

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

**Camila Ortiz**

Química

**EFEITOS DA AMETRINA NA BIOENERGÉTICA DE  
MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO**

Dracena

2021

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

**Camila Ortiz**

**EFEITOS DA AMETRINA NA BIOENERGÉTICA DE  
MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO**

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

Orientador: Prof. Dr. Fábio Erminio Mingatto

Dracena

2021

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

O775e

Ortiz, Camila.

Efeitos da Ametrina na bioenergética de mitocôndrias isoladas de fígado de rato / Camila Ortiz. -- Dracena: [s.n.], 2021.

38 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp). Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena. Área do conhecimento: Produção Animal, 2021.

Orientador: Fábio Erminio Mingatto

1. Agrotóxico. 2. ATP. 3. Fígado. 4. Hepatotoxicidade. 5. S-triazina. I. Título.



Bibliotecário Fábio Sampaio Rosas  
CRB 8/6665



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Dracena



### CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: **EFEITOS DA AMETRINA NA BIOENERGÉTICA DE MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO DE RATO**

**AUTORA: CAMILA ORTIZ**

**ORIENTADOR: FÁBIO ERMINIO MINGATTO**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA E TECNOLOGIA ANIMAL, área: Produção Animal pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. FÁBIO ERMINIO MINGATTO (Participação Virtual)  
Departamento de Produção Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena - UNESP

Prof. Dr. DANIEL NICODEMO (Participação Virtual)  
Curso de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena

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

Dracena, 02 de março de 2021.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**Camila Ortiz**, nascida em 9 de agosto de 1993, na cidade de Dracena/SP - Brasil, filha de Luciana Matheus Ortiz e Florisvaldo Ortiz. Em janeiro de 2016, concluiu a graduação em Química pelo Centro Universitário de Adamantina. Em agosto de 2018, iniciou no Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Animal, em nível de mestrado, área de concentração Produção Animal na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Programa Interunidades do Câmpus de Dracena e Câmpus de Ilha Solteira, realizando estudos na área de “Bioquímica Metabólica e Toxicológica”, sob a orientação do Prof. Adj. Fábio Erminio Mingatto.

Dedico esse trabalho ao meu marido **Anderson Baroni Tossatto**, companheiro e incentivador e ao meu filho **Pedro Henrique Ortiz Tossatto** motivo pelo qual dedico minha vida!

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, por me guiar em todos os momentos de minha vida, dando forças para superar todos os obstáculos.

Aos meus pais Florisvaldo e Luciana, minha irmã Mariana, meu marido Anderson e meu filho Pedro, amo vocês, obrigada pelo apoio, carinho, confiança e amor, sem vocês minha vida não teria sentido.

Ao professor, Prof. Dr. Fábio Erminio Mingatto por ter aceitado o convite em ser meu orientador durante o mestrado, obrigado pela confiança depositada, atenção e amizade.

A todos os amigos que fiz durante esses anos na Unesp, agradeço à equipe LaBMeT, por toda ajuda e amizade, principalmente as minhas grandes amigas Anilda Rufino e Camila Miranda.

As minhas grandes amigas Kamila Balieira e Jéssica Ganzaroli, que concluíram seu mestrado nessa instituição e me deram todo o apoio e incentivo nos momentos que mais precisei.

Aos técnicos de laboratório Andréia e Edison, obrigada pela ajuda, amizade, paciência e pelo auxílio nas análises.

Aos membros da minha banca de qualificação e defesa.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pelo financiamento dos programas de pós-graduação.

Meu muito obrigada!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota’.

Madre Teresa de Calcutá

## Comissão de Ética no Uso de Animais

## Certificado

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos do inseticida diazinon e do herbicida ametrina em mitocôndrias isoladas de fígado de rato" (registro nº 13/2018.SP - CEUA), vinculada a proposta intitulada "Efeitos do inseticida diazinon em mitocôndrias isoladas de fígado de rato" (registro nº 13/2018.R1 - CEUA), sob a responsabilidade do(a) Prof(a). Dr(a). **Fábio Erminio Mingatto** – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica** – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas da UNESP - Câmpus de Dracena, em reunião de **15/02/2021**.

Dracena, 16 de fevereiro de 2021.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Danilo Domingues Millen', with a long horizontal stroke extending to the right.

Prof. Dr. Danilo Domingues Millen

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

## RESUMO

O aumento na demanda de alimentos pela população associado com a exigência de maior produtividade por área faz com que, cada vez mais, os produtores optem pela utilização de praguicidas na lavoura. Sabe-se que o uso destes compostos é crescente em todo o mundo e, paralelo a isso, os riscos de contaminação de organismos não alvos (animais e humanos) tende a aumentar proporcionalmente. A Ametrina é um herbicida da classe das triazinas amplamente empregado em culturas como abacaxi, banana, café, cana-de-açúcar, citros e milho, extremamente móvel no ambiente e altamente persistente na água e solo. Há relatos da presença de resíduos e metabólitos da Ametrina encontrados em águas subterrâneas mesmo depois de longos períodos após sua aplicação. Dados na literatura indicam que o fígado é um órgão alvo da toxicidade da Ametrina, pois ela é capaz de desregular a morfologia e a fisiologia hepática. O fígado desempenha uma função central no metabolismo, pois recebe grandes quantidades de nutrientes e substâncias exógenas (xenobióticos) que são absorvidos por meio do trato digestório e conduzidos pela veia porta para a posterior metabolização e eliminação do organismo. Responsáveis pela síntese da quase totalidade do ATP necessário à manutenção da estrutura e função celular, as mitocôndrias representam um alvo crítico para a ação de drogas e toxinas. O objetivo do presente estudo foi caracterizar os efeitos da Ametrina em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. A fração mitocondrial foi isolada por centrifugação diferencial e as concentrações do herbicida utilizadas foram de 25, 50, 100 e 150  $\mu\text{M}$ . Os efeitos da Ametrina nas mitocôndrias foram avaliados pela determinação do consumo de oxigênio mitocondrial, atividades das enzimas relacionadas à cadeia respiratória mitocondrial (NADH desidrogenase e Succinato desidrogenase), potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ) e níveis de ATP mitocondriais. Quando energizadas com malato + glutamato (substratos do complexo I da cadeia de transporte de elétrons) a Ametrina promoveu uma redução significativa no consumo de oxigênio nas concentrações a partir de 50  $\mu\text{M}$  e quando energizadas com succinato (substrato do complexo II da cadeia de transporte de elétrons) não foram observadas alterações. Observou-se a dissipação do potencial de membrana a partir 50  $\mu\text{M}$  em mitocôndrias energizadas com malato + glutamato e somente em 150  $\mu\text{M}$  quando energizadas com succinato. Os níveis mitocondriais de ATP foram reduzidos de maneira dose-dependente a partir de 50  $\mu\text{M}$  da Ametrina. O herbicida afetou a atividade da enzima NADH desidrogenase nas concentrações superiores a 50  $\mu\text{M}$  e da Succinato desidrogenase somente na maior concentração testada (150  $\mu\text{M}$ ). Assim, os resultados desse estudo indicam que a toxicidade da Ametrina em hepatócitos pode estar relacionada às alterações na bioenergética mitocondrial.

**Palavras-chave:** Agrotóxico. ATP. Fígado. Hepatotoxicidade. S-triazina.

## ABSTRACT

The increase in the demand for food by the population associated with the demand for greater productivity by area means that, increasingly, producers opt for the use of pesticides in the fields. It is known that the use of these compounds is increasing worldwide and, in parallel, the risks of contamination from non-target organisms (animals and humans) tend to increase proportionately. Ametrine is a triazine herbicide widely used in cultures as pineapple, banana, coffee, sugar cane, citrus and corn, extremely mobile in the environment and highly persistent in water and soil. Ametrine residues and metabolites have been reported to be found in groundwater even after long periods after application. Data in the literature indicate that the liver is a target organ for Ametrine toxicity, as it is capable of deregulating liver morphology and physiology. The liver plays a central role in metabolism, as it receives large amounts of nutrients and exogenous substances (xenobiotics) that are absorbed through the digestive tract and conducted through the portal vein for further metabolism and elimination from the body. Responsible for the synthesis of almost all of the ATP necessary to maintain cellular structure and function, mitochondria represent a critical target for the action of drugs and toxins. The aim of the present study was to characterize the effects of Ametrine in isolated rat liver mitochondria. The mitochondrial fraction was isolated by differential centrifugation and the concentrations of the herbicide used were 25, 50, 100 and 150  $\mu\text{M}$ . The effects of Ametrine on mitochondria were assessed by determining mitochondrial oxygen consumption, enzyme activities related to the mitochondrial respiratory chain (NADH dehydrogenase and Succinate dehydrogenase), mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi$ ) and mitochondrial ATP levels. When energized with malate + glutamate (substrates of complex I of the electron transport chain) Ametrine promoted significant reduction of oxygen consumption in concentrations from 50  $\mu\text{M}$  and when energized with succinate (substrate of complex II of the electron transport chain) no changes were observed. The dissipation of the membrane potential from 50  $\mu\text{M}$  was observed in mitochondria energized with malate + glutamate and only in 150  $\mu\text{M}$  when energized with succinate. The mitochondrial level of ATP was reduced in a dose-dependent manner from 50  $\mu\text{M}$  of Ametrine. The herbicide affected the activity of the enzyme NADH dehydrogenase at concentrations greater than 50  $\mu\text{M}$  and Succinate dehydrogenase only at the highest concentration tested (150  $\mu\text{M}$ ). Thus, the results of this study indicate that the toxicity of Ametrine in hepatocytes may be related to changes in mitochondrial bioenergetics.

**Keywords:** ATP. Hepatotoxicity. Liver. Pesticides. S-triazine.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	15
2.1 Praguicidas .....	15
2.2 Ametrina.....	16
2.3 Generalidades sobre o fígado e hepatotoxicidade .....	18
2.4 Bioenergética mitocondrial.....	19
3 OBJETIVOS .....	221
3.1 Objetivo geral.....	216
3.2 Objetivo específico.....	216
3.3 Hipótese.....	216
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	222
4.1 Avaliação Ética.....	222
4.2 Local dos experimentos .....	222
4.3 Reagentes.....	222
4.4 Animais .....	222
4.5 Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato intactas e rompidas .....	233
4.6 Determinação da concentração das proteínas mitocondriais.....	233
4.7 Determinação do consumo de oxigênio mitocondrial.....	244
4.8 Determinação do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ).....	244
4.9 Determinação da concentração de ATP mitocondrial .....	255
4.10 Determinação das atividades das enzimas relacionadas à cadeia respiratória mitocondrial (NADH desidrogenase e Succinato desidrogenase).....	255
4.11 Análise estatística .....	266
5 RESULTADOS .....	266
5.1 Efeito da Ametrina sobre o consumo de oxigênio mitocondrial.....	266
5.2 Efeito da Ametrina sobre o potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ).....	277
5.3 Efeito da Ametrina sobre a concentração de ATP mitocondrial .....	288
5.4 Efeito da Ametrina sobre as atividades das enzimas relacionadas à cadeia respiratória mitocondrial (NADH Desidrogenase e Succinato Desidrogenase)....	299
6 DISCUSSÃO .....	3132
7 CONCLUSÃO.....	333
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	344

## 1 INTRODUÇÃO

Buscando otimizar a produção agrícola, é cada vez mais frequente a utilização de compostos sintéticos para redução total ou parcial das pragas e como consequência disso, a ocorrência de intoxicação direta ou indireta causada por praguicidas torna-se um problema de saúde pública (ROQUE *et al.*, 2016). Existe grande preocupação sobre os efeitos da exposição dos praguicidas a longo prazo. Em estudo realizado por Pinto *et al.* (2020), com revisão de literatura de artigos publicados entre os anos de 1945 e 2020, observou-se que a exposição de trabalhadores aos praguicidas causa danos ao DNA e maior taxa de mutação (tendo indícios cancerígenos).

Os praguicidas são classificados de acordo com suas funções, podendo ser: herbicidas, fungicidas, acaricidas, inseticidas, larvicidas ou algicidas. Essas substâncias cumprem com o objetivo inicial de melhorar a produção com aumento da quantidade e qualidade do produto, porém o uso indiscriminado apresenta problemas para o meio ambiente principalmente pela capacidade que alguns compostos têm de se bioacumular ao longo das cadeias biológicas (PRESTON, 2002; COUTINHO *et al.*, 2005).

Estudos relatam que a aplicação, armazenamento e eliminação inadequados de praguicidas na agricultura, favorecem seu acúmulo na água, solo e ar por muitos anos. O resultado da alta toxicidade do herbicida pode gerar mutagenicidade e carcinogenicidade nos organismos vivos devido às substâncias químicas contidas em sua formulação. O acúmulo aleatório no meio ambiente representa séria ameaça para os ecossistemas e para a saúde humana (KHODAYAR *et al.*, 2016).

Entre os praguicidas sistêmicos encontramos o herbicida Ametrina, que compõe uma s-triazina, cujos substituintes são, um grupo tiometil, um grupo etil e um grupo isopropil, que formam a estrutura de nome N-etil-N-(1-metiletil)-6-(metiltio)-1,3,5 triazina 2,4-diamina. Trata-se de uma substância amplamente empregada em culturas de abacaxi, banana, café, cana-de-açúcar, citros, milho, etc. Em peixes ela é moderadamente tóxica, o que representa um risco para os aqueles que posteriormente consumirão a carne. Além disso, dados na literatura indicam que o fígado é um órgão alvo da toxicidade da Ametrina, pois ela é capaz de promover danos oxidativos, genotóxicos e morfológicos no fígado (ARMAS *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2015).

O fígado recebe grandes quantidades de nutrientes e substâncias exógenas (xenobióticos) que são absorvidos por meio do trato digestório e conduzidos pela veia porta para posterior metabolização e eliminação do organismo. Entre as principais funções hepáticas estão a captação de aminoácidos, lipídios, carboidratos e vitaminas, com subsequente armazenamento, conversão metabólica e liberação no sangue e bile. O fígado é também o principal órgão envolvido na biotransformação de xenobióticos mediada pelo citocromo P450, com o objetivo de converter compostos hidrofóbicos em hidrossolúveis, para que assim sejam mais facilmente eliminados pelo organismo (GUILLOUZO, 1998; IOANNIDES, 2002; DANIELSON, 2002). Esse processo tem sido apontado como responsável pelos efeitos tóxicos de inúmeros compostos químicos, visto que os metabólitos produzidos podem exercer atividades adversas ao organismo animal por alterar, a nível celular e molecular, algum componente celular fundamental (mitocôndria, por exemplo) modulando assim sua função (MEYER E KULKARNI, 2001; MINGATTO *et al.*, 2007).

A mitocôndria é a organela responsável pela produção da maior parte do ATP necessário para a manutenção da célula e dados experimentais indicam que ela representa um alvo preferencial e crítico para a ação de drogas, toxinas ou seus metabólitos reativos formados pelo citocromo P450. Os efeitos tóxicos sobre as mitocôndrias podem ocorrer por mecanismos diretos e indiretos, levando a disfunções mitocondriais, tais como alterações na cadeia respiratória e fosforilação oxidativa, na permeabilidade da membrana mitocondrial, no transporte de cálcio, no estado oxidativo, além de uma série de outros eventos que levam à depleção de ATP e indução de morte celular (NADANACIVA *et al.*, 2007).

Pensando no papel central do fígado no organismo e a importância da função mitocondrial para a manutenção desse órgão, torna-se importante a avaliação dos efeitos da Ametrina sobre os parâmetros relacionados à bioenergética de mitocôndrias isoladas de fígado de rato, no sentido de avaliar os mecanismos envolvidos na hepatotoxicidade provocada pelo herbicida. Assim, espera-se fornecer informações relevantes para o auxílio no tratamento em casos de intoxicação em animais e humanos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Praguicidas

As substâncias químicas utilizadas para prevenção e combate de formas de vida vegetal ou animal indesejáveis nas culturas agrícolas, na pecuária, nas casas, nos jardins e na saúde pública, recebem várias denominações, dentre elas, defensivos agrícolas, biocidas, praguicidas, agrotóxicos e agroquímicos (MOURA, 2008). As terminologias adotadas são exemplos da multiplicidade de visões que cercam essas substâncias químicas utilizadas na agricultura. Para as indústrias produtoras desses compostos o termo mais utilizado é “defensivo agrícola”, pois protegem os produtos agrícolas da ação de pragas que poderiam causar prejuízos econômicos (KHOURI, 2007).

Segundo a ANVISA (2017), a definição para agrotóxicos e afins são "Produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, desseccantes, estimulantes e inibidores de crescimento”.

Segundo MORAGAS (2003) a finalidade dos praguicidas pode ser dividida em diversas classes de uso, tendo como exemplo:

- Acaricidas: destinados ao controle de ácaros;
- Fungicidas: destinados a eliminar fungos;
- Herbicidas: destinados a eliminar ou impedir o crescimento de ervas daninhas;
- Inseticidas: destinados a eliminar insetos;
- Raticidas: destinados a eliminar ratos, marmotas, toupeiras, preás e camundongos;
- Nematicidas: ação de combate a nematoides;
- Molusquicidas: ação de combate a moluscos.

Entre os praguicidas utilizados na agricultura, aproximadamente 50% correspondem ao grupo de herbicidas, desta forma esta classe dos praguicidas é a

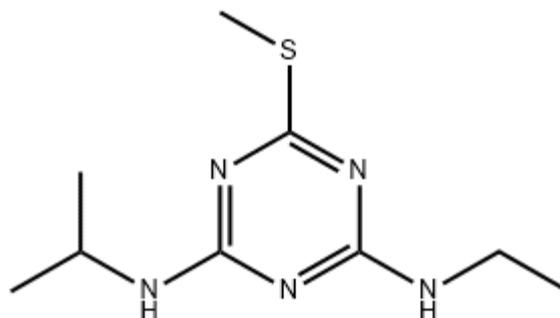
mais representativa no mundo. A maior parte deles apresenta elevada toxicidade ao ser humano, bem como baixa taxa de degradação, com conseqüente persistência no solo, podendo atingir os lagos e águas subterrâneas, devido a permeação através do solo (HERTWIG *et al.*, 1983; SINDAG, 2008; FERRACINI *et al.*, 2005; ARMAS *et al.*, 2007).

Quando se trata da escolha do herbicida, algumas questões devem ser levadas em consideração como: seletividade - seletivos ou não seletivos, absorção pela planta - herbicidas de solo e foliares, o tipos de ação - sistêmicos ou de contato, o tempo de aplicação - pré-plantio, pré-emergente ou pós-emergente. No Brasil as principais culturas de consumo de herbicidas são soja, milho, cana-de-açúcar, café, arroz, citros, feijão, algodão e trigo (MARTINS, 1995; QUEIROZ, LANÇAS, 1997; INOUE *et al.*, 2003; SINDAG, 2008) A grande desvantagem é que a maior parte dos herbicidas possui efeitos altamente tóxicos.

## 2.2 Ametrina

A Ametrina (Figura 1) é um herbicida que compõe uma s-triazina formada por um grupo tiometil, um grupo etil e um grupo isopropil, formando a estrutura que leva o nome de 2-N-etil-4-N-isopropil-6-tiometil-1,3,5-triazina-2,4-diamino. Ela é um herbicida seletivo sistêmico, utilizada no combate de plantas daninhas anuais (folhas estreitas e largas), que está associada, principalmente, as culturas de abacaxi, banana, café, cana-de-açúcar, citros e milho. Por ser pouco estável, ela apresenta uma meia-vida de 20 a 100 dias, tornando-se muito móvel no ambiente e altamente persistente na água e no solo. Há relatos de seus metabólitos encontrados em águas subterrâneas mesmo depois de longos períodos após sua aplicação.

Figura 1 - Estrutura química do herbicida Ametrina



Fonte: Chemical Book (2017).

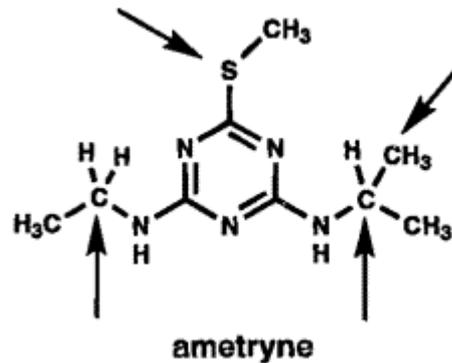
Em estudo realizado por ARMAS *et al.*, 2007 sobre o diagnóstico espaço-temporal da ocorrência de herbicidas no rio Corumbataí, observou-se a presença de resíduos de Ametrina nas amostras de água e sedimentos durante o período do estudo. Amplamente utilizada para otimizar a produção de cana-de-açúcar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

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

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

Lang, Rettie e Böcker (1997) desenvolveram um estudo cinético com amostras de fígado de pessoas com idade entre 30 e 70 anos para desvendar os mecanismos de biotransformação das s-triazinas (atrazina, terbutilazina, ametrina e terbutina). Em relação à Ametrina, os resultados do trabalho demonstraram que mais de uma isoforma P450 está envolvida no processo de metabolização da substância, sendo a deisopropilametrina (DIAm); 1-(hidroxiisopropil) ametrina (Am-M1); desetilametrina (DEAm) e sulfóxido de ametrina (AmSO) os seus principais metabólitos. A Figura 2 demonstra o metabolismo da ametrina.

Figura 2 - Metabolismo *in vitro* da ametryne. As setas indicam as posições de ataque oxidativo



Fonte: Lang, Rettie e Böcker (1997).

### 2.3 Generalidades sobre o fígado e hepatotoxicidade

Devido à sua interposição entre o trato digestório e a circulação geral do organismo, o fígado desempenha uma função central no metabolismo. Ele recebe grandes quantidades de nutrientes e xenobióticos que são absorvidos por meio do trato digestivo e veia porta. Entre as principais funções hepáticas estão a captação de aminoácidos, lipídios, carboidratos e vitaminas, com subsequente armazenamento, conversão metabólica e liberação no sangue e bile. O fígado é também o principal órgão envolvido na biotransformação de substâncias exógenas (xenobióticos), com capacidade de converter compostos hidrofóbicos em hidrossolúveis, mais facilmente eliminados pelo organismo (GUILLOUZO, 1998).

Substâncias capazes de produzir danos aos hepatócitos são denominadas hepatotóxicas. Os hepatotóxicos intrínsecos afetam todos os indivíduos em uma forma dose-dependente e, portanto, previsivelmente, podendo interferir com o metabolismo celular (hepatotóxicos ativos) ou tornarem-se tóxicos após biotransformação (hepatotóxicos latentes). A hepatotoxicidade idiossincrática, por outro lado, é dose-independente, podendo ser uma consequência do metabolismo anormal do xenobiótico em indivíduos susceptíveis (idiossincrasia metabólica) ou ser provocada por lesão hepática mediada pelo sistema imune (hepatite alérgica); nesses casos, mesmo pequenas concentrações de um fármaco podem provocar toxicidade. A atividade do fígado no metabolismo de substâncias exógenas é mediada principalmente pelo citocromo P450. Embora as reações de biotransformação estejam associadas ao processo de desintoxicação, em alguns casos o metabolismo do

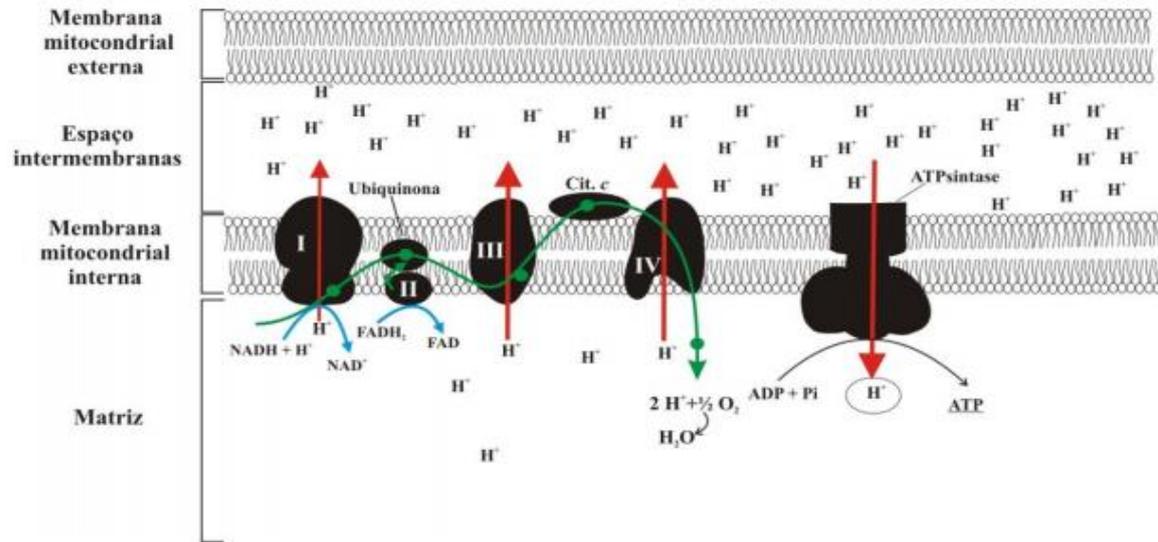
xenobiótico é prejudicial às células devido à produção de metabólitos altamente reativos, mais tóxicos do que o composto de origem, entre eles, eletrófilos, radicais e espécies reativas de oxigênio; estes, por sua vez, podem reagir diretamente com macromoléculas celulares ou iniciar reações em cadeia. Apesar deste processo de ativação ser o evento central em diversos fenômenos tóxicos, os hepatócitos possuem mecanismos de defesa efetivos para minimizá-los, de tal forma que é o balanço entre a bioativação, a desintoxicação e os mecanismos de defesa que determina se um composto irá ou não apresentar toxicidade (GÓMEZ-LECHÓN *et al.*, 2001).

Os diversos aspectos da lesão química ao fígado incluem a natureza dos agentes hepatotóxicos, a característica da lesão, o mecanismo para os efeitos hepatotóxicos, as circunstâncias de exposição e a importância médica e social. Algumas hepatotoxinas encontradas na natureza são produtos de plantas, metabolismo de fungos e bactérias ou são minerais (SCHOENTAL, 1963). Muitos agentes hepatotóxicos são produtos da indústria química ou farmacêutica (TOLMAN; SIRRINE, 1998; ZIMMERMAN, 1998). Outros ainda são subprodutos ou resíduos de materiais industriais que, por poluir o ambiente, podem ter acesso a humanos e animais. A lesão hepatotóxica pode ter várias formas. Alguns agentes levam à necrose, esteatose, cirrose ou carcinoma (SCHOENTAL, 1963; TOLMAN; SIRRINE, 1998; ZIMMERMAN, 1998). Outros levam apenas a interferências na secreção biliar e icterícia, com pequena ou nenhuma lesão evidente ao parênquima hepático (ROUILLER, 1964; ZIMMERMAN, 1998). Alguns produzem curiosas lesões degenerativas ou vasculares.

#### **2.4 Bioenergética mitocondrial**

A mitocôndria é responsável pela síntese da quase totalidade do ATP necessário à manutenção da estrutura e função celular. Os elétrons doados por substratos oxidáveis à cadeia respiratória na membrana mitocondrial interna, por meio de NADH ou FADH<sub>2</sub>, são transferidos ao O<sub>2</sub> reduzindo-o a H<sub>2</sub>O (respiração mitocondrial), e a energia livre resultante é utilizada para a síntese de ATP (fosforilação oxidativa).

Figura 3 - Representação da cadeia respiratória e fosforilação oxidativa. Seta verde: caminho percorrido pelos elétrons



Fonte: Maioli (2012).

De acordo com a hipótese quimiosmótica de Mitchell em associação com a do acoplamento conformacional de Boyer, o fluxo de elétrons é acompanhado de bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço Inter membranas, gerando um gradiente eletroquímico de H<sup>+</sup>. A energia livre liberada no retorno do H<sup>+</sup> à matriz mitocondrial induz alteração conformacional no componente F<sub>1</sub> da F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP sintase, liberando o ATP formado a partir de ADP e Pi em seus sítios catalíticos (MITCHELL, 1961; BOYER *et al.*, 1973). Quando a membrana mitocondrial se torna permeável a H<sup>+</sup> (por exemplo, pela ação de protonóforos) ocorre dissipação do potencial de membrana aumentando a velocidade de respiração; sob essas condições (desacoplamento), a capacidade da mitocôndria de sintetizar ATP é comprometida (MITCHELL, 1961; NICHOLLS; FERGUSON, 2002).

Evidências experimentais indicam que a mitocôndria representa um alvo preferencial e crítico para a ação de drogas e toxinas. Os efeitos tóxicos sobre as mitocôndrias podem ocorrer por mecanismos diretos e indiretos, levando a disfunções mitocondriais, tais como alterações no transporte de elétrons e fosforilação oxidativa, na permeabilidade da membrana mitocondrial interna, no transporte de cálcio, no estado oxidativo, além de uma série de outros eventos que levam à depleção de ATP (NADANACIVA *et al.*, 2007, DYKENS *et al.*, 2008, CASTANHA-ZANOLI *et al.*, 2012, LI *et al.*, 2012).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Determinar os efeitos da Ametrina em mitocôndrias isoladas de fígado de rato sobre parâmetros relacionados à bioenergética para auxiliar no conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na toxicidade apresentada pelo herbicida.

#### **3.2 Objetivo específico**

Avaliar os efeitos da Ametrina no consumo de oxigênio de mitocôndrias isoladas de fígado de rato, potencial de membrana mitocondrial, síntese de ATP e atividade das enzimas NADH e Succinato desidrogenase.

#### **3.3 Hipótese**

A Ametrina afeta a bioenergética das mitocôndrias isoladas de fígado de rato alterando a funcionalidade da cadeia respiratória e reduzindo a síntese de ATP.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Avaliação Ética**

A Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas da Unesp – Câmpus de Dracena certificou que os procedimentos utilizando animais estão de acordo com os “Princípios Éticos na Experimentação Animal” (Certificado n° 13/2018.SP - CEUA).

### **4.2 Local dos experimentos**

Os experimentos foram realizados na FCAT – Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - UNESP - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Dracena, no Laboratório de Bioquímica Metabólica e Toxicológica (LaBMeT).

### **4.3 Reagentes**

A Ametrina (Código 45321) foi adquirida da empresa Sigma-Aldrich Brasil Ltda (São Paulo, SP, Brasil). Em todos os ensaios foram empregados reagentes de alto grau analítico disponíveis comercialmente e as soluções foram preparadas com água ultra-filtrada em sistema purificador Millipore DirectQ-3® (Milli-Q®). As substâncias lipofílicas foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO).

### **4.4 Animais**

Ratos Wistar machos com aproximadamente 200 g de peso vivo, provenientes do Biotério Central da Unesp (Campus de Botucatu), ficaram alojados no Biotério da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas- Unesp - Campus de Dracena, em número máximo de quatro animais por caixa, com cobertura metálica e serragem de madeira. As caixas plásticas, com dimensões (CxLxA) 41x34x16 cm, foram armazenadas sob temperatura controlada de aproximadamente 22°C e os animais receberam alimento e água *ad libitum*, seguindo recomendações do *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* - Institute for Laboratory Animal Research.

#### 4.5 Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato intactas e rompidas

O método da centrifugação diferencial foi aplicado no isolamento das mitocôndrias (PEDERSEN *et al.*, 1978). Os animais foram dessensibilizados com éter etílico e em seguida eutanasiados por decapitação em guilhotina. Após incisão bilateral na cavidade abdominal, pequenos fragmentos do fígado foram imersos rapidamente em 50 mL de meio contendo sacarose 250 mM, ácido etilenoglicol bis ( $\beta$ -aminoetiléter) N,N,N',N'- tetraacético (EGTA) 1 mM e ácido 2-[4(2 hidroxietil) piperazinil(1)] etanossulfônico (HEPES)-KOH 10 mM, pH 7,2, a 4°C. Após lavagens sucessivas, os fragmentos foram homogeneizados três vezes por 15 segundos, com intervalos de 1 minuto, em homogeneizador Potter-Elvehjem. A suspensão obtida foi centrifugada a 770 g durante 5 minutos, a 4°C, e o sobrenadante resultante centrifugado a 9.800 g durante 10 minutos, a 4°C. O sedimento obtido foi ressuspensão em 10 mL de meio contendo sacarose 250 mM, EGTA 0,3 mM e HEPES-KOH 10 mM, pH 7,2, e centrifugado a 4.500 g durante 15 minutos, a 4°C. O sedimento mitocondrial final resultante foi homogeneizado em 1 mL de meio contendo sacarose 250 M e HEPES-KOH 10 mM, pH 7,2, mantido em temperatura de 4°C e utilizado por um período máximo de 3 horas após o isolamento.

As mitocôndrias rompidas foram obtidas por tratamento de choque térmico após três ciclos consecutivos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em um banho de água aquecido a 37°C. Os fragmentos de membrana foram mantidos a 4°C e foram utilizados na avaliação da atividade enzimática mitocondrial no período máximo de 3 horas.

#### 4.6 Determinação da concentração das proteínas mitocondriais

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

#### 4.7 Determinação do consumo de oxigênio mitocondrial

O consumo de oxigênio pelas mitocôndrias foi monitorado polarograficamente em oxímetro equipado com eletrodo de oxigênio do tipo Clark (Strathkelvin Precision Dissolved Oxygen Respirometer, Strathkelvin Instruments Limited, Glasgow, Scotland, UK) e os parâmetros respiratórios determinados conforme CHANCE WILLIAMS (1955). As mitocôndrias (1 mg de proteína/mL) foram incubadas sob agitação, em uma câmara fechada e termostaticada a 30°C, no meio de respiração contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM e HEPES-KOH 10 mM, acrescido de EGTA 0,5 mM e K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM (pH7,4) e energizadas com glutamato 5 mM + malato 5 mM ou succinato de potássio 5 mM (acrescido de rotenona 50 mM). Diferentes concentrações (25, 50, 100 e 150 µM) de Ametrina foram adicionadas e as velocidades de consumo de oxigênio determinadas por meio do software Strathkelvin Oxygen 782 System (versão 3.0, 2005) e expressas como nmol O<sub>2</sub> consumido/min/mg de proteína. A respiração do estado 3 iniciou-se após a adição de 400 nmols de ADP.

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

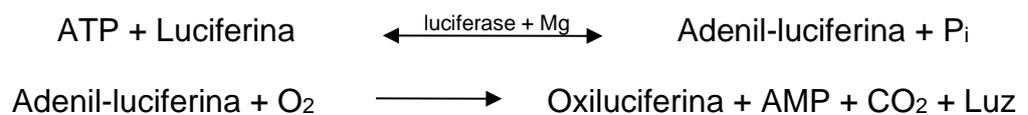
O potencial de membrana mitocondrial foi determinado em espectrofluorímetro modelo RFPC 5301 (Shimadzu, Tokyo, Japão), monitorando-se as variações de fluorescência promovida pela captação de safranina O, nos comprimentos de onda de 505 e 535 nm para excitação e emissão, respectivamente. As mitocôndrias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

A técnica consiste no monitoramento das alterações da fluorescência da sonda safranina O, um composto catiônico permeável à membrana celular que é rapidamente captado pelas mitocôndrias intactas das células. A intensidade de fluorescência estabelece uma relação estequiométrica inversa entre a polarização e a fluorescência, ou seja, quanto maior for a potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) menor será a fluorescência captada pelo equipamento pois a sonda é internalizada quando se forma o potencial de membrana.

#### 4.9 Determinação da concentração de ATP mitocondrial

O método de quimioluminescência (sistema luciferina-luciferase de vagalume) foi utilizado na quantificação de ATP mitocondrial, por meio do kit Bioluminescent Assay Kit Sigma (St. Louis, MO, USA) em um aparelho Luminômetro modelo Sirius I (Berthold Detection Systems, Pforzheim, Alemanha). As mitocôndrias (1 mg de proteína) foram incubadas no meio de respiração (1 mL de volume final) na presença ou na ausência de ametrina. A suspensão foi submetida a agitação branda e após 10 minutos de incubação a mesma foi centrifugada a 9.000 x g por 5 min, a 4°C. O precipitado obtido foi tratado com 1 mL de ácido percloracético 1 M a 4°C e novamente centrifugado a 14.000 x g por 10 min a 4°C. Foram separadas alíquotas de 100 µL do sobrenadante de cada amostra e as mesmas foram neutralizadas com KOH 2 M. Em seguida foi adicionado TRIS-HCl 100 mM, pH 7,8 (1 mL de volume final), sendo as amostras centrifugadas a 15.000 x g, por 10 min a 4°C, e os sobrenadantes resultantes foram avaliados, em triplicata, no Luminômetro seguindo as recomendações do fabricante do kit.

O método consiste na quebra do ATP pela luciferase e a união do ADP à luciferina, formando assim a adenil-luciferina. Essa por sua vez reage com o oxigênio emitindo luz, sendo essa intensidade de luz captada pelo aparelho. Por meio de uma curva padrão consegue-se realizar a quantificação do ATP presente na amostra. O ATP é o fator limitante da reação para a emissão de luz, ou seja, a quantidade de luz emitida é diretamente proporcional à quantidade de ATP na amostra.



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

As atividades das enzimas NADH desidrogenase e Succinato desidrogenase foram determinadas pelo método espectrofotométrico descrito por SINGER (1974), usando o ferricianeto como acceptor artificial de elétrons. A reação ocorreu a 28°C, em volume final de 1,0 mL, em sistema de reação constituído de: tampão fosfato 50 mM, pH 7,4, EDTA 2 mM, NADH 0,17 mM ou Succinato 10 mM (+ rotenona 1 µM), ferricianeto de potássio 0,6 mM, e 100 µg de proteína mitocondrial juntamente com diferentes concentrações de Ametrina (25, 50, 100 e 150 µM). A reação, iniciada pela

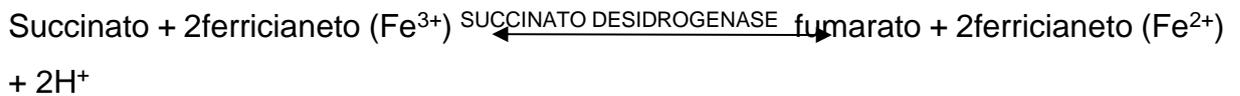
adição de NADH ou Succinato, foi monitorada em 420 nm e os resultados expressos em nmol de ferricianeto reduzido  $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$  de proteína $^{-1}$ , considerando-se o coeficiente de extinção molar do ferricianeto de  $1.040 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (CREUTZ, 1973).

O método consiste no monitoramento da redução do ferricianeto nas seguintes reações:

- NADH desidrogenase:



- Succinato desidrogenase:



#### 4.11 Análise estatística

A significância estatística dos dados experimentais foi avaliada pela análise de variância, sendo a comparação de médias realizada por meio do teste de Dunnet, o qual realiza a comparação entre os tratamentos e o controle, e os resultados com valor de  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes. O programa utilizado foi o Graphpad Prism, versão 4.0 para o Windows, do Graphpad Software (SAN DIEGO, CA, USA).

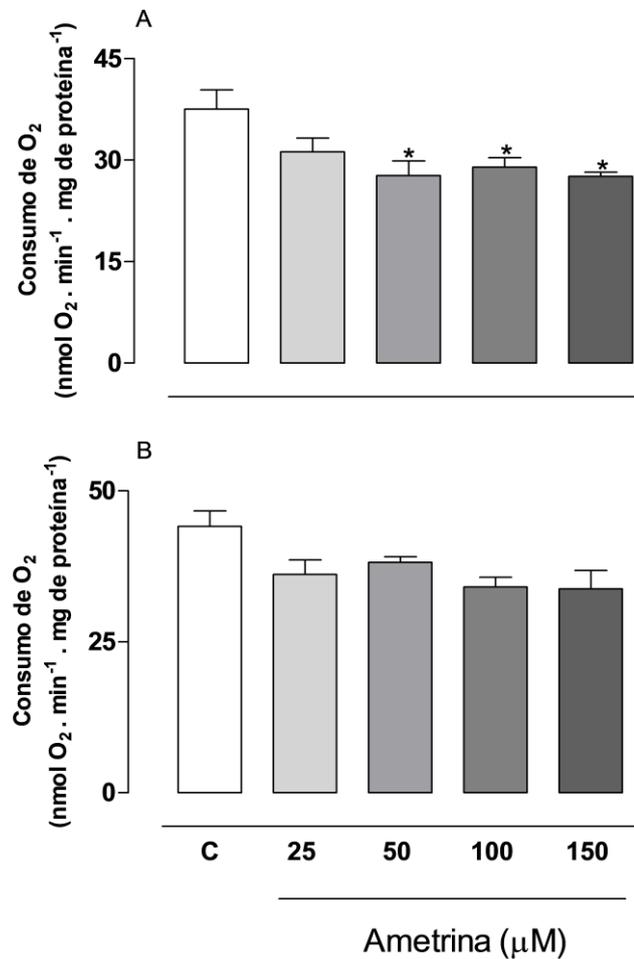
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Efeito da Ametrina sobre o consumo de oxigênio mitocondrial

Os resultados de consumo de oxigênio obtidos utilizando mitocôndrias energizadas com glutamato + malato (doadores de elétrons para o complexo I) mostraram uma inibição nas concentrações de 50, 100 e 150  $\mu\text{M}$  (Figura 4 A). Quando energizadas com succinato, doador de elétrons para o complexo II, não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle (Figura 4 B).

Figura 4 - Efeito da Ametrina no consumo de oxigênio do estado 3 da respiração em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, energizadas com glutamato 5 mM + malato 5 mM (A) e succinato 5 mM (+ rotenona 50 nM) (B). Os valores representam a média

± EPM de quatro experimentos com diferentes preparações mitocondriais.  
 \*Significativamente diferente do controle (\*P < 0,05). C = controle, sem adição da Ametrina.



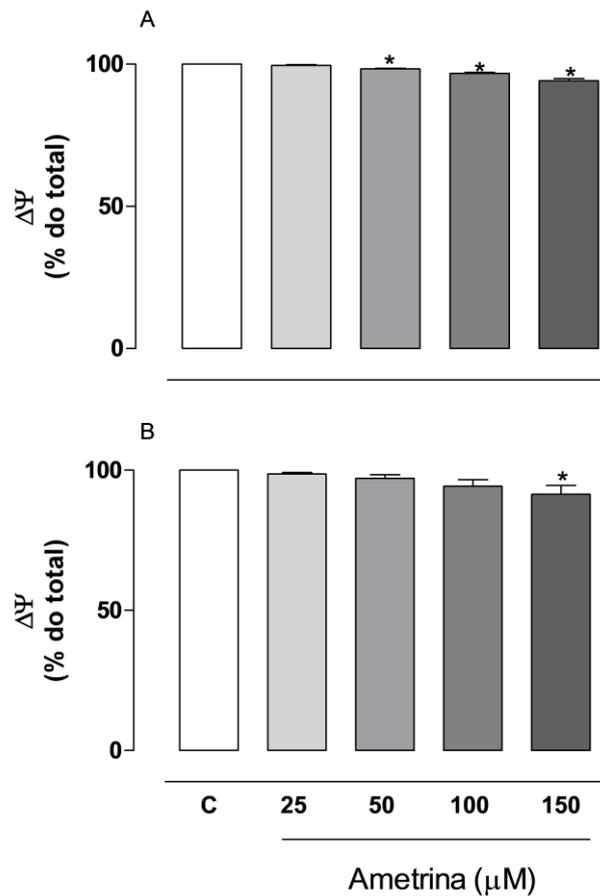
Fonte: elaborado pela autora.

## 5.2 Efeito da Ametrina sobre o potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ )

A Ametrina dissipou significativamente o potencial de membrana de mitocôndrias energizadas com malato + glutamato nas concentrações de 50, 100 e 150 μM (Figura 5 A) e quando energizadas com succinato + rotenona esse efeito foi observado apenas na presença de 150 μM do herbicida (Figura 5 B).

Figura 5 - Efeito da Ametrina no potencial de membrana em mitocôndrias isoladas de fígado de rato energizadas com glutamato 5 mM + malato 5 mM (A) ou succinato 5 mM (+ 2,5 μM de rotenona) (B). Os valores representam a média ± EPM de quatro

experimentos com diferentes preparações mitocondriais. \*Significativamente diferente do controle (\*P < 0,05). C = controle, sem adição da Ametrina.

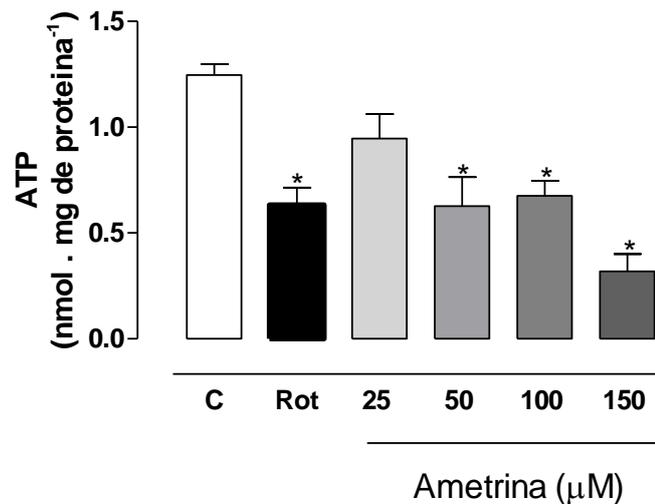


Fonte: elaborado pela autora.

### 5.3 Efeito da Ametrina sobre a concentração de ATP mitocondrial

A Ametrina diminuiu a concentração de ATP nas mitocôndrias energizadas com glutamato + malato de maneira dose-dependente, sem do os efeitos significantes observados nas concentrações de 50, 100 e 150  $\mu\text{M}$  (Figura 6).

Figura 6 - Efeito da Ametrina na concentração de ATP em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, energizadas com glutamato 5 mM + malato 5 mM. Os valores representam a média  $\pm$  EPM de quatro experimentos com diferentes preparações mitocondriais. \*Significativamente diferente do controle (\*P < 0,05). C = controle, sem adição do Ametrina ou rotenona; Rot = controle positivo, obtido pela adição de rotenona 2,5  $\mu\text{M}$ .

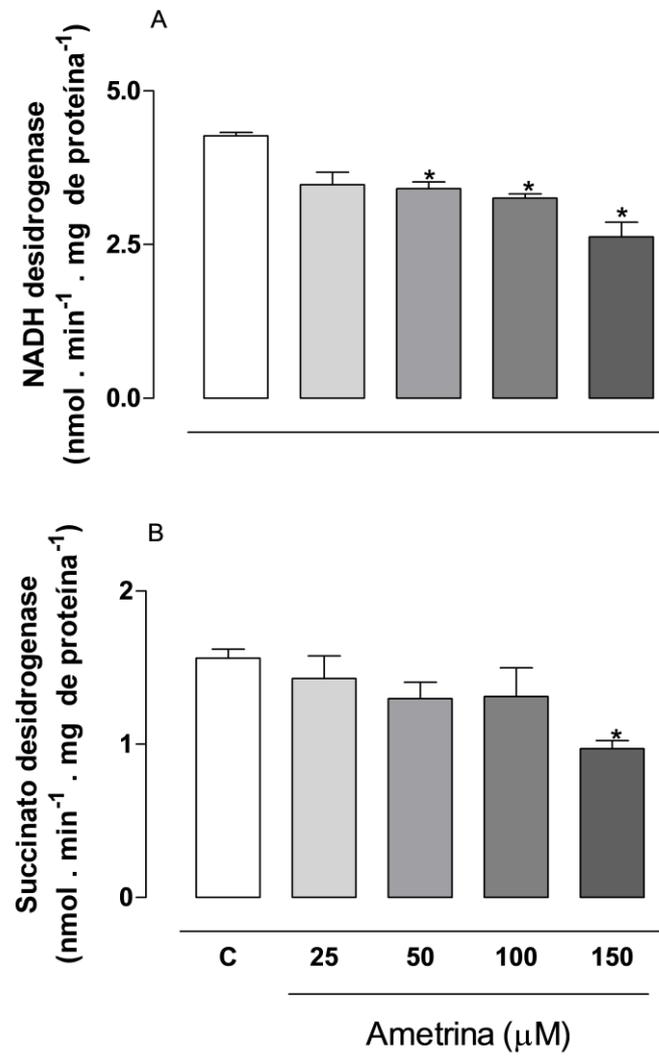


Fonte: elaborado pela autora.

#### 5.4 Efeito da Ametrina sobre as atividades das enzimas relacionadas à cadeia respiratória mitocondrial (NADH Desidrogenase e Succinato Desidrogenase)

Com relação à atuação da Ametrina na atividade da enzima NADH desidrogenase, localizada no complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, foi observado um efeito inibidor dose-dependente a partir de 50 μM (Figura 7 A). Quando analisada a atuação do herbicida sobre a succinato desidrogenase, enzima localizada no complexo II da cadeia respiratória mitocondrial, a inibição aconteceu apenas na concentração de 150 μM (Figura 7 B).

Figura 7 - Efeito da Ametrina nas atividades das enzimas NADH (A) e Succinato (B) desidrogenase. Os valores representam a média ± EPM de três experimentos com diferentes preparações mitocondriais. \*Significativamente diferente do controle (\*P < 0,05). C = controle, sem adição de Ametrina.



Fonte: elaborado pela autora.

## 6 DISCUSSÃO

Estudos demonstraram que a contaminação de solos e de águas superficiais/subterrâneas pelo herbicida Ametrina (CUMMING; DOYLE; BROWN, 2002; LAABS *et al.*, 2002; ARMAS, 2006), pertencente à classe das s-triazinas, pode causar anormalidades sexuais em sapos (HAYES *et al.*, 2003; SULLIVAN; SPENCE, 2003), reduzir a produção de testosterona em ratos (TRENTACOSTE, 2001) e em níveis elevados, para humanos, pode causar náuseas, vômitos, diarréias, fraqueza muscular e câncer de próstata (MACLENNAN *et al.*, 2002).

Evidências na literatura científica indicam que o fígado é um dos alvos da toxicidade da Ametrina. Em estudo realizado por Ohno *et al.*, (1998), a Ametrina apresentou citotoxicidade em hepatócitos isolados e cultura primária de hepatócitos, aumentando a liberação da enzima lactato desidrogenase e diminuindo a concentração de GSH em ambos os casos. Santos *et al.*, (2015) aplicaram duas concentrações sub-letais de ametrina (15 e 30 mg/kg/dia) por gavagem durante 56 dias em ratos Wistar e demonstraram que a Ametrina afeta os hepatócitos, provocando a diminuição volumétrica dos sinusóides com fibrose. Os núcleos dos hepatócitos apresentaram diminuição significativa de diâmetro e volume.

Para avaliar o potencial envolvimento das mitocôndrias na hepatotoxicidade relacionada à Ametrina, no presente estudo foram avaliados os seus efeitos na bioenergética de mitocôndrias isoladas de fígado de ratos. As mitocôndrias são organelas celulares muito importantes por serem responsáveis pela maior parte da energia gerada e utilizada pelas células (NICHOLLS; FERGUSON, 2002). Elas desempenham papel fundamental para a sobrevivência celular por representarem o principal sítio do metabolismo oxidativo dos eucariotos e também por participarem de vias apoptóticas e necróticas (LIU *et al.*, 1996; DESAGUER; MARTINOU, 2000; NICHOLLS; FERGUSON, 2002).

Toda energia liberada pela oxidação de substratos na cadeia respiratória é usada para transportar prótons através da membrana interna, gerando assim a força próton-motora que impulsiona a síntese de ATP pela  $F_0F_1$ -ATP sintase. Muitos compostos são capazes de promover mudanças na fosforilação oxidativa (BRIDGES *et al.*, 2014). Entre estes, estão os inibidores que interferem com a síntese de ATP atuando nos complexos da cadeia respiratória ou na  $F_0F_1$ -ATP sintase (NICHOLLS; FERGUSON, 2002).

No presente estudo, a interferência da Ametrina no funcionamento da cadeia de transporte de elétrons foi monitorada pelo consumo de oxigênio. Os resultados obtidos na respiração mitocondrial de estado 3 demonstraram que, nas concentrações testadas, o herbicida interfere no transporte de elétrons para o complexo I levando à inibição do consumo de oxigênio. A inibição do transporte de elétrons resulta na redução do potencial da membrana mitocondrial (KALBACOVA *et al.*, 2003). Esse efeito também foi observado para a Ametrina, sendo observada redução do potencial de membrana nas mitocôndrias energizadas com os substratos do complexo I (glutamato + malato) a partir de 50  $\mu\text{M}$ .

Ao inibir a cadeia de transporte de elétrons e a formação do potencial de membrana, seria esperado que a Ametrina reduzisse a concentração mitocondrial de ATP. Nesse sentido, as mitocôndrias foram incubadas com a Ametrina na presença dos substratos do complexo I e posteriormente a concentração de ATP foi medida, tendo sido observada uma redução dose-dependente na concentração do nucleotídeo nas doses acima de 50  $\mu\text{M}$  do herbicida. A interferência na síntese ou uso do ATP mitocondrial é o mecanismo pelo qual muitos xenobióticos expressam sua toxicidade aguda ou crônica (MEYER E KULKARNI, 2001). Além disso, a redução do ATP pode diminuir a eficiência dos processos dependentes de energia e a transdução de sinais celulares mediados pelo mesmo, o que segundo Eguchi *et al.*, (1997) e Skulachev (2006), os níveis de ATP determinam o tipo de morte celular, pois quando a depleção dos níveis acontece gradativamente as células se encaminham para apoptose, e quando a queda é repentina ela é direcionada para necrose.

Para avaliar o possível efeito da Ametrina sobre as enzimas da cadeia de transporte de elétrons, foram realizados experimentos para a medida da atividade da NADH desidrogenase, localizada no complexo I, e da succinato desidrogenase, enzima localizada no complexo II, sendo que o herbicida foi capaz de inibir a atividade da NADH desidrogenase de maneira mais eficiente. Esses resultados corroboram os efeitos observados no consumo de oxigênio e no potencial de membrana mitocondrial, indicando que o mecanismo tóxico do herbicida está relacionado com sua ação direta na cadeia de transporte de elétrons, sendo mais proeminente no complexo I.

## **7 CONCLUSÃO**

A Ametrina exerce efeito danoso na bioenergética de mitocôndrias isoladas de fígado de rato que consiste na alteração da funcionalidade da cadeia respiratória e redução dos níveis de ATP. Uma vez que a inibição do metabolismo energético pode afetar vários processos importantes para a manutenção celular, é razoável que as mudanças na produção de energia mitocondrial do fígado descritas no presente trabalho possam contribuir para a hepatotoxicidade apresentada pelo herbicida.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANVISA. **Relatório de atividades da gerência geral de toxicologia**. 2017. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/index.htm>. Acesso em: 05 out. 2020.
- ARMAS, E. D. **Biogodinâmica de herbicidas utilizados em cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) na sb-bacia do rio Corumbataí**. 2006. 187 f. Tese (Doutorado em Ecologia de Agroecossistemas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.
- ARMAS, E. D.; MONTEIRO, R. T. R.; ANTUNES, P. M.; SANTOS, M. A. P. F.; CAMARGO, P. B.; ABAKERLI, R. B. Diagnóstico espaço-temporal da ocorrência de herbicidas nas águas superficiais e sedimentos do Rio Corumbataí e principais afluentes. **Química Nova**, [S.L.], v. 30, n. 5, p. 1119-1127, out. 2007.
- BOYER, P.D.; CROSS, R. L.; MOMSEN, W. A new concept for energy coupling in oxidative phosphorylation based on a molecular explanation of the oxygen exchange reactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.70, p. 2837-2839, 1973.
- BRIDGES, H. R.; JONES, A. J. Y.; POLLAK, M. N.; HIRST, J. Effects of metformin and other biguanides on oxidative phosphorylation in mitochondria. **Biochemical Journal**, v. 462, p. 475-487, 2014.
- CASTANHA-ZANOLI, J. C.; MAIOLI, M. A.; MEDEIROS, H. C. D.; MINGATTO, F. E.. Abamectin affects the bioenergetics of liver mitochondria: a potential mechanism of hepatotoxicity. **Toxicology In Vitro**, [S.L.], v. 26, n. 1, p. 51-56, fev. 2012.
- CHANCE, B.; WILLIAMS, G. R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. **Advances in Enzymology**, v. 17, p. 65-134, 1955.
- CHEMICAL BOOK. **Ametryn**. 2017. Disponível em: [https://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB2684343\\_EN.htm](https://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB2684343_EN.htm). Acesso em: 27 abr. 2021
- COUTINHO, C. F. B.; TANIMOTO, S. T.; GALLI, A.; GARBELLINI, G. S.; TAKAYAMA, M.; AMARAL, R. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S.. PESTICIDAS: mecanismo de ação, degradação e toxidez. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, [S.L.], v. 15, p. 65-72, 31 dez. 2005.
- CREUTZ, C.; SUTIN, N. Reduction of ferricytochrome F by dithionite ion: electron transfer by parallel adjacent and remote pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 70, n. 6, p. 1701-1703, 1973.
- CUMMING, J. P.; DOYLE, R. B.; BROWN, P. H. Clomazone Ddissipation in four Tasmanian Topsoils. **Weed Science**, v. 50, n. 3, p. 405-409, 2002.
- DANIELSON, P.B. The cytochrome P450 superfamily: Biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Current Drug Metabolism*. v.3, p. 561-597, 2002.

DESAGUER, S.; MARTINOU, J. C. Mitochondria as the central control point of apoptosis. **Trends Cell Biology**, v.10, p.369-377, 2000.

DYKENS, J. A.; JAMIESON, J. D.; MARROQUIN, L. D.; NADANACIVA, S.; XU, J. J.; DUNN, M. C.; SMITH, A. R.; WILL, Y. In Vitro Assessment of Mitochondrial Dysfunction and Cytotoxicity of Nefazodone, Trazodone, and Buspirone. **Toxicological Sciences**, [S.L.], v. 103, n. 2, p. 335-345, 15 mar. 2008.

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

FERRACINI, V. L.; QUEIROZ, S. C. N.; GOMES, M. A. F.; SANTOS, G. L. Método para a determinação de hexazinone e tebutiuron em água. *Química Nova*, [S.L.], v. 28, n. 3, p. 380-382, jun. 2005. **Química Nova**, v. 28, p. 380-382, 2005

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

HAYES, T.; HASTON, K.; TSUI, M.; HOANG, A.; HAEFFELE, C.; VONK, A.. Atrazine-induced hermaphroditism at 0.1 ppb in American leopard frogs (*Rana pipiens*): laboratory and field evidence.. **Environmental Health Perspectives**, [S.L.], v. 111, n. 4, p. 568-575, abr. 2003.

HERTWIG, K. V. **Manual de herbicidas desfolhantes, dessecantes, fitorreguladores e bio-estimulantes**. 2. Ed. São Paulo. 1983. p. 28-30.

INOUE, M. H.; OLIVEIRA JUNIOR, R. S.; REGITANO, J. B.; TORMENA, C. A.; TORNISIELO, V. L.; CONSTANTIN, J. Critérios para avaliação do potencial de lixiviação dos herbicidas comercializados no Estado do Paraná. **Planta Daninha**, [S.L.], v. 21, n. 2, p. 313-323, ago. 2003.

IOANNIDES, C. **Enzyme systems that metabolise drugs and other xenobiotics**. ed. Baffins Lane, Chichester, West Sussex, UK: John Wiley & Sons, 2002.

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

KHODAYAR, M. J.; NAMDAR, F.; HOJATI, S.; LANDI, A.; KHORASGANI, Z. N.; ALAMOLHODA, S. Removal of Ametryn From Aqueous Solutions With Zeolite Nanoparticles Optimized Using the Box-Behnken Design. **Jundishapur Journal Of Natural Pharmaceutical Products**, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 0-1, 17 abr. 2016.

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

LAABS, V.; AMELUNG, W.; PINTO, A. A.; WANTZEN, M.; SILVA, C. J.; ZECH, W. Pesticides in Surface Water, Sediment, and Rainfall of the Northeastern Pantanal Basin, Brazil. **Journal Of Environmental Quality**, [S.L.], v. 31, n. 5, p. 1636-1648, set. 2002.

LANG, D. H.; RETTIE, A. E.; BÖCKER, R. H. Identification of enzymes involved in the metabolism of atrazine, terbutylazine, ametryne, and terbutryne in human liver microsomes. **Chemical Research in Toxicology**, v. 10, n. 9, p. 1037-1044, 1997.

LI, Y.; COUCH, L.; HIGUCHI, M.; FANG, J.; GUO, L. Mitochondrial Dysfunction Induced by Sertraline, an Antidepressant Agent. **Toxicological Sciences**, [S.L.], v. 127, n. 2, p. 582-591, 2 mar. 2012.

LIU, X.; KIM, C. N.; YANG, J.; JEMMERSON, R.; WANG, X.. Induction of Apoptotic Program in Cell-Free Extracts: requirement for datp and cytochrome c. **Cell**, [S.L.], v. 86, n. 1, p. 147-157, jul. 1996.

MACHADO, C. S.; FREGONESI, B. M.; ALVES, R. I. S.; TONANI, K. A. A.; SIERRA, J.; MARTINIS, B. S.; CELERE, B. S.; MARI, M.; SCHUHMACHER, M.; NADAL, M. Health risks of environmental exposure to metals and herbicides in the Pardo River, Brazil. **Environmental Science And Pollution Research**, [S.L.], v. 24, n. 25, p. 20160-20172, 22 jun. 2017

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

MAIOLI, M. A.; LEMOS, D. E.C.V.; GUELFY, M.; MEDEIROS, H. C. D.; RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MINGATTO, F. E. Mechanism for the uncoupling of oxidative phosphorylation by juliprosopine on rat brain mitochondria. **Toxicol**, [S.L.], v. 60, n. 8, p. 1355-1362, dez. 2012.

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

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

MINGATTO, F. E.; DORTA, D. J.; SANTOS, A. B.; CARVALHO, I.; SILVA, C. H. T. P. ; SILVA, V. B.; UYEMURA, S. A.; SANTOS, A. C.; CURTI, C. Dehydromonocrotaline inhibits mitochondrial complex I. A potential mechanism accounting for hepatotoxicity of monocrotaline. **Toxicol**, [S.L.], v. 50, n. 5, p. 724-730, out. 2007.

MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to 36léctron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. **Nature**, v. 191, p. 144-148, 1961.

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

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

NADANACIVA, S.; DYKENS, J. A.; BERNAL, A.; CAPALDI, R. A.; WILL, Y. Mitochondrial impairment by PPAR agonists and statins identified via immunocaptured OXPHOS complex activities and respiration. **Toxicology And Applied Pharmacology**, [S.L.], v. 223, n. 3, p. 277-287, 15 set. 2007.

NICHOLLS, D.G; FERGUSON, S.J. **Bioenergetics 3**. San Diego: Academic Press, 2002.

OHNO, Y., MIYAJIMA, A., SUNOUCHI, M. Alternative methods for mechanistic studies in toxicology. Screening of hepatotoxicity of pesticides using freshly isolated and primary cultured hepatocytes and non-liver-derived cells, SIRC cells. **Toxicology Letters**, v. 102-103, p. 569-573, 1998.

PEDERSEN, P. L.; GREENAWALT, J. W.; REYNAFARJE, B.; HULLIHEN, J.; DECKER, G. L.; SOPER, J. W.; BUSTAMENTE, E. Chapter 26 Preparation and Characterization of Mitochondria and Submitochondrial Particles of Rat Liver and Liver-Derived Tissues. **Methods In Cell Biology**, [S.L.], p. 411-481, 1978.

PINTO, B. G. S.; SOARES, T. K. M.; LINHARES, M. A.; GHISI, N. C. Occupational exposure to pesticides: genetic danger to farmworkers and manufacturing workers : a meta-analytical review. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 748, p. 141382, dez. 2020.

PRESTON, B.L. Indirect effects in aquatic ecotoxicology: implications for ecological risk assessment. **Environmental Management**, v. 29, p. 311-323. 2002.

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

ROQUE, I. S.; RAMÍREZ, A. L. R.; HERRERA, S. L. G.; PALE, C. T.; SILVA, L. R.; CARO, M. F. H.; ALONSO, J. C. Á.; HERNÁNDEZ, S. A. L.; JACINTO, J. A. P.; LÓPEZ, Z. J. F. Toxic risk by the use of pesticides. **Toxicology Letters**, [S.L.], v. 259, p. 225-229, out. 2016.

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

SANTOS, T.; CANCIAN, G.; NEODINI, D. N. R.; MANO, D. R. S.; CAPUCHO, C.; PREDES, F. S.; BARBIERI, R.; OLIVEIRA, C. A.; PIGOSO, A. A.; DOLDER, H. Toxicological evaluation of ametryn effects in Wistar rats. **Experimental And Toxicologic Pathology**, [S.L.], v. 67, n. 10, p. 525-532, out. 2015.

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

SINGER, T. P. Determination of the activity of succinate, NADH, choline and αglycerophosphate dehydrogenases. **Methods of Biochemical Analysis**, v. 22, p. 123-175, 1974.

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

SULLIVAN, K. B.; SPENCE, K. M. Effects of sublethal concentrations of atrazine and nitrate on metamorphosis of the African clawed frog. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 22, n. 3, p. 627-635, 2003.

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

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

ZIMMERMAN, H. J. Drug-induced liver disease. *In*: SCHIFF, E.R., SORREL, M.F., MADDREY, W.C. **Diseases of the liver**, Philadelphia, p.973-1964, 1998.