



CAMPUS CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E FARMACÊUTICAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
LABORATÓRIO DE QUÍMICA MEDICINAL E AMBIENTAL TEÓRICA

ESTUDO TEÓRICO (MODELAGEM MOLECULAR E QSAR) DE
COMPOSTOS QUINOLÍNICOS COM ATIVIDADE HERBICIDA

TAISA PEREIRA PIACENTINI RIBEIRO

CASCAVEL - PARANÁ

2017

TAISA PEREIRA PIACENTINI RIBEIRO

ESTUDO TEÓRICO (MODELAGEM MOLECULAR E QSAR) DE
COMPOSTOS QUINOLÍNICOS COM ATIVIDADE HERBICIDA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Borges de Melo

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Cascavel - Paraná

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

R372e Ribeiro, Taisa Pereira Piacentini
Estudo teórico (modelagem molecular e QSAR) de compostos quinolínicos com atividade herbicida . / Taisa Pereira Piacentini Ribeiro.— Cascavel, 2017. 88 p.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Borges de Melo

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, 2017
Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Farmacêuticas

1. Inibição do PET. 2. Estudos de relação estrutura-atividade quantitativa. 3. Regra de três de Briggs. 4. Triagem virtual. I. Melo, Eduardo Borges de. II. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. III. Título.

CDD 21.ed. 615
CIP-NBR 12899

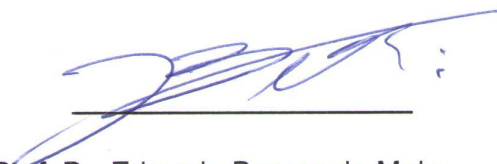
Ficha catalográfica elaborada por Helena Soterio Beijo – CRB 9ª/965

TAISA PEREIRA PIACENTINI RIBEIRO

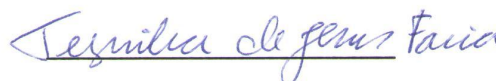
ESTUDO TEÓRICO (MODELAGEM MOLECULAR E QSAR) DE
COMPOSTOS QUINOLÍNICOS COM ATIVIDADE HERBICIDA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Eduardo Borges de Melo
Universidade Estadual do Oeste do Paraná
UNIOESTE
Orientador



Prof. Dra. Terezinha de Jesus Faria
Universidade Estadual de Londrina
UEL
Banca



Profa. Dr. Maurício Ferreira da Rosa
Universidade Estadual do Oeste do Paraná
UNIOESTE
Banca

Cascavel - Paraná

2017

BIOGRAFIA

TAISA PEREIRA PIACENTINI RIBEIRO

Filha de João Carlos Piacentini e Maria Aparecida Pereira Piacentini e cônjuge de Marcelo Henrique Ribeiro. Nasceu em 1989, no município de Apucarana-PR. Atualmente é Farmacêutica estatutária da Secretaria de Saúde do Município de Toledo-PR, como Diretora Técnica da Central de Abastecimento Farmacêutico. Graduada em Farmácia pela Universidade Estadual de Londrina (2011), trabalhou por três anos (2011-2014) como analista de Controle de Qualidade no laboratório Instrumental da Indústria Farmacêutica Prati Donaduzzi em Toledo. É especialista em Farmacologia Lato Sensu pela Universidade Católica Dom Bosco (2015). Em 2015, iniciou suas atividades no Programa de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da UNIOESTE, na área de fármacos e medicamentos, com pesquisa em modelagem molecular e estudos de QSAR.

*“O mundo está cheio de coisas mágicas, que pacientemente esperam que a
nossa percepção fique mais aguçada.”*

Bertrand Russell



Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu amado esposo, Marcelo Henrique Ribeiro, que sempre acreditou em mim e acompanhou de perto esta conquista.

Agradecimentos

A Deus, Senhor da minha vida, pela sabedoria, proteção e por permitir que tudo isso fosse possível.

Ao meu esposo, Marcelo, pelo incentivo e apoio em todas as minhas decisões e por estar sempre ao meu lado.

Aos meus pais e ao meu irmão, pelo suporte e amor incondicional.

Ao meu orientador, Professor Dr. Eduardo Borges de Melo - brilhante pesquisador - pelos ensinamentos, paciência e dedicação.

À Ms. Luana Campos, pela amizade, ensinamentos, e pela colaboração com o trabalho e com as produções enviadas para congressos.

Aos colegas de turma, pelos compartilhamentos de experiências e trabalhos em equipe.

À universidade (UNIOESTE) e ao Programa de Pós Graduação Stricto-sensu em Ciências Farmacêuticas (PCF) e todo o seu corpo docente e administrativo, em especial à coordenadora Professora Dra. Luciana Oliveira de Fariña, pela oportunidade e pela dedicação ao programa e aos alunos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), e à Fundação Araucária pelo suporte financeiro.

À Professora Dra. Flávia Manarin, pela participação na banca de qualificação, pelas contribuições para a melhoria do trabalho e pela orientação no desenvolvimento do artigo científico, um dos resultados deste trabalho.

Ao Professor Dr. Fávero Paula, pela participação na banca de qualificação, pelas contribuições para a melhoria do trabalho e pela parceria, através da UNIPAMPA, que possibilitou o acesso ao programa Pentacle.

Ao Professor Dr. Daniel Kawano, da UNICAMP, que gentilmente realizou as análises de toxicidade “in silico” no software Derek Nexus.

À Professora Dra. Terezinha Faria e ao Professor Dr. Maurício da Rosa pela participação na banca de defesa e pelas contribuições para a melhoria do trabalho.

ESTUDO TEÓRICO (MODELAGEM MOLECULAR E QSAR) DE COMPOSTOS QUINOLÍNICOS COM ATIVIDADE HERBICIDA

RESUMO

A busca de novos herbicidas para o controle de ervas daninhas resistentes é necessária para atender à crescente demanda alimentar da população mundial. Este trabalho foi dividido em duas partes. A primeira teve por objetivo a obtenção de modelos de QSAR-2D, 3D e híbrido para previsão de compostos com atividade de inibição da fotossíntese. Para isso, foi utilizado um conjunto de dados formado por 44 análogos de quinolina descritos na literatura como inibidores do PET e todos testados pela mesma metodologia de ensaio biológico. Para construção dos modelos foram utilizados os programas QSAR Modeling e Pentacle. Os modelos A, C e D obtidos foram aprovados nos testes de validação (interna e externa), são robustos e com boa capacidade de previsão. A segunda parte do estudo teve como objetivo a identificação de um modelo farmacofórico, para compostos selecionados do conjunto de dados da primeira parte, visando o uso do mesmo como ferramenta para triagem virtual. A pesquisa resultou em 86.560 compostos, e assim foram aplicados diversos filtros de seleção de acordo com a regra de três de Briggs, análises “in silico” de toxicidade, técnica de reconhecimento de padrões não supervisionados (PCA), e estudos e ancoramento molecular. Como resultado, restaram 28 compostos, sendo que todos mostraram potencial para serem herbicidas, através da previsão utilizando os modelos de QSAR obtidos, porém apenas o modelo D mostrou-se confiável para previsão da triagem virtual. Por fim, foram selecionados os dez compostos que apresentaram maior valor de previsão de atividade de inibição do PET, utilizando o modelo D.

Palavras-Chave: inibição do PET; estudos de relação estrutura-atividade quantitativa; regra de três de Briggs; triagem virtual

THEORY STUDY (MOLECULAR MODELING AND QSAR) OF QUINOLINE COMPOUNDS WITH HERBICIDE ACTIVITY

ABSTRACT

The search for new herbicides to control herbicides-resistant weeds is necessary to attend the rising demand of food from the world's population. This work was divided into two parts. The first aimed to obtain a model of QSAR-2D, 3D and hybrid to predict compounds with activity to the inhibition of photosynthesis. For this, was used a data set of 44 quinoline analogues described in the literature as PET inhibitors, and all tested in the same bioassay method. For construction of models were used the programs QSAR Modeling and Pentacle. The obtained models A, C and D, were approved in the validation tests (internal and external), they are robust and with good predictive capacity. The second part of studie aimed to identify a pharmacophore model, for select compounds from the data set of first part, aiming to use as a tool for virtual screening. The research resulted in 86,560 compounds, and thus several screening filters were applied according to Briggs rule of three, in silico toxicity analyzes, unsupervised pattern recognition (PCA), and docking studies. As a result, 28 compounds remained, all of which showed potential to be herbicides, through the prediction using the obtained QSAR models, however, only the model D proved to be reliable for prediction the virtual screening. Finally, we selected the ten compounds that presented the highest predictive value of PET inhibition activity, using the model D.

Keywords: PET-inhibiting; studies of quantitative structure-activity relationship; Briggs rule of three; virtual screening

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	2
2.1 Objetivo geral	2
2.2 Objetivos específicos.....	2
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
3.1 O processo de fotossíntese e mecanismo de ação dos inibidores do FSII.....	4
3.2 Herbicidas inibidores do FSII	5
3.2.1 Triazinas.....	8
3.2.2 Triazinonas.....	10
3.2.3 Triazolinonas	11
3.2.4 Uréias.....	12
3.2.5 Anilidas.....	14
3.2.6 Benzotiadiazinonas	15
3.2.7 Benzonitrilas.....	16
3.3 Ervas daninhas resistentes a herbicidas	17
3.4 Planejamento de fármacos auxiliado por computadores	19
3.4.1 Planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor (SBDD). 19	
3.4.1.1 Ancoramento molecular	20
3.4.2 Planejamento de fármacos baseado na estrutura dos ligantes (LBDD) 21	
3.4.2.1 Modelo farmacofórico	21
3.4.2.2 Estudos de QSAR	22
3.5 Modelagem molecular	24
3.5.1 Aproximação clássica.....	25
3.5.1.1 Mecânica molecular	25
3.5.1.2 Dinâmica molecular.....	26
3.5.2 Aproximação quântica.....	26
3.5.2.1 Métodos “ab initio”	26
3.5.2.2 Métodos semi-empírico	27
3.5.2.3 Teoria do funcional de densidade	27
4 PARTE I – ESTUDO DE QSAR	28
4.1 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1.1 Seleção do conjunto de dados	28

4.1.2 Modelagem molecular	28
4.1.3 Estudos de QSAR	29
4.1.3.1 QSAR-2D	29
4.1.3.1.1 Obtenção dos descritores.....	30
4.1.3.1.2 Seleção de variáveis e construção do modelo	32
4.1.3.1.3 Validação do modelo	32
4.1.3.2 QSAR-3D	34
4.1.3.2.1 Cálculo dos MIFs e dos descritores GRIND	35
4.1.3.2.2 Seleção de variáveis, construção dos modelos e validação	36
4.1.3.2.3 Interpretação dos modelos	36
4.1.3.3 QSAR modelo híbrido	37
4.1.3.3.1 Construção dos modelos.....	37
4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.2.1 QSAR-2D	37
4.2.2 QSAR-3D	43
4.2.3 QSAR modelo híbrido	49
5 PARTE II – TRIAGEM VIRTUAL.....	52
5.1 MATERIAL E MÉTODOS.....	52
5.1.1 Conjunto de dados e modelagem molecular	52
5.1.2 Construção do farmacóforo.....	52
5.1.3 Triagem virtual.....	52
5.1.4 Filtragem dos compostos obtidos por triagem virtual	53
5.1.4.1 Filtro regra de três de Briggs.....	53
5.1.4.2 Filtro de toxicidade 1	53
5.1.4.3 Filtro de toxicidade 2	53
5.1.4.4 Filtro por técnica de análise de componentes principais	54
5.1.4.5 Filtro por estudo de ancoramento molecular	55
5.1.4.6 Previsão de atividade herbicida utilizando modelos QSAR.....	55
5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
6 CONCLUSÃO.....	61
7 REFERÊNCIAS.....	62
8 ANEXOS	72
8.1 ANEXO I.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Classificação toxicológica e rótulos dos agroquímicos.....	6
Tabela 2 Regra de três de Briggs para compostos agroquímicos.....	24
Tabela 3 Descritores obtidos para os estudos de QSAR-2D.....	31
Tabela 4 Parâmetros estatísticos empregados na validação interna dos modelos e suas respectivas equações.....	33
Tabela 5 Parâmetros estatísticos empregados na validação externa dos modelos e suas respectivas equações.....	34
Tabela 6 Resultados dos parâmetros estatísticos empregados na validação interna do modelo A.....	39
Tabela 7 Resultados dos parâmetros estatísticos empregados na validação externa do modelo A.....	41
Tabela 8 Valores de atividade biológica real e predita para o conjunto teste do modelo A.....	41
Tabela 9 Resultados estatísticos de modelos PLS obtidos no Pentacle.....	43
Tabela 10 Descritores GRIND do modelo B.....	44
Tabela 11 Resultados dos parâmetros estatísticos empregados na validação interna do modelo C.....	45
Tabela 12 Resultados dos parâmetros estatísticos empregados na validação externa do modelo C.....	47
Tabela 13 Valores de atividade biológica real e predita para o conjunto teste do modelo C.....	47
Tabela 14 Descritores GRIND do modelo C.....	47
Tabela 15 Resultados dos parâmetros estatísticos empregados na validação interna do modelo D.....	49
Tabela 16 Resultados dos parâmetros estatísticos empregados na validação externa do modelo D.....	51
Tabela 17 Valores de atividade biológica real e predita para o conjunto teste do modelo C.....	51
Tabela 18 Resultados de previsão de atividade de inibição do PET para os compostos resultantes da triagem virtual.....	58

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E QUADROS

Figura 1 Transporte de elétrons e prótons na fase fotoquímica da fotossíntese.....	5
Figura 2 Estrutura química dos herbicidas que atuam como inibidores do FSII, comercializados no Brasil.....	7
Figura 3 Interação da atrazina com os aminoácidos no sítio de ligação Q _B da proteína D1	8
Figura 4 Anel s-triazina ou 1,3,5-triazina.....	9
Figura 5 Reação de conjugação da atrazina com a glutathione, catalisada pela glutathione S-transferase	9
Figura 6 Estrutura química do herbicida monuron	12
Figura 7 Biodegradação do diuron até a formação do metabólito DCA	13
Figura 8 Biodegradação do propanil no arroz	15
Figura 9 Estrutura química dos herbicidas ioxinil, bromoxinil e diclorobenil...	16
Figura 10 Biodegradação do ioxinil	17
Figura 11 Esquema das estratégias empregadas no planejamento de fármacos auxiliados por computadores (CADD).....	20
Figura 12 Inibidores do PET descritos por GONEC et al., 2012	29
Figura 13 Inibidores do PET descritos por MUSIOL et al., 2007.....	29
Figura 14 Esquema das estratégias empregadas no planejamento de fármacos auxiliados por computadores (CADD).....	38
Figura 15 Validação leave-11-out aplicado ao modelo A	40
Figura 16 Resultados do teste de randomização do y para o modelo A	40
Figura 17 Coeficientes PLS mostrando os descritores diretamente e inversamente correlacionados com a atividade herbicida.....	44
Figura 18 Validação leave-11-out aplicado ao modelo C.....	46
Figura 19 Resultados do teste de randomização do y para o modelo C	46
Figura 20 Representação gráfica dos dois descritores com maiores coeficientes PLS do modelo C	48
Figura 21 Validação leave-11-out aplicado ao modelo D	50
Figura 22 Resultados do teste de randomização do y para o modelo C.....	50
Figura 23 Modelo farmacofórico selecionado.....	56
Figura 24 Gráficos de PCA apresentando a similaridade dos compostos da triagem virtual com os herbicidas comerciais.....	57

Figura 25 Domínio de aplicabilidade euclidiano	59
Figura 26 Compostos com melhor resultado de previsão de atividade de inibição do PET, utilizando o modelo D.....	60
Anexos	
Figura 1 Estrutura molecular dos compostos resultantes da filtragem	72
Quadros	
Quadro 1 Previsões e toxicidades “in silico” analisadas pelo software Derek Nexus.....	54

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ATP	Adenosine Triphosphate (Trifosfato de Adenosina)
AM1	Austin Model 1
B3LYP	Becke's three-parameter hybrid exchange Functional and the Lee-Yang-Parr correlation Functional
Bn	Radical Benzila
c-Pn	Ciclopentano
c-Hn	Ciclohexano
c-Oc	Ciclooctano
CADD	Computer-Aided Drug Design (Planejamento de Fármacos Auxiliados por Computadores)
DCA	3,4-dicloroanilida
DFT	Density Functional Theory (Teoria do Funcional de Densidade)
DLA	3,4-diclorolactanilida
DPR	Desvio Padrão Relativo
EH	Equivalent Hydrocarbon (Número de Equivalente Hidrocarboneto)
EPA	United States Environmental Protection Agency (Agência de Proteção Ambiental Americana)
EUA	Estados Unidos da América
FFD	Fractional Factorial Design (Planejamento Fatorial Fracionário)
FD	Ferredoxina
FNR	Flavoproteína ferredoxina-NADP Redutase
FSI	Fotossistema I
FSII	Fotossistema II
GRIND	GRId-INdependent Descriptors (Descritores GRID independentes)
HF	Hartree-Fock
i-Pr	Isopropil
LBDD	Ligand Based Drug Design (Planejamento de Fármacos Baseado na Estrutura dos Ligantes)
MIF	Molecular Interaction Field (Campos de Interação Moleculares)
MLR	Multiple Linear Regression (Regressão Linear Múltipla)
NADP	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato.
OPS	Ordered Predictors Selection (Seleção de Preditores Ordenados)
PC	Plastocianina
PCA	Principal Components Analysis (Análise de Componentes Principais)
PCR	Principal Component Regression (Regressão por Componentes Principais)
PDB	Protein Data Bank
PET	Photosynthetic Electron Transport (Transporte de Elétrons Fotossintético)
Ph	Feofitina
PLS	Partial Least Squares (Regressão por Quadrados Mínimos Parciais)
PQ _A	Plastoquinona Q _A
PQ _B	Plastoquinona Q _B
PQH ₂	Plastohidroquinona
PSA	Polar Surface Area (Área de Superfície Polar Molecular)
Q ² _{LOO} / Q ² _{LNO}	Coeficiente de correlação entre as atividades biológicas observadas e preditas durante o processo de validação cruzada leave-one-out/ leave-N-out.
QSAR	Quantitative Structure-Activity Relationship (Relação Estrutura Atividade

	Quantitativa)
R ²	Coefficiente de Determinação Múltipla
RDF	Radial Distribution Functions (Função de Distribuição Radial)
RMSEC	Raiz Quadrada do Erro da Calibração
RMSECV	Raiz Quadrada do Erro da Validação Cruzada
RMSD	Root-Mean-Square Deviation (Raiz do valor do Desvio Quadrático Médio)
SBDD	Structure Based Drug Design (Planejamento de Fármacos Baseado na Estrutura do Receptor)
TZD	Tidiazurom
VL	Variável Latente

1 INTRODUÇÃO

O grupo quinolina está presente em muitos compostos bioativos, entre eles; antifúngicos, antibacterianos, antiprotozoários e antituberculostáticos usados clinicamente. Alguns derivados de hidroquinolinas foram descritos na literatura com atividade herbicida através do mecanismo de inibição do PET no FSII.

O uso de herbicidas é um ingrediente essencial na agricultura moderna. Herbicidas revolucionaram o controle de pragas ao longo dos últimos 65 anos, contribuindo de forma significativa para uma maior produtividade das culturas. Perdas nas safras não são aceitáveis para atender à crescente demanda alimentar populacional. Mas tal como todas as tecnologias, os herbicidas também enfrentam desafios; como o aparecimento de ervas daninhas resistentes, um resultado previsível dos recursos naturais de seleção.

Nas últimas décadas, a indústria agroquímica não lançou novos produtos no mercado, e a rápida ascensão de múltipla resistência causa problemas no controle de pragas infestantes. Isto leva ao uso de misturas de agentes químicos com diferentes mecanismos de ação e em quantidades excessivas. Neste cenário, surge a necessidade da descoberta de novos herbicidas efetivos para o controle de pragas e, que ao mesmo tempo sejam seguros para saúde humana, animal e para o meio ambiente.

Como estratégia para obtenção de novos compostos com atividade herbicida, pode-se lançar mão de abordagens do planejamento de fármacos auxiliados por computadores, com destaque para os estudos de QSAR. Estudos utilizando QSAR no desenvolvimento de herbicidas ainda são poucos, comparados com o uso desta ferramenta para desenvolvimento de fármacos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho foi dividido em duas partes. A parte I teve por objetivo realizar estudos de QSAR para um conjunto de análogos quinolínicos descritos como herbicidas na literatura. E a parte II teve por objetivo identificar um modelo farmacofórico para o mesmo conjunto, e utilizá-lo como ferramenta de triagem virtual para identificação de novos compostos com potencial para atividade herbicida.

2.2 Objetivos específicos

Parte I

1. Seleção do conjunto de treinamento de compostos quinolínicos com atividade herbicida, testados pelo mesmo protocolo de ensaio biológico;
2. Desenho da estrutura tridimensional dos compostos do conjunto de treinamento e aplicação de métodos de modelagem molecular para obtenção de geometrias mais estáveis;
3. Obtenção de descritores moleculares a partir das geometrias mais estáveis;
4. Realização de estudos de QSAR 2D, 3D e híbrido;
5. Validação dos modelos;
6. Interpretação dos melhores modelos obtidos.

Parte II

1. Seleção do conjunto de treinamento de compostos quinolínicos com atividade herbicida;
2. Desenho da estrutura tridimensional dos compostos do conjunto de treinamento e aplicação de métodos de modelagem molecular para obtenção de geometrias mais estáveis;
3. Construção de modelos farmacofóricos e identificação do mais apropriado;
4. Realização de triagem virtual utilizando o modelo obtido na etapa 3;
5. Seleção dos compostos obtidos na etapa 4, utilizando como filtro regra de três de Briggs, análises “in silico” de toxicidade, PCA, e estudos de ancoramento molecular;
6. Identificação de compostos com potencial para atividade herbicida.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A presença de plantas daninhas sempre interferiu no rendimento das culturas agrícolas. Estima-se que estas pragas causam 15% de perdas na produção de grãos, pois diminuem os recursos disponíveis no ambiente, aumentam os custos de produção, e levam a dificuldades na colheita e depreciação da qualidade do produto (WASI, TABREZ e AHMAD, 2013). A cada ano, estas perdas giram em torno de 95 milhões de dólares (DOS SANTOS, CORREIA e BOTELHO, 2013).

Os agentes químicos com atividade herbicida, quando associados com as práticas de plantio direto, contribuem para a diminuição da erosão do solo, do escoamento de nutrientes, e auxiliam na conservação da água. Também demandam pequena quantidade de mão de obra, quando comparado com métodos de controle mecânico. O mercado de herbicidas cresceu 39% em todo o mundo apenas entre 2002 e 2011 (GREEN, 2014).

Atualmente, os herbicidas são utilizados rotineiramente em mais de 90% da área da maioria das culturas dos EUA, representando cerca de 87 milhões de hectares de terras cultiváveis. Já no Brasil, são aplicados cerca de 470 mil toneladas de herbicidas anualmente. Há uma necessidade de aumento contínuo de rendimento das culturas não apenas para produção de alimentos, mas também para a produção de combustíveis. Nos EUA, a produção de etanol é principalmente a base de milho, enquanto no Brasil utiliza-se a cana-de-açúcar, cuja produção tem aumentado muito nos últimos anos (LEBARON, McFARLAND e BURNSIDE, 2008; DOS SANTOS, CORREIA e BOTELHO, 2013).

Embora a importância do uso dos herbicidas seja indiscutível do ponto de vista econômico, seu uso leva a uma série de inconvenientes associados à toxicidade em humanos, animais e ao meio-ambiente. E ainda, podem causar fitotoxicidade em cultivos vizinhos. Por isso, o manuseio requer operadores treinados e equipamentos adequados de proteção e de aplicação (OLIVEIRA JR, JAMIL e INOUE, 2011).

Os herbicidas estão propensos a se acumularem no ecossistema dependendo de: (i) suas características físico-químicas (taxa de degradação, adsorção de carbono orgânico e solubilidade em água), (ii) fatores climáticos (temperatura e precipitação), (iii) características do solo, e (iv) técnica agrícola de aplicação. Deste modo, podem contaminar o solo, a água, e afetar organismos que aí residem (RASMUSSEN et al., 2015). A exposição crônica a estes agentes está

associada a danos no sistema imunológico, reprodutivo, efeitos cancerígenos e doenças neurodegenerativas em humanos (ABBAS, et al. 2012; HERNÁNDEZ, et al. 2013).

3.1 O processo de fotossíntese e mecanismo de ação dos inibidores do FSII

Através da fotossíntese as plantas usam a energia luminosa para converter gás carbônico e água em glicose e oxigênio. Todo o processo ocorre no cloroplasto e envolve duas etapas interdependentes: a fase fotoquímica ou luminosa (reação de Hill) e a fase bioquímica (ciclo de Calvin). A fase fotoquímica é de interesse para o estudo dos herbicidas capazes de inibir o FSII, e depende da luz, pois uma molécula de água é quebrada em oxigênio, prótons e elétrons por fotólise. Os elétrons são transportados nos complexos de proteína denominados FSII, citocromo b6/f, FSI e ATP sintetase, que estão localizados na membrana dos tilacóides dos cloroplastos (HOPKINS e HÜNER, 2009). As etapas do transporte de elétrons na fase luminosa da fotossíntese estão esquematizadas na Figura 1.

O centro de reação do complexo FSII é formado por duas proteínas (D1 e D2), e associado a elas estão a clorofila P_{680} , feofitinas e plastoquinonas. A luz é absorvida pela P_{680} , que transfere um elétron para o aceptor feofitina (Ph), esta transfere um elétron para a plastoquinona Q_A (PQ_A) na proteína D2, que por sua vez transfere um elétron para a plastoquinona Q_B (PQ_B) na proteína D1. Ocorrem duas transferências de elétrons e a plastoquinona Q_B recebe dois H^+ do meio ficando reduzida a plastohidroquinona (PQH_2). Esta hidroquinona se dissocia do complexo FSII e transfere seus elétrons para o complexo citocromo b6/f liberando os prótons no lúmen do tilacóide. Estes elétrons são transferidos para o FSI através da plastocianina (PC), uma proteína solúvel que reduz a clorofila P_{700} . Na sequência, proteínas ferro-sulfúreas ligadas à membrana transferem elétrons para uma ferredoxina solúvel (FD), e a flavoproteína ferredoxina-NADP redutase (FNR) reduz o $NADP^+$ a NADPH, que será utilizado no ciclo de Calvin. Os H^+ liberados no lúmen ativam a ATP sintetase para produção de ATP (FUERST e NORMAN, 1991; TAIZ e ZEIGER, 2004).

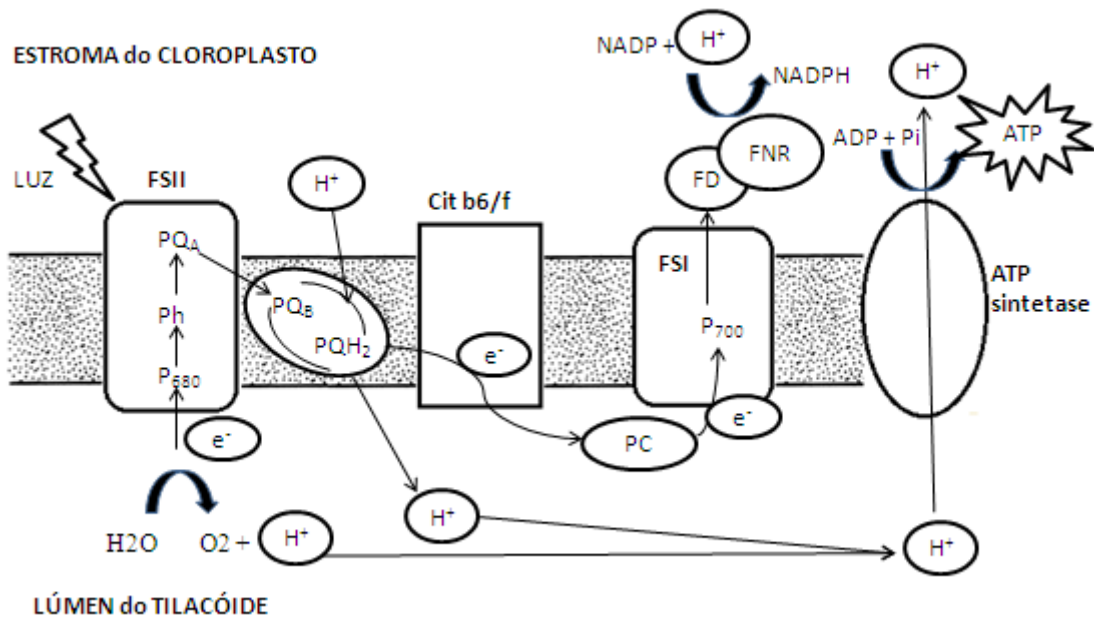


Figura 1 Transporte de elétrons e prótons na fase fotoquímica da fotossíntese. Figura adaptada de FUERST e NORMAN, 1991.

O sítio Q_B de ligação da plastoquinona, na proteína D1, é considerado não seletivo, e pode acomodar herbicidas que atuam como análogos da plastoquinona. Isto leva à inibição do transporte de elétrons da plastoquinona Q_A para a Q_B , resulta na paralisação da produção de NADPH e ATP, e interrompe a fixação de carbono. Como os elétrons não conseguem ser armazenados como energia química, há formação de radicais livres que levam à peroxidação de lipídeos da membrana, causando a necrose e morte das ervas daninhas (OLIVEIRA JR, JAMIL e INOUE, 2011). O processo nas plantas suscetíveis inicia-se por clorose; a destruição da clorofila por meio das reações de foto-oxidação no cloroplasto, inicialmente ao redor da margem das folhas, e que progride para o centro (HESS, 2000).

3.2 Herbicidas inibidores do FSII





Atualmente, existem diversas formas de classificar os herbicidas. Além da classificação pelo mecanismo de ação, também é possível classificá-los quanto à translocação, à época de aplicação ou a sua toxicidade. Na translocação, os herbicidas podem ser classificados como ação de contato ou ação sistêmica. Os primeiros só causam danos nos tecidos das plantas em que entram em contato direto. Esses herbicidas não são translocados para outras partes do vegetal, e sua eficiência depende de uma boa cobertura de aplicação. O efeito é rápido e, em

questão de horas, pode-se observar sintomas. Já os de ação sistêmica apresentam efeitos mais lentos. Nesse caso, ocorre translocação do herbicida pelo xilema, pelo floema ou por ambos. Os ativos que apresentarem absorção lenta podem sofrer prejuízos nos resultados, quando aplicados em períodos chuvosos (OLIVEIRA JR, JAMIL e INOUE, 2011).

Quanto à época de aplicação, os herbicidas podem ser classificados como pré-emergência e pós-emergência. Considera-se herbicida de ação de pré-emergência quando a aplicação é feita antes do surgimento das plantas daninhas, pois o agente químico atua na germinação das sementes ou no crescimento radicular. Já os herbicidas de ação pós-emergentes são aqueles que atuam em ervas daninhas que já germinaram e ultrapassaram a superfície do solo, com aplicação na folhagem da praga. Estes são absorvidos preferencialmente via foliar e requerem tolerância da cultura à exposição do produto (OLIVEIRA JR, JAMIL e INOUE 2011).

Os agrotóxicos podem ser classificados pelo seu grau de toxicidade. No Brasil, o Ministério da Saúde determina que os rótulos dos agroquímicos devem conter uma faixa colorida indicativa de sua classificação toxicológica, conforme ilustrado na Tabela 1 (OPAS, 1997).

Tabela 1 Classificação toxicológica e rótulos dos agroquímicos

CLASSE	GRAU DE TOXICIDADE	COR DA FAIXA NO RÓTULO
I	Extremamente tóxicos	 Vermelha
II	Altamente tóxicos	 Amarela
III	Medianamente tóxicos	 Azul
IV	Pouco tóxicos	 Verde

Em sua maioria, herbicidas inibidores do FSII estão na classe toxicológica III. Porém, mesmo com seu moderado grau de toxicidade, atualmente estes produtos são essenciais na agricultura, sendo muito utilizados em culturas de arroz, soja, milho, cana-de-açúcar e algodão (SILVA et al., 2013a). A Figura 2 apresenta a estrutura química destes agentes comerciais disponíveis no Brasil, divididos em seus 7 grupos químicos.

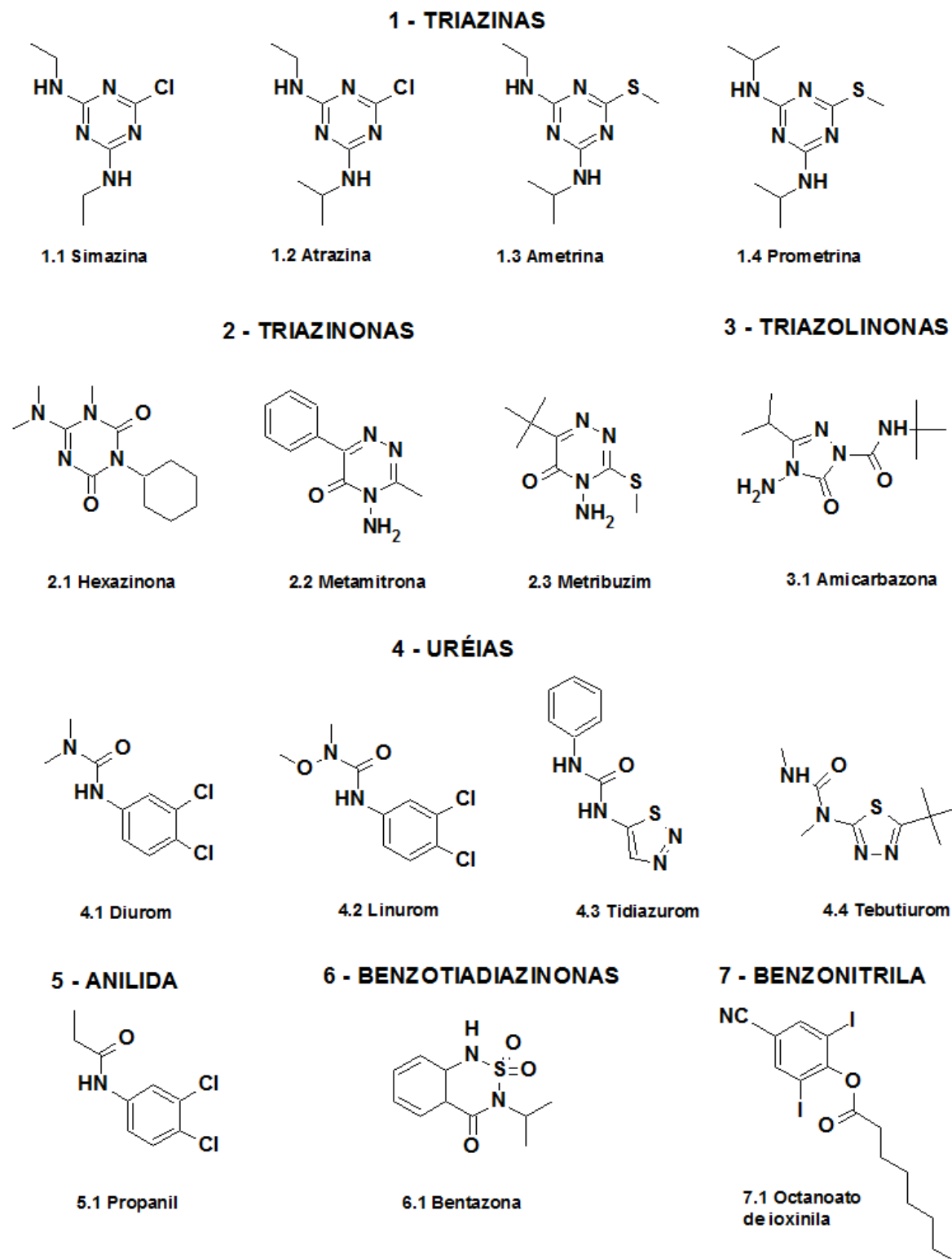


Figura 2 Estrutura química dos herbicidas que atuam como inibidores do FSII, comercializados no Brasil.

A interação da atrazina com os aminoácidos na proteína D1 é o mais estudado, e está representado na Figura 3. Este agente liga-se ao sítio Q_B por

ligações de hidrogênio entre a Serina 264 (Ser264) e Fenilalanina 265 (Phe265), e através de interações hidrofóbicas com Fenilalanina 255 (Phe255). Deste modo, impede a ligação da plastoquinona, atuando como um inibidor competitivo (POWLES e YU, 2010).

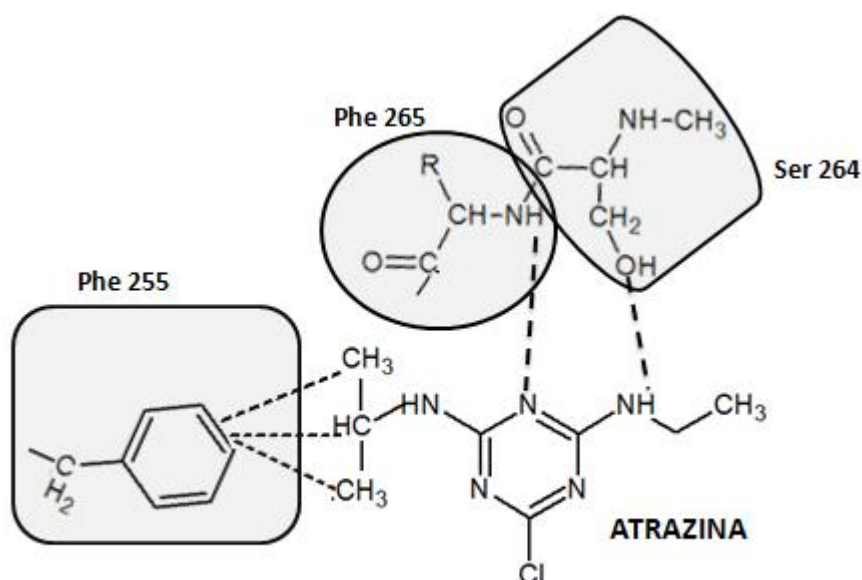


Figura 3 Interação da atrazina com os aminoácidos no sítio de ligação Q_B da proteína D1. O herbicida se liga através de ligações de hidrogênio com Phe265 e Ser264 e por interações hidrofóbicas com Phe255. Figura adaptada de POWLES e YU, 2010.

3.2.1 Triazinas

As primeiras triazinas empregadas foram as clorotriazinas, descobertas na Suíça em 1952 através da síntese sistemática do anel s-triazina (Figura 4). Em 1956 foi autorizado o registro e o uso da simazina (6-cloro- N^2, N^4 -dietil-1,3,5-triazina-2,4-diamina) para cultura de milho e aspargo na Europa. Logo em seguida foi lançado no mercado a atrazina (6-cloro- N^2 -etil- N^4 -isopropil-1,3,5-triazina-2,4-diamina), e no início da década de 60 surgiram as metiltiotriazinas: a ametrina (N^2 -etil- N^4 -isopropil-6-metiltio-1,3,5-triazina-2,4-diamina) e a prometrina (N^2, N^4 -di-isopropil-6-metiltio-1,3,5-triazina-2,4-diamina). A atrazina foi introduzida nos EUA em 1959 e em pouco tempo se tornou o herbicida mais utilizado. Entre os anos 1970 e 1976 a patente das triazinas expirou, e esta classe de herbicidas passou a ser produzida em mais de 100 países, e é atualmente essencial para o alto rendimento agrícola e para o cultivo sustentável (LEBARON, McFARLAND e BURNSIDE, 2008).

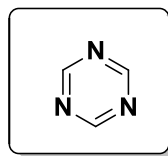


Figura 4 Anel s-triazina ou 1,3,5-triazina

A atrazina foi o herbicida que revolucionou a produção agrícola de milho e é o mais estudado da classe. Tem amplo espectro contra ervas daninhas, é de fácil aplicação e pode ser utilizado em associações. Em 1970 uma mudança na sua formulação, que passou a ser a base de água, melhorou a poeira no processo de fabricação, e tornou mais fácil a embalagem, a aplicação e a possibilidade de mistura. Atualmente, a atrazina é utilizada em mais de 70 países em aplicação de pré e pós-emergência (LEBARON, McFARLAND e BURNSIDE, 2008; BRASIL, 2016).

Boa parte das culturas não é afetada pela ação das triazinas devido à seletividade do seu metabolismo secundário. Espécies de plantas como milho e sorgo possuem a enzima glutatona S-transferase que inativa o herbicida, levando a desintoxicação da planta (WIEGAND et al., 2001). A reação de conjugação da atrazina com a glutatona, catalisada pela glutatona S-transferase é apresentada na Figura 5.

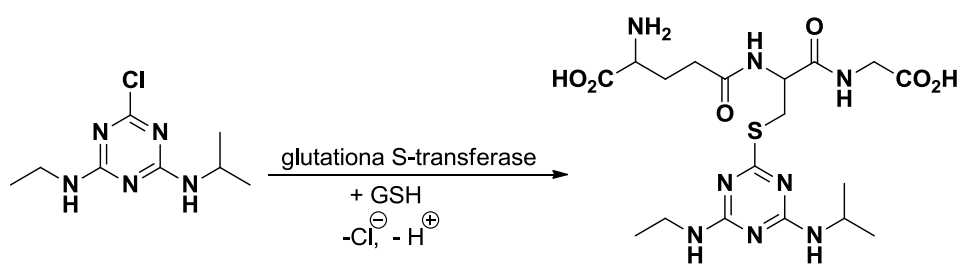


Figura 5 Reação de conjugação da atrazina com a glutatona, catalisada pela glutatona S-transferase. Figura adaptada de WIEGAND et al., 2001.

Os herbicidas desta classe são moderadamente ou pouco solúveis em água (BRASIL, 2016). Isso possibilita o acúmulo dos ativos nas culturas, afetando negativamente a produção. A prometrina, por exemplo, que é aplicada diretamente no solo, pode diminuir a qualidade do trigo, por interferir no crescimento, reduzir o teor de clorofila e causar dano nos lipídeos de membrana deste cultivo (JIANG et al., 2010).

Todos os agentes químicos do grupo possuem classificação toxicológica III. Por apresentarem características físico-químicas de alta lipofilicidade, hidrólise lenta e elevada absorção por matéria orgânica e tecido gorduroso, estes herbicidas são potenciais contaminantes, com risco de bioconcentração no ecossistema (CAMPOS PEREIRA et al., 2012). Por preocupações ambientais, a União Europeia, desde 2005, proíbe o uso de simazina e atrazina. No entanto, ainda é possível detectar resíduos destes ativos nos solos e em aquíferos (JIANG et al., 2010; LORENTE et al., 2015).

Estudos apontaram que as triazinas induzem estresse oxidativo, causam danos no DNA e alterações no sistema antioxidante dos vertebrados. Bioensaios “in vivo”, utilizando ratos, apontaram riscos de genotoxicidade por exposição crônica à ametrina, indicando que o produto e seus metabólitos causam danos ao DNA de eritrócitos da medula óssea (SANTOS et al., 2015). A ampla utilização de atrazina está ligada ao declínio global de anfíbios, pois ela pode induzir à feminilização dos indivíduos do sexo masculino, com efeitos sobre a espermatogênese e a qualidade do sêmen produzido. Também afeta o sistema imunológico destes animais, predispondo a maior suscetibilidade de infecções por patógenos (HAYES et al., 2011; JIA et al., 2015). Foi demonstrado que, em roedores, a exposição à atrazina leva a distúrbios neurodegenerativos, devido a alterações no sistema dopaminérgico (MA et al., 2015; KARMAUS e ZACHAREWSKI, 2015).

Em humanos, há poucos estudos sobre efeitos tóxicos das triazinas. Alguns apontam correlação destes pesticidas com cânceres de ovário e de mama (KETTLES et al., 1997; DONNA et al., 1989), mas uma revisão epidemiológica indica que faltam dados conclusivos para criar uma relação destes agentes com a formação de tumores em humanos, desde que utilizados de acordo com as boas práticas fitossanitárias (SATHIAKUMAR et al., 2011).

3.2.2 Triazinonas

No Brasil, a classe das triazinonas é amplamente utilizada para controle de plantas daninhas na cana-de-açúcar. Em 1970, a metamitrona (4-amino-3-metil-6-fenil-1,2,4-triazin-5-ona) foi lançada para uso na produção de beterraba, uma cultura que até hoje conta com poucas opções para o controle químico de plantas daninhas. No mesmo ano, o metribuzim (4-amino-6-*terc*-butil-4,5-diidro-3-metiltio-1,2,4-triazin-5-ona) foi autorizado na Alemanha para uso nas plantações de batata, mas em

pouco tempo seu principal uso passou a ser nos cultivos de soja. É muito comum a mistura de metribuzim com outros herbicidas, pois este apresenta amplo espectro de ação contra ervas daninhas de folhas largas e gramíneas. E em 1974, foi introduzido no mercado a hexazinona (3-ciclohexil-6-dimetilamina-1-metil-1,3,5-triazina-2,4(1H,3H)-diona), para uso de pós-emergência em lavouras, na silvicultura e na cana-de-açúcar (LEBARON, McFARLAND e BURNSIDE, 2008; BRASIL, 2016)

Os três representantes da classe possuem classificação toxicológica III e são solúveis em água. Assim, através do deslocamento no solo, conseguem alcançar as águas subterrâneas. Estes compostos apresentam baixa toxicidade para invertebrados aquáticos, mas são altamente tóxicos para algumas espécies de algas. A toxicidade para aves e mamíferos é relativamente baixa, porém podem causar lesões oculares graves. De acordo com a EPA, os dados de estudos de carcinogenicidade em humanos são insuficientes e os bioensaios em animais são inadequados (USDA, 2005).

3.2.3 Triazolinonas

A amicarbazona (4-amino-N-*terc*-butil-4,5-diidro-3-isopropil-5-oxo-1*H*-1,2,4-triazol-1-carboxamida) possui classificação toxicológica III e é altamente solúvel em água. Está disponível comercialmente com formulação de grânulos, que podem ser dispersos em água, e é empregada como herbicida de pré-emergência em cultura de milho, e em pré e pós-emergência de controle de ervas daninhas em cana-de-açúcar (BRASIL, 2016). Sua atividade herbicida foi descrita em 1999 (PHILBROOK et al., 1999). No Brasil, foi introduzida em 2004, e por apresentar alta mobilidade no solo é considerado ideal para aplicação na cultura de cana-de-açúcar em época de seca (CARBONARI, 2007; POSSOMAI et al., 2013). Este agente ganhou destaque por controlar seletivamente a *Annual bluegrass*; uma espécie de planta daninha presente em gramados. Esta praga diminui a estética dos gramados, pois apresenta vantagem competitiva sobre as gramíneas, já que é mais tolerante a doenças e resiste a períodos de estiagem (McCULLOUGH et al., 2010).

Experimentos em espécies de ervas daninhas selecionadas (entre elas *Digitaria sanguinalis* e *Echinochloa crus-galli*) demonstraram que o desempenho da amicarbazona em inibir o transporte de elétrons foi superior ao da atrazina. A amicarbazona apresenta absorção tanto radicular como foliar, o que garante sua maior eficácia para alcançar os cloroplastos e atuar no sítio de ligação no FSII.

Porém, o milho apresentou-se mais tolerante à atrazina quando comparado a amicarbazona, nas mesmas condições estudadas (DAYAN, TRINDADE e VELINI, 2009).

Estudos em animais relacionaram a exposição da amicarbazona à neurotoxicidade subcrônica. Porém, os mesmos foram considerados insuficientes para comprovar a relação (EPA, 2005). Por se tratar de um herbicida novo no mercado, há pouca informação sobre seu comportamento no ambiente (POSSAMAI et al., 2013).

3.2.4 Uréias

O primeiro estudo de fenil ureias substituídas com atividade herbicida foi publicado em 1951. Tratava-se do monuron (3-(*p*-clorofenil)-1,1-dimetilureia - Figura 6), que foi sintetizado pela reação entre isocianato de *p*-clorofenila com dimetilamina (BUCHA e TODD, 1951).

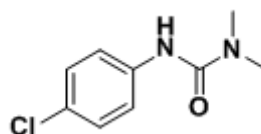


Figura 6 Estrutura química do herbicida monuron

O monuron ainda é utilizado nos EUA para controle de ervas daninhas de folhas largas em áreas não agrícolas (por exemplo, estradas), em instalações industriais e em algumas culturas como o algodão e o abacaxi. Porém, seu uso não é permitido no Brasil. Embora existam mais de 20 fenilureias comerciais, no Brasil apenas o diurom (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea), o linurom (3-(3,4-diclorofenil)-1-metoxi-1-metilurea), o tebutiurom (1-(5-*terc*-butil-1,3,4-tiadiazol-2-il)-1,3-dimetilurea) e o tidiazurom (1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il)urea, TZD) possuem registro. Os quatro representantes da classe são solúveis em água, e apresentam persistência moderada no solo. De modo geral, a meia vida é de 3 a 6 meses, que varia de acordo com as condições ambientais. Atualmente, são utilizados como herbicidas em muitas culturas como soja, algodão, frutas cítricas, cana-de-açúcar, alfafa, trigo, cacau e café (BRASIL, 2016; SHARMA et al., 2011).

O diurom é o agente químico mais estudado do grupo. Além de herbicida, ele também é utilizado como dessecante do cultivo de algodão e como algicida na

produção comercial de peixes (IHLASEH et al., 2011). Tem classificação toxicológica III e sua degradação resulta em três principais metabólitos tóxicos apresentados na Figura 7: DCPMU (3-(3,4-diclorofenil)-1-metil-ureia), DCPMDU (1-(3,4-diclorofenil)-3-metildeneuréia), DCPU (3-(3,4-diclorofenil) ureia) e DCA (3,4-dicloroanilida) (PERISSINI, 2015). O DCA, que também pode ser originado da degradação de outras fenilureias e do propanil, é uma amina aromática muito tóxica ao ambiente (PERISSINI, 2015).

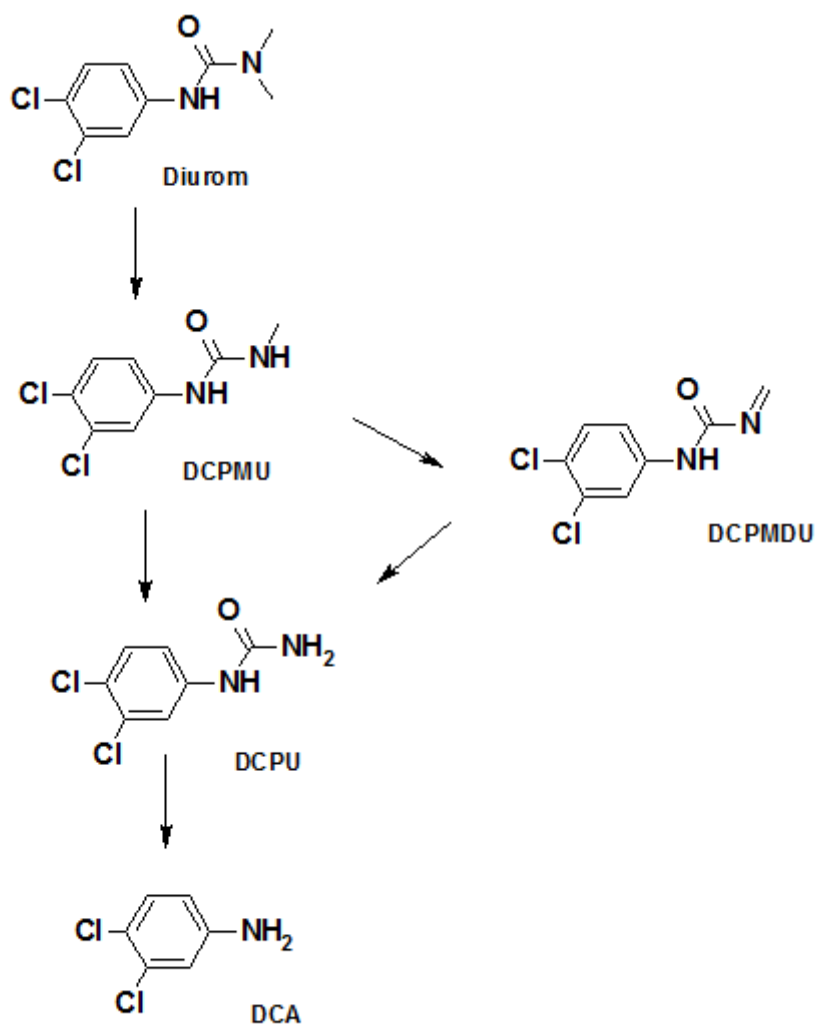


Figura 7 Biodegradação do diurom até a formação do metabólito DCA. Figura adaptada de PERISSINI, 2015.

Vários estudos demonstraram, em animais de laboratório, a potencial atividade carcinogênica deste ativo. Em um bioensaio de dois anos, ratos Wistar, de ambos os sexos, desenvolveram carcinoma de bexiga após exposição alimentar de diurom (na concentração de 2500 ppm) (IHLASEH et al., 2011). Outros estudos

associaram o herbicida à esplenomegalia e à diminuição do número de linfócitos T CD4⁺ (DA ROCHA et al., 2014; DOMINGUES et al., 2011).

O linurom também tem classificação toxicológica III (BRASIL, 2016). Estudos já demonstraram que ele atua como antiandrógeno “in vitro” e “in vivo” em mamíferos; causando mudanças nos testículos e afetando a reprodução (TURNER et al., 2002). Dados também sugerem que exposição crônica ao linurom afeta o crescimento dos ossos (ANDREWS e GRAY, 1990). Já o tebutiurom tem classificação toxicológica II e incorre em mais riscos de causar danos ambientais, pelo potencial de contaminação aquática e efeitos deletérios sobre organismos deste ecossistema (BRASIL, 2016; TEMPLE, MURPHY e CHESLAK, 1991).

O tidiazurom tem classificação toxicológica IV (BRASIL, 2016). Este ativo foi desenvolvido na Alemanha em 1976 para ser usado como desfolhante de algodoeiro e mostrou atividade citocínicas (reguladora de crescimento) quando aplicado em concentrações reduzidas (LAMEIRA et al., 1997). As citocinas, combinadas com as auxinas, são substâncias que estimulam a divisão celular nas plantas. Já foi observado que o uso deste produto aumenta a frutificação e o tamanho de maçãs e kiwis (PETRI, SCHUCK e LEITE, 2001). A aplicação de TZD leva à indução de calos e à formação de embriões somáticos em diversas culturas, que vão de herbáceas a árvores (MURTHY, MURCH e SAXENA, 1998).

3.2.5 Anilidas

O propanil (*N*-(3,4-diclorofenil)propanamida) possui classificação toxicológica III, e é um sólido solúvel em água. Quando usado isoladamente, é um herbicida pós-emergente, de ação de contato, seletivo para controle de gramíneas nas culturas de arroz e quando em associação também é utilizado em pré-emergência (BRASIL, 2016).

Este ativo é um dos dez herbicidas mais utilizados nos cultivos de arroz em todo o mundo. O arroz não é sensível ao agente químico porque no processo de degradação, transforma o propanil em 3,4-diclorolactanilida (DLA) por oxidação, que é hidrolisado em DCA e ácido láctico pela enzima arilacilamidase (Figura 8). O mesmo processo acontece nas ervas daninhas, porém de maneira muito lenta, o que permite acumular uma concentração letal de DLA (RIOS, 2008).

Estudos mostraram que o propanil afeta o sistema imunológico, causando atrofia no timo e diminuição do desenvolvimento de células T e B na medula óssea,

em mamíferos “in vivo” e em modelos “in vitro” (SALAZAR et al., 2008). Além disso, está associado ao efeito tóxico de metahemoglobinemia e anemia hemolítica (McMILLAN et al., 1991).

Devido a estes riscos em potencial, a EPA não permite seu uso em cultivos de pequenos grãos, como trigo, aveia e cevada. Entretanto, para o arroz ainda não existe substituto direto com controle de amplo espectro de ervas daninhas sem prejuízo para o cultivo e, portanto, o propanil continua sendo essencial para os altos rendimentos na produção de arroz (EPA, 2006b).

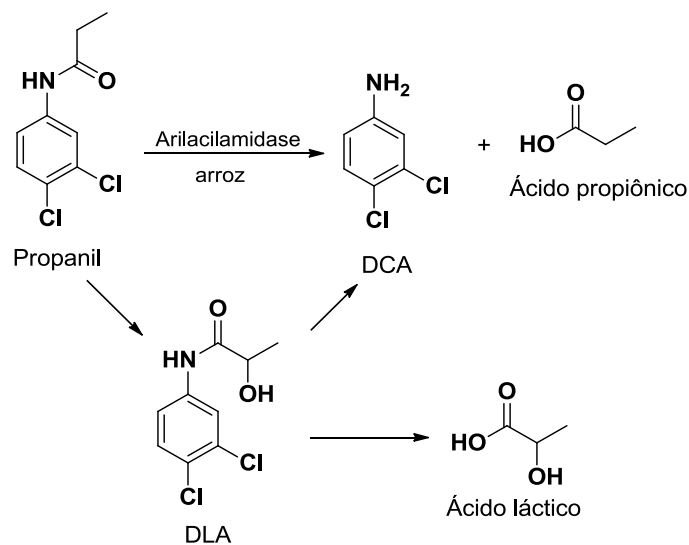


Figura 8 Biodegradação do propanil no arroz. Fonte: RIOS, 2008.

3.2.6 Benzotiadiazinonas

Bentazona (3-isopropil-1*H*-2,1,3-benzotiadiazin-4(3*H*)-ona 2,2-dioxido), de classificação toxicológica III, também é um sólido solúvel em água (BRASIL, 2016). Seu primeiro registro data de 1975. Publicações de 1972 e 1973 descreveram o seu efeito herbicida em cultivos de soja e arroz, respectivamente (MINE e MATSUNAKA, 1975). Hoje é utilizado em pós-emergência para controle de plantas daninhas em culturas de amendoim, arroz, feijão e trigo na forma de sal sódico isolado ou em combinação com outros herbicidas, como a atrazina (BRASIL, 2016). Não é carcinogênico, porém a exposição crônica em mamíferos está associada à anemia, congestão do intestino delgado e do baço (HUBER e OTTO, 1994).

3.2.7 Benzonitrilas

Fazem parte desta classe os herbicidas ioxinil, bromoxinil e diclorobenil (Figura 9). Todos têm um substituinte ciano (grupo nitrilo) no anel benzênico, sendo o diclorobenil halogenado nas duas posições orto, enquanto, o ioxinil e o bromoxinil são halogenados nas duas posições meta. Além disso, esses dois últimos ativos possuem um substituinte hidroxila na posição para, o que os torna mais solúveis em água e mais susceptíveis à lixiviação (HOLTZE et al., 2008).



Figura 9 Estrutura química dos herbicidas ioxinil, bromoxinil e diclorobenil.

No Brasil, o bromoxinil é liberado exclusivamente para exportação. E o ioxinil, na forma de octanoato, é liberado para uso de aplicação em pós-emergência para o controle de plantas infestantes de culturas de alho e cebola (BRASIL, 2016). As propriedades herbicidas do ioxinil foram descobertas na Inglaterra em 1959, quando foi descrito como um herbicida de contato seletivo para ervas daninhas de folhas largas (ZAKI, TAYLOR e WAIN, 1967). A longa cadeia carbônica do octanoato de ioxinila (octanoato de 4-ciano-2,6-di-iodofenil) torna este agente mais hidrofóbico que o ioxinil, melhorando sua absorção pelas folhas das ervas daninhas, além de apresentar menor risco de lixiviação. O mesmo possui classificação toxicológica II (BRASIL, 2016). No solo, o ioxinil sofre biodegradação por bactérias, gerando como metabólitos o 3-5-diiodo-4-hidroxibenzamida e o ácido 3-5-diiodo-4-hidroxibenzóico (Figura 10) (HOLTZE et al., 2008).

Apesar de apresentar pouco ou nenhum potencial genotóxico, estudos mostraram indução de câncer em fígado e na tireoide de ratos. Foi demonstrado também que tanto o ioxinil como o octanoato de ioxinila são inibidores da comunicação intercelular através de junções de hiato, sistemas que desempenham papel no controle do crescimento e da diferenciação celular, na manutenção e homeostase dos tecidos e na embriogênese, sendo que, a forma esterificada causa uma inibição mais potente (LEITHE et al., 2010).

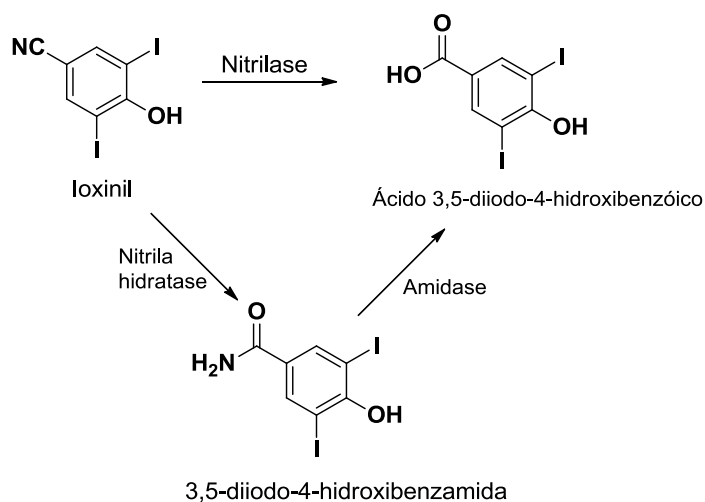


Figura 10 Biodegradação do ioxinil. Fonte: HOLTZE et al., 2008.

3.3 Ervas daninhas resistentes a herbicidas

A dependência do controle químico para conter infestação de ervas daninhas levou ao fenômeno da resistência, que pode surgir após exposição a uma dose de herbicida comumente letal para uma população normal (susceptível) da mesma espécie (CHRISTOFFOLETI, 2008). O primeiro caso documentado foi em 1968 com a espécie *Senecio vulgaris* (popularmente conhecida como tasneirinha) resistente à simazina. A primeira espécie a apresentar resistência às uréias foi *Alopecurus myosuroides* na Inglaterra (1982) e na Alemanha (1983). Estima-se que a área total infestada com plantas daninhas resistentes a triazinas seja superior a quatro milhões de hectares em todo o mundo. Atualmente, 73 espécies já desenvolverem resistência aos inibidores do FSII do grupo C1; 28 espécies foram identificadas como resistentes aos herbicidas do grupo C2; e 4 espécies possuem resistência ao grupo C3 (WEED SCIENCE, 2016).

Alterações na proteína D1 são as principais causas de ocorrência de resistência de herbicidas que agem no FSII (HEAP, 2014). O gene *psbA* no genoma do cloroplasto codifica a proteína D1 no FSII; a sequência de aminoácidos no gene *psbA* das plantas suscetíveis e das resistentes às triazinas são idênticas, com exceção da posição 264, pois há uma mutação que gera substituição do aminoácido serina 264 (Ser264) por uma glicina (SILVA et al., 2013b). As triazinas e a plastoquinona competem pelo mesmo sítio de ligação. A mutação Ser264Gly impede a ligação da triazina, mas ainda permite a ligação da plastoquinona, porém em menor intensidade. Uma planta resistente ao herbicida inibidor do FSII consegue

efetuar transporte de elétrons na fase luminosa mesmo na presença do herbicida (POWLES e YU, 2010).

Os mecanismos de resistência já estudados envolvem mutação no local de ligação do herbicida; o aumento da capacidade da planta de metabolizar o ativo antes de ele exercer o efeito; a diminuição da absorção e/ou translocação do herbicida para o local de ação; o sequestro do agente químico nas paredes celulares ou vacúolos, e o aumento do ligante endógeno por amplificação gênica. Desta maneira, exige-se uma dose maior do agroquímico para ganhar a competição (HEAP, 2014).

A evolução da resistência de plantas daninhas depende principalmente de fatores genéticos; bioecológicos (ciclo de vida curto, elevada produção de sementes, baixa dormência da semente, várias gerações reprodutivas por ano, extrema suscetibilidade a um determinado herbicida e grande diversidade genética) e agronômicos. Os dois primeiros fatores são de difícil manipulação, restando o manejo dos fatores agronômicos como estratégia para controle da resistência. Hoje, sabe-se que aplicação de herbicidas com efeitos residuais prolongados (que é o caso das triazinas), aplicados repetidamente ou em misturas de herbicidas com o mesmo mecanismo de ação, e em doses elevadas favorecem o desenvolvimento de ervas daninhas resistentes. Isso porque quanto maior for a persistência do produto no solo, maior será a pressão de seleção sobre plantas infestantes, pois as germinações sucessivas de diversas gerações de plantas daninhas foram expostas ao agente químico. Contribuem para isso, a falta de rotação de culturas e a pouca utilização de controle mecânico no combate de pragas (CHRISTOFFOLETI, 2008).

Por mais de 40 anos os agricultores tem lidado com ervas daninhas resistentes a herbicidas, porque a indústria forneceu um fluxo relativamente constante de novos agentes químicos com diferentes mecanismos de ação. No entanto, a mesma indústria não lançou um novo herbicida para o mercado há mais de 20 anos. Assim, a rápida ascensão de múltipla resistência associado a um manejo de pragas realizado de modo inadequado agravou o problema e conseqüentemente, o custo da produção (HEAP, 2014). Isto levou ao uso de misturas de agroquímicos com diferentes mecanismos de ação e em quantidades excessivas (GREEN, 2014). O uso irracional e desprotegido destes produtos vem ao longo dos anos ameaçando o ecossistema, a saúde e o meio ambiente. Assim, surge a necessidade do desenvolvimento de novos herbicidas efetivos para o controle de ervas daninhas, que consigam lidar com o problema da resistência

disseminada e ao mesmo tempo sejam seguros para saúde humana e animal e sem riscos para o meio ambiente (WASI et al., 2013).

3.4 Planejamento de fármacos auxiliado por computadores

O lançamento de um novo composto bioativo no mercado é um processo caro em termos de recursos financeiros, mão de obra e tempo (MACALINO et al., 2015). Além disso, da identificação de um composto protótipo até a aprovação por órgãos reguladores pode demorar cerca de uma década. Por isso, hoje se fala na concepção racional no desenvolvimento de novos compostos de interesse (UMASHANKAR e GURUNATHAN, 2015).

Métodos para estudos “in silico” de CADD tornaram-se essenciais para as fases iniciais do desenvolvimento de novos compostos bioativos, pois minimizam a quantidade de recursos para síntese e posterior ensaio biológico, agilizando o processo (UMASHANKAR e GURUNATHAN, 2015), fornecem informações sobre a interação molecular entre uma biomolécula alvo e um ligante, e orientam a otimização molecular para melhora da eficácia, farmacocinética favorável e perfil de toxicidade (HUNG e CHEN, 2014). As estratégias empregadas para o CADD, representadas na Figura 11, podem ser divididas em duas abordagens: SBDD e LBDD.

3.4.1 Planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor (SBDD)

Esta abordagem é aplicada quando se dispõe de informações sobre a estrutura do alvo bioquímico dos compostos bioativos em estudo. O conhecimento de sua estrutura tridimensional é utilizado para projetar e avaliar ligantes com base em interações previstas (MACALINO et al., 2015). Compreender os princípios pelos quais pequenas moléculas reconhecem e interagem com seus alvos também é de grande importância na pesquisa e desenvolvimento de novos agroquímicos (OHKAWA, MIYAGAWA e LEE, 2007). A estrutura de um alvo biológico proteico pode ser obtida a partir de bancos de dados de estruturas de macromoléculas obtidas por cristalografia por raio-X (por exemplo, o Protein Data Bank); por ressonância magnética nuclear ou por outros métodos (DANISHUDDIN e KHAN, 2015).

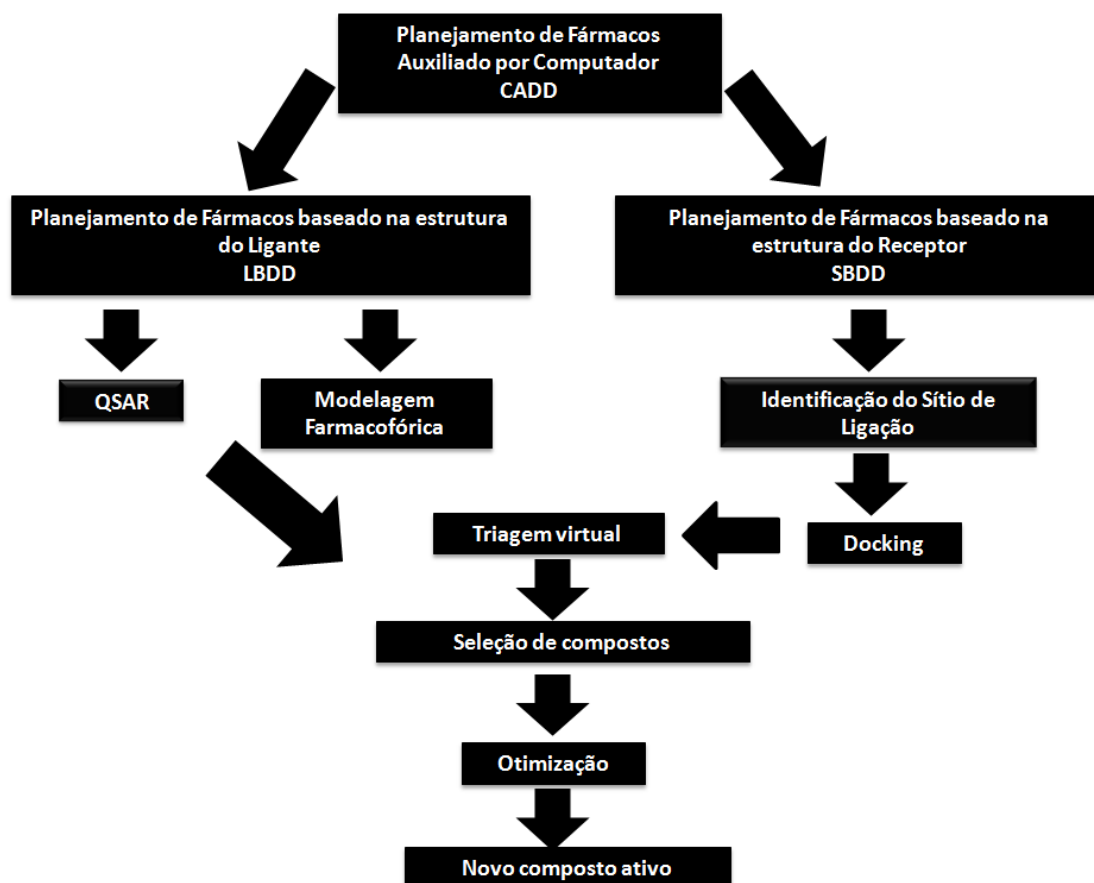


Figura 11 Esquema das estratégias empregadas no planejamento de fármacos auxiliados por computadores (CADD). Adaptado de MACALINO et al., 2015.

3.4.1.1 Ancoramento molecular

Ancoramento molecular (docking) é um dos métodos SBDD mais conhecidos. Seu objetivo principal é a predição de possíveis modos de ligação dos compostos em um sítio de ligação do alvo biológico com estimativas de afinidade de ligação baseada na conformação e características de complementaridade (MACALINO et al., 2015). Na simulação molecular, o ancoramento é utilizado para prever os conformémeros que uma molécula pode apresentar para formar um complexo estável com um alvo biológico. Com base na distância de ligação e na energia entre o ligante e o sítio, modelos de interações e afinidades podem ser calculados para simular interações ideais (HUNG e CHEN, 2014).

Um protocolo de ancoramento necessita de dois componentes principais: um algoritmo de busca e uma função de avaliação (ou função de escore). Algoritmos de busca são usados para explorar a superfície de energia livre, com a finalidade de encontrar as melhores conformações de ligantes. Já a função de escore direciona a

busca para conformações relevantes, e deve ser capaz de distinguir o modo de ligação correto dos incorretos. Também tem a finalidade de prever as afinidades de ligação entre receptor e ligante, classificando diferentes moléculas de acordo com sua afinidade. Na metodologia que considera flexibilidade dos ligantes, os algoritmos de busca podem ser divididos em três abordagens: sistemática, estocástica e determinística. De maneira geral, a abordagem sistemática busca explorar todos os graus de liberdade do ligante exaustivamente. A estocástica realiza mudanças conformacionais aleatórias, buscando encontrar aquela de mais baixa energia. E a abordagem determinística utiliza métodos de minimização de energia e de dinâmica molecular, que permitem melhor exploração da energia livre do sistema (GUEDES, MAGALHÃES e DARDENNE, 2014).

3.4.2 Planejamento de fármacos baseado na estrutura dos ligantes (LBDD)

Esta abordagem é aplicada quando se dispõe de informações sobre a estrutura dos compostos bioativos e suas atividades biológicas, porém o alvo biológico não é conhecido ou sua estrutura não está disponível. Informações extraídas de um conjunto de ligantes ativos podem ser usadas para identificar propriedades moleculares significativas (descritores moleculares) responsáveis pela atividade biológica observada. Parte-se do pressuposto que compostos estruturalmente semelhantes interagem de modo semelhante com o sítio de ligação. As técnicas mais comuns nessa abordagem são modelos de padrão farmacofórico e estudos de QSAR (SLIWOSKI et al., 2014).

3.4.2.1 Modelo farmacofórico

Para construção de um farmacóforo, múltiplos compostos ativos são alinhados de tal modo que um número máximo de características químicas se sobrepõem geometricamente. Este modelo pode ser obtido através de programas que utilizem a estrutura 2D ou 3D em representações estruturais rígidas ou incorporando flexibilidade molecular para determinar pontos de sobreposição (SLIWOSKI et al., 2014). Deste modo, um farmacóforo descreve as características de um conjunto de compostos ativos, que são necessárias (porém não necessariamente suficientes) para ligação ao receptor alvo (ARTESE et al., 2013). É considerado o maior denominador comum de recursos de interações moleculares

partilhados por um conjunto de moléculas ativas. Frequentemente, os programas consideram as características de pontos de átomos receptor / doador de ligação hidrogênio, átomos de ânion / cátion, anel aromático, ou um par de átomos adjacentes hidrofóbicos (QING et al., 2014).

3.4.2.2 Estudos de QSAR

Estudos de QSAR baseiam-se na premissa que alterações na atividade biológica estão associadas com as variações estruturais em um conjunto de compostos. Deste modo, é possível correlacionar quantitativamente descritores moleculares de compostos ativos e atividade biológica em modelos matemáticos. Uma das características mais importantes é a capacidade de previsão da atividade e conseqüentemente, o uso destes modelos para compreensão do possível mecanismo de ação. Assim, a síntese de novos compostos ativos com propriedades otimizadas pode ser orientada (GERTRUDES et al., 2012).

Na construção de um modelo são utilizadas dois tipos de variáveis. A variável dependente, ou variável resposta, que corresponde à atividade biológica (por exemplo, IC_{50} – a dose necessária para inibir ou estimular um determinado processo biológico ou atividade enzimática em 50%). Já as variáveis independentes, ou descritores moleculares, descrevem propriedades químicas e estruturais dos compostos. Existem diversos programas para geração de descritores moleculares, sendo que os tipos a serem obtidos dependem basicamente da representação molecular (RODRIGUES et al., 2012).

As abordagens matemáticas mais utilizadas em estudos QSAR são a regressão linear múltipla (MLR), a regressão por quadrados mínimos parciais (PLS), a regressão por componentes principais (PCR), e os métodos não-lineares, como os baseados em redes neurais artificiais (KIRALJ e FERREIRA, 2009).

A qualidade e o sucesso de um modelo QSAR dependem da precisão dos dados de entrada, da seleção dos descritores apropriados e da validação do modelo desenvolvido. É importante dizer que um modelo QSAR só é válido, na maioria das vezes, para estruturas moleculares análogas utilizadas para construir o modelo. A validação utiliza ferramentas estatísticas, sendo o processo mais comum aquele em que é dividido em validação interna e externa (KIRALJ e FERREIRA, 2009):

- a) Validação interna: visa avaliar o grau de ajuste, a significância e a qualidade da predição interna de um modelo, ou seja, utilizando os mesmos compostos presente no modelo. Os principais parâmetros utilizados são o coeficiente de determinação (R^2), o teste de Fischer (F) e o coeficiente da determinação da validação cruzada leave-one-out (Q^2_{LOO});
- b) Validação externa: é realizada através da comparação de valores preditos e experimentais de um conjunto teste, não utilizados na construção do modelo. Espera-se o menor desvio possível entre os valores. Os parâmetros estatísticos mais utilizados é o coeficiente de determinação da validação externa (R^2_{pred} ou Q^2_{pred}).

Na pesquisa em QSAR dos dias de hoje, a ênfase é dada sobre a qualidade preditiva (validação externa) e a facilidade de interpretação mecanística dos modelos, embora um modelo com boa capacidade de predição pode não ser interpretável. Estudos de QSAR são amplamente utilizados em diferentes campos da química com aplicações na medicina, meio ambiente e na agricultura. Um dos fortes apelos lida com a segurança química e risco de toxicidade. Neste contexto, modelos preditivos de toxicidade (carcinogenicidade, mutagenicidade, teratogenicidade, hepatotoxicidade, cardiotoxicidade, e nefrotoxicidade, entre outros) podem fornecer uma estimativa de avaliação de riscos e segurança de candidatos a princípios ativos, e podem ser considerados como uma maneira de reduzir a necessidade de ensaios em animais, bem como custos monetários das pesquisas (ROY, 2015).

A combinação das duas abordagens de CADD proporciona uma melhor informação na modelagem de candidatos a compostos bioativos. A etapa de triagem virtual é realizada com o auxílio de banco de dados de moléculas pequenas, como o DrugBank, GILDA, PubChem e ZINC (todos gratuitos). Atualmente, o ZINC é a base mais utilizada, já que, possui mais de 21 milhões de moléculas disponíveis para triagem virtual, com opções de filtros, como a faixa de peso molecular e o número de ligações rotáveis. Este banco de dados disponibiliza a representação estrutural de cada molécula em diferentes formatos (SDF, Mol2, 3D e SMILES) e também oferece informações de fornecedores para aquisição dos compostos (CAI et al., 2013).

O uso de filtros na triagem virtual de agroquímicos segue a regra de três de Briggs (Tabela 2). Três dos critérios adotados nesta regra são similares aos usados na regra dos cinco de Lipinski (peso molecular, logP e número de ligação de

hidrogênio doador) e três novos critérios foram introduzidos, sendo $\Delta\log P$ ($\log P_{\text{octanol/água}} - \log P_{\text{hexano/água}}$), ponto de fusão e número de equivalente hidrocarboneto (EH) (LINDELL, PATTENDER e SHANNON, 2009).

Tabela 2 Regra de três de Briggs para compostos agroquímicos

REGRA DE TRÊS DE BRIGGS	
Peso molecular	300 ± 100
$\log P$	3 ± 3
Número de ligações de hidrogênio (doação)	≤ 3
$\Delta\log P$	≤ 3
Ponto de fusão	$\leq 300^{\circ}\text{C}$
Equivalente hidrocarboneto	30 ± 5

O parâmetro $\Delta\log P$ é uma medida da polaridade. De maneira geral, compostos muito polares não são eficientes para penetrar membranas celulares, e por isso não conseguem atingir o sítio de ligação. A absorção pelas raízes, combinada com a translocação pelo xilema é particularmente importante para herbicidas inibidores da fotossíntese (SILVA et al., 2013a). Como $\Delta\log P$ é um parâmetro difícil de ser calculado, a literatura sugere substituição por PSA (área de superfície polar molecular). Compostos que são muito polares ($\text{PSA} > 75$) tem sua absorção prejudicada (ERTL, ROHDE e SELZER, 2000).

A medida do ponto de fusão é considerada devido à sua correlação com solubilidade em água. Compostos sintéticos com ponto de fusão $> 300^{\circ}\text{C}$ tendem a ser insolúveis em água e são, portanto, menos biodisponíveis. Número de equivalente hidrocarboneto é utilizado para estimar a pressão de vapor. Compostos com valores de EH muito baixos (≤ 24) podem ser perdidos na evaporação dos veículos utilizados na composição dos agrotóxicos, antes de serem absorvidos (LINDELL et al., 2009).

3.5 Modelagem molecular

Tanto na abordagem LBDD como na SBDD, os estudos se iniciam com o uso de programas de modelagem molecular para construção de modelos de estruturas moleculares e utilizam um método teórico (ou mais de um) para produzir um modelo com geometrias otimizadas. A conformação desempenha papel

fundamental na atividade, pois a maioria dos mecanismos de ação se baseia no ajuste correto da conformação molecular (conformação bioativa) de um ligante e seu sítio de ligação. Uma maneira de avaliar a otimização da estrutura é a sua energia: quanto menor, maior a sua estabilidade termodinâmica. Teoricamente, a conformação que corresponde ao mínimo global (ou seja, a conformação de menor energia entre todas que a estrutura pode apresentar) é a que predominará quando do processo de interação com o receptor (embora esta não necessariamente seja a conformação bioativa). Os cálculos que os programas de modelagem molecular executam no processo de busca para a aproximação de um mínimo de energia é caracterizada por um gradiente (a primeira derivada da energia em função dos parâmetros estruturais) tendendo a zero (SANT'ANNA, 2009).

As funções usadas na determinação de energia de estruturas moleculares têm como base duas aproximações teóricas: a clássica (que inclui métodos de mecânica molecular e dinâmica molecular) e a quântica (que inclui principalmente os métodos “ab initio”, semi-empíricos e os englobados pela teoria do funcional de densidade – DFT). A escolha entre um e outro depende das propriedades que se deseja avaliar, da precisão desejada e da capacidade computacional disponível (DE FREITAS e RAMALHO, 2013).

3.5.1 Aproximação clássica

3.5.1.1 Mecânica molecular

Neste método as moléculas são descritas como um conjunto de átomos conectados no lugar de núcleos e elétrons. Os núcleos são representados por ‘bolas’ e as ligações químicas por ‘molas’ com constante de força característica. Neste modelo é definido um campo de força, que se trata de um conjunto de funções de energia que determinam penalidades energéticas para a geometria molecular com base no afastamento da estrutura dos valores ideais. A minimização de energia é um processo no qual através de um algoritmo matemático adequado busca-se reduzir em conjunto as penalidades energéticas a um mínimo. Uma das funções do campo de força é o termo de energia para o estiramento de ligações químicas. Os campos de força modernos combinam duas ou mais funções e muitos estão disponíveis como MM e AMBER (CARVALHO et al., 2003).

3.5.1.2 Dinâmica molecular

Nesta abordagem, o comportamento dinâmico de um sistema molecular é simulado através da integração numérica de equações do movimento. As equações de movimento da dinâmica molecular representa a evolução no tempo dos movimentos moleculares (trajetórias). Entende-se que as moléculas que possuem certa energia cinética podem superar barreiras energéticas, o que permite a exploração da superfície de energia potencial na busca de outras conformações estáveis (NAMBA, SILVA e DA SILVA, 2008).

3.5.2 Aproximação quântica

Os métodos clássicos não são suficientemente rigorosos para fornecer resultados precisos, pois não consideram os elétrons. Já os métodos quânticos consideram a estrutura molecular como um conjunto de núcleos e elétrons. O principal complicador no desenvolvimento destes métodos é que os elétrons também possuem comportamento ondulatório (a chamada dualidade partícula-onda), que foi resolvido por Erwin Schrödinger em uma equação ($H\Psi = E\Psi$). Os métodos quânticos residem na tentativa de resolver esta equação. A aproximação quântica é capaz de gerar descritores interessantes como propriedades termodinâmicas, cargas elétricas dos átomos, momento dipolar e energia de solvatação (SANT'ANNA, 2009).

É importante observar que geometrias e energias obtidas por diferentes métodos nem sempre convergem para resultados semelhantes. Discrepâncias importantes são observadas entre mecânica molecular e métodos quânticos, mas também entre os métodos semi-empíricos e “ab initio” ou DFT (DE FREITAS e RAMALHO, 2013).

3.5.2.1 Métodos “ab initio”

São os métodos que seguem a abordagem HF, nos quais não são feitas aproximações adicionais na resolução da equação de Schrödinger e representam os orbitais através dos conjuntos de base, sendo o método que resolve com mais exatidão a equação. Um conjunto de base mínimo contem apenas as funções necessárias para acomodar todos os elétrons de um átomo, por exemplo, uma

função 1s para átomos de H ou He. Uma maior flexibilidade na descrição dos elétrons é conseguida com conjuntos de base de valência dividida, nos quais as funções que representam os elétrons de valência são divididas em dois componentes, um mais interno e compacto e outro mais externo e difuso (SANT'ANNA, 2009).

3.5.2.2 Métodos semi-empírico

Trata-se de uma introdução de parâmetros empíricos ou previamente calculados, na tentativa de redução do tempo de cálculo da equação de Schrödinger, quando comparado com o método “ab initio”. Para simplificar, são considerados apenas os elétrons de valência durante os cálculos, enquanto os elétrons das camadas internas são considerados “congelados” junto aos núcleos. Além disso, os programas devem fornecer informações estruturais quimicamente precisas com um custo razoável de tempo de cálculo. Os métodos mais conhecidos e utilizados atualmente são o PM3 e o AM1 (Austin Model 1) (SANT'ANNA, 2009).

3.5.2.3 Teoria do funcional de densidade

Trata-se de um modelo alternativo baseado em orbitais moleculares, que considera que a energia de um conjunto de elétrons sob influência de um campo externo é um funcional único da densidade eletrônica. Como a energia é expressa como uma função de uma única variável, as equações que resultam da aplicação deste modelo são mais simples do que as resultantes da teoria de HF, em que as variáveis são o conjunto de funções de onda de um elétron (OBOT, MACDONALD e GASEM, 2015).

4 PARTE I – ESTUDO DE QSAR

4.1 MATERIAL E MÉTODOS

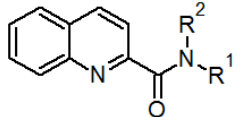
4.1.1 Seleção do conjunto de dados

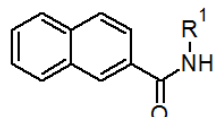
Um conjunto de dados formado por 44 análogos quinolínicos descritos como inibidores do PET foram selecionados de dois artigos (MUSIOL et al., 2007; GONEC et al., 2012), e todos os compostos foram testados pela mesma metodologia de ensaio “in vitro” para atividade de inibição do PET. Os resultados foram apresentados como a dose mínima necessária em $\mu\text{mol/L}^{-1}$, para inibição do PET em 50% (IC_{50}) em cloroplastos de espinafre. Como os valores não possuíam faixa de distribuição normal, com variações numéricas extensas, os mesmos foram convertidos em seus respectivos logaritmos negativos (pIC_{50}), resultando em um intervalo de variação de 2,796 a 5,125 unidades logarítmicas (sendo que os valores foram considerados em sua forma $10^{-6} \text{ mol/L}^{-1}$). As estruturas químicas dos compostos são apresentadas nas Figuras 12 e 13.

4.1.2 Modelagem molecular

As estruturas tridimensionais do conjunto de dados foram construídas no programa HyperChem 7 (HYPERCUBE, 2002) com base em estruturas cristalográficas (códigos CIF: 2201734, 7213893, 2208696, e 2218249) obtidas no banco de dados Crystallography Open Database (GRAZULIS et al., 2012). Nem todas as estruturas bases foram encontradas no banco de dados, então foram escolhidas as estruturas semelhantes.

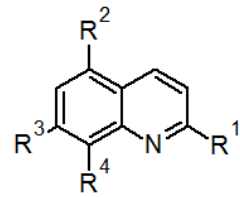
Geometrias de mínimo de energia das estruturas neutras foram calculadas primeiramente em mecânica molecular (MM+) no algoritmo Polak-Ribiere (gradiente conjugado) e em seguida, utilizando mecânica quântica ao nível semi-empírico AM1. Os arquivos foram convertidos em arquivos de entrada para o programa Gaussian 0.9W (GAUSSIAN, 2009) utilizando o software Open Babel (OPENBABEL, 2011). Neste programa, foram realizados os cálculos de otimização, primeiro ao nível HF, utilizando as funções de base 6-31G (d), e na sequência utilizando o funcional B3LYP, procedimento englobado pela DFT, utilizando a base 6-311G++(d,p).

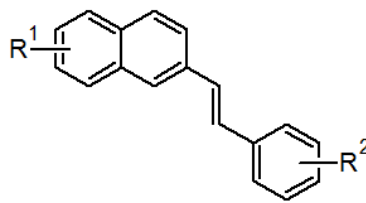




Comp.	R ¹	R ²	pIC ₅₀	Comp.	R ¹	R ²	pIC ₅₀	Comp.	R ¹	pIC ₅₀	Comp.	R ¹	pIC ₅₀
1	CH ₁₂ H ₂₅	H	3,242	12	3-F-C ₆ H ₄	H	4,061	22	i-Pr	3,452	29	3-OCH ₃ -C ₆ H ₄	3,514
2	-(CH ₂) ₄ -		2,796	13	4-F-C ₆ H ₄	H	4,123	23	C ₁₂ H ₂₅	3,073	30	3-Cl-C ₆ H ₄	4,092
3	c-Pn	H	3,118	14	2-Cl-C ₆ H ₄	H	4,294	24	c-Hp	3,665	31	3-Br-C ₆ H ₄	3,988
4	c-Hx	H	2,982	15	3-Cl-C ₆ H ₄	H	4,037	25	c-Oc	3,162	32	3-CF ₃ -C ₆ H ₄	3,509
5	c-Oc	H	3,382	16	4-Cl-C ₆ H ₄	H	3,831	26	C ₆ H ₅	4,684	33	3-NO ₂ -C ₆ H ₄	3,198
6	C ₆ H ₅	H	4,070	17	2-Br-C ₆ H ₄	H	4,035	27	Bn	5,125	34	4-NO ₂ -C ₆ H ₄	3,585
7	Bn	H	4,226	18	3-Br-C ₆ H ₄	H	3,388	28	2-OCH ₃ -C ₆ H ₄	3,117			
8	2-OH-C ₆ H ₄	H	4,788	19	4-Br-C ₆ H ₄	H	3,512						
9	2-CH ₃ -C ₆ H ₄	H	3,845	20	2-CF ₃ -C ₆ H ₄	H	3,961						
10	2-CH ₃ -C ₆ H ₄	H	3,997	21	2-CF ₃ -C ₆ H ₄	H	3,482						
11	2-F-C ₆ H ₄	H	4,008										

Figura 12 Inibidores do PET descritos por GONEC et al., 2012.





Comp.	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	pIC ₅₀	Comp.	R ¹	R ²	pIC ₅₀
35	H	NO ₂	NO ₂	OH	4,086	40	5-COOH	4-Cl	3,312
36	CH ₃	NO ₂	NO ₂	OH	4,585	41	6-COOH	2-Cl	3,667
37	H	NH ₂	NH ₂	OH	3,733	42	8-OH	3-Cl	3,836
38	CH ₃	NH ₂	NH ₂	OH	3,848	43	8-OH	4-Cl	3,349
39	CH ₃	NO ₂	H	H	3,836	44	8-OH	4-Br	3,870

Figura 13 Inibidores do PET descritos por MUSIOL et al., 2007.

4.1.3 Estudos de QSAR

4.1.3.1 QSAR-2D

Para os estudos de QSAR-2D utilizou-se o programa QSAR Modeling, que permite a construção de modelos de QSAR utilizando regressão por PLS. O programa disponibiliza um método de seleção de variáveis denominado de seleção de preditores ordenados (OPS) e ferramentas de validação incluindo a validação

cruzada leave-N-out e o teste de randomização do y. Também é possível realizar a detecção de amostras anômalas, ou outliers (MARTINS e FERREIRA, 2009).

No método de regressão por PLS, a matriz de descritores é correlacionada com o vetor atividade biológica (ou vetor y). Assim, os dados são otimizados para estimar os valores de y, originando novas variáveis X', denominadas de variáveis latentes (VL). Estas novas variáveis têm a vantagem de serem ortogonais entre si, ou seja, não apresentam o problema de intercorrelação, uma das limitações do método MLR. Como o número de variáveis geradas para um estudo de QSAR pode ser muito grande e altamente correlacionadas entre si, o método PLS é útil para evitar o sobreajuste dos dados (MARTINS e FERREIRA, 2013).

O objetivo da seleção de variáveis é reduzir significativamente o número de variáveis independentes para obtenção de modelos simples, robustos e interpretáveis. No método OPS é atribuído importância a cada descritor com base em um vetor informativo (que contém informação sobre a localização das melhores variáveis resposta para a predição), para que em seguida a matriz de descritores seja rearranjada de modo que os mais importantes sejam representados pela primeira coluna da matriz (TEÓFILO, MARTINS e FERREIRA, 2009).

4.1.3.1.1 Obtenção dos descritores

Os descritores foram obtidos a partir das estruturas tridimensionais otimizadas. Nos programas Gaussian 0.9W e GUAUSSView 5 foram obtidos os descritores eletrônicos. As mesmas estruturas foram convertidas para os formatos HIN e Mol2 utilizando o software Open Babel. Estes formatos químicos eram requeridos para o reconhecimento pelos programas Dragon 6.0 (DRAGON, 1997) e Marvin (CHEMAXON, 2008), respectivamente. Uma relação das classes de descritores utilizados na etapa de QSAR-2D é apresentado na Tabela 3.

No Dragon 6.0 foram obtidos descritores constitucionais, topológicos, geométricos e moleculares. No mesmo programa foram aplicados os seguintes filtros para redução de variáveis: eliminação de um membro entre pares com alta correlação entre si (maior que 0,900), eliminação de descritores invariantes e quase-invariantes, e eliminação daqueles que apresentavam desvio padrão menor que 0,001. Ao final, foi realizada uma redução manual para exclusão de descritores com baixa variação. Já no programa Marvin foram obtidos descritores geométricos, de

solubilidade, descritores de carga e outros. Com a soma de todos os descritores, obteve-se uma matriz de 781 variáveis independentes.

Tabela 3 Descritores obtidos para os estudos de QSAR-2D.

PROGRAMA	DESCRITORES	TOTAL
Gaussian 0.9W/ GaussView	<ul style="list-style-type: none"> • Eletrônicos: ✓ Distribuição de carga Mulliken; ✓ Distribuição de carga NBO (Natural Bond Orders); ✓ Momento dipolo total e nos eixos x, y e z; ✓ E(RB3LYP); ✓ Energia dos orbitais moleculares de valência ($E_{\text{HOMO}-1}$, E_{HOMO}, E_{LUMO}, $E_{\text{LUMO}+1}$). 	29
Dragon 6.0	<ul style="list-style-type: none"> • Constitucionais; • Contagem de grupos funcionais; • Descritores de carga; • Propriedades moleculares; • Contagem de circuitos e caminhos (walk and path counts); • Índice de informação; • Índice de adjacência de ponta; • Índice de cargas topológicas; • Topológicos • Geométricos; ✓ Descritores 3D de Morse; ✓ Descritores RDF; ✓ Descritores COMMA; • Pares de átomos 2D e 3D; • Descritores CATS 	720
Marvin Suite	<ul style="list-style-type: none"> • Ponto isoelétrico pH 7.2; • LogD (Consensus/ChemAxon); • LogP pH7.2 (Consensus/ChemAxon); • Descritores de carga; • Geométricos; • Geométricos 3D; • Outros: ✓ Superfície polar área 2D; ✓ Contagem de ligação de hidrogênio doador; ✓ Contagem de ligação de hidrogênio aceptor; ✓ Refratividade molecular. 	32

Uma última etapa de redução de descritores foi realizada no programa QSAR Modeling, em que foram excluídos aqueles que apresentavam correlação absoluta com a atividade biológica ($|r|$) abaixo de 0,200. A matriz final continha 337 descritores.

4.1.3.1.2 Seleção de variáveis e construção do modelo

Na sequência, o modelo de QSAR-2D foi construído utilizando a metodologia de seleção de variáveis OPS, sendo que na primeira etapa foi selecionado o modelo que apresentou o menor valor de RMSECV (0,204). Para as demais etapas foi utilizado o parâmetro de $Q^2_{LOO} > 0,5$. Os modelos foram construídos com dados autoescalados; um pré-processamento que consiste em subtrair de cada elemento de uma coluna de uma matriz de dados o valor médio da respectiva coluna e dividir o resultado pelo seu desvio padrão. O autoescalamamento é necessário quando as variáveis têm diferentes unidades, ou para os casos de grande faixa de variação de dados (MARTINS e FERREIRA, 2013).

4.1.3.1.3 Validação do modelo

Na validação interna foram avaliados os parâmetros apresentados na Tabela 4. Utilizando estes testes, foi verificada a qualidade do grau de ajuste dos dados do modelo, da significância do modelo e de sua capacidade de predição interna. Também foi avaliada a robustez dos modelos pela validação cruzada LNO, com o uso do coeficiente de determinação entre as atividades biológicas observadas e preditas. Este teste foi aplicado para $N = 1-11$ (25% do conjunto de dados) e repetido seis vezes para cada " N ". Finalmente, a possibilidade de o modelo apresentar correlação ao acaso nas informações explicitadas e preditas foi medida através do teste de randomização do y (KIRALJ e FERREIRA, 2009). Estes testes foram calculados no programa QSAR Modeling.

Tabela 4 Parâmetros estatísticos empregados na validação interna dos modelos e suas respectivas equações.

PARÂMETRO	SIGNIFICADO	EQUAÇÃO	VALOR DE REFERÊNCIA
R^2	Coeficiente de determinação ^a	$R^2 = 1 - \frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_{ci})^2}{\sum_i (y_i - \bar{y})^2}$	> 0,6
RMSEC	Raiz quadrada do erro da calibração ^a	$\sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_{ci})^2}{n - p - 1}}$	< Possível
F	Teste de Fischer (com 95% de confiança, $\alpha = 0,05$) ^b	$\frac{\sum_i (y_{obsi} - y_{ci})^2}{k} \frac{n - p - 1}{\sum_i (y_{obsi} - \bar{y}_{obs})^2}$	> Valor referência
Q^2_{LOO}	Coeficiente de determinação da validação cruzada ^{c,d}	$Q^2_{LOO} = 1 - \frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_{vi})^2}{\sum_i (y_i - \bar{y})^2}$	> 0,5
RMSECV	Raiz quadrada do erro da validação cruzada ^c	$\sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_{vi})^2}{n}}$	< Possível

^a qualidade do ajuste; ^b significância; ^c validação cruzada; ^d qualidade da predição interna; y : atividade biológica; \bar{Y} : atividade biológica média; obs: valores experimentais; c: atividade estimada no modelo de regressão; n: número de compostos do conjunto de treinamento; p: número de variáveis latentes; Y_{obsi} : atividade média observada para o conjunto de treinamento completo (DE MELO et al., 2010).

Para validação externa foi separado um conjunto teste de 7 compostos (3, 9, 16, 20, 31, 34 e 42). Estes compostos foram selecionados manualmente (ou seja, sem auxílio de algoritmos ou metodologias automatizadas), sendo que para esta seleção foi considerado que as estruturas deveriam ser selecionadas tanto para representarem a faixa de variabilidade estrutural, quanto a faixa de variação da atividade biológica das amostras. Estes compostos, não foram utilizados na construção do modelo real. Como a atividade biológica das amostras do conjunto de teste é conhecida, pode-se fazer uma comparação entre o valor previsto pelo modelo e o valor real, utilizando parâmetros estatísticos. A qualidade da predição foi avaliada através dos parâmetros descritos na Tabela 5, utilizando o software Xternal Validation Metric Calculator 1.0 (DTCLABS, 2013)

Tabela 5 Parâmetros estatísticos empregados na validação externa dos modelos e suas respectivas equações.

PARÂMETRO	SIGNIFICADO	EQUAÇÃO	VALOR DE REFERÊNCIA
R_{pred}^2	Coefficiente de determinação da validação externa ^e	$R_{\text{pred}}^2 = 1 - \frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_{ei})^2}{\sum_i (y_i - \bar{y})^2}$	> 0,6
k e k'	Inclinações das linhas das regressões lineares de predição ^e	$k = \frac{\sum_i (y_i \hat{y}_{ei})}{\sum_i \hat{y}_{ei}^2}$ $k' = \frac{\sum_i (y_i \hat{y}_{ei})}{\sum_i y_i^2}$	0,85 < k < 1,15 0,85 < k' < 1,15
Average r_m^2	Média de r^2 modificado ^e	$\overline{r_m^2} = (r_m^2 + r'/m^2)/2$	> 0,5
Δr_m^2	Varição de r^2 modificado	$\Delta r_m^2 = r_m^2 - r'/m^2 $	< 0,2

^e validação externa: obs: valores experimentais; i: atividade média observada para o conjunto de treinamento completo; ei: valor obtido na validação externa; r_m^2 : coeficiente de correlação modificado obtido a partir de regressão com dados observados e preditos; r'/m^2 : coeficiente de correlação modificado obtido na regressão com a troca de eixos (DE MELO et al., 2010).

4.1.3.2 QSAR-3D

Estudos de QSAR 3D têm como objetivo encontrar correlação estatística entre descritores obtidos diretamente a partir da estrutura tridimensional de uma molécula, cuja disposição no espaço dá origem aos campos de interação moleculares (MIF), e a atividade biológica sob estudo. Os MIFs são utilizados para representar o processo de interação do ligante com o seu alvo biológico. Para isso, são utilizadas diferentes tipos de sondas, ou átomos de prova, através dos quais se podem obter posições em que interações específicas levem a um “sítio receptor virtual”. Esta entidade abstrata define um local ideal para que um determinado composto químico interaja de modo complementar, e representaria a capacidade (em potencial) de um ligante interagir com uma biomolécula (PASTOR et al., 2000).

Para os estudos de QSAR-3D foi utilizado o programa Pentacle versão 1.0.7, uma ferramenta computacional para calcular descritores do tipo MIF sem a necessidade de alinhamento do conjunto de treinamento, uma necessidade da

maioria dos programas de QSAR-3D. Neste programa, eles são denominados de “descritores GRID independentes”, ou GRIND. As principais características dos descritores GRIND são (PENTACLE, 2015):

- a) Descreve a capacidade das moléculas interagirem com outras moléculas;
- b) São adequados para representar afinidade de ligação;
- c) São independentes de alinhamento, e assim não requerem superposição dos compostos; e
- d) São rápido para calcular.

Resumidamente a metodologia adotada no programa Pentacle envolve três etapas: (i) cálculo dos MIFs para moléculas do conjunto de dados; (ii) filtragem dos MIFs para extrair as regiões mais relevantes (opção do algoritmo AMANDA ou ALMOND); e (iii) codificação das interações pré-filtradas em descritores GRIND (utilizando o algoritmo MACC2 ou CLACC) (ERMONDI et al., 2011).

Além de computar descritores, o Pentacle inclui ferramentas quimiométricas que permitem usá-los para construir modelos QSAR e os mesmos podem ser utilizados para estudos de triagem virtual. Para construção do modelo é utilizado o método PLS e conta com o planejamento fatorial fracionário (FFD) para a seleção de variáveis. O objetivo desta ferramenta é selecionar as variáveis mais relevantes quanto a capacidade de previsão, empregando para isso, o desvio padrão de erro de predição, para avaliar e decidir se um determinado grupo de variáveis será mantido ou descartado do modelo final (BARONI et al., 1993).

4.1.3.2.1 Cálculo dos MIFs e dos descritores GRIND

Para uso no Pentacle o conjunto de dados foi importado com as estruturas tridimensionais otimizadas e previamente convertidas para formato Mol2. Os MIFs foram calculados com a resolução GRID de 0,5 Å, utilizando quatro átomos de prova diferentes: DRY (representa interações hidrofóbicas), O (oxigênio carbonila, representa grupos aceptores de ligação de hidrogênio), N1 (nitrogênio amida, representa grupos doadores de ligação de hidrogênio), e TYP (representa a forma da molécula, em termo de pontos estéricos relevantes). Neste estudo foram aplicados tanto as abordagens ALMOND como AMANDA como filtro dos MIFs, e como algoritmos de codificação foram usados tanto MACC2 como CLACC. Deste

modo, a filtragem e a codificação foram combinadas em quatro métodos para produzir descritores GRIND: ALMOND / MACC2; ALMOND / CLACC; AMANDA / MACC2 e AMANDA / CLACC.

4.1.3.2.2 Seleção de variáveis, construção dos modelos e validação

Para seleção de variáveis foi utilizado o FFD, e os modelos foram construídos utilizando PLS com dados autoescalados. Verificou-se a qualidade estatística dos modelos através dos parâmetros de R^2 e Q^2_{LOO} . Na tentativa de obter modelos com melhor qualidade estatística, um segundo passo foi extrair os descritores gerados pela melhor combinação de filtragem e codificação para uma matriz. Foi então realizada uma redução manual para descritores invariantes e, utilizando o QSAR Modeling foram excluídos descritores que apresentavam correlação absoluta com a atividade biológica ($|r|$) abaixo de 0,200. Assim, foi obtida uma matriz de 70 variáveis independentes. Também no QSAR Modeling, foi realizada a seleção destas variáveis pelo método OPS, e os modelos foram novamente construídos utilizando PLS. A validação (interna e externa) seguiu conforme protocolo já descrito anteriormente. Para validação externa foi separado um conjunto teste de 7 compostos (3, 9, 16, 20, 31, 34 e 42).

4.1.3.2.3 Interpretação dos modelos

No Pentacle é possível visualizar uma representação 3D com a molécula cercada pelas variáveis selecionadas. Nesta representação as regiões são separadas por linhas divisoras de distância, e o usuário pode alterar o composto do conjunto de dados e também as variáveis. Para os modelos gerados no próprio programa pode-se contar com uma janela de interpretação, que carrega o gráfico de coeficiente PLS e uma caixa de diálogo com as 10 variáveis mais importantes, apresentando informações sobre a distância e o tipo de átomo de prova.

4.1.3.3 QSAR modelo híbrido

4.1.3.3.1 Construção dos modelos

A construção do modelo híbrido se deu com a soma dos descritores do melhor modelo QSAR-2D e 3D obtidos. Com o objetivo de melhorar a qualidade estatística, foi realizado uma seleção dos descritores mais relevantes, utilizando o software Pirouette V.4.5 (INFOMETRIX, 2014). Após esta seleção, o modelo foi construído no programa QSAR Modeling, utilizando PLS. A validação (interna e externa) seguiu conforme protocolo já descrito anteriormente. Para validação externa foi separado um conjunto teste de 7 compostos (3, 9, 16, 20, 31, 34 e 42).

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.1 QSAR-2D

Após a seleção de variáveis com o método OPS, foi verificado a presença de um outlier. A Figura 14 apresenta o gráfico de influência versus resíduos de Student, obtido no programa QSAR Modeling. Pode-se observar que o composto 1 apresenta simultaneamente influência e resíduo de Student acima dos limites aceitos na literatura, sendo então considerado como outlier e excluído do conjunto de dados em busca de um melhora estatística do modelo (MARTINS e FERREIRA, 2013).

Utilizando como critério de classificação um $Q^2_{LOO} > 0,5$ (na intenção de se obter modelos com alta capacidade de predição), foram obtidos diversos modelos, que variaram de 37 a 5 descritores. O melhor modelo obtido é apresentado na Equação 1 (modelo A).

$$pIC_{50} = 4,170 - 0,923 (DISPp) - 0,781 (Mor30u) - 0,043 (RDF060u) - 0,147 (CATS2D_09_AL) + 0,178 (CATS2D_03_DL)$$

Equação 1 Modelo de predição real A

Detecção de Outliers

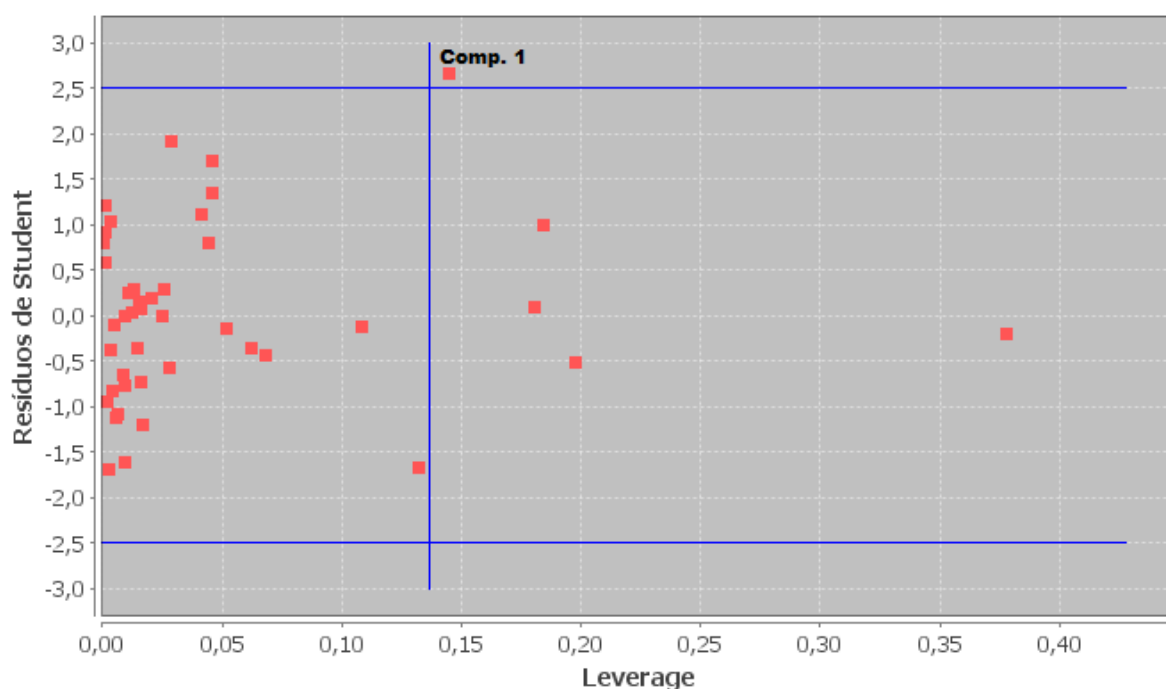


Figura 14 Gráfico de leverage versus resíduos de Student para a detecção de amostras anômalas (outliers). As linhas azuis indicam os limites aceitos pela literatura.

O modelo real A é formado por 5 descritores que deram origem a 2VLs (informação acumulada: 88,84%, sendo VL1 = 33,47% e VL2 = 55,37%). A qualidade do ajuste dos dados é de 76,7% e está acima do mínimo recomendável ($R^2 > 0,6$). O RMSEC, que representa a variabilidade na atividade não explicada do modelo, e, portanto deve ser o mínimo possível, também apresentou valor aceitável. O grau de significância da equação foi avaliado pelo Teste de Fischer (com 95% de confiança, $\alpha = 0,05$). O valor de F obtido foi maior que o seu valor crítico ($F_C = 3,29$, para $p = 2$ e $n-p-1 = 33$), classificando o modelo como significativo (GAUDIO e ZANDONADE, 2001; MARTINS e FERREIRA, 2013).

A previsibilidade interna foi testada pela validação cruzada LOO, que avalia a quantidade de informação ou variabilidade que um modelo pode prever. O resultado mostra que o modelo é capaz de prever 67,0% da informação e está acima do mínimo recomendável ($Q^2_{LOO} > 0,5$). O valor do RMSECV associado foi de 0,301 e o mesmo deve ser o menor possível. A diferença entre os valores de R^2 e Q^2_{LOO} é de apenas 0,097, o que indica pequena possibilidade de ocorrência de sobreajuste de dados (BESALÚ e VERA, 2008; MARTINS e FERREIRA, 2013). Deste modo, o modelo A possui boa capacidade de predição, é significativo, e também possui baixa

tendência de sobreajuste. Resultados resumidos da validação interna do modelo A são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 Resultados dos parâmetros estatísticos empregados na validação interna do modelo A

PARÂMETRO	RESULTADO	VALOR DE REFERÊNCIA
R^2	0,767	> 0,6
RMSEC	0,253	< Possível
F	54,315	> Valor referência (3,29)
Q^2_{LOO}	0,670	> 0,5
RMSECV	0,301	< Possível
$R^2 - Q^2_{LOO}$	0,097	< 0,2

A robustez do modelo foi avaliada pelo procedimento de leave-N-out, onde um maior número de amostras são retiradas do conjunto de dados (entre 20 a 30%). Como resultado, avalia-se a oscilação nos valores de cada Q^2_{LNO} e do seu valor médio em relação ao valor do Q^2_{LOO} , e do desvio padrão de cada replicata. Para análise deste modelo, foi realizado um processo de Leave-11-out (25% do conjunto de treinamento) e para cada valor de N o procedimento foi repetido seis vezes. Na Figura 15 pode-se observar que o modelo pode ser considerado robusto, pois apresenta pequenas flutuações nos valores de Q^2_{LNO} (de 0,632 a 0,690) e pequena diferença para o valor de Q^2_{LOO} do modelo (0,670).

A presença da correlação ao acaso foi avaliada pelo teste de randomização do y. Para que o modelo possa ser considerado livre de correlações espúrias, as intersecções das retas obtidas devem apresentar interceptos menores que 0,050 para Q^2_{LOO} e menores que 0,300 para R^2 (MARTINS e FERREIRA, 2013). A Figura 16 mostra que o modelo obtido apresenta baixa probabilidade de sofrer correlação ao acaso.

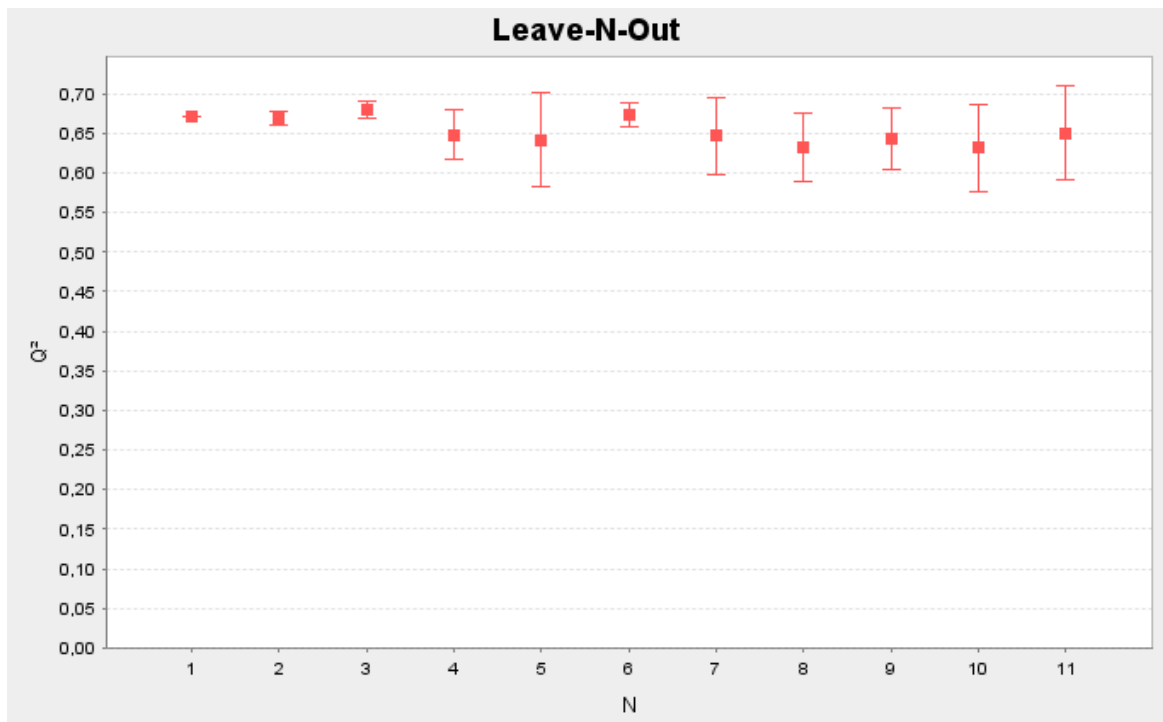


Figura 15 Validação leave-11-out aplicada ao modelo A. Os pontos representam a média e as barras indicam o desvio padrão de 6 replicatas para cada valor de N. O modelo mostrou-se robusto até um valor de N igual a 11 (25% das amostras).

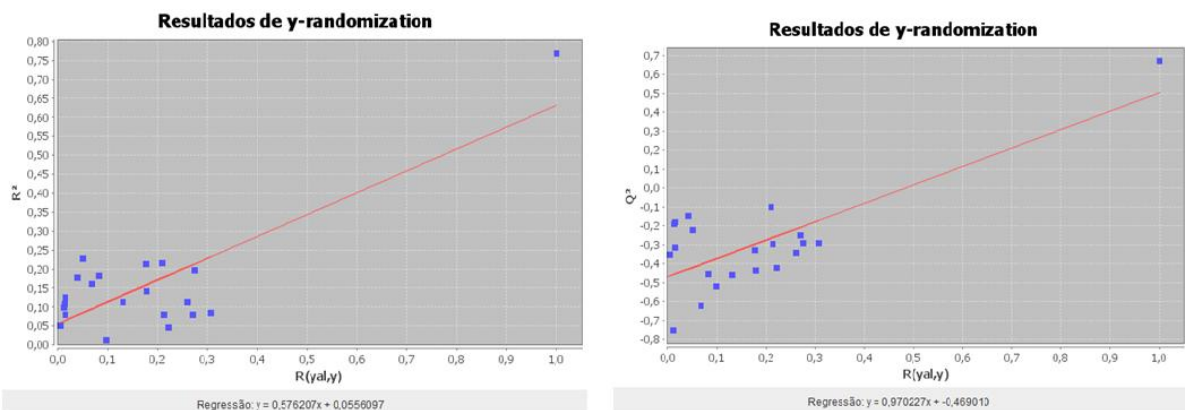


Figura 16 Resultados do teste de randomização do y para o modelo A. Na figura são apresentados os valores dos interceptos para R^2 e Q^2_{LOO} . O modelo apresenta baixa probabilidade de sofrer correlação ao acaso.

Quanto à validação externa, os resultados apresentados na Tabela 7 mostram que o modelo A foi aprovado em todos os testes adotados, indicando que o modelo obtido possui boa capacidade de predição. Na Tabela 8 são apresentados os valores da atividade biológica real e predita para o conjunto teste.

Tabela 7 Resultados dos parâmetros estatísticos empregados na validação externa do modelo A

PARÂMETRO	RESULTADO	VALOR DE REFERÊNCIA
R^2_{pred}	0,689	> 0,6
$ R^2_0 - R'^2_0 $	0,024	< 0,3
k	0,995	$0,85 < k < 1,15$
k'	1,003	$0,85 < k' < 1,15$
Average r_m^2	0,583	> 0,5
Δr_m^2	0,020	< 0,2

Tabela 8 Valores de atividade biológica real e predita para o conjunto teste do modelo A.

COMPOSTO	pIC ₅₀ REAL	pIC ₅₀ PREDITO
3	3,118	3,242
9	3,845	4,128
16	3,831	3,971
20	3,961	3,812
31	3,988	3,829
34	3,585	3,406
42	3,836	3,877

A abordagem QSAR é amplamente reconhecida para previsão de propriedades biológicas dos compostos. Sempre que possível deve-se realizar a interpretação mecanística do modelo de predição em relação ao mecanismo de ação do conjunto de dados, o que garante melhor credibilidade e aceitação do modelo obtido (OCDE, 2007). Todas as moléculas utilizadas neste estudo apresentaram atividade biológica de inibição do PET. Atualmente são comercializados vários herbicidas inibidores do PET, sendo a atrazina a mais conhecida e a mais estudada. O modo como ela interage com o sítio de ligação está descrito na Figura 3. Sabe-se que a presença de grupamentos moleculares que possibilitem a formação de ligações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos Phe265 e Ser264 favorecem a atividade, assim como grupamentos que possibilitem interação hidrofórica com Phe255. Abaixo é apresentada uma breve descrição da função dos descritores selecionados no modelo A.

Mor30u é um descritor geométrico de representação molecular 3D baseado em descritores de difração de elétrons, denominados 3D-MoRSE. Para cálculo do

valor do descritor são considerados três parâmetros: (i) ponderação; (ii) dispersão (s); e (iii) distância interatômica. O símbolo u significa que o descritor é não ponderado. A ponderação visa trazer a discriminação entre os átomos, e assim, os descritores ponderados são sensíveis à presença de fragmentos moleculares específicos. O algarismo arábico da sigla do descritor indica a dispersão, sendo que 30 significa que o parâmetro s é igual a 29 \AA^{-1} . Entende-se que quanto maior o valor de s, pequenas perturbações na geometria da molécula levam a grande variação no valor final do descritor. Quanto às distâncias interatômicas, as mesmas estão sujeitas a variações tanto na natureza (devido a vibrações moleculares), como em estudos computacionais (dependem do método de otimização de geometria). Assim, segundo a literatura, embora o descritor MoRSE seja calculado por uma equação exata, os seus valores são extraídos de alguma distribuição de probabilidade (aleatória). Por fim, vale ressaltar que, embora cada descritor MoRSE incorpore informação sobre a estrutura inteira da molécula, o seu valor final é derivado principalmente de pares atômicos de curta distância (até 3 \AA) e, como o conjunto de dados apresenta uma certa variação estrutural, há uma dificuldade de interpretar o modelo a partir deste descritor (TODESCHINI e CONSONNI, 2009; DEVINYAK, HAVRYLYUK e LESYK, 2014).

RDF60u é um descritor geométrico de função de distribuição radial (RDF) que descreve a distância de pontos no espaço tridimensional, e pode ser interpretado como a probabilidade de encontrar um átomo de volume esférico em raio de R com base no código de função radial de distribuição. O símbolo u significa que o descritor é não ponderado. Este descritor trabalha dentro de uma faixa de distância pré-definida, é independente do número de átomos e invariante a rotações da molécula. Além disso, pode fornecer informações valiosas sobre distância de ligação, tipo de anel, sistemas planares ou não planares e tipos de átomos. A presença do descritor RDF60u no modelo A sugere a ocorrência de alguma dependência linear entre a distribuição molecular tridimensional, calculada no raio de 60 \AA do centro geométrico de cada molécula com a diminuição da atividade biológica (DOKTORGRADES, 2007).

DISPp é o vetor de deslocamento ponderado pela polarizabilidade atômica, descrito como valor de COMMA2 (análise comparativa de momento molecular). Descritores COMMA estão relacionados com a estrutura geométrica e determinam o deslocamento entre um centro de campo de polarizabilidade atômica e o centroide de uma molécula. São independentes de alinhamento ou superposição do conjunto

de dados. O descritor DISPp está relacionado negativamente com a atividade biológica (SILVERMAN, 2000).

Descritores CATS são baseados em distâncias topológicas entre dois pontos, que podem variar de 0 a 9 ligações. Em sua obtenção são definidos cinco pontos farmacóforos em potencial, onde D é doador de ligação de hidrogênio, A é acceptor de ligação de hidrogênio, P são pontos carregados positivamente ou ionizados, N são pontos carregados negativamente ou ionizados e L são pontos farmacóforos lipofílicos (TODESCHINI, CONSONNI, 2009).

Considerando os descritores selecionados, o modelo A indica que a atividade herbicida está relacionada com a geometria (Mor30u e RDF060u) e a polarizabilidade atômica (DISPp). Também pode-se observar que a presença de subestruturas moleculares relacionadas à presença de grupos aceptores de ligação hidrogênio e grupos lipofílicos (CATS2D_09_AL), assim como grupos doadores de ligação hidrogênio e grupos lipofílicos (CATS2D_03_DL) também são relevantes.

4.2.2 QSAR-3D

Resultados estatísticos dos modelos de PLS utilizando a ferramenta FFD como seleção de variáveis e diferentes combinações de algoritmo de filtro e codificação estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 Resultados estatísticos de modelos PLS obtidos no Pentacle.

ALGORITMO FILTRAGEM	ALGORITMO CODIFICAÇÃO	N DESC.	VL	Q^2_{L00}
ALMOND	CLACC	59	3	0,520
ALMOND	MACC 2	45	3	0,440
AMANDA	CLACC	81	3	0,470
AMANDA	MACC 2	49	2	0,400

Apenas a combinação dos algoritmos ALMOND e CLACC resultou em um modelo (modelo B) com um valor de Q^2_{L00} acima da referência (> 0,5). Já as outras combinações resultaram em modelos com resultados estatísticos insatisfatórios, e foram desconsiderados.

O modelo B contém 59 descritores, predominando aqueles do tipo TIP-TIP (pontos estéricos relevantes) e DRY-TIP (hidrofóbico e pontos estéricos relevantes).

A Figura 17 apresenta graficamente os coeficientes PLS dos descritores que compõem o modelo (gráfico denominado correlograma), destacando o descritor nº 6, que é a variável de maior valor positivo. É possível notar que a atividade biológica está relacionada com as interações do tipo DRY-DRY (hidrofóbicos), TIP-TIP, e DRY-O (hidrofóbico e grupos aceptores de ligação de hidrogênio nos compostos), pois seus coeficientes PLS são os que apresentam maiores valores. A Tabela 10 apresenta os dez descritores GRIND mais relevantes para o modelo B e um detalhamento dos intervalos de distância das respectivas interações.

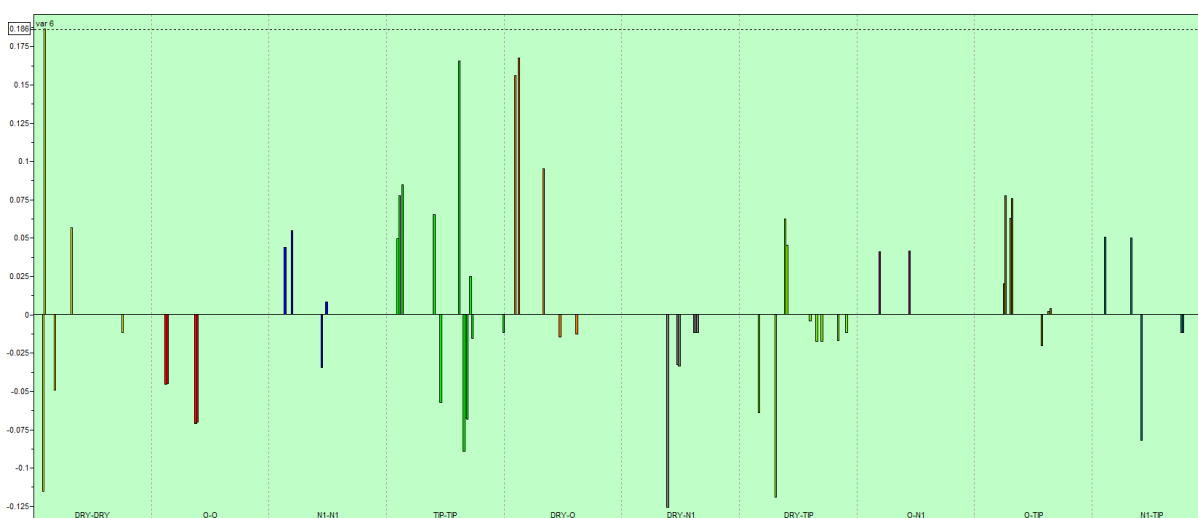


Figura 17 Coeficientes PLS mostrando os descritores diretamente (valores positivos) e inversamente (valores negativos) correlacionados com a atividade herbicida.

Tabela 10 Descritores GRIND do modelo B. Tais variáveis foram identificadas como as mais correlacionadas com a atividade biológica em estudo.

VARIÁVEL	DISTÂNCIA	CORRELOGRAMA	COEFICIENTE PLS
6	4,40 - 2,80 Å	DRY-DRY	0,186
292	3,20 - 3,60 Å	DRY-O	0,167
256	17,20 - 17,60 Å	TIP-TIP	0,165
447	8,40 - 8,80 Å	DRY-TIP	-0,119
382	10,8 - 11,2 Å	DRY-N1	-0,125
307	9,20 - 9,60 Å	DRY-O	0,099
668	11,6 - 12,0 Å	N1-TIP	-0,082
222	3,60 - 4,0 Å	TIP-TIP	0,084
586	7,2 - 7,6 Å	O-TIP	0,077
97	10,4 - 10,8 Å	O-O	-0,071

Após a extração dos descritores GRIND para uma matriz e a seleção de variáveis utilizando a ferramenta OPS no programa QSAR Modeling, obteve-se o modelo C, que é apresentado na equação 2:

$$pIC_{50} = 1,273 + 2,161 (\text{Var. } 303) + 0,523 (\text{Var. } 523) - 0,684 (\text{Var. } 383) + 0,869 (\text{Var. } 28) + 2,785 (\text{Var. } 19) + 1,108 (\text{Var. } 245) - 0,752 (\text{Var. } 260) + 1,717 (\text{Var. } 521) + 0,757 (\text{Var. } 255)$$

Equação 2 Modelo de predição real C

O modelo real C obtido é formado por 9 descritores que deram origem a 2VLs (informação acumulada: 42,68%, sendo VL1 = 13,86% e VL2 = 28,82%). A qualidade do ajuste dos dados (R^2) é de 86,2% e a análise de previsibilidade mostrou que o modelo é capaz de prever 78,8% da informação. O modelo também foi aprovado nos outros testes de validação interna e os resultados são apresentados na Tabela 11.

A robustez do modelo foi avaliada pelo procedimento de leave-N-out. Na Figura 18 observa-se que o modelo pode ser considerado robusto, pois apresenta pequenas flutuações nos valores de Q^2_{LNO} (de 0,717 a 0,788) e pequena diferença para o valor de Q^2_{LOO} do modelo (0,788). A presença da correlação ao acaso foi avaliada pelo teste de randomização do y. A Figura 19 mostra que o modelo obtido apresenta baixa probabilidade de sofrer correlação ao acaso.

Tabela 11 Resultados dos parâmetros estatísticos empregados na validação interna do modelo C

PARÂMETRO	RESULTADO	VALOR DE REFERÊNCIA
R^2	0,862	> 0,6
RMSEC	0,195	< Possível
F	94,345	> Valor referência (3,29)
Q^2_{LOO}	0,788	> 0,5
RMSECV	0,241	< Possível
$R^2 - Q^2_{LOO}$	0,074	< 0,2

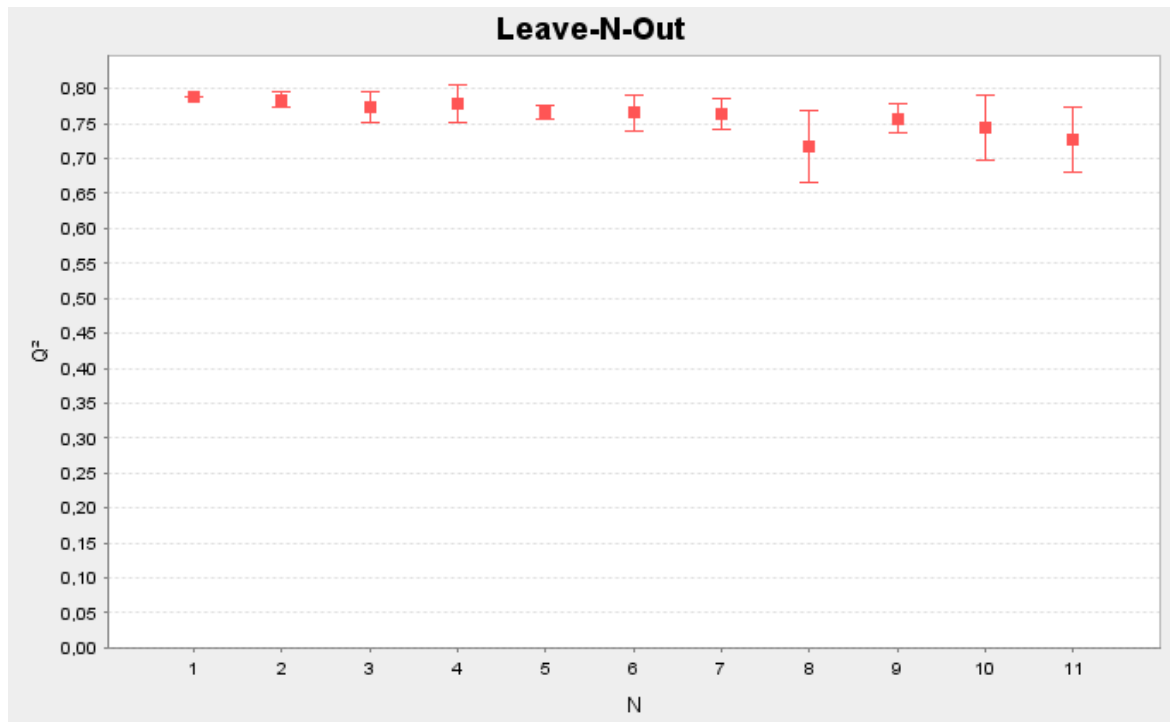


Figura 18 Validação leave-11-out aplicada ao modelo C. Os pontos representam a média e as barras indicam o desvio padrão de 6 replicatas para cada valor de N. O modelo mostrou-se robusto até um valor de N igual a 11 (25% das amostras).

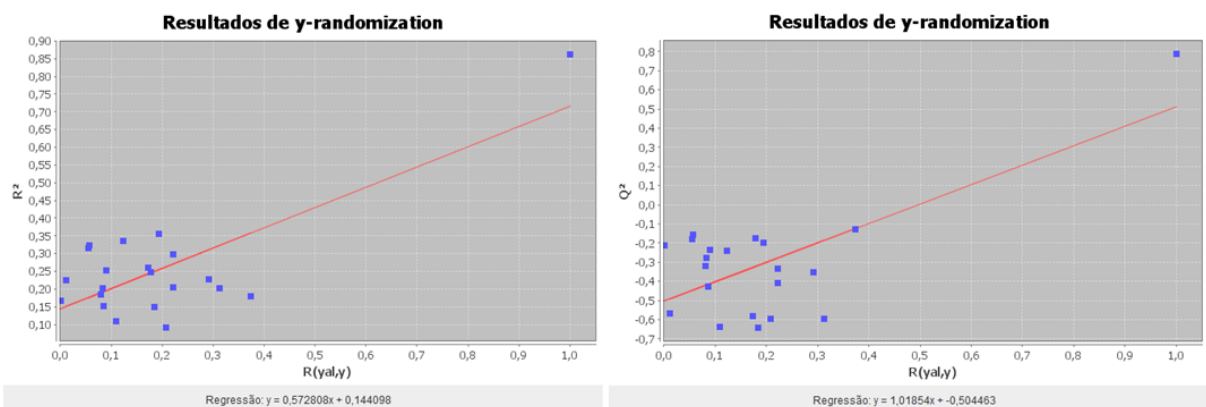


Figura 19 Resultados do teste de randomização do y para o modelo C. Na figura são apresentados os valores dos interceptos para Q^2_{LOO} e R^2 . O modelo apresenta baixa probabilidade de sofrer correlação ao acaso.

Quanto à validação externa, os resultados apresentados na Tabela 12 mostram que o modelo C foi aprovado em todos os testes adotados, indicando que o modelo obtido possui boa capacidade de predição. Na Tabela 13 são apresentados os valores da atividade biológica real e predita para o conjunto teste.

Tabela 12 Resultados dos parâmetros estatísticos empregados na validação externa do modelo C

PARÂMETRO	RESULTADO	VALOR DE REFERÊNCIA
R^2_{pred}	0,892	> 0,6
$ R^2_0 - R^2_0 $	0,129	< 0,3
k	0,989	$0,85 < k < 1,15$
k'	1,010	$0,85 < k' < 1,15$
Average r_m^2	0,583	> 0,5
Δr_m^2	0,190	< 0,2

Tabela 13 Valores de atividade biológica real e predita para o conjunto teste do modelo C

COMPOSTO	pIC ₅₀ REAL	pIC ₅₀ PREDITO
3	3,118	3,366
9	3,845	3,755
16	3,831	3,859
20	3,961	4,031
31	3,988	3,898
34	3,585	3,626
42	3,836	3,937

Semelhante ao modelo B, no modelo C prevalecem em maior quantidade os descritores do tipo TIP-TIP. Informações sobre o correlograma de cada descritor selecionado no modelo C estão na Tabela 14.

Tabela 14 Descritores GRIND do modelo C. Tais variáveis foram identificadas como as mais correlacionadas com a atividade biológica em estudo.

VARIÁVEL	DISTÂNCIA	CORRELOGRAMA	COEFICIENTE PLS
19	7,60 - 8,00 Å	DRY-DRY	2,785
303	7,60 - 8,0	DRY-O	2,161
521	9,60 - 10,0 Å	O-N1	1,717
245	12,80 - 13,20 Å	TIP-TIP	1,108
28	11,20 - 11,60 Å	DRY-DRY	0,869
255	16,80 - 17,20 Å	TIP-TIP	0,757
260	18,8 - 19,20 Å	TIP-TIP	-0,752
383	11,20 - 11,6 Å	DRY-N1	-0,684
523	10,40 - 10,80 Å	O-N1	0,523

Os descritores 19 e 303 são os mais relacionados com a atividade biológica, de acordo com os seus coeficientes. Como já mencionados na Tabela 14, estes descritores são da classe de interações DRY-DRY (hidrofóbicas) e DRY-O (hidrofóbicas e aceptoras de ligação de hidrogênio) respectivamente, e ambos são importantes para ligação da atrazina com o sítio receptor. A representação na Figura 20 detalha estes dois descritores, comparando a molécula mais ativa (composto 27) com a menos ativa (composto 2) do conjunto de dados.

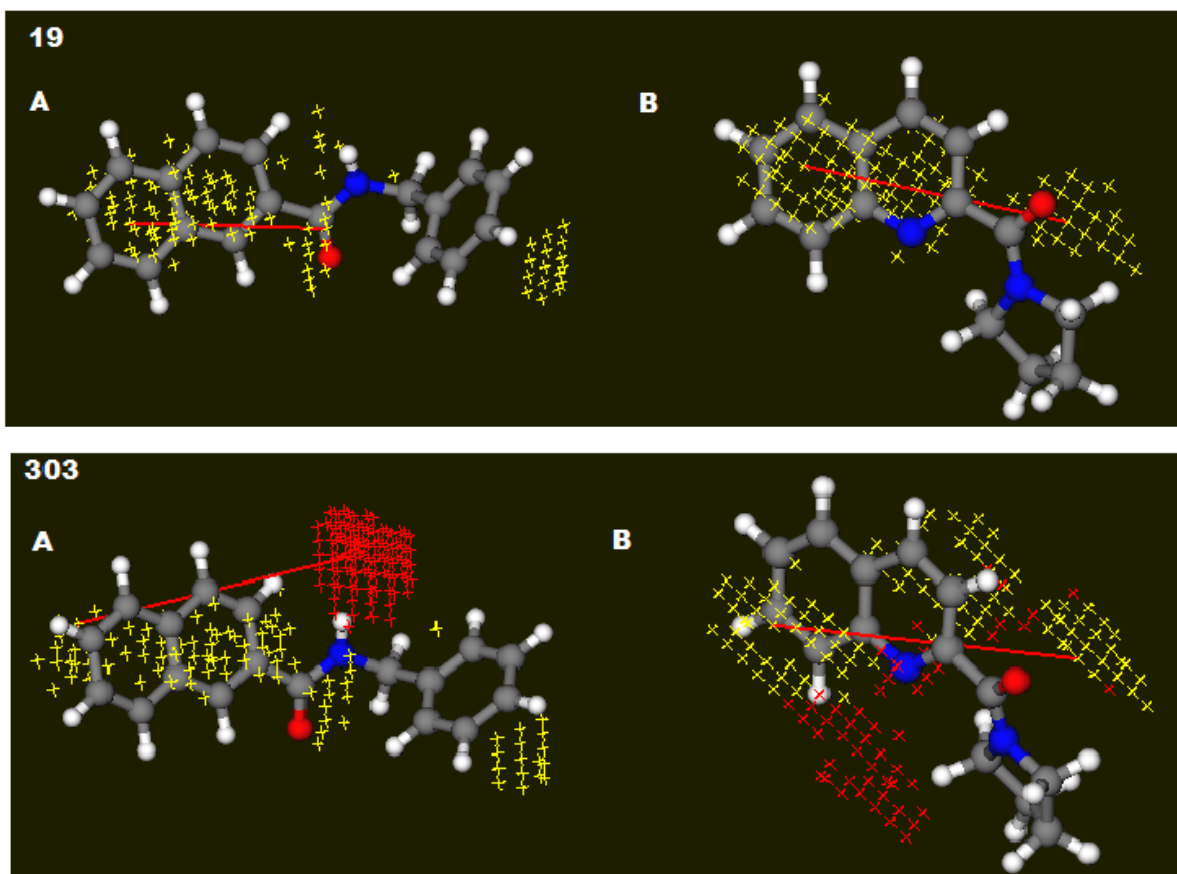


Figura 20 Representação gráfica dos dois descritores com maiores coeficientes PLS do modelo C. O descritor 19 é da classe DRY-DRY (interações hidrofóbicas – cruces amarelas) e o descritor 303 é da classe DRY-O (interações hidrofóbicas – cruces amarelas e aceptoras de ligação de hidrogênio – cruces vermelhas). A é o composto mais ativo e B é o composto menos ativo do conjunto de dados. A linha vermelha representa o intervalo de distância em Å.

4.2.3 QSAR modelo híbrido

O modelo híbrido obtido (modelo D) é apresentado na equação 3.

$$pIC_{50} = 2,663 - 0,577 (DISPp) - 0,833 (Mor30u) - 0,095 (CATS2D_09_AL) + 0,078 (CATS2D_03_DL) + 1,402 (Var. 303) - 0,439 (Var. 383) + 1,915 (Var. 19) + 1,442 (Var. 521)$$

Equação 3 Modelo de predição real D

O modelo real D obtido é formado por 8 descritores que deram origem a 2VLs (informação acumulada: 61,12%, sendo VL1 = 24,81% e VL2 = 36,31%). A qualidade do ajuste dos dados (R^2) é de 85,2% e a análise de previsibilidade mostrou que o modelo é capaz de prever 76,3% da informação. O modelo também foi aprovado nos outros testes de validação interna e os resultados são apresentados na Tabela 15.

A robustez do modelo foi avaliada pelo procedimento de leave-N-out.. Na Figura 21 observa-se que o modelo pode ser considerado robusto, pois apresenta pequenas flutuações nos valores de Q^2_{LNO} (de 0,771 a 0,728) e pequena diferença para o valor de Q^2_{LOO} do modelo (0,763). A presença da correlação ao acaso foi avaliada pelo teste de randomização do y. A Figura 22 mostra que o modelo obtido apresenta baixa probabilidade de sofrer correlação ao acaso.

Tabela 15 Resultados dos parâmetros estatísticos empregados na validação interna do modelo D

PARÂMETRO	RESULTADO	VALOR DE REFERÊNCIA
R^2	0,852	> 0,6
RMSEC	0,202	< Possível
F	83,473	> Valor referência (3,29)
Q^2_{LOO}	0,763	> 0,5
RMSECV	0,255	< Possível
$R^2 - Q^2_{LOO}$	0,089	< 0,2

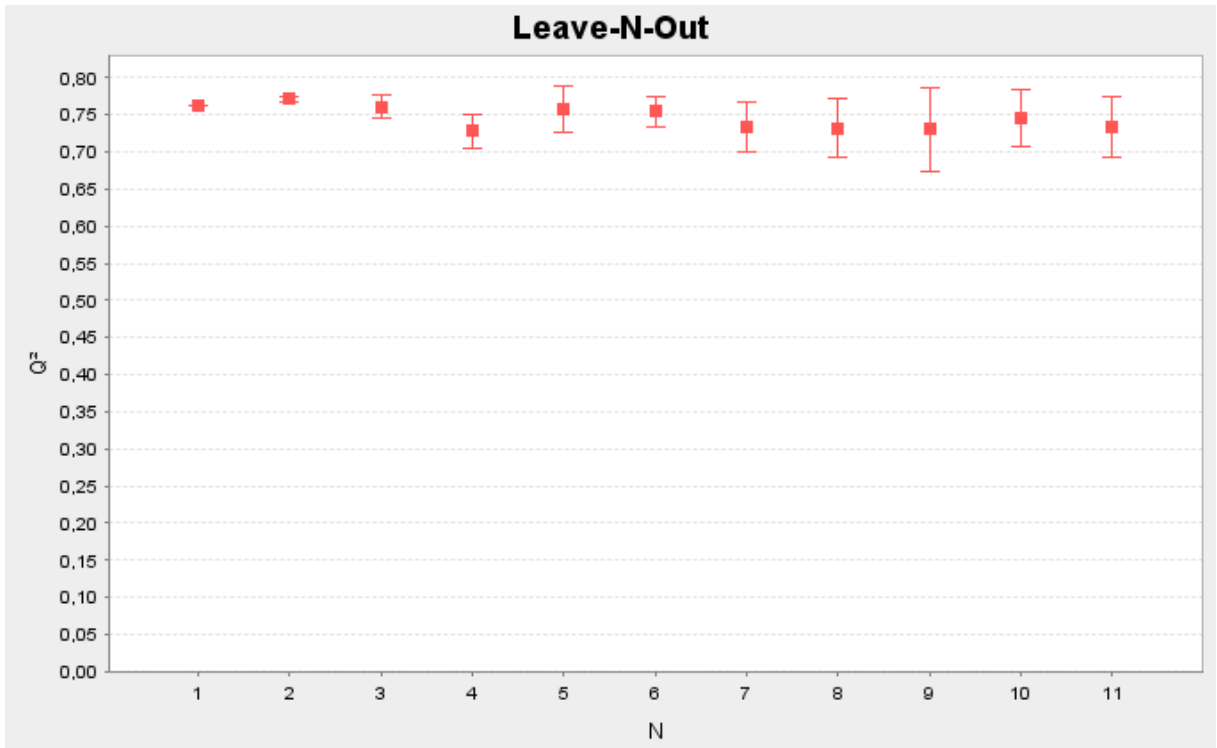


Figura 21 Validação leave-11-out aplicada ao modelo D. Os pontos representam a média e as barras indicam o desvio padrão de 6 replicatas para cada valor de N. O modelo mostrou-se robusto até um valor de N igual a 11 (25% das amostras).

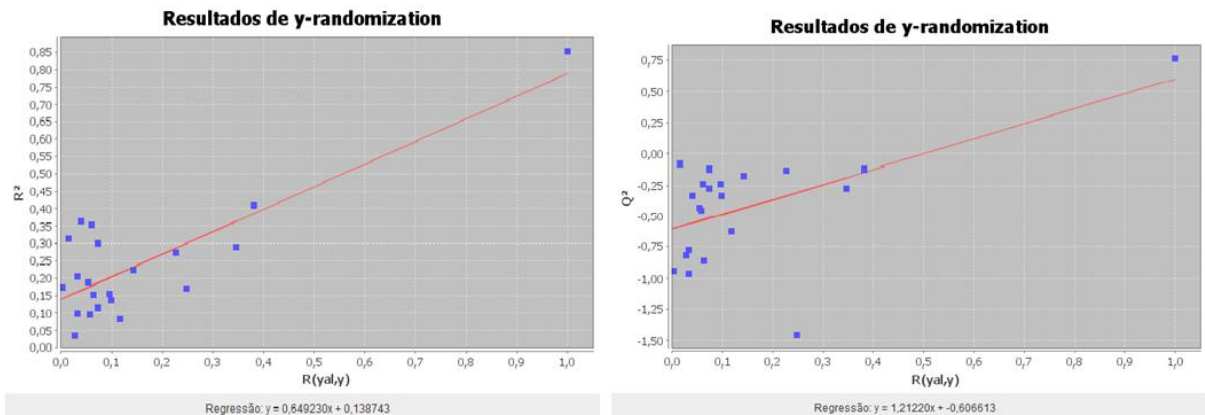


Figura 22 Resultados do teste de randomização do y para o modelo D. Na figura são apresentados os valores dos interceptos para Q^2_{LOO} e R^2 . O modelo apresenta baixa probabilidade de sofrer correlação ao acaso.

Quanto à validação externa, os resultados apresentados na Tabela 16 mostram que o modelo D foi aprovado em todos os testes adotados, indicando que o modelo obtido possui boa capacidade de predição. Na Tabela 17, são apresentados os valores da atividade biológica real e predita para o conjunto teste.

Tabela 16 Resultados dos parâmetros estatísticos empregados na validação externa do modelo D

PARÂMETRO	RESULTADO	VALOR DE REFERÊNCIA
R^2_{pred}	0,735	> 0,6
$ R^2_0 - R^2_0 $	0,075	< 0,3
k	1,007	$0,85 < k < 1,15$
k'	0,997	$0,85 < k' < 1,15$
Average r_m^2	0,635	> 0,5
Δr_m^2	0,180	< 0,2

Tabela 17 Valores de atividade biológica real e predita para o conjunto teste do modelo D

COMPOSTO	pIC ₅₀ REAL	pIC ₅₀ PREDITO
3	3,118	3,197
9	3,845	3,814
16	3,831	4,077
20	3,961	3,887
31	3,988	3,877
34	3,585	3,195
42	3,836	3,958

5 PARTE II – TRIAGEM VIRTUAL

5.1 MATERIAL E MÉTODOS

5.1.1 Conjunto de dados e modelagem molecular

Foram selecionados 31 compostos estruturalmente representativos do conjunto de dados utilizados na parte I. Sendo eles os compostos 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 11, 13, 14, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 35, 36, 39, 40, 42 e 44. O desenho tridimensional e a otimização da geometria se deram também como descrito anteriormente.

5.1.2 Construção do farmacóforo

O modelo farmacofórico foi obtido através do PharmaGist (<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PharmaGist/>). Este servidor web é utilizado para gerar farmacóforos 3D a partir de um conjunto de ligantes de entrada e é possível fazer o download do módulo para triagem virtual (SCHNEIDMAN-DUHOVNY et al., 2008). O pivô para o alinhamento do estudo foi o composto 6, por ser um dos mais ativos do grupo e o que melhor representava a estrutura base do conjunto de dados. Na ponderação da pontuação das características farmacofóricas, foram levadas em consideração as interações que a atrazina faz com a proteína D1 no sítio Q_B (Figura 3) como referência. Por isso, definiram-se os valores 0,100 para anel aromático, 0,100 para carga (ânion/cátion); 2,000 para ligação de hidrogênio (doador/aceptor) e 2,000 para características hidrofóbicas. Todos os resultados gerados pelo programa foram analisados e alguns critérios foram utilizados para escolha do modelo farmacofórico como: pontuação, alinhamentos que contemplassem variações estruturais presentes no conjunto de dados e presença de características similares às interações da atrazina com o FSII.

5.1.3 Triagem virtual

O modelo farmacofórico selecionado no PharmaGist foi utilizado para triagem virtual no ZINCPharmer (<http://zincpharmer.csb.pitt.edu/>), que é um servidor online do ZINC. Nesta etapa foram aplicados alguns filtros disponíveis no próprio

servidor, sendo número máximo de um hit por conformação e por molécula; desvio máximo em relação à ocupação dos pontos farmacofóricos de 0,100 da raiz do valor do desvio quadrático médio (RMSD); e peso molecular de 200 a 400. A faixa de variação do peso molecular foi definida segundo a regra de três de Briggs (Tabela 2).

5.1.4 Filtragem dos compostos obtidos por triagem virtual

Como o número de compostos obtidos na triagem foi muito elevado, várias etapas de filtragem das moléculas foram realizadas nas sequências, sendo excluídos a cada etapa os compostos que não se adequavam aos parâmetros. Os filtros aplicados estão descritos abaixo.

5.1.4.1 Filtro regra de três de Briggs

Nesta etapa, os compostos foram classificados de acordo com os parâmetros da regra de três de Briggs (Tabela 2): logP, PSA, número de ligações de hidrogênio doador, número de EH e ponto de fusão. Como sugerido pela literatura, para medida da polaridade foi utilizado o parâmetro PSA no lugar do $\Delta\log P$. Os valores de ponto de fusão foram obtidos no programa EPISuite 4.11 (EPA, 2012). Todos os outros descritores foram obtidos no programa Dragon 6.0.

5.1.4.2 Filtro de toxicidade 1

O objetivo desta etapa era excluir do resultado da triagem os compostos potencialmente tóxicos. Para isso foi utilizado o software Derek Nexus (LHASA, 2016), que avalia a toxicidade potencial de substâncias químicas baseado em observações empíricas suportados por uma compreensão do mecanismo de toxicidade. O Quadro 1 apresenta as previsões de toxicidade “in silico” que são avaliadas pelo programa.

5.1.4.3 Filtro de toxicidade 2

Ainda com o objetivo de excluir da triagem compostos com potencial tóxico, foi utilizado o programa VEGA para a análise “in silico” de mutagenicidade através

do modelo de QSAR CAESAR (versão 2.1.13), e para a análise de carcinogenicidade pelo modelo de QSAR CAESAR (versão 2.1.7) (VEGA, 2015).

Quadro 1 Previsões de toxicidade “in silico” analisadas pelo software Derek Nexus.

TOXICIDADE AVALIDA
Mutagenicidade bacteriana “in vitro”
Carcinogenicidade em mamíferos
Disfunção mitocondrial em mamíferos
Sensibilização cutânea em mamíferos
Metahemoglobinemia em mamíferos
Fototoxicidade em mamíferos
Esplenotoxicidade em mamíferos
Fotoalergenicidade em mamíferos
Neurotoxicidade em mamíferos
Alerta de nefropatia Alfa-2-um-globulina em mamíferos
Alerta de efeito cumulativo na contagem de glóbulos brancos em mamíferos
Irritação no trato gastrointestinal em mamíferos
Inibição do canal de HERG em mamíferos “in vitro”
Genotoxicidade não específica em mamíferos “in vitro”
Dano a cromossomos de mamíferos “in vitro”
Hepatotoxicidade em mamíferos
Nefrotoxicidade em mamíferos
Teratogenicidade em mamíferos
Irritação de olhos em mamíferos
Toxicidade na medula óssea de mamíferos
Alerta de toxicidade aguda em mamíferos
Sensibilização respiratória em mamíferos
Tireotoxicose em mamíferos
Mutagenicidade em mamíferos “in vivo”
Fosfolipidose em mamíferos
Cloracne em mamíferos
Alerta de bradicardia em mamíferos

5.1.4.4 Filtro por técnica de análise de componentes principais

A análise de componentes principais (PCA), uma técnica de reconhecimento de padrões não supervisionados, foi utilizada como filtro dos compostos obtidos na triagem, a partir de dados das propriedades moleculares consideradas na regra de três de Briggs. A metodologia visa evidenciar similaridades dentro de um conjunto de

dados, através de gráficos de “score” e “loading” , cujos eixos são componentes principais para projeção de dados (CORREIA e FERREIRA, 2007). Os compostos obtidos na triagem foram comparados com os herbicidas comerciais (atrazina, simazina, ametrina, prometrina, hexazinona, metamitrona, metribuzim, diurom, linurom, tidiazurom, tebutiurom, propanil, bentazona, ioxinil e amicarbazona).

5.1.4.5 Filtro por estudo de ancoramento molecular

Os estudos de ancoramento molecular foram realizados a fim de se verificar as energias de interação entre os compostos e o sítio Q_B da proteína D1, levando em consideração as interações da atrazina e também da plastoquinona (ligante endógeno). O banco de dados PDB disponibiliza a estrutura proteica do FSII (código 1S5L). A partir desta foi extraído apenas o sítio de ligação Q_B utilizando o servidor de modelagem Swiss-PDB Viewer (GUERX e PEITSCH, 1997). A docagem foi realizada utilizando o software iGEMDOCK (HSU et al., 2011) com a metodologia “very slow” (tamanho da geração = 800, gerações = 80 e número de soluções = 10). Essa metodologia foi selecionada a partir da validação do método, onde foi realizada a redocagem da plastoquinona complexada na proteína cristalografada. Como o complexo mais semelhante ao complexo cristalográfico foi obtido utilizando esta abordagem, a mesma foi adotada para as demais moléculas.

5.1.4.6 Previsão de atividade herbicida utilizando modelos QSAR

Para os compostos resultantes das etapas de triagem foi prevista a atividade de inibição do PET utilizando os modelos obtidos na parte I deste trabalho. O desenho tridimensional, a otimização da geometria e o cálculo dos descritores destes compostos seguiram exatamente a metodologia descrita anteriormente. Além disso, os compostos foram avaliados quanto à adequação no domínio de aplicabilidade do respectivo modelo utilizado para predição. O domínio de aplicabilidade é o espaço físico químico, estrutural e biológico sobre o qual o conjunto de treinamento do modelo foi desenvolvido. Diz-se que o modelo é mais confiável para prever compostos que estão dentro domínio de aplicabilidade. Para este fim foi utilizando o programa DTC_Euclidean (DTCLABS, 2013b).

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O farmacóforo selecionado no PharmaGist é formado por 4 características (uma aromática, duas aceptoras de ligação de hidrogênio e uma doadora de ligação de hidrogênio), como apresentado na Figura 23.

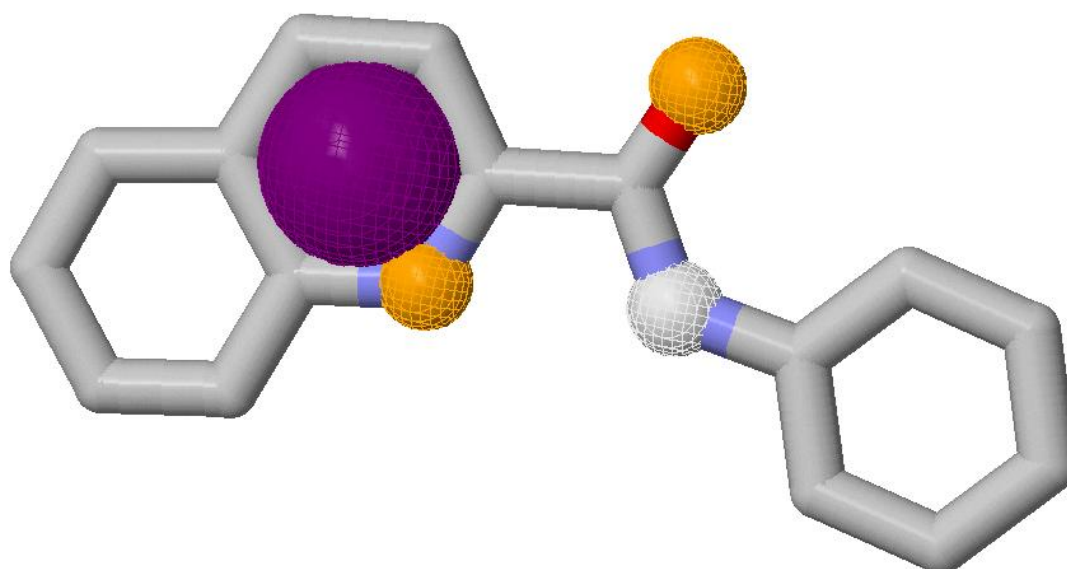
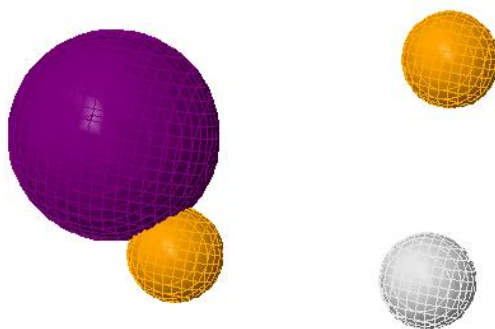
**A****B**

Figura 23 Modelo farmacofórico selecionado. Em roxo: característica aromática; em amarelo: característica aceptora de ligação de hidrogênio; e em branco: característica doadora de ligação de hidrogênio. Em B a representação estrutural do composto pivô foi removida para dar destaque aos pontos farmacofóricos. A figura foi construída no ZINC Pharmer.

A triagem virtual realizada pelo ZINC resultou em 86.560 hits. As etapas de redução, utilizando diversos filtros, apresentaram os seguintes resultados:

- Regra de três de Briggs: 15.942 compostos;
- Derek: 7.591 compostos;

- VEGA: 2.188 compostos;
- PCA: 242 compostos (Figura 24);
- Ancoramento molecular: 28 compostos.

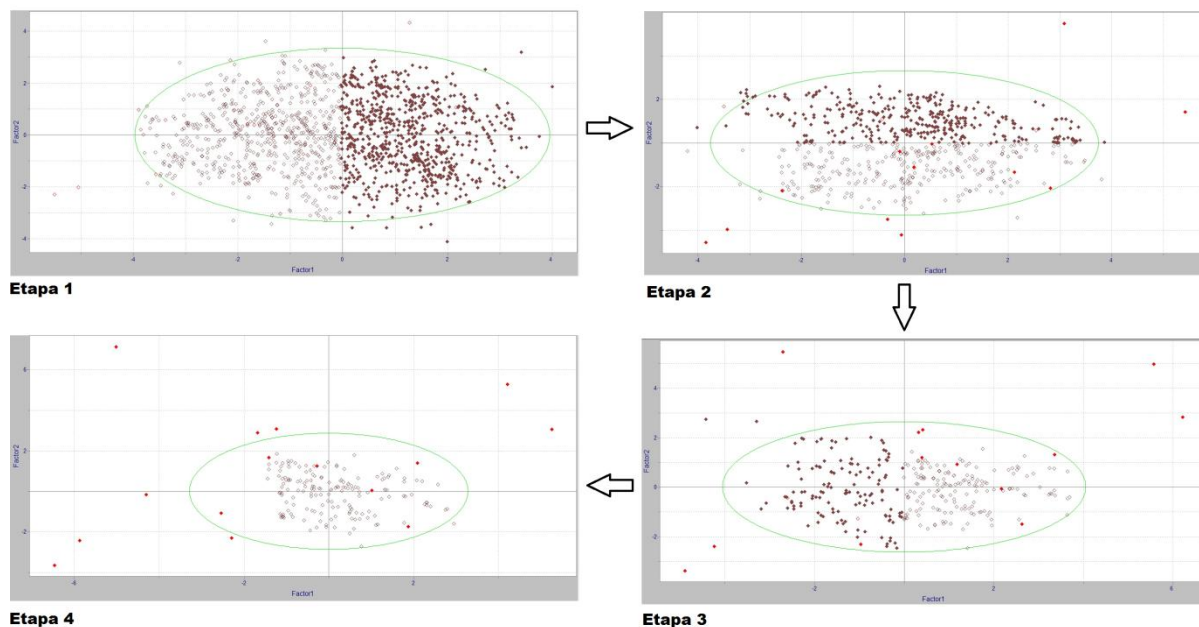


Figura 24 Gráficos de PCA apresentando a similaridade dos compostos da triagem virtual (losangos em branco) com os herbicidas comerciais (losangos em vermelho). Devido à quantidade de compostos obtidos na triagem, foi necessário realizar o processo em quatro etapas, sempre procurando manter os compostos que se acumulassem no quadrante com o maior número de herbicidas comerciais.

Em relação aos resultados obtidos na etapa de ancoramento molecular, os compostos selecionados interagiram de maneira semelhante à atrazina e à plastoquinona com os resíduos de aminoácidos no sítio Q_B . A estrutura destes compostos é apresentada na Figura 1 dos Anexos.

Para os 28 compostos, foi realizada a previsão de atividade de inibição do PET utilizando os modelos A, C e D. É possível observar que o modelo A apresentou sete compostos fora do limite de linearidade, enquanto o modelo C apresentou quinze compostos fora do limite. Em ambos os casos, estas previsões localizaram-se abaixo do valor mínimo representado pelos modelos (2,796). No modelo A, sete destes compostos apresentaram valores próximos deste limiar (diferença máxima de 0,846 unidades). Considerando esta mesma diferença, no modelo C dezesseis compostos apresentaram abaixo deste limite. Os resultados de previsão são apresentados na Tabela 18.

Tabela 18 Resultados de previsão de atividade de inibição do PET para os compostos resultantes da triagem virtual. Valores abaixo do valor mínimo representado pelos modelos (2,796) estão em destaque.

AMOSTRA	pIC50 DE ACORDO COM MODELO			
	A (2D)	C (3D)	D (Híbrido)	%DPR
ZINC35163359	3,394	2,417	2,958	16,37
ZINC32769579	3,026	2,958	2,951	7,75
ZINC08867283	3,463	3,732	4,042	1,38
ZINC48687929	2,904	2,314	2,818	16,73
ZINC56906697	3,449	2,571	3,301	12,17
ZINC74290496	1,950	2,800	2,432	11,91
ZINC70642231	3,950	2,807	3,732	15,14
ZINC74385720	2,760	2,800	2,845	17,37
ZINC75363212	3,889	2,450	3,323	7,58
ZINC75371915	3,179	2,522	3,208	17,82
ZINC92991642	3,060	1,866	2,986	1,53
ZINC03189299	3,016	2,245	3,043	22,50
ZINC73218896	2,835	2,453	2,766	13,07
ZINC92629320	2,916	3,832	4,076	16,26
ZINC91141383	3,230	2,127	3,024	14,23
ZINC81823972	3,454	2,630	3,605	8,73
ZINC92605964	2,670	4,004	3,874	20,99
ZINC94332434	3,760	4,989	5,105	3,33
ZINC82302860	2,732	2,154	2,832	4,11
ZINC84252827	3,448	2,894	3,170	14,50
ZINC92658880	2,651	2,714	2,784	20,93
ZINC92677110	2,476	2,922	2,887	16,96
ZINC92583080	3,178	2,374	2,908	5,29
ZINC92582036	2,673	2,505	2,624	2,45
ZINC92639326	2,803	2,582	2,856	13,01
ZINC92582074	2,825	2,783	3,004	8,98
ZINC92663194	2,831	3,225	3,674	25,36
ZINC44549087	3,256	2,602	3,221	16,15

Os descritores do modelo A e C foram combinados, gerando um modelo híbrido (modelo D). E este modelo foi refinado através da retirada de descritores que apresentavam uma menor contribuição para a qualidade do mesmo. O modelo D, formado por descritores topológicos, geométricos e de campo, apesar de ser um pouco inferior ao modelo C e um pouco superior ao modelo A, mostrou um comportamento melhorado para o cálculo dos valores da atividade biológica do

conjunto obtido na triagem virtual: apenas três compostos apresentaram valores abaixo do limite mínimo da faixa de variação da atividade, sendo estas de apenas 0,030, 0,012 e 0,172 unidades, respectivamente.

Este comportamento talvez possa ser explicada pela análise dos domínios de aplicabilidade euclidianos de cada modelo, apresentados na Figura 25. É possível observar que, para o modelo D, nenhuma das amostras apresentou uma distância média normalizada maior que a linha limite (1,000). Enquanto isso, no modelo A, oito amostras localizaram-se fora do domínio de aplicabilidade, e no modelo C, cinco amostras tiveram este comportamento.

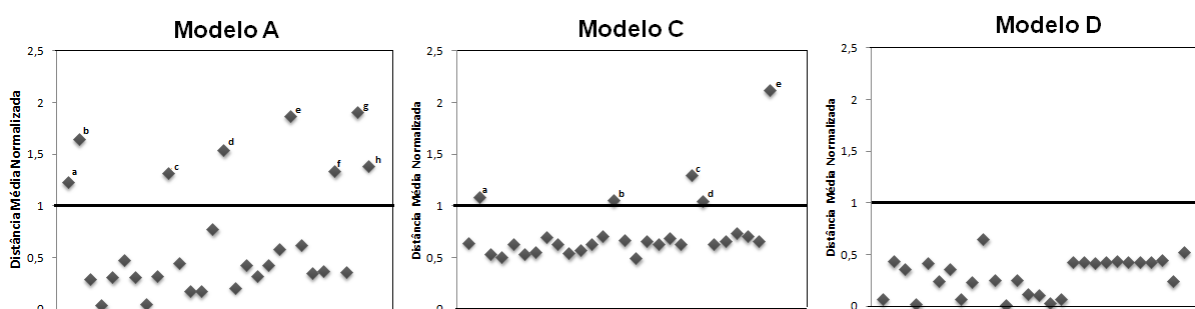


Figura 25 Domínio de aplicabilidade euclidiano. Para o modelo A, oito amostras apresentaram distância média normalizada maior que 1,000 (a = ZINC3189299, b = ZINC8867283, c = ZINC74290496, d = ZINC82302860, e = ZINC92605964, f = ZINC92663194, g = ZINC92991642, h = ZINC94332434). E o mesmo aconteceu com cinco amostras no modelo C (a = ZINC8867283, b = ZINC81823972, c = ZINC92605964, d = ZINC92629320, e = ZINC94332434). Já para o modelo D, todas as amostras apresentaram-se dentro do domínio de aplicabilidade.

Estes resultados podem indicar que as previsões obtidas para os modelos A e C podem não ser confiáveis, ao menos para estruturas que, apesar de serem obtidas a partir do farmacóforo baseado no conjunto de dados em estudo, não são quinolinas. Assim, as previsões realizadas não são confiáveis, sendo que estes modelos podem ser mais aptos para o planejamento de novas quinolinas com capacidade de inibir o PET. Já o modelo D apresenta potencial de uso tanto para estudo de síntese orgânica, quanto para triagem virtual. Portanto, optou-se por selecionar, como resultado final da triagem virtual, os dez compostos. Os mesmos são apresentados na Figura 26.

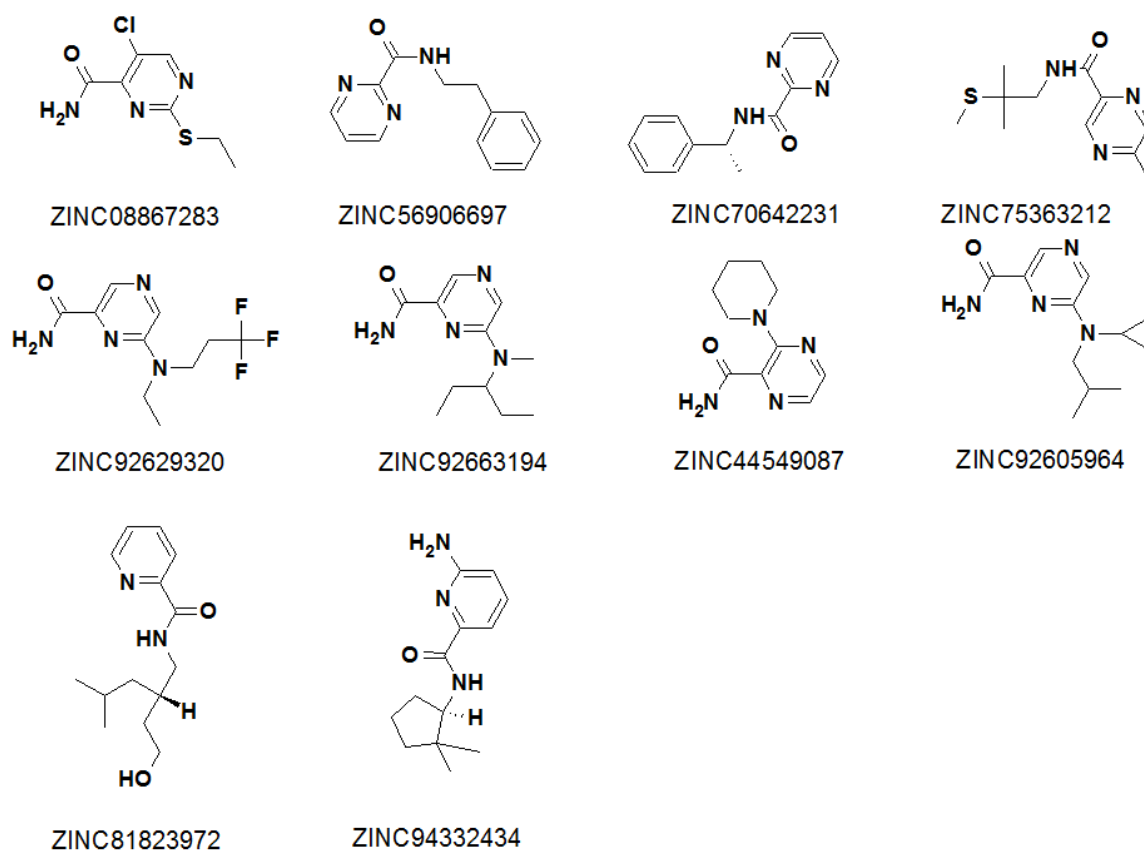


Figura 26 Compostos com melhor resultado de previsão de atividade de inibição do PET, utilizando o modelo D.

6 CONCLUSÃO

Este trabalho apresentou resultados de estudos de QSAR-2D, 3D e híbrido para um conjunto de derivados quinolínicos com atividade de inibição do PET. Os modelos A, C e D foram aprovados nos testes de validação (interna e externa), indicando que os mesmos são significativos e não apresentam correlação ao acaso, e também possuem boa capacidade de predição e robustez. Uma segunda parte do trabalho apresentou estudos de triagem virtual para compostos representativos do conjunto de dados utilizado na construção dos modelos. Após várias etapas de filtragem, entre elas; parâmetros da regra de três de Briggs, análises de toxicidade “in silico”, técnicas de PCA, e estudos de ancoramento molecular, foram obtidos 28 compostos. E destes, todos mostraram potencial para serem herbicidas, através da previsão utilizando os modelos de QSAR obtidos. Porém, apenas o modelo D foi considerado confiável para ser utilizado na triagem virtual. Como resultado final, optou-se por selecionar os dez compostos que apresentaram maior valor de previsão de atividade de inibição do PET, utilizando o modelo D. Uma continuação do trabalho se dará com a aquisição ou síntese destes dez compostos e uma posterior análise biológica para confirmação da atividade herbicida.

7 REFERÊNCIAS

ABBAS, K.; LÄMSÄ, V.; REPONEN, P.; KÜBLBECK J.; HONKAKOSKI, P.; MATTILA, S.; PELKONEN, O.; Kakkola, J. Characterization of human cytochrome P450 induction by pesticides. **Toxicology**, Hamburg, v. 294, n. 1, p. 17-26, mar. 2012.

ANDREWS, J. E.; GRAY, L. E. The effects of lindane and linuron on calcium metabolism, bone morphometry and the kidney in rats. **Toxicology**, Hamburg, v. 60, n. 1-2, p. 99-107, 1990.

ARTESE, A.; CROSS, S.; COSTA, G.; DISTINTO, S.; PARROTTA, L.; ALCARO, S.; ORTUSO, F.; CRUCIANI, G. Molecular interaction fields in drug discovery: recent advances and future perspectives. **Wiley Interdisciplinary Reviews: computational Molecular Science**, Hoboken, v. 3, n. 6, p. 594-613, mai. 2013.

BARONI, M.; CLEMENTI, S.; CRUCIANI, G.; KETTANEH-WOLD, N.; WOLD, S. D-Optimal designs in QSAR. **Quantitative Structure-Activity Relationships**, Hoboken, v. 12, n. 3, p. 225-231, 1993.

BESALÚ, E.; VERA, L. Internal test set (ITS) method: a new cross-validation technique to assess the predictive capability of QSAR models, application to a benchmark set of steroids. **Journal of the Chilean Chemical Society**, Concepcion, v. 53, p. 1576-1580, mai. 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Monografias de agrotóxicos**. Brasília: Ministério da Saúde. 2016. Disponível em: <
<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Monografias+de+Agrotoxicos/Monografias>>.
Acesso em: Dez 2016.

BUCHA, H. C.; TODD, C. W. 3-(p-chlorophenyl)-1,1-dimethylurea - a new herbicide. **Science**, Washington, v. 114, n. 2967, p. 493-494, nov. 1951.

CAI, C.; GONG, J.; LIU, X.; GAO, D.; LI, H. Molecular similarity: methods and performance. **Chinese Journal of Chemistry**, Fusiónópolis, v. 31, n. 9, p. 1123-1132, set. 2013.

CAMPOS-PEREIRA, F. D.; OLIVEIRA, C. A.; PIGOSO, A. A.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; BARBIERI, R.; SPATTI, E. F.; MARIN-MORALES, M. A.; SEVERI-AGUIAR, G. D. C. Early cytotoxic and genotoxic effects of atrazine on Wistar rat liver: a morphological, immunohistochemical, biochemical, and molecular study. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Nova York, v. 78, p. 170-177, abr. 2012.

CARBONARI, C. A. Eficácia do herbicida amicarbazone em aplicação conjunta com a colheita de cana-de-açúcar no controle das principais plantas daninhas da cultura. Botucatu, p.127. 2007. Dissertação (Mestrado em Agronomia).

CARVALHO, I.; PUPO, M. T.; BORGES, Á. D. L.; BERNARDES, L. S. C. Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, p. 428-438, mai./jun. 2003.

CHEMAXON. **MARVIN**. 2008. Disponível em: <
<https://www.chemaxon.com/products/marvin/>>. Acesso em dez. 2016.

CHRISTOFFOLETI, P. J. **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 3 ed. Piracicaba: Associação Brasileira de Ação à Resistência de Plantas aos Herbicidas (HRAC-BR), 2008. 120 p.

CORREIA, P. R. M; FERREIRA, M. M. C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Química nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 481-487, mar./abr. 2007.

DA ROCHA, M. S.; ARNOLD, L. L.; DE OLIVEIRA, M. L. C. S.; CATALANO, S. M. I.; CARDOSO, A. P. F.; PONTES, M. G. N.; FERRUCIO, B.; DODMANE, P. R.; COHEN, S. M.; DE CAMARGO, J. L. V. Diuron-induced rat urinary bladder carcinogenesis: mode of action and human relevance evaluations using the international programme on chemical safety framework. **Critical Reviews in Toxicology**, Abingdon, v. 44, n. 5, p. 393-406, fev. 2014.

DANISHUDDIN, M.; KHAN, A. U. Structure based virtual screening to discover putative drug candidates: necessary considerations and successful case studies. **Methods**, Amsterdam, v. 71, p. 135-145, out. 2015.

DAYAN, F. E.; TRINDADE, M. L. B.; VELINI, E. D. Amicarbazone, a new photosystem II inhibitor. **Weed Science**, Washington, v. 57, n. 6, p. 579-583, jul 2009.

DE FREITAS, M. P.; RAMALHO, T. C. Employing conformational analysis in the molecular modeling of agrochemicals: insights on QSAR parameters of 2,4-D. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 37, n. 6, p. 485-494, nov./dez. 2013.

DE MELO, E. B.; MARTINS, J. P. A.; JORGE, T. C. M.; FRIOZI, M. C.; FERREIRA, M. M. C. Multivariate QSAR study on the antimutagenic activity of flavonoids against 3-NFA on *Salmonella typhimurium* TA98. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Amsterdam, v. 45, n. 10, p. 4562-4569, out. 2010.

DEVINYAK, O.; HAVRYLYUK, D.; LESYK, R. 3D-MoRSE descriptors explained. **Journal of Molecular Graphics and Modeling**, Amsterdam, v. 54, p. 194-203, nov. 2014.

DOKTORGRADES, E. **Radial distribution functions in computational chemistry: theory and applications**. 1 ed. Nuremberg: Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, 2007. 193 p.

DOMINGUES, A.; BARBISAN, L. F.; MARTINS, P. R.; SPINARDI-BARBISAN, A. L. T. Diuron exposure induces systemic and organ-specific toxicity following acute and sub-chronic exposure in male Wistar rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 3. n. 3, p. 387-396, mai. 2011.

DONNA, A.; CROSNARI, P.; ROBUTTI, F.; BETTA, P. G.; BOCCA, R.; MARIANI, N.; FERRARIO, F.; FISSI, R.; BERRINO, F. Triazine herbicides and ovarian epithelial

neoplasm. **Scandinavian Journal of Work, Environment & Health**, Helsínquia, v. 15, n. 1, p. 47-53, fev. 1989.

DOS SANTOS, E. A.; CORREIA, N. M.; BOTELHO, R. G. Resíduos de herbicidas em corpos hídricos - uma revisão. **Revista Brasileira de Herbicidas**, Londrina, v. 12, n. 2, p. 188-201, mai./ago. 2013.

DRAGON. **DRAGON SOFTWARE VERSION 6.0**. 1997. Disponível em: < http://www.talete.mi.it/products/dragon_description.htm >. Acesso em dez. 2016.

DTCLABS. **Xternal Validation Metric Calculator 1.0**. 2013a. Disponível em: < <http://dtclab.webs.com/software-tools> >. Acesso em dez. 2016

_____. **DTC_Euclidean 1.1**. 2013b. Disponível em: < <http://dtclab.webs.com/software-tools> >. Acesso em dez. 2016

EPA, ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Pesticide fact sheet amicabazone**. 2005. Disponível em: < http://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-114004_04-Oct-05.pdf >. Acesso em dez. 2016.

_____. **Amendment to registration eligibility decision (RED) for propanil**. 2006. Disponível em: < https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/propanil_red_combined.pdf >. Acesso em dez. 2016.

_____. **EPI Suite - Estimation program interface V.4.11**. 2012. Disponível em: < <https://www.epa.gov/tsca-screening-tools/download-epi-suitetm-estimation-program-interface-v411> >. Acesso em dez. 2016.

ERMONDI, G.; CARON, G.; GARCIA PINTOS, I.; GERBALDO, M.; PEREZ, M.; PEREZ, D. I.; GANDARA, Z.; MARTINEZ, A.; GOMEZ, G.; FALL, Y. An application of two MIFs-based tools (Volsurf plus and Pentacle) to binary QSAR: the case of a palinurin-related data set of non-ATP competitive Glycogen Synthase Kinase 3 beta (GSK-3 beta) inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Manchester, v. 46, n. 3, p. 860-869, mar. 2011.

ERTL, P.; ROHDE, B.; SELZER, P. Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 20, p. 3714-3717, 2000.

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

GAUDIO, A. C.; ZANDONADE, E. Proposição, validação e análise dos modelos que correlacionam estrutura química e atividade biológica. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 5, p. 658-671, set./out. 2001.

GAUSSIAN. **GAUSSIAN SOFTWARE VERSION 09**. USA, 2009. Disponível em: < <http://www.gaussian.com> >. Acesso em dez. 2016.

GERTRUDES, J. C.; MALTAROLLO, V. G.; SILVA, R. A.; OLIVEIRA, P. R.; HONÓRIO, K. M.; DA SILVA, A. B. F. Machine learning techniques and drug design. **Current Medicinal Chemistry**, Cambridge, v. 19, n. 25, p. 4289-4297, 2012.

GONEC, T.; BOBAL, P.; SUJAN, J.; PESKO, M.; GUO, J.; KRALOVA, K.; PAVLACKA, L.; VESELY, L.; KRECKOVA, E.; KOS, J.; COFFEY, A.; KOLLAR, P.; IMRAMOVSKY, A.; PLACEK, L.; JAMPILEK, J. Investigating the spectrum of biological activity of substituted quinoline-2-carboxamides and their isosters. **Molecules**, Basel, v. 17, p. 613-644, jan. 2012.

GRAZULIS, S.; DASKEVIC, A.; MERKYS, A.; CHATEIGNER, D.; LUTTEROTTI, L.; QUIRÓS, M.; SEREBRYANAYA, N. R.; MOECK, P.; DOWNS, R. T.; LeBaIL, A. Crystallography open database (COD): an open-access collection of crystal structures and platform for world-wide collaboration. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 40, p. 420-427, nov. 2012.

GREEN, J. M. Current state of herbicides in herbicide-resistant crops. **Pest Management Science**, Nova York, v. 70, n. 9, p. 1351-1357, fev. 2014.

GUEDES, I. A.; DE MAGALHÃES, C. S.; DARDENNE, L. E. Receptor-ligand molecular docking. **Biophysical Reviews**, Nova York, v. 6, n. 1, p. 75-87, mar. 2014.

GUEx, N.; PEITSCH, M. C. SWISS-Model and the Swiss-PDBViewer: an environment for comparative protein modeling. **Electroforesis**, Hoboken, v. 18, n. 15, p. 2714-2723, dez. 1997.

HAYES, T. B.; ANDERSON, L. L.; BEASLEY, V. R.; DE SOLLA, S. R.; IGUCHI, T.; INGRAHAM, H.; KESTEMONT, P.; KNIEWALD, J.; KNIEWALD, Z.; LANGLOIS, V. S.; LUQUE, E. H.; MCCOY, K. A.; MUNOZ-DE-TORO, M.; OKA, T.; OLIVEIRA, C. A.; ORTON, F.; RUBY, S.; SUZAWA, M.; TAVERA-MENDOZA, L. E.; TRUDEAU, V. L.; VICTOR-COSTA, A. B.; WILLINGHAM, E. Demasculinization and feminization of male gonads by atrazine: consistent effects across vertebrate classes. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, Neuberberg, v. 127, n. 1-2, p. 64-73, out. 2011.

HEAP, I. Global perspective of herbicide-resistant weeds. **Pest Management Science**, Hoboken, v. 70, n. 9, p. 1306-1315, jan. 2014.

HERNÁNDEZ, A. F.; PARRÓN, T.; TSATSAKIS, A. M.; REQUENA, M.; ALARCÓN, R.; LÓPEZ-GUARNIDO, O. Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level: their relevance to human health. **Toxicology**, Amsterdam, v. 307, p. 136-145, mai. 2013.

HESS, F. D. Light-dependent herbicides: an overview. **Weed Science**, Lawrence, v. 48, n. 2, p. 160-170, 2000.

HOLTZE, M. S.; SORENSEN, S. B.; SORENSEN, J.; AAMAND, J. Microbial degradation of the benzonitrile herbicides dichlobenil, bromoxynil and ioxynil in soil and subsurface environment-selnsightsinto degradation pathways, persistent metabolites and involved degrader organisms. **Environmental Pollution**, Amsterdam, v. 154, p. 14, jul. 2008.

HOPKINS, W. G.; HÜNER, N. P. A. **Introduction to plant physiology**. 4 ed. New York: John Wiley & Sons, 2009. 503 p.

HSU, K. C.; CHEN, Y. F.; LIN, S. R.; YANG J. M. iGEMDOCK: a grafical environment of enhancing GEMDOCK using pharmacological interactions and post-screening analysis. **BMC Bioinformatics**, Londres, v. 12, p. 1-11, jan. 2011.

HUBER, R.; OTTO, S. Environmental behavior of bentazon herbicide. In: Ware, G. W. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**. Nova York: Springer, 1994, p. 111-134.

HUNG, C. L.; CHEN, C. C. Computational approaches for drug discovery. **Drug Development Research**, Hoboken, v. 75, n. 6, p. 412-418, set. 2014.

HYPERCUBE. **HyperChem 7.1**. USA, 2002. Disponível em: <<http://www.hyper.com/>>. Acesso em dez. 2016.

INFOMETRIX. **PIROUETTE Comprehensive chemometrics modeling software**. 2014. Disponível em: <<https://infometrix.com/pirouette/>>. Acesso em dez. 2016

IHLASEH, S. M.; BAILEY, K. A.; HESTER, S. D.; JONES, C.; REN, H.; CARDOSO, A. P. F.; OLIVEIRA, M. L. C. S.; WOLF, D. C.; CAMARGO, J. L. V. Transcriptional profile of diuron-induced toxicity on the urinary bladder of male Wistar rats to inform mode of action. **Toxicological Sciences**, Oxford, v. 122, n. 2, p.330-338, abr. 2011.

JIA, X.; WANG, D.; GAO, N.; CAO, H.; ZHANG, H. Atrazine triggers the extrinsic apoptosis pathway in lymphocytes of the frog *Pelophylax nigromaculata* "in vivo". **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 28, n. 10, p. 2010-2018, set. 2015.

JIANG, L.; MA, L.; SUI, Y.; HAN, S. Q.; WU, Z. Y.; FENG, Y. X.; YANG, H. Effect of manure compost on the herbicide prometryne bioavailability to wheat plants. **Journal of Hazardous Materials**, Nova York, v. 184, p. 337-344, dez. 2010.

KARMAUS, A. L.; ZACHAREWSKI, T. R. Atrazine-mediated disruption of steroidogenesis in BLTK1 murine leydning cells. **Toxicological Sciences**, Oxford, v. 148, n. 2, p. 544-554, set. 2015.

KETTLES, M. K.; BROWNING, S. R.; PRINCE, T. S.; HORSTMAN, S. W. Triazine herbicide exposure and breast cancer incidence: an ecologic study of kentucky countries. **Environmental Health Perspective**, Bethesda, v. 105, n. 1, p. 1222-1227, nov. 1997.

KIRALJ, R.; FERREIRA, M. M. C. Basic validation procedures for regression models in QSAR and QSPR studies: theory and application. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 20, n. 4, p. 770-787, 2009.

LAMEIRA, O. A.; PINTO, J. E. B. P.; CARDOSO, M. D. G.; GAVILANES, M. L. Efeito de thidiazuron na indução e manutenção de calos de erva-baleeira (*Cárdia verbenacea* L.). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, n. 1, p. 47-49, jan./mar. 1997.

LeBARON, H. M.; McFARLAND, J. E.; BURNSIDE, O. C. **The Triazine Herbicides: 50 years revolutionizing agriculture**. 1 ed. Amsterdam: Elsevier. 2008. 584 p.

LEITHE, E.; KJENSETH, A.; BRUUN, J.; SIRNES, S.; RIVEDAL, E. Inhibition of connexin 43 gap junction channels by the endocrine disruptor ioxynil. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Amsterdam, v. 247, n. 1, p. 10-7, ago. 2010.

LHASA. **Derek Nexus: 4.1.0, Nexus: 2.0.0**. 2016. Disponível em: < <http://www.lhasalimited.org/products/derek-nexus.htm> >. Acesso em dez. 2016.

LINDELL, S. D.; PATTENDEN, L. C.; SHANNON, J. Combinatorial chemistry in the agrosociences. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, Amsterdam, v. 17, n. 12, p. 4035-4046, jun. 2009.

LORENTE, C.; CAUSAPÉ, J.; GLUD, R. N.; HANCKE, K.; MERCHÁN, D.; MUÑIZ, S.; VAL, J.; NAVARRO, E. Impacts of agricultural irrigation on nearby freshwater ecosystems: the seasonal influence of triazine herbicides in benthic algal communities. **Science of The Total Environment**, Barcelona, v. 503/504, p. 151-158, jan. 2015.

MA, K.; WU, H.; ZHANG, B.; HE, X.; LI, B. Neurotoxicity effects of atrazine-induced SH-SY5Y human dopaminergic neuroblastoma cells via microglial activation. **Molecular BioSystem**, Autstin, v. 11, p. 2915-2924, ago. 2015.

MACALINO, S. J.; GOSU, V.; HONG, S.; CHOI, S. Role of computer-aided drug design in modern drug discovery. **Archives of Pharmacal Research**, Nova York, v. 38, n. 9, p. 1686-701, 2015.

MARTINS, J. P. A.; FERREIRA, M. M. C. QSAR MODELING: a new open source computational package to generate and validate qsar models. **Quimica Nova**, São Paulo, v. 36, n. 4, p. 554-560, mar. 2013 .

MARTINS, J. P. A.; FERREIRA, M. M. C. **QSAR Modeling**. 2009. Disponível em: < <http://lqta.iqm.unicamp.br> >. Acesso em dez. 2016.

McCULLOUGH, P. E.; HART, S. E.; WEISENBERGER, D.; REICHER, Z. J. Amicarbazone efficacy on *Annual bluegrass* and safety on cool-season turfgrasses. **Weed Technology**, Washington, v. 24, n. 4, p. 461-470, mai. 2010.

McMILLAN, D. C.; BRADSHAW, T. P.; HINSON, J. A.; JOLLOW, D. J. Role of metabolites in propanil-induced hemolytic anemia. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Amsterdam, v. 110, n. 1, p. 70-78, ago. 1991.

MINE, A.; MATSUNAKA, S. Mode of action of bentazon: effect on photosynthesis. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Amsterdam, v. 5, n. 5, p. 444-450, out. 1975.

MURTHY, B. N. S.; MURCH, S. J.; SAXENA, P. K. Thidiazuron: a potent regulator of "in vitro" plant morphogenesis. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Nova York, v. 34, n. 4, p. 267-275, 1998.

MUSIOL, R.; JAMPILEK, J.; KRALOVA, K.; RICHARDSON, D. R.; KALINOWSKI, D.; PODESZWA, B.; FINSTER, J.; NIEDBALA, H.; PALKA, A.; POLANSKI, J. Investigating biological activity spectrum for novel quinoline analogues. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, Amsterdam, v. 15, n. 3, p. 1280-1288, fev. 2007.

NAMBA, A. M.; DA SILVA, V. B.; DA SILVA, C. H. T. P. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Eclética Química**, Araraquara, v. 44, n. 4, p. 1-11, out./dez. 2008.

OBOT, I. B.; MACDONALD, D. D.; GASEM, Z. M. Density functional theory (DFT) as a powerful tool for designing new organic corrosion inhibitors: Part 1: an overview. **Corrosion Science**, Amsterdam, v. 99, p. 1-30, out. 2015.

OECD - **Organization for Economic Co-Operation and Development Guidance Document on the Validation of (Quantitative) Structure-Activity Relationship [(Q)SAR] Models**. Paris, OECD, 2007. Disponível em: <<http://www.oecd.org/env/guidance-document-on-the-validation-of-quantitative-structure-activity-relationship-q-sar-models-9789264085442-en.htm>>. Acesso em dez. 2016.

OHKAWA, H.; MIYAGAWA, H.; LEE, P. W. **Pesticide chemistry: crop protection, public health, environmental safety**. 1 ed. Hoboken: John Wiley and Sons, 2007. 497 p.

OLIVEIRA JR, R. S.; JAMIL, C.; INOUE, M. H. **Biologia e manejo de plantas daninhas**. 1 ed. Curitiba: Omnipax, 2011. 348p.

OPAS, ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos**. Representação do Brasil. Ministério da Saúde. Brasília: Secretaria de Vigilância Sanitária. 1997.

OPENBABEL. **OPEN BABEL VERSION 2.3.1**. 2011. Disponível em: <<http://openbabel.org>>. Acesso em dez. 2016.

PASTOR, M.; CRUCIANI, G.; MCLAY, I.; PICKETT, S.; CLEMENTI, S. Grid-independent descriptors (GRIND): A novel class of alignment-independent three-dimensional molecular descriptors. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 43, n. 17, p. 3233-3243, ago. 2000.

PENTACLE. **PENTACLE SOFTWARE VERSION 1.0.7**. Manual Version 1.0, United Kingdom 2015. Disponível em: <<http://www.moldiscovery.com/software/pentacle/>>. Acesso em dez. 2016.

PERISSINI, B. N. Avaliação do potencial de degradação do herbicida diuron por fungos isolados de solo de canavial e suas tolerâncias aos metabólitos gerados. São José do Rio Preto, p.88. 2015. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Microbiologia). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

PETRI, J. L.; SCHUCK, E.; LEITE, G. B. Efeito do thidiazuron (TDZ) na frutificação de fruteiras de clima temperado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 513-517, dez. 2001.

PHILBROOK, B. D.; KREMER, M.; MULLER, K. H.; DEEGE, R. BAY MKH 3586—a new herbicide for broad spectrum weed control in corn (maize) and sugar cane. Brighton Conference. Kansas City: Weeds. 1: 6 p. 1999.

POSSAMAI, A. C. S.; INOUE, M. H.; MENDES, K. F.; DE SANTANA, D. C.; BEN, R.; DOS SANTOS, E. G. Leaching potential and residual effect of amicarbazone in soils of contrasting texture. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 5, p. 2203-2210, set./out. 2013.

POWLES, S. B.; YU, Q. (1991). Evolution in action: plants resistant to herbicides. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, 61, p. 317-347, jun. 2010.

QING, X.; LEE, X. Y.; DE RAEYMAEKER, J.; TAME, J. R.; ZHANG, K. Y.; DE MAEYER, M.; VOET, A. R. Pharmacophore modeling: advances, limitations, and current utility in drug discovery. **Journal of Receptor, Ligand and Channel Research**, Auckland, v. 7, p. 81-92, ago. 2014.

RASMUSSEN, J. J.; WIBERG-LARSEN, P.; BAATTRUP-PEDERSEN A.; CEDERGREEN, N.; McKNIGHT, U. S.; JACOBSEN, D.; KRISTENSEN, E. A.; FRIBERG, N. The legacy of pesticide pollution: an overlooked factor in current risk assessment of freshwater system. **Water Research**, Amsterdam, v. 84, p. 25-32, nov. 2015.

RIOS, A. C. Comportamento do herbicida propanil em cultura de arroz irrigado. Botucatu, p.107. 2008. Dissertação (Mestrado de Agronomia).

RODRIGUES, R. P.; MANTOANI, S. P.; DE ALMEIDA, J. R.; PINSETTA, F. R.; SEMIGHINI, E. P.; DA SILVA, V. B.; DA SILVA, C. H. P. Estratégias de triagem virtual no planejamento de fármacos. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v. 4, n. 6, p. 739-776, dez. 2012.

ROY, K. **Quantitative structure-activity relationships in drug design, predictive toxicology, and risk assessment**. 1 ed. Hershey: IGI Global, 2015. 703 p.

SALAZAR, K. D.; USTYUGOVA, I. V.; BRUNDAGE, K. M.; BARNETT, J. B.; SCHAFER, R. A review of the immunotoxicity of the pesticide 3,4-dichloropropionanilide. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews**, Abingdon, v. 11, n. 8, p. 630-645, set. 2008.

SANT'ANNA, C. M. R. Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: uma introdução. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v. 1, n. 1, p. 49-57, fev. 2009.

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

SATHIAKUMAR, N.; MACLENNAN, P. A.; MANDEL, J.; DELZELL, E. A review of epidemiologic studies of triazine herbicides and cancer. **Critical Reviews in Toxicology**, Hamburg, v. 41, n. 1, p. 1-34, mar. 2011.

SCHNEIDMAN-DUHOVNY, D.; DROR, O.; INBAR, Y.; NUSSINOV, R.; WOLFSON, H. J. PharmaGist: a webserver for ligand-based pharmacophore detection. **Nucleic acids research**, Oxford, v. 36, p. 223-228, mar. 2008.

SILVA, I. P. D. F.; JUNIOR, J. F. D. S.; PUTTI, F. F.; LATORRE, D. D. O.; SCHIMIDT, A. P.; LUDWIG, R. Herbicidas inibidores do fotossistema II – parte II. **Brazilian Journal of Biosystems Engineering**, Tupã, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2013a.

SILVA, I. P. D. F.; JUNIOR, J. F. D. S.; PUTTI, F. F.; LATORRE, D. D. O.; SCHIMIDT, A. P.; R., L. Herbicidas inibidores do fotossistema II – parte II. **Brazilian Journal of Biosystems Engineering**, Tupã, v. 7, n. 1, p. 12-22, 2013b.

SILVERMAN, B. D. Three-dimensional moments of molecular property fields. **Journal Chemistry Informatics Science**, Washington, v. 40, n. 6, p. 1470-1476, set. 2000.

SHARMA, P.; SABLOK, K.; BHALLA, V.; SURI, C. R. A novel disposable electrochemical immunosensor for phenyl urea herbicide diuron. **Biosensors and Bioelectronics**, Linköping, v. 26, n. 10, p. 4209-4212, jun. 2011.

SLIWOSKI, G.; KOTHIWALE, S.; MEILER, J.; LOWE JR, E. W. Computational methods in drug discovery. **Pharmacological Reviews**, Bethesda, v. 66, n. 1, p. 334-395, dez. 2014.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TEMPLE, A. J.; MURPHY, B. R.; CHESLAK, E. F. Effects of tebuthiuron on aquatic productivity. **Hydrobiologia**, Nova York, v. 224, n. 2, p. 117-127, 1991.

TEÓFILO, R. F.; MARTINS, J. P. A.; FERREIRA, M. M. C. Sorting variables by using informative vectors as a strategy for feature selection in multivariate regression. **Journal of Chemometrics**, Hoboken, v. 23, n. 1, p. 32-48, jan. 2009.

TODESCHINI, R; CONSONNI, V. **Molecular descriptors for chemoinformatics**. 2 ed. Weinheim, Germany: Willey-VCH, 2009.

TURNER, K. J.; BARLOW, N. J.; STRUVE, M. F.; WALLACE, D. G.; GAIDO, K. W.; DORMAN, D. C.; FOSTER, P. M. Effects of in utero exposure to the organophosphate insecticide fenitrothion on androgen-dependent reproductive development in the Crl:CD(SD)BR rat. **Toxicological Sciences**, Oxford, v. 68, p. 174-183, fev. 2002.

UMASHANKAR, V.; GURUNATHAN, S. Drug discovery: an appraisal. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 7, n. 4, p. 59-66, fev. 2015.

USDA. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Hexazinone – human health and ecological risk assessment**. 2005. Disponível em: < http://www.fs.fed.us/foresthealth/pesticide/pdfs/102505_hexazinone_ra.pdf >. Acesso em: Dez 2016.

VEGA. **VEGA-QSAR: AI inside a platform for predictive toxicology 2015**. Disponível em: < <http://www.vega-qsar.eu/index.php> >. Acesso em dez. 2016.

WASI, S.; TABREZ, S.; AHMAD, M. Toxicological effects of major environmental pollutants: an overview. **Environmental Monitoring and Assessment**, Países Baixos, v. 185, n. 3, p. 2585-2593, jul. 2013.

WEED SCIENCE. **Herbicide-resistat weeds by year**. 2016. Disponível em: < <http://w.weedscience.com/byyear/year.htm> >. Acesso em nov. 2016.

WIEGAND, C.; KRAUSE, E.; STEINBERG, C.; PFLUGMACHER, S. Toxicokinetics of atrazine in embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 49, n. 3, p. 199-205, jul. 2001.

ZAKI, M. A.; TAYLOR, H. F.; WAIN, R. L. Studies with 3,5-diiodo-4-hydroxybenzotrile (ioxynil) and related compounds in soils and plants. **Annals of Applied Biology**, Nova Jersey, v. 59, n. 3, p. 481-491, jun. 1967.

8 ANEXOS

8.1 ANEXO I

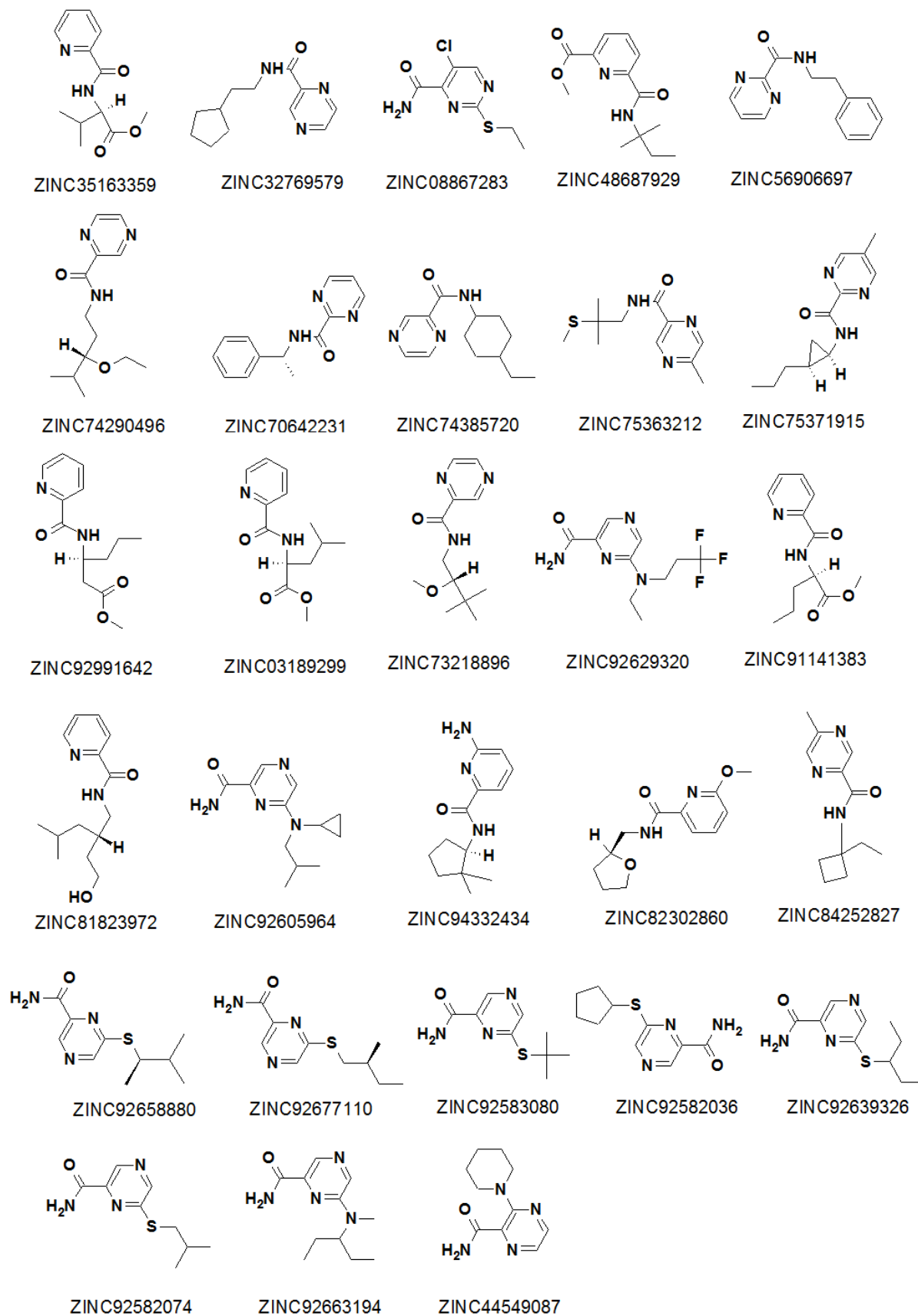


Figura 1 Estrutura molecular dos compostos resultantes da filtragem.