

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação da toxicidade dos herbicidas trifluralina e tebutiuron
utilizando ensaios mitocondriais**

Bárbara de Oliveira

Ribeirão Preto

2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação da toxicidade dos herbicidas trifluralina e tebutiuram
utilizando ensaios mitocondriais**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientada: Bárbara de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Daniel Junqueira Dorta

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em 17/11/2017. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Oliveira, Bárbara.

Avaliação da toxicidade dos herbicidas trifluralina e tebutirom utilizando ensaios mitocondriais. Ribeirão Preto, 2018.

92p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Dorta, Daniel Junqueira

1. Contaminantes emergentes. 2. Herbicidas. 3. Trifluralina 4. Tebutirom 5. Mitocôndrias

FOLHA DE APROVAÇÃO

Bárbara de Oliveira

Avaliação da toxicidade dos herbicidas trifluralina e tebutirom utilizando ensaios mitocondriais

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Junqueira Dorta

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Superfantastic, everything is beautiful
Nothing's too tragic when it comes to happy people
Bedtime stories, morning glories
Blue skies and the perfect life
For you and me

Superfantastic – Mr. Big

DEDICATÓRIA

À minha Família

Dedico este trabalho unicamente à minha família, meu pai Guilherme, minha mãe Carla, e minhas irmãs Isadora e Eleonora. O apoio e a paciência de vocês foram fundamentais para a conclusão desse projeto. Pai e Mãe, obrigada por sempre me darem o suporte necessário para ir atrás dos meus objetivos, mesmo quando esses pareciam difíceis e distantes. Isa e Lê, a companhia de vocês me dava a energia necessária para continuar adiante, principalmente quando o desânimo e os obstáculos me faziam perder o foco.

Vocês tem o meu amor e a minha gratidão eterna.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço ao Prof. Dr. Daniel Dorta por ter me concedido a oportunidade de embarcar nesse projeto e por confiar no meu potencial mesmo após pouco tempo de convivência.

Agradeço também aos meus colegas de laboratório, Maria Júlia, Mariana, Raul, Alana, Leka, Raíssa e em especial à Lilian e ao Murilo, por todos os ensinamentos, trocas de experiências e bons momentos que passamos juntos durante essa jornada.

Confesso-me em débito com o Prof. Dr. José Carlos Toledo Júnior e ao seu aluno de pós-graduação André Luís Condeles, do Departamento de Química Inorgânica da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, por terem disponibilizado o uso do espectrofluorímetro e pelas boas tardes de conversas que tivemos tomando café.

Agradeço ainda aos funcionários do Laboratório de Bioquímica do Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Profa. Dra. Luciane Alberice e Ana Elisa Azzolini pelo auxílio à realização da pesquisa.

Não poderia deixar de homenagear a secretária da Pós-Graduação Rosemary Ioshimine Gerolineto por ser sempre atenciosa e cuidadosa com todos os alunos.

Aos meus melhores amigos, Livia e Rodrigo, pela paciência, carinho e apoio durante todo esse tempo. A amizade de vocês significa muito para mim.

Por fim, a todos que, mesmo brevemente, estiveram em minha vida ao longo desse período e de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, mesmo que fosse para tornar meus dias mais calmos e alegres.

RESUMO

Oliveira, B. **Avaliação da toxicidade dos herbicidas trifluralina e tebutiurom utilizando ensaios mitocondriais.** 92 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Os contaminantes emergentes compreendem uma classe de substâncias que apresentam carência de dados toxicológicos, principalmente em relação aos seus efeitos danosos e aos biomarcadores de exposição, além de potencial dano ao ambiente, sendo esta uma preocupação recente da comunidade científica. Dentro dessa classe enquadram-se os praguicidas, mais especificamente os herbicidas, os quais são largamente utilizados na agricultura para prevenir o aparecimento de ervas daninhas, que interferem no rendimento e qualidade da colheita. Esses compostos apresentam potencial contaminação de solo e águas, podendo atingir, dessa forma, organismos não-alvo. Pelo fato da mitocôndria ser reconhecida como a principal organela produtora de energia celular, além de exercer papel fundamental na manutenção de inúmeras funções celulares, ela foi utilizada como modelo experimental para avaliar os efeitos dos herbicidas trifluralina e tebutiurom na faixa de concentração de 1 $\mu\text{mol/L}$ a 100 $\mu\text{mol/L}$. Os resultados obtidos mostram que o tebutiurom não afeta a bioquímica mitocondrial em nenhuma concentração testada. Já a trifluralina, principalmente na concentração mais alta (100 $\mu\text{mol/L}$), é capaz de interagir com a membrana mitocondrial, induzir inchamento mitocondrial, dissipar o potencial de membrana, desregular a homeostase cálcica, afetar a respiração celular e alterar os níveis de ATP. Entretanto, não é capaz de induzir estresse oxidativo na mitocôndria. Os resultados indicam possíveis mecanismos de toxicidade do herbicida em organismos não-alvo.

Palavras-chave: Trifluralina, tebutiurom, herbicidas, mitocôndria.

ABSTRACT

OLIVEIRA, B. **Evaluation of the toxicity of the herbicides trifluralin and tebuthiuron using mitochondrial assays.** 92 f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

The emerging contaminants comprise a class of substances that exhibit a lack of toxicology data, especially regarding to their harmful effects and biomarkers of exposure, besides the potential damage to the environment, which is a recent concern of the scientific community. Within this class there are the pesticides, more specifically the herbicides, which are widely used in crop production to prevent the appearance of weeds, that can damage the yield and quality of the harvest. These compounds are potential contaminants of soil and water, and may achieve non-target organisms. Because mitochondria are recognized as the main energy-producing cell organelles, and play a vital role in the maintenance of many cellular functions, they were used as an experimental model to evaluate the effects of the herbicides trifluralin and tebuthiuron in concentrations ranging from 1 $\mu\text{mol/L}$ to 100 $\mu\text{mol/L}$. The results show that tebuthiuron does not affect the mitochondrial biochemistry in any concentration tested. Trifluralin, especially at the highest concentration (100 $\mu\text{mol/L}$), is capable of interacting with mitochondrial membrane, inducing swelling, dissipating the membrane potential, dysregulating calcium homeostasis, impairing mitochondrial respiration and altering ATP levels. However, it isn't able to induce oxidative stress in mitochondria. These events might be involved in the mechanisms of the toxicity of trifluralin in non-target organisms.

Keyword: Trifluralin, tebuthiuron, herbicides, mitochondria.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura molecular do tebutiurom
- Figura 2.** Mecanismo de ação do tebutiurom
- Figura 3.** Estrutura molecular da trifluralina
- Figura 4** Esquemática da estrutura mitocondrial
- Figura 5.** Esquemática do ciclo da glutatona
- Figura 6.** Efeito da trifluralina na respiração mitocondrial
- Figura 7.** Efeito do tebutiurom na respiração mitocondrial
- Figura 8.** Efeito do tebutiurom no potencial de membrana
- Figura 9.** Efeito da trifluralina no potencial de membrana
- Figura 10.** Interação dos herbicidas com a membrana mitocondrial interna
- Figura 11.** Efeito do tebutiurom sobre inchamento mitocondrial
- Figura 12.** Efeito da trifluralina sobre inchamento mitocondrial
- Figura 13.** Efeito da trifluralina e inibidores sobre o inchamento mitocondrial
- Figura 14.** Efeito da trifluralina sobre o efluxo de cálcio
- Figura 15.** Efeito do tebutiurom sobre o efluxo de cálcio
- Figura 16.** Efeito do tebutiurom sobre os níveis de ATP
- Figura 17.** Efeito da trifluralina sobre os níveis de ATP
- Figura 18.** Efeito da trifluralina sobre a formação de radicais
- Figura 19.** Efeito do tebutiurom sobre a formação de radicais
- Figura 20.** Efeito dos herbicidas sobre a oxidação de membranas mitocondriais
- Figura 21.** Efeito do tebutiurom sobre os níveis de NAD(P)H
- Figura 22.** Efeito da trifluralina sobre os níveis de NAD(P)H
- Figura 23.** Efeito dos herbicidas sobre a razão GSH/GSSG

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito dos herbicidas sobre a razão de controle respiratório (RCR)

Tabela 2. Efeito dos herbicidas sobre a razão ADP/O

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina 5' Difosfato
ADP/O	Razão de ADP por molécula de Oxigênio
ANS	1-anilino-8-naftaleno sulfonato sal
ANT	Translocador de nucleotídeo de adenina
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
CCCP	Cianeto de Carbonila Cloro Fenilhidrazona
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CsA	Ciclosporina A
CypD	Ciclofilina D
Da	Daltons
DNA	Ácido Desoxiribonucleíco
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DPH	1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno
EGTA	Ácido Etilenoglicol bis (β -aminoetil éter)-N,N,N',N'- tetraacético
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa Oxidada
H ₂ DCFDA	2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-piperazinil-(1)]-etanossulfônico
mtDNA	Ácido Desoxiribonucleíco Mitocondrial
mV	Milivolts
NAD(P)H	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (fosfato) (forma reduzida)
NEM	N-etilmaleimida
nm	nanômetros
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido
OH [•]	Radical Hidroxil
OPT	o-ftalaldeído
PiC	Carreador de fosfato inorgânico

PTP	Poro de transição de permeabilidade
PCA	Ácido Perclórico
PM	Peso Molecular
RCR	Razão de Controle Respiratório
RR	Vermelho de Rutênio (Ruthenium Red)
T-BOOH	terc-butilhidroperóxido
TPM	Transição de Permeabilidade Mitocondrial
USP	Universidade de São Paulo
VDAC	Canal de ânion dependente de voltagem
$\Delta\psi$	Potencial de membrana mitocondrial

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS	v
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Herbicidas</i>	1
1.2 <i>Mitocôndria</i>	7
2. OBJETIVO	16
2.1 <i>Objetivos específicos</i>	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 <i>Decapitação sem anestesia</i>	17
3.2 <i>Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato e dosagem de proteína</i>	19
3.3 <i>Dosagem de proteínas</i>	20
3.4 <i>Respiração mitocondrial</i>	20
3.5 <i>Intumescimento Osmótico Mitocondrial</i>	21
3.6 <i>Lipoperoxidação de membrana</i>	22
3.7 <i>Potencial de Membrana</i>	23
3.8 <i>Avaliação do Estado Redox dos Nucleotídeos de Piridina</i>	24
3.9 <i>Interação com membrana mitocondrial interna</i>	25
3.10 <i>Movimentação e Liberação de Ca⁺²</i>	25
3.11 <i>Concentração mitocondrial de ATP</i>	26
3.12 <i>Concentração mitocondrial de Glutathione Reduzida (GSH) e Glutathione Oxidada (GSSG)</i>	27
3.13 <i>Produção de Espécies Reativas de Oxigênio</i>	28
3.14 <i>Análise estatística</i>	29
4. RESULTADOS	30

4.1 <i>Respiração Mitocondrial</i>	30
4.2 <i>Potencial de membrana</i>	33
4.3 <i>Interação com membrana mitocondrial interna</i>	36
4.4 <i>Intumescimento osmótico mitocondrial</i>	38
4.5 <i>Movimentação e liberação de Ca⁺²</i>	42
4.6 <i>Concentração mitocondrial de ATP</i>	45
4.7 <i>Produção de espécies reativas de oxigênio</i>	47
4.8 <i>Lipoperoxidação de membrana</i>	50
4.9 <i>Avaliação do estado redox dos nucleotídeos de piridina</i>	51
4.10 <i>Concentrações mitocondriais de glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG)</i>	54
5. DISCUSSÃO	55
6. CONCLUSÃO	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

1. INTRODUÇÃO

1.1 Herbicidas

Contaminantes emergentes são substâncias naturais ou sintéticas, utilizadas no dia-a-dia, e que, na sua grande maioria, não apresentam dados toxicológicos que permitam prever os seus efeitos tanto à saúde humana quanto aos ecossistemas. O termo pode ser relacionado a compostos recentemente introduzidos no meio ambiente, como medicamentos aprovados recentemente, ou a substâncias que se encontram presentes no ambiente já há algum tempo, porém, sua presença só foi detectada ultimamente. Ainda, pode se referir a um contaminante convencional já legislado, mas que devido a novos dados referentes à sua ocorrência, destino ou efeitos adversos, tornou-se novamente foco de atenção (GAFFNEY *et al.*; 2014).

Produtos farmacêuticos e de higiene pessoal, hormônios, derivados do colesterol, retardantes de chama, praguicidas e produtos de transformação resultantes dos mesmos são considerados contaminantes emergentes. Em águas naturais, estes compostos surgem, principalmente, a partir do descarte de efluentes industriais e/ou domésticos e, mesmo sob concentrações baixas (ng L^{-1} a pg L^{-1}), podem provocar efeitos nocivos em organismos vivos (SODRÉ; LOCATELLI; JARDIM; 2010).

Dentre estes cotaminantes emergentes, os praguicidas compreendem um grupo de agroquímicos utilizados com o objetivo de inibir o aparecimento e crescimento de organismos danosos às plantações. Sendo o solo o destino final dos praguicidas aplicados tanto nas partes aéreas das plantas como diretamente no próprio solo, a sorção, ou seja, a distribuição do soluto aplicado

entre o solo e a água, irá determinar a influência e eficácia dos praguicidas, bem como a disponibilidade de escoamento, lixiviação, degradação e possível absorção por organismos não-alvo (SUDDABY *et al.*, 2013).

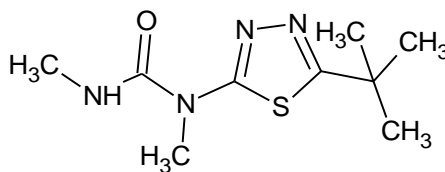
A maior parte do uso mundial de praguicidas, aproximadamente 80%, está ligada à prática da agricultura e a fração restante, por volta de 20%, é voltada para o controle de pestes à saúde pública (MUTURI *et al.*; 2017). Segundo a Abrasco, Associação Brasileira de Saúde Coletiva, 70% dos alimentos *in natura* consumidos no Brasil estão contaminados com resíduos de praguicidas. O uso indiscriminado dessas substâncias mantém o país na liderança do consumo mundial de praguicidas desde 2008 (CCST, 2015). O uso no país se dá principalmente para o cultivo de soja, milho, citros e cana-de-açúcar. A quantidade elevada de praguicidas utilizados na soja (32,6 %) e cana-de-açúcar (7,6%) são devidos, principalmente, à grande extensão que essas culturas ocupam no país (SPADOTTO; GOMES, 2016).

Um praguicida é uma substância química, física ou biológica, capaz de destruir, repelir ou mitigar qualquer praga macro ou micro-organismo, animal ou vegetal (JOHNSTON, 2001). Os herbicidas são agroquímicos utilizados, em especial, para o controle de ervas daninhas, as quais podem competir com os vegetais por luz, água e nutrientes, além de hospedar pragas e doenças à cultura (PITELLI; DURIGAN, 1985), interferindo no rendimento e qualidade da colheita. Os herbicidas apresentam vários estágios de aplicação, podendo ser utilizados antes da plantação da semente (herbicidas pré-plantio), imediatamente após a semeadura e antes do aparecimento de ervas daninhas (pré-emergente) ou após o surgimento de pragas e antes que essas interfiram no desenvolvimento da cultura (pós-emergente) (EMBRAPA, 2006).

A classificação e identificação de um herbicida pode ser feita a partir da sua estrutura química básica e do seu mecanismo de ação nas plantas. Considera-se como mecanismo de ação o primeiro ponto do metabolismo das plantas onde o herbicida atua (FRANCO-BERNARDES, 2016).

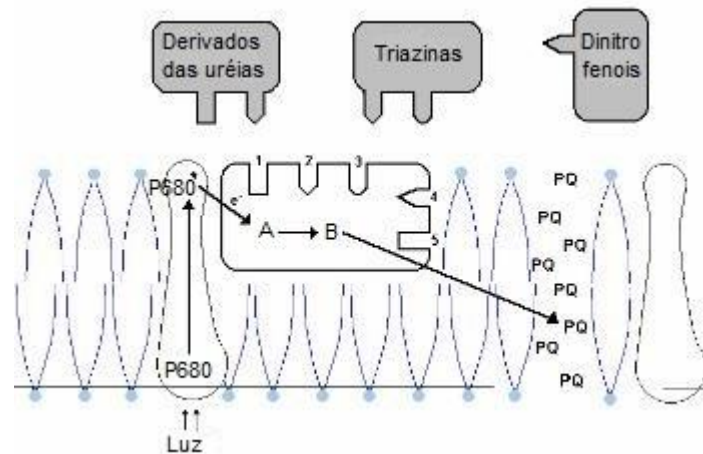
O tebutiurô (Figura 1) é um herbicida pré-emergente, pertencente à classe das uréias substituídas, e amplamente utilizado no cultivo de cana-de-açúcar, para o controle das principais espécies de plantas daninhas infestantes da cultura (NEGRISOLI *et al.*, 2005).

Figura 1. Estrutura molecular do tebutiurô



Os herbicidas inibidores do fotossistema II das plantas, como o tebutiurô, ligam-se ao sítio de ligação da proteína D1 presente nos cloroplastos, e bloqueiam o transporte de elétrons da quinona A para a quinona B (Figura 2), gerando moléculas de clorofila mais carregadas energeticamente, e interrompendo a fixação de CO₂ e a produção de ATP e NADPH pela planta. Esse estado facilita a formação de radicais livres, levando à oxidação de membranas e morte das plantas daninhas (FUERST; NORMAN, 1991; GRONWALD, 1994; VIDAL, 1997; BREITENBACH; ZHU; SANDMAN, 2001).

Figura2. Mecanismo de ação do herbicida tebutiurum, pertencente à classe dos derivados das uréias.



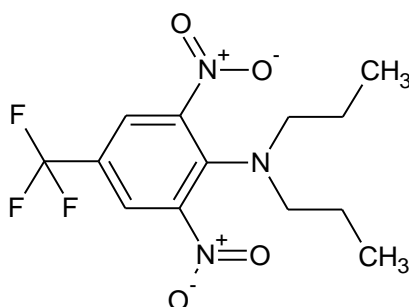
Fonte: Adaptado de Gressel, 1985.

Um estudo realizado no Instituto de Ciência Marinha da Austrália revelou que vários herbicidas inibidores do fotossistema II, incluindo o tebutiurum, foram encontrados em concentrações elevadas na água e se mostraram capazes de inibir o processo fotossintético de plantas marinhas. Apesar do efeito de rápida duração, associado a outros processos estressores, a ação desses herbicidas pode provocar impacto ambiental legítimo (FLORES *et al.*; 2013).

Além dos efeitos em organismos não-alvo, o tebutiurum apresenta meia-vida longa de cerca de um ano em solos ricos em carbono ou com baixos índices de chuva (CHANG; STRIKZE, 1977; FRANCO-BERNARDES, 2016) e possui elevada solubilidade em água, podendo contaminar lençóis de água subterrâneos, provocando grande impacto ambiental (MEYER; BOVERY, 1988; SOUZA *et al.*, 2001).

A trifluralina (Figura 3), herbicida pertencente à classe das dinitroanilinas, é comumente utilizada no tratamento pré-emergente de vários cultivos, como algodão, tomate e soja (GONG *et al.*, 2016). Seu mecanismo de ação está relacionado com a inibição da divisão celular através da formação de um complexo com as subunidades de tubulina livres presentes na célula vegetal, que impede a polimerização dos microtúbulos. Conseqüentemente, não há formação das fibras de fuso, uma das estruturas responsáveis por uma divisão celular bem-sucedida, comprometendo o desenvolvimento e crescimento da planta (CALLAHAN, 1996; ANTHONY; HUSSEY, 1999).

Figura 3. Estrutura molecular da Trifluralina



Apesar de ser um herbicida que apresenta baixa solubilidade em água, a trifluralina se liga fortemente a componentes do solo, por isso apresenta baixo potencial de contaminação de águas subterrâneas. É facilmente degradada sob luz solar em todos os meios, com meia-vida podendo variar de minutos a vários meses, dependendo do substrato (GROVER *et al.*, 1997).

Sabe-se que a trifluralina inibe a polimerização de microtúbulos em plantas e protozoários, porém não apresenta o mesmo efeito em vertebrados e fungos (LYONS-ABBOTT *et al.*; 2010). Entretanto, uma revisão

correlacionando a incidência de câncer e a exposição de agricultores a certos praguicidas, dentre eles a trifluralina, revelou que esta é capaz de aumentar a incidência de câncer de cólon nos agricultores em relação a indivíduos não expostos (WEICHENTHAL *et al.*; 2010). Além disso, a trifluralina foi considerada como um dos praguicidas de maior risco de efeitos crônicos para a saúde, apresentando efeito carcinogênico e desregulação endócrina (SUGENG *et al.*; 2013). Contudo, a IARC (International Agency for Research on Cancer) classifica a trifluralina como categoria 3, ou seja, não classificável quanto à sua carcinogenicidade para os seres humanos, indicando falta de evidências suficientes do poder carcinogênico deste herbicida para os humanos (IARC). Experimentos realizados em células HepG2 demonstraram ainda capacidade citotóxica desse herbicida, através da indução do bloqueio do ciclo celular na fase S, e morte celular por apoptose e necrose, entretanto, o mesmo herbicida não apresentou mutagenicidade tanto para células HepG2 quanto para diferentes linhagens de *Salmonella typhimurium* (FRANCO-BERNARDES, 2016).

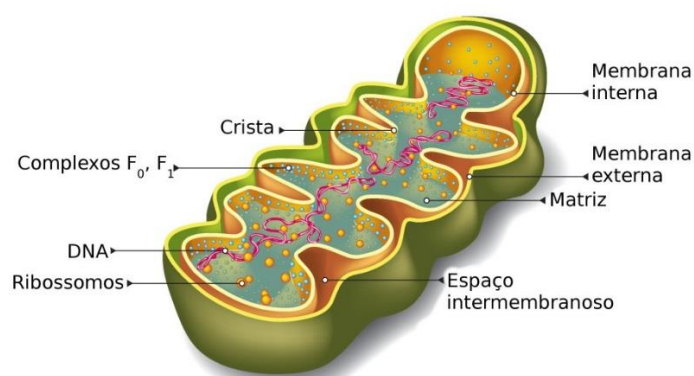
Estima-se que apenas uma parcela do total de herbicida aplicado atinja os sítios de ação, sendo a maior parte perdida via pulverizações, deposições fora do alvo, escoamento, fotodegradação, dentre outros. Isto não só aumenta o custo das produções das culturas, como também causa grave poluição e toxicidade para organismos não-alvos (WANG; LIU, 2007; FRANCO-BERNARDES, 2016). Assim, o estudo desses compostos é de extrema importância a fim de compreender, prevenir e tratar os efeitos provocados pelos mecanismos de toxicidade em organismos não-alvos.

1.2 Mitocôndria

As mitocôndrias são organelas presentes na maioria das células eucarióticas e também em alguns micro-organismos como algas, fungos e protozoários. Elas se localizam no citoplasma celular e apresentam tamanho, formato e estrutura variáveis, dependendo do tecido no qual se encontram, podendo medir de 1 - 5 μm de comprimento a 0,3 – 1 μm de largura (TYLER, 1995). São responsáveis principalmente por prover energia à célula, além de estarem envolvidas na biossíntese de pirimidinas e do grupo heme da hemoglobina, bem como no metabolismo de ácidos graxos e aminoácidos (NASSEH *et al.*, 2001).

Estruturalmente, as mitocôndrias são envoltas por duas membranas, uma interna e rica em proteínas, e outra externa semipermeável, além de um espaço aquoso denominado matriz mitocondrial, e inúmeras invaginações conhecidas como cristas mitocondriais (Figura 4) (STRYER, 1996).

Figura 4. Esquematização da estrutura mitocondrial



Fonte: ALEIXO, M. S. *Infoescola*. Adaptado de NoPainNoGain/ Shutterstock.com

A membrana externa é permeável à maior parte de íons e moléculas pequenas (PM < 1500 Da) e contém proteínas associadas que promovem a comunicação entre as mitocôndrias e a rede metabólica (LESNEFSKY *et al*, 2001). A membrana interna, por outro lado, é impermeável a quase todos os íons e moléculas polares e contém elevada quantidade de proteínas (cerca de 75%) (NICHOLLS; FERGUSON, 1982), dentre elas, proteínas que permitem o transporte de metabólitos específicos. Possui ainda o sistema transportador de elétrons e delimita o espaço da matriz mitocondrial, onde encontram-se inúmeras enzimas e cópias do genoma mitocondrial (FREY; MANNELLA, 2000).

Estima-se que 90 % do ATP necessário para o funcionamento celular seja fornecido pelas mitocôndrias (TYLER, 1992). O processo de produção de energia, também chamado de fosforilação oxidativa, depende do funcionamento de um complexo de proteínas localizadas nas cristas mitocondriais da membrana interna da organela. Esse complexo proteico, conhecido como cadeia transportadora de elétrons, é composto por quatro enzimas, mais a ubiquinona e o citocromo *c*, orientados de forma específica na membrana interna, a fim de favorecer o transporte de elétrons até o seu aceptor final, o oxigênio. A passagem de elétrons entre esses complexos libera energia, a qual é armazenada na forma de um gradiente de prótons entre as membranas, que será utilizado para a formação de ATP a partir do ADP (SARASTE, 1999).

Assim, para que o processo de síntese de ATP ocorra, a fosforilação oxidativa tem início com a oxidação do NADH ou do FADH₂, provenientes de outras vias metabólicas, pelo complexo I (NADH desidrogenase) e II (succinato

desidrogenase) respectivamente. Os elétrons oriundos dessa oxidação são transportados para os complexos III (ubiquinona-citocromo *c* oxidorreductase) e IV (citocromo oxidase), via ubiquinona e citocromo *c*, a fim de reduzir o aceptor final, oxigênio, em água. Os complexos I, III e IV são proteínas transmembranas e, por isso, funcionam como bombas de prótons, ou seja, impulsionam os prótons para o espaço intermembranar, criando uma diferença de potencial eletroquímico, a qual é utilizada pela ATP sintase na formação de ATP a partir de ADP e Pi (FERREIRA; AGUIAR; VILARINHO, 2008; LIU; FISKUM; SCHUBERT, 2002).

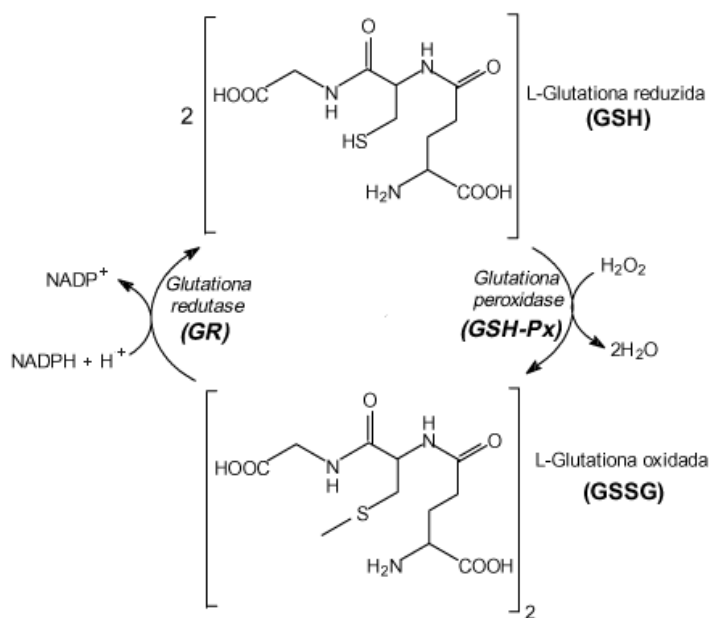
Quando a membrana mitocondrial torna-se permeável a H⁺, como pela ação de desacopladores, ocorre dissipação do gradiente eletroquímico aumentando a velocidade de respiração basal. Além disso, inibidores da cadeia respiratória, como é o caso da rotenona (complexo I) e antimicina A (complexo III), inibem a respiração acoplada à síntese de ATP. Em ambas as situações ocorre comprometimento na capacidade mitocondrial de sintetizar ATP, que consiste na principal ação tóxica dessas substâncias (MITCHELL, 1961, NICHOLLS; CROMPTON, 1980).

A mitocôndria é considerada uma das maiores fontes de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) dentro da célula, uma vez que os elétrons que passam pela cadeia transportadora de elétrons podem, eventualmente, escapar e reagir com o oxigênio molecular formando compostos reativos como o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio (LOSCHEN; AZZI; FLOHE, 1974; BOVERIS; CADENAS, 1975; LIU; FISKUM; SCHUBERT, 2002).

A produção de EROs faz parte de uma rede de comunicação entre a mitocôndria e o núcleo para manter a homeostasia celular. Embora um certo nível de EROs seja benéfico para a célula, o excesso pode provocar efeitos prejudiciais (BISCHOF, J. *et al.*; 2017). Acredita-se que a produção em excesso pela mitocôndria está associada a processos de envelhecimento e patogêneses de doenças neurodegenerativas, como o Parkinson (SHIGENAGA; HAGEN; AMES, 1994; WALLACE, 1999; BETARBET *et al.*, 2000; LIU; FISKUM; SCHUBERT, 2002).

Os radicais livres formados nas células são neutralizados por um elaborado sistema de defesa antioxidante constituído por enzimas como a catalase, a superóxido dismutase, a glutatona peroxidase, e outros antioxidantes não-enzimáticos incluindo as vitaminas A, E e C, e flavonoides (URSO; CLARKSON, 2003). O ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) formado em condições normais é neutralizado pela ação da superóxido dismutase (SOD) dando origem ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2), um composto menos reativo, mais estável e difusível que o $O_2^{\cdot-}$. Durante o processo de redução do H_2O_2 em água pela glutatona peroxidase, há o consumo de glutatona reduzida, que por sua vez, é regenerada pela glutatona redutase utilizando NADPH (Figura 5). (KOWALTOWSKI; VERCESI, 1999; GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2000; MARTINS, 2007).

Figura 5: Esquemática do ciclo da glutatona



Fonte: Adaptado de JÚNIOR; HÖEHR; VELLASCO.

Quando ocorre aumento na geração de superóxido ou deficiência nas defesas antioxidantes, condição conhecida como estresse oxidativo, o H₂O₂ se acumula na mitocôndria, e na presença de Fe²⁺ produz o radical hidroxil via reação de Fenton-Haber-Weiss. Este radical é capaz de induzir citotoxicidade por meio de danos oxidativos em macromoléculas celulares, como proteínas e DNA, e provocar peroxidação dos lipídios de membrana. Além da sua rápida capacidade de oxidar componentes celulares, o efeito oxidativo do radical hidroxil se torna ainda mais alarmante por não existir nenhum sistema antioxidante enzimático capaz de reduzi-lo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; URSO; CLARKSON, 2003).

Emparelhado com a oxidação do DNA, proteínas e lipídeos, o estresse oxidativo pode induzir a abertura do poro de transição de permeabilidade (PTP), um processo que está correlacionado com os mecanismos de morte

celular (LEMASTERS, 1999). A Transição de Permeabilidade Mitocondrial (TPM) é um fenômeno mediado pela abertura de poros de natureza proteica na membrana da mitocôndria, como consequência do contato da organela com altas concentrações de Ca^{2+} e/ou estresse oxidativo (PEREIRA, 2012). Esse fenômeno, o qual pode ser inibido por Ciclosporina A (CsA), leva à difusão de solutos de até 1500 Da, dissipação do potencial de membrana mitocondrial e depleção dos níveis de ATP (RASOLA; BERNARDI, 2007), além de provocar inchamento mitocondrial, causando o rompimento da membrana externa e consequente liberação de proteínas, como a citocromo c, a qual está envolvida no processo de apoptose (HALESTRAP, 2005).

O poro de transição de permeabilidade, apesar da existência de diversos modelos propostos, é classicamente descrito como sendo composto por três proteínas principais: o canal de ânion dependente de voltagem (VDAC) presente na membrana exterior; o translocador de nucleotídeo de adenina (ANT) localizado na membrana interna; e a Ciclofilina D (Cyp D) encontrada na matriz mitocondrial (TSUJIMOTO; SHIMIZU, 2007). Quando agentes externos agem sobre a mitocôndria, a CypD se associa ao ANT causando a abertura do poro. O VDAC, localizado na membrana externa, junto com o ANT formam um canal de interligação das duas membranas mitocondriais, conectando a matriz mitocondrial com o citosol celular (RAO; CARLSON; YAN, 2013).

Uma outra estrutura, denominada carreador de fosfato inorgânico (PiC), localizada na membrana interna, foi também descrita como um potencial constituinte do PTP. O PiC pode formar o poro por si só ou também em associação com o ANT (RAO; CARLSON; YAN, 2013, LEUNG; VARANYUWATANA; HALESTRAP, 2008). Um estudo conduzido por Leung *et*

al propôs que o fosfato inorgânico (Pi) se liga ao PiC induzindo a formação do poro, explicando a habilidade do Pi em ativar a abertura do PTP (LEUNG, VARANYUWATANA; HALESTRAP, 2008; VARANYUWATANA; HALESTRAP, 2012).

Ainda, um trabalho publicado em 2013, investigou a formação do PTP a partir dos dímeros de ATP sintase. Tal complexo, formado pela porção catalítica F1 e pelo translocador de próton F0, possui uma região lateral com afinidade pela Cyp D. Em condições estressoras, a proteína Cyp D é capaz de se ligar à ATP sintase, impedindo a rotação das subunidades F1 e F0, necessária à produção de ATP, e levando à abertura do PTP (GIORGIO *et al.*, 2013).

Independente da constituição do PTP, sabe-se que um fator crítico para a ocorrência de TPM é a oxidação de grupos tiólicos de proteínas da membrana mitocondrial interna, que levariam à formação de ligações cruzadas entre eles (COSTANTINI *et al.*, 1996; HALESTRAP; WOODFIELD; CONNERN, 1997; KOWALTOWSKI; CASTILHO; VERCESI, 2001). Além de espécies reativas de oxigênio, o aumento da concentração mitocondrial de Ca^{+2} e do fosfato inorgânico também podem induzir a abertura do poro (KWONG; MOLKENTIN, 2015). O Cálcio está envolvido em diversos mecanismos que levam a abertura do poro. Acredita-se que o aumento da concentração de cálcio na matriz mitocondrial favoreça a conformação das proteínas CypD, ANT e VDAC que levam a formação da abertura do poro. Entretanto, estudos demonstraram que a ablação genética em camundongos das proteínas ANT e VDAC ainda levam à formação do poro de transição de permeabilidade, porém a perda da Ciclofilina D resulta na diminuição da sensibilidade do poro por

ativação cálcica (WONG; STEENBERGEN; MURPHY, 2012), indicando a relevância da conexão entre Cyp D e cálcio para abertura do poro de transição de permeabilidade.

O processo de abertura do poro pode ser inibido na presença de determinados moduladores. A Ciclosporina A (CsA), por exemplo, é capaz de inibir a formação do PTP por se ligar à Cyp D, uma das proteínas envolvidas no processo de abertura, assim, a CsA é muito empregada para avaliar se o processo de inchamento mitocondrial ocorre devido à abertura do poro mediada pela Cyp D (BROEKEMEIER; PFEIFFER, 1995; TSUJIMOTO; SHIMIZU, 2006). O Vermelho de Rutênio (RR), por sua vez, é utilizado para verificar se a abertura do poro está sendo dependente de cálcio, já que o RR inibe o canal uniporter desse íon, impedindo a saída de Ca^{2+} do meio intramitocondrial, quando utilizado na concentração de 5 $\mu\text{mol/L}$, e a entrada do mesmo para a matriz, quando na concentração de 0,5 $\mu\text{mol/L}$ (KOWALTOWSKI; CASTILHO, 1997). O ADP possui alta afinidade de associação com o ANT e atua diminuindo a sensibilidade do canal em liberar Ca^{2+} (HALESTRAP; WOODFIELD; CONNERN, 1997; LEUNG; VARANYUWATANA; HALESTRAP, 2008). A oxidação de grupos tióis de cisteína do ANT, em situações de estresse oxidativo, diminui a afinidade do ADP à esta proteína e aumenta a da ligação com a Cyp D, favorecendo a abertura do poro. Em baixas concentrações, a N-etilmaleimida (NEM) previne a oxidação dos grupos tióis e inibe a ativação do PTP (ZORATTI; SZABO, 1995; MCSTAY; CLARKE; HALESTRAP, 2002).

Um outro papel importante da organela dentro da célula, em particular a TPM, é o seu envolvimento na morte celular. Em meados dos anos 80, estudos

sugeriram que a inibição do PTP com Ciclosporina A poderia reduzir a disfunção e a morte celular seguida da isquemia-reperfusão cardíaca. De fato, inúmeros estudos seguintes confirmaram o efeito cardioprotetor da inibição da formação do PTP em humanos (WONG; STEENBERGEN; MURPHY, 2012). Durante a apoptose, a mitocôndria libera proteínas pró-apoptóticas do espaço intermembranar, como o citocromo c, ativando a via interna (mitocondrial) do processo. Por outro lado, um dano severo na mitocôndria que leve à depleção de ATP induz a morte da célula por necrose (LOGAN; MURPHY, 2017). O processo de apoptose, ao contrário da necrose, requer a presença de ATP. Assim, a instalação da TPM será crucial para determinar o processo de morte celular. Nos casos onde a TPM acontece de forma ríspida, provocando falta de ATP, o processo ocorrerá por necrose; porém se os níveis de ATP se mantiverem devido à instalação gradativa da TPM ou pela existência de outras fontes de ATP, a sinalização da via apoptótica é iniciada (LEMASTERS, 1999; PAROLIN, M. B.; REASON, I. J. M.; 2001).

Baseado no que foi citado anteriormente, a mitocôndria é o centro da vida e da morte da célula. Seu papel na manutenção do funcionamento celular é indiscutível. Alterações bioquímicas, energéticas ou oxidativas nessa organela afetam drasticamente os processos celulares. Assim, entender como xenobióticos afetam a capacidade da mitocôndria de exercer seu papel pode contribuir para compreender os efeitos tóxicos e o seu mecanismo de ação dentro do organismo.

2. OBJETIVO

O presente estudo visou analisar os mecanismos de toxicidade dos herbicidas trifluralina e tebutiuram, utilizando mitocôndrias isoladas de fígado de ratos como modelo biológico, a fim de estimar os danos provocados pelos mesmos quando em contato com o organismo humano.

2.1 Objetivos específicos

- Verificar os efeitos dos herbicidas trifluralina e tebutiuram na bioenergética de mitocôndrias isoladas de fígado de ratos;
- Investigar os efeitos dos herbicidas trifluralina e tebutiuram sobre o estado oxidativo de mitocôndrias isoladas de fígado de ratos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Para o estudo, foram utilizadas soluções padrão dos herbicidas trifluralina e tebutiuram (Sigma-Aldrich, USA) nas concentrações de 1, 5, 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{mol/L}$. Para isso, foram preparadas soluções estoque de 0,2; 1; 2; 4; 10 e 20 mmol/L dos herbicidas em DMSO com o objetivo de padronizar o volume adicionado das substâncias às mitocôndrias para obtenção da concentração final de herbicida desejada. A concentração máxima de DMSO utilizada foi 0,5%. Os compostos foram analisados em mitocôndrias isoladas de células hepáticas de ratos.

Para a obtenção das mitocôndrias, foram utilizados ratos machos da raça Wistar, pesando aproximadamente 150 g. Os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto em salas com temperatura de 19 a 23°C e sendo servidos de ração e água “ad libitum”. O controle de iluminação do local de alojamento foi feito de forma automática com timer, assim os animais foram mantidos sob 12 horas no claro e 12 horas no escuro. O tempo mínimo de permanência no biotério foi de 48 horas, para ambientação dos mesmos. Todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do *campus* da USP-RP em 31/08/2015 sob o Protocolo nº 15.1.690.59.3.

3.1 *Decapitação sem anestesia*

Para o isolamento das mitocôndrias, os ratos foram sacrificados por decapitação e posteriormente tiveram o fígado retirado. Vários estudos

sugerem que o uso de anestésicos em roedores pode afetar tanto a estrutura quanto a função mitocondrial, se administrados previamente à decapitação ou mesmo após o isolamento (STARKOV, 2008).

Há muito são estudados os efeitos de drogas anestésicas em mitocôndrias *in vivo* e *in vitro*. Alguns experimentos iniciais revelaram que certos anestésicos, como os barbitúricos, são capazes de bloquear a transferência de elétrons do NADH para a flavoproteína (COHEN, 1973), impedindo assim que os processos bioquímicos para produção de ATP sejam completados. Inúmeros pesquisadores relataram também que a anestesia é capaz de inibir a captação de oxigênio pela organela (COHEN, 1973), um dos passos essenciais para o encadeamento da respiração mitocondrial.

Além desses efeitos, estudos revelam que a anestesia local é capaz de desacoplar a fosforilação oxidativa, inibir a F₁ ATPase e o transporte adenina-nucleotídeo em mitocôndrias isoladas e em culturas celulares (GROUSELLE *et al.*, 1990). Podem ainda interferir no transporte de Ca⁺² e de metabólitos através da membrana interna (RAFALOWSKA, 1979; BRANCA *et al.*, 1988). A nível estrutural, os anestésicos alteram a composição lipídica da membrana interna (DEKUTOVICH; KARGAPOLOV, 1986), a estrutura física e interações proteína-lipídeo da mitocôndria (LENAZ *et al.*, 1978; MAZZANTI *et al.*, 1979).

Assim, uma vez que a anestesia poderia interferir nos resultados finais dos experimentos, por afetar o funcionamento da cadeia respiratória, a translocação de Ca⁺² e a integridade da membrana interna, os ratos foram sacrificados por decapitação por este ser um método de eutanásia rápido e indolor, que permite a recuperação dos tecidos e fluidos corporais não contaminados quimicamente, e por não interferir nos processos bioquímicos da

mitocôndria (CFMV, 2002). Após o procedimento, foi realizado um corte sagital para remoção do fígado. O animal foi descartado em saco de lixo contaminante (saco branco), armazenado em freezer a -18°C e descartado posteriormente sob os cuidados do próprio biotério.

3.2 Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato e dosagem de proteína

Após a decapitação e extração do fígado, o mesmo foi rapidamente colocado em um béquer contendo 25 mL do meio de homogeneização (sacarose 250 mmol/L, EGTA 1mmol/L e HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,2). Todo material utilizado durante a extração do fígado e isolamento das mitocôndrias foi mantido a temperaturas baixas, 4°C , e previamente lavado com os meios a serem utilizados. O fígado, então, foi picotado e lavado três vezes com o meio de homogeneização para limpar o tecido de sangue e substâncias que pudessem interferir no experimento.

Em seguida, o órgão picotado foi homogeneizado três vezes por 15 segundos, com intervalos de 1 minuto, em homogeneizador Potter-Elvehjen. A suspensão foi centrifugada à 770 g por 5 minutos à temperatura de 4°C . O sobrenadante, livre de gordura e sangue, foi centrifugado novamente à 9.800 g por 10 minutos. O sedimento foi ressuspenso em 20 mL do meio de lavagem (sacarose 250 mmol/L, EGTA 0,3 mmol/L e HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,2) e centrifugado uma última vez à 4.500 g por 15 minutos. O sedimento mitocondrial final foi suspenso novamente em 1 mL do meio específico contendo sacarose 250 mmol/L e HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,2 e utilizado num período de 4 horas (PEDERSEN *et al.*, 1978).

3.3 Dosagem de proteínas

A quantificação de proteína mitocondrial foi realizada utilizando o método do Biureto (CAIN; SKILLETER, 1987), no qual adicionou-se 10 μL do sedimento mitocondrial em uma mistura contendo 100 μL de ácido deoxicólico 5% (m/v) e água q.s.p 1,5 mL. 1500 μL da solução de biureto foi adicionada, por fim, e a solução foi submetida à leitura em espectrofotômetro (DU-70, Beckman – U.S.A.) no λ 540 nm. A dosagem proteica foi determinada a partir de uma curva de calibração utilizando BSA como padrão.

3.4 Respiração mitocondrial

O consumo de oxigênio realizado pela mitocôndria foi analisado utilizando um oxígrafo equipado com um eletrodo do tipo Clark (Hansatech instruments, Oxytherm electrode unit, UK) (CHANCE; WILLIANS, 1956).

O eletrodo de oxigênio, designado por Clark inicialmente para medir oxigênio em amostras de sangue, é constituído por uma célula polarográfica, composta por um ânodo de prata e um cátodo de platina, imersos em uma solução saturada de KCl, e coberta por uma membrana de Teflon, permeável ao oxigênio. Com a aplicação de uma tensão de polarização de 700 mV, o eletrólito KCl é ionizado, desencadeando uma série de reações eletroquímicas que culminam com a redução do oxigênio no cátodo de platina em íons OH^- . A corrente elétrica gerada pela polarização do fluxo de elétrons é proporcional a concentração de oxigênio (BRACHT; IWAMOTO 2003).

Para tanto, 1 mg de proteína mitocondrial foi incubada em 1 mL do meio de reação, constituído de Sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L, Hepes-KOH 10 mmol/L, K₂HPO₄ 10 mmol/L e EGTA 0,5 mmol/L e Succinato 5 mmol/L (utilizando rotenona 2 µmol/L para inibição do complexo I) como substrato oxidável de complexo II. A respiração de estado 3 foi iniciada com 400 nmols de ADP (CAIN; SKILLETER, 1987). As velocidades de consumo de oxigênio foram expressas em nmol/átomo de oxigênio consumidos por ml da suspensão de proteína mitocondrial por minuto (nmol/ml/min), na ausência (Controle negativo) e presença dos herbicidas, utilizando 5µL de CCCP 1µmol/L como controle positivo no final de cada corrida.

A análise do consumo de oxigênio foi realizada à temperatura e agitação constantes, sem trocas de oxigênio entre o meio externo e a câmara do oxígrafo (SEVERINGHAUS; FREEMAN BRADLEY; 1958).

3.5 Intumescimento Osmótico Mitocondrial

O inchamento da mitocôndria avalia o intumescimento osmótico da organela, ou seja, a diminuição da turbidez da suspensão provocada pela alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial interna. A penetração de água ou solutos acompanhados de água promove o distanciamento de elementos estruturais. Dessa forma, a membrana interna perde sua estrutura em forma de invaginações e se torna estendida. Como consequência dessa alteração, a organela inchada aumenta de tamanho e diminui a dispersão da luz, fenômeno que pode ser observado por meio da diminuição da absorvância

em um comprimento de onda específico. (BLONDIN; GREEN, 1967; ZORATTI; SZARO, 1995).

Para isso, 0,4 mg de proteína/mL da suspensão de mitocôndrias foi incubada em 3 mL do meio de reação (Sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L, HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,2), acrescido de rotenona 2,5 µmol/L, succinato 5 mmol/L, CaCl₂ 10 µmol/L, e 15 µL de cada concentração de cada herbicida. Como controle positivo foi utilizado 20 µL de fosfato inorgânico (Pi) 10mM. A variação da absorvância nas cubetas foi determinada por um espectrofotômetro (DU-70, Beckman – U.S.A.) em λ 540 nm.

3.6 Lipoperoxidação de membrana

Para realizar o teste de peroxidação lipídica, incubou-se 1 mg de proteína mitocondrial com 1 mL do meio de reação (Sacarose 125 mmol/L, KCl 130 mmol/L, HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,2), rotenona 2,5 µmol/L, succinato de potássio 5 mmol/L, e 10 µL dos herbicidas por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA), 40 mL de hidróxido de sódio e 500 µL de ácido fosfórico 20 %. A reação foi incubada em banho-maria à 85°C por mais 20 minutos. Após o resfriamento em gelo, adicionou-se 2 mL de n-butanol P.A., centrifugou-se à 380 g por 2 minutos e verificou-se a absorvância do sobrenadante em espectrofotômetro (DU-70, Beckman – U.S.A.) em λ 535 nm.

O experimento de lipoperoxidação visava verificar a capacidade dos herbicidas em gerar espécies reativas de oxigênio, as quais são capazes de abstrair um átomo de hidrogênio dos lipídeos presentes nas membranas,

iniciando o processo de peroxidação. Através de hidrólise ou aquecimento, esse processo gera produtos de degradação de baixo peso molecular, como o malondialdeído (MDA). Sob aquecimento e em meio ácido, o MDA reage com o TBA originando um complexo de coloração rosa, o qual pode ser extraído por um solvente orgânico e lido em espectrofotômetro a 535 nm (PLAA; WITSCHI, 1976).

Os lipídeos são componentes essenciais das membranas celulares que mantêm a estrutura e o controle funcional das células. O ataque aos lipídeos de membranas por espécies reativas de oxigênio, processo conhecido como peroxidação lipídica, está associado com vários estados patológicos (ESTERBAUER; 1993).

3.7 Potencial de Membrana

O potencial de membrana mitocondrial foi determinado incubando-se 1 mg/ mL de proteína mitocondrial em meio de reação (Sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L, Hepes-KOH 10 mmol/L, pH 7,2), acrescido de rotenona 2,5 μ mol/L, safranina-O 10 mmol/L e energizadas com succinato 5 mmol/L. O potencial eletroquímico foi monitorado espectrofluorimetricamente (SHIMADZU, RF-5301PC) em λ 495 nm e 586 nm de excitação e emissão, respectivamente. No final do período de incubação, o potencial de membrana foi totalmente desfeito utilizando 5 μ l de CCCP 1 μ mol/L.

A safranina-O é uma substância catiônica fluorescente capaz de difundir-se para o interior da matriz mitocondrial em resposta à formação do gradiente eletroquímico (AKERMAN; WIKSTROM, 1976). O desacoplamento da

fosforilação oxidativa desfaz o gradiente e, dessa forma, ocorre o aumento na intensidade de fluorescência do corante à medida em que ele é liberado das mitocôndrias. O potencial de membrana é gerado por um gradiente eletroquímico via cadeia de transporte de elétrons, no qual há o acúmulo de prótons no espaço intermembranar. Uma diminuição desse potencial está associada a disfunções que podem levar à morte celular (SAKAMURU *et al.*, 2012).

3.8 Avaliação do Estado Redox dos Nucleotídeos de Piridina

Os nucleotídeos de piridina são compostos orgânicos que apresentam estados de oxidação e redução. O NAD(P)H é a forma reduzida desses compostos e quando excitados em comprimentos de onda de 366 nm emitem fluorescência a 450 nm. Assim, 1 mL da suspensão de proteína mitocondrial foi incubada em meio de reação (Sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L, HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,2), acrescido de rotenona 2,5 µmol/L e energizadas com succinato 5 mmol/L. Diferentes concentrações dos herbicidas foram adicionadas em cada experimento e o estado redox dos nucleotídeos de piridina foi monitorado por 10 minutos. Para o controle positivo foi utilizado t-butilhidroperóxido 300 µmol/L. Como os nucleotídeos são fluorescentes apenas na forma reduzida, alterações nos valores de fluorescência representam alterações de estado redox de NAD(P)H para NAD(P)⁺ (OLIVEIRA *et al.*, 2005). Essa diminuição da fluorescência decorrente da oxidação dos nucleotídeos de piridina pode estar associada a processos oxidativos provocados pelos herbicidas.

3.9 Interação com membrana mitocondrial interna

A interação dos herbicidas com a membrana mitocondrial interna foi determinada espectrofluorimetricamente utilizando Difenilhexatrieno (DPH) para monitorar interações com a região hidrofóbica e 1-anilino-8-naftaleno sulfonato (ANS) para monitorização da região hidrofílica da membrana. Assim, 2 mg/mL de proteína mitocondrial foram incubadas em meio de reação padrão (Sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L, HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,2) por 30' a 37°C com os marcadores DPH (concentração final 0,5 µmol/L) e ANS (concentração final 75 µmol/L). A interação foi determinada em espectrofluorímetro (SHIMADZU, RF-5301PC) nos comprimentos de onda 360 nm de excitação e 430 nm de emissão para DPH e 380 nm de excitação e 485 nm de emissão para ANS, com adição sequencial dos herbicidas (LEE *et al.*, 1999; SLAVIK, 1982; MAIOLI, *et al.*, 2012).

3.10 Movimentação e Liberação de Ca²⁺

A movimentação de Ca²⁺ foi monitorada utilizando o marcador fluorescente Calcium Green 5N, o qual se liga reversivelmente ao Ca²⁺ livre encontrado fora da mitocôndria (MADUNGWE *et al.*, 2016). Assim, a fluorescência determinada é proporcional à quantidade de cálcio liberado pela organela.

Para isso, incubou-se em meio de reação (Sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L, HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,2) 1 mg/mL de proteína mitocondrial, acrescido de rotenona 2 µmol/L, Ca²⁺ 10 µmol/L e Calcium Green 5N 150

nmol/L. As mitocôndrias foram energizadas com succinato de potássio 5 mmol/L e em seguida adicionou-se diferentes concentrações dos herbicidas. O efluxo de Ca^{+2} foi monitorado por 600 segundos em espectrofluorímetro (SHIMADZU, RF-5301PC) em λ 506 nm de excitação e 531 nm de emissão. O efluxo total de Ca^{+2} foi realizado utilizando CCCP 1 μ mol/L.

3.11 Concentração mitocondrial de ATP

Para determinar a concentração mitocondrial de ATP, foram incubados 1 mg de proteína mitocondrial/mL em meio de reação, acrescido de rotenona 2,5 μ mol/L, succinato 5 mmol/L, CaCl_2 10 μ mol/L e as diferentes concentrações dos herbicidas por 10 minutos à 30°C. A suspensão foi centrifugada a 9.000 g por 5 minutos, a 4°C e o sedimento contendo as mitocôndrias foi tratado com 1mL de HClO_4 1M. Após centrifugação a 14000 g por 5 minutos, a 4°C, alíquotas (100 μ L) do sobrenadante foram neutralizadas com 70 μ L de KOH 2 mol/L, acrescidas de Tris-HCl 100 mmol/L, pH 7,8 (volume final 1 mL) e novamente centrifugadas a 15000 g por 10 minutos à 4°C. Por fim, o sobrenadante foi separado e a luminescência determinada no luminômetro, utilizando-se o “kit” da Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, U.S.A.).

O ATP presente na amostra é consumido durante a oxidação da Luciferina, catalisada pela enzima luciferase com emissão de luz conforme reação:



Quando as concentrações de luciferina, luciferase e oxigênio são mantidos constantes e o ATP é o reagente limitante, a quantidade de luz emitida é proporcional ao ATP presente no meio (THORE, 1979).

3.12 Concentração mitocondrial de Glutathiona Reduzida (GSH) e Glutathiona Oxidada (GSSG)

As concentrações de glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) foram determinados espectrofluorimetricamente (SHIMADZU, RF-5301PC) em λ 350 nm para excitação e 420 nm para emissão, utilizando o-ftalaldeído (OPT) como sonda fluorescente. As mitocôndrias (1,0 mg de proteína/mL) foram incubadas em meio padrão de reação, contendo Sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L, HEPES-KOH 10 mmol/L, em pH 7,2, acrescido de rotenona 2,5 μ mol/L e succinato 5 mmol/L e diferentes concentrações dos herbicidas em estudo por 30 minutos a 30°C. A reação foi interrompida com adição de Ácido Perclórico (PCA) 1% e levada a centrifugação a 9000 g por 3 minutos. Alíquotas do sobrenadante (100 μ L) foram adicionadas a 1,75 mL de Tampão KH_2PO_4 0,1 mol/L contendo EGTA 5 mmol/L pH 8,0 e completou-se o volume adicionando 100 μ L de OPT (1mg/mL). A fluorescência para GSH foi determinada após 15 minutos de incubação ao abrigo da luz. Os níveis de GSSG, por sua vez, foram determinados pela adição de 250 μ L de N-etilmaleimida (NEM) 0,04M a alíquotas de 250 μ L de sobrenadante. Após 20 minutos de incubação a temperatura ambiente, adicionou-se 500 μ L de NaOH 10 mol/L e 100 μ L desta solução foi acrescido a 1,75 mL de NaOH 1 mol/L e 100 μ L de OPT (1mg/mL).

A fluorescência foi determinada após 15 minutos de incubação ao abrigo da luz (HISSIN; HILF, 1976).

Este método consiste na utilização de um agente fluorescente (OPT) que possui afinidade por GSH ou GSSG dependente do pH. O NEM é um potente inibidor da glutathiona redutase e, por isso, é utilizado para evitar a redução do GSSG em GSH (BROWNE, R. W.; ARMSTRONG, D., 1998).

3.13 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi verificada utilizando o diacetato de 2' 7'-diclorofluoresceína (H₂DCFDA), um composto que atravessa facilmente membranas biológicas e é enzimaticamente hidrolisado por esterases liberando o composto não fluorescente DCFH. Em presença de EROs, este é oxidado e transformado em DCF, o qual apresenta fluorescência quando excitado em 503 nm. Assim, o aumento da fluorescência é diretamente proporcional à produção de EROs pela mitocôndria (AMES, 1983; LEBEL, C. P.; ISCHIROPOLUS, H.; BONDY, S. C., 1992).

A geração de espécies reativas de oxigênio foi monitorada espectrofluorimetricamente (SHIMADZU, RF-5301PC) nos comprimentos de onda de excitação 503 nm e de emissão 529 nm. As mitocôndrias (1,0 mg de proteína/mL) foram incubadas em meio de reação contendo Sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L, HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,2, acrescido de rotenona 2,5 µmol/L e H₂DCFDA 2 µmol/L e energizadas pela adição de succinato de potássio 5 mmol/L. Foi realizado controle negativo (basal), positivo induzido por

t-butilhidroperóxido (t-BOOH) 300 µmol/L e tratamentos utilizando as diferentes concentrações do tebutiuram e da trifluralina.

3.14 Análise estatística

A significância estatística dos dados experimentais, quando pertinente, foi verificada pela análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Dunnett para a comparação de vários grupos tratados em relação aos seus controles, utilizando-se o programa GraphPad Prism, versão 5.01 (San Diego, CA, U.S.A.). Os resultados com valor de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS

4.1 *Respiração Mitocondrial*

Para avaliar o efeito dos herbicidas sobre o consumo de oxigênio foram utilizados como parâmetros a razão do controle respiratório (RCR) e o ADP/O. O RCR foi calculado através da relação entre o estado 3 e o estado 4 da respiração, enquanto o ADP/O foi determinado pela razão da concentração de ADP adicionado na câmara pelo consumo de oxigênio molecular durante o estado 3 (ESTABROOK, 1967, CHANCE; WILLIAMS, 1955). O estado 3 (V_3) representa a velocidade de consumo de oxigênio realizado pela mitocôndria após estímulo com ADP e o estado 4 (V_4) representa a taxa basal da respiração mitocondrial.

Como demonstrado nas tabelas 1 e 2, o RCR não foi significativamente alterado por ambos os herbicidas, contudo a razão ADP/O apresentou alteração significativa a partir da concentração de 50 $\mu\text{mol/L}$ quando em contato com a trifluralina. Analisando os gráficos da Figura 6, nota-se que o consumo de O_2 no estado 3 diminui conforme aumenta-se a concentração da trifluralina, indicando possível inibição da fosforilação oxidativa por parte desse herbicida. Conforme observado na Figura 7, o tebutiuram não diminuiu significativamente o consumo de O_2 no estado 3 em nenhuma concentração.

TABELA 1. Efeito da trifluralina e do tebutiurô sobre a razão de controle respiratório (RCR) utilizando succinato como substrato oxidável para o complexo II em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. Os valores são expressos como média +/- desvio padrão para três experimentos com diferentes preparações mitocondriais.

[] $\mu\text{mol/L}$	Trifluralina	Tebutiurô
Controle (0)	4,45 \pm 0,31	4,47 \pm 0,29
1	4,39 \pm 0,23	4,21 \pm 0,05
5	4,55 \pm 0,33	4,17 \pm 0,20
10	4,68 \pm 0,26	4,21 \pm 0,20
20	4,47 \pm 0,34	4,12 \pm 0,06
50	4,34 \pm 0,36	4,00 \pm 0,05
100	4,05 \pm 0,17	4,00 \pm 0,03

TABELA 2. Efeito da trifluralina e do tebutiurô sobre a razão ADP/O utilizando succinato para indução do complexo II em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. Os valores são expressos como média +/- desvio padrão para três experimentos com diferentes preparações mitocondriais. *Resultados estatisticamente significantes ($p < 0,05$) em relação ao controle.

[] $\mu\text{mol/L}$	Trifluralina	Tebutiurô
Controle (0)	1,54 \pm 0,11	1,34 \pm 0,22
1	1,65 \pm 0,19	1,97 \pm 0,69
5	1,69 \pm 0,32	1,99 \pm 0,56
10	1,79 \pm 0,04	2,08 \pm 0,61
20	1,89 \pm 0,18	2,22 \pm 0,74
50	2,12 \pm 0,13 *	2,33 \pm 0,71
100	2,25 \pm 0,49 *	2,38 \pm 0,80

Figura 6. Efeito da trifluralina sobre a respiração no estado 3 em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. A curva de respiração foi iniciada pela indução do complexo II com adição de succinato.

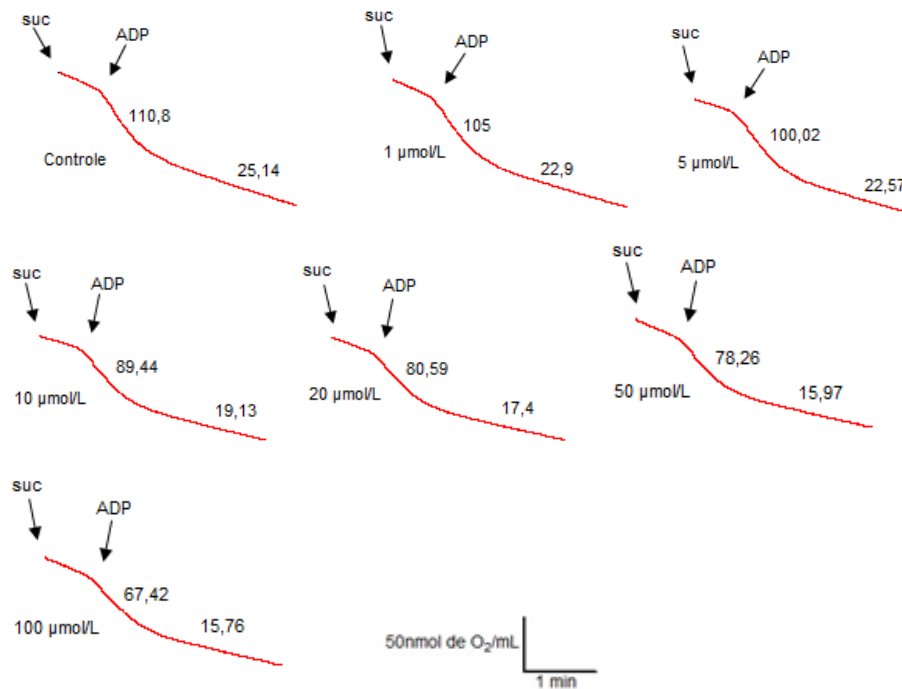
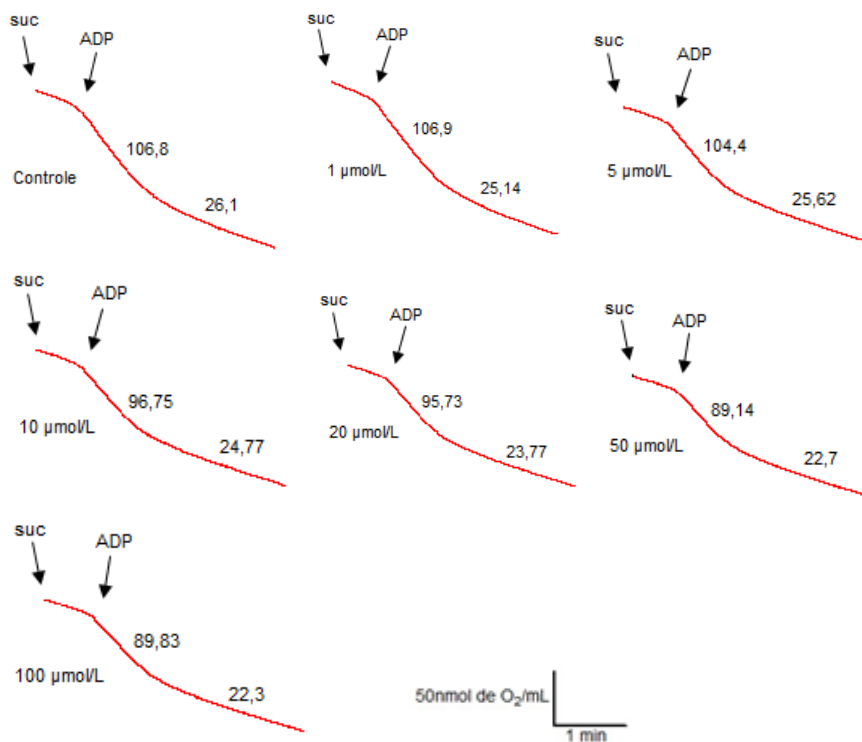


Figura 7. Efeito do tebutiuram sobre a respiração no estado 3 em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. A curva de respiração foi iniciada pela indução do complexo II com adição de succinato.

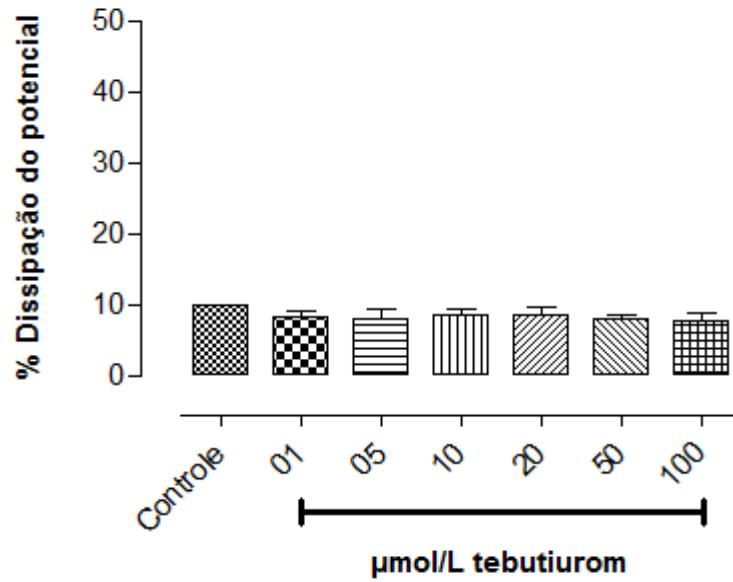


4.2 Potencial de membrana

A dissipação do potencial de membrana está intimamente relacionada com a integridade da membrana mitocondrial interna e com o funcionamento da cadeia respiratória (PETIT *et al.*, 1990). Os resultados obtidos mostram que o tebutiurom não afeta o potencial de membrana em qualquer das concentrações testadas (Figura 8). Já a trifluralina apresentou capacidade de dissipar o potencial de membrana mitocondrial de forma parcial porém significativa para a maior concentração (100 $\mu\text{mol/L}$), como pode ser observado na Figura 9.

Figura 8. A) Efeito concentração-resposta do tebutiurom sobre a dissipação do potencial de membrana mitocondrial em mitocôndrias isoladas de fígado de rato (1,0 mg de proteína/mL) incubadas como descrito em materiais e métodos. Os resultados representam a média \pm EPM de três determinações com diferentes preparações mitocondriais, relativo ao controle na ausência do composto. B) Traçado representativo do efeito do tebutiurom sobre o potencial de membrana mitocondrial. A dissipação total do potencial de membrana foi induzida por CCCP 1 μ mol/L.

A)



B)

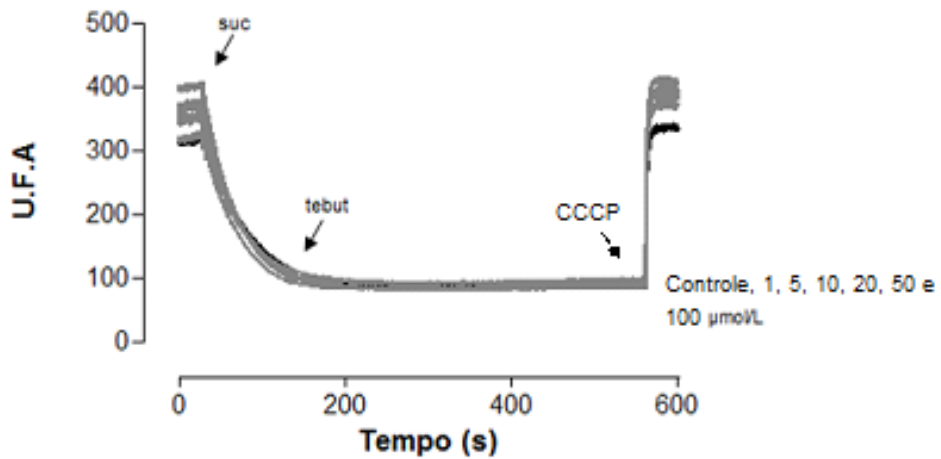
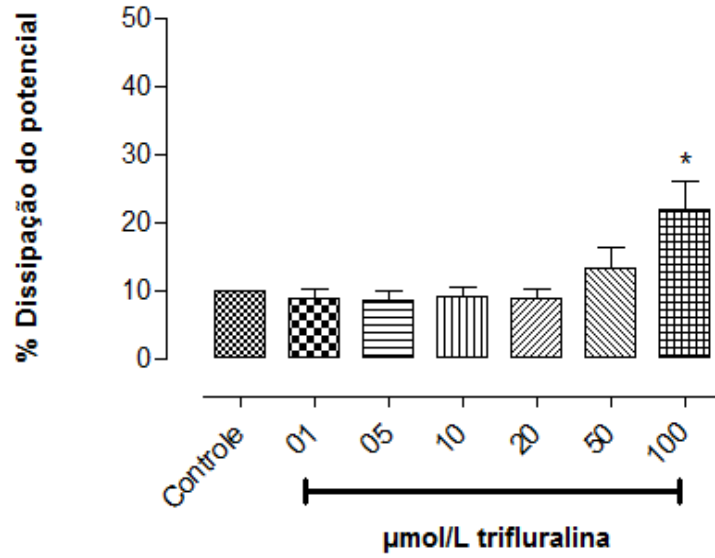
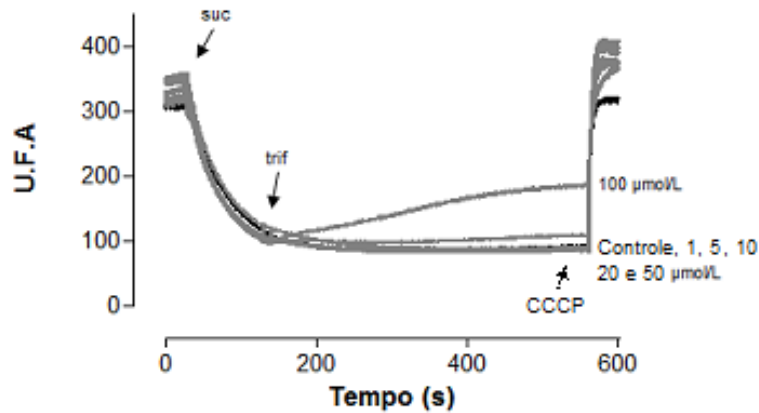


Figura 9. A) Efeito concentração-resposta da trifluralina sobre a dissipação do potencial de membrana mitocondrial em mitocôndrias isoladas de fígado de rato (1,0 mg de proteína/mL) incubadas como descrito em materiais e métodos. Os resultados representam a média \pm EPM de três determinações com diferentes preparações mitocondriais, relativo ao controle na ausência do composto. *Resultados estatisticamente significantes ($p < 0,05$) em relação ao controle. B) Traçado representativo do efeito da trifluralina sobre o potencial de membrana mitocondrial. A dissipação total do potencial de membrana foi induzida por CCCP 1 μ mol/L.

A)



B)



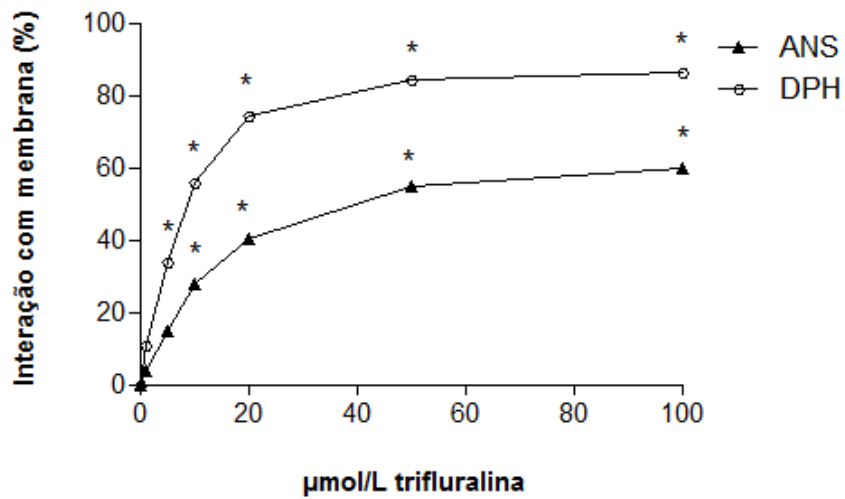
4.3 Interação com membrana mitocondrial interna

A partir dos resultados obtidos para o experimento do potencial de membrana, utilizou-se dois marcadores fluorescentes para detectar se os herbicidas eram capazes de interagir com a membrana mitocondrial interna. O DPH monitora interação com a região hidrofóbica e o ANS com a região hidrofílica da membrana biológica, ou seja, com os grupos-cabeça polares dos fosfolípidios, proteínas e grupos sulfônicos aniônicos na superfície das membranas (KLAUSNER, R. D. *et al.*; 1979). Uma vez que o xenobiótico é capaz de interagir com a membrana, ocorre a liberação da sonda, consequentemente provocando a diminuição da fluorescência (MAIOLI *et al.*, 2012).

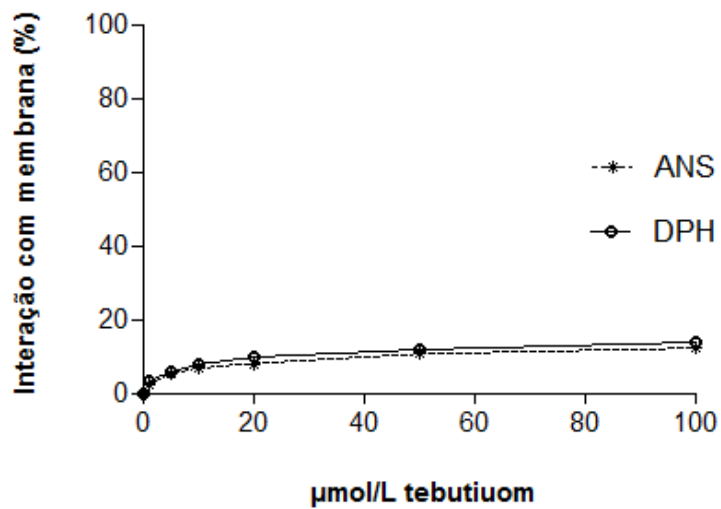
Os resultados obtidos revelam que a trifluralina afeta de forma significativa a fluorescência de ambas as sondas utilizadas, sugerindo que esse herbicida interage tanto com a região lipofílica quanto com a região hidrofílica da membrana mitocondrial interna (Figura 10). Entretanto, a análise estatística mostrou que o marcador DPH sofreu maior interferência na sua fluorescência (83%) que o ANS (57%), quando adicionado 100 $\mu\text{mol/L}$ de trifluralina. O tebutiurum não apresentou interferência significativa na fluorescência das sondas em nenhuma concentração testada.

Figura 10. Interação dos herbicidas trifluralina e tebutiuron com a membrana mitocondrial interna avaliada pelas sondas ANS e DPH, conforme descrito em materiais e métodos. O gráfico representa os efeitos dos herbicidas (A – Trifluralina e B – Tebutiuron) comparado ao grupo controle (sem adição do composto e considerado como 0% de efeito). Os resultados representam a média \pm EPM de três determinações com diferentes preparações mitocondriais, relativo ao controle na ausência do composto. *Resultados estatisticamente significantes ($p < 0,05$) em relação ao controle.

A)



B)

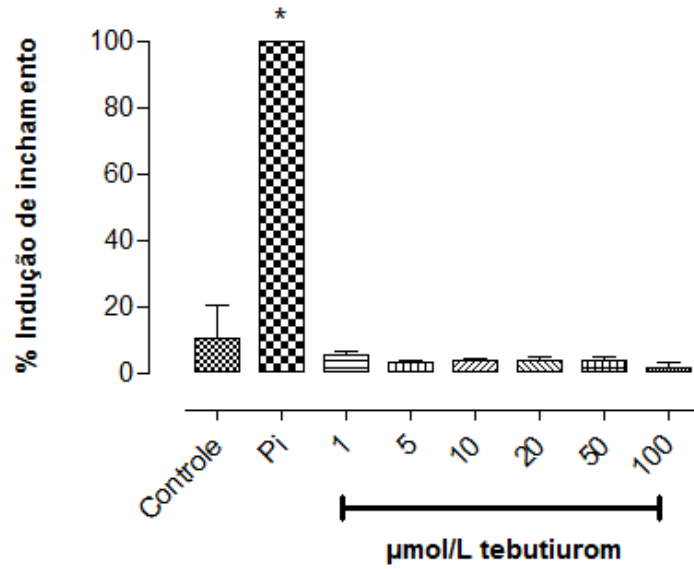


4.4 Intumescimento osmótico mitocondrial

O inchamento mitocondrial, ou também chamado de *swelling mitocondrial*, avalia a capacidade dos herbicidas tebutiuram e trifluralina em provocar o intumescimento da organela através da alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial. Foi observado que o tebutiuram não induziu o inchamento em nenhuma concentração testada (Figura 11). Entretanto, a trifluralina foi capaz de provocar esse efeito a partir da concentração 20 $\mu\text{mol/L}$ (Figura 12).

Figura 11. A) Efeito concentração-resposta do tebutiurom sobre o inchamento mitocondrial em mitocôndrias isoladas de fígado de rato (0,4 mg de proteína/mL) incubadas como descrito em materiais e métodos. Os resultados representam a média \pm EPM de três determinações com diferentes preparações mitocondriais, relativo ao controle na ausência do composto. *Resultados estatisticamente significantes ($p < 0,05$) em relação ao controle. B) Traçados representativos do efeito do tebutiurom sobre o inchamento mitocondrial.

A)



B)

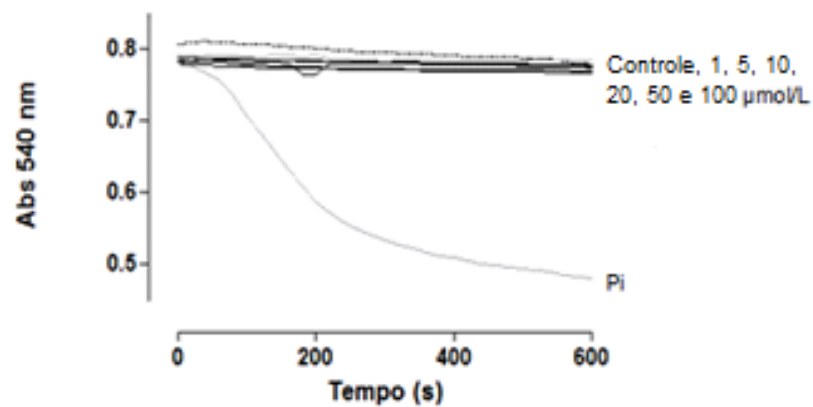
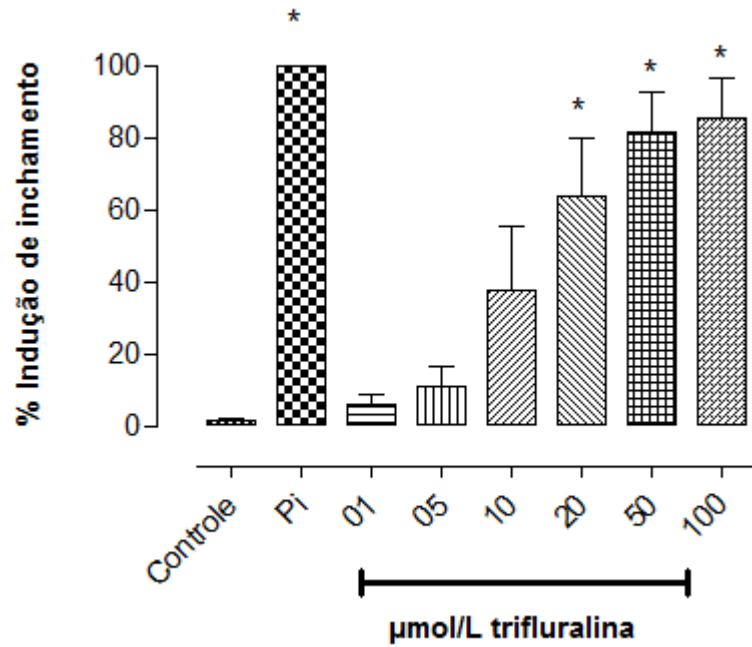
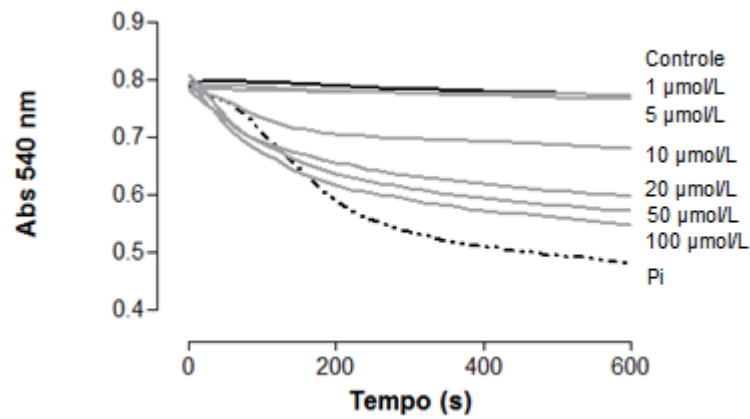


Figura 12. A) Efeito concentração-resposta da trifluralina sobre o inchamento mitocondrial em mitocôndrias isoladas de fígado de rato (0,4 mg de proteína/mL) incubadas como descrito em materiais e métodos. Os resultados representam a média \pm EPM de três determinações com diferentes preparações mitocondriais, relativo ao controle na ausência do composto. *Resultados estatisticamente significantes ($p < 0,05$) em relação ao controle. B) Traçados representativos do efeito da trifluralina sobre o inchamento mitocondrial.

A)

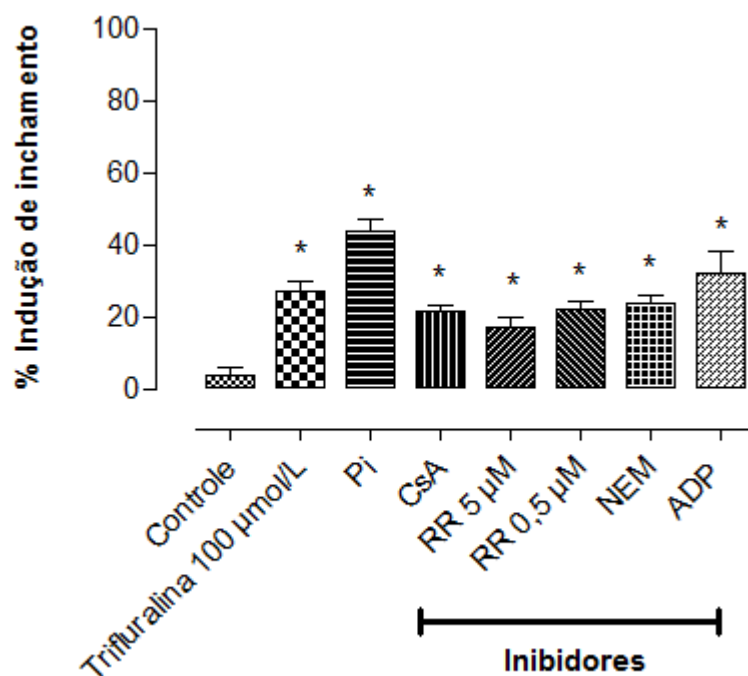


B)



Com os resultados obtidos para a trifluralina, foram realizados outros experimentos, dessa vez utilizando alguns moduladores (CsA, RR, NEM e ADP) que permitiriam inferir o mecanismo de ação pelo qual a trifluralina afeta a permeabilidade da membrana mitocondrial. O teste com a trifluralina foi realizado apenas com a maior concentração (100 $\mu\text{mol/L}$), porém nesta situação, nenhum inibidor foi capaz de impedir o intumescimento osmótico provocado pelo herbicida (Figura 13).

Figura 13. Efeito de inibidores do inchamento mitocondrial sobre o inchamento induzido pela trifluralina (100 $\mu\text{mol/L}$): Ciclosporina A (CsA) 1 $\mu\text{mol/L}$; N-etilmaleimida (NEM) 25 $\mu\text{mol/L}$; Vermelho de Rutênio (RR) 0,5 $\mu\text{mol/L}$ e 5 $\mu\text{mol/L}$ e ADP.



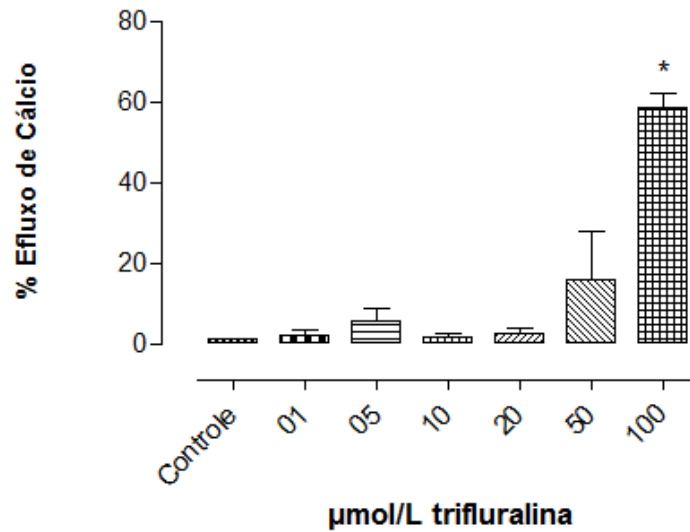
4.5 Movimentação e liberação de Ca^{+2}

O intumescimento osmótico pode estar relacionado, dentre outros fatores, com a abertura do poro de transição de permeabilidade (PTP). Assim, analisou-se os efeitos dos herbicidas sobre a homeostasia cálcica no interior da mitocôndria, uma vez que a abertura do poro ocasiona liberação de íons Ca^{+2} da organela (KINNALLY *et al.*, 2011).

Observou-se que a trifluralina foi capaz de interferir de forma significativa na liberação de cálcio na maior concentração testada, 100 $\mu\text{mol/L}$ (Figura 14). Não foi observado, no entanto, efluxo de cálcio para o tebutiuram em nenhuma concentração (Figura 15).

Figura 14. A) Efeito concentração-resposta da trifluralina sobre o efluxo de cálcio em mitocôndrias isoladas de fígado de rato (1,0 mg de proteína/mL) incubadas como descrito em materiais e métodos. Os resultados representam a média \pm EPM de três determinações com diferentes preparações mitocondriais, relativo ao controle na ausência do composto. * Resultados estatisticamente significantes ($p < 0,05$) em relação ao controle. B) Traçados representativos do efeito da trifluralina sobre o efluxo de cálcio mitocondrial. A liberação total de cálcio foi induzida por CCCP 1 $\mu\text{mol/L}$.

A)



B)

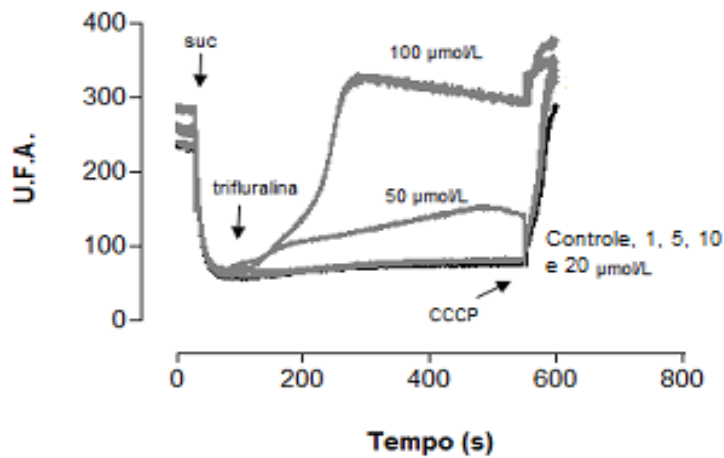
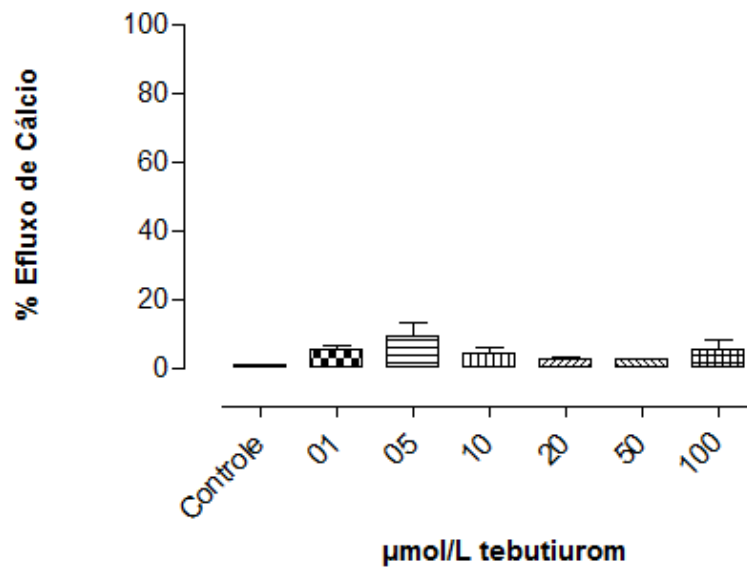
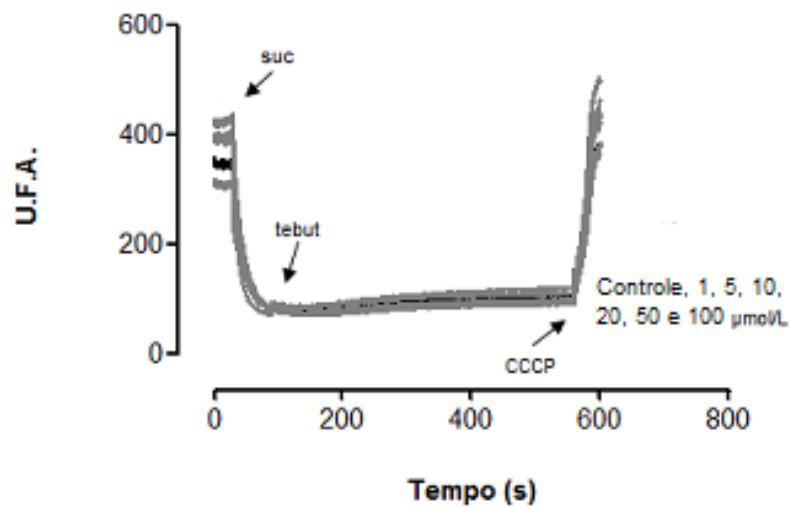


Figura 15. A) Efeito concentração-resposta do tebutiurum sobre o efluxo de cálcio em mitocôndrias isoladas de fígado de rato (1,0 mg de proteína/mL) incubadas como descrito em materiais e métodos. Os resultados representam a média \pm EPM de três determinações com diferentes preparações mitocondriais, relativo ao controle na ausência do composto. *Resultados estatisticamente significantes ($p < 0,05$) em relação ao controle. B) Traçados representativos do efeito do tebutiurum sobre o efluxo de cálcio mitocondrial. A liberação total de cálcio foi induzida por CCCP 1 $\mu\text{mol/L}$.

A)



B)



4.6 Concentração mitocondrial de ATP

A fim de verificar se os herbicidas afetavam a capacidade da organela de produzir ATP, a concentração mitocondrial de ATP foi avaliada após 10 minutos de incubação da suspensão com os herbicidas. Os resultados demonstram que o tebutiurum não foi capaz de diminuir a concentração de ATP (Figura 16). Já a trifluralina apresentou diminuição significativa para a concentração 100 $\mu\text{mol/L}$ (Figura 17).

Figura 16. Efeito concentração-resposta do tebutiurum sobre a concentração de ATP em mitocôndrias isoladas de fígado de rato (1,0 mg de proteína/mL) incubadas como descrito nos materiais e métodos. Os resultados representam a média \pm EPM de três determinações com diferentes preparações mitocondriais, relativo ao controle na ausência do composto. *Resultados estatisticamente significantes ($p < 0,05$) em relação ao controle. Como controle positivo foi utilizado CCCP 1 $\mu\text{mol/L}$.

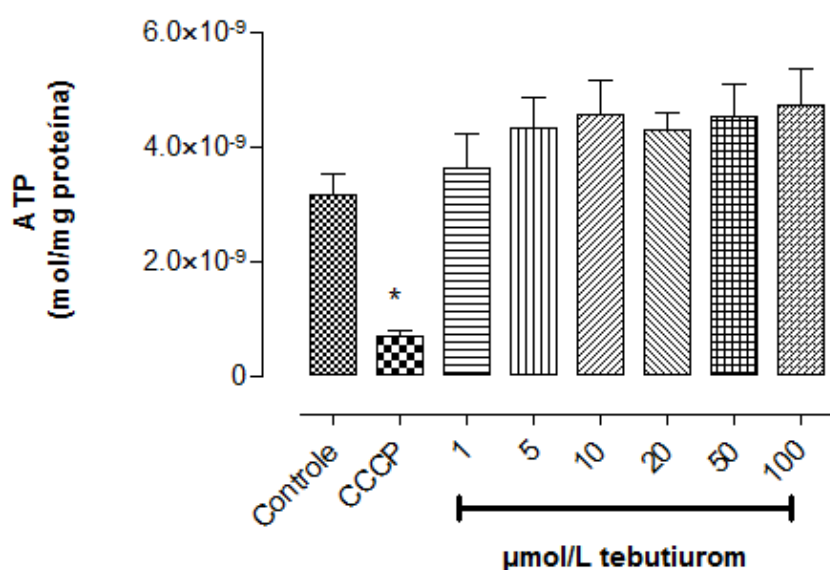
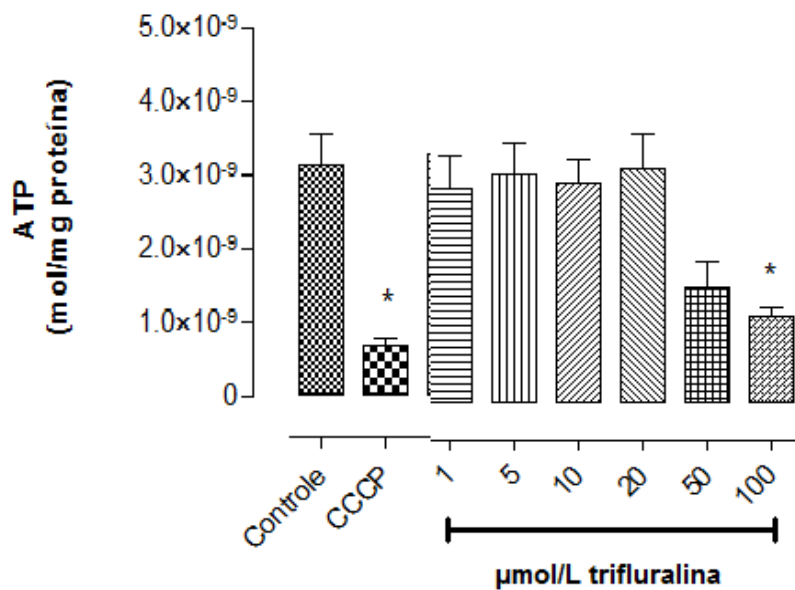


Figura 17. Efeito concentração-resposta da trifluralina sobre a concentração de ATP em mitocôndrias isoladas de fígado de rato (1,0 mg de proteína/mL) incubadas como descrito em materiais e métodos. Os resultados representam a média \pm EPM de três determinações com diferentes preparações mitocondriais, relativo ao controle na ausência do composto. *Resultados estatisticamente significantes ($p < 0,05$) em relação ao controle. Como controle positivo foi utilizado CCCP 1 $\mu\text{mol/L}$.

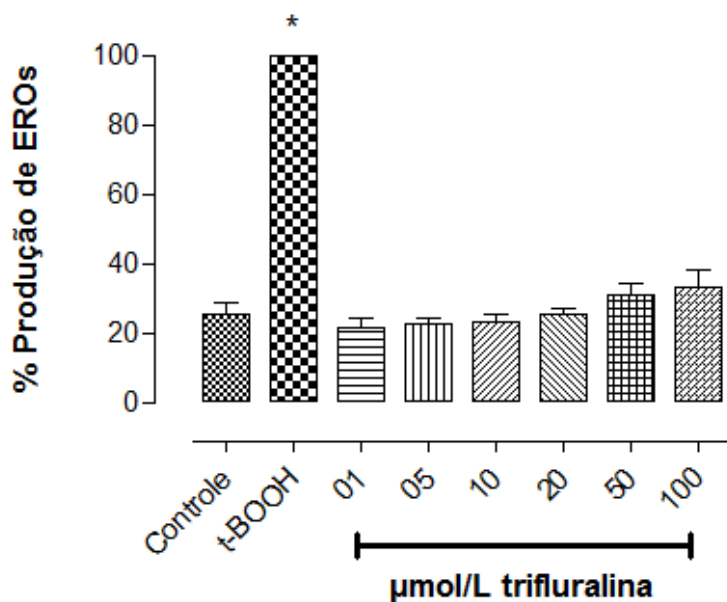


4.7 Produção de espécies reativas de oxigênio

Com o intuito de investigar mais a fundo se os herbicidas eram capazes de provocar interferência no estado redox das mitocôndrias, analisou-se a formação e acúmulo de espécies reativas de oxigênio. Entretanto, tanto a trifluralina (Figura 18) quanto o tebutiurrom (Figura 19) não induziram a produção de espécies reativas de oxigênio em nenhuma das concentrações testadas.

Figura 18. A) Efeito concentração-resposta da trifluralina sobre a formação de radicais livres em mitocôndrias isoladas de fígado de rato (1,0 mg de proteína/mL) incubadas como descrito em materiais e métodos. Os resultados representam a média \pm EPM de três determinações com diferentes preparações mitocondriais, relativo ao controle na ausência do composto. *Resultados estatisticamente significantes ($p < 0,05$) em relação ao controle. B) Traçados representativos do efeito da trifluralina sobre a produção de EROs. O aumento na formação de radicais livres foi induzido por t-BOOH 300 $\mu\text{mol/L}$.

A)



B)

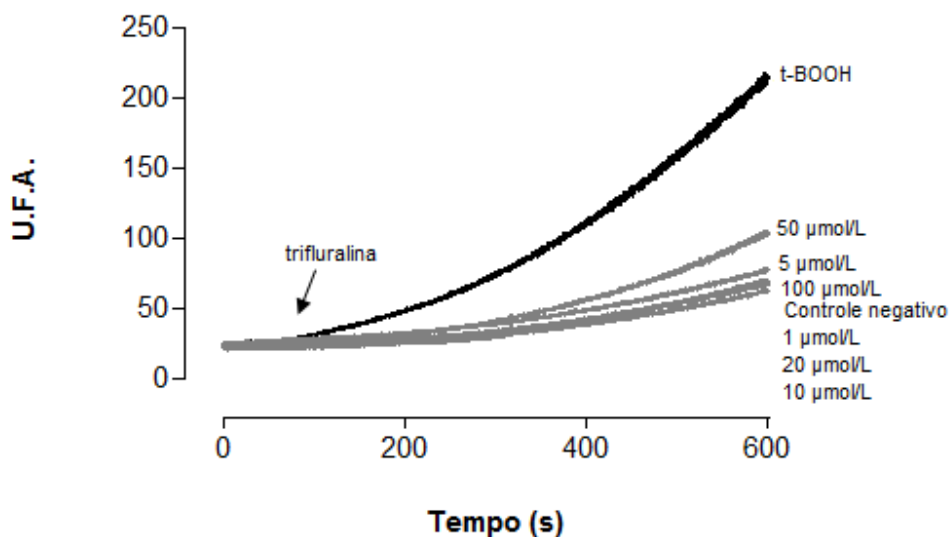
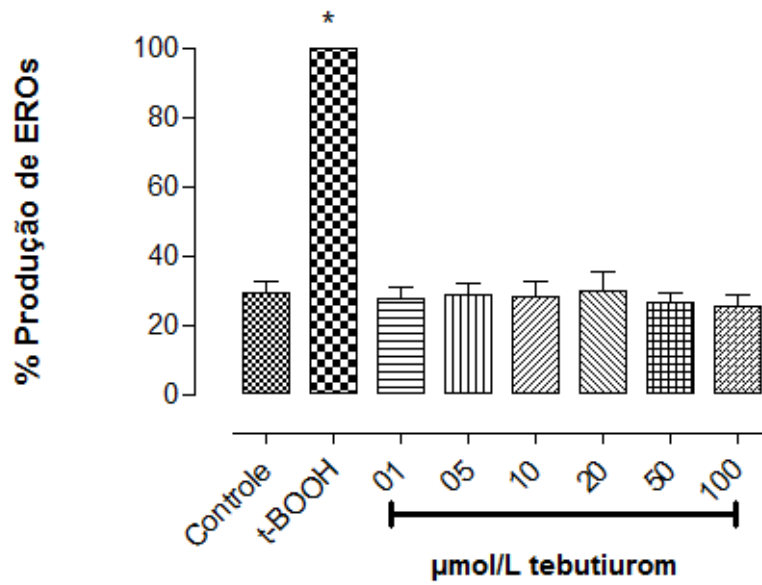
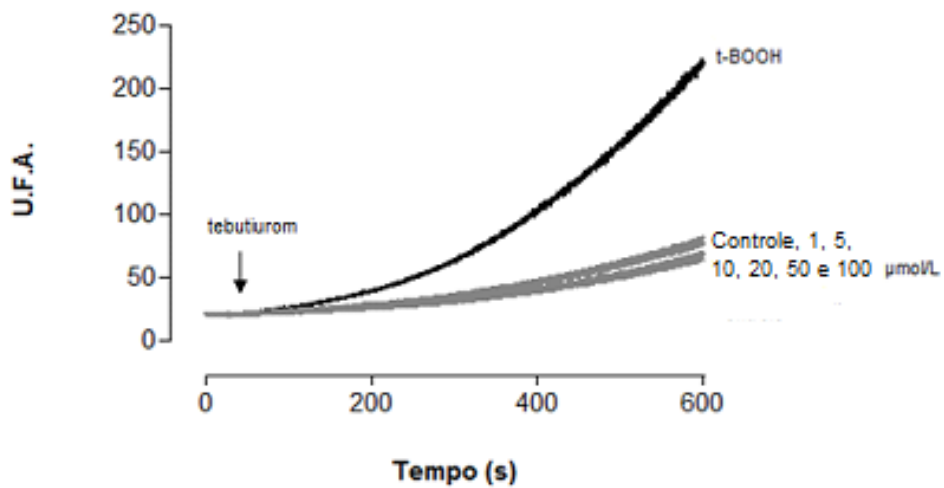


Figura 19. A) Efeito concentração-resposta do tebutiurom sobre a formação de radicais livres em mitocôndrias isoladas de fígado de rato (1,0 mg de proteína/mL) incubadas como descrito em materiais e métodos. Os resultados representam a média \pm EPM de três determinações com diferentes preparações mitocondriais, relativo ao controle na ausência do composto. *Resultados estatisticamente significantes ($p < 0,05$) em relação ao controle. B) Traçados representativos do efeito da trifluralina sobre a produção de EROs. O aumento na formação de radicais livres foi induzido por t-BOOH 300 $\mu\text{mol/L}$.

A)



B)

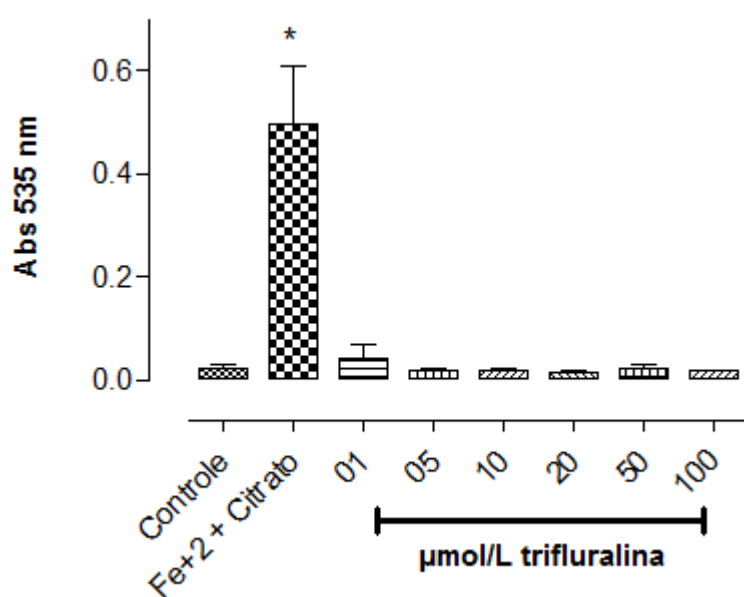


4.8 Lipoperoxidação de membrana

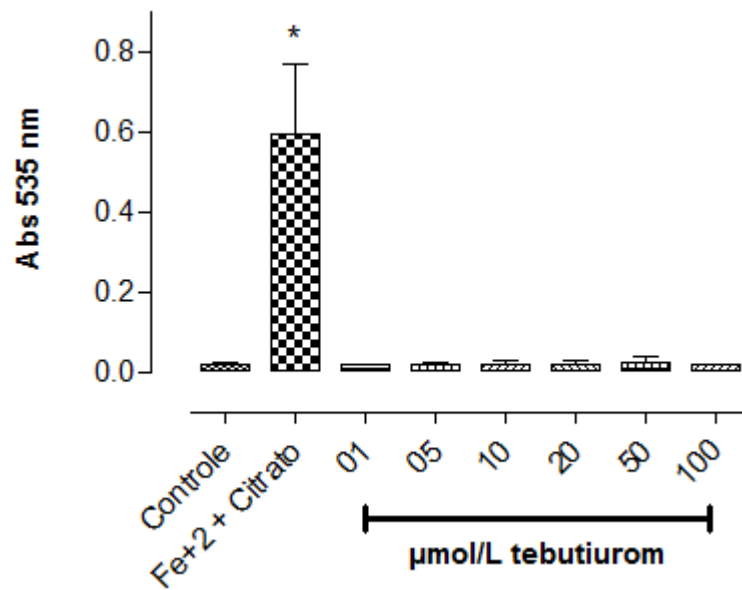
O experimento de lipoperoxidação foi realizado com o intuito de verificar se os herbicidas trifluralina e tebutiuram eram capazes de induzir estresse oxidativo na mitocôndria. Como controle positivo foi utilizado Fe^{+2} / citrato, uma vez que íons ferrosos reagem com hidoperóxidos lipídicos (LOOH) originando radicais altamente reativos ($\text{LO}\cdot$ e $\text{LOO}\cdot$) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Como mostra a Figura 20, nenhum dos herbicidas foi capaz de induzir a lipoperoxidação nas concentrações testadas:

Figura 20. Efeito concentração-resposta dos herbicidas trifluralina (A) e tebutiuram (B) sobre a oxidação de lipídeos de membranas em mitocôndrias isoladas de fígado de rato (1,0 mg de proteína/mL) incubadas como descrito em materiais e métodos. Os resultados representam a média \pm EPM de três determinações com diferentes preparações mitocondriais, relativo ao controle na ausência do composto. *Resultados estatisticamente significantes ($p < 0,05$) em relação ao controle.

A)



B)

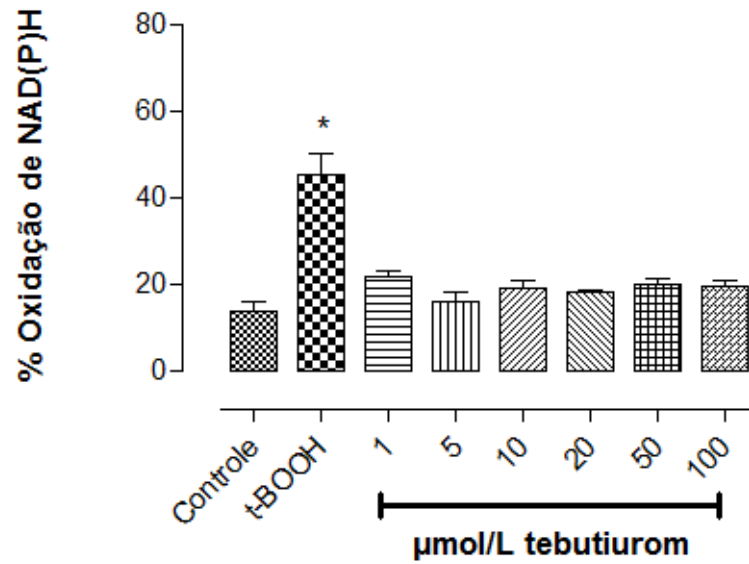


4.9 Avaliação do estado redox dos nucleotídeos de piridina

O estado oxidativo das mitocôndrias também foi analisado por meio da oxidação dos nucleotídeos de piridina (NAD(P)H). Os resultados apresentados para o tebutiurom corroboram os dados apresentados pelos experimentos anteriores, onde não foram encontradas alterações no estado oxidativo mitocondrial (Figura 21). Já para a trifluralina, constatou-se alteração no estado oxidativo de NAD(P)H de forma significativa nas concentrações 20, 50 e 100 µmol/L (figura 22).

Figura 21. A) Efeito concentração-resposta do tebutiurom sobre o estado oxidativo dos nucleotídeos de piridina(NAD(P)H) em mitocôndrias isoladas de fígado de rato (1,0 mg de proteína/mL) incubadas como descrito em materiais e métodos. Os resultados representam a média \pm EPM de três determinações com diferentes preparações mitocondriais, relativo ao controle na ausência do composto. *Resultados estatisticamente significantes ($p < 0,05$) em relação ao controle. B) Traçados representativos do efeito do tebutiurom sobre a oxidação dos nucleotídeos de piridina. A oxidação de NAD(P)H foi induzida por t-BOOH 300 $\mu\text{mol/L}$.

A)



B)

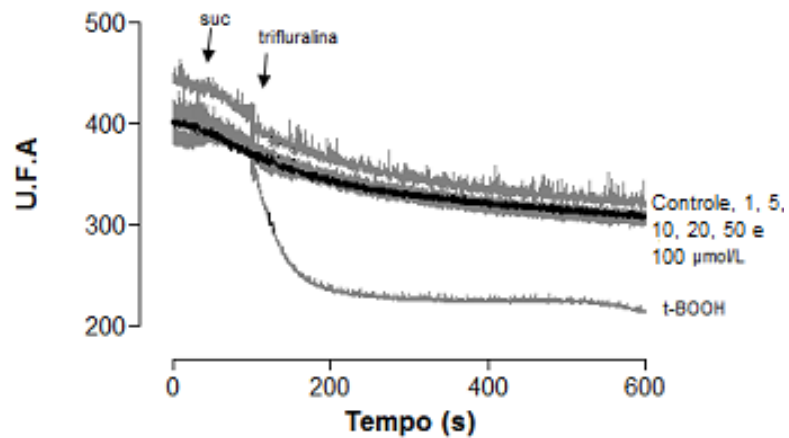
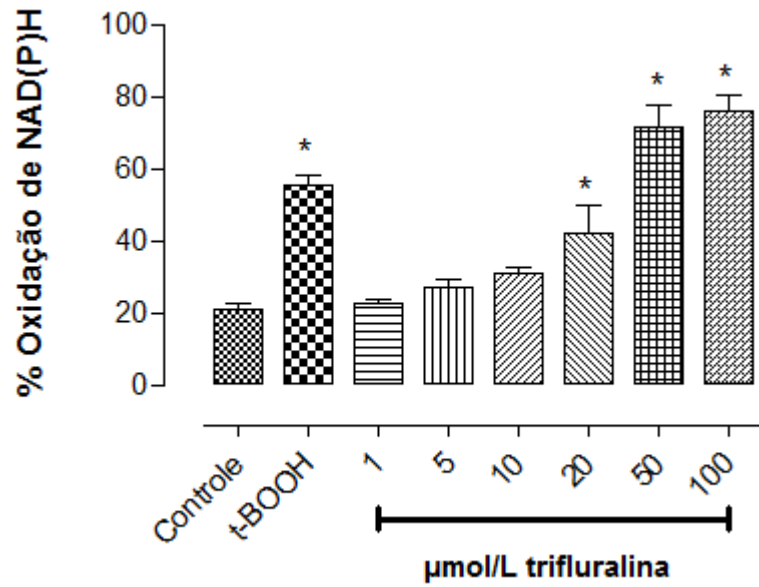
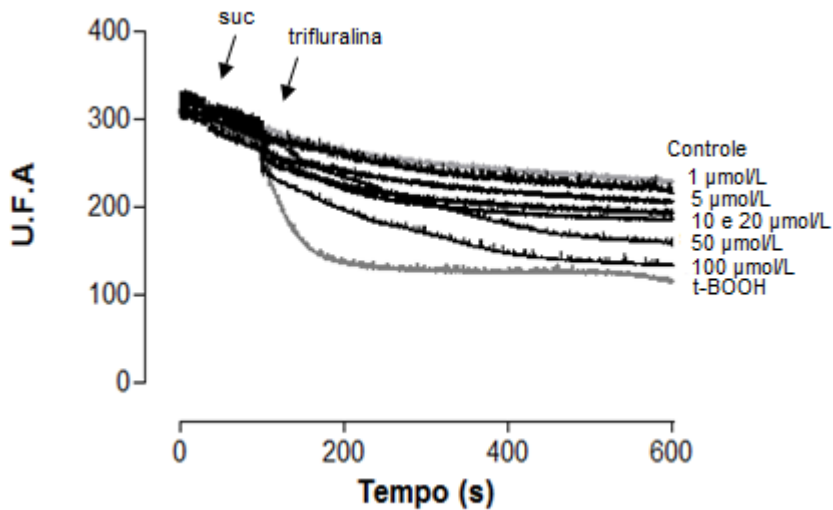


Figura 22. A) Efeito concentração-resposta da trifluralina sobre o estado oxidativo dos nucleotídeos de piridina (NAD(P)H) em mitocôndrias isoladas de fígado de rato (1,0 mg de proteína/mL) incubadas como descrito em materiais e métodos. Os resultados representam a média \pm EPM de três determinações com diferentes preparações mitocondriais, relativo ao controle na ausência do composto. *Resultados estatisticamente significantes ($p < 0,05$) em relação ao controle. B) Traçados representativos do efeito da trifluralina sobre a oxidação dos nucleotídeos de piridina. A oxidação de NAD(P)H foi induzida por t-BOOH 300 $\mu\text{mol/L}$.

A)



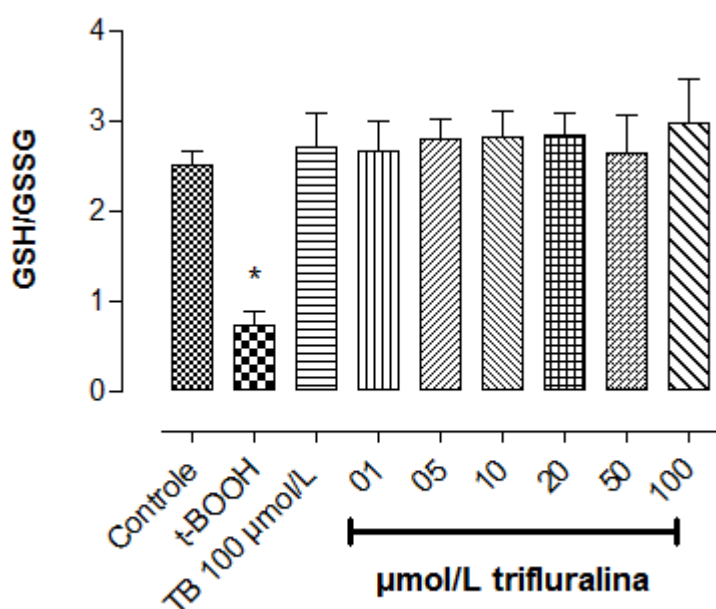
B)



4.10 Concentrações mitocondriais de glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG)

Por fim, uma vez que o NADPH participa do ciclo de redução da glutathiona, investigou-se a possibilidade de os herbicidas alterarem as concentrações mitocondriais de glutathiona reduzida e glutathiona oxidada. Ambos os herbicidas não provocaram nenhuma alteração nos níveis mitocondriais de GSH e GSSG em nenhuma das concentrações testadas, conforme demonstrado pela razão entre GSH/GSSG (Figura 23).

Figura 23. Efeito concentração-resposta dos herbicidas sobre a razão GSH/GSSG em mitocôndrias isoladas de fígado de rato (1,0 mg de proteína/mL) incubadas como descrito nos materiais e métodos. Os pontos representam a média \pm EPM de três determinações com diferentes preparações mitocondriais, relativo ao controle na ausência do composto. *Resultados estatisticamente significantes ($p < 0,05$) em relação ao controle. A queda na razão GSH/GSSG foi induzida por t-BOOH 300 $\mu\text{mol/L}$.



5. DISCUSSÃO

Há muito são investigados os riscos e as consequências da poluição ambiental provocada pelo uso de substâncias químicas na natureza. Uma vez que atingem organismos não-alvos, esses compostos, tais como os praguicidas, são capazes de afetar o desenvolvimento, a fisiologia, o comportamento, a reprodução e a sobrevivência de espécies. Também aumentam a taxa de hibridização e diminuem a diversidade genética, ocasionando uma redução da viabilidade populacional podendo levar à extinção (LIFSHITZ; CLAIR, 2016).

Tanto o tebutiurum quanto a trifluralina já foram quantificados em solo e águas, mesmo após meses de uso dos mesmos (MERCURIO *et al.*, 2016), indicando contaminação ambiental por esses herbicidas, o que favorece a absorção por organismos não-alvo e possibilita a ação tóxica por parte destes herbicidas nesses organismos.

Desta forma, a primeira parte do estudo avaliou os aspectos energéticos das mitocôndrias isoladas de fígado de rato, quando expostas aos herbicidas tebutiurum e trifluralina, pois já é descrito na literatura que alguns praguicidas, como é o caso dos organoclorados, são capazes de bioacumular em células hepáticas e provocar mudanças estruturais nas cristas mitocondriais (LIU *et al.*, 2017) e assim afetar a bioenergética celular.

Os resultados obtidos para interação com a membrana mitocondrial denotam que apenas a trifluralina apresentou resultado significativo para ambas as sondas utilizadas, DPH e ANS, porém causou maior interferência

quando utilizado o DPH. Uma vez que este marcador se incorpora dentro da região lipofílica da bi-camada lipídica, orientando-se em paralelo com lipídios e adquirindo fluorescência (HELENA *et al.*, 2006), é razoável supor que a trifluralina se dissolva na região hidrofóbica da membrana, diminuindo sua fluidez. Tal efeito afeta negativamente os processos energéticos da mitocôndria, já que os mesmos são sensíveis à organização da membrana interna.

Majoritariamente, o processo de produção de ATP ocorre através da fosforilação oxidativa, processo que consiste na transferência de elétrons em uma série de reações redox. A energia liberada pelo fluxo de elétrons pela cadeia transportadora de elétrons, localizada na membrana mitocondrial interna, cria um gradiente eletroquímico essencial para a síntese de ATP. A análise do potencial de membrana gerado através desse gradiente eletroquímico fornece uma avaliação acerca da função mitocondrial (SAKAMURU *et al.*, 2012). Dentre os herbicidas analisados, apenas a trifluralina foi capaz de desfazer o potencial de membrana, na maior concentração testada (100 $\mu\text{mol/L}$). Este achado corrobora um estudo conduzido com células HepG2 que demonstrou que o tebutiurum não é capaz de dissipar o potencial de membrana destas células na mesma faixa de concentração utilizada no presente trabalho, enquanto a trifluralina induziu a diminuição do $\Delta\psi$ nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{mol/L}$ (FRANCO-BERNARDES, 2016), reforçando a capacidade desse herbicida em afetar parâmetros celulares ligados à produção de ATP.

Muitos xenobióticos, incluindo os contaminantes emergentes, são capazes de dissipar o potencial de membrana atuando como desacopladores,

substâncias anfífilas capazes de atravessar a membrana mitocondrial interna e transportar prótons para a matriz mitocondrial por uma via independente da ATP sintase, como o 2,4-Dinitrofenol e o CCCP. Ainda existem os inibidores específicos de cada complexo, que levam à interrupção da cadeia transportadora de elétrons, como a Antimicina A e a Rotenona (KENWOOD *et al.*, 2013). Além disso, a abertura do poro de transição de permeabilidade (PTP) também pode levar à diminuição do potencial de membrana (HUSER; BLATTER, 1999). O resultado significativo obtido para a trifluralina na dissipação do potencial provavelmente está relacionado à abertura do PTP, que provoca como consequência o intumescimento mitocondrial e lise da membrana externa da organela. O efeito desacoplador deste herbicida sobre a mitocôndria é descartado ao avaliarmos a taxa de consumo de oxigênio no estado 3 da respiração mitocondrial, na qual percebe-se que conforme ocorre o aumento da concentração de trifluralina utilizada, menor é a velocidade de consumo de oxigênio realizado pela mitocôndria isolada. Esse valor se reflete na elevada taxa de ADP/O encontrada, uma vez que o consumo de oxigênio é inversamente proporcional à razão ADP/O.

A mitocôndria está envolvida em inúmeros processos fisiológicos, que incluem o metabolismo energético, a homeostase cálcica e a morte celular. A abertura do PTP, sensível ao Ca^{+2} , é um dos fatores que podem levar à liberação de proteínas pró-apoptóticas, como o citocromo *c* e o AIF (DETAILLE *et al.*, 2016). Desregulação cálcica, espécies reativas de oxigênio, proteases e diminuição do potencial de membrana são alguns dos fatores que levam ao desencadeamento da transição de permeabilidade mitocondrial (TPM), o que sugere que a mitocôndria atua como um sensor celular de estresse

(HAJNOCZKY; MADESH, 2003; ROBERTS; GOPING; BLEACKLEY, 2003). Como consequência da TPM a organela incha, podendo levar à ruptura da membrana externa e liberação de fatores apoptogênicos (GREEN; REED, 1998). O tebutiurom não apresentou resultado significativo para o experimento de inchamento mitocondrial para nenhuma concentração testada. Entretanto, a trifluralina foi capaz de induz tal efeito nas concentrações 20, 50 e 100 $\mu\text{mol/L}$.

A transição de permeabilidade pode ser regulada através de inibidores que impedem a formação do PTP. A droga imunossupressora Ciclosporina A (CsA) se liga ao Cyp D, bloqueando sua ligação com o ANT. Vários estudos também relataram que a abertura do PTP é melhorada quando há depleção dos nucleotídeos de adenina, que se ligam ao ANT e, de forma contrária, a adição de ATP ou ADP é capaz de inibir a formação do poro (HALESTRAP, 2006). Ainda, uma vez que o potencial de membrana pode induzir a TPM, a presença de reagentes de grupos tióis, como o N-etilmaleimida (NEM), eleva o potencial aparente a valores de voltagem mais negativos, diminuindo a probabilidade de abertura do poro (PETRONILLI *et al.*, 1994; PESTANA, 2010). Por fim, a elevada concentração de Ca^{+2} na matriz mitocondrial também pode desencadear o processo de abertura do poro de transição de permeabilidade. O consumo de cálcio para a matriz é alcançado por um uniporter sensível ao Vermelho de Rutênio (RR) (BERNARDI e RASOLA, 2007).

Os resultados obtidos apontam que a trifluralina foi capaz de induzir inchamento mitocondrial nas concentrações 20, 50 e 100 $\mu\text{mol/L}$. Entretanto, nenhum dos inibidores utilizados (CsA, RR, NEM e ADP) impediu o intumescimento provocado pela mesma. Esses dados sugerem que a trifluralina não atua por nenhum dos mecanismos citados anteriormente. O PiC,

carreador de fosfato inorgânico, e, mais recentemente, os dímeros da ATP sintase, são proteínas que também possuem papel na abertura do poro de transição de permeabilidade (MIURA; TANNO, 2012; GIORGIO *et al.*, 2013). Essas recentes descobertas reforçam a complexidade do mecanismo de indução da abertura do poro de transição mitocondrial, e indicam que a trifluralina talvez atue por processos ainda não elucidados. Por ser um processo complexo, os mecanismos relacionados à essa abertura ainda não estão completamente elucidados, por isso outros experimentos utilizando diferentes inibidores devem ser realizados para se compreender a ação pela qual a trifluralina é capaz de induzir o inchamento mitocondrial. Porém, a ocorrência do inchamento está intimamente relacionada com a abertura do poro de transição de permeabilidade, apontando a capacidade da trifluralina de alterar a permeabilidade mitocondrial.

Ainda sobre a abertura do poro de transição de permeabilidade, o cálcio é um íon que assume grande importância para o desencadeamento desse evento. Um aumento expressivo na concentração interna de Ca^{+2} é um dos principais gatilhos da abertura do PTP, que tem como uma de suas consequências a liberação massiva do próprio íon cálcio para fora da organela (HALESTRAP, 2006; RASOLA; BERNARDI, 2007). A avaliação do efluxo de cálcio através do experimento com Cálcio Green 5N revelou que o tebutirom não induz a liberação do íon, enquanto a trifluralina, apesar de liberar cálcio sutilmente na concentração de 50 $\mu\text{mol/L}$, o efeito ocorre de forma significativa na maior concentração testada, 100 $\mu\text{mol/L}$. Este resultado condiz com um estudo realizado com herbicidas e fungicidas, dentre eles a trifluralina e a orizalina, um herbicida também pertencente à classe das dinitroanilinas, que

revelou a influência desses compostos no efluxo de Ca^{+2} em mitocôndrias isoladas de fígado de ratos (HERTEL *et al.*, 1981). Conforme mencionado anteriormente, o efluxo é uma das consequências da abertura do poro de transição de permeabilidade. Assim, a liberação do íon quando na presença da trifluralina sugere que este herbicida, pelo menos em altas concentrações, é capaz de induzir a abertura do poro e alterar a transição de permeabilidade de membrana, afetando bruscamente o funcionamento da organela.

A concentração celular de ATP está diretamente envolvida no processo de morte celular. Enquanto um leve decaimento nos níveis de ATP na mitocôndria encaminha a célula para a apoptose, uma queda abrupta sinaliza mecanismo de necrose (LA PIANA *et al.*, 1998). A análise da concentração mitocondrial de ATP revelou redução significativa para a trifluralina na concentração de 100 $\mu\text{mol/L}$, apesar da concentração 50 $\mu\text{mol/L}$ também ter apresentado grande queda. O tebutirom, por outro lado, não afetou os níveis de ATP.

Em congruência com os resultados já obtidos, a diminuição de ATP está diretamente relacionada com os demais efeitos provocados pela trifluralina. A dissipação do potencial de membrana, o inchamento mitocondrial e o efluxo de cálcio são indicativos de abertura do poro de transição de permeabilidade, que provoca, além da liberação de moléculas para o citoplasma, a perda da homeostasia celular e a interrupção da síntese de ATP. Quando esses sinais alcançam a mitocôndria, há liberação, através do PTP, de proteínas ativadores, dentre as quais encontra-se a citocromo c. Esta possui papel fundamental durante o processo de morte celular por participar da via intrínseca da apoptose através da ativação das caspases (HALESTRAP, 2005).

Corroborando os resultados encontrados nesse trabalho, um estudo realizado com células HepG2 demonstrou que a trifluralina é capaz de provocar morte celular por necrose e apoptose, além de induzir bloqueio do ciclo celular na fase S, sendo considerado, portanto, um herbicida citotóxico para essa célula (FRANCO-BERNARDES, 2016). A análise realizada com mitocôndrias neste projeto sugere que o efeito citotóxico da trifluralina pode estar relacionado com a formação do PTP e consequente transição de permeabilidade mitocondrial. Como já mencionado, a mitocôndria apresenta um importante papel na manutenção do funcionamento celular. Assim, um efeito drástico, como a indução do poro de transição de permeabilidade, pode afetar os processos celulares e levar à morte celular.

Em situações de estresse oxidativo causadas por xenobióticos e toxicantes, o aumento da geração de O_2^{\cdot} e consequente acúmulo de H_2O_2 e OH^{\cdot} na mitocôndria pode levar a oxidação de lipídios de membrana, um processo conhecido como lipoperoxidação (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). O experimento realizado com a sonda H_2DCFDA para verificar a formação de radicais livres revelou que ambos os herbicidas não são capazes de estimular a produção dessas espécies além do basal. Esses resultados são confirmados pelos dados obtidos para os experimentos de lipoperoxidação e níveis de GSH e GSSG, nos quais, novamente, tanto a trifluralina quanto o tebutiurum não apresentaram resultados positivos.

Entretanto, foi constatado que a trifluralina é capaz de alterar o estado redox dos nucleotídeos de piridina nas três maiores concentrações, 20, 50 e 100 $\mu\text{mol/L}$. Uma das principais funções do NADPH dentro da organela é a de restaurar sistemas antioxidantes, como o da glutatona, a qual é responsável

por catalisar a transformação de H_2O_2 em H_2O (MAILLOUX; TREBERG, 2016). O tebutiuram, assim como nos demais experimentos oxidativos, não foi capaz de alterar o estado redox do NAD(P)H.

Uma vez que os níveis de GSH e GSSG não foram afetados pela trifluralina, acredita-se que o resultado positivo obtido para a oxidação de NAD(P)H seja proveniente de uma interação direta entre o herbicida e o nucleotídeo de piridina. O paraquat, por exemplo, herbicida utilizado em diversas culturas como algodão, arroz e café, é uma molécula aceptora de elétrons, a qual em plantas expostas a luz leva a depleção de NADPH com consequente produção de superóxidos, promovendo a destruição de membranas. Em humanos, esse herbicida provoca a geração de grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio, levando o organismo ao estresse oxidativo e à peroxidação de gorduras, bem como a depleção de NADPH por oxidação direta desta coenzima (MARTINS, T., 2013). Apesar dos demais experimentos demonstrarem que a trifluralina não provoca estresse oxidativo, assim como o paraquat, ela pode atuar diretamente ao NAD(P)H, oxidando-o e diminuindo os níveis mitocondriais dessa coenzima. Entretanto, outros experimentos devem ser realizados para confirmar tal suposição.

A oxidação do NAD(P)H por toxicantes pode iniciar ou amplificar eventos patológicos e fisiológicos (DI LISA; ZIEGLER, 2001), contudo, já que não houve alterações nos níveis de GSH e GSSG, compreende-se que a oxidação do NAD(P)H provocada pela trifluralina não é intensa o suficiente para provocar um desequilíbrio nos processos antioxidantes da mitocôndria. Com base no ciclo da glutathiona, uma vez que a oxidação da glutathiona reduzida (GSH) provoca a estimulação da via das pentoses e aumento da síntese de NADPH

(WINKLER; DESANTIS; SOLOMON, 1986), a oxidação massiva do NAD(P)H ocasionaria redução na atividade da glutathione redutase, enzima a qual o NADPH atua como cofator, reduzindo a concentração de glutathione reduzida (GSH). Essa alteração causaria desequilíbrio entre a razão GSH/GSSG, que seria observado no experimento de níveis mitocondriais de GSH e GSSG. Contudo, os resultados obtidos revelam que não houve alteração, implicando que o efeito da trifluralina sobre o NADPH não são significantes a ponto de afetar o funcionamento mitocondrial.

No estudo realizado por Franco-Bernardes (2016) foi constatado o acúmulo de espécies reativas de oxigênio provocado pela trifluralina (100 $\mu\text{mol/L}$) em células HepG2. Uma vez que essas células possuem atividade de metabolização, a discrepância entre os achados com esse trabalho pode ser fruto da ação oxidativa de produtos de degradação ou biotransformação provenientes da metabolização do herbicida nessas células.

6. CONCLUSÃO

Com base nos objetivos do trabalho e nos resultados obtidos, pode-se concluir que o tebutirom não afeta os processos bioquímicos ou oxidativos da mitocôndria, nas concentrações testadas. A trifluralina, por outro lado, foi capaz de alterar os processos bioquímicos bioenergéticos testados, porém não provocou desequilíbrio significativo nos experimentos oxidativos. Assim, acredita-se que, em altas concentrações, a trifluralina seja capaz de afetar organismos não-alvo, porém o efeito observado é para concentrações maiores das que são encontradas no ambiente. Isso indica, entretanto, que um eventual acúmulo desse herbicida, ou mesmo uma toxicidade aguda provocada pelo mesmo, poderia ocasionar danos severos ao organismo, já que tal herbicida demonstrou ser capaz de interagir com as regiões hidrofóbicas e hidrofílicas da membrana mitocondrial, levando à dissipação do potencial de membrana, alteração na respiração mitocondrial, inchamento da organela, efluxo de Ca^{+2} e, conseqüentemente, redução da produção de ATP.

Ainda, a partir dos resultados obtidos da ação da trifluralina sobre o estado energético mitocondrial, acredita-se que a TPM desempenha um papel chave na etiologia da toxicidade desse herbicida.

No entanto, os compostos analisados não induzem estresse oxidativo, indicando que a formação de espécies reativas pode não ser o principal mecanismo responsável pela toxicidade dos herbicidas estudados em mitocôndrias isoladas de fígado de ratos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT-LYONS, S. et al. α -tubulin mutations alter oryzalin affinity and microtubule assembly properties to confer dinitroaniline resistance. **Eukaryotic cell**, v. 9, n. 12, p. 1825-1834, 2010.

AKERMAN, K. E. O.; WIKSTROM, M. K. F. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. **FEBS Letters**, v. 68, n. 2, p. 191-197, 1976.

ANTHONY, R. G.; HUSSEY, P. J. Dinitroaniline herbicide resistance and the microtubule 87ollusca87ton. **Trends in Plant Science**, v. 4, n. 3, p. 112-116, 1999.

BERNARDI, P.; RASOLA, A. The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. **Apoptosis**, Boston, v. 12, p. 815-833, 2007.

BETARBET, R. et al. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. **Nature Neuroscience**, v. 3, p. 1301-1306, 2000.

BISCHOF, J. et al. Clearing the outer mitochondrial membrane from harmful proteins via lipid droplets. **Cell Death Discovery**, 2017.

BLONDIN, G. A.; GREEN, D. E. The Mechanism of Mitochondrial Swelling. Institute for Enzyme Research, University of Wisconsin, Madison. **Biochemistry**, v. 58, p. 612-619, 1967.

BOVERIS, A.; CADENAS, E. Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to antimycin insensitive respiration. **FEBS Letters**, v. 54, p. 311-314, 1975.

BRACHT, A.; IWAMOTO, E.L.I. O estudo do metabolismo energético em mitocôndrias isoladas de tecido animal. In: Métodos de laboratório em bioquímica. 1ª Ed, São Paulo, cap. 9, p. 227-246, 2003.

BRANCA, D.; VAROTTO, M.L.; VINCENTI, E.; SCUTARI, G. The inhibition of calcium efflux from rat liver mitochondria by halogenated anesthetics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 155, n. 2, p. 978-83, 1988.

BREITENBACH, J.; ZHU, C.; SANDMAN, G. Bleaching herbicide norflurazon inhibits phytoene desaturase by competition with the cofactors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5270-5272, 2001.

BROEKEMEIER, K. M.; PFEIFFER, D. R. Inhibition of the Mitochondrial Permeability Transition by Ciclosporin A during Long Time Frame Experiments: Relationship between Pore Opening and the Activity of Mitochondrial Phospholipases. **Biochemistry**, v. 34, p. 16440-16449, 1995.

BROWNE, R. W.; ARMSTRONG, D. Reduced Glutathione and Glutathione Disulfide. **Free Radical and Antioxidant Protocols: Methods in Molecular Biology**, v. 108, cap. 33, Totowa, New Jersey.

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

CALLAHAN, H. L. et al. Microtubule Inhibitors: Structure-Activity Analyses Suggest Rational Models To Identify Potentially Active Compounds. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 4, p. 947-952, abr. 1996.

Centro de Ciência do Sistema Terrestre. Acesso em 07 de agosto de 2017 <<http://www.ccst.inpe.br/brasil-lider-mundial-no-uso-de-agrotoxicos/>>

CHANCE, B.; WILLIAMS G. R. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 217, p. 383–393, 1955.

CHANCE, B.; WILLIAMS, G. R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. **Advances Enzymology**, New York, v. 17, p. 65-134, 1956.

CHANG, S. S.; STRITZKE, J. F. Sorption, movement, and dissipation of tebuthiuron in soils. **Weed Science**, p. 184-187, 1977.

COHEN, P. J. Effect of Anesthetics on Mitochondrial Function. **Anesthesiology**, v. 39, n. 2, p. 153-164, 1973.

Conselho Federal de Médicos Veterinários. Resolução CFMV nº 714, 20 de junho de 2002.

CONSTANTINI, P.; CHERNYAK, B. V.; PETRONILLI, V.; BERNARDI, P. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore by pyridine nucleotides and dithiol oxidation at two separate sites. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 12, p. 6746-6751, 1996.

DEKUTOVICH, G. V.; KARGAPOLOV, A. V. Characteristic effect of local anesthetics on the phospholipid composition of mitochondrial. **Vopr Med Khim**, v. 32, p. 38-41, 1986.

DETAILLE, D. et al. Imeglimin prevents human endothelial cell death by inhibiting mitochondrial permeability transition without inhibiting mitochondrial respiration. **Cell Death Discovery**, 2, 2016.

DI LISA, F.; ZIEGLER, M. Patophysiological relevance of mitochondria in NAD⁺ metabolism. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 492, p. 4-8, 2001.

Época de aplicação dos herbicidas. **EMBRAPA Trigo**. Documentos Online. Passo Fundo, RS. n. 62, set. 2006.

ESTABROOK, R. W. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurements in mitochondria. **Methods in Enzymology**, v. 10, p. 41-47, 1967.

ESTERBAUER, H. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 1993.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 61-68, 1997.

FERREIRA, M.; AGUIAR, T.; VILARINHO, L. Cadeira Respiratória Mitochondrial: Aspectos Clínicos, Bioquímicos, Enzimáticos e Moleculares Associados ao Déficit do Complexo I. **Arquivos de Medicina**, v. 22, n. 2/3, p. 49-56, 2008.

FLORES, F. et al. Phytotoxicity of four photosystem II herbicides to tropical seagrasses. **Plus One**, v. 8, p. 1-12, 2013.

FRANCO-BERNARDES, M. F. Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade dos herbicidas tebutiuram e trifluralina e de seus efeitos na expressão de genes de resposta ao estresse celular. **Tese de doutorado**, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

FREY, T. G.; MANNELLA, C. A. The internal structure of mitochondria. **Trends Biochemical Sciences**, v. 25, p. 319-324, 2000.

FUERST, E. P.; NORMAN, M. A. Interactions of herbicides with photosynthetic electron transport. **Weed Science**, Champaign, v. 39, n. 3, p. 458-464, 1991.

GAFFNEY, V. J.; CARDOSO, V. V.; RODRIGUES, A.; FERREIRA, E.; BENOLIEL, M. J.; ALMEIDA, C. M. M. Análise de fármacos em águas por SPE-UPLC-ESI-MS/MS. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 138-149, 2014.

GIORGIO, V.; STOCKUM, S. V.; ANTONIEL, M.; FABBRO, A.; FOGOLARI, F.; FORTE, M.; GLICK, G. D.; PETRONILLI, V.; ZORATTI, M.; SZABÓ, I.; LIPPE, G.; BERNARDI, P. Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. **PNAS**, v. 110, n.15, p. 5887-5892, 2013.

GREEN, D. R.; REED, C.J. Mitochondria and apoptosis. **Science**, 281, 5381: 1309-1312, 1998.

GRESSEL, J. Herbicide tolerance and resistance alteration of site of activity. In: Duke, S. (Ed.). **Weed Physiology**, Boca Raton, EUA: CRC, Press, v. II, p. 160-190, 1985.

GONG, W. et al. Abiotic reduction of trifluralin and pendimethalin by sulfides in black-carbon-amended coastal sediments. **Journal of Hazardous Materials**, v. 310, p. 125-134, 2016.

GRONWALD, J. W. Resistance to photosystem II inhibiting herbicides. In: POWLES, S.; HOLTUM, J. (eds.). **Herbicide resistance in plants: biology and biochemistry**. Boca Raton: CRC, p. 27-60, 1994.

GROUSELLE, M. et al. Effect of local anaesthetics on mitochondrial membrane potential in living cells. **Biochemical Journal**, v. 271, p. 269-272, 1990.

GROVER, R.; WOLT, J. D.; CESSNA, A. J.; SCHIEFER, H. B. Environmental fate of trifluralin. In: **Reviews of environmental contamination and toxicology**. Springer New York, p. 1-64, 1997.

GUTTERIDGE, J. M.; HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 899, p. 136-147, 2000.

HAJNOCZKY, G. MADESH, M. Calcium signaling and apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 304, p. 545-554, 2003.

HALESTRAP, A. A pore way to die. **Nature**, v. 434, p. 578-579, 2005.

HALESTRAP, A. P. Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. **Biochemical Society Transactions**, v. 34, p. 232-237, 2006.

HALESTRAP, A. P.; WOODFIELD, K. Y.; CONNERN, C. P. Oxidative stress, thiol reagents and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 6, p. 3346-3354, 1997.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 3 ed., Oxford University Press, New York, 1999.

HELENA, A. F. C. et al. Effects of isocoumarins isolated from *Paepalanthus bromelioides* on mitochondria: uncoupling, and induction/inhibition of mitochondrial permeability transition. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 161, p. 155-164, 2006.

HERTEL, C.; QUADER, H.; ROBINSON, D. G.; ROOS, I.; CARAFOLI, E.; MARMÉ, D. Herbicides and fungicides stimulate Ca^{+2} efflux from rat liver mitochondria. **FEBS Letters**, v. 127, n. 1, p. 37-39, 1981.

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

HUSER, J.; BLATTER, L. A. Fluctuations in mitochondrial membrane potential caused by repetitive gating of the permeability transition pore. **Biochemical Journal**, v. 343, p. 311-317, 1999.

IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. **International Agency for Research on Cancer**. Disponível em <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest_classif.php> Acesso em 07 de julho de 2017.

JOHNSTON, J.J. Introduction to Pesticides and Wildlife. **American Chemical Society**. Washington, cap 1, 2000.

JÚNIOR, L. R.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, n. 1, São Paulo, 2001.

KENWOOD, B. M. et al. Identification of a novel mitochondrial uncoupler that does not depolarize the plasma membrane. **Molecular Metabolism**, v. 3, p. 114-123, 2013.

KINNALLY, K. W. et al. Is mPTP the gatekeeper for necrosis, apoptosis, or both? **Biochimica et Biophysica Acta**, p. 616-622, 2011.

KLAUSNER, R. D. et al. Lipid domains in membranes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 255, n. 4, p. 1286-1295, 1980.

KOWALTOWSKI, A. J.; CASTILHO, R. F. Ca²⁺ acting at the external side of the inner mitochondrial membrane can stimulate mitochondrial permeability transition induced by phenylarsine oxide. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1322, p. 221-229, 1997.

KOWALTOWSKI, A. J.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. Ca(2+)-induced mitochondrial membrane permeabilization: role of coenzyme Q redox state. **American Journal of Physiology**, v. 269, p. C141-C147, 1995.

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

KOWALTOWSKI, A. J.; VERCESI, A. E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 26, p. 463-471, 1999.

KWONG, J. Q., MOLKENTIN, J. D., Physiological and pathological roles of the mitochondrial permeability transition pore in the heart. **Cell Metabolism**, v. 21, n. 2, p. 206-214, 2015.

LA PIANA, G. et al. Mitochondrial membrane potential supported by exogenous cytochrome c oxidation mimics the early stages of apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 246, p. 556-561, 1998.

LEBEL, C. P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, S. C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chemical Research in Toxicology**, v. 5, p. 227-231, 1992.

LEE, J.; YU, B. P.; HERLIHY, J. T. Modulation of cardiac mitochondrial membrane fluidity by age and calorie intake. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 26, p. 260-265, 1999.

LEMASTERS, J.J. Mechanisms of hepatic toxicity V. Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. **American Journal of Physiology**, v. 276, n. 1, p. 1-6, 1999.

LENAZ, G. et al. Effects of general anesthetics on lipid protein interactions and ATPase activity in mitochondria. **Biochemical Pharmacology**, v. 24, p. 2835-2844, 1978.

LESNEFSKY, E. J. et al. Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia-reperfusion, aging and heart failure. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, London, v. 33, p. 1065-1089, 2001.

LEUNG, A. W. C.; VARANYUWATANA, P.; HALESTRAP, A. P. The mitochondrial phosphate carrier interacts with cyclophilin D and may play a key role in the permeability transition. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 39, p. 26312-26323, 2008.

LIFSHITZ, N.; CLAIR, C. C. S. Coloured ornamental traits could be effective and non-invasive indicators of pollution exposure for wildlife. **Conservation Physiology**, v. 4, 2016.

LIU, Q. et al. Organochloride pesticides impaired mitochondrial function in hepatocytes and aggravated disorders of fatty acid metabolism. **Scientific Reports**, 7, 2017.

LIU, Y.; FISKUM, G.; SCHUBERT, D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. **Journal of Neurochemistry**, v. 80, p. 780-787, 2002.

LOSCHEN, G.; AZZI, A.; FLOHE, L. Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. **FEBS Letters**, v. 42, p. 68-72, 1974.

LOGAN, A.; MURPHY, M. P. Using chemical biology to assess and modulate mitochondria: progress and challenges. **Interface Focus**, 7, 2017.

LYONS-ABBOTT, S.; SACKETT, D. L.; WLOGA, D.; GAERTING, J.; MORGAN, R. E.; WEBOVETZ, K. A.; MORRISSETTE, N. S. α -Tubulin mutations alter oryzalin affinity and microtubule assembly properties to confer dinitroaniline resistance. **Eukaryot Cell**, v.9, n. 12, 2010.

MACSTAY, G. P.; CLARKE, S. J.; HALESTRAP, A. P. Role of critical thiol groups on the matrix surface of the adenine nucleotide translocase in the mechanism of the mitochondrial permeability transition pore. **Biochemistry Journal**, v. 367, p. 541-548, 2002.

MADUNGWE, N. B. et al. Critical role of mitochondrial ROS is dependent on their site of production on the electron transport chain in ischemic heart. **American Journal of Cardiovascular Disease**, 6(3), p. 93-108, 2016.

MAILLOUX, R. J.; TREBERG, J. R. Protein S-glutathionylation links energy metabolism to redox signaling in mitochondria. **Redox Biology**, v. 8, p. 110-118, 2016.

MAIOLI, M. A. et al. Mechanism for the uncoupling of oxidative phosphorylation by juliprosopine on rat brain mitochondria. **Toxicol**, 60, p. 1355-1362, 2012.

MARTINS, N. M. Avaliação do estresse oxidativo e estado redox mitocondrial na hepatotoxicidade induzida pela cisplatina em ratos Wistar: efeito protetor da dimetiltiouréia. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2007.

MARTINS, T. Herbicida Paraquat: conceitos, modo de ação e doenças relacionadas. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 34, n. 2, p. 175-186, 2013.

MAZZAANTI, L. et al. Lipid protein interactions in mitochondria. VIII. Effect of general anesthetics on the mobility of spin labels in lipid vesicles and mitochondrial membranes. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 11, p. 17-32, 1979.

MERCURIO, P. et al. Degradation of herbicides in the tropical marine environment: influence of light and sediment. **Plos One**, 11, p. 1-21, 2016.

MEYER, R.E.; BOVEY, R.W. Tebutiuron formulation and placement effects on response of woody plants and soil residue. **Weed Science**, Champaign, v.36, p.373-378, 1988.

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

MIURA, T.; TANNO, M. The mPTP and its regulatory proteins: final common targets of signaling pathways for protection against necrosis. **Cardiovascular Research**, v. 9, p. 181-189, 2012.

MUTURI, E. et al. Effect of pesticides on microbial communities in container aquatic habitats. **Scientific Reports**, 7, 44565, p. 1-10, 2017.

NASSEH, I. E. et al. Doenças Mitocondriais. **Revista Neurociências**, v. 9, p. 60-69, 2001.

NEGRISOLI, E. et al. Deposition and leaching of Tebutiuron on sugar cane straw applied with and without alkyl polyglycoside adjuvant. **J. Environ. Sci.**

Health. Part B, Pestic. Food Contam. Agric. Wastes, v. B40, n. 1, p. 207-214, 2005.

NICHOLLS, D. G.; CROMPTON, M. Mitochondrial calcium transport. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 11, p. 261-268, 1980.

NICHOLLS, D. G.; FERGUSON, S. J. **Bioenergetics 2**. Academic Press Inc.: London, 1982.

OLIVEIRA, H. C. F. et al. Oxidative stress in atherosclerosis-prone mouse is due to low antioxidante capacity of mitochondria. **The FASEB Journal**, v. 19, p. 278-280, 2005.

PAROLIN, M. B.; REASON, I. J. M. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. **Arquivos de Gastroenterologia**, v 38, n. 2, p. 138-144, 2001.

PEDERSEN, P. L. et al. Preparation and characterization of mitochondria and submitochondrial particles of rat liver and liver-derived tissues. **Methods in Cell Biology**, v. 20, p. 411-481, 1978.

PEREIRA, L. C. Alterações mitocôndrias induzidas por representantes das principais classes de Éteres Difenílicos Polibromados. **Dissertação de Mestrado**. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

PEREIRA, L. C.; SOUZA, A. O.; PAZIN, M.; DORTA, D. J. Mitocôndria como alvo para avaliação de toxicidade de xenobiótico. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 25, n. 1, p. 1-14, 2012.

PESTANA, C. R. Aspectos bioquímicos-estruturais do transportador de nucleotídeos de adenina, cardiolipinas e ciclofilina D na transição de permeabilidade mitocondrial induzida por Ca^{+2} . Ribeirão Preto, 2010. **Tese de Doutorado**, Universidade de São Paulo.

PETIT, P. X. et al. Analysis of the membrane potential of rat- and mouse-liver mitochondria by flow cytometry and possible applications. **European Journal of Biochemistry**, v. 194, p. 389-397, 1990.

PETRONILLI, V. et al. The Voltage Sensor of the Mitochondrial Permeability Transition Pore Is Tuned by the Oxidation-Reduction State of Vicinal Thiols. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 24, p. 16638-16642, 1994.

PITELLI, R. A.; DURIGAN, J. C. Interferência de plantas daninhas em culturas agrícolas. **Inf. Agropec.**, Belo Horizonte, v. 11, n. 129, p. 16-27, 1985.

PLAA, G. L.; WITSCHI, H. Chemicals, drugs, and lipid peroxidation. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 16, p. 125-142, 1976.

RAFAŁOWSKA, U. Transport of malate and citrate into rat brain mitochondria under hypoxia and anesthesia. **Neurochemical Research**, v. 4, n. 3, p. 355-364, 1979.

RAO, V. K.; CARLSON, E. A.; YAN, S. S. Mitochondrial permeability transition pore is a potential drug target for neurodegeneration. **Biochimica et Biophysica Acta**, In Press <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.09.003>, 2013.

RASOLA, A.; BERNARDI, P. The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. **Apoptosis**, London, v. 12, p. 815-833, 2007.

ROBERTS, D. L.; GOPLING, I. S.; BLEACKLEY, R. C. Mitochondrial at the heart of the cytotoxic attack. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 304, p. 513-518, 2003.

SAKAMURU, S. et al. Application of a homogenous membrane potential assay to assess mitochondrial function. **Physiological Genomics**, v. 44, p. 495-503, 2012.

SARASTE, M. Oxidative Phosphorylation at the fin de siècle. **Science**, v. 283, p. 1488-1493, 1999.

SEVERINGHAUS, J. W.; BRADLEY, A. F. Electrodes for blood pO₂ and pCO₂ determination. v. 13, p. 515-520, 1958.

SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T. M.; AMES, B. N. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, p. 10771-10778, 1994.

SLAVÍK, J. Anilidonaphthalene sulfonate as a probe of membrane composition and function. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 694, p. 1-25. 1982.

SODRÉ, F. F.; LOCATELLI, M. A. F.; JARDIM, W. F. Sistema limpo em linha para extração em fase sólida de contaminantes emergentes em águas naturais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 216-219, 2010.

SOUZA, M. D.; BOEIRA, R. C.; GOMES, M. A. F.; FERRACINI, V. L.; MAIA, A. H. N., Adsorção e lixiviação de tebutiuron em três tipos de solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 25, n. 4, 2001.

SPADOTTO, C. A.; GOMES, M. A. F., Agrotóxicos no Brasil. **Agência Embrapa de Informação Tecnológica**. Acesso em 10 de fevereiro de 2016 <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/arvore/CONTAG01_40_210200792814.html>

STARKOV, A. On the use of anaesthesia in rodents in studies with isolated mitochondria. Disponível em <www.oxphos.org/index.php?option=com_content&task=view&id=83&Itemid=75> Acesso em 12 de dezembro de 2015

STRYER, L. Bioquímica. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 4 ed., 1996.

SUDDABY, L. A. et al. Reanalysis of Experiments to Quantify Irreversibility of Pesticide Sorption–Desorption in Soil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 2033-2038, 2013.

SUGENG, A. J. et al. Hazard-ranking of agricultural pesticides for chronic health effects in Yuma County, Arizona. **Science of the Total Environment**, p. 1-19, 2013.

SUN, J. et al. Desensitizing mitochondrial permeability transition by ERK-cyclophilin D axis contributes to the neuroprotective effect of gallic acid against cerebral ischemia/reperfusion injury. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8:184, 2017.

THORE, A. Technical aspects of bioluminescent firefly luciferase assay of ATP. **Science Tools**, v. 26, n. 2, p. 30-34, 1979.

TSUJIMOTO, Y.; SHIMIZU, S. Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death. **Apoptosis**, v. 12, p. 835-840, 2006.

TYLER, D. D. The Mitochondrion. In: _____. **Principles of Medical Biology: Cellular Organelles and the Extracellular Matrix**. 1995, v. 3, p. 59-132, cap. 4.

URSO, M. L.; CLARKSON, P. M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology**, v. 189, p. 41-54, 2003.

VARANYUWATANA, P.; HALESTRAP, A. P., 2012. The roles of phosphate and the phosphate carrier in the mitochondrial permeability transition pore. **Mitochondrion**, v. 12, n. 1, p. 120-125, 2012.

VIDAL, R. A. **Herbicidas: mecanismos de ação e resistência de plantas**. Porto Alegre: R. A. Vidal, p. 165, 1997.

WALLACE, D. C. Mitochondrial diseases in man and mouse. **Science**, v. 283, p. 1482-1488, 1999.

WANG, C. J.; LIU, Z. Q. Foliar uptake of pesticides - Present status and future challenge. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 87, n. 1, p. 1-8, 2007.
TYLER, D. D. The Mitochondrion. In: _____. **Principles of Medical Biology: Cellular Organelles and the Extracellular Matrix**. 1995, v. 3, p. 59-132, cap. 4.

WEICHTAL, S. et al. A review of pesticide exposure and cancer incidence in the agricultural health study cohort. **Environmental health perspectives**, v. 118, n. 8, p. 1117-1125, 2010.

WINKLER, B. S.; DESANTIS, N.; SOLOMON, F. Multiple NADPH-producing pathways control glutathione (GSH) content in retina. **Experimental Eye Research**, v. 43, p. 829-847, 1986.

WONG, R.; STEENBERGEN, C.; MURPHY, E. Mitochondrial permeability transition pore and calcium handling. **Methods in Molecular Biology**, v. 810, p. 235-242, 2012.

ZORATTI, M.; SZABÒ, I. The mitochondrial permeability transition. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1241, p. 139-176, 1995.