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 tebutiuron
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

Oliveira, B	<p>Avaliação da toxicidade dos herbicidas trifluralina e tebutiuron utilizando ensaios mitocondriais</p>		<p>MESTRADO FCFRPUSP 2018</p>
-------------	--	--	---------------------------------------

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 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.

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 tebutiurum 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 tebutiurum na faixa de concentração de 1 $\mu\text{mol/L}$ a 100 $\mu\text{mol/L}$. Os resultados obtidos mostram que o tebutiurum 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, tebutiurum, 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.** Esquematização da estrutura mitocondrial
- Figura 5.** Esquematização do ciclo da glutathione
- 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 Herbicidas.....	1
1.2 Mitocôndria.....	7
2. OBJETIVO.....	Erro! Indicador não definido.
2.1 Objetivos específicos.....	Erro! Indicador não definido.
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	Erro! Indicador não definido.
3.1 Decapitação sem anestesia.....	Erro! Indicador não definido.
3.2 Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato e dosagem de proteína.....	Erro! Indicador não definido.
3.3 Dosagem de proteínas.....	Erro! Indicador não definido.
3.4 Respiração mitocondrial.....	Erro! Indicador não definido.
3.5 Intumescimento Osmótico Mitocondrial.....	Erro! Indicador não definido.
3.6 Lipoperoxidação de membrana.....	Erro! Indicador não definido.
3.7 Potencial de Membrana.....	Erro! Indicador não definido.
3.8 Avaliação do Estado Redox dos Nucleotídeos de Piridina.....	Erro! Indicador não definido.
3.9 Interação com membrana mitocondrial interna.....	Erro! Indicador não definido.
3.10 Movimentação e Liberação de Ca^{+2}	Erro! Indicador não definido.
3.11 Concentração mitocondrial de ATP.....	Erro! Indicador não definido.
3.12 Concentração mitocondrial de Glutathione Reduzida (GSH) e Glutathione Oxidada (GSSG).....	Erro! Indicador não definido.
3.13 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio.....	Erro! Indicador não definido.

3.14 Análise estatística	Erro! Indicador não definido.
4. RESULTADOS	Erro! Indicador não definido.
4.1 <i>Respiração Mitocondrial</i>	Erro! Indicador não definido.
4.2 <i>Potencial de membrana</i>	Erro! Indicador não definido.
4.3 <i>Interação com membrana mitocondrial interna</i>	Erro! Indicador não definido.
4.4 <i>Intumescimento osmótico mitocondrial</i>	Erro! Indicador não definido.
4.5 <i>Movimentação e liberação de Ca^{+2}</i>	Erro! Indicador não definido.
4.6 <i>Concentração mitocondrial de ATP</i>	Erro! Indicador não definido.
4.7 <i>Produção de espécies reativas de oxigênio</i>	Erro! Indicador não definido.
4.8 <i>Lipoperoxidação de membrana</i>	Erro! Indicador não definido.
4.9 <i>Avaliação do estado redox dos nucleotídeos de piridina</i>	Erro! Indicador não definido.
4.10 <i>Concentrações mitocondriais de glutathione reduzida (GSH) e glutathione oxidada (GSSG)</i>	Erro! Indicador não definido.
5. DISCUSSÃO	Erro! Indicador não definido.
6. CONCLUSÃO	16
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17

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 tebutiuram, 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 tebutiuram 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. Consequentemente, 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 $FADH_2$, 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 patologêses 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 glutathione 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 glutathione peroxidase, há o consumo de glutathione reduzida, que por sua vez, é regenerada pela glutathione 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 H_2O_2 se acumula na mitocôndria, e na presença de Fe^{2+} 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.

6. CONCLUSÃO

Com base nos objetivos do trabalho e nos resultados obtidos, pode-se concluir que o tebutiuram 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. **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. Ca^{2+} 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. Necroptosis 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. **Toxicon**, 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. Anilinonaphthalene 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 tebuthiuron 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.

WEICHTENTAL, 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.