

EFEITO DO CONTAMINANTE CLOROTALONIL NA ENZIMA GLUTATIONA S-TRANSFERASE

RODRIGO SANTOS¹; EDUARDO RIBEIRO²; MALUARE CANTELE³; JULIANO ZANETTE⁴

¹ *Graduando em Medicina Veterinária - Universidade Federal de Pelotas – rodrigo7887@gmail.com*

² *Graduando em Engenharia Bioquímica - Universidade Federal do Rio Grande – eduardosilveiraribeiro@yahoo.com*

³ *Graduanda em Engenharia Bioquímica - Universidade Federal do Rio Grande – maluarecantele@gmail.com*

⁴ *Professor Adjunto do Departamento de Ciências Biológicas (FURG) – julianozanette@furg.br*

1. INTRODUÇÃO

O clorotalonil (2,4,5,6-tetrachloroisophthalonitrile) é um composto orgânico utilizado primariamente na agricultura como um fungicida de amplo espectro. Apesar do notável uso nas lavouras, a aplicação desta substância ainda estende-se aos pesticidas, acaricidas e também como protetor de superfícies expostas à água (U.S. EPA, 1999). Em ambientes aquáticos, enfatiza-se a utilização como princípio ativo contra a formação e o estabelecimento de comunidades bioincrustantes sobre estruturas em contato com a água, as chamadas tintas anti-incrustantes (CASTRO et al, 2011). Como essa substância pode apresentar toxicidade para peixes e invertebrados aquáticos (ONDUKA, 2012), existe a necessidade de entender mais sobre seu mecanismo de atuação.

As glutationa S-transferases (GSTs) compõem uma família multigênica de complexos enzimáticos de detoxificação e podem ser utilizados como biomarcadores da contaminação ambiental. Isto porque, as GSTs podem ser induzidas ou inibidas frente à exposição a certos contaminantes (SCHLENK et. al., 2008). No presente estudo, amostras de fígado de Carpa comum (*Cyprinus Carpio*) foram utilizadas, uma vez que é sabido que contaminantes ambientais podem ser biotransformados por estas enzimas nesta espécie de peixe (NICHOLS et al., 2006). Baseando-se no genoma de peixe-zebra (*Danio rerio*), GLISIC e colaboradores (2015) identificaram cerca de 30 genes relacionados a isoformas de GSTs. Espera-se que a carpa comum tenha um número semelhante de isoformas de GSTs, se comparado ao peixe-zebra, por pertencerem à mesma ordem *Cypriniforme*.

O ensaio competitivo é um método amplamente aceito para observar a atividade enzimática da GST (EISENTHAL&DANSON, 2008). Sendo o CDNB um substrato conhecido das GSTs, a sua conjugação é um parâmetro para avaliar a interação destas com o contaminante testado. Dessa forma, os objetivos deste estudo foram: 1) verificar se há interação entre clorotalonil e a conjugação dos complexos enzimáticos com o CDNB através de diferentes concentrações da substância em um ensaio enzimático competitivo *in vitro*; 2) avaliar se as concentrações saturante e K_m de CDNB causam alteração na atividade enzimática.

2. METODOLOGIA

Extratos correspondentes à fração de fígado de *Cyprinus carpio* foram preparados e utilizados em ensaio enzimático espectrofotométrico utilizando tampão fosfato de potássio com pH 7,0, 1-cloro-2,4-nitrobenzeno (CDNB) e Glutationa reduzida (GSH) na concentração 0,1 M e pH 7,0 de acordo com KEEN (1976).

A concentração saturante do substrato CDNB é usualmente escolhida para ensaios competitivos *in vitro* (FERNANDES, 2001). Um estudo anterior do nosso grupo de pesquisa confeccionou uma curva de atividade das GSTs em função do CDNB para uma amostra do extrato S9 de brânquia de carpa. A partir desta curva, foi possível estabelecer o valor de concentração saturante, que é correspondente à concentração necessária para atingir $V_{\text{máx}}$ (velocidade máxima) e outra não-saturante, K_m , que pode ser definida como a concentração necessária para alcançar metade de $V_{\text{máx}}$ (NELSON, 2000). Portanto, foram utilizadas no presente estudo as concentrações de CDNB saturante e K_m (1,2 mM e 0,3 mM, respectivamente).

Para o ensaio enzimático utilizou-se a temperatura constante em 29ºC, e o tempo de ensaio estabelecido de 3 minutos. Para o ensaio competitivo, concentrações K_m e saturante de CDNB (0,42 e 4,20 mM, respectivamente) foram escolhidas para avaliar o efeito competitivo do contaminante clorotalonil na atividade da GST utilizando-se de DMSO (dimetil sulfóxido; 1%) como solvente. Os valores das médias das atividades enzimáticas foram comparados utilizando ANOVA - Tukey ($p<0.05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeiramente, foram realizados os ensaios do grupo de controle com 1,2 mM de CDNB, extrato S9 de fígado e DMSO. Em seguida, acrescentou-se 0,42 mM de clorotalonil ao DMSO e notou-se que a atividade foi reduzida em 15,8%. Dando sequência, aumentou-se a concentração do contaminante em 10 vezes, ou seja, foi empregado 4,20 mM de clorotalonil, onde a análise dos dados mostrou uma queda da atividade enzimática de 15,9%, também em relação ao controle. Seguindo o mesmo protocolo, foram feitos os mesmos procedimentos para a concentração não-saturante (0,3 mM). Desta vez, a redução foi de 14,2% com a concentração menor de clorotalonil e 14,6% para a concentração 10 vezes maior conforme a Figura 1 ilustra.

A partir da análise estatística, pode-se observar que o clorotalonil causou uma queda da atividade enzimática, em relação ao grupo controle (aproximadamente 15% em ambas as concentrações de clorotalonil e CDNB). Utilizar uma concentração de CDNB abaixo da saturante tinha o objetivo de exacerbar a resposta obtida pela ação do clorotalonil, pois a competição deste pelo extrato S9 de fígado é supostamente facilitada ao diminuir a concentração do substrato principal das GSTs. Com base nisso, observou-se que a concentração de CDNB não influenciou nos resultados.

Não houve correlação aparente entre o efeito inibitório na GST e as doses de clorotalonil testadas, portanto, não foi possível observar uma relação dose-dependente para as concentrações do contaminante testadas. É possível que 15 % de inibição pelo clorotalonil seja o valor máximo de inibição possível para a amostra de S9 de fígado de carpa, uma vez que não foi possível aumentar este

valor de inibição, mesmo com o uso de uma concentração 10 vezes maior do composto. Supõe-se que a quantidade de contaminante extra excede a quantidade disponível de isoformas de GST destinadas à conjugação do composto (dose acima da saturante). Como o extrato de fígado supostamente possui várias isoformas de GSTs entende-se que o clorotalonil é o substrato de algumas delas. Com base no que foi exposto acima, é possível que 85% das GSTs presentes no extrato tenham especificidade pelo CDNB mas não pelo clorotalonil.

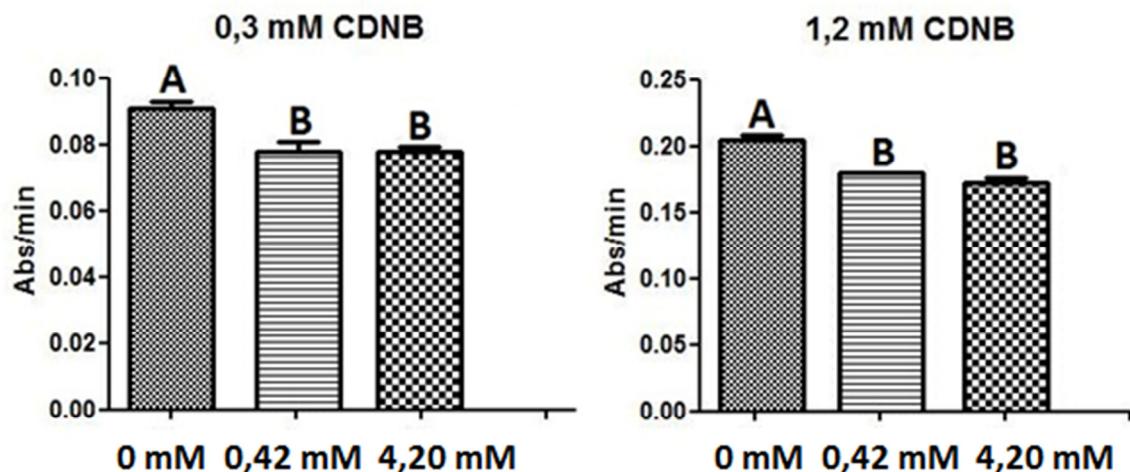


Figura 1: Atividade enzimática do extrato S9 de fígado dos grupos expostos a 0 mM (controle), 0,42 mM e 4,20 mM de clorotalonil, nas concentrações de 0,3 mM e 1,2 mM de CDNB. Letras iguais representam ausência de diferença estatística.

4. CONCLUSÕES

O tipo de interação que é estabelecida entre as GSTs e o clorotalonil não foi determinado no presente estudo. Dessa forma, o contaminante ou atua como substrato das GSTs ou apenas age como um regulador da sua atividade enzimática. Ademais, é necessária a realização de mais pesquisas no sentido de esclarecer as isoformas específicas que têm maior atuação na relação entre o clorotalonil e as GSTs, bem como utilizar concentrações mais baixas do contaminante para assim visualizar melhor a sua inibição.

A partir dos resultados obtidos, percebe-se que a atividade enzimática é influenciada de alguma forma pela adição do contaminante em ensaios enzimáticos *in vitro*. No entanto, não parece possuir relação dose-dependente com as concentrações testadas e tampouco diferentes concentrações de CDNB causam aumento da sensibilidade do teste. Como geralmente os substratos das GSTs são compostos tóxicos fica claro que o clorotalonil é potencialmente impactante ao ecossistema marinho como componente de tintas anti-incrustantes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CASTRO, I.; FILLMANN, G. Tintas anti-incrustantes de terceira geração: novos biocidas no ambiente aquático, **Química Nova**. v. 34, 2011
- EISENTHAL R.; DANSON M.J. **Enzyme Assays: A Practical Approach**. Oxford University Press, England, 2002

FERNANDES, E. M. A. **Avaliação da Toxicidade de Cianobactérias para Brachydanio rerio utilizando ensaios a diferentes níveis de organização biológica.** 2001. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada) – Curso de pós Graduação em Ecologia Aplicada, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

GLISIC, B.; MALJEVIC, I.; POPOVIC, M.; ZAJA, R.; LONCAR, J.; FENT, K.; KOVACEVIC, R.; SMITAL, T. Characterization of glutathione-S-transferases in zebrafish (*Danio rerio*). ***Aquatic Toxicology*** v.158 p.50-62. 2015.

GUSTAVINO, B.; BUSCHINI, A. Modulating effects of humic acids on genotoxicity induced by water disinfectants in *Cyprinus carpio*. ***Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis***, v.587, p.103-113, 2005.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione-S-transferases. ***J. Biol. Chem.*** v.251(20), p.6183-6188, 1976.

NELSON, D. L.; COX, M. Lehninger – Princípios de Bioquímica. São Paulo. Sarvier, 2002.

ONDUKA, T.; KAKUNO, A.; KONO, K.; ITO, K.; MOCHIDA, K. Toxicity of chlorothalonil to marine organisms. ***Fisheries Science*** 78.6, p.1301-1308, 2012

SCHLENK, D.; CELANDER, M.; GALLAGHER, E.; GEORGE, S.; JAMES, M.; KULLMAN, S.; VAN DEN HURK, P.; WILLET, K. Biotransformation in Fishes. In: Di Giulio RT, Hinton DE, editors. ***The Toxicology of Fishes***. CRC press; New York: p.153–234, 2008.

U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency). **Re-registration Eligibility Decision (RED) of Chlorothalonil.** EPA-738-R-99-004. Prevention, Pesticides, and Toxic Substances, 1999