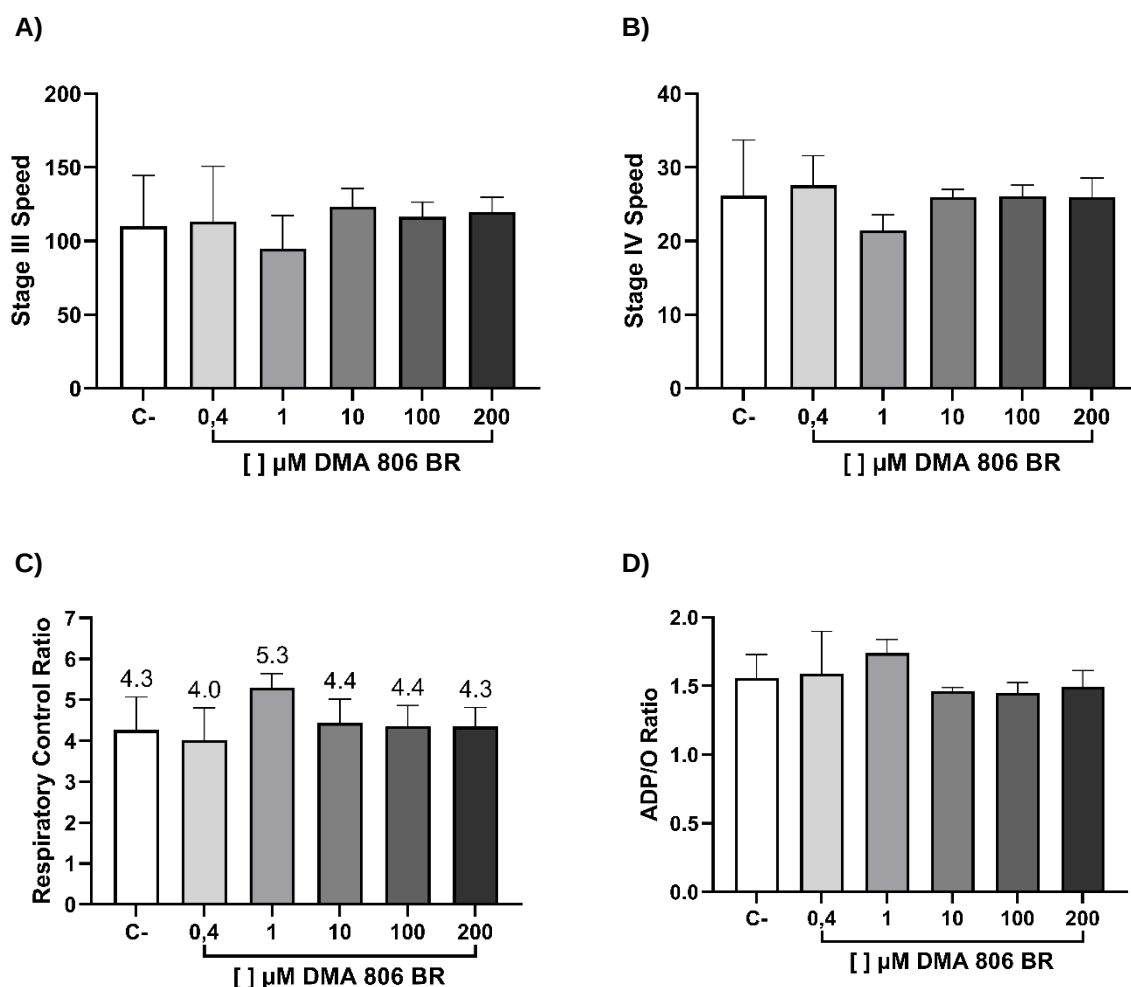
As shown, there was no practical difference between oxygen consumption for the different experimental conditions. This can be statistically confirmed by analyzing respiratory parameters, namely speed of states 3 and 4, RCR and ADP/O ratio (figures 10 and 11).

**Figure 10 - Respiratory parameters of isolated mitochondria after exposure to 2,4-D**



Mitochondria (1.0 mg protein/mL) incubated for 5 minutes in Respiration Medium, added of 2.5  $\mu\text{M}$  rotenone and energized with 5  $\mu\text{M}$  potassium succinate in a final volume of 1 mL. State III respiration was initiated with 400 nmol ADP. Top row: Speed of oxygen consumption rate in **A)** state III and **B)** state IV by mitochondria exposed to 2,4-D. Bottom row: Ratios of **C)** respiratory control and **D)** ADP/O of mitochondria exposed to 2,4-D. ADP/O = phosphorylated adenosine diphosphate molecules per oxygen molecule consumed.

**Figure 11 - Respiratory parameters of isolated mitochondria exposed to the formulated product containing 2,4-D**



Mitochondria (1.0 mg protein/mL) incubated for 5 minutes in Respiration Medium, added of 2.5 µM rotenone and energized with 5 µM potassium succinate in a final volume of 1 mL. State III respiration was initiated with 400 nmol ADP. Top row: Speed of oxygen consumption rate in **A)** state III and **B)** state IV by mitochondria exposed to 2,4-D in formulated product. Bottom row: Ratios of **C)** respiratory control and **D)** ADP/O of mitochondria exposed to 2,4-D in formulated product. ADP/O = phosphorylated adenosine diphosphate molecules per oxygen molecule consumed.

## 4 Discussion

The present work proposed to evaluate the in vitro mitochondrial effects of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on isolated mitochondria and to correlate the findings with what is described in the literature, in order to investigate the participation of mitochondria in the biological outcomes of exposure. To do so, the dose

range from 0.4 to 200  $\mu\text{M}$  (0.08841 to 44.21 ppm) was selected to study the effects of concentrations found in the environment (0.4  $\mu\text{M}$ ) (de Castro Lima et al., 2020; World Health Organization, 2017) and concentrations used in studies with isolated mitochondria described in the literature, generally within the order of 0.1 to 1000  $\mu\text{M}$  (de Oliveira et al., 2020; Palmeira et al., 1994a; Pereira et al., 2013).

Scientific literature points out that the liver is one of the main target organs for 2,4-D toxicity (Bueno Franco Salla et al., 2019; Tayeb et al., 2013; Troudi et al., 2012). Exposure to 2,4-D increased the activity of liver damage biomarkers (aspartate and alanine aminotransferases and alkaline phosphatase) and altered the enzymatic profile related to oxidative (glutathione S-transferase and catalase) and metabolic (lactate dehydrogenase) stress in zebrafish, causing serious changes such as vacuolation of the cytosol, eccentric cell nucleus and loss of tissue architecture and cell boundaries (Martins et al., 2021). In rats, 2,4-D intoxication caused liver and kidney damage, as indicated by increases in biomarkers (alkaline phosphatase, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, urea, creatinine, and blood urea nitrogen). Furthermore, it caused an increase in the level of malondialdehyde and a reduction in the activities of superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase in liver and kidney tissues (Shafeeq and Mahboob, 2020).

Studies demonstrate that 2,4-D can induce the generation of free radicals and associated oxidative stress responses, as observed in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), evidenced by the generation of hydroxyl radicals in a dose-dependent manner, consistently greater in mutants lacking cytosolic copper-zinc superoxide dismutase (Teixeira et al., 2004). In freshly isolated rat hepatocytes, a 3-hour exposure to 2,4-D reduced NADH levels from 1.8 to 0.53 and to 0 nmol/ $10^6$  cells at concentrations of 5 and 10 mM, respectively (Palmeira et al., 1994b). In general, certain synthetic auxins can lead to mitochondrial dysfunction and oxidative stress in plant cells through mechanisms such as loss of phosphorylation capacity (Peixoto et al., 2003). Many data in the literature suggest that exposure to 2,4-D is capable of causing cellular events related to oxidative stress; however, there is little information about the induction of oxidative stress in isolated mitochondria.

Our results indicate that oxidative stress is not a mechanism of mitochondrial toxicity of 2,4-D, as evidenced by the lack of significant response in

assessments of RONS accumulation, oxidation of NADPH molecules and oxidation of protein sulfhydryl groups. This can be justified by the wide variation in possible oxidative stress events, according to the experimental model. For example, in erythrocytes, 2,4-D was also unable to cause changes in the number of free thiol groups (Duchnowicz and Koter, 2003). In isolated mitochondria, the herbicide trifluralin can disrupt mitochondrial respiration without inducing oxidative stress (de Oliveira et al., 2020), although it decreased the levels of SOD and glutathione peroxidase and increased lipoperoxidation in the kidneys, ureter and urinary bladder of Wistar rats treated with doses starting at 0.8 g/kg/day (Denek et al., 2013). In general, we know that 2,4-D exerts its activity in cells by mimicking auxins (Woodward and Bartel, 2005); however, the extent of its actions in mitochondria, considering its selective permeability and how well regulated the organelle's defenses are (Alberts et al., 2002), have not yet been well established.

The distribution of substances varies according to the test system, being able to accumulate in certain regions and react with other elements in a different way than what would happen in an organelle with the dynamics and dimensions of mitochondria (Willems et al., 2015; Zheng et al., 2022). Additionally, there are marked differences in the antioxidant properties and defenses present in different cellular compartments. Mitochondria have a unique environment, with a high generation of ROS, and therefore must have an efficient antioxidant defense system – which includes distinct levels of elements such as glutathione, SOD and glutathione peroxidase (Pereira, 2012). Finally, it is of note that the experimental models that present an oxidative stress response are models with greater metabolic activity, which indicates that the response observed under these conditions may be due to the action of metabolites or metabolism per se. This behavior is characteristic of substances such as the herbicide diuron, whose metabolites can promote more prominent changes in the antioxidant response and biotransformation process when compared to the original compound (Felício et al., 2018). Indeed, 2,4-D has shown less severe toxicity than its metabolite 2,4-dichlorophenol in other experimental models (Ju et al., 2019). Taken together, this data brings attention to the differences in the responses induced by 2,4-D and its metabolites and justifies the absence of effects of 2,4-D on redox balance in isolated mitochondria.

In experiments in liver cells with concentrations starting from 100  $\mu\text{M}$ , 2,4-D was demonstrated to be a respiration uncoupler, by decreasing the mitochondrial membrane potential and inhibiting complexes II and III (succinate dehydrogenase and cytochrome c reductase), while cytochrome c oxidase (complex IV) was not affected (Bueno Franco Salla et al., 2019; Palmeira et al., 1994a, 1994b). In this context, the assessment of mitochondrial membrane potential is essential in understanding the function of the organelle, since the uncoupling of mitochondrial respiration by toxicants can be controlled by the respiratory chain, while coupled respiration at rest (state IV) is controlled by the movement of protons across the inner mitochondrial membrane and respiratory chain (Palmeira et al., 1994a). In molecular dynamics simulations, 2,4-D showed little affinity for the hydrophobic regions of a typical membrane and only entered it when high concentrations accompanied a large number of water molecules (Bueno Franco Salla et al., 2019). However, exposure has been shown to be destructive to lipid bilayers, which suggests that the effects on liver enzymes observed clinically in cases of human 2,4-D poisoning may result from direct interactions with cell membranes (Bradberry et al., 2004; Bueno Franco Salla et al., 2019). The results of the present study are in line with studies on hepatocytes in the literature, indicating that concentrations of 100  $\mu\text{M}$  and higher are capable of dissipating the membrane potential in isolated mitochondria. Although statistically limitrophe ( $p = 0.0447$ ), the concentration of 10  $\mu\text{M}$  was also capable of doing so, but we interpret this data as indicative of the tendency towards dissipation of the membrane potential at concentrations starting from 10  $\mu\text{M}$ . For the formulated product tested, only the concentration of 200  $\mu\text{M}$  was able to dissipate the membrane potential, although it is possible to observe a non-significant trend at lower doses.

Still regarding the integrity of the mitochondrial membrane function, it is important to remember that  $\text{Ca}^{2+}$  must have its concentrations finely controlled, as it is an effector of mitochondrial function. The concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  participates in the activation of caspases and favors the opening of the mitochondrial permeability transition pore, one of the main mechanisms for inducing structural changes, such as mitochondrial swelling (Pereira, 2012; Pinton et al., 2008). Considering our results regarding the ability of 2,4-D to dissipate membrane potential, it was expected that concentrations demonstrating such effect would be capable of inducing calcium efflux

(Scitable, 2014). When the uncoupling between electron transport and ATP synthesis occurs – a possible consequence of the dissipation of membrane potential – the consumption of protons by ATP synthase is interrupted. Such collapse of the proton gradient can affect the function of the mitochondrial calcium uniporter, a transmembrane protein that allows the passage of calcium ions from the cytosol to the mitochondria (Pinton et al., 2008). Indeed, at the same concentrations at which membrane potential was dissipated, calcium efflux was greater: for the formulated product, at the highest concentration tested (200  $\mu$ M); for 2,4-D, at the two highest concentrations tested (100 and 200  $\mu$ M). The effect on calcium efflux was not significant at a concentration of 10  $\mu$ M of 2,4-D, the lowest concentration at which the membrane potential was significantly dissipated, which endorses the interpretation that what was observed at this concentration indicates only a tendency to the onset of the analyzed events. Again, the effect observed with exposure to the formulated product was less prominent when compared to isolated 2,4-D.

These results lead us to question whether the formulation excipients that accompany 2,4-D in formulated products somehow delay the events that lead to the dissipation of membrane potential or alter the effects of 2,4-D on the mitochondrial membranes. The excipients of a commercial formulation can affect the final activity of the product, and the final result in an organism can reflect an increase or decrease in toxicity, depending on the dynamics between the activities and concentrations of the components. A study has already compared the membrane degradations and mitochondrial and caspase activities of nine pesticides, including glyphosate (a commercially important herbicide) and fluroxypyr (a synthetic auxin, such as 2,4-D). Of these, eight formulations were up to a thousand times more toxic than their isolated active ingredients (Mesnage et al., 2014). Our negative results for oxidative stress and positive results for membrane potential dissipation contribute to the construction of a hypothesis of direct activity of 2,4-D on mitochondrial membranes, both in isolated form and as an active formulation ingredient.

The dissipation of membrane potential and changes in calcium efflux observed may accompany structural events such as swelling, density and staining of mitochondria. However, with the analysis of photomicrographs obtained by transmission electron microscopy (TEM), it was not possible to observe a trend

towards an increase in the two-dimensional area of the organelles or significant visual changes. Furthermore, in experiments evaluating mitochondrial swelling by spectrophotometry, the results were comparable to negative controls in both conditions, indicating that exposure to the herbicide is not capable of inducing significant mitochondrial swelling.

The effects on mitochondrial respiration, a crucial function of mitochondria, were also evaluated. In a previous study with isolated mitochondria, RCR and ADP/O values reached half of their control values at 750  $\mu\text{M}$  in the presence of succinate. However, at concentrations close to those tested in the present study (up to 250  $\mu\text{M}$ ), these values were close to those of negative controls (Zychlinski and Zolnierowicz, 1990). Our results for 2,4-D corroborate these results, as the exposure to concentrations of up to 200  $\mu\text{M}$  was not able to impact oxygen consumption or mitochondrial respiration parameters. Furthermore, we demonstrated that there is no difference in the effects on mitochondrial respiration after exposure to the formulated product – which indicates that excipients commonly used in industry do not add toxicity to the formulation for respiratory parameter outcomes.

In summary, exposure to up to 200  $\mu\text{M}$  of isolated or formulated 2,4-D is not capable of inducing oxidative stress in isolated mitochondria. Concentrations from 100  $\mu\text{M}$  are capable of dissipating membrane potential and inducing calcium efflux, demonstrating interactions with mitochondrial membranes. However, these interactions are not sufficient to impact respiratory parameters or cause mitochondrial swelling (Figure 13).

**Figure 12 - Summary of results observed after exposure of isolated mitochondria to isolated and formulated 2,4-D**

|                                      | Concentration (μM) |   |       |       |     |
|--------------------------------------|--------------------|---|-------|-------|-----|
|                                      | 0,4                | 1 | 10    | 100   | 200 |
| RONS formation                       |                    |   |       |       |     |
| NAD(P)H oxidation                    |                    |   |       |       |     |
| Sulfhydryl groups oxidation          |                    |   |       |       |     |
| Membrane potential dissipation       |                    |   | 2,4-D |       | FP  |
| Calcium efflux                       |                    |   |       | 2,4-D | FP  |
| Swelling - spectrophotometry         |                    |   |       |       |     |
| Swelling - microscopy                |                    |   |       |       |     |
| Changes in mitochondrial respiration |                    |   |       |       |     |

Summary of the results observed after exposure of isolated liver mitochondria to isolated 2,4-D and to equivalent concentrations of the formulated product DMA 806 BR. RONS = Reactive Oxygen and Nitrogen Species. NAD(P)H: reduced pyridine nucleotides. 2,4-D: isolated 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. FP = formulated product.

Our hypothesis is that, for exposures to concentrations equal to or greater than 100 μM, the initial toxicological effects of 2,4-D on isolated mitochondria are chemical interactions with mitochondrial membranes. In fact, the presence of a carboxylic acid group in 2,4-D makes it chemically similar to many natural fatty acids, which are components of lipid membranes; Furthermore, the chlorine atoms present in the ring contribute to the polarity and electronegativity of the molecule and can interact with membrane elements, such as phosphates. The results of this work also indicate that common excipients in formulations that contain 2,4-D as an active ingredient do not add mitochondrial toxicity to the product for the parameters of dissipation of membrane potential and induction of calcium efflux. Nevertheless, the mechanisms of toxicity of 2,4-D must be further investigated in other experimental models, to elucidate the key toxicological events.

## 5 Conclusions

The study investigated the effects of in vitro exposure of liver mitochondria isolated from rats to concentrations of 0.4 to 200  $\mu\text{M}$  of isolated 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and in a formulated product - conditions that include some found in the environment and some used in studies with isolated mitochondria. Under the conditions evaluated, the products do not significantly induce the formation of reactive oxygen and nitrogen species and oxidation of pyridine nucleotides or sulfhydryl groups of mitochondrial membrane proteins, indicating the absence of deregulation of the redox state. At concentrations from 100  $\mu\text{M}$ , higher than those found in the environment, the products can dissipate the mitochondrial membrane potential, which can even induce calcium efflux. Mitochondrial swelling experiments and structural evaluation by transmission electron microscopy did not indicate significant structural changes after exposure in any of the conditions evaluated. Exposure to the tested conditions is not capable of altering mitochondrial respiratory parameters, namely, respiratory control ratio (RCR), speed of states 3 and 4 (S3 and S4), and ratio of phosphorylated ADP per oxygen molecule consumed (ADP/O). For exposures to concentrations from 100  $\mu\text{M}$ , the initial effects of 2,4-D on isolated mitochondria are possibly due to chemical interactions with mitochondrial membranes, which could be justified by the presence of the carboxylic acid group and the chlorine atoms. Concentrations from 100  $\mu\text{M}$  of isolated 2,4-D are already capable of inducing membrane potential dissipation and calcium efflux in isolated mitochondria, while exposure to the tested formulated product is only capable of doing so from 200  $\mu\text{M}$ . Common excipients in formulations that contain 2,4-D as the main active ingredient may not add mitochondrial toxicity to the product for the parameters of dissipation of membrane potential and induction of calcium efflux. More comparative studies on other models are needed to ensure whether the excipients add safety to the formulation.

## Conflicts of interest

This study is linked to Botucatu Medical School, UNESP, state of São Paulo, Brazil. After its completion, Lucas Roberto Ferreira Polido took up a position in a private company. The authors have no conflicts of interest to declare.

## References

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2002. The Mitochondrion.
- Bradberry, S.M., Proudfoot, A.T., Vale, J.A., 2004. Poisoning due to chlorophenoxy herbicides. *Toxicol Rev* 23, 65–73. <https://doi.org/10.2165/00139709-200423020-00001/METRICS>
- Bueno Franco Salla, G., Bracht, L., Valderrama Parizotto, A., Comar, J.F., Peralta, R.M., Bracht, F., Bracht, A., 2019. Kinetics of the metabolic effects, distribution spaces and lipid-bilayer affinities of the organo-chlorinated herbicides 2,4-D and picloram in the liver. *Toxicol Lett* 313, 137–149. <https://doi.org/10.1016/J.TOXLET.2019.06.008>
- Castilho, R.F., Vicente, J.A.F., Kowaltowski, A.J., Vercesi, A.E., 1997. 4,6-Dinitro-o-cresol uncouples oxidative phosphorylation and induces membrane permeability transition in rat liver mitochondria. *Int J Biochem Cell Biol* 29, 1005–1011. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(97\)00041-1](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(97)00041-1)
- Cathcart, R., Schwiers, E., Ames, B.N., 1983. Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. *Anal Biochem* 134, 111–116. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(83\)90270-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(83)90270-1)
- Chance, B., Williams, G.R., 2006. The Respiratory Chain and Oxidative Phosphorylation. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem* 17, 65–134. <https://doi.org/10.1002/9780470122624.CH2>
- Corteva, 2023. DMA® 806 BR | Proteção de Cultivos [WWW Document]. URL <https://www.corteva.com.br/produtos-e-servicos/protecao-de-cultivos/dma-806br.html> (accessed 6.13.23).
- de Castro Lima, J.A.M., Labanowski, J., Bastos, M.C., Zanella, R., Prestes, O.D., de Vargas, J.P.R., Mondamert, L., Granado, E., Tiecher, T., Zafar, M., Troian, A., Le Guet, T., dos Santos, D.R., 2020. “Modern agriculture” transfers many pesticides to watercourses: a case study of a representative rural catchment of southern Brazil. *Environmental Science and Pollution Research* 27, 10581–10598. <https://doi.org/10.1007/S11356-019-06550-8/METRICS>

- de Oliveira, B., Pereira, L.C., Pazin, M., Franco-Bernanrdes, M.F., Dorta, D.J., 2020. Do trifluralin and tebuthiuron impair isolated rat liver mitochondria? *Pestic Biochem Physiol* 163, 175–184. <https://doi.org/10.1016/J.PESTBP.2019.11.012>
- Denek, Z., Erbil, G., Ozbal, S., Micili, S.C., Ozogul, C., 2013. The effects of resveratrol against trifluralin toxicity in the urinary tract of rats. *Sage Journals* 32, 106–117. <https://doi.org/10.1177/0748233713498437>
- Duchnowicz, P., Koter, M., 2003. Damage to the erythrocyte membrane caused by chlorophenoxyacetic herbicides [WWW Document]. *Cell Mol Biol Lett*. URL <https://www.researchgate.net/publication/10840434> (accessed 6.17.23).
- Felício, A.A., Freitas, J.S., Scarin, J.B., de Souza Onde, L., Teresa, F.B., Schlenk, D., de Almeida, E.A., 2018. Isolated and mixed effects of diuron and its metabolites on biotransformation enzymes and oxidative stress response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Ecotoxicol Environ Saf* 149, 248–256. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2017.12.009>
- Fernandes, M.P., Leite, A.C.R., Araújo, F.F.B., Saad, S.T.O., Baratti, M.O., Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B., Gadelha, F.R., Vercesi, A.E., 2014. The Cratylia mollis Seed Lectin Induces Membrane Permeability Transition in Isolated Rat Liver Mitochondria and a Cyclosporine A-Insensitive Permeability Transition in Trypanosoma cruzi Mitochondria. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 61, 381–388. <https://doi.org/10.1111/JEU.12118>
- Ferro, N., Bredow, T., Jacobsen, H.J., Reinard, T., 2010. Route to novel auxin: Auxin chemical space toward biological correlation carriers. *Chem Rev* 110, 4690–4708. [https://doi.org/10.1021/CR800229S/ASSET/CR800229S.FP.PNG\\_V03](https://doi.org/10.1021/CR800229S/ASSET/CR800229S.FP.PNG_V03)
- Grossmann, K., 2010. Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action. *Pest Manag Sci* 66, 113–120. <https://doi.org/10.1002/PS.1860>
- Haugaard, N., 2000. Reflections on the Role of the Thiol Group in Biology. *Ann N Y Acad Sci* 899, 148–158. <https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.2000.TB06183.X>
- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 2022. Painéis de informações de agrotóxicos [WWW Document]. URL <https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e->

- biologicos/agrotoxicos/paineis-de-informacoes-de-agrotoxicos/paineis-de-informacoes-de-agrotoxicos (accessed 6.10.23).
- Jocelyn, P.C., 1987. Spectrophotometric assay of thiols. *Methods Enzymol* 143, 44–67. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)43013-9](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)43013-9)
- Ju, Z., Liu, S.S., Xu, Y.Q., Li, K., 2019. Combined Toxicity of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid and Its Metabolites 2,4-Dichlorophenol (2,4-DCP) on Two Nontarget Organisms. *ACS Omega* 4, 1669–1677. [https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.8B02282/ASSET/IMAGES/MEDIUM/AO-2018-02282V\\_M006.GIF](https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.8B02282/ASSET/IMAGES/MEDIUM/AO-2018-02282V_M006.GIF)
- Karnovsky, M.J., 1964. A Formaldehyde-Glutaraldehyde Fixative of High Osmolality for Use in Electron Microscopy [WWW Document]. URL [https://www.researchgate.net/publication/244955881\\_A\\_Formaldehyde-Glutaraldehyde\\_Fixative\\_of\\_High\\_Osmolality\\_for\\_Use\\_in\\_Electron\\_Microscopy](https://www.researchgate.net/publication/244955881_A_Formaldehyde-Glutaraldehyde_Fixative_of_High_Osmolality_for_Use_in_Electron_Microscopy) (accessed 6.17.23).
- Lemasters, J.J., Diguiseppi, J., Nieminen, A.L., Herman, B., 1987. Blebbing, free Ca<sup>2+</sup> and mitochondrial membrane potential preceding cell death in hepatocytes. *Nature* 325, 78–81. <https://doi.org/10.1038/325078a0>
- Li, Y., Couch, L., Higuchi, M., Fang, J.L., Guo, L., 2012. Mitochondrial Dysfunction Induced by Sertraline, an Antidepressant Agent. *Toxicological Sciences* 127, 582–591. <https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFS100>
- Ma, L., Dong, J.X., Fu, W.R., Li, X.Y., Chen, J., Liu, Y., 2018. Mitochondrial morphology and function impaired by dimethyl sulfoxide and dimethyl Formamide. *J Bioenerg Biomembr* 50, 297–305. <https://doi.org/10.1007/S10863-018-9759-7>
- Martins, R.X., Vieira, L., Souza, J.A.C.R., Silva, M.G.F., Muniz, M.S., Souza, T., Queiroga, F.R., Machado, M.R.F., da Silva, P.M., Farias, D., 2021. Exposure to 2,4-D herbicide induces hepatotoxicity in zebrafish larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 248, 109110. <https://doi.org/10.1016/J.CBPC.2021.109110>

- Mesnager, R., Defarge, N., Spiroux De Vendômois, J., Séralini, G.E., 2014. Major pesticides are more toxic to human cells than their declared active principles. *Biomed Res Int* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/179691>
- Palmeira, C.M., Moreno, A.J., Madeira, V.M.C., 1994a. Interactions of Herbicides 2,4-D and Dinoseb with Liver Mitochondrial Bioenergetics. *Toxicol Appl Pharmacol* 127, 50–57. <https://doi.org/10.1006/TAAP.1994.1138>
- Palmeira, C.M., Moreno, A.J., Madeira, V.M.C., 1994b. Metabolic alterations in hepatocytes promoted by the herbicides paraquat, dinoseb and 2,4-D. *Arch Toxicol* 68, 24–31. <https://doi.org/10.1007/S002040050025/METRICS>
- Paque, S., Weijers, D., 2016. Q&A: Auxin: The plant molecule that influences almost anything. *BMC Biol* 14, 1–5. <https://doi.org/10.1186/S12915-016-0291-0>
- Pedersen, P.L., Greenawalt, J.W., Reynafarje, B., Hüllihen, J., Decker, G.L., Soper, J.W., Bustamente, E., 1978. Chapter 26 Preparation and Characterization of Mitochondria and Submitochondrial Particles of Rat Liver and Liver-Derived Tissues. *Methods Cell Biol* 20, 411–481. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)62030-0](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)62030-0)
- Peixoto, F., Vicente, J.A.F., Madeira, V.M.C., 2003. The herbicide dicamba (2-methoxy-3,6-dichlorobenzoic acid) interacts with mitochondrial bioenergetic functions. *Arch Toxicol* 77, 403–409. <https://doi.org/10.1007/S00204-003-0456-9/METRICS>
- Pereira, L.C., 2012. Mitocôndria como Alvo para avaliação de toxicidade de xenobiótico [WWW Document]. URL [https://www.researchgate.net/publication/279912311\\_Mitochondria\\_como\\_Alvo\\_para\\_avaliacao\\_de\\_toxicidade\\_de\\_xenobiotico](https://www.researchgate.net/publication/279912311_Mitochondria_como_Alvo_para_avaliacao_de_toxicidade_de_xenobiotico) (accessed 6.17.23).
- Pereira, L.C., Cabral Miranda, L.F., Franco-Bernardes, M.F., Tasso, M.J., Duarte, F.V., Inácio Varela, A.T., Rolo, A.P., Marques Palmeira, C.M., Dorta, D.J., 2018. Mitochondrial damage and apoptosis: Key features in BDE-153-induced hepatotoxicity. *Chem Biol Interact* 291, 192–201. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2018.06.021>

- Pereira, L.C., De Souza, A.O., Dorta, D.J., 2013. Polybrominated Diphenyl Ether Congener (BDE-100) Induces Mitochondrial Impairment. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 112, 418–424. <https://doi.org/10.1111/BCPT.12046>
- Pinton, P., Romagnoli, A., Rizzuto, R., Giorgi, C., 2008. Ca<sup>2+</sup> Signaling, Mitochondria and Cell Death. *Curr Mol Med* 8, 119–130. <https://doi.org/10.2174/156652408783769571>
- PubChem, 2023. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid | C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>3</sub> | CID 1486 - PubChem [WWW Document]. URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1486> (accessed 6.24.23).
- Rajdev, S., Reynolds, I.J., 1993. Calcium green-5N, a novel fluorescent probe for monitoring high intracellular free Ca<sup>2+</sup> concentrations associated with glutamate excitotoxicity in cultured rat brain neurons. *Neurosci Lett* 162, 149–152. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(93\)90582-6](https://doi.org/10.1016/0304-3940(93)90582-6)
- Reynolds, E.S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 17, 208–212. <https://doi.org/10.1083/JCB.17.1.208>
- São Paulo, 2005. Lei nº 11.977, de 25 de agosto de 2005 - Assembleia Legislativa do Estado de São Paulo [WWW Document]. URL <https://www.al.sp.gov.br/repositorio/legislacao/lei/2005/lei-11977-25.08.2005.html> (accessed 6.17.23).
- Scitable, 2014. Contents of Cell Biology for Seminars | Learn Science at Scitable [WWW Document]. URL <https://www.nature.com/scitable/ebooks/cell-biology-for-seminars-14760004/129391449/> (accessed 6.24.23).
- Shafeeq, S., Mahboob, T., 2020. Magnesium supplementation ameliorates toxic effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in rat model. *Hum Exp Toxicol* 39, 47–58. [https://doi.org/10.1177/0960327119874428/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177\\_0960327119874428-FIG4.JPEG](https://doi.org/10.1177/0960327119874428/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_0960327119874428-FIG4.JPEG)
- Tayeb, W., Nakbi, A., Cheraief, I., Miled, A., Hammami, M., 2013. Alteration of lipid status and lipid metabolism, induction of oxidative stress and lipid peroxidation by

- 2,4-dichlorophenoxyacetic herbicide in rat liver. *Toxicology Mechanisms and Methods* 23, 449–458. <https://doi.org/10.3109/15376516.2013.780275>
- Teixeira, M.C., Telo, J.P., Duarte, N.F., Sá-Correia, I., 2004. The herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid induces the generation of free-radicals and associated oxidative stress responses in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 324, 1101–1107. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2004.09.158>
- Troudi, A., Ben Amara, I., Samet, A.M., Zeghal, N., 2012. Oxidative stress induced by 2,4-phenoxyacetic acid in liver of female rats and their progeny: Biochemical and histopathological studies. *Environ Toxicol* 27, 137–145. <https://doi.org/10.1002/TOX.20624>
- Unites States National Institute of Food and Agriculture, 2023. Researchers Helping Protect Crops From Pests | National Institute of Food and Agriculture [WWW Document]. URL <https://www.nifa.usda.gov/about-nifa/blogs/researchers-helping-protect-crops-pests> (accessed 10.11.23).
- Willems, P.H.G.M., Rossignol, R., Dieteren, C.E.J., Murphy, M.P., Koopman, W.J.H., 2015. Redox Homeostasis and Mitochondrial Dynamics. *Cell Metab* 22, 207–218. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2015.06.006/ATTACHMENT/4B30AFC8-7E08-44C2-923B-F11B5AD64F0D/MMC1.PDF>
- Woodward, A.W., Bartel, B., 2005. Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann Bot* 95, 707–735. <https://doi.org/10.1093/AOB/MCI083>
- World Health Organization, 2017. Guidelines for drinking-water quality, 4th edition, incorporating the 1st addendum.
- Zheng, D., Liu, J., Piao, H., Zhu, Z., Wei, R., Liu, K., 2022. ROS-triggered endothelial cell death mechanisms: Focus on pyroptosis, parthanatos, and ferroptosis. *Front Immunol* 13, 1039241. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.1039241/BIBTEX>
- Zhu, J., Wang, K.Z.Q., Chu, C.T., 2013. After the banquet: Mitochondrial biogenesis, mitophagy, and cell survival. *Autophagy* 9, 1663–1676. <https://doi.org/10.4161/AUTO.24135>

- Zoratti, M., Szabò, I., 1995. The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1241, 139–176. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(95\)00003-A](https://doi.org/10.1016/0304-4157(95)00003-A)
- Zychlinski, L., Zolnierowicz, S., 1990. Comparison of uncoupling activities of chlorophenoxy herbicides in rat liver mitochondria. *Toxicol Lett* 52, 25–34. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(90\)90162-F](https://doi.org/10.1016/0378-4274(90)90162-F)

## Conclusão

O estudo investigou os efeitos da exposição in vitro de mitocôndrias hepáticas isoladas de ratos a concentrações de 0,4 a 200  $\mu\text{mol/L}$  de ácido 2,4-diclorofenoxiacético isolado e em um produto formulado - condições que incluem algumas encontradas no ambiente e algumas usadas em estudos com mitocôndrias isoladas. Os resultados indicam que, sob as condições avaliadas, os produtos não induzem significativamente a formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, nem a oxidação de nucleotídeos piridínicos ou grupos sulfidrílicos de proteínas da membrana mitocondrial, indicando a ausência de desregulação do estado redox. Em concentrações a partir de 100  $\mu\text{mol/L}$ , mais altas do que as encontradas no ambiente, os produtos podem dissipar o potencial da membrana mitocondrial, podendo até induzir a saída de cálcio. Experimentos de inchamento mitocondrial e avaliação estrutural por microscopia eletrônica de transmissão não indicaram mudanças estruturais significativas após a exposição em nenhuma das condições avaliadas. A exposição às condições testadas não é capaz de alterar os parâmetros respiratórios mitocondriais, ou seja, a razão de controle respiratório (RCR), a velocidade dos estados 3 e 4 (S3 e S4), e a razão de ADP fosforilado por molécula de oxigênio consumida (ADP/O). Para exposições a concentrações a partir de 100  $\mu\text{mol/L}$ , os efeitos iniciais do 2,4-D em mitocôndrias isoladas possivelmente se devem a interações químicas com as membranas mitocondriais, justificadas pela presença do grupo ácido carboxílico e dos átomos de cloro. Concentrações a partir de 100  $\mu\text{mol/L}$  de 2,4-D isolado são capazes de induzir a dissociação do potencial da membrana e a saída de cálcio em mitocôndrias isoladas, enquanto a exposição ao produto formulado testado é capaz de fazê-lo apenas a partir de 200  $\mu\text{mol/L}$ . Excipientes comuns em formulações que contêm 2,4-D como ingrediente ativo principal podem não adicionar toxicidade mitocondrial ao produto para os parâmetros de dissociação do potencial da membrana e indução da saída de cálcio. São necessários mais estudos comparativos em outros modelos para garantir se os excipientes adicionam segurança à formulação.

## Anexo: Certificado de aprovação pelo CEUA

|                                                                                     |                                                                                     |                                                                                      |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
|  |  |     |
| UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA<br>"JULIO DE MESQUITA FILHO"<br>Campus de Botucatu   |                                                                                     | Comissão de Ética no Uso de Animais<br>Criada pela Portaria DFM nº 611 de 13/12/2012 |

**CERTIFICADO Nº 1382/2021 – CEUA**

Certificamos que o projeto intitulado: **"Multiparâmetros para avaliação integrada da toxicidade do herbicida 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético sal de dimetilamina) em zebrafish (Danio rerio) e mitocôndrias isoladas"** - conduzido pelo Pesquisador: **Cristina Viriato de Freitas** - Orientadora: Profa. **Lilian Cristina Pereira** - Colaboradores: Lucas Roberto Ferreira Polido - registrado com o nº **1382/2021**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu, em reunião ordinária de 28 de abril de 2021.

|                       |                                    |
|-----------------------|------------------------------------|
| Finalidade            | ( ) Ensino (X) Pesquisa Científica |
| Espécie/Linhagem/Raça | Ratos Wistar                       |
| Nº Total de animais   | 60                                 |
| Idade/Peso            | 04 Semanas – 150 Gramas            |
| Sexo                  | Machos                             |



Sara Rosa Stanley Sampaio  
Secretária da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP



Profa. Associada Bertha Furlan Polegato  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

The research project registered by the number 1382/2021 is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Committee on Ethics in the Use of Animals of Botucatu Medical School - Sao Paulo State University (UNESP) on 28/April/2021.

Distrito Rubião Júnior, s/nº – Botucatu – SP. CEP: 18618-970 Fones: (14) 38801880 – E-mail Secretária: ceua@fmb.unesp.br