

PERFIL TOXICOLÓGICO DO CLOMAZONE SOB A PERSPECTIVA IN SILICO: AMPLIANDO POSSIBILIDADES E REDUZINDO CUSTOS

Elvio Serpa ¹

Thais Pasqualli ²

Queila Amaral ³

Lavinia Veiga ⁴

Luis Flavio Souza De Oliveira ⁵

Michel Mansur Machado ⁶

Resumo:

Clomazone é um herbicida bastante empregado, inclusive no manejo de alimentos. A regulamentação sobre Clomazone não é bem estabelecida, apesar da ANVISA estabelecer sua classificação de risco, inclusive no meio ambiente. Os estudos sobre aspectos de carcinogenicidade, mutagenicidade ou efeitos teratogênicos, são escassos. O presente estudo analisou diferentes plataformas de predição computacional sob o viés toxicológico. O objetivo deste trabalho foi avaliar interações do Clomazone com alvos moleculares específicos, evidenciando características de sua própria molécula que possam colaborar para entender seu potencial toxicológico, em plataformas de análise in silico. Buscamos o código SMILE do Clomazone e inserimos, posteriormente, esse nas plataformas Molinspiration, Way2Drug e Lazar que utilizando modelos matemáticos, buscaram avaliar o potencial mutagênico, carcinogênico, teratogênico e citotóxico do Clomazone, bem como informações físico-químicas relevantes. O composto estudado demonstrou na plataforma Molinspiration elevado potencial de absorção em epitélio intestinal e em monocamadas de Caco-2, além de ser potencialmente permeável à barreira hematoencefálica. Já na plataforma Way2Drug Clomazone demonstrou possuir potencial carcinogênico, com tendência à indução de adenocarcinoma de colón, além de alterações na expressão de proteínas, mRNAs e genes em células MCF-7 -uma linhagem de câncer de mama. O programa Lazar revelou que o Clomazone apresenta alta capacidade penetrante na barreira hematoencefálica e a concentração máxima de exposição diária para humanos, que seria de 1,23 mg/kg. Estudos experimentais biológicos se fazem necessários explicar achados deste estudo. Nosso grupo traz à luz através de análises in silico características importantes referentes ao potencial carcinogênico. Demonstramos que plataformas de análise in silico predizem rapidamente com eficácia e baixo custo danos ao organismo.

Palavras-chave: Herbicida; Genotoxicidade; Mutagenicidade

Modalidade de Participação: Pós-Graduação

PERFIL TOXICOLÓGICO DO CLOMAZONE SOB A PERSPECTIVA IN SILICO: AMPLIANDO POSSIBILIDADES E REDUZINDO CUSTOS

¹ Aluno de pós-graduação. serpaelvio@gmail.com. Autor principal

² Aluno de Pós-Graduação. thais.pasqualli@yahoo.com.br. Co-autor

³ Aluno de Pós-graduação. queilamaral@yahoo.com.br. Co-autor

⁴ acadêmico de graduação. lavi.veiga10@gmail.com. Co-autor

⁵ Docente. luisoliveira@unipampa.edu.br. Orientador

⁶ Professor. micmanmac@gmail.com. Co-orientador

PERFIL TOXICOLÓGICO DO CLOMAZONE SOB A PERSPECTIVA *IN SILICO*: AMPLIANDO POSSIBILIDADES E REDUZINDO CUSTOS

Introdução

O Clomazone (CZN) é um herbicida pertencente à classe das isoxazolidinonas, amplamente empregado no controle de ervas invasoras em vários cultivares, tais como: arroz, batata, milho, pimentão, soja, entre outros (SILVA et al., 2012). O intervalo de segurança (período entre a última aplicação e a colheita) não é bem estabelecido pelos órgãos regulamentadores, já que a especificação de emprego consiste no controle pré-emergência (MACHADO et al., 2006). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), esse composto apresenta classificação toxicológica Classe III, medianamente tóxico. No meio ambiente esse produto também é enquadrado na Classe III, considerado perigoso, altamente móvel e persistente no solo, podendo atingir lençóis freáticos. Estudos prévios sugerem que CZN apresenta baixa toxicidade e poucas evidências de carcinogenicidade, mutagenicidade ou efeitos teratogênicos (LAFFRANQUE et al., 2002). Dessa forma, nosso principal objetivo foi avaliar as interações do CZN com alvos moleculares específicos e evidenciar características de sua própria molécula que, conjunta ou isoladamente, possam colaborar para entender melhor seu potencial toxicológico, através de plataformas de análise *in silico*, em especial sobre o potencial carcinogênico, mutagênico, teratogênico e citotóxico do CZN. Dentro deste contexto, submetemos a molécula do CZN a diferentes plataformas de predição computacional sob o viés toxicológico, de forma a otimizar tempo, racionalizar custos e corroborar com o desenho experimental de futuros estudos biológicos.

Metodologia

Inicialmente buscou-se o código SMILE do CZN e, posteriormente, esse código foi inserido nas plataformas *Molinspiration*, *Way2Drug* e *Lazar* para obtenção de dados referentes às características da estrutura e suas possíveis interações com alvos moleculares endógenos. As plataformas utilizadas neste estudo dispõem de uma ampla base de dados de moléculas que, através de modelos matemáticos, buscaram avaliar o potencial carcinogênico, mutagênico, teratogênico e citotóxico do CZN, além de outras informações físico-químicos relevantes.

Resultados

Os dados obtidos das análises *in silico* estão dispostos na tabela 1. A análise na plataforma *Molinspiration* apontou que o CZN possui elevado potencial de absorção em epitélio intestinal e em monocamadas de Caco-2, além de ser potencialmente permeável à barreira hematoencefálica. A plataforma *Way2Drug* apontou que o CZN possui potencial carcinogênico, com tendência à indução de adenocarcinoma de colón, além de alterações na expressão de proteínas, mRNAs e vários genes em células MCF-7 - uma linhagem de câncer de mama. O programa *Lazar* revelou que o CZN apresentaria alta permeabilidade à barreira hematoencefálica e que a concentração máxima de exposição diária ao CZN para humanos seria de 1,23 mg/kg.

Tabela 1: características do CZN nas plataformas *Molinspiration*, *Way2Drug* e *Lazar*.

Plataformas	DMD	PMB	ABS	PCGN	LIPOS
<i>Molinspiration</i>	-	Alta	Alta	Alta	Alta
<i>Way2Drug</i>	-	Alta	Alta	Alta	-
<i>Lazar</i>	1,23 mg/kg	Alta	Alta	-	-

DMD = Dose máxima diária; PMB = Permeabilidade; ABS = Absorção; PCGN = Potencial carcinogênico; LIPOS = Lipossolubilidade.

Discussão

Apesar de utilizarem modelos matemáticos preditivos, as análises *in silico* nos revelam

um panorama preocupante sobre a exposição humana ao CZN. A alta absorção intestinal e em monocamadas em linhagem de células Caco-2, a permeabilidade à barreira hematoencefálica podem estar relacionados com sua lipossolubilidade em consonância com estudo de Pereira et al. (2013). Concomitante a isso, seu potencial carcinogênico, em especial para câncer de mama – linhagem MCF-7, provavelmente esteja relacionado à regulação de mais de 30 genes dessa linhagem, diminuindo a expressão de FOXM1 gene importante na manutenção genômica, sendo sua superexpressão relacionado à promoção da proliferação celular, migração e invasão de células cancerosas, como por exemplo, no câncer de ovário (WEN et al., 2014). Outro gene afetado à exposição do CZN é o UBE2C, que possui relação direta, no caso, com o aumento da proliferação celular e diminuição da sensibilidade de células do câncer de mama à radioterapia e ao tratamento com os fármacos doxorubicina, tamoxifeno e letrozol (RAWAT et al., 2013). Adicionalmente, o CZN age aumentando a ativação do gene CCL5, que está relacionado com pró-malignidade do câncer de mama (SORIA et al., 2012); bem como aumentando a ativação do gene DDX60, o qual está relacionado com aumento do processo tumorigênico (FU et al., 2016). Esses resultados contrapõem-se aos encontrados pela Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA) (2007), onde o composto demonstrou segurança após três testes de Ames serem realizados. No entanto, corroborou com o achado de Cattaneo et al. (2011), onde o CZN demonstra formação de espécies reativas de oxigênio, grande aumento na população de micronúcleos, bem como danos ao DNA de eritrócitos de carpas expostas a 5,0 mg/L do herbicida CZN. Esses resultados sugerem que o CZN pode induzir alterações celulares significativas, fazendo supor que sua exposição possa trazer prejuízos à saúde humana.

Conclusão

Estudos experimentais biológicos se fazem necessários para confirmar e explicar os achados deste estudo. Nosso grupo traz à luz através de análises *in silico* características importantes na absorção, bem como interações do CZN com proteínas e mRNAs, predizendo um potencial carcinogênico. Dessa forma, fica claro que as plataformas de análise *in silico* podem contribuir na investigação de compostos com potencial de dano ao organismo de forma rápida, com baixo custo e balizar pesquisas experimentais, sejam *in vitro* ou *in vivo*.

Referências

- MACHADO, R. F. et al. Reflexos do mecanismo de ação de herbicidas na qualidade fisiológica de sementes e na atividade enzimática em plântulas de arroz. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 3, p. 151-160, 2006.
- SILVA, V. N. B. Tolerância de *Ricinus communis* L. ao herbicida clomazone em solos com diferentes capacidades de adsorção. 2011. 31f. **Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas)**. Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2012. Disponível em: <http://dspace.bc.uepb.edu.br/jspui/handle/123456789/196>. Acesso 09 de setembro de 2018.
- SILVA, M. S. et al. Effect of the association of clomazone in alginate/chitosan nanoparticles under soil sorption. **Química Nova**, v. 35, n. 1, p. 102-107, 2012.
- PEREIRA, L.; FERNANDES, M. N.; MARTINEZ, C. BR. Hematological and biochemical alterations in the fish *Prochilodus lineatus* caused by the herbicide clomazone. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 36, n. 1, p. 1-8, 2013.
- PETERS, L. P. **Efeito dos herbicidas ametrina e clomazone no sistema antioxidante bacteriano**. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, University of São Paulo, Piracicaba, 2011. doi:10.11606/D.11.2011.tde-28062011-151621. Acesso em: 2018-09-05.
- CATTANEO, Roberta. **Toxicological parameters in carp (*Cyprinus carpio*) exposed to a commercial formulation of clomazone (gamit®)**. 2011. 146 f. Tese (Doutorado em

Bioquímica) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

LAFFRANQUE, J. P.; LEBLANC, J.; PEAR, N. Clomazone. A multi-crop herbicide. **Phytoma. La Défense des Végétaux (France)**, 2002.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance clomazone. **EFSA Journal**, v. 5, n. 8, p. 109r, 2007.

FU, T-Y. et al. Subsite-specific association of DEAD box RNA helicase DDX60 with the development and prognosis of oral squamous cell carcinoma. **Oncotarget**, v. 7, n. 51, p. 85097, 2016.

SORIA, G. et al. Mechanisms regulating the secretion of the promalignancy chemokine CCL5 by breast tumor cells: CCL5's 40s loop and intracellular glycosaminoglycans. **Neoplasia (New York, NY)**, v. 14, n. 1, p. 1, 2012.

RAWAT, A. et al. Inhibition of ubiquitin conjugating enzyme UBE2C reduces proliferation and sensitizes breast cancer cells to radiation, doxorubicin, tamoxifen and letrozole. **Cellular oncology**, v. 36, n. 6, p. 459-467, 2013.

WEN, N. et al. Overexpression of FOXM1 predicts poor prognosis and promotes cancer cell proliferation, migration and invasion in epithelial ovarian cancer. **Journal of translational medicine**, v. 12, n. 1, p. 134, 2014.