



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Avaliação do Potencial Carcinogênico do Carbendazim e seus metabólitos

Renato César da Silva

Recife

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Avaliação do Potencial Carcinogênico do Carbendazim e seus metabólitos

por

Renato César da Silva*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Antonio Carlos Pavão (DQF-UFPE)

* Bolsista FACEPE

Recife

2014

Catálogo na fonte
Bibliotecária Joana D'Arc L. Salvador, CRB 4-572

Silva, Renato César da.
Avaliação do potencial carcinogênico do
carbendazim e seus metabólitos / Renato César da Silva.
– Recife: O Autor, 2014.
106 f.: fig., tab.

Orientador: Antonio Carlos Pavão.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de
Pernambuco. CCEN. Química, 2014.
Inclui referências e anexos.

1. Físico-química. 2. Fungicidas. 3. Carcinogênese.
4. Análise de componentes principais. I. Pavão, Antonio
Carlos (orientador). II. Título.

541.3

(22. ed.)

FQ 2014-41

Dissertação submetida ao Corpo Docente do Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Química.

Aprovada:

Prof. Antônio Carlos Pavão
(Orientador)
Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. João Bosco Paraíso da Silva
Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Marcelo Brito Carneiro Leão
Departamento de Química
Universidade Federal Rural de Pernambuco

*Avaliação do Potencial Carcinogênico do
Carbendazim e seus Metabólitos*

Por

Renato César da Silva

Departamento de Química Fundamental
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Universidade Federal de Pernambuco
Recife-PE-Brasil
21 de Julho de 2014

Dedico

*à minha mãe Severina Ana pela educação
concedida, à minha noiva Roberta Maria pelo
amor e compreensão, “vocês me fazem feliz”,
acreditaram e torceram por mim dando todo amor
e carinho.*

Agradecimentos

Agradeço principalmente a Deus pela beleza da vida, por me ajudar a chegar até aqui com as linhas escritas ao longo deste trabalho.

À minha mãe que verdadeiramente dedicou sua vida por amor e carinho a mim dando toda educação.

À minha noiva, pessoa maravilhosa e especial em minha vida, pelo grande carinho e companheirismo nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador e amigo, Professor Antonio Carlos Pavao que atuou como um pai, orientando com paciência e incentivando o progresso deste trabalho, perdoando as minhas falhas.

Ao grupo de orientandos do Professor Pavão por toda ajuda fornecida e convivência enriquecedora, Cristiano, Marconi, Brito, em especial a Karina Anunciada.

Aos professores do Departamento de Química Fundamental por seus valiosos ensinamentos.

Aos secretários da pós-graduação deste Departamento, Patrícia e Maurílio, pela colaboração oferecida durante esses anos.

Ao órgão financiador da minha bolsa a FACEPE, ao CENAPAD-SP e CENAPAD-PE pelo suporte computacional.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

“Nunca deixe que alguém te diga que não pode fazer algo. Se você tem um sonho, tem que protegê-lo. Se quer alguma coisa, vá e lute por ela.” (Filme: A Procura da Felicidade)

Resumo

O potencial carcinogênico do carbendazim e seus metabólitos foi analisado utilizando um tratamento estatístico dos parâmetros eletrônicos obtidos a partir de cálculos AM1 e DFT/BLYP/6-311++G(d,p). A interação carcinógeno-DNA é descrita através da Teoria da Ressonância Não Sincronizada da Ligação Covalente como um processo de transferência de elétron envolvendo os orbitais de fronteira HOMO e LUMO, modelo já desenvolvido por Pavão e Leão. Através de uma Análise de Componentes Principais da afinidade eletrônica, energia de interação carcinógeno-DNA, atração eletrostática e permeabilidade da membrana celular (momento de dipolo e coeficiente de partição) obtivemos evidência que o carbendazim exibe atividade carcinogênica. Para os metabólitos do carbendazim, a análise dos parâmetros eletrônicos também exibiram similaridade aos carcinógenos conhecidos. Embora existam poucos dados na literatura sobre a carcinogenicidade destes compostos, os resultados do presente estudo indicam que o uso deste fungicida representa um risco para a saúde da população, em especial para os trabalhadores rurais. Desta forma, os resultados aqui obtidos podem servir de subsídios para a aplicação de uma política de saúde pública baseada no princípio da precaução.

Palavras-chave: Fungicidas. Carcinogênese química. Cálculos AM1 e DFT. Análise de componentes principais.

Abstract

The carcinogenic potential of carbendazim and its metabolites was analyzed using a statistical treatment of electronic parameters obtained from AM1 and DFT/6-311++G(d,p) calculations. The carcinogen–DNA interaction is described in the framework of the Theory of Unsynchronized Resonance of Covalent Bond as a process of electron transfer involving the HOMO and LUMO frontier orbitals, model of already developed by Pavão and Leão. Through a Principal Component Analysis (PCA) of the electron affinity, carcinogen–DNA interaction energy, electrostatic attraction and cell membrane permeability (dipole moment and partition coefficient) we have obtained evidence that carbendazim displays carcinogenic activity. For the metabolites of carbendazim, analysis of the electronic parameters also exhibited similarity to known carcinogens. Although there are few data in the literature on the carcinogenicity of these compounds, the results of this study indicate that the use of this fungicide poses a risk to the health of the population, especially for rural workers. Thus, our findings may provide support for the implementation of a public health policy based on the precautionary principle.

Keywords: Fungicides. Chemical carcinogenesis. AM1 and DFT calculations. Principal component analysis. Structure activity relationship.

Lista de figuras

		Página
Figura 1	Pinta preta em laranja	17
Figura 2	História do caso carbendazim	17
Figura 3	Trecho de um texto pela EPA	18
Figura 4	História do caso carbendazim pela CitrusBR e Fundecitrus	19
Figura 5	Impacto na mídia: Carbendazim no suco de laranja	20
Figura 6	Exportações brasileiras de suco de laranja aos EUA	20
Figura 7	Evolução do consumo de bebidas sabor laranja nos EUA	21
Figura 8	Vendas de suco de laranja no varejo americano em milhões de galões	21
Figura 9	Rota metabólica do carbendazim em ratos	25
Figura 10	Representação da Carcinogênese	28
Figura 11	Ministério da Saúde adverte: Fumar causa câncer de pulmão	28
Figura 12	James e Elizabeth Miller	31
Figura 13	Estrutura primária do DNA	32
Figura 14	Ressonância <i>não</i> -sincronizada	38
Figura 15	Ressonância sincronizada	38
Figura 16	Transferência de elétron do DNA/Guanina para o carcinógeno por meio dos orbitais de fronteira HOMO-LUMO	40

Figura 17	Ressonância <i>não</i> -sincronizada: espécie carcinogênica e a base do DNA	41
Figura 18a	Estruturas moleculares otimizadas (AM1) dos não-carcinógenos e protetores controle	65
Figura 18b	Estruturas moleculares otimizadas (AM1) dos carcinógenos-controle	66
Figura 19	ACP dos parâmetros eletrônicos AM1 dos compostos controle	70
Figura 20	Bases nitrogenadas do DNA	73
Figura 21	Mapa do potencial eletrostático e distribuição de cargas atômicas para as bases nitrogenadas do DNA com geometrias otimizadas (DFT)	74
Figura 22	Mapa de distribuição dos orbitais HOMO da Guanina e componentes da ρ (DFT)	75
Figura 23	Estruturas moleculares otimizadas (AM1) do carbendazim e seus metabólitos	77
Figura 24	ACP dos descritores eletrônicos AM1 do carbendazim e seus metabólitos	79
Figura 25	ACP dos descritores eletrônicos DFT do carbendazim e seus metabólitos	81
Figura 26	Estruturas moleculares otimizadas (AM1) dos fungicidas	84
Figura 27	ACP dos descritores eletrônicos AM1 do carbendazim e fungicidas	86
Figura 28	ACP dos descritores eletrônicos AM1 dos fungicidas, carbendazim e seus metabólitos	88

Lista de tabelas

		Página
Tabela 1	Características do MBC em formulação comercial	16
Tabela 2	Regulamentação do limite máximo residual (MRL) em partes por bilhão (ppb) para carbendazim em citros	19
Tabela 3	Estágios da carcinogênese química	27
Tabela 4	Parâmetros eletrônicos AM1 e LogP dos compostos controle	68
Tabela 5	Energia de ionização e dos orbitais moleculares de fronteira para as bases do DNA utilizando o método AM1	73
Tabela 6	Parâmetros eletrônicos AM1 e LogP do carbendazim e seus metabólitos	78
Tabela 7	Parâmetros eletrônicos AM1 e LogP do carbendazim e fungicidas	85

Lista de abreviaturas e siglas

(d,p)	Funções de polarização
++	Funções difusas
ACP	Análise de componentes principais
AM1	Austin Model 1
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BLYP	Funcional puro de densidade de Becke, Lee, Yang, e Parr
CitrusBR	Associação de exportadores de sucos cítricos do país
CNDO	Complete Neglect of Differential Overlap
CRF	Função de repulsão do caroço
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DFT	Teoria do Funcional da Densidade
DL50	Dose Letal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EA	Afinidade eletrônica
E_{Lig}	Energia de ligação
EPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
EUA	Estados Unidos da América
eV	Elétron-volts
FDA	Food and Drug Administration
FMO	Teoria do Orbital Molecular de Fronteira
Fundecitrus	Fundo de Defesa da Citricultura
HF	Hartree-Fock
HOMO	Orbital molecular ocupado de maior energia
HPA	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
I	Energia de ionização
INDO	Intermediate Neglect of Differential Overlap
INDO/S	Intermediate Neglect of Differential Overlap/Spectroscopy
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
JPA	Juice Products Association
kg	Kilograma
LCAO	Combinação Linear de orbitais atômicos

LDA	Aproximação da densidade local
LogP	Logaritmo do coeficiente de partição
LUMO	Orbital molecular desocupado de mais baixa energia
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MBC	Methyl N-(1H-benzimidazol-2-yl)carbamate
mg	Miligrama
MNDO	Modifield Neglect of Diatomic Overlap
MO	Orbitais Moleculares
MPF/DF	Ministério Público Federal no Distrito Federal
MRL	Limite máximo residual
N7	Nitrogênio 7 da guanina
NDDO	Neglect of Diatomic Differential Overlap
O16	Oxigênio 16 da guanina
OMS	Organização Mundial da Saúde
PC1	Primeira componente principal
PC2	Segunda componente principal
pH	Potencial hidrogeniônico
ppb	Partes por bilhão
PPP	Pariser-Parr-Pople
QSAR	Relação Quantitativa Estrutura Atividade
RNA	Ácido ribonucléico
RVB	Teoria da ressonância <i>não</i> -sincronizada da ligação covalente
SCF	Campo Auto-Consistente
STO	Funções do tipo Slater
UE	União Europeia
UV	Ultravioleta
VB	Ligação de Valência
ZDO	Zero-Differential Overlap
ΔE_{L-H}	Energia de interação carcinógeno-DNA
Δq	Atração eletrostática
γ	Raios gama
μ	Momento de dipolo elétrico
ρ	Densidade eletrônica

Sumário

	Página
Capítulo 1 – Introdução	
1.1 Carbendazim: o fungicida utilizado em laranjas	16
1.2 Estudo da carcinogênese química	27
Capítulo 2 – Objetivos	
2.1 Objetivo geral	34
2.2 Objetivos específicos	34
Capítulo 3 – Metodologia	
3.1 Teoria RVB	37
3.2 Teoria RVB da interação carcinógeno-DNA	39
3.3 Fatores que caracterizam a interação DNA-Carcinógeno	42
3.4 Métodos Computacionais	46
3.4.1 Método Hartree-Fock	46
3.4.2 Métodos Semi-Empíricos	49
3.4.2.1 O método Austin Model 1 (AM1)	52
3.4.3 Teoria do Funcional da Densidade (DFT)	52
3.5 Programas computacionais	57
3.5.1 Hyperchem	57
3.5.2 Gaussian	57
3.5.3 Gaussview	58
3.5.4 Statistica	58
3.5.5 ALOGPS	58
3.5.6 Computadores utilizados	59
3.6 Análise de Componentes Principais (ACP)	61

Capítulo 4 – Resultados e Discussões

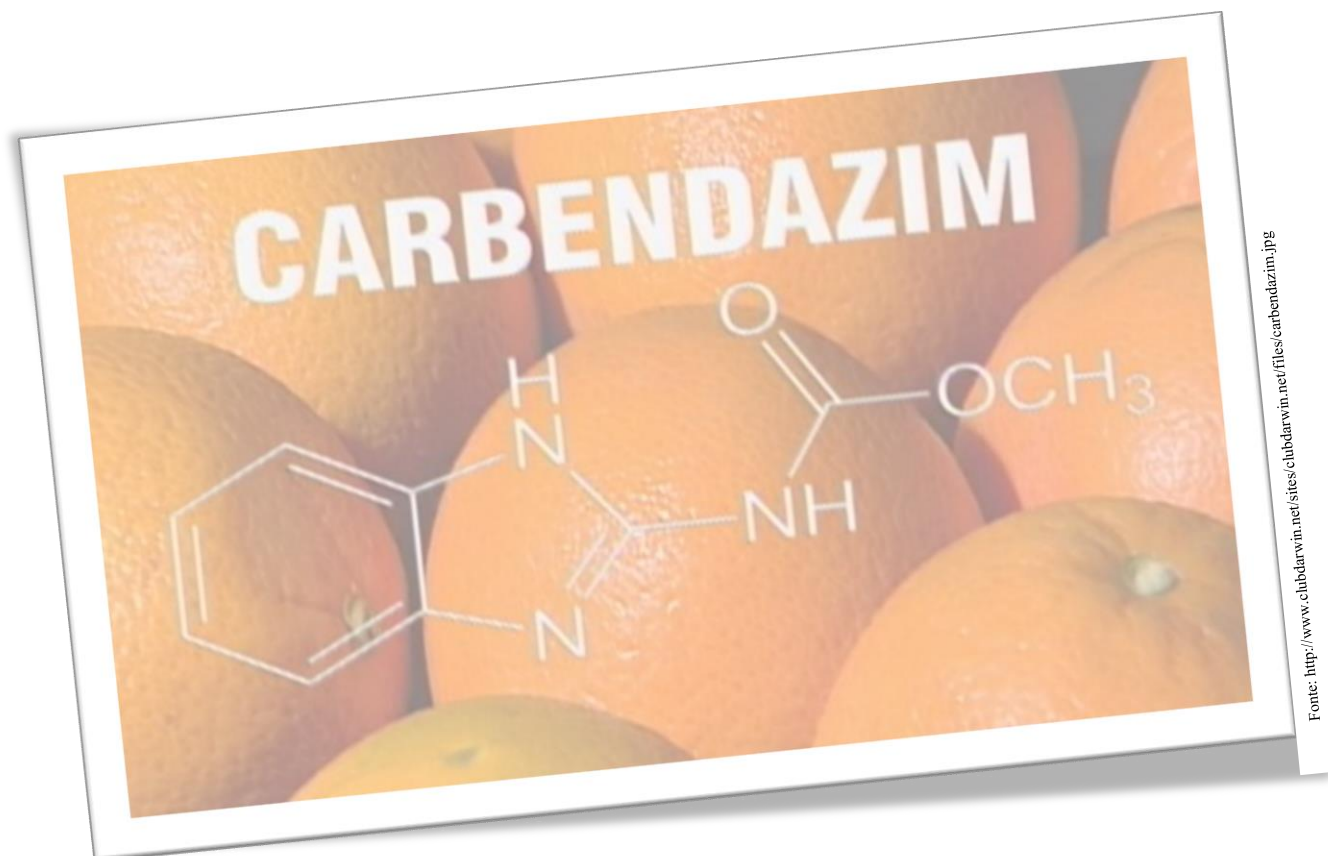
4.1 Avaliação dos descritores eletrônicos: Compostos–Controle	65
4.1.1 ACP dos Compostos–Controle	70
4.2 Análise das bases do DNA	72
4.3 Avaliação da carcinogenicidade: Carbendazim e Metabólitos	76
4.3.1 ACP do Carbendazim e Metabólitos	78
4.3.2 ACP: DFT do Carbendazim e Metabólitos	80
4.3.3 ACP: AM1 x DFT do Carbendazim e Metabólitos	82
4.4 Avaliação da carcinogenicidade: Fungicidas	83
4.4.1 ACP dos Fungicidas	85
4.4.2 ACP dos Fungicidas, Carbendazim e seus Metabólitos	87

Capítulo 5 – Conclusões e Perspectivas	91
---	----

Referências	95
--------------------	----

Anexos: Artigo Publicado	100
---------------------------------	-----

CAPÍTULO 1

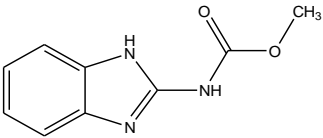


INTRODUÇÃO

1.1 Carbendazim: o fungicida utilizado em laranjas

O fungicida benzimidazólico methyl N-(1H-benzimidazol-2-yl)carbamate (MBC), fórmula molecular $C_9H_9N_3O_2$, conhecido popularmente como carbendazim, foi notícia internacional em janeiro de 2012, quando os EUA proibiram temporariamente toda a importação do suco de laranja brasileiro devido à presença deste fungicida. Segundo a Associação que reúne os principais exportadores de sucos cítricos do país (CitrusBR), esta decisão causou um enorme impacto já que o Brasil destina cerca de 15% das suas 1,3 milhões de toneladas de suco de laranja aos EUA, onde 80% da bebida comercializada tem o suco brasileiro em sua composição¹. A Tabela 1 apresenta algumas características do MBC disponível comercialmente².

Tabela 1. Características do MBC em formulação comercial

Característica do MBC	
Nome químico (IUPAC)	methyl N-(1H-benzimidazol-2-yl)carbamate
Nome comercial	Derosal 500 SC
Princípio ativo	Carbendazim
Nº registro no MAPA	1718491
Grupo químico	Benzimidazólico
Outros nomes	Mecarazole, Bavistin, Carbendazole, Medamine, Thicoper
Classe Toxicológica ³	III – Medianamente tóxico
Classificação ambiental	III – Produto perigoso
Fórmula molecular	$C_9H_9N_3O_2$
Massa molecular	191,2 g.mol ⁻¹
Fórmula estrutural	

¹ <http://noticias.bol.uol.com.br/economia/2012/01/12/eua-suspendem-importacao-de-suco-de-laranja-de-todos-paises.jhtm>, acessada em Abril 2012.

² <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/b17ca88047458b58951fd53fbc4c6735/c24.pdf?MOD=AJPERES>, acessada em Maio 2012.

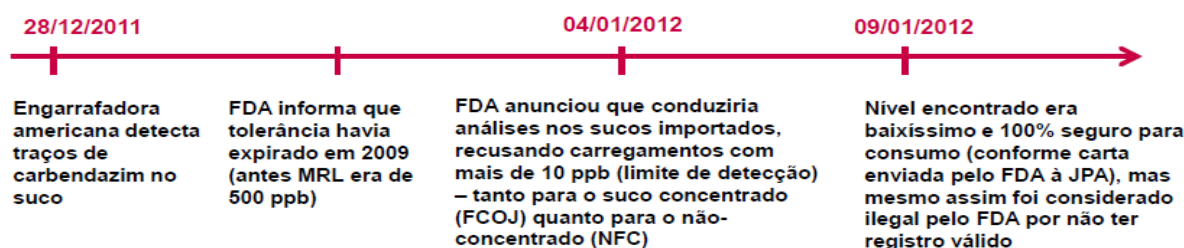
³ <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/>, acessada em Maio 2012.

O carbendazim é um produto legalizado no Brasil e é utilizado no combate de pragas como a *Guignardia citricarpa* (pinta preta) (Figura 1) e *Colletotrichum acutatum* (estrelinha), que são fungos comuns em lavouras de laranjas⁴. Entretanto, segundo a *Food and Drug Administration* (FDA), agência norte-americana responsável pela fiscalização de alimentos e medicamentos, o consumo do fungicida está associado a um aumento no risco de tumores de fígado e, por essa razão, a substância é proibida no país⁵. A Figura 2 mostra a história do caso carbendazim.



Fonte: Wilyssys Wölgang
http://www.ruralbr.com.br/imagestc/15497989.jpg?w=7

Figura 1. Pinta preta em laranja



Fonte: <http://www.fdpi.org/docs/default-document-library/lohbauer---translated.pdf?sfvrsn=0> (Acessada em: 12 jun 2012)

Figura 2. História do caso carbendazim

A FDA enviou uma carta de esclarecimento a Associação dos Produtos de Suco (JPA), onde afirma que não tinha a intenção de tomar medidas de remoção do suco de laranja no comércio doméstico mesmo sabendo dos baixos níveis de carbendazim com base nos estudos feitos pela U.S. Environmental Protection Agency (EPA). Trecho de um texto pela EPA pode ser visualizado na Figura 3 a seguir.

⁴ Kupper, K. C.; Corrêa, F. E.; de Azevedo, F. A.; da Silva, A. C. *Sci. Hortic.* v. 134, p. 139, 2012.

⁵ <http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/UCM292266.pdf>, acessada em Maio 2012.

The Environmental Protection Agency has conducted a preliminary risk assessment based on the recent reports of carbendazim in orange juice. Based on that risk assessment, EPA has concluded that consumption of orange juice with carbendazim at the low levels that have been reported does not raise safety concerns.

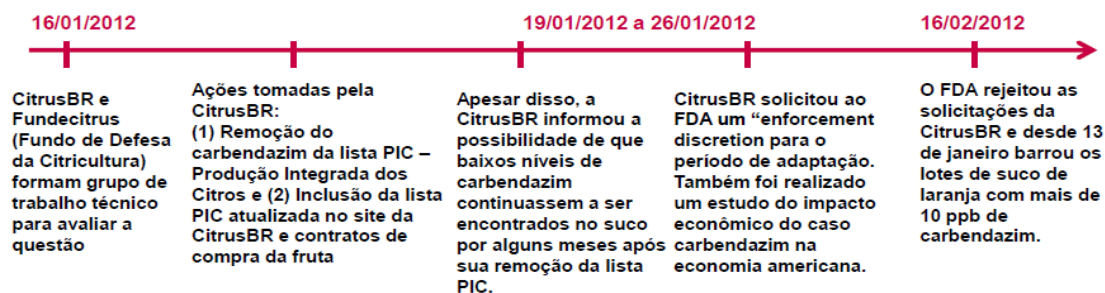
Fonte: <http://www.fdl.org/docs/default-document-library/lohbauer---translated.pdf?sfvrsn=0> (Acessada em: 12 jun 2012)

Figura 3. Trecho de um texto pela EPA

Neste texto, a EPA conduziu um estudo preliminar de análise de risco baseado nos relatórios recentes sobre o carbendazim no suco de laranja. Com base nesse estudo, o EPA concluiu que o consumo de suco de laranja com os baixos níveis de carbendazim reportados não causa preocupação quanto à segurança do produto. Porém mesmo assim foi considerado ilegal pelo FDA por não apresentar registro válido. Como medida de precaução, a FDA está realizando seus próprios testes de identificação de carbendazim no suco de laranja importado, não permitindo em suas análises carregamentos de sucos com mais de 10 ppb (partes por bilhão) para carbendazim.

O fungicida MBC é registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para pulverização das culturas de citros, algodão, feijão, soja e trigo, além do tratamento de sementes de algodão, feijão, milho e soja. No caso dos citros, o uso do produto para controle da pinta preta foi suspenso no início de 2012 pelo Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus), mantido por produtores e indústrias, após o embargo pelos EUA de 20 carregamentos de suco concentrado com níveis de carbendazim acima do máximo tolerado pelas autoridades norte-americanas⁶. A Figura 4 a seguir mostra a história do caso carbendazim pela CitrusBR e Fundecitrus.

⁶ <http://www.midianews.com.br/conteudo.php?sid=4&cid=173419>, acessada em Maio 2012.



Fonte: <http://www.fdpi.org/docs/default-document-library/lohbauer---translated.pdf?sfvrsn=0> (Acessada em: 12 jun 2012)

Figura 4. História do caso carbendazim pela CitrusBR e Fundecitrus

A Tabela 2 apresenta o limite máximo residual para carbendazim em citros de acordo com cada legislação. A FDA informa que a tolerância máxima para resíduos de carbendazim em citros até 2009 admitia um valor de 500 ppb, onde no Brasil admitia cerca de 10 vezes mais o seu valor. Já em 2012, a FDA anuncia que conduziria análises de sucos importados recusando carregamentos com mais de 10 ppb como limite de detecção para carbendazim em sucos concentrados e diluídos.

Tabela 2. Regulamentação do limite máximo residual (MRL) em partes por bilhão (ppb) para carbendazim em citros

Legislação Legislation	MRL máx. p/ carbendazim em citros Max. Carbendazim MRL allowed for citrus crops
Codex Alimentarius	1.000 ppb
EU-27 EU-27	200ppb
Canadá Canada	10.000 ppb
Austrália Australia	10.000 ppb*
Japão Japan	3.000 ppb
Brasil Brazil	5.000 ppb
EUA até 2009 USA into 2009	500 ppb
Carbendazim encontrado no suco Carbendazim found in the juice	35 ppb
Nível de carbendazim tolerado para suco já internalizado nos EUA Level of carbendazim tolerated in the OJ already internalized in the US	80 ppb
Limite de detecção do FDA FDA limit for detection	10 ppb

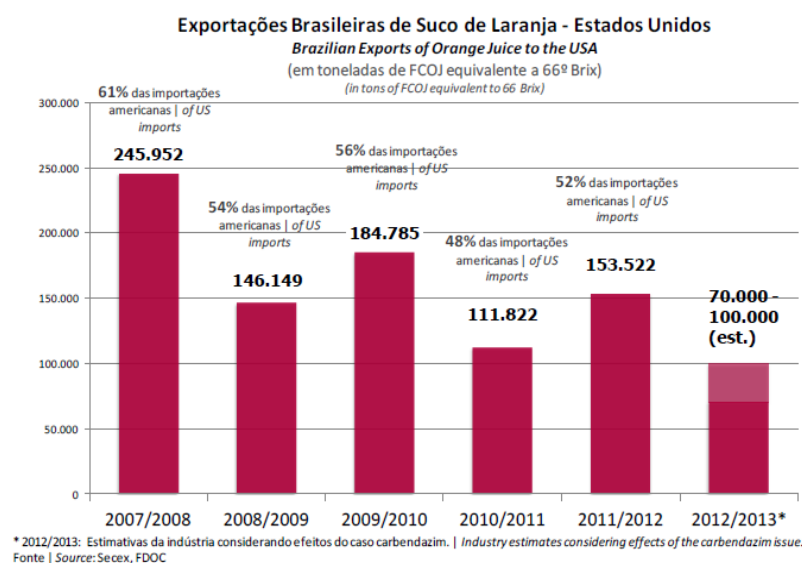
* Até janeiro de 2012

Fonte: <http://www.fdpi.org/docs/default-document-library/lohbauer---translated.pdf?sfvrsn=0> (Acessada em: 12 jun 2012)

O grande impacto que a questão Carbendazim causou foi a divulgação da notícia do fungicida no suco de laranja brasileiro pela mídia norte americana (Figura 5), pegando muita gente de surpresa, e exemplificou citando o programa do Dr. Oz (nosso Dráuzio Varela) de um canal de TV americana que sugeriu não tomar suco que fosse oriundo do Brasil, prejudicando de forma geral o consumo de suco de laranja nos EUA.

Figura 5. Impacto na mídia: Carbendazim no suco de laranja

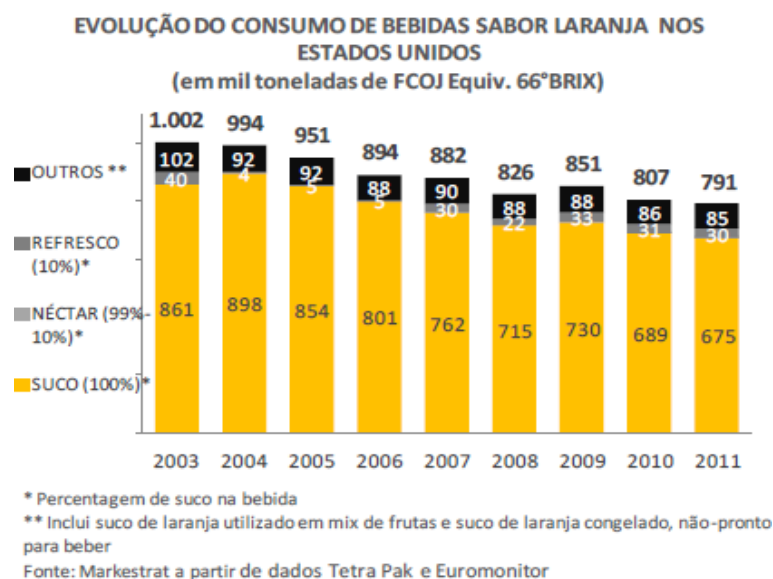
A Figura 6 mostra o impacto das exportações brasileiras de suco de laranja aos EUA. Observamos nesta figura que no ano de 2012/2013 se tem uma estimativa da indústria considerando os efeitos do caso carbendazim, onde o número de exportações varia de 70.000 à 100.000, um valor bem mais baixo do que os anos anteriores.



Fonte: <http://www.fdl.org/docs/default-document-library/lohbauer---translated.pdf?sfvrsn=0> (Acessada em: 12 jun 2012)

Figura 6. Exportações brasileiras de suco de laranja aos EUA

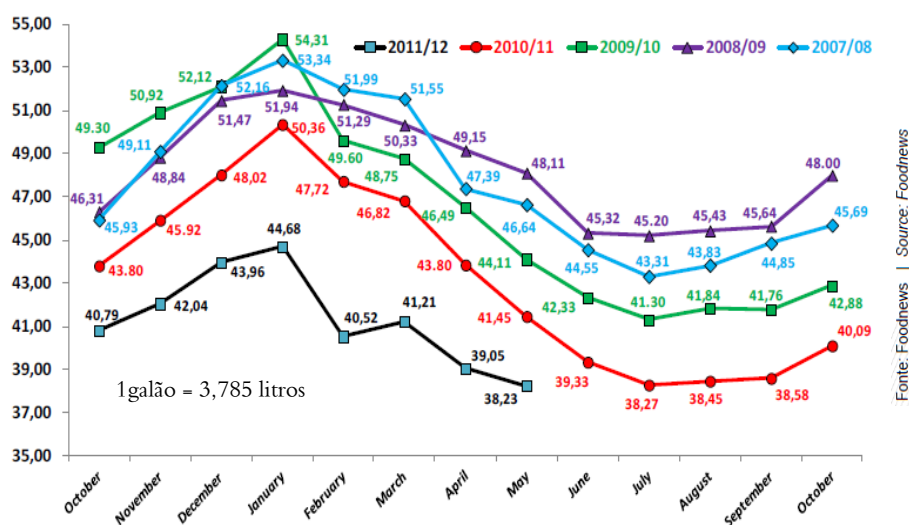
A Figura 7 mostra a evolução do consumo de bebidas sabor laranja nos EUA



Fonte: <http://www.fdli.org/docs/default-document-library/lohbauer---translated.pdf?sfvrsn=0> (Acessada em: 12 jun 2012)

Figura 7. Evolução do consumo de bebidas sabor laranja nos EUA

A Figura 8 mostra as vendas de suco de laranja no varejo americano em milhões de galões. Verificamos nesta figura que no ano de 2011/2012 se tem um consumo pouco e declínio rápido no número de vendas em relação aos anos anteriores.



Fonte: <http://www.fdli.org/docs/default-document-library/lohbauer---translated.pdf?sfvrsn=0> (Acessada em: 12 jun 2012)

Figura 8. Vendas de suco de laranja no varejo americano em milhões de galões

Em setembro de 2013, o Ministério Público Federal no Distrito Federal (MPF/DF) entrou com ação na Justiça para suspender o registro de agrotóxicos formulados com carbendazim no Brasil, onde argumenta que o fungicida é proibido nos EUA e faz parte do programa de revisão de substâncias da União Europeia (UE). Segundo o MPF/DF, a proibição do uso do fungicida deve ser adotada até que a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) conclua o processo de reavaliação da toxicidade do princípio ativo. A última avaliação do ingrediente foi realizada pela ANVISA em 2002. Desde então, centenas de novas pesquisas apontaram riscos na ingestão do produto, que pode causar danos aos sistemas endócrino, hepático e reprodutor⁷.

Segundo as especificações da ANVISA em 2002⁸ e da EPA⁹, o carbendazim é um fungicida de classe toxicológica III, considerado de toxicidade média. Um dos fatores que constitui a essência para a avaliação toxicológica de um fungicida é a sua Dose Letal (DL50), sendo a mais preocupante a aguda oral (variando entre 1–500 mg kg⁻¹). A DL50 é definida como a dose que causou/causa a morte de 50% da população em estudo. Esta dose geralmente é expressa em função da massa do agente tóxico inoculado (mg) por unidade de massa corpórea da espécie em estudo (kg). Os testes toxicológicos são realizados em camundongos ou cobaias e extrapolados para seres humanos, já que as reações comportamentais são extremamente parecidas com a sensibilidade dos organismos humanos. A DL50 para o carbendazim em ratos administrado por via oral é de 6400 mg kg⁻¹ por peso do animal¹⁰.

⁷ <http://www.pmf.mpf.mp.br/impressa/18-09-2013-mpf-df-quer-suspender-registro-de-agrotoxicos-com-carbendazim-no-brasil>, acessada em Novembro 2013.

⁸ Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Índice Monográfico: Carbendazim. Brasília, Brasil, 2008. Disponível em: <[http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP\[20903-1-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP[20903-1-0].PDF)>, acessada em Junho 2012.

⁹ U. S. Environmental Protection Agency. Fungicida Carbendazim. Washington, 2012. Disponível em: <www.epa.gov/pesticides/factsheets/chemicals/carbendazim_ra.pdf>, acessada em Julho 2012.

¹⁰ Michael, A.; Irene, A.; Em *Handbook of Preservatives*. Taft, A., ed.; Synapse Info Resources: New York, p. 319, 2004.

Em conformidade com a tabela toxicológica da EPA, o MBC é considerado do grupo C, classificado como possível carcinógeno em humanos. Pesquisas experimentais relatam a formação de neoplasias hepatocelulares em fêmeas de camudongos⁹.

A absorção do MBC pelas plantas ocorre facilmente através das raízes, sementes ou folhas, sendo posteriormente transferido para a planta inteira¹¹. O tempo de meia vida do MBC no meio ambiente é relativamente alto, em torno de dois meses em condições aeróbias e vinte e cinco meses sob condições anaeróbias¹². Por conta disso, sua degradação é considerada lenta, o que torna o MBC um composto quimicamente estável. Contudo, na presença de luz (fotodegradação) e variações de temperatura e pH, sua estabilidade é afetada, como por exemplo, em meio alcalino e na presença de oxigênio torna-se mais instável e sua degradação é acelerada. Na temperatura ambiente o MBC possui baixa solubilidade em água, já em temperaturas maiores que 25°C passa a ser solúvel¹³. Portanto, este é um dos fatores que leva o carbendazim a ser encontrado no meio ambiente na forma de resíduos. Os produtos formados a partir do processo de degradação do MBC dependem do meio onde ocorre a degradação. A forma como é absorvido e/ou eliminado muda conforme o ambiente em que sofreu a decomposição, se em animais, plantas ou solo.

A rota metabólica do MBC já foi estudada em diversas espécies de animais, tais como: galinhas, ratos, camundongos, coelhos, cachorros, ovelhas, vacas, e em plantas e solos. Estudos com ratos revelam que o MBC é bem absorvido quando administrados por via oral cerca de 80 a 85%, sendo posteriormente metabolizado em diversos compostos dentro do organismo¹⁴.

¹¹ Huebra, M. J. G.; *et al.* *Fresenius J. Anal. Chem.* v. 367, p. 474, 2000.

¹² Escalada, J. P.; Pajares, A.; Gianotti, J.; Massad, W. A.; Bertolotti, S.; Amat-Guerri, F.; Garcia, N. A. *Chemosphere*. v. 65, p. 237, 2006.

¹³ Lee, J.; Hong, W.; Yao, W.; Mark, G.; Steve, D. W. *J. Pharm. Sci.* v. 92, p. 161, 2003.

¹⁴ Muthuviveganandavel V.; Muthuraman P.; Muthu S.; Srikumar K.; *J. Toxicol. Sci.* v. 33, p. 25, 2008.

Durante o processo metabólico do carbendazim em ratos (Figura 9)¹⁵, a principal reação química que ocorre é a hidroxilação, fornecendo como principais metabólitos: o 5-hidroxi-2-benzimidazole-carbamato (5-HBC) encontrado na urina e fezes de ratos machos; o 2-metoxycarbonil-amino-1H-benzimidazol-5-yl-(sulfato de hidrogênio) (5-HBC-S); e o 5,6-hidroxi-2-benzimidazole-carbamato-N-óxido (5,6-HOBC-N-óxido) encontrado nas excretas de ratos fêmeas.

¹⁵ Monson K. D.; Metabolism of [phenyl(U)-14C]carbendazim in rats, **1990**. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc149.htm>>, acessada em Julho 2012.

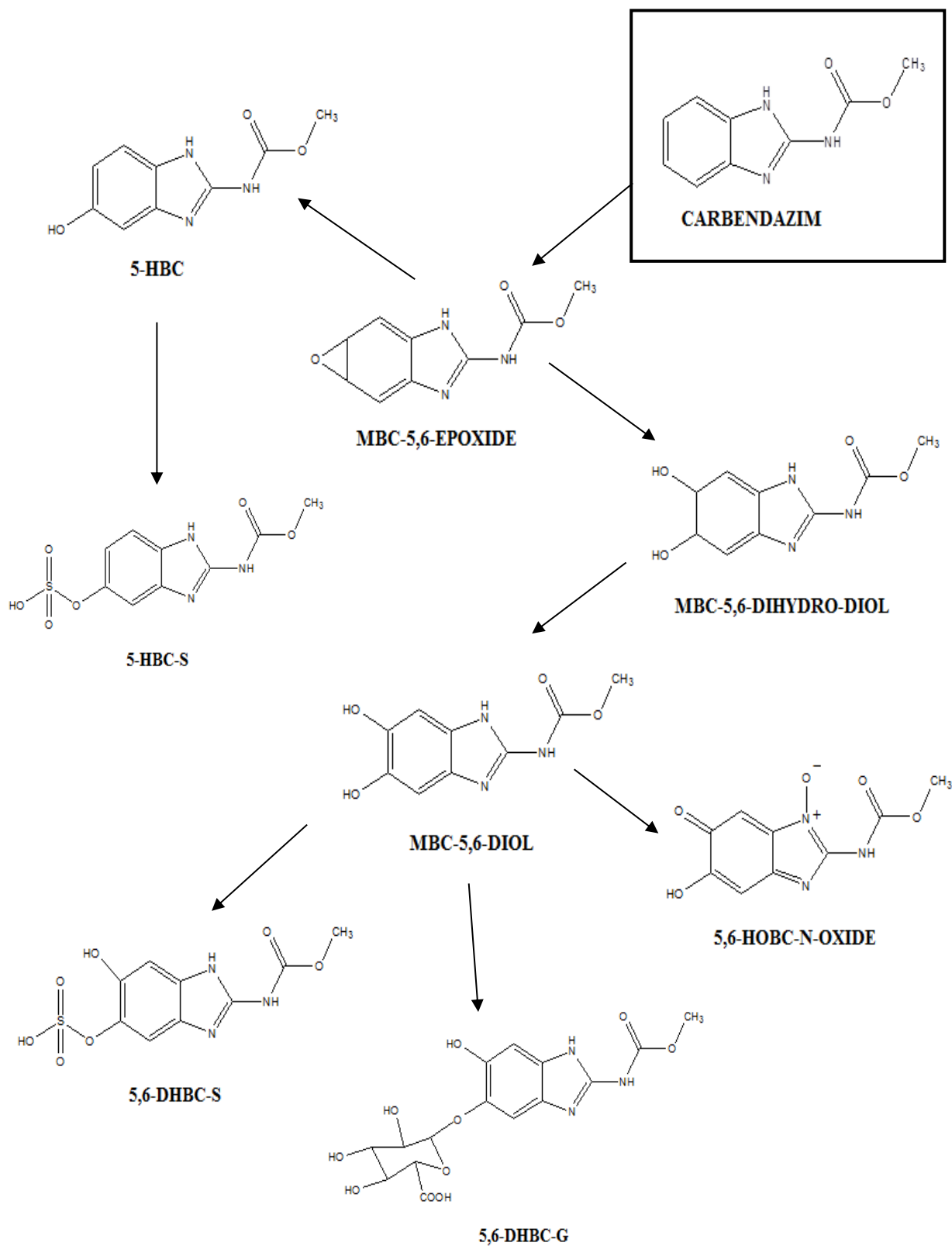


Figura 9. Rota metabólica do carbendazim em ratos (Adaptado de Monson, 1990)¹⁵

Como metabólitos secundários temos o metil-2-benzimidazole-carbamato-5,6-diol (MBC-5,6-DIOL) que pode se metabolizar a 6-hidroxi-2-metoxycarbonil-amino-1H-benzimidazol-5-il-5-(sulfato de hidrogênio) (5,6-DHBC-S) e 6-hidroxi-2-metoxycarbonil-amino-1H-benzimidazol-5-il- β -D-ácido glucopiranosiduronico (5,6-DHBC-G) nas formas conjugadas sulfatadas e glucuronizadas, respectivamente. Pesquisas descrevem que os metabólitos secundários citados anteriormente são excretados de forma rápida por meio da urina em ratos machos e fêmeas¹⁶.

A intoxicação por carbendazim é passível de ocorrer através da ingestão de alimentos tais como: feijão, arroz, trigo, soja, citros onde geralmente é aplicado esse fungicida⁸. Os trabalhadores rurais aplicadores diretos do carbendazim nas plantações, sofrem maiores riscos de exposição e intoxicação. Desse modo, para o Poder Público conceder satisfatoriamente o direito à saúde humana com alimentos seguros e saudáveis, a toxicidade do princípio ativo carbendazim necessita passar por um processo de reavaliação pela ANVISA. Considerando a problemática toxicidade do carbendazim e seus metabólitos aos efeitos mutagênicos, a causalidade deve ser estudada utilizando-se o maior número possível de informações, tanto qualitativas como quantitativas. A modelagem química computacional que estuda dentre os muitos possíveis temas, como exemplo, a interação de espécies químicas com o DNA, enzimas e proteínas está cada vez mais em evidência e oferece uma opção viável por ser às vezes de baixo custo e informar rapidamente sobre parâmetros que podem ser correlacionados com o potencial carcinogênico de substâncias químicas. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi caracterizar o potencial carcinogênico do carbendazim e seus metabólitos através de uma análise estatística de parâmetros eletrônicos obtidos por cálculos precisos de química quântica.

¹⁶ Yu, G.; Guo, Q.; Xie, L.; Liu, Y.; Wang, X. Effects. *Toxicol. Ind. Health*. v. 25, p. 41, 2009.

1.2 Estudo da carcinogênese química

O câncer é uma das doenças que mais causa mortes em todo mundo, tendo o seu número de casos aumentado bastante nos últimos anos¹⁷. Entretanto, neste trabalho, procuramos abordar o problema de uma forma mais ampla e, sobretudo, analisando o processo da gênese do câncer causado por agentes químicos^{17,18}. Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de uma centena de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo¹⁹. O processo da carcinogênese química em geral se dá muito lentamente, podendo levar vários anos para que uma célula cancerosa prolifere e dê origem a um tumor visível. Esse processo passa por três estágios (Tabela 3) antes de chegar à formação do tumor.

Tabela 3. Estágios da carcinogênese química

Estágio	As células
1-Iniciação	Sofrem ação de agentes cancerígenos que provocam modificações em alguns de seus genes
2-Promoção	Geneticamente alteradas, sofrem o efeito de agentes chamados oncopromotores. São transformadas em células malignas, de forma lenta e gradual
3-Progressão	Geneticamente alteradas se multiplicam de forma descontrolada e irreversível

Em nível citológico, uma célula normal pode sofrer alterações no DNA dos genes, causando a chamada mutação genética. As células cujos materiais genéticos foram alterados

¹⁷ Ladik, J.; Forner, W. Em *The Beginnings of Cancer in the Cell*. Springer-Verlag: Berlin, 1994.

¹⁸ Miller, E. C. *Cancer Res.* v. 38, p. 1479, 1978.

¹⁹ INCA. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>, acessada em Maio 2013.

passam a receber instruções erradas para suas atividades, comportando-se então de forma anormal, multiplicando-se de maneira descontrolada, mais rapidamente do que as células normais do tecido à sua volta, invadindo-o. O acúmulo dessas células formam tumores malignos. As células cancerosas são, geralmente, menos especializadas nas suas funções do que as normais. Conforme as células cancerosas vão substituindo as normais, os tecidos invadidos vão perdendo suas funções (Figura 10)²⁰.

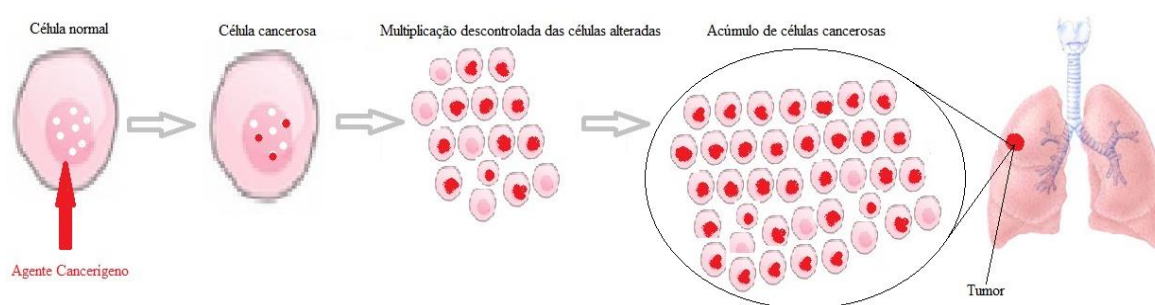


Figura 10. Representação da Carcinogênese

A maioria dos casos de câncer (80%) está relacionada ao meio ambiente²¹. O consumo de cigarros, por exemplo, é uma das mais devastadoras causas evitável de doenças e mortes prematuras. A Organização Mundial da Saúde (OMS) registra mais de 60 mil pesquisas comprovando a relação causal entre o uso do cigarro e doenças graves como câncer de pulmão (90% dos casos) (Figura 11), enfisema pulmonar (80%), infarto do miocárdio (25%), bronquite crônica e derrame cerebral (40%)²².



Fonte: http://img.terra.com.br/2003/10/22/82596_ga.jpg

Figura 11. Ministério da Saúde adverte: Fumar causa câncer de pulmão

²⁰ INCA. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=318>, acessada em Março 2013.

²¹ INCA. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=13>, acessada em Agosto 2013.

²² FUMO começa na idade escolar. *Folha de S. Paulo*, São Paulo, 25 abr. 2000, p. 3-1.

Alguns alimentos contêm níveis consideráveis de agentes cancerígenos. Por exemplo, os nitratos e nitritos usados como conservantes de alguns tipos de alimentos, como pickles, salsichas e alguns tipos de enlatados, se transformam em nitrosaminas no estômago. As nitrosaminas, que têm ação carcinogênica potente, são responsáveis pelos altos índices de câncer de estômago observados em populações que possuem uma dieta rica destes tipos de alimentos²³. As nitrosaminas serão abordadas neste trabalho.

Os defumados e os churrascos são impregnados pelo alcatrão proveniente da fumaça do carvão, o mesmo encontrado na fumaça do cigarro e que tem ação carcinogênica. A presença de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) nestas fumaças é também um fator de extrema importância na indução da carcinogênese. O benzopireno é um destes hidrocarbonetos estudados neste trabalho. Outro grave problema está relacionado ao fato de que, quando grãos e cereais são armazenados em locais inadequados e úmidos, eles podem ser contaminados por fungos. Um exemplo é o *Aspergillus Flavus*, o qual produz a Aflatoxina, substância altamente cancerígena estudada aqui neste trabalho. Essa toxina, juntamente com o vírus da Hepatite-B, está relacionada ao desenvolvimento de câncer de fígado²⁴.

No Brasil é observado que os tipos de câncer que se relacionam aos hábitos alimentares estão entre as seis primeiras causas de mortalidade por esta doença²³. Em diversas regiões do país, o perfil de consumo de alimentos que contém fatores de proteção está abaixo do recomendado²³. A ingestão de substâncias químicas com potencial carcinogênico é um dos fatores responsáveis pela formação do tumor maligno, devido os agentes carcinogênicos serem capazes de realizar alterações no material genético celular (DNA), favorecendo a formação de células cancerígenas, ou seja, células neoplásicas malignas.

²³ INCA. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=18>, acessada em Dezembro 2013.

²⁴ <http://www.uscs.edu.br/cipa/dicas.php?id=41>, acessada em Julho 2013.

Em relação a medicamentos, apesar da valiosa contribuição para o controle de muitas doenças, a incorporação destes à prática médica produz efeitos indesejáveis, entre os quais a carcinogênese. Um exemplo é o uso de estrogênios conjugados para o tratamento dos sintomas da menopausa no qual são correlacionados com uma maior ocorrência do câncer do endométrio, e alguns estudos relacionam o câncer de mama com o uso prolongado de contraceptivos²³. Outro problema é o grande número de substâncias químicas usadas na indústria e na agricultura que constituem um fator de risco de câncer em trabalhadores de várias ocupações. São raros os casos de câncer que se devem exclusivamente a fatores hereditários, familiares e étnicos, apesar de o fator genético exercer um importante papel na oncogênese²⁵.

É importante ressaltar que além dos chamados carcinógenos químicos (enfocados neste trabalho), que são substâncias que induzem direta (reagem diretamente com o material genético sem necessitar de qualquer tipo de reação enzimática) ou indiretamente (não reagem diretamente com o material genético, antes passando por um processo metabólico)²⁶ a carcinogênese (carcinogênese química), existem outras possibilidades de indução. As radiações ultravioletas (UV), raios gama (γ), raios-X, partículas radioativas e alguns tipos de vírus apresentam esta característica indutora da carcinogênese. A maioria dos carcinógenos químicos sofre processo de metabolismo para então formar o chamado carcinógeno efetivo (último), este se liga covalentemente ao DNA resultando nos adutos, denominado o produto responsável pela formação do câncer²⁷. Carcinógenos químicos são substâncias químicas mutagênicas capazes de induzir alterações nas células somáticas tendo como consequências a formação de tumores malignos.

²⁵ <http://www.portaleducacao.com.br/educacao/artigos/8181/oncogenese>, acessada em Agosto 2013.

²⁶ Leão, M. B. C.; Pavão, A. C. *J. Mol. Structure*. v. 593, p. 297, 2001.

²⁷ Andreas, L. *Nature Reviews*, v. 5, p. 113, 2005.

Em 1966 James Miller e Elizabeth Miller (Figura 12) foram os primeiros a estudar os mecanismos envolvidos durante a carcinogênese química²⁸.



Fonte: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Miller,_james_and_elizabeth.jpg

Figura 12. James e Elizabeth Miller

Estes pesquisadores descobriram a importância da ativação metabólica na formação dos adutos covalentes envolvendo macromoléculas como ácido nucléicos e proteínas. Elizabeth Miller e James Miller descobriram em suas pesquisas que uma substância química carcinogênica é um reagente eletrofílico ou será metabolizado a um, onde estes exercem efeitos biológicos por interações intramoleculares do tipo covalente com macromoléculas como DNA, RNA ou proteínas²⁸.

A informação genética está contida em moléculas gigantes chamadas ácido desoxirribonucleico (DNA) localizadas no núcleo de células eucariontes. Esta macromolécula que contém locais ricos em elétrons^{17,29} é responsável pelas informações utilizadas na síntese de proteínas necessárias ao funcionamento celular. Quatro bases nucleotídicas, adenina (A), guanina (G), citosina (C) e timina (T) codificam estas informações. A guanina, base nitrogenada do DNA, é a mais suscetível ao ataque do carcinógeno químico³⁰.

²⁸ Miller, E. C.; Miller, J. A. *Cancer*. v. 47, p. 1055, 1981.

²⁹ Blackburn, G. M.; Gait, M. J. Em *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*. Oxford University Press: Oxford, 1996.

³⁰ Leão, M. C. B.; Longo, R. L.; Pavão, A. C. *J. Mol. Structure*. v. 490, p. 145, 1999.

Cada uma dessas bases é ligada a um fragmento de açúcar (pentose), que são conectados entre si por meio de grupos fosfatos, formando o que chamamos de nucleotídeos. As bases são divididas em pirimídicas (monocíclicas), exemplo: citosina, timina; e em púricas (bicíclicas), exemplo: adenina e guanina (Figura 13).

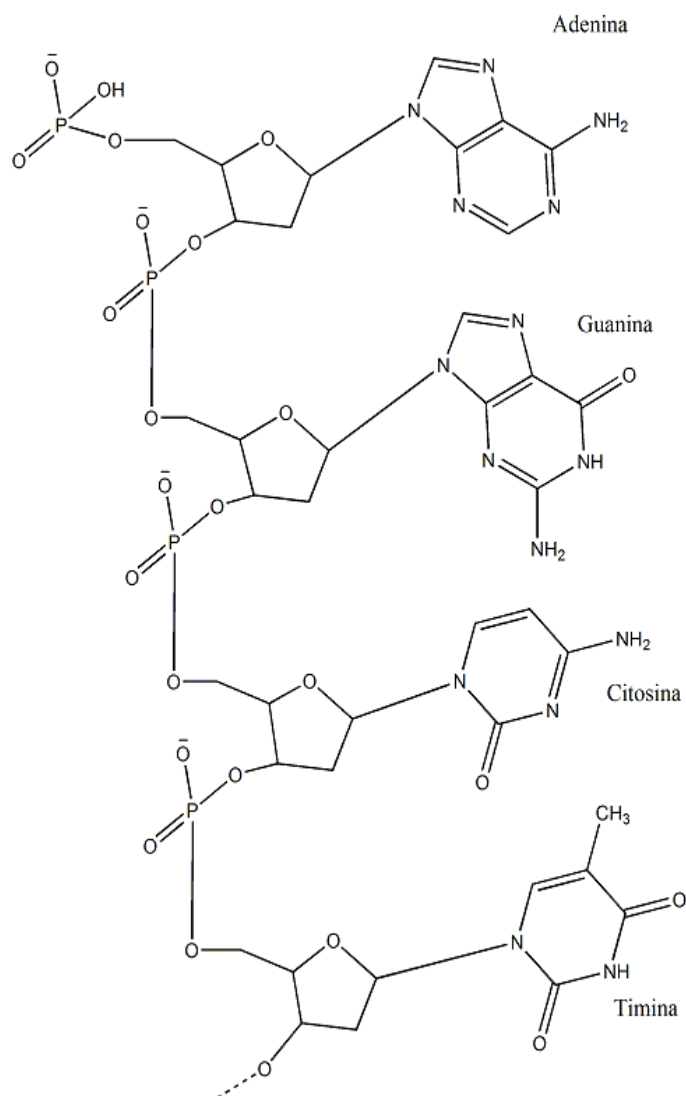


Figura 13. Estrutura primária do DNA

CAPÍTULO 2



Fonte: <http://www.infonet.com.br/economia/ler.asp?id=115135>

OBJETIVOS

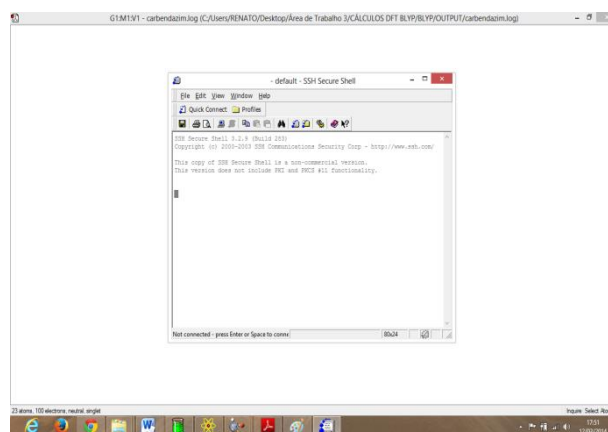
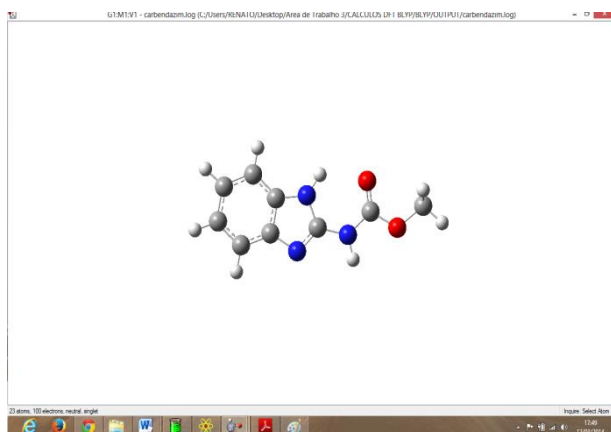
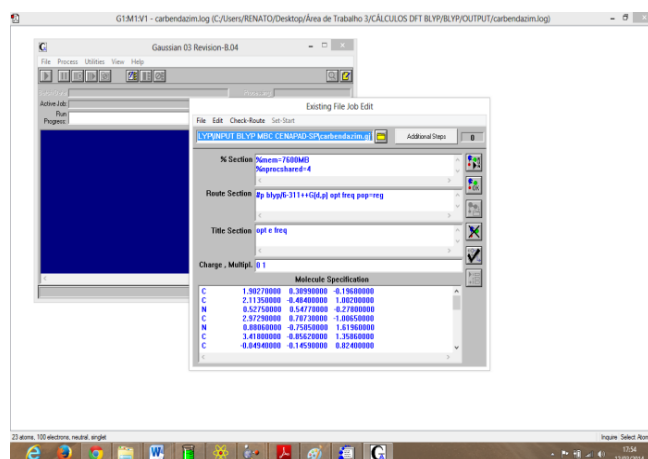
2.1 Objetivo geral

Investigar os riscos de carcinogênese química do carbendazim, metabólitos e outros fungicidas utilizados na fruticultura brasileira.

2.2 Objetivos específicos

- Utilizar parâmetros energéticos e eletrônicos obtidos através de cálculos computacionais utilizando métodos semi-empírico (AM1) e da Teoria do Funcional da Densidade (DFT) com a finalidade de investigar o potencial carcinogênico do carbendazim e seus metabólitos;
- Realizar um tratamento estatístico multivariado, a análise de componentes principais (ACP), para avaliar a influência dos parâmetros energéticos e eletrônicos na atividade carcinogênica do carbendazim e seus metabólitos;
- Aplicar o modelo rápido e eficiente desenvolvido por Pavão e Leão para previsão do risco de carcinogênese química.

CAPÍTULO 3



METODOLOGIA

Teoria RVB



3.1 Teoria RVB

A teoria da ressonância *não*-sincronizada das ligações covalentes (RVB) descreve a formação de ligações químicas através da transferência de elétrons, sendo aplicada com sucesso a uma variedade de casos e fenômenos distintos³⁰⁻³⁶. Originalmente desenvolvida por Linus Pauling para explicar as propriedades de metais e ligas³¹, ela contempla ainda a supercondutividade³², magnetismo³³, carcinogênese química^{26,30,34}, mecanismo de interação de moléculas com superfícies metálicas³⁵, metais, ligas e compostos intermetálicos, condutividade elétrica e reações químicas em geral. A RVB oferece uma descrição simples das forças interatômicas em metais e mostra que a ligação metálica está diretamente relacionada à ligação covalente comum (emparelhamento de elétrons). No metal, todos ou a maioria dos elétrons externos dos átomos, incluindo os elétrons *d* no caso dos metais de transição (e não apenas os elétrons *s*), tomam parte na formação da ligação. Os elétrons de cada átomo estão envolvidos com aqueles dos átomos vizinhos numa interação que pode ser descrita pela formação de uma ligação covalente, sendo que as ligações são ressonantes entre as posições disponíveis. Para a ocorrência de ressonância *não*-sincronizada entre as ligações químicas, Pauling introduziu o conceito de orbital metálico. Através de cálculo *ab initio* VB (valence bond), já se observa a importância do orbital metálico e o caráter covalente da ligação metal-metal³⁶.

Para uma simples exposição do conceito de ressonância *não*-sincronizada, podemos utilizar o exemplo da transferência de ligação em um cristal de lítio. Pauling destaca que mais importante do que a ressonância sincronizada para a estabilidade do cristal é a ressonância *não*-

³¹ Pauling, L. *J. Solid State Chem.* v. 54, p. 297, **1984**.

³² Pauling, L. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 88, p. 9208, **1991**.

³³ Pauling, L. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 39, p. 551, **1953**.

³⁴ Leão, M. B. C.; Pavão, A. C. *Int. J. Quantum Chem.* v. 62, p. 323, **1997**.

³⁵ Ferreira, J. V.; Pavão, A. C. *Surf. Sci.* v. 602, p. 1964, **2008**.

³⁶ Mohallem, J. R.; Vianna, R. O.; Quintão, A. D.; Pavão, A. C.; McWeeny, R. Z. *Phys. D.* v. 42, p. 135, **1997**.

sincronizada (Figura 14), onde a transferência de ligação química leva a uma separação de cargas e, portanto a um estado condutor, como corresponde ao metal lítio. Na ressonância *não*-sincronizada apenas uma ligação é transferida, resultando na transferência de elétron de um átomo para outro.



Figura 14. Ressonância *não*-sincronizada

Na ressonância sincronizada (Figura 15) não ocorre a separação de cargas, o que corresponde à descrição de um estado isolante do cristal. Esta ressonância é equivalente àquela observada no benzeno onde uma ligação é transferida sincronizadamente com outra.



Figura 15. Ressonância sincronizada

É intrigante o fato de que Pauling, embora tenha explicitado essas duas ressonâncias em sua formulação original da teoria da ressonância e tenha utilizado a *não*-sincronizada para explicar diversos fenômenos, somente a ressonância sincronizada é que se popularizou entre os químicos.

Um ponto central no estudo da carcinogênese química é entender como atua o carcinógeno no organismo. O carcinógeno pode formar uma ligação química com o DNA, RNA e proteínas. Baseado então, no fato que carcinógenos são eletrófilos e formam ligações covalentes com as bases do DNA, podemos utilizar a RVB de Pauling³¹ para descrever

esta interação. A vantagem da utilização da RVB no problema da carcinogênese química é que, como veremos na próxima seção, esta Teoria permite racionalizar a formação da ligação covalente do carcinógeno com o DNA em termos das propriedades de moléculas isoladas.

3.2 Teoria RVB da interação carcinógeno-DNA

Para explicar a interação entre o carcinógeno e o DNA utilizamos o modelo desenvolvido por Pavão e Leão que combina os princípios da Teoria do Orbital Molecular de Fronteira (FMO) e da RVB associados com cálculos de orbitais moleculares. A formação da ligação entre o carcinógeno e o DNA é tratada como sendo uma reação de transferência de elétron ocorrendo entre orbitais de fronteira. Ou seja, a transferência de um elétron do orbital molecular ocupado de maior energia (HOMO) do DNA para o orbital molecular desocupado de mais baixa energia (LUMO) do carcinógeno (Figura 16) pode ser descrita como uma ressonância *não*-sincronizada envolvendo a transferência de uma ligação do DNA para o carcinógeno²⁶. Esta interação será mais efetiva à medida que a energia do HOMO do DNA estiver mais próxima da energia do LUMO do carcinógeno interagente^{37,38}.

³⁷ Dewar, M. J. S. *J. Mol. Structure*. v. 200, p. 301, **1989**.

³⁸ Flemming, I. Em *Frontier Orbitals and Organic Chemical Reactions*. John Wiley: New York, **1976**.

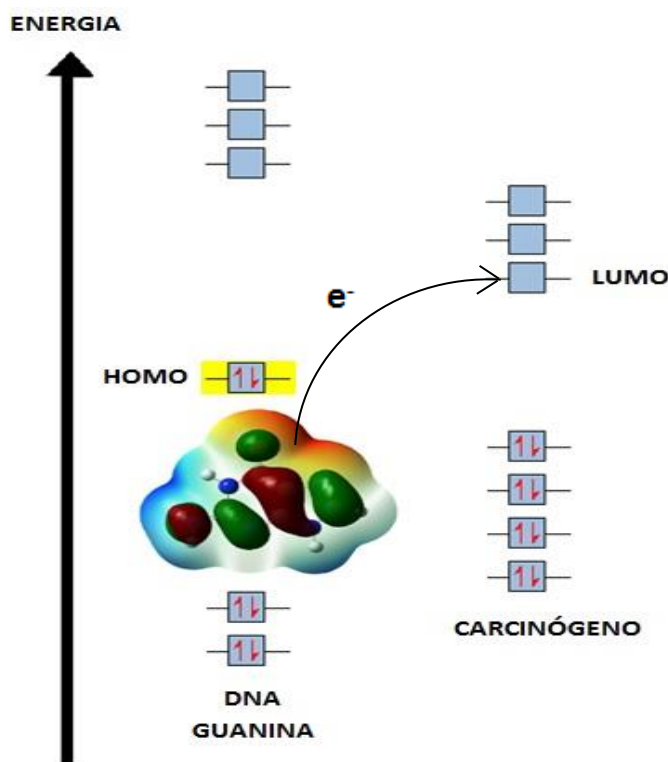


Figura 16. Transferência de elétron do DNA/Guanina para o carcinógeno por meio dos orbitais de fronteira HOMO-LUMO

A transferência de elétron ocorre de algum centro nucleofílico do DNA, no caso da Figura 16 nos referimos à guanina, para o carcinógeno, um eletrófilo. Dentre as bases nitrogenadas do DNA, a guanina é a que apresenta o menor valor para a energia de ionização (alta energia para o HOMO), fato que justifica a preferência dos carcinógenos por esta base^{26,39}. É importante também salientar que quanto mais baixa for a energia do LUMO de uma substância, maior será o seu caráter eletrofílico, com grande afinidade eletrônica, o que é explicado pela facilidade energética do LUMO em receber elétrons. Em contrapartida, as substâncias nucleofílicas deverão possuir uma alta energia do HOMO, apresentando uma grande facilidade energética em doar elétrons.

³⁹ Leão, M. B. C.; Pavão, A. C.; Espinoza, V. A. A.; Taft, C. A.; Bulnes, E. P. *J. Mol. Structure*. v. 710, p. 129, 2005, e referências dos autores aqui citadas.

A Figura 17 ilustra a transferência de elétron através da transferência da ligação covalente, ou seja, a mudança de posição da ligação covalente do DNA para o carcinógeno, explicada pela teoria RVB. Neste modelo de interação ocorre a formação de uma ligação covalente entre as duas espécies formando um complexo³⁶.

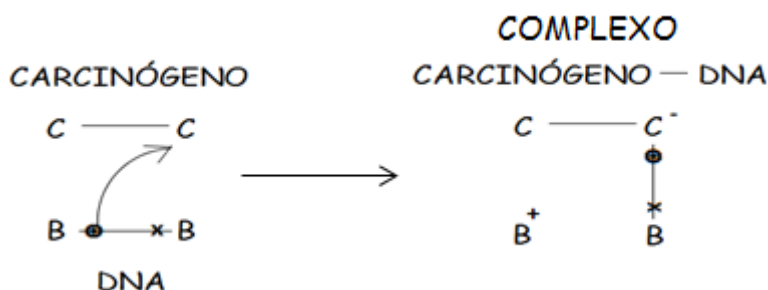


Figura 17. Ressonância *não*-sincronizada: C representa a espécie carcinogênica e B a base do DNA

Para que ocorra a transferência de elétron é necessário que a espécie que vai receber o elétron possua um orbital vazio para receber este elétron. É o que Pauling denomina de *orbital metálico*. Sua função é receber o elétron para que ocorra a formação da nova ligação química.

Com base na teoria dos orbitais de fronteira e da teoria da ressonância *não*-sincronizada das ligações covalentes, devemos esperar que o substrato (DNA, RNA, proteínas) possua uma energia do HOMO em uma faixa relativamente próxima à do LUMO do agente cancerígeno para que a reação de transferência de elétrons entre eles aconteça com um pequeno “gap” energético. Ou seja, quanto menor for a diferença entre as energias do LUMO do carcinógeno e o HOMO do DNA, maior a possibilidade de interação entre as duas moléculas. Em nosso trabalho, representaremos esta energia de interação por ΔE_{L-H} . Assim, neste modelo o DNA age como um doador de elétrons e as substâncias carcinogênicas ou seus metabólitos são substâncias receptoras de elétrons. Diante disso é preciso analisar propriedades eletrônicas que forneçam informações a respeito da capacidade eletrofílica das substâncias.

Fundamentalmente a análise deve ser concentrada na observação da energia do LUMO, pois é através deste orbital que o agente cancerígeno, funcionando como um receptor deverá interagir com o DNA em uma reação de transferência de elétrons.

3.3 Fatores que caracterizam a interação DNA–Carcinógeno

O potencial carcinogênico do carbendazim e metabólitos foi aqui estudado tomando como referência os estudos prévios que descrevem com sucesso a atividade carcinogênica de diversos compostos, tais como aflatoxinas, diclorodifeniltricloroetano (DDT), dimetilnitrosamina, benzopirenos, uma variedade de pesticidas e a atividade protetora de substâncias antioxidantes (vitamina C e resveratrol) contra o câncer^{39,40}. Todos estes estudos utilizará a mesma metodologia empregada em nossa pesquisa. Este modelo reproduz satisfatoriamente as observações experimentais^{18,41}.

As substâncias carcinogênicas no organismo podem sofrer uma série de transformações metabólicas. Assim, uma substância não necessariamente irá interagir com o substrato sob a forma inicial de absorção. O responsável pela indução do câncer é o chamado carcinógeno último (carcinógeno efetivo), o qual interage com o substrato celular. Porém nem todos os carcinógenos irão requerer metabolismo intracelular, são os chamados agentes alquilantes diretos. Elizabeth C. Miller propõe que o mecanismo de ação dos carcinógenos baseia-se no processo de interação do último metabólito (carcinógeno efetivo) eletrofílico com os sítios nucleofílicos de DNA, RNA e proteínas.

⁴⁰ Bedor, C. N. G.; Pavão, A. C.; Rego, M. A. V.; Augusto, L. G. S.; Em *Vulnerabilidades socioambientais associadas ao uso de agrotóxicos na fruticultura do semiárido pernambucano: indicadores precoces de carcinogênese*. Augusto, L. G. S., ed.; Saúde do Trabalhador e Sustentabilidade do Desenvolvimento Humano Local – Ensaio em Pernambuco: Recife/UFPE, p. 147, **2009**.

⁴¹ Miller, E. C. *Cancer Res.* v. 11, p. 100, **1951**.

Elizabeth Miller demonstrou que no processo de hepatocarcinogênese ocorria a formação de uma ligação covalente entre azocarcinogênicos e proteínas^{41,42}. Depois disso ela observou a interação covalente entre o benzopireno e seus metabólitos com proteínas⁴³. Existem também outros trabalhos que demonstram esta interação do carcinógeno com o DNA, RNA e proteínas^{42,44}, evidenciando a utilidade da RVB na descrição da formação desta ligação química. Entretanto, para que este processo se concretize é preciso levar em consideração outros fatores. Neste trabalho, além da diferença entre as energias de interação (ΔE_{L-H}) do LUMO (espécie a ser analisada) pelo HOMO da base do DNA (guanina), tal como requer a teoria RVB, consideramos também a atração eletrostática entre os sítios de interação, o momento de dipolo, o coeficiente de partição, além da afinidade eletrônica do carcinógeno.

A afinidade eletrônica, (EA), de uma molécula é calculada segundo a Equação 1,

$$EA = E_{t(\text{neutra})} - E_{t(\text{ânion})} \quad (1)$$

onde $E_{t(\text{neutra})}$ é a energia total da molécula neutra e $E_{t(\text{ânion})}$ é a energia total da molécula aniônica, estando ambas com suas geometrias otimizadas. Esta é denominada afinidade eletrônica adiabática. Este procedimento é mais realista do que simplesmente usar o Teorema de Koopmans ($-LUMO$) ou calcular EA vertical que utiliza apenas a geometria da molécula neutra otimizada⁴⁵. Quanto maior for o valor da afinidade eletrônica, maior será a atividade carcinogênica da espécie, indicando a facilidade em receber elétrons. A atração eletrostática (Δq) é calculada pela diferença de carga do átomo mais positivo do carcinógeno e a carga negativa do oxigênio (O16) da guanina, que é o sítio de interação no DNA. Este parâmetro é um

⁴² Norinder, U. *J. Mol. Structure*. v. 151, p. 259, **1987**.

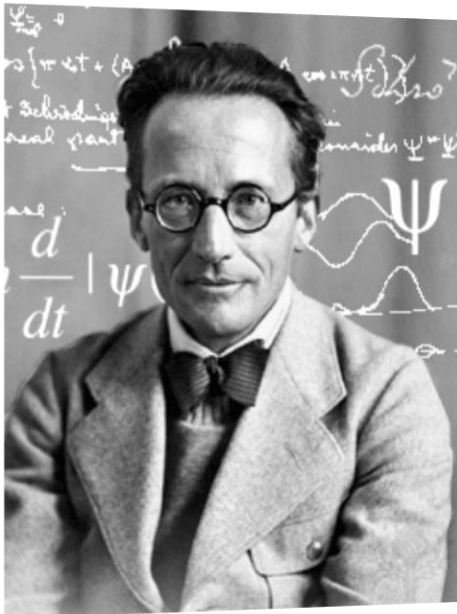
⁴³ Lowdin, P. *Int. J. Quantum Chem*. v. 16, p. 219, **1989**.

⁴⁴ Mishra, P. C. *J. Mol. Structure*. v. 195, p. 201, **1989**.

⁴⁵ Rienstra-Kiracofe, J. C.; Tschumper, G. S.; Schaefer, H. F. *Chem. Rev.* v. 102, p. 231–282, **2002**.

indicador da facilidade de aproximação do agente eletrofílico e o DNA para a transferência do elétron. Quanto maior for esta diferença, maior será a atração eletrostática DNA-Carcinógeno. O momento de dipolo elétrico (μ) e o logaritmo do coeficiente de partição (LogP) do carcinógeno são utilizados para a caracterização da permeabilidade da membrana celular para a passagem do carcinógeno. Com baixo valor para o momento dipolo do carcinógeno podemos avaliar sua interação com as membranas lipídicas do organismo (que possuem baixo grau de polaridade). Compostos de mesma polaridade tendem a interagir melhor entre si. O LogP é utilizado como parâmetro hidrofóbico para descrever a razão das concentrações do composto em dois meios líquidos imiscíveis em equilíbrio (octanol/água), ou seja, expressa a relação entre a solubilidade do composto em meio lipídico e em meio aquoso. Quanto maior o valor do LogP da substância, maior sua solubilidade em meio lipídico, tendo assim uma melhor afinidade com a região hidrofóbica da membrana. Estes parâmetros (ΔE_{L-H} , EA, Δq , μ e LogP) foram obtidos através de cálculos semi-empíricos AM1 e DFT, e posteriormente incluídos numa análise estatística. Estes métodos são descritos nos próximos capítulos.

Métodos Computacionais



Erwin Schrödinger

$$H\Psi = E\Psi$$

3.4 Métodos Computacionais

A química computacional tem sido aplicada como ferramenta de pesquisa em diversas áreas da ciência. Em nosso grupo de pesquisa, os métodos computacionais têm sido de grande importância para explicar problemas de carcinogenicidade química, química medicinal, supercondutividade, magnetismo, investigação das partículas elementares, etc. Nesta seção descreveremos sobre os métodos computacionais do tipo Hartree-Fock, com uma abordagem especial sobre os métodos semi-empíricos e ênfase no método AM1, que foi o utilizado para o desenvolvimento desta pesquisa.

3.4.1 Método Hartree-Fock

Os métodos de química quântica buscam a obtenção de propriedades moleculares através da resolução da equação de Schrödinger independente do tempo, segundo a Equação 2:

$$\hat{H}\Psi = E\Psi \quad (2)$$

onde \hat{H} é o operador hamiltoniano, Ψ é a função de onda que caracteriza o movimento de uma partícula e a partir da qual se podem derivar várias propriedades desta partícula, e E corresponde à energia total desejada do sistema (núcleos e elétrons)^{46,47}. A função de onda, segundo um dos postulados fundamentais da mecânica quântica, descreve completamente o estado de um sistema em função das coordenadas espaciais das partículas que o compõem e do tempo (este último pode ser desconsiderado se não houver interesse nas mudanças do sistema com o tempo).

⁴⁶ Mahan, B. M.; Myers, R. J. *Química: um curso universitário*. 4 ed. Araki, T. K.; Matsumoto, F. M., eds.; Edgard Blücher: São Paulo, p. 272, 1998.

⁴⁷ Atkins, P.; de Paula, J. *Físico-química*. 8 ed. da Silva, T. E. C.; Cardoso, M. J. E. M.; Faria, M. A. F.; Barcia, O. E., eds.; LTC: Rio de Janeiro, p. 589, 2008.

Outra importante consideração sobre a função de onda é que esta, normalmente, é um número complexo e, portanto, não possui significado físico. Entretanto, segundo outro postulado fundamental da mecânica quântica, o produto desta função de onda pelo seu complexo conjugado, correspondente ao quadrado do módulo da função de onda (Equação 3), tem significado físico e é interpretado como a probabilidade de se encontrar uma partícula em determinado ponto do espaço, cuja integração sobre todo o espaço iguala-se a um.

$$\Psi\Psi^* = |\Psi|^2 \quad (3)$$

Na mecânica quântica, o conceito de operador é de grande importância. Um operador (opcionalmente representado sob o símbolo “^”) é um objeto que representa uma instrução para executar determinada ação (multiplicação, diferenciação ou integração). O operador Hamiltoniano aplicado em uma função (a função de onda) leva a energia total do sistema.

Em sistemas moleculares polieletrônicos, o hamiltoniano contém os operadores de energia cinética dos núcleos (T_N), energia cinética dos elétrons (T_e), energia potencial de atração elétron-núcleo (V_{eN}), energia potencial de repulsão elétron-elétron (V_{ee}) e energia potencial de repulsão núcleo-núcleo (V_{NN})⁴⁶, segundo a Equação 4.

$$\hat{H} = T_N + T_e + V_{eN} + V_{ee} + V_{NN} \quad (4)$$

Para a resolução da Equação 2, considerando H tal como descrito na Equação 4 em sistemas polieletrônicos é necessária à inclusão de algumas aproximações. A primeira é a de Born-Oppenheimer que trata separadamente a energia cinética dos núcleos da energia cinética dos elétrons. Isto significa que a equação Schrödinger pode ser separada em uma parte eletrônica e outra nuclear. Com isso o Hamiltoniano pode ser escrito segundo a Equação 5:

$$\hat{H} = \hat{H}_{(\text{núcleos})} + \hat{H}_{(\text{elétrons})} \quad (5)$$

No entanto, com esta aproximação, a equação de Schrödinger somente será resolvida de maneira exata para sistemas monoelétrônicos. Em sistemas polieletrônicos o termo de repulsão elétron-elétron torna inviável este procedimento. A solução deste problema foi proposta por Douglas Rayner Hartree e Vladimir Fock⁴⁸ (o chamado método Hartree-Fock), na qual propuseram um modelo matemático utilizado para representar a estrutura eletrônica de sistemas multieletrônicos e por aproximação tornar possível a resolução da equação de Schrödinger para tais sistemas.

O objetivo do método Hartree-Fock é solucionar de forma aproximada a equação de Schrödinger utilizando um determinante de Slater. O procedimento de Hartree-Fock toma como base o modelo de partículas independentes. Entretanto, o ponto crucial do método de Hartree-Fock, é a determinação da forma matemática das funções orbitais⁴⁹. A saída para este impasse veio com o procedimento de Hartree-Fock-Roothaan, onde cada orbital, atômico ou molecular, é descrito como uma combinação linear de um conjunto de funções de bases obtidas através do procedimento do campo autoconsistente (HF-SCF-LCAO-MO). A combinação linear de orbitais atômicos (Equação 6)

$$\phi_i = \sum_{k=1}^m C_{ik} \chi_k \quad (6)$$

representa os orbitais moleculares como misturas de m funções de base χ_k . Os coeficientes C_{ik} são determinados através da desigualdade, segundo a Equação 7:

$$\frac{\langle \psi | H \psi \rangle}{\langle \psi | \psi \rangle} \geq E_0 \quad (7)$$

⁴⁸ Roothaan, C. C. J. *Rev. Mod. Phys.* v. 23, p. 69, 1951.

⁴⁹ Pauling, L. *Physica XV*, v. 1, p. 23, 1949.

onde E_0 é a energia do estado fundamental. A aplicação do princípio variacional implica em escrever a função ϕ_i com uma expansão de um conjunto de funções com coeficientes otimizados para minimizar o lado esquerdo da equação. Para isso se resolve a equação secular (Equação 8):

$$|H - \epsilon S| = 0 \quad (8)$$

onde S é a matriz de recobrimento. Os métodos de solução da equação secular podem ser divididos em duas classes: aqueles que resolvem completamente as integrais são chamados de *ab initio*; e os que parametrizam e/ou desprezam algumas destas integrais são chamados de métodos semi-empíricos. Os métodos semi-empíricos usam aproximações e dados experimentais que simplificam o cálculo de integrais. A vantagem é que podem ser aplicados à moléculas grandes com baixo custo computacional e às vezes oferecendo bons resultados para certas propriedades moleculares.

3.4.2 Métodos Semi-Empíricos

Os métodos de cálculos semi-empíricos usam aproximações que simplificam o cálculo de integrais do método Hartree-Fock-Roothaan. Estes métodos empregam parâmetros empíricos para calcular certas integrais, tendo com isso uma exatidão limitada. A utilização de parâmetros experimentais reduz o número de equações a serem resolvidas para obtenção das propriedades desejadas, ganhando assim um precioso tempo computacional. São cálculos mais lentos em relação aos de mecânica molecular, porém mais rápidos que os *ab initio* e apresentam resultados eficientes⁵⁰.

⁵⁰ Trsic, M; Siqueira Pinto, M. F. *Química Quântica: fundamentos e aplicações*. Manole: São Paulo, p. 104, 2009.

Os métodos semi-empíricos são classificados conforme a abordagem teórica, as aproximações matemáticas e experimentais utilizadas para resolução das equações propostas pelo método utilizado e por fim ao procedimento de parametrizações. Em sua maioria, os métodos semi-empíricos utilizam um conjunto de base mínima de valência formado por funções do tipo Slater⁵¹. Nestes métodos a função de onda total eletrônica é representada por apenas um único determinante de Slater. As principais diferenças entre os diversos métodos semi-empíricos se encontram nas integrais que são adicionadas e/ou omitidas na resolução das equações de Hartree-Fock-Roothaan, no conjunto de funções de base empregada e nos parâmetros experimentais utilizados⁴⁸.

Inicialmente os métodos semi-empíricos foram criados com o intuito de realizar estudos mecânico-quânticos de sistemas que apresentavam elétrons π (π). Os cálculos realizados somente levavam em consideração os elétrons π , portanto limitavam os tipos de sistemas que podiam ser investigados e, por considerar apenas estes elétrons, apresentavam erros em seus resultados, pois outros elétrons que influenciavam nas propriedades dos sistemas não eram considerados. Por conta da imprecisão inicial dos cálculos realizados por este método, John A. Pople e colaboradores propuseram novos métodos levando em consideração não apenas os elétrons π , mas todos os elétrons da camada de valência.

O primeiro método semi-empírico foi o de Huckel, tendo sido desenvolvido em 1930 com a finalidade de explicar o comportamento de hidrocarbonetos aromáticos e insaturados. Com a realização de algumas modificações neste método surgiu o Huckel Extendido, onde alguns efeitos das interações elétron-elétron foram incluídos através de parametrizações.

⁵¹ Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular. Morgon, N. H.; Coutinho, K., eds.; Livraria da Física: São Paulo, 2007.

Os pesquisadores Pariser, Parr e Pople, baseados no método Huckel, desenvolveram o método Pariser-Parr-Pople (PPP). Uma das principais contribuições deste método foi a retirada de algumas integrais de repulsão eletrônica (as integrais de overlap), ficando esta aproximação conhecida como ZDO (*Zero-Differential Overlap*)⁵². Em seguida, Pople e colaboradores partindo do método PPP, desenvolveram o CNDO (*Complete Neglect of Differential Overlap*). Neste novo método as equações de Roothaan são resolvidas iterativamente utilizando funções do tipo Slater (STO) por orbital de valência. Posteriormente, Pople, Beveridge e Dobosh modificaram o formalismo do método CNDO e obtiveram o INDO (*Intermediate Neglect of Differential Overlap*). Esta aproximação considera a sobreposição diferencial monoatômica, contudo somente para as integrais de um único centro⁵³. Os pesquisadores Ridley e Zerner através de parametrizações no formalismo do INDO especialmente para os cálculos de espectros eletrônicos criaram o INDO/S (*Intermediate Neglect of Differential Overlap/Spectroscopy*), onde anos mais tarde foi novamente reparametrizado para realização de cálculos para sistemas contendo átomos mais pesados. Após a realização de algumas modificações no INDO, Pople, Santry e Segal implementaram o NDDO (*Neglect of Diatomic Differential Overlap*). As modificações realizadas foram a omissão das integrais de recobrimento (ou sobreposição) para moléculas diatômicas que possuísem orbitais atômicos distintos e a inclusão das integrais para a retenção de interações dipolo-dipolo^{53,54}. Atualmente o NDDO é o método base para todos os métodos semi-empíricos. Através de modificações no NDDO, Thiel e Dewar criaram o MNDO (*Modified Neglect of Diatomic Overlap*), sendo este basicamente um aperfeiçoamento do método NDDO.

⁵² Stewart, J. J. P. *J. Mol. Model.* v. 13, p. 1173, **2007**.

⁵³ Almeida, W. B. *Escola de Química Teórica*. ICEx: UFMG, **1993**.

⁵⁴ Pople, J. A.; Santry, D. P.; Segal, G. A. *J. Chem. Phys.* v. 43, p. 129, **1965**.

3.4.2.1 O método Austin Model 1 (AM1)

O método semi-empírico *Austin Model 1* (AM1) foi criado em 1985 por Dewar e colaboradores⁵⁵ e propõe a modificação da função de repulsão do caroço (CRF) do método MNDO para minimização do erro de superestimar as repulsões entre átomos quando estão aproximadamente a distâncias de Van der Waals. Neste método ainda foram adicionadas uma função de repulsão do caroço (CRF), funções gaussianas atrativas e repulsivas e foi desenvolvido um novo procedimento para a otimização. Estas modificações tornaram o tempo computacional do método menor. As integrais de repulsão eletrônica de um centro permanecem inalteradas em relação ao método MNDO. Essas mudanças produziram previsões mais precisas de barreiras de ativação para muitas reações, bem como uma melhoria nas previsões do calor de formação de moléculas, quando comparadas ao MNDO. Os elementos contidos na versão reparametrizada do método AM1 são: C, N, O, H, B, F, Al, Si, P, S, Cl, Zn, Ge, Se, Br, Sn, Sb, Te, I, Hg, As.

3.4.3 Teoria do Funcional da Densidade (DFT)

As propriedades eletrônicas dos compostos investigados nesta pesquisa foram inicialmente obtidas a partir de cálculos semi-empíricos utilizando o hamiltoniano AM1 (*Austin Model 1*), que em geral é bem parametrizado para reproduzir dados experimentais para o tipo de moléculas aqui analisadas. Para verificar se o método AM1 é adequado para o cálculo das propriedades moleculares, tais como a EA e o μ , seria necessário realizar uma comparação com os dados experimentais. Contudo, estes dados são muito escassos para os compostos controle e até inexistentes para os metabólitos do carbendazim, o que dificulta uma boa caracterização por esta via.

⁵⁵ Dewar, M. J. S.; Zoebisch, E. G.; Healy, E. F.; Stewart, J. J. P. *J. Am. Chem. Soc.* v. 107, p. 3902, 1985.

Assim, para uma comparação com os cálculos AM1, realizamos também cálculos utilizando a Teoria do Funcional da Densidade (DFT) com o funcional puro BLYP, que combina o funcional de troca proposto por Becke⁵⁶ para correção da energia com o funcional de correlação desenvolvido por Lee, Yang e Parr⁵⁷.

Em 1964, Hohenberg e Kohn demonstraram que a energia exata de um sistema de muitos corpos no estado fundamental não-degenerado pode ser determinada por sua densidade eletrônica ρ , ao invés da função de onda ψ ^{47,50}. Assim, a energia exata de uma molécula com n elétrons no estado fundamental é:

$$E[\rho] = E_K + E_{P;e,N} + E_{P;e,e} + E_{XC}[\rho] \quad (9)$$

onde E_K é a energia cinética total; $E_{P;e,N}$ é a energia potencial elétron-núcleo; $E_{P;e,e}$ é a energia potencial elétron-elétron; $E_{XC}[\rho]$ é a energia de troca-correlação e considera os efeitos devido ao *spin*. Os orbitais utilizados para construir a densidade eletrônica a partir de

$$\rho(r) = \sum_{i=1}^N |\psi_i(r)|^2 \quad (10)$$

são calculados pelas equações de Kohn-Sham, que são encontradas aplicando-se o princípio variacional à energia eletrônica:

$$\left\{ \underbrace{-\frac{\hbar^2}{2m_e} \nabla^2}_{\text{Energia cinética}} - \underbrace{\sum_{j=1}^N \frac{Z_j e^2}{4\pi\epsilon_0 r_{j1}}}_{\text{Atração elétron-núcleo}} + \underbrace{\int \frac{\rho(r_2) e^2}{4\pi\epsilon_0 r_{12}} dr_2}_{\text{repulsão elétron-elétron}} + \underbrace{V_{XC}(r_1)}_{\text{Potencial de troca-correlação}} \right\} \psi_i(r_1) = \epsilon_i \psi_i(r_1) \quad (11)$$

⁵⁶ Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* v. 98, p. 5648, 1993.

⁵⁷ Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. *Phys. Rev B.* v. 37, p. 785, 1988.

O potencial de troca–correlação V_{XC} é a derivada funcional da energia de troca–correlação:

$$V_{XC}[\rho] = \frac{\delta E_{XC}[\rho]}{\delta \rho} \quad (12)$$

Para verificar a forma da densidade eletrônica, utiliza-se uma superposição de densidades eletrônicas atômicas. V_{XC} é calculado admitindo-se a dependência entre a E_{XC} e a ρ , utilizando-se a aproximação da densidade local (*Local Density Approximation*, LDA):

$$E_{XC}[\rho] = \int \rho(r) \varepsilon_{XC}[\rho(r)] dr \quad (13)$$

Em que ε_{XC} é a energia de troca–correlação por elétron num gás homogêneo de densidade constante. Em seguida, as equações de Kohn–Sham são resolvidas.

Com o exposto, fica claro que a energia é uma função da densidade eletrônica, isto é, $E[\rho]$ e esta depende da posição r , ou seja, $\rho(r)$. Uma função de uma função é chamada, no jargão matemático, de funcional, por isso essa teoria é conhecida como Teoria do Funcional da Densidade (DFT).

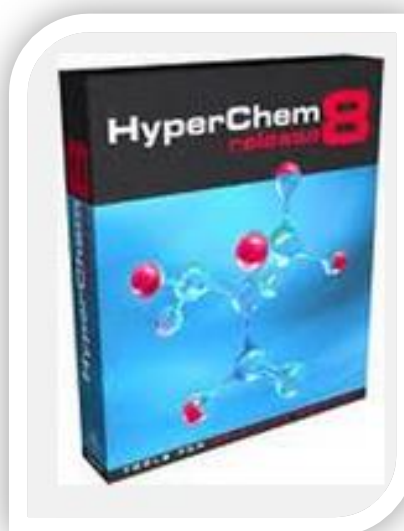
O conjunto de funções de base utilizado para cálculos DFT foi o 6–311++G(d,p). Nesta função, o primeiro número indica o número de primitivas gaussianas usadas na contração para representar orbitais atômicos de camada interna (caroço). O número seis (6) indica que existe uma função de base do tipo s contraídas por seis (6) funções gaussianas contraídas. Os números depois do hífen indicam o número de primitivas usadas para os orbitais atômicos de valência. Assim, os três números (311) indica que existem três funções de base do tipo p contraídas por três/uma/uma funções gaussianas contraídas.

O símbolo (++) indica que funções difusas foram adicionadas ao conjunto, permitindo assim corrigir eventuais distorções para as moléculas aniônicas, as quais têm elevada distribuição de densidade eletrônica. As funções difusas são do tipo *s* e do tipo *p* nos átomos diferentes do hidrogênio e para o hidrogênio a função difusa do tipo *s*. A representação: (*d,p*), indica que funções de polarização, tipo *d* e *p* foram adicionadas na função de base utilizada nos cálculos computacionais. Estas funções, quando empregadas, produzem melhores resultados para as geometrias moleculares e frequências vibracionais calculadas⁵⁸.

Veremos que ambos os níveis de cálculos, AM1 e DFT, levaram a resultados semelhantes na análise da carcinogenicidade do carbendazim e seus metabólitos. Tal concordância é uma indicação a favor da confiabilidade dos cálculos químico-quânticos aqui realizados.

⁵⁸ Szabo, A.; Ostlund, N. S. *Modern quantum chemistry: introduction to advanced electronic structure theory*. Dover: New York, 1996.

Programas Computacionais



ALOGPS 2.1

3.5 Programas computacionais

Nesta seção, descreveremos brevemente os *softwares* computacionais utilizados na elaboração das estruturas moleculares, dos cálculos computacionais e estatísticos matemáticos. Através dos resultados obtidos por estes programas realizamos a análise do estudo investigado.

3.5.1 Hyperchem

O Hyperchem 8.0.3 é um programa de fácil manipulação para a construção de moléculas, realização de cálculos e visualização de resultados, combina um ambiente de visualização agradável com métodos de química teórica, os quais estão implementados no mesmo. Ele foi criado pela empresa Hypercube e, por enquanto, pode ser utilizado apenas nos sistemas operacionais Windows e Mac. Possui os métodos: *ab initio*, semi-empírico, DFT e mecânica molecular implementados em seu pacote computacional.

3.5.2 Gaussian

O Gaussian 09W é a versão mais recente do Gaussian. É um programa de estrutura eletrônica, usada por químicos, engenheiros químicos, bioquímicos, físicos e outros cientistas. A partir das leis fundamentais da mecânica quântica, Gaussian 09 prevê as energias, estruturas moleculares, frequências vibratórias e propriedades moleculares de moléculas e reações em uma ampla variedade de ambientes químicos. Podem ser executados cálculos utilizando métodos de mecânica molecular, semi-empíricos, *ab initio* HF e DFT em várias plataformas. Os modelos do Gaussian 09 podem ser aplicados a ambas as espécies e compostos que são difíceis ou impossíveis de se observar experimentalmente. Este programa usa funções atômicas do tipo gaussianas.

3.5.3 Gaussview

O GaussView 5.0.8 é a interface visual para Gaussian 09. Permite construir geometrias de entrada, enviar otimizações de geometria, e analisar os resultados dos cálculos gaussianos. Podemos visualizar com esse programa os orbitais moleculares, superfície de densidade eletrônica a partir de qualquer densidade calculada, superfície potencial eletrostática, superfície de propriedades magnéticas, cargas atômicas, momentos dipolo, animações dos modos normais correspondentes às frequências vibratórias, espectros, informação estereoquímica molecular, etc.

3.5.4 Statistica

O Statistica 8.0 é um programa utilizado para realização de cálculos matemáticos de estatística. Possibilita a realização de uma análise mais refinada do problema estudado. É uma ferramenta bastante abrangente, pois fornece análise, gerenciamento e visualização de processo de dados. Algumas das principais funções oferecidas pelo programa são: estatística descritiva, análise de dados exploratória, correlações, probabilidade, análise de resposta múltipla, métodos de regressão múltipla e estatística não-paramétrica. Pode ser utilizado apenas em ambiente Windows e Mac.

3.5.5 ALOGPS

O ALOGPS 2.1 é um programa utilizado para calcular o logaritmo do coeficiente de partição (LogP). Esse parâmetro descreve a solubilidade do composto em meio lipídico e em meio aquoso. O programa se encontra disponível no link: <http://www.vcclab.org/lab/alogps/>

3.5.6 Computadores utilizados

Os cálculos AM1 foram efetuados com o *software* Gaussian 09⁵⁹ através de uma máquina MS Windows 8 Pro 64-bit, processador Intel Core 2 Duo, CPU T5800 2.00GHz, memória 3,0GB RAM, com HD sata de 160GB. Já os cálculos computacionais DFT foram efetuados com o *software* Gaussian 09 implementado no CENAPAD-PE.

⁵⁹ Frisch, M. J., et al, *GAUSSIAN-09, Revision D.01*, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.

Análise Estatística



ACP

3.6 Análise de Componentes Principais (ACP)

A partir de cálculos químico-quânticos de orbitais moleculares, selecionamos um conjunto de descritores para realizar um estudo estatístico visando caracterizar a atividade carcinogênica dos compostos aqui investigados. Através de um tratamento estatístico multivariado com Análise de Componentes Principais (ACP), foi possível correlacionar os descritores eletrônicos com o potencial cancerígeno. A ACP é uma técnica estatística que permite interpretar a estrutura de um conjunto de dados diversos a partir das respectivas matrizes de variâncias-covariâncias ou de correlações entre os parâmetros considerados⁶⁰. Matematicamente, a ACP consiste no cálculo dos autovalores e correspondentes autovetores de uma matriz de variâncias-covariâncias ou de uma matriz de coeficientes de correlação entre variáveis. Os cálculos matemáticos são realizados a partir de uma transformação linear de todas as variáveis originais em novas variáveis, de tal maneira que a primeira nova variável computada seja responsável pela maior parte da variação possível existente no conjunto de dados, a segunda pela maior variação possível restante, e assim por diante até que toda a variação do conjunto tenha sido explicada⁶⁰.

Portanto, a ACP é considerada como uma técnica de transformação de variáveis. Corresponde a uma fatoração da matriz X de dados originais com “n” carcinógenos e “p” descritores. Este procedimento requer a diagonalização da matriz de covariância X^tX , onde X^t é a transposta da matriz X . Os elementos dos autovetores, que na ACP são chamados de pesos, representam a contribuição com que cada um dos eixos originais entra na composição dos novos eixos, chamados de componentes principais⁶⁰. Os autovalores representam a quantidade de variância original explicada pelos respectivos autovetores.

⁶⁰ Análise Multivariada da Teoria a Prática. Disponível em: <<http://w3.ufsm.br/adriano/livro/Caderno%20dedatico%20multivariada%20-%20LIVRO%20FINAL%201.pdf>>, acessada em Julho 2013.

Metodologicamente, a ACP procura rotacionar os eixos originais para a obtenção de um novo conjunto de eixos de menor dimensão que concentre o máximo das informações. A expectativa é que os novos eixos apresente um certo padrão que permite relacionar esses descritores com a propriedade estudada. A primeira componente principal (PC1) descreve o eixo de maior variância, sendo neste eixo onde os pontos se encontram mais espalhados. A segunda componente principal (PC2), ortogonal a PC1, representa o segundo eixo de maior variância residual. Na figura gerada pela projeção dos n objetos nas PC'S espera-se encontrar certo padrão que permite relacionar esses descritores com a propriedade estudada⁶⁰.

As componentes principais vão ser escritas como uma combinação linear das antigas variáveis, sendo os *loadings* os pesos que cada variável tem para uma determinada componente principal e os *scores* as coordenadas que cada objeto possui ao longo de cada componente principal. É dada a Equação 14:

$$t_1 = X_a l_1, \quad t_2 = X_a l_2, \dots \quad (14)$$

Onde t_i são os scores para i -ésima componente principal, X_a é a matriz autoescalada (pré-processamento) que deixa as variáveis todas adimensionais e dentro de um mesmo intervalo de dados e l_i são os loadings de cada variável em relação à i -ésima componente principal.

Existem vários modelos estatísticos que descrevem bem o potencial carcinogênico de compostos químicos. Contudo, a maioria destes métodos leva em consideração semelhanças entre as estruturas das moléculas investigadas, como por exemplo, nos estudos de QSAR.

Na análise ACP é possível estabelecer uma relação entre determinados descritores com a propriedade que se deseja avaliar. Portanto, é possível definir quais os descritores que mais influenciam na propriedade que se quer determinar. Os parâmetros selecionados para a ACP

foram: afinidade eletrônica adiabática (EA), energia de interação carcinógeno–DNA (ΔE_{L-H}), atração eletrostática carcinógeno–DNA (Δq), momento de dipolo elétrico (μ) e logaritmo do coeficiente de partição (LogP). Veremos no próximo capítulo que os cálculos e gráficos da ACP, obtidos através do *software* computacional STATISTICA 8.0 para um total de 21 compostos estudados, incluindo o carbendazim, seus metabólitos e os compostos controle, separou de forma clara os não–carcinogênicos, carcinogênicos e protetores.

CAPÍTULO 4



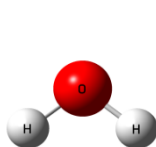
Fonte: <http://www.oregonal.com.br/Images/Noticia/Thumb/fundecitrus-carbendazim1-copia-24032012.jpg>

RESULTADOS E DISCUSSÕES

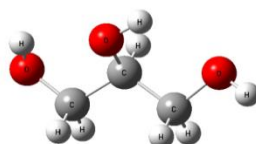
4.1 Avaliação dos descritores eletrônicos: Compostos–Controle

O potencial carcinogênico do carbendazim e seus metabólitos foram avaliados a partir da Análise de Componentes Principais (ACP) de parâmetros eletrônicos obtidos por cálculos do tipo AM1 e DFT. Inicialmente, procurou-se fazer uma análise dos compostos controle: substâncias reconhecidamente não carcinogênicas (água, glicose e glicerol); carcinógenos conhecidos (benzopireno, tetracloreto de carbono, aflatoxina-B1, dimetilnitrosamina, 2-naftilamina e 2-acetilaminofluoreno); e substâncias protetoras antioxidantes (resveratrol, acetilsalicilato e ascorbato). As estruturas moleculares otimizadas (AM1) dos compostos controle podem ser observados na Figura 18(a e b).

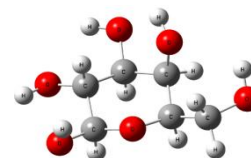
Não Carcinogênicas



Água

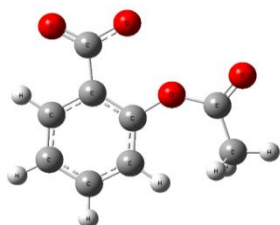


Glicerol

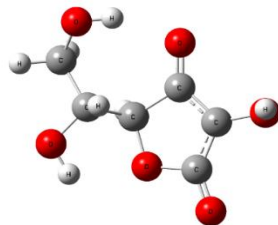


Glicose

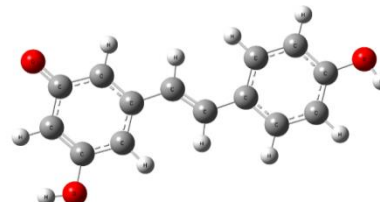
Protetores



Acetilsalicilato

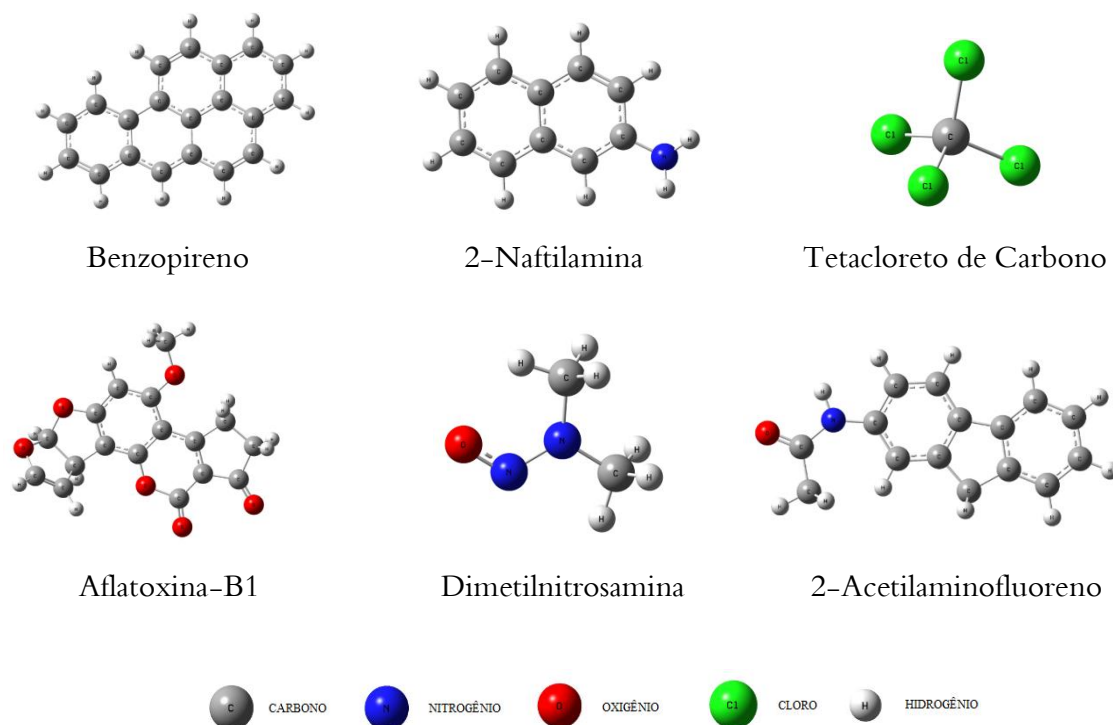


Ascorbato



Resveratrol-H

Figura 18a. Estruturas moleculares otimizadas (AM1) dos não-carcinógenos e protetores controle

Carcinogênicas**Figura 18b.** Estruturas moleculares otimizadas (AM1) dos carcinógenos–controle

Para uma substância ter atividade protetora ela deverá de alguma maneira interferir no processo de interação entre o agente carcinogênico e o DNA. Podemos imaginar uma substância protetora dentro de um processo de competição com o DNA para a doação do elétron a substância carcinogênica. Com isso aquela substância que conseguir mais facilmente doar o seu elétron deverá ganhar a competição. Em termos do modelo apresentado devemos observar que quanto mais próximo for a energia do HOMO e do LUMO, mais facilmente ocorrerá a reação de transferência do elétron. Assim, uma substância para ter característica protetora deverá possuir uma energia do HOMO maior que da guanina e próxima à energia do LUMO do agente carcinógeno.

Há muito tempo se tem discutido a possível atividade protetora do ácido ascórbico (vitamina C) e de seu metabólito (ascorbato). A utilização de grandes doses de vitamina C foi proposta nos trabalhos de Ewan Cameron e Linus Pauling⁶¹. Primeiramente, estes trabalhos mostraram que pacientes com câncer normalmente possuem uma quantidade de vitamina C no plasma sanguíneo e nos leucócitos do sangue bastante inferior à quantidade em pessoas saudáveis. A grande maioria dos estudos concentra-se na área do uso da vitamina C e de outras substâncias (betacaroteno, resveratrol, ácido acetilsalicílico) como agente de tratamento ao câncer já instalado.

É importante lembrar que em fluidos corporais, o ácido ascórbico está quase que completamente ionizado (vitaminaC-H) em íon ascorbato e o íon hidrogênio⁶¹. Um estudo prévio desenvolvido por Pavão e Leão já descreve com sucesso a atividade protetora de substâncias antioxidantes contra o câncer³⁹. Em confirmação foi observado em nossos resultados a partir de novos cálculos que a energia do HOMO do íon ascorbato se encontra bem mais próximo ao LUMO do agente carcinógeno do que o HOMO do DNA. Esta maior proximidade deverá favorecer a reação de transferência de elétron do íon ascorbato para o carcinógeno. Assim a atividade protetora da vitamina C está associada ao íon ascorbato presente no organismo. O mesmo comportamento como atividade protetora em nosso trabalho foi a utilização do resveratrol na sua forma ionizada (Resveratrol-H) e o íon acetilsalicilato obtido da ionização do ácido acetilsalicílico (AAS-H). Os parâmetros eletrônicos dos compostos controle por meio de cálculos AM1 podem ser observados na Tabela 4.

⁶¹ Pauling, L. *Como viver mais e melhor*. Best Seller: São Paulo, 1988.

Tabela 4. Parâmetros eletrônicos AM1 e LogP dos compostos controle

Composto	Símbolo	EA (eV)	ΔE_{L-H} (eV)*	μ (D)	Δq (e)	LogP
Água	a	-4,250	13,099	1,860	-0,130	-1,380
Glicerol	b	-2,383	11,594	2,860	-0,097	-2,320
Glicose	c	-0,993	10,597	1,572	-0,094	-1,880
Acetilsalicilato	d	-3,190	12,410	12,730	0,700	1,264
Ascorbato	e	-4,390	13,570	13,293	0,680	-2,667
Resveratrol-H	f	-2,020	11,280	14,980	0,610	3,140
Benzopireno	g	1,773	7,569	0,037	0,309	5,930
2-Naftilamina	h	0,644	8,504	1,546	0,393	2,170
Tetracloro de carbono	i	1,444	7,462	0,000	0,405	2,860
Aflatoxina-B1	j	2,253	7,312	7,351	0,700	1,250
Dimetilnitrosamina	k	0,193	9,526	3,268	0,606	-0,640
2-acetilaminofluoreno	l	0,921	8,434	3,059	0,631	3,030

* Em relação ao HOMO (H) da guanina

De acordo com Elizabeth e James Miller, quanto mais eletrofílica for a substância, maior a atividade carcinogênica da mesma. E para isso ocorrer, deverá apresentar valor alto para a afinidade eletrônica (EA). Deste modo, a EA é definida como o descritor mais importante para a carcinogênese química³⁹. Os valores altos para a EA dos carcinógenos–controle mostram que estão em concordância com a proposta dos pesquisadores, que definiram a natureza eletrofílica dos carcinógenos químicos. Conforme observado na Tabela 4, as substâncias carcinogênicas (em vermelho) apresentam valores altos para a EA, enquanto que os não–carcinogênicos (em azul) e protetores (em verde) possuem valores baixos para a EA. De maneira que os baixos valores da EA dos protetores facilitam a doação de elétrons destes compostos para outras substâncias. Enquanto que os carcinógenos por ter valor alto para a EA possuem maior habilidade em receber elétrons. Com relação à energia de interação dos compostos–controle com o DNA, representado pelo gap (ΔE_{L-H}), quanto mais baixo o valor do ΔE_{L-H} , maior a interação entre as espécies reagentes. De acordo com os nossos resultados, os carcinógenos–controle apresentam valores baixos comparado aos valores dos compostos não carcinogênicos e

protetores controle, significando, portanto, que a interação entre o DNA e o carcinógeno será mais efetiva em comparação com os demais controles. A atração eletrostática (Δq) representa o possível sítio de interação entre as espécies reagentes, quanto maior o seu valor, maior a interação entre as espécies. Dentre os compostos controle os que apresentam valores mais altos são os carcinógenos. Os protetores também apresentam valores altos para Δq em função de sua natureza polar, bem como a facilidade de formar ligações de hidrogênio com o DNA. Isto também é explicado, pelo fato de que os protetores servirão para bloquear a chegada do carcinógeno ao DNA, impedindo que ocorra a doação de elétrons do DNA para o carcinógeno. O coeficiente de partição octanol/água (LogP) é utilizado para descrever a tendência preferencial do composto em se dissolver em uma fase ou em outra⁶². Ou seja, descreve a fração de solubilidade do composto nos meios apolar e polar, onde quanto maior for o seu valor, mais apolar será a substância. O comportamento dos compostos–controle foi o seguinte: obtemos valores altos do LogP para os carcinógenos–controle e baixos para os demais controle. Já o momento de dipolo elétrico (μ), que descreve a natureza da molécula em polar ou apolar, quanto menor for o seu valor, mais apolar será a substância. Portanto, como os carcinógenos–controle apresentam valores altos para o LogP e baixos para o μ , estes são de natureza apolar e mais solúveis em meios apolares. Já os compostos não carcinogênicos e protetores apresentam valores baixos para o LogP e altos para o μ , sendo estes de natureza polar e mais solúveis em meios polares. Com isso, fechamos a discussão dos parâmetros eletrônicos disponibilizados na Tabela 4 dos compostos controle que servirão como base para descrevermos os descritores eletrônicos dos compostos investigados neste trabalho.

⁶² Amott, J. A.; Kumar, R.; Planey, S. L. *J. Appl. Biopharm. Pharmacokinet.* v. 1, p. 31, 2013.

4.1.1 ACP dos Compostos–Controle

As propriedades eletrônicas dos compostos controle foram incluídas na ACP onde se encontra representada no gráfico da Figura 19. As substâncias com propriedades carcinogênicas, não carcinogênicas e protetores estão indicadas por símbolos (letras do alfabeto) conforme a Tabela 4. Na primeira componente principal (PC1) e na segunda componente principal (PC2) temos como resultado a combinação linear dos cinco descritores eletrônicos: EA, ΔE_{L-H} , μ , Δq e LogP.

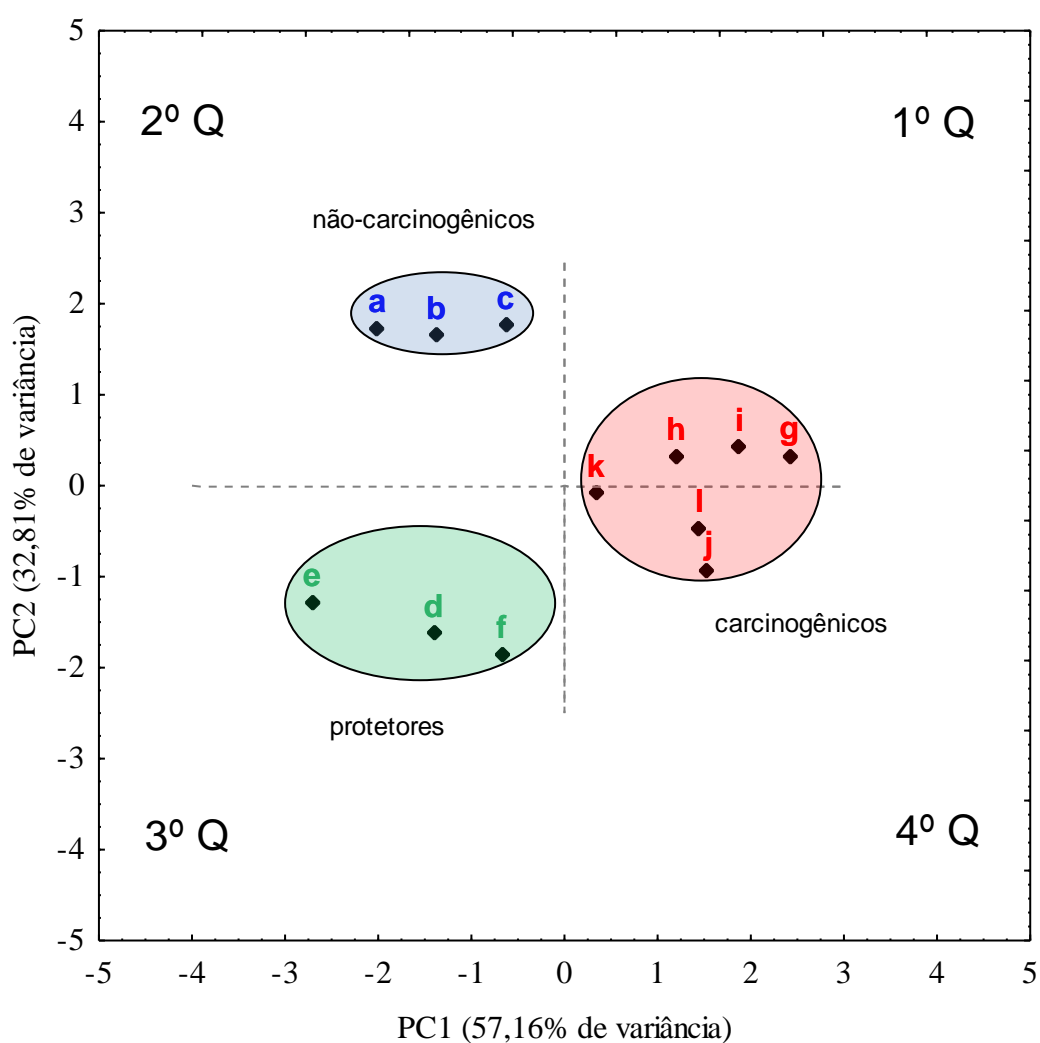


Figura 19: ACP dos parâmetros eletrônicos AM1 dos compostos controle. As letras correspondem aos compostos indicados na Tabela 4

A PC1 foi composta por 57,16% da variância total, enquanto a PC2 foi composta por 32,81% da variância total, totalizando para as duas componentes principais 89,97% da variância total.

As Equações 15 e 16 da PC1 e PC2 que permitem verificar as variáveis que mais contribuem para identificar o potencial carcinogênico dos compostos controle estão descritas abaixo.

$$\text{PC1} = + 0,78 \text{ LogP} - 0,98 \Delta E_{L-H} - 0,53 \mu + 0,97 \text{ EA} + 0,23 \Delta q \quad (15)$$

$$\text{PC2} = - 0,34 \text{ LogP} - 0,03 \Delta E_{L-H} - 0,82 \mu + 0,01 \text{ EA} - 0,93 \Delta q \quad (16)$$

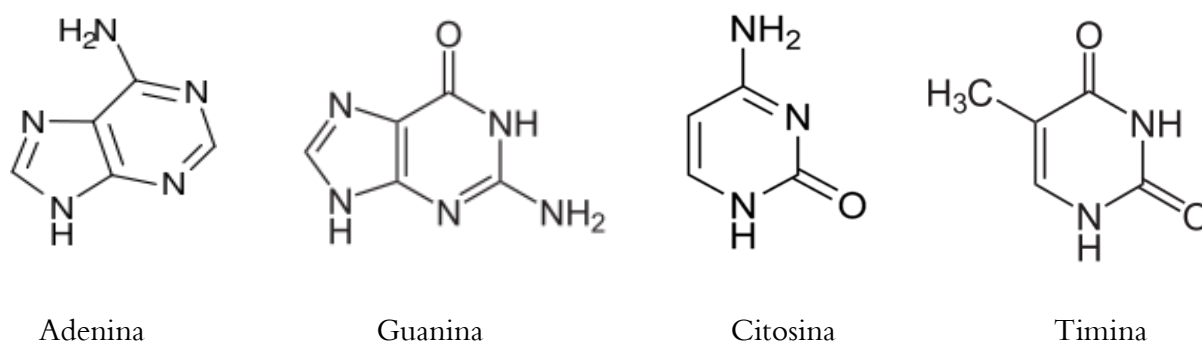
Na PC1 os descritores eletrônicos que mais colaboram para a separação das classes destes compostos são: EA, ΔE_{L-H} e LogP. Já na PC2, os descritores que mais colaboram são: μ e Δq para a separação das classes dos compostos. Analisando o agrupamento na Figura 19, verificamos que os compostos carcinogênicos encontram-se entre o primeiro e o quarto quadrantes da PC1 e PC2, de maneira que estes apresentam os valores mais altos para a EA e o LogP, e baixo para o ΔE_{L-H} . Já os compostos não-carcinogênicos e protetores encontram-se, respectivamente, no segundo e terceiro quadrantes da PC1 e PC2 apresentando valores mais altos para o ΔE_{L-H} e o μ . Para análise da PC2, destacaremos os descritores eletrônicos de maior relevância para a descrição dos compostos controle. No terceiro e quarto quadrantes da PC2 observamos valores mais altos para o μ e a Δq . Os carcinógenos-controle, *k*, *l*, *j*, estão posicionados no quarto quadrante e os protetores-controle, *e*, *d*, *f*, no terceiro, portanto, todos esses controles citados acima apresentam valores mais altos para o μ e a Δq .

Em resumo, os carcinógenos–controle possuem valores altos para EA, LogP e Δq , e baixo para o ΔE_{L-H} . Portanto, para que os compostos investigados neste trabalho venham a ser considerados como possíveis carcinógenos deverão apresentar o mesmo comportamento para os descritores eletrônicos dos carcinógenos–controle.

4.2 Análise das bases do DNA

De acordo com o modelo desenvolvido por Pavão e Leão^{26,39} acerca da interação entre os orbitais moleculares de fronteira das espécies químicas reagentes, HOMO (DNA) – LUMO (Carcinógeno), ressalta-se a ocorrência desta reação por meio da transferência de elétrons do HOMO do DNA para o LUMO do agente carcinógeno. A interação entre as espécies reagentes, DNA–carcinógeno, terá como preferência uma das bases do DNA. Por isso, se faz necessário um estudo sobre qual das bases apresenta maior disponibilidade para doar elétrons. Dentre as bases nucleotídicas, Adenina, Citosina, Timina, e Guanina, a que apresentar maior valor para o HOMO terá mais facilidade em doar elétrons.

Com os resultados obtidos através dos novos cálculos computacionais utilizando o método AM1, obtivemos a energia do HOMO e a energia de ionização (I) para as bases nitrogenadas (Adenina, Guanina, Citosina, Timina) com objetivo de avaliar qual destas bases apresentaria o menor valor para a I, ou seja, o maior valor para o HOMO. Estas características definirão qual destas bases nitrogenadas terá maior facilidade para doar elétrons. Na Figura 20 temos as estruturas das bases nitrogenadas avaliadas.

**Figura 20.** Bases nitrogenadas do DNA

De acordo com os resultados descritos na Tabela 5, notamos que dentre as bases nitrogenadas, a guanina é aquela que apresenta a maior energia para o HOMO. Utilizando o teorema de Koopmans⁶³ obtemos a I por meio da seguinte expressão, $I_{\text{Koopmans}} = -\text{HOMO}$. Conhecendo as energias do estado fundamental das moléculas neutras e dos seus respectivos cátions, ambas as estruturas com suas geometrias otimizadas, o potencial de ionização adiabático ($I_{\text{Adiabático}}$) foi calculado pela diferença entre as energias. De acordo com os valores de HOMO e I para todas as bases nitrogenadas, a guanina é a que apresenta o menor valor para a I , ou seja, maior valor para o HOMO. Fato que justifica a preferência dos carcinógenos para interagir com esta base, visto que a mesma doará elétrons mais facilmente³⁹.

Tabela 5. Energia de ionização e dos orbitais moleculares de fronteira para as bases do DNA utilizando o método AM1

Base DNA	HOMO (eV)	I (eV)	
		Koopmans	Adiabático
Adenina	-8,770	8,770	8,220
Citosina	-9,370	9,370	8,770
Timina	-9,610	9,610	8,900
Guanina	-8,680	8,680	7,890

⁶³ Reynolds, C. A.; Thomson, C. *J. Mol. Structure*. v. 149, p. 352, 1987.

Na Figura 21 mostramos o mapa do potencial eletrostático e a distribuição de cargas atômicas para as bases nitrogenadas do DNA com todas as suas geometrias otimizadas pelo método DFT.

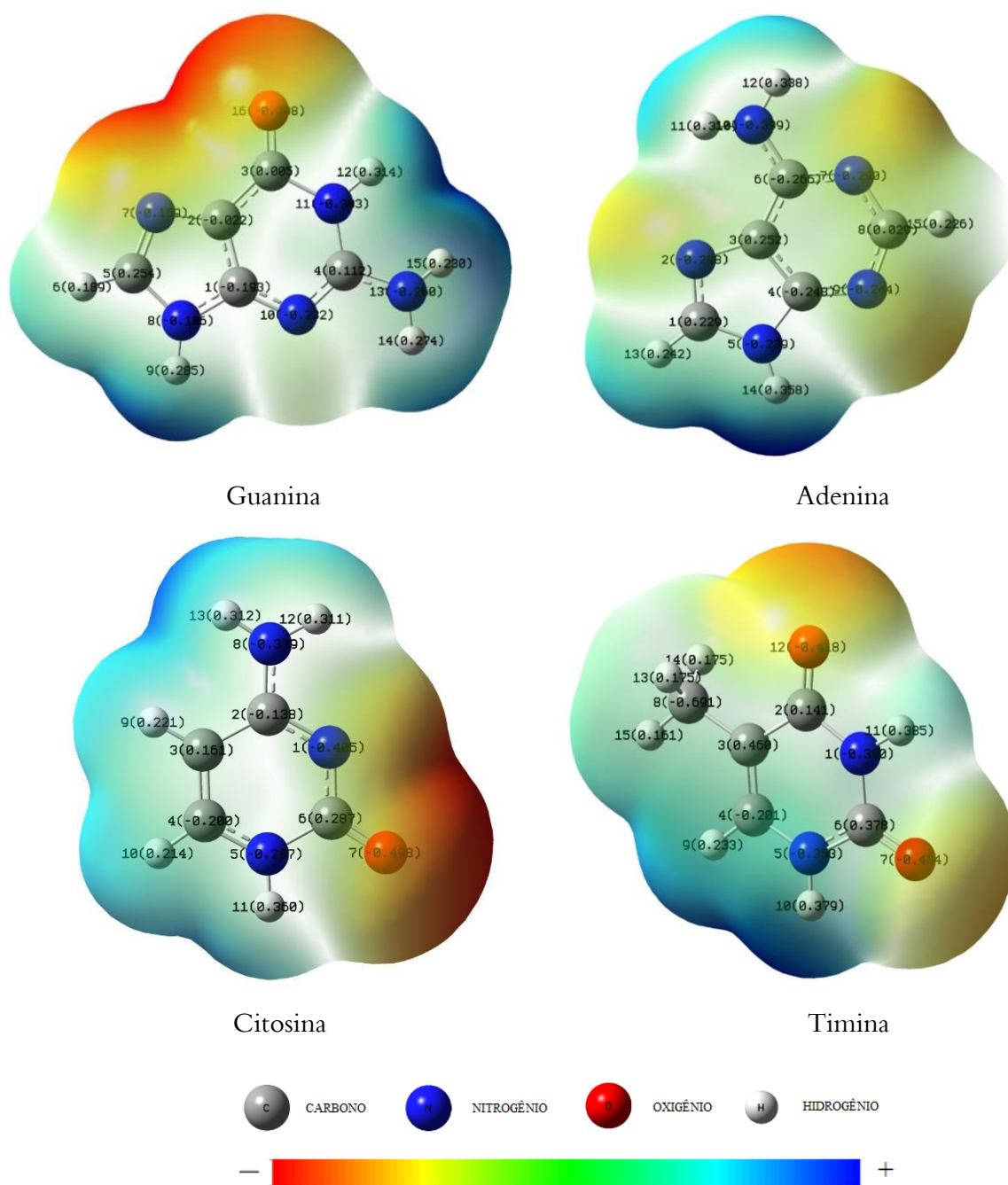


Figura 21. Mapa do potencial eletrostático e distribuição de cargas atômicas para as bases nitrogenadas do DNA com geometrias otimizadas (DFT). Azul indica a densidade de carga positiva e vermelho a negativa

A densidade de carga negativa na guanina é mais pronunciada entre o oxigênio (O16) e o nitrogênio (N7). Podemos observar que nossos resultados se confirmam com a proposta dos pesquisadores Pavão e Leão^{26,39}. Com base nos cálculos DFT, o oxigênio apresenta uma maior densidade eletrônica (com carga atômica de Mulliken -0,308), sendo, portanto o sítio provável da interação do carcinógeno, com a “quebra” da ligação do grupo carbonila. Enquanto que para os cálculos AM1, o oxigênio apresenta uma carga de Mulliken -0,321. Com relação a esta interação é importante observar as principais componentes da densidade eletrônica (ρ) do HOMO da guanina. A Figura 22 mostra o mapa de distribuição dos orbitais HOMO da Guanina e as componentes da ρ .

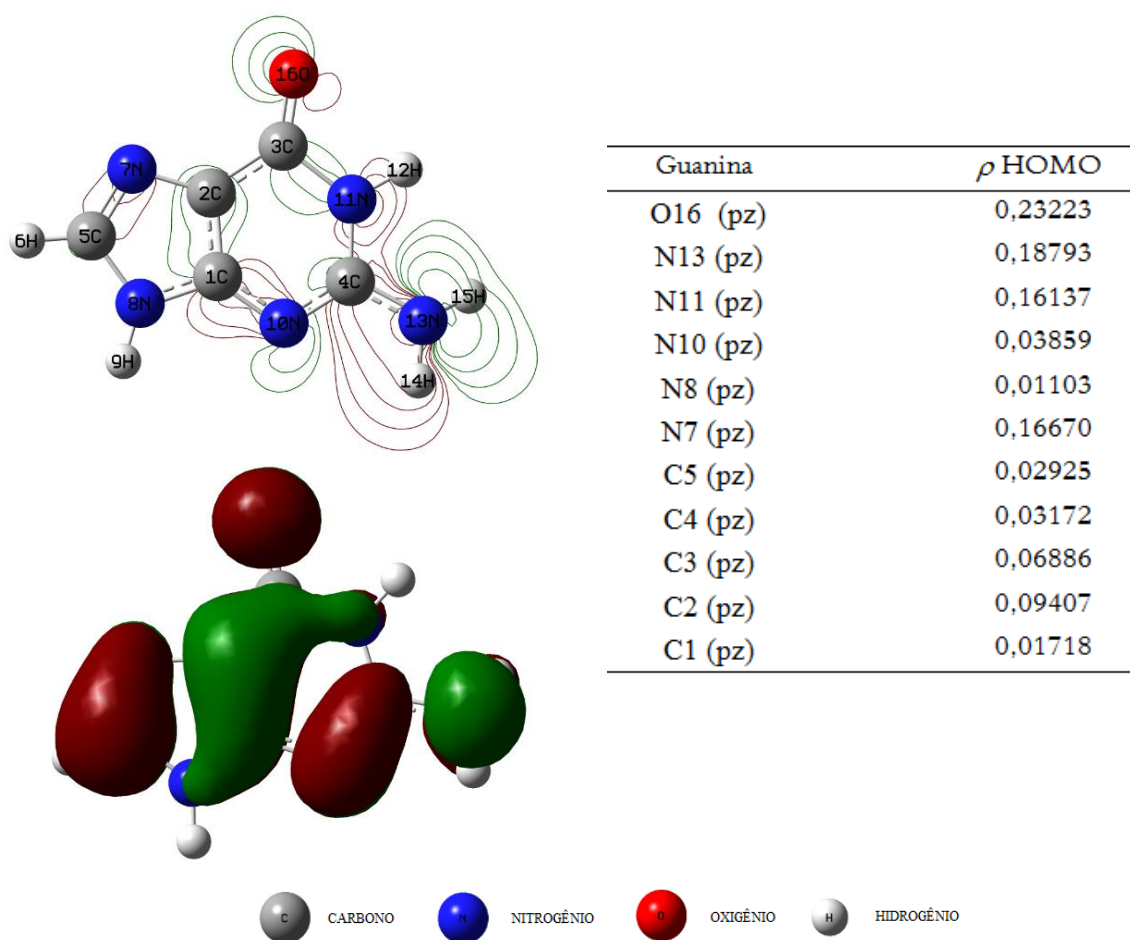


Figura 22. Mapa de distribuição dos orbitais HOMO da Guanina e componentes da ρ (DFT)

As maiores componentes de densidade eletrônica (ρ) do HOMO da guanina indicam a localização dos possíveis sítios nucleofílicos da molécula. O oxigênio (O16) da guanina para o orbital p_z é o sítio de interação em maior proporção para a ligação do carcinógeno.

4.3 Avaliação da carcinogenicidade: Carbendazim e Metabólitos

Na literatura, ainda são poucas as pesquisas que descrevem sobre a carcinogenicidade do fungicida carbendazim (MBC). Contudo, estudos em animais apontam que o MBC pode prejudicar o fígado (sistema hepático), afetar a produção de hormônios causando anomalias da diferenciação sexual e da reprodução (sistema endócrino), provocar alterações cromossômicas com anomalias do número de cromossomos nas células, tanto em testes *in vitro*, como *in vivo*, trazendo danos à molécula do DNA (efeitos mutagênicos) e perturbar o desenvolvimento embrionário ou fetal (efeitos teratogênicos/embriotoxicidade)⁶⁴. A mutação no DNA é uma alteração genética do processo de carcinogenicidade. Estudos recentes relatam que a toxicidade do MBC em ratos é capaz de afetar o aparelho reprodutor masculino com anomalias na formação dos espermatozoides, diminuição da fertilidade e atrofia testicular do epidídimo (toxicidade testicular reprodutiva)^{13,65}. Com base nos estudos descritos acima, resolvemos realizar uma análise estatística para avaliar a carcinogenicidade deste fungicida e seus metabólitos. Para início deste estudo mostraremos na Figura 23 as estruturas moleculares otimizadas (AM1) do carbendazim e seus metabólitos.

⁶⁴ Talal, A. Z.; Atef, M. A. *Riv. Eur. Sci. Med. Farmacol.* v. 15, p. 413, 2011.

⁶⁵ Hidetaka, M.; Toshihiko, Y.; Masatoshi, N.; Taijiro, O.; Kiminobu, G.; Nobuhiro, H.; Hajime, N. *Endocrinology.* v. 145, p. 1860, 2004.

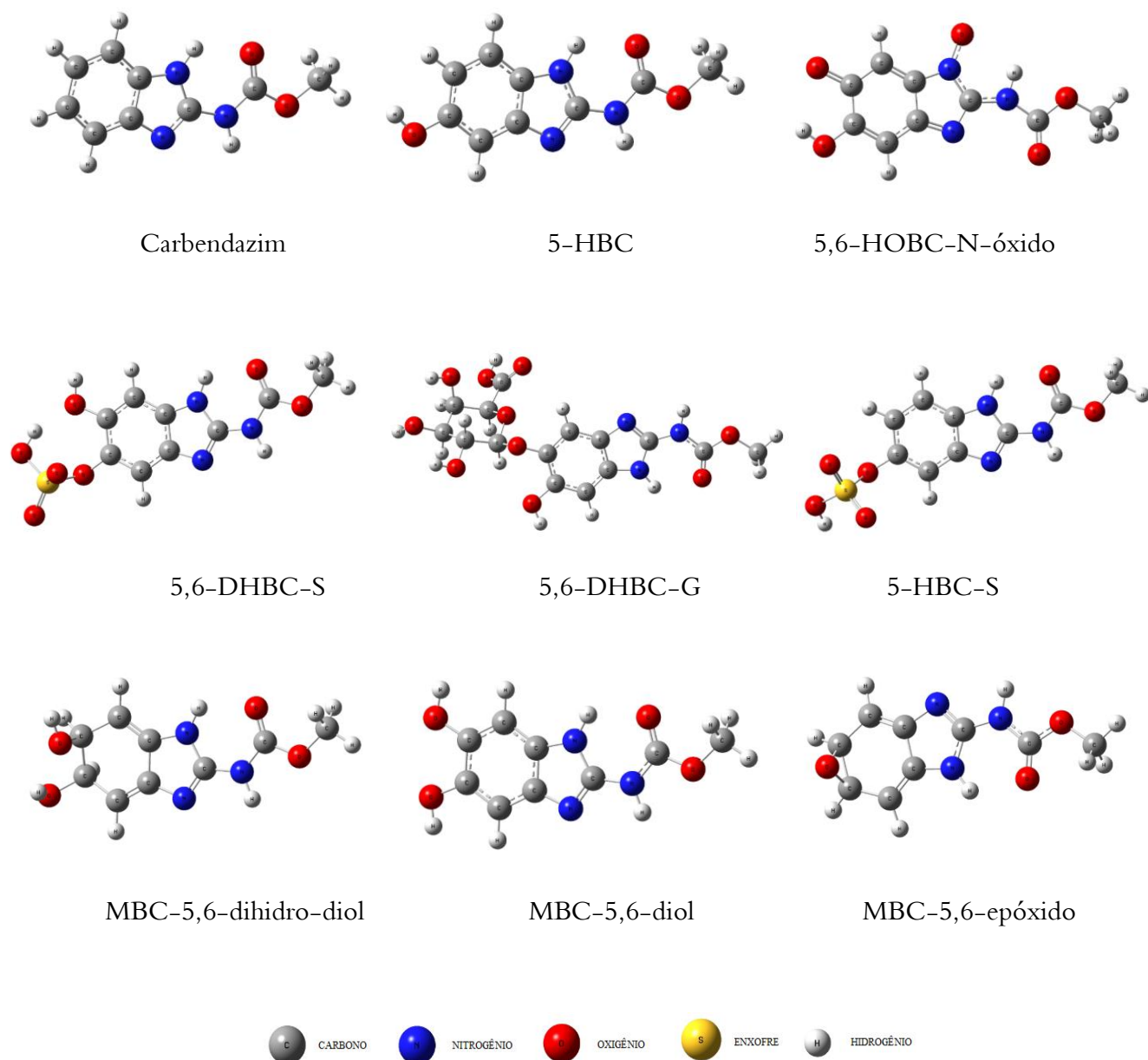


Figura 23. Estruturas moleculares otimizadas (AM1) do carbendazim e seus metabólitos

A Tabela 6 apresenta os parâmetros eletrônicos obtidos por cálculos AM1 para o carbendazim e seus metabólitos (em roxo).

Tabela 6. Parâmetros eletrônicos AM1 e LogP do carbendazim e seus metabólitos

Composto	Símbolo	EA (eV)	ΔE_{L-H} (eV) *	μ (D)	Δq (e)	LogP
Carbendazim	m	1,094	8,564	2,307	0,723	1,750
5-HBC	n	1,340	8,448	3,328	0,724	1,080
5,6-HOBC-N-óxido	o	3,916	5,836	3,244	0,713	-0,602
5,6-DHBC-S	p	2,636	7,639	3,338	0,715	-0,420
5,6-DHBC-G	q	1,644	8,214	6,631	0,725	-0,998
5-HBC-S	r	1,646	7,860	3,845	0,728	-0,510
MBC-5,6-dihidro-diol	s	1,737	7,769	3,512	0,727	-0,352
MBC-5,6-diol	t	1,386	8,432	2,605	0,723	0,780
MBC-5,6-epóxido	u	1,552	8,078	3,092	0,728	0,123

* Em relação ao HOMO (H) da guanina

As propriedades eletrônicas do carbendazim e metabólitos foram incluídas na ACP. De acordo com a Tabela 6, os descritores EA, LogP e Δq apresentaram valores altos, e baixo para o ΔE_{L-H} , semelhantemente aos valores obtidos para os carcinógenos–controle. Portanto, o carbendazim e metabólitos apresentam similaridade em relação aos carcinógenos–controle, sendo então avaliados como possíveis substâncias carcinogênicas. Pode ser visto na Tabela 6 que o carbendazim apresentou um maior valor para o LogP, tendo uma correlação inversa com o μ .

4.3.1 ACP do Carbendazim e Metabólitos

A Figura 24 representa a ACP do carbendazim e metabólitos. Estes compostos estão indicados por símbolos (letras do alfabeto) conforme a Tabela 6. Na PC1 e PC2 temos como resultado a combinação linear dos cinco descritores eletrônicos: EA, ΔE_{L-H} , μ , Δq e LogP. A PC1 foi composta por 53,39% da variância total, enquanto a PC2 por 27,14% da variância total,

totalizando para as duas componentes principais 80,53% da variância total.

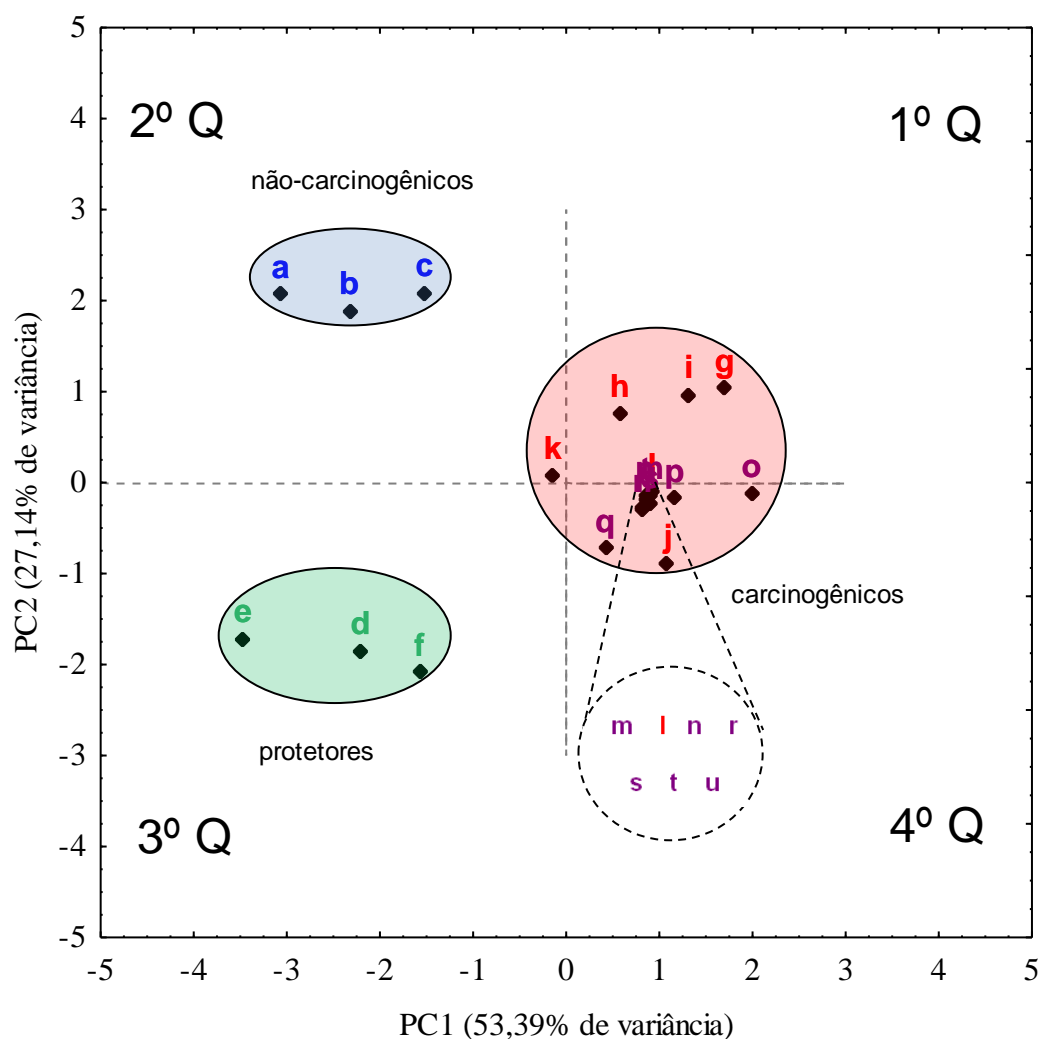


Figura 24. ACP dos descritores eletrônicos AM1 do carbendazim e seus metabólitos. As letras correspondem aos compostos indicados na Tabela 4 e 6

As Equações 17 e 18 da PC1 e PC2, descritas abaixo, permitem verificar quais são os descritores eletrônicos que mais contribuem para identificar o potencial carcinogênico dos compostos investigados.

$$PC1 = + 0,49 \text{ LogP} - 0,98 \Delta E_{L-H} - 0,52 \mu + 0,97 \text{ EA} + 0,49 \Delta q \quad (17)$$

$$PC2 = - 0,12 \text{ LogP} - 0,03 \Delta E_{L-H} - 0,82 \mu - 0,00 \text{ EA} - 0,82 \Delta q \quad (18)$$

Na PC1 os descritores eletrônicos que mais contribuem para classificação do potencial carcinogênico do carbendazim e metabólitos são: EA, ΔE_{L-H} e μ . Os descritores da PC2, μ e Δq , ambos colaboram com valores altos para a classificação do carbendazim e metabólitos como possíveis carcinógenos. Analisando o agrupamento dos compostos investigados na Figura 24, verificamos que o carbendazim (*m*) e seus metabólitos assemelham-se aos carcinógenos–controle. Estando os compostos situados entre o primeiro e o quarto quadrantes da PC1 e PC2, estes são os que possuem valores mais altos para a EA, e baixos valores para o ΔE_{L-H} e o μ . No quarto quadrante da PC2, encontramos o carbendazim (*m*) mais agrupado com os metabólitos, *n*, *r*, *s*, *t*, *u*, onde todos eles possuem valores altos para o μ e a Δq . O carbendazim e os metabólitos são mais semelhantes aos carcinógenos–controle 2-acetilaminofluoreno (*h*) e aflatoxina–B1 (*j*). Em especial, o carbendazim e os metabólitos *n*, *r*, *s*, *t*, *u* são mais semelhantes ao carcinógeno–controle *l*.

4.3.2 ACP: DFT do Carbendazim e Metabólitos

Para um estudo comparativo realizamos a ACP do carbendazim e metabólitos a partir de cálculos DFT, sendo visualizada no gráfico da Figura 25. Na PC1 e PC2 temos como resultado a combinação linear dos cinco descritores eletrônicos: EA, ΔE_{L-H} , μ , Δq e LogP. A PC1 explica 50,14% da variância total, enquanto a PC2 descreve 29,32% da variância total, totalizando para as duas componentes principais 79,46% da variância total.

As Equações 19 e 20 da PC1 e PC2, descritas a seguir, permitem verificar as variáveis que mais contribuem para identificar o potencial carcinogênico dos compostos investigados.

$$\text{PC1} = +0,45 \text{ LogP} - 0,97 \Delta E_{\text{L-H}} - 0,64 \mu + 0,94 \text{ EA} + 0,28 \Delta q \quad (19)$$

$$\text{PC2} = -0,15 \text{ LogP} - 0,05 \Delta E_{\text{L-H}} - 0,73 \mu - 0,20 \text{ EA} - 0,93 \Delta q \quad (20)$$

Na PC1 os descritores eletrônicos que mais contribuem para a classificação do potencial carcinogênico do carbendazim e metabólitos são: EA, $\Delta E_{\text{L-H}}$, e μ . Os descritores da PC2, μ e Δq , colaboram com valores mais altos para a classificação do carbendazim e metabólitos como possíveis carcinógenos.

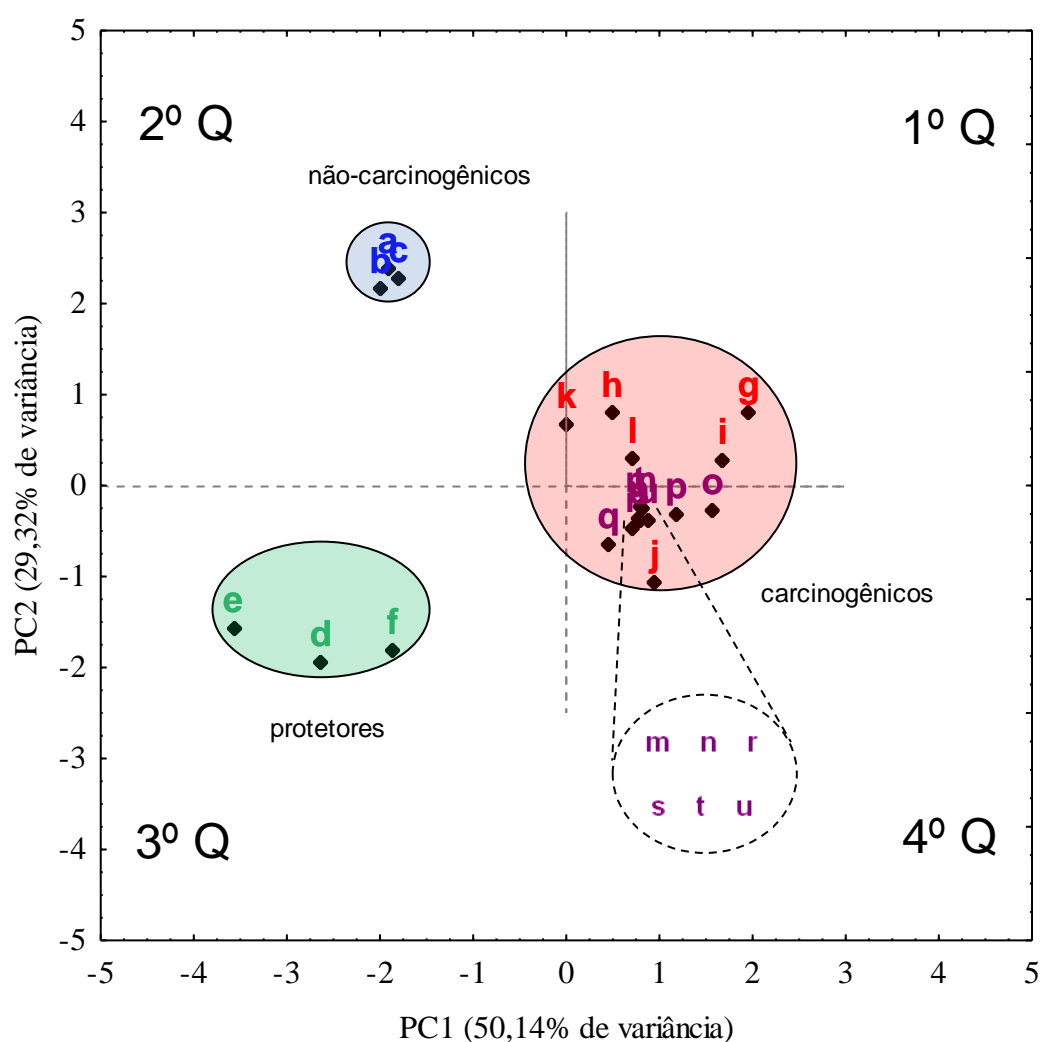


Figura 25. ACP dos descritores eletrônicos DFT do carbendazim e seus metabólitos

Analisando o agrupamento dos compostos investigados na Figura 25, verificamos que o carbendazim (*m*) e seus metabólitos assemelham-se aos carcinógenos–controle. Estando estes compostos situados entre o primeiro e o quarto quadrantes da PC1 e PC2, estes são os que possuem valores mais altos para a EA, e baixos valores para o ΔE_{L-H} e o μ . Analisando o primeiro e quarto quadrantes da PC1 e PC2, verificamos que o carbendazim (*m*) e os metabólitos, *n*, *r*, *s*, *t*, *u*, estão agrupados entre os carcinógenos–controle 2-acetilaminofluoreno (*h*) e a aflatoxina–B1 (*j*).

4.3.3 ACP: AM1 x DFT do Carbendazim e Metabólitos

As equações 17, 18, 19 e 20 geradas a partir dos parâmetros eletrônicos calculados pelos métodos AM1 e DFT apresentaram o mesmo padrão com relação à classificação do potencial carcinogênico dos compostos investigados neste trabalho. Os resultados da ACP utilizando dados dos cálculos AM1 (Figura 24), semelhantemente aos resultados DFT (Figura 25), agruparam o carbendazim e metabólitos à classe dos carcinógenos–controle. A variância total para as duas componentes principais no AM1 é de 80,53%, muito próxima do valor obtido para os cálculos DFT (79,46%), explicitando claramente a correlação entre os descritores da carcinogenicidade do carbendazim e metabólitos. Tal como no resultado AM1, com DFT a resposta da PC1 fornece maior peso para a EA, o ΔE_{L-H} e o μ , e a PC2 para o μ e a Δq , classificando desta forma claramente a atividade carcinogênica dos compostos investigados.

Assim concluímos que os resultados descritos na ACP pelos métodos AM1 e DFT para o carbendazim e seus metabólitos com os carcinógenos–controle são compatíveis entre si, visto que os mesmos estão bem agrupados nos gráficos das Figuras 24 e 25. Portanto, os parâmetros eletrônicos para os carbendazim e metabólitos apresentam similaridade aos carcinógenos

conhecidos. Assim mostramos a importância dos resultados obtidos neste estudo para uma política de saúde pública baseada no princípio da precaução.

4.4 Avaliação da carcinogenicidade: Fungicidas

Estimulado pelo resultado do Carbendazim, resolvemos ampliar este estudo para outros fungicidas utilizados na fruticultura brasileira. As estruturas moleculares otimizadas (AM1) dos fungicidas selecionados podem ser observados na Figura 26.

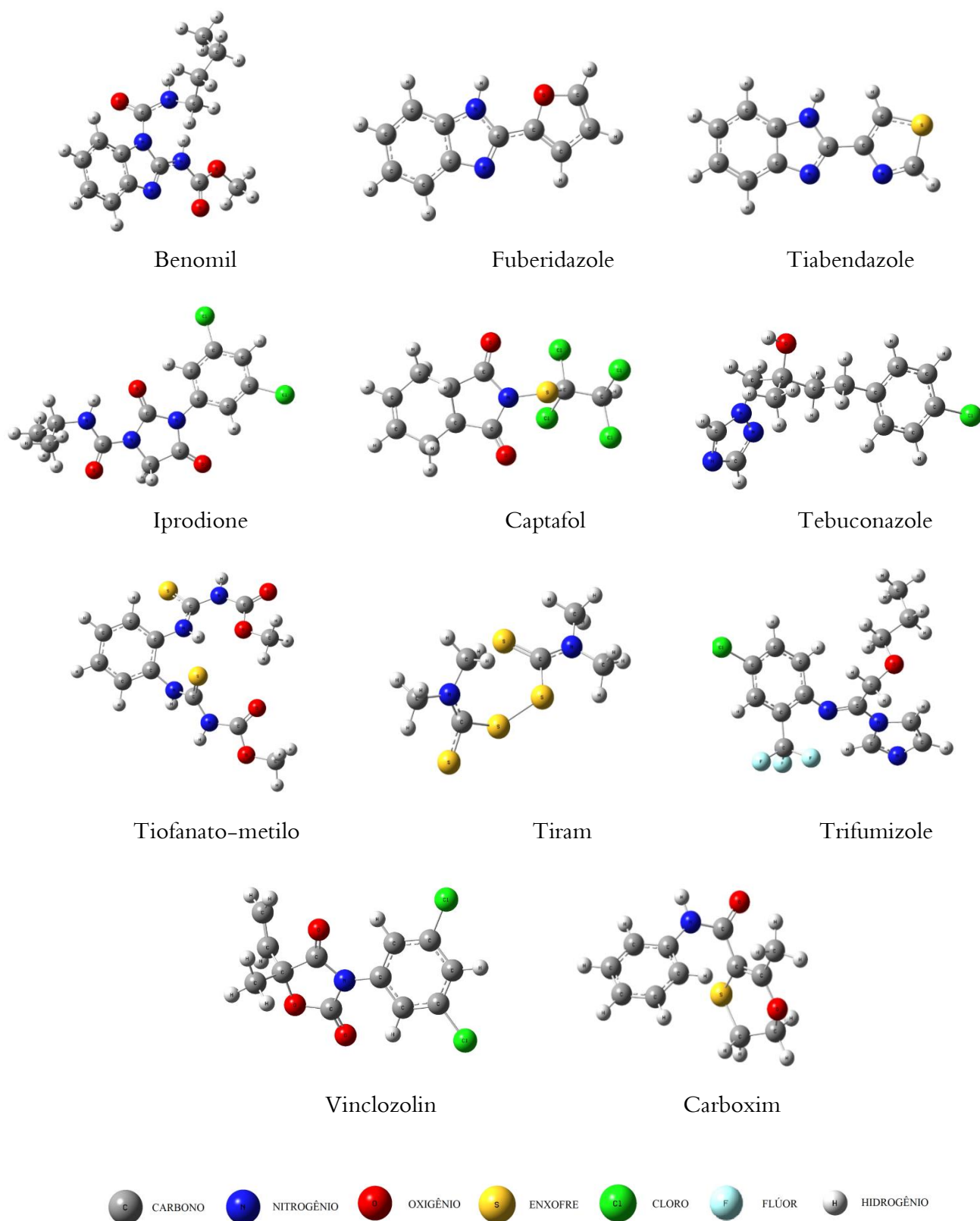


Figura 26. Estruturas moleculares otimizadas (AM1) dos fungicidas

Na Tabela 7 estão descritas as propriedades eletrônicas de outros fungicidas (em laranja) avaliados neste trabalho utilizando o método AM1.

Tabela 7. Parâmetros eletrônicos AM1 e LogP do carbendazim e fungicidas

Substância	Símbolo	EA (eV)	ΔE_{H-L} (eV)*	μ (D)	Δq (e)	LogP
Carbendazim	m	1,094	8,564	2,307	0,723	1,750
Iprodione	Ipr	1,725	8,227	2,322	0,747	2,800
Captafol	Cap	2,218	7,828	4,777	0,626	2,400
Tebuconazole	Teb	0,547	8,817	3,647	0,387	2,350
Tiofanato-metilo	Tio	2,496	7,756	7,194	0,738	1,160
Tiram	Tir	3,491	7,275	3,642	0,234	1,750
Triflumizole	Tri	2,259	7,626	6,194	0,797	4,660
Vinclozolin	Vin	1,386	8,198	2,987	0,722	3,190
Tiabendazole	Tia	1,583	7,878	4,769	0,396	2,470
Fuberidazole	Fub	1,366	8,160	2,688	0,398	2,670
Benomil	Ben	1,675	8,294	5,208	0,729	2,410
Carboxim	Car	0,983	8,745	3,339	0,699	3,000

* Em relação ao HOMO (H) da guanina

4.4.1 ACP dos Fungicidas

As propriedades eletrônicas dos fungicidas foram incluídas na ACP. Os fungicidas estão indicados por abreviaturas de seus nomes conforme a Tabela 7. No gráfico da Figura 27, temos na PC1 e PC2 o resultado da combinação linear dos cinco descritores eletrônicos: EA, ΔE_{L-H} , μ , Δq e LogP. A PC1 foi composta por 58,35% da variância total, enquanto a PC2 foi composta por 29,45% da variância total, totalizando para as duas componentes principais 87,80% da variância total. As Equações 21 e 22 da PC1 e PC2, descritas a seguir, permitem verificar quais são os descritores eletrônicos que mais contribuem para identificar o potencial carcinogênico dos fungicidas.

$$\text{PC1} = +0,82 \text{ LogP} - 0,97 \Delta E_{\text{L-H}} - 0,43 \mu + 0,96 \text{ EA} + 0,44 \Delta q \quad (21)$$

$$\text{PC2} = -0,22 \text{ LogP} - 0,11 \Delta E_{\text{L-H}} - 0,85 \mu + 0,08 \text{ EA} - 0,83 \Delta q \quad (22)$$

Na PC1 os descritores eletrônicos que mais contribuem para a classificação do potencial carcinogênico dos fungicidas são: EA, $\Delta E_{\text{L-H}}$ e LogP. Os descritores da PC2, μ e Δq , colaboram com valores mais altos para a classificação do potencial carcinogênico dos fungicidas.

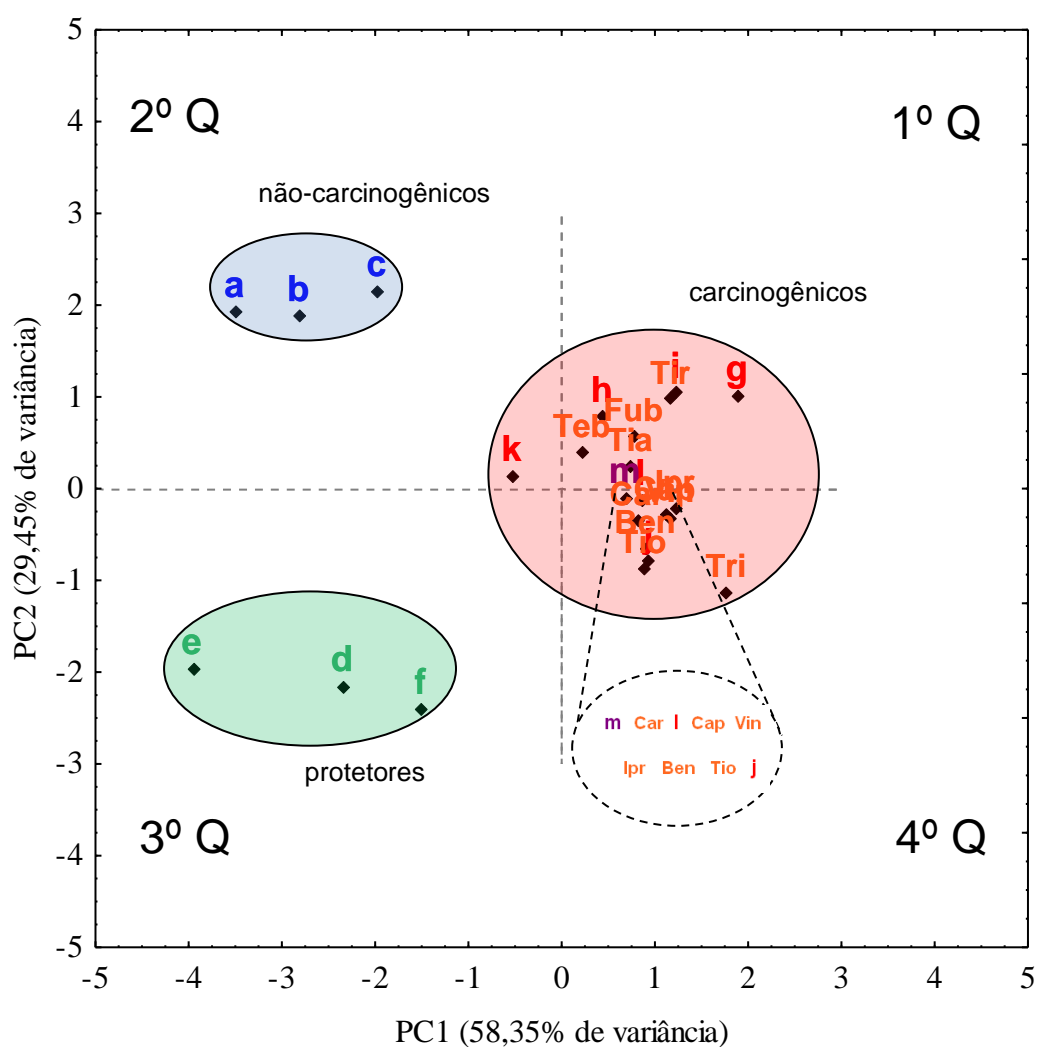


Figura 27. ACP dos descritores eletrônicos AM1 do carbendazim e fungicidas. As letras e abreviaturas correspondem aos compostos indicados na Tabela 4 e 7

Analisando o agrupamento dos fungicidas na Figura 27, verificamos que os mesmos assemelham-se aos carcinógenos–controle. Os fungicidas situados entre o primeiro e o quarto quadrantes da PC1 e PC2, são os que possuem valores mais altos para a EA e o LogP, e baixo valor para o ΔE_{L-H} . No quarto quadrante da PC2, encontramos o carbendazim (*m*) mais agrupado aos fungicidas, *Car*, *Cap*, *Vin*, *Ipr*, *Ben*, *Tio*, onde todos eles têm valores altos para o μ e a Δq . Os fungicidas e o carbendazim são mais semelhantes aos carcinógenos–controle 2-acetilaminofluoreno (*h*), aflatoxina-B1 (*j*) e tetracloreto de carbono (*i*).

A partir destes resultados chegamos à conclusão que os fungicidas têm parâmetros próximos aos carcinógenos–controle e, portanto, podem ser classificados como potencialmente cancerígenos com base no modelo de interação carcinógeno–DNA desenvolvido por Pavão e Leão.

4.4.2 ACP dos Fungicidas, Carbendazim e seus Metabólitos

Finalizaremos o nosso trabalho de pesquisa com a ACP de todos os compostos investigados, fungicidas, carbendazim e seus metabólitos, vistos no gráfico da Figura 28. Na PC1 e PC2 temos como resultado a combinação linear dos cinco descritores eletrônicos: EA, ΔE_{L-H} , μ , Δq e LogP. A PC1 foi composta por 53,02% da variância total, enquanto a PC2 foi composta por 26,99% da variância total, totalizando para as duas componentes principais 80,01% da variância total. As Equações 23 e 24 da PC1 e PC2, descritas a seguir, permitem verificar as variáveis que mais contribuem para identificar o potencial carcinogênico do carbendazim, metabólitos e demais fungicidas investigados neste trabalho.

$$PC1 = +0,58 \text{ LogP} - 0,97 \Delta E_{L-H} - 0,47 \mu + 0,96 \text{ EA} + 0,47 \Delta q \quad (23)$$

$$PC2 = -0,16 \text{ LogP} - 0,06 \Delta E_{L-H} - 0,82 \mu + 0,02 \text{ EA} - 0,80 \Delta q \quad (24)$$

Na PC1 os descritores eletrônicos que mais contribuem para a classificação do potencial carcinogênico de todos os compostos investigados neste trabalho são: EA, ΔE_{L-H} e LogP. Os descritores da PC2, μ e Δq , colaboram com valores mais altos para a classificação do potencial carcinogênico de todos os compostos.

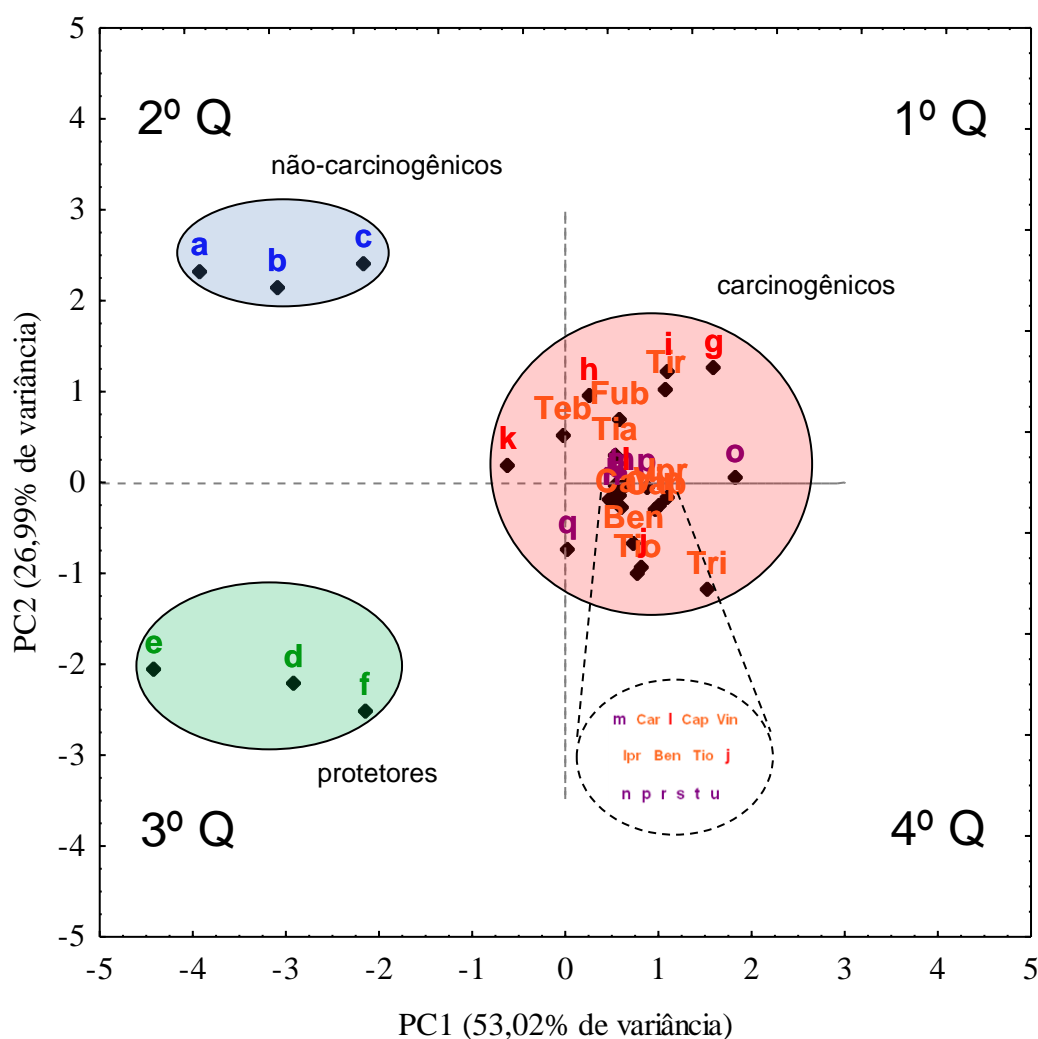


Figura 28. ACP dos descritores eletrônicos AM1 dos fungicidas, carbendazim e seus metabólitos. As letras e abreviaturas correspondem aos compostos indicados na Tabela 4, 6 e 7

Analisando o agrupamento na Figura 28, verificamos que o carbendazim, metabólitos e os fungicidas assemelham-se aos carcinógenos–controle. A maioria destes compostos analisados na Figura 28 estão situados entre o primeiro e o quarto quadrantes da PC1 e PC2, de maneira que estes apresentam valores mais altos para a EA e o LogP, e baixo valor para o ΔE_{L-H} . Analisando o quarto quadrante da PC2, observamos que o carbendazim (*m*), seus metabólitos *n*, *p*, *r*, *s*, *t*, *u*, e os fungicidas *Car*, *Cap*, *Vin*, *Ipr*, *Ben*, *Tio*, ficaram mais agrupados aos carcinógenos–controle 2-acetilaminofluoreno (*h*) e aflatoxina-B1 (*j*), apresentando valores mais altos para o μ e a Δq . De acordo com ACP da Figura 28, observamos que todos os compostos investigados neste trabalho agrupam-se próximos aos carcinógenos–controle. Logo, podemos afirmar que o carbendazim, metabólitos e fungicidas são semelhantes aos carcinógenos–controle, sendo classificados assim como potencialmente carcinogênicos.

CAPÍTULO 5



Fonte: <http://www.midianeWS.com.br/conteudo.php?sid=4&cid=168658>

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

5. Conclusões e Perspectivas

Com base numa análise estatística de parâmetros de hidrofobicidade e eletrônicos obtidos por cálculos de química quântica, o fungicida carbendazim e seus metabólitos têm parâmetros similares aos carcinógenos-controle e são, portanto, classificados como potencialmente carcinogênicos com base no modelo de interação carcinógeno-DNA desenvolvido por Pavão e Leão⁶⁶. Dado o risco para a saúde humana, principalmente para os trabalhadores agrícolas que estão mais expostos a este composto, seria recomendável a limitação do uso desta substância já que, de acordo com a legislação brasileira, são proibidos o registro de agrotóxicos com potenciais mutagênicos e/ou carcinogênicos⁶⁷. O presente estudo apresenta assim mais um exemplo da importância de modelos teóricos proporcionados pela química quântica para a identificação de espécies com potencial carcinogênico.

A análise multivariada das propriedades eletrônicas separou adequadamente os compostos escolhidos como controle de acordo com suas atividades (carcinógenos, não-carcinogênicos e protetores). Os gráficos da ACP para os compostos investigados nesta pesquisa seguiram o mesmo comportamento dos compostos-controle carcinogênicos. Todos os compostos investigados nesta pesquisa apresentaram um forte caráter eletrofílico (elevada afinidade eletrônica), uma das características importantes de compostos carcinogênicos (na carcinogênese química), assim também com baixos valores do gap de interação carcinógeno-DNA, permitindo assim melhor transferência do elétron entre as espécies próximas, com alto valor para a atração eletrostática DNA-Carcinógeno.

⁶⁶ Leão, M. B. C.; Pavão, A. C. Modelo teórico para caracterização de carcinógeno (Tese). DQF/UFPE. Recife, **1999**.

⁶⁷ Brazil. Lei No 7.802, de 11 de Julho de 1989. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, **1989**. Disponível em: <www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l7802.htm>, acessada em Janeiro 2014.

De acordo com nossos resultados verificamos que o carbendazim e seus metabólitos, 5-HBC (*n*), 5-HBC-S (*r*), MBC-5,6-dihidro-diol (*s*), MBC-5,6-diol (*t*) e MBC-5,6-epóxido (*u*), apresentaram carcinogenicidade semelhante à de carcinógenos conhecidos, como 2-acetilaminofluoreno e aflatoxina-B1.

Foi realizado ainda um estudo da ACP para alguns fungicidas utilizados na fruticultura brasileira, quando chegamos à conclusão de que estes compostos também apresentam atividade carcinogênica.

Como perspectiva que se abre com este estudo, pretendemos ainda incluir novos parâmetros, como exemplo, a energia de ligação (E_{lig}) do complexo (Composto-DNA), nos casos que não foram estudados nas análises estatísticas neste trabalho de dissertação, a fim de que este procedimento permita um maior refinamento do modelo proposto por Pavão e Leão.

Pretendemos propor uma modificação estrutural na estrutura do carbendazim de forma a localizar o LUMO e permitir a este orbital um aumento de energia, de modo a favorecer ao composto uma menor ação carcinogênica.

Desejamos divulgar o método teórico aqui utilizado para a ANVISA e outros órgãos de controle da saúde pública, oferecendo esta alternativa simples, barata e eficiente para identificação de carcinógenos. A aplicação do modelo desenvolvido por Pavão e Leão visa justamente estudar novas substâncias, buscando obter uma indicação teórica, anterior aos necessários testes experimentais, da ação carcinogênica de diversos compostos químicos. Levando-se em conta o princípio da precaução, este modelo é uma ferramenta como forma alternativa para o registro, renovação ou extensão de uso de agrotóxicos.

É importante lembrar que este trabalho não pretende ser uma análise completa da carcinogênese química, porém a ideia básica é a de se estabelecer um caminho para uma possível e segura determinação qualitativa e quantitativa do poder carcinogênico de uma substância através da teoria de orbitais moleculares.

REFERÊNCIAS

Referências

1. <http://noticias.bol.uol.com.br/economia/2012/01/12/eua-suspendem-importacao-de-suco-de-laranja-de-todos-paises.jhtm>, acessada em Abril 2012.
2. <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/b17ca88047458b58951fd53fbc4c6735/c24.pdf?MOD=AJPERES>, acessada em Maio 2012.
3. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/>, acessada em Maio 2012.
4. Kupper, K. C.; Corrêa, F. E.; de Azevedo, F. A.; da Silva, A. C. *Sci. Hortic.* v.134, p. 139, **2012**.
5. <http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/UCM292266.pdf>, acessada em Maio 2012.
6. <http://www.midianews.com.br/conteudo.php?sid=4&cid=173419>, acessada em Maio 2012.
7. <http://www.prdf.mpf.mp.br/imprensa/18-09-2013-mpf-df-quer-suspender-registro-de-agrotoxicos-com-carbendazim-no-brasil>, acessada em Novembro 2013.
8. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Índice Monográfico: Carbendazim. Brasília, Brasil, **2008**. Disponível em: <[http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP\[20903-1-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP[20903-1-0].PDF)>, acessada em Junho 2012.
9. U. S. Environmental Protection Agency. Fungicida Carbendazim. Washington, **2012**. Disponível em: <www.epa.gov/pesticides/factsheets/chemicals/carbendazim_ra.pdf>, acessada em Julho 2012.
10. Michael, A.; Irene, A.; Em *Handbook of Preservatives*. Taft, A., ed.; Synapse Info Resources: New York, p. 319, **2004**.
11. Huebra, M. J. G.; *et al. Fresenius J. Anal. Chem.* v. 367, p. 474, **2000**.
12. Escalada, J. P.; Pajares, A.; Gianotti, J.; Massad, W. A.; Bertolotti, S.; Amat-Guerri, F.; Garcia, N. A. *Chemosphere*. v. 65, p. 237, **2006**.
13. Lee, J.; Hong, W.; Yao, W.; Mark, G.; Steve, D. W. *J. Pharm. Sci.* v. 92, p. 161, **2003**.

-
14. Muthuviveganandavel V.; Muthuraman P.; Muthu S.; Srikumar K.; *J. Toxicol. Sci.* v. 33, p. 25, **2008**.
 15. Monson K. D.; Metabolism of [phenyl(U)-14C]carbendazim in rats, **1990**. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc149.htm>>, acessada em Julho 2012.
 16. Yu, G.; Guo, Q.; Xie, L.; Liu, Y.; Wang, X. Effects. *Toxicol. Ind. Health.* v. 25, p. 41, **2009**.
 17. Ladik, J.; Forner, W. Em *The Beginnings of Cancer in the Cell*. Springer-Verlag: Berlin, **1994**.
 18. Miller, E. C. *Cancer Res.* v. 38, p. 1479, **1978**.
 19. INCA. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>, acessada em Maio 2013.
 20. INCA. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=318>, acessada em Março 2013.
 21. INCA. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=13>, acessada em Agosto 2013.
 22. FUMO começa na idade escolar. *Folha de S. Paulo*, São Paulo, 25 abr. 2000, p. 3-1.
 23. INCA. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=18>, acessada em Dezembro 2013.
 24. <http://www.uscs.edu.br/cipa/dicas.php?id=41>, acessada em Julho 2013.
 25. <http://www.portaleducacao.com.br/educacao/artigos/8181/oncogenese>, acessada em Agosto 2013.
 26. Leão, M. B. C.; Pavão, A. C. *J. Mol. Structure.* v. 593, p. 297, **2001**.
 27. Andreas, L. *Nature Reviews*, v. 5, p. 113, **2005**.
 28. Miller, E. C.; Miller, J. A. *Cancer.* v. 47, p. 1055, **1981**.
 29. Blackburn, G. M.; Gait, M. J. Em *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*. Oxford University Press: Oxford, **1996**.

-
30. Leão, M. C. B.; Longo, R. L.; Pavão, A. C. *J. Mol. Structure*. v. 490, p. 145, **1999**.
31. Pauling, L. *J. Solid State Chem*. v. 54, p. 297, **1984**.
32. Pauling, L. *Proc. Natl. Acad. Sci*. v. 88, p. 9208, **1991**.
33. Pauling, L. *Proc. Natl. Acad. Sci*. v. 39, p. 551, **1953**.
34. Leão, M. B. C.; Pavão, A. C. *Int. J. Quantum Chem*. v. 62, p. 323, **1997**.
35. Ferreira, J. V.; Pavão, A. C. *Surf. Sci*. v. 602, p. 1964, **2008**.
36. Mohallem, J. R.; Vianna, R. O.; Quintão, A. D.; Pavão, A. C.; McWeeny, R. Z. *Phys. D*. v. 42, p. 135, **1997**.
37. Dewar, M. J. S. *J. Mol. Structure*. v. 200, p. 301, **1989**.
38. Flemming, I. Em *Fronteir Orbitals and Organic Chemical Reactions*. John Wiley: New York, **1976**.
39. Leão, M. B. C.; Pavão, A. C.; Espinoza, V. A. A.; Taft, C. A.; Bulnes, E. P. *J. Mol. Structure*. v. 710, p. 129, **2005**, e referências dos autores aqui citadas.
40. Bedor, C. N. G.; Pavão, A. C.; Rego, M. A. V.; Augusto, L. G. S.; Em *Vulnerabilidades socioambientais associadas ao uso de agrotóxicos na fruticultura do semiárido pernambucano: indicadores precoces de carcinogênese*. Augusto, L. G. S., ed.; Saúde do Trabalhador e Sustentabilidade do Desenvolvimento Humano Local – Ensaios em Pernambuco: Recife/UFPE, p. 147, **2009**.
41. Miller, E. C. *Cancer Res*. v. 11, p. 100, **1951**.
42. Norinder, U. *J. Mol. Structure*. v. 151, p. 259, **1987**.
43. Lowdin, P. *Int. J. Quantum Chem*. v. 16, p. 219, **1989**.
44. Mishra, P. C. *J. Mol. Structure*. v. 195, p. 201, **1989**.
45. Rienstra-Kiracofe, J. C.; Tschumper, G. S.; Schaefer, H. F. *Chem. Rev*. v. 102, p. 231, **2002**.

-
46. Mahan, B. M.; Myers, R. J. *Química: um curso universitário*. 4 ed. Araki, T. K.; Matsumoto, F. M., eds.; Edgard Blücher: São Paulo, p. 272, **1998**.
47. Atkins, P.; de Paula, J. *Físico-química*. 8 ed. da Silva, T. E. C.; Cardoso, M. J. E. M.; Faria, M. A. F.; Barcia, O. E., eds.; LTC: Rio de Janeiro, p. 589, **2008**.
48. Roothaan, C. C. J. *Rev. Mod. Phys.* v. 23, p. 69, **1951**.
49. Pauling, L. *Physica XV*. v. 1, p. 23, **1949**.
50. Trsic, M.; Siqueira Pinto, M. F. *Química Quântica: fundamentos e aplicações*. Manole: São Paulo, p. 104, **2009**.
51. Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular. Morgon, N. H.; Coutinho, K., eds.; Livraria da Física: São Paulo, **2007**.
52. Stewart, J. J. P. *J. Mol. Model.* v. 13, p. 1173, **2007**.
53. Almeida, W. B. *Escola de Química Teórica*. ICEX: UFMG, **1993**.
54. Pople, J. A.; Santry, D. P.; Segal, G. A. *J. Chem. Phys.* v. 43, p. 129, **1965**.
55. Dewar, M. J. S.; Zoebisch, E. G.; Healy, E. F.; Stewart, J. J. P. *J. Am. Chem. Soc.* v. 107, p. 3902, **1985**.
56. Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* v. 98, p. 5648, **1993**.
57. Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. *Phys. Rev B*. v. 37, p. 785, **1988**.
58. Szabo, A.; Ostlund, N. S. *Modern quantum chemistry: introduction to advanced electronic structure theory*. Dover: New York, **1996**.
59. Frisch, M. J., *et al*, *GAUSSIAN-09, Revision D.01*, Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2009**.
60. Análise Multivariada da Teoria a Prática. Disponível em: <<http://w3.ufsm.br/adriano/livro/Caderno%20dedatico%20multivariada%20-%20LIVRO%20FINAL%201.pdf>>, acessada em Julho 2013.
61. Pauling, L. *Como viver mais e melhor*. Best Seller: São Paulo, **1988**.

-
62. Arnott, J. A.; Kumar, R.; Planey, S. L. *J. Appl. Biopharm. Pharmacokinet.* v. 1, p. 31, **2013**.
63. Reynolds, C. A.; Thomson, C. *J. Mol. Structure.* v. 149, p. 352, **1987**.
64. Talal, A. Z.; Atef, M. A. *Riv. Eur. Sci. Med. Farmacol.* v. 15, p. 413, **2011**.
65. Hidetaka, M.; Toshihiko, Y.; Masatoshi, N.; Taijiro, O.; Kiminobu, G.; Nobuhiro, H.; Hajime, N. *Endocrinology.* v. 145, p. 1860, **2004**.
66. Leão, M. B. C.; Pavão, A. C. Modelo teórico para caracterização de carcinógeno (Tese). DQF/UFPE. Recife, **1999**.
67. Brazil. Lei No 7.802, de 11 de Julho de 1989. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, **1989**. Disponível em: <www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l7802.htm>, acessada em Janeiro 2014.

ANEXOS

Artigo Publicado

CARCINOGENICIDADE DO CARBENDAZIM E SEUS METABÓLITOS

Renato C. Silva, Karina A. Barros e Antonio C. Pavão*

Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-540 Recife – PE, Brasil

Recebido em 03/02/2014; aceito em 10/06/2014; publicado na web em 29/07/2014

CARCINOGENICITY OF CARBENDAZIM AND ITS METABOLITES. The carcinogenic potential of carbendazim and its metabolites was analyzed using statistical treatment of electronic parameters obtained from DFT/ 6-311++G(d,p) and AM1 calculations. The carcinogen-DNA interaction is described in the framework of the theory of unsynchronized resonance of covalent bond as a process of electron transfer involving the HOMO and LUMO frontier orbitals. Through a Principal Component Analysis (PCA) of the electron affinity, carcinogen-DNA interaction energy, electrostatic attraction and cell membrane permeability (dipole moment μ and partition coefficient LogP) evidence was obtained showing carbendazim displays carcinogenic activity. For the metabolites of carbendazim, no evidence was found in the literature of their carcinogenic activities. However, the electronic parameters for these metabolites exhibited similarity to known carcinogens, thereby showing the importance of the results obtained in this study for a policy based on the precautionary principle.

Keywords: fungicides; chemical carcinogenesis; DFT and AM1 calculations.

INTRODUÇÃO

O fungicida benzimidazólico metil-2-benzimidazole-carbamato (MBC), fórmula molecular $C_9H_9N_3O_2$, conhecido popularmente como carbendazim (Figura 1),

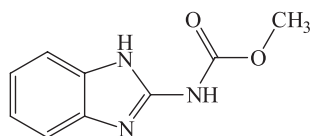


Figura 1. Fórmula estrutural do carbendazim

foi notícia internacional em janeiro de 2012, quando os EUA proibiram a importação do suco de laranja brasileiro devido à presença deste fungicida. Esta decisão causou um enorme impacto já que o Brasil destina cerca de 15% das suas 1,3 milhões de toneladas de suco de laranja aos EUA. O carbendazim é um produto legalizado no Brasil e é utilizado no combate de pragas como a *Guignardia citricarpa* (pinta preta) e *Colletotrichum acutatum* (estrelinha), que são fungos comuns em lavouras de laranjas.¹ Entretanto, segundo a *Food and Drug Administration* (FDA), agência norte-americana responsável pela fiscalização de alimentos e medicamentos, o consumo do fungicida está associado a um aumento no risco de tumores de fígado e, por essa razão, a substância é proibida no país.² Segundo as especificações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)³ e da U.S. Environmental Protection Agency (EPA),⁴ o carbendazim é um fungicida de classe toxicológica III, considerado de toxicidade média. A DL50, quantidade necessária para matar metade de uma população em teste, para o carbendazim em ratos administrado por via oral é de 6400 mg kg⁻¹ por peso do animal.⁵ Em conformidade com a tabela toxicológica da EPA, o MBC é considerado do grupo C, classificado como possível carcinógeno em humanos. Pesquisas experimentais relatam a formação de neoplasias hepatocelulares em fêmeas de camundongos⁴ e a indução da atividade tumoral em células do ovário humano.⁶

O tempo de meia vida do MBC no meio ambiente é relativamente

alto, em torno de dois meses em condições aeróbias e vinte e cinco meses sob condições anaeróbias.⁷ Por conta disso, sua degradação é considerada lenta, o que torna o MBC um composto quimicamente estável. Contudo na presença de luz (fotodegradação) e em diferentes condições ambientais, tais como mudanças na temperatura e no pH, sua estabilidade é afetada, como por exemplo em meio alcalino e na presença de oxigênio torna-se mais instável e sua degradação é acelerada. Na temperatura ambiente o MBC possui baixa solubilidade em água, já em temperaturas mais altas passa a ser solúvel.⁸ Portanto, este é um dos fatores que leva o carbendazim a ser encontrado no meio ambiente na forma de resíduos. Os produtos formados a partir do processo de degradação do MBC dependem do meio onde ocorre a degradação. A forma como é absorvido e/ou eliminado muda conforme o ambiente em que sofreu a decomposição, se em animais, plantas ou solo.

A rota metabólica do MBC já foi estudada em diversas espécies de animais, tais como: galinhas, ratos, camundongos, coelhos, cachorros, ovelhas, vacas, e em plantas e solos. Estudos com ratos revelam que o MBC é bem absorvido quando administrados por via oral cerca de 80 a 85%, sendo posteriormente metabolizado em diversos compostos dentro do organismo.⁹ Durante o processo metabólico do carbendazim em ratos (Figura 2), a principal reação química que ocorre é a hidroxilação,¹⁰ fornecendo como principais metabólitos: o 5-hidroxi-2-benzimidazole-carbamato (5-HBC) encontrado na urina e fezes de ratos machos; o 2-metoxycarbonil-amino-1H-benzimidazol-5-il-(sulfato de hidrogênio) (5-HBC-S); e o 5,6-hidroxi-2-benzimidazole-carbamato-N-óxido (5,6-HOBC-N-óxido) encontrado nas excretas de ratos fêmeas, principalmente na forma glucuronizada.

Como metabólitos secundários temos o 5,6-dihidroxibenzimidazol-2-il-carbamato (5,6-DHCB) que pode se metabolizar a 6-hidroxi-2-metoxycarbonil-amino-1H-benzimidazol-5-il-5-(sulfato de hidrogênio) (5,6-DHCB-S) e 6-hidroxi-2-metoxycarbonil-amino-1H-benzimidazol-5-il-β-D-ácido glucopiranosidurônico (5,6-DHCB-G) nas formas conjugadas sulfatadas e glucuronizadas, respectivamente. Pesquisas descrevem que os metabólitos secundários citados anteriormente são excretados de forma rápida por meio da urina em ratos machos e fêmeas.¹¹

A intoxicação por carbendazim é passível de ocorrer por meio da ingestão de alimentos tais como: feijão, arroz, trigo, soja, citros onde

*e-mail: pavao@ufpe.br

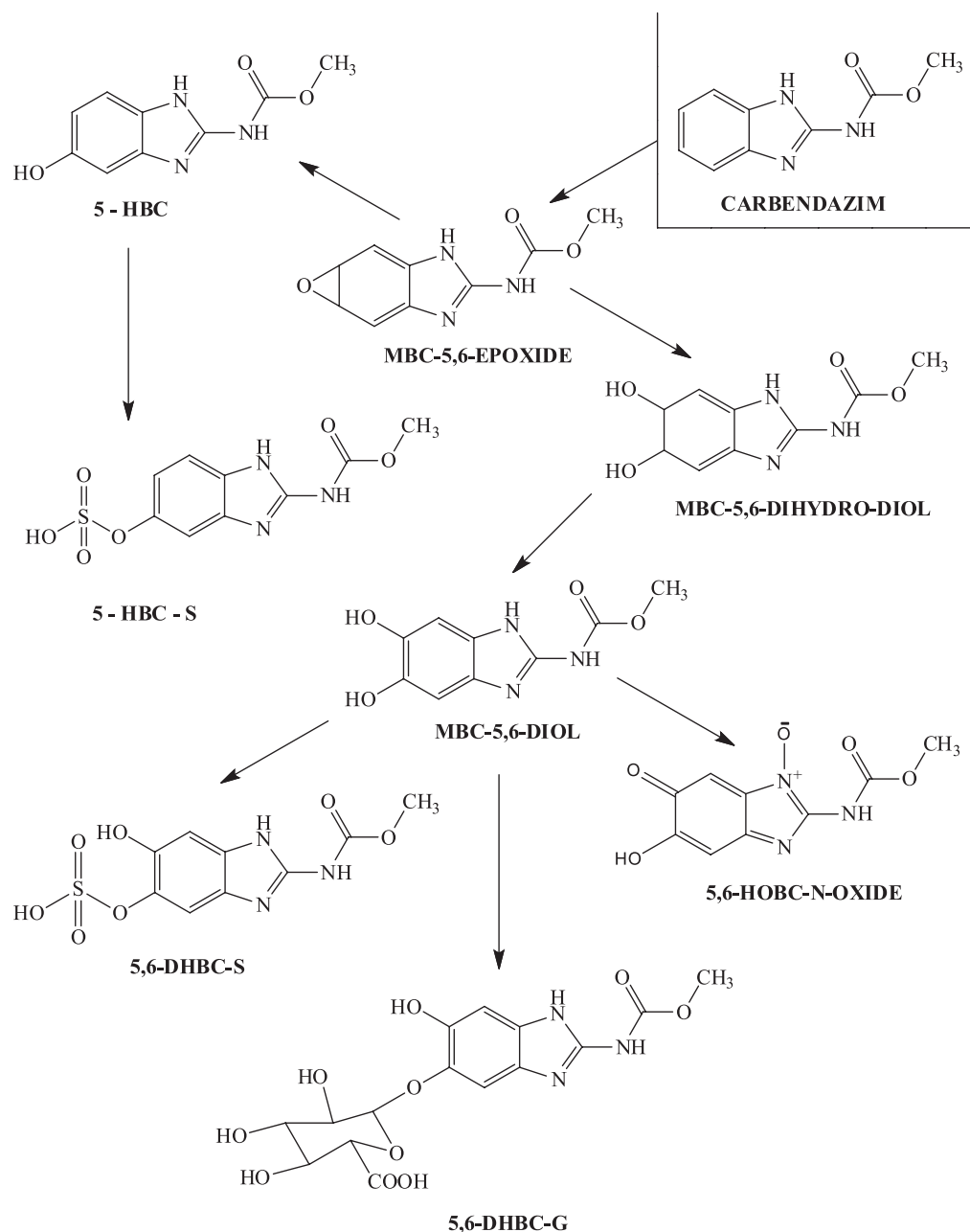


Figura 2. Rota metabólica do carbendazim em ratos

geralmente é aplicado esse fungicida.³ Os trabalhadores rurais aplicadores diretos do carbendazim nas plantações sofrem maiores riscos de exposição e intoxicação. Desse modo, para o Poder Público conceder satisfatoriamente o direito à saúde humana com alimentos seguros e saudáveis, a toxicidade do princípio ativo carbendazim necessita passar por um processo de reavaliação pela ANVISA. Considerando a problemática toxicidade do carbendazim e seus metabólitos aos efeitos mutagênicos, a causalidade deve ser estudada utilizando-se o maior número possível de informações, tanto qualitativas como quantitativas. A modelagem química computacional que estuda a interação de espécies químicas com o DNA, enzimas e proteínas está cada vez mais em evidência e oferece uma opção viável por ser de baixo custo e informar rapidamente sobre o potencial carcinogênico de substâncias químicas. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi caracterizar o potencial carcinogênico do carbendazim e seus metabólitos a partir de uma análise estatística de parâmetros eletrônicos obtidos por cálculos precisos de química quântica.

METODOLOGIA

A partir de cálculos químico-quânticos de orbitais moleculares, selecionamos um conjunto de descritores para realizar um estudo estatístico visando caracterizar a atividade carcinogênica dos compostos aqui investigados. Este procedimento já foi utilizado em vários trabalhos publicados sobre carcinogênese química, como os que descrevem com sucesso a atividade carcinogênica de aflatoxinas, DDT, nitrosaminas, benzopirenos e uma variedade de pesticidas, além da atividade protetora de antioxidantes (vitamina C e resveratrol) contra o câncer.¹²⁻¹⁷ Por meio de um tratamento estatístico multivariado com análise de componentes principais (ACP) foi possível correlacionar os descritores eletrônicos com o potencial cancerígeno. A ACP é uma técnica estatística que permite interpretar a estrutura de um conjunto de dados diversos a partir das respectivas matrizes de variâncias-covariâncias ou de correlações entre os parâmetros considerados. Matematicamente, a ACP corresponde a uma fatoração da matriz

X de dados originais com “n” carcinógenos e “p” descritores. Este procedimento requer a diagonalização da matriz de covariância $X'X$, em que X' é a transposta da matriz X. Os elementos dos autovetores, que na ACP são chamados de pesos, representam a contribuição com que cada um dos eixos originais entra na composição dos novos eixos, chamados de componentes principais. Os autovalores representam a quantidade de variância original explicada pelos respectivos autovetores. Metodologicamente, a ACP procura rotacionar os eixos originais para a obtenção de um novo conjunto de eixos de menor dimensão que concentre o máximo das informações. Os novos eixos apresentam um certo padrão que permite relacionar esses descritores com a atividade estudada. Na análise ACP é possível estabelecer uma relação entre determinados descritores com a propriedade que se deseja avaliar sem necessariamente ter que levar em consideração as características estruturais dos compostos investigados. Assim, uma vantagem desta técnica é que permite a descrição de determinada propriedade para um conjunto de moléculas que não apresentam semelhanças em suas estruturas geométricas. A informação considerada como relevante na ACP refere-se às duas componentes principais. A primeira (PC1) descreve o eixo de maior variância, sendo neste eixo onde os pontos se encontram mais espalhados. A segunda (PC2), ortogonal a PC1, representa o segundo eixo de maior variância residual. Veremos que os cálculos e gráficos da ACP obtidos a partir do *software* computacional STATISTICA 8.0, para o grupo de compostos estudados, separou de forma clara os não-carcinogênicos, carcinógenos e protetores.

Os parâmetros selecionados para a ACP são: afinidade eletrônica adiabática (AE), energia de interação carcinógeno-DNA (ΔE_{H-L}), atração eletrostática carcinógeno-DNA (Δq), momento de dipolo elétrico (μ) e logaritmo do coeficiente de partição (LogP). A justificativa para a escolha deste conjunto considera que os parâmetros selecionados devem ter alguma correlação com o problema em questão. Assim, vejamos inicialmente o caso da AE. Desde os trabalhos pioneiros de Elizabeth Miller,¹⁸ substâncias carcinogênicas têm sido reconhecidas pela sua natureza eletrofílica, sendo capazes de reagir com sítios nucleofílicos de macromoléculas como DNA e proteínas. Daí a justificativa para a inclusão de AE entre os parâmetros selecionados para o estudo estatístico. Neste trabalho vamos utilizar a afinidade eletrônica adiabática (AE), que é obtida pela diferença entre a energia total da molécula neutra e a energia total da molécula aniônica ($E_{\text{total}} \text{ molécula neutra} - E_{\text{total}} \text{ molécula aniônica}$), estando ambas as moléculas com suas geometrias otimizadas. Valores altos para AE adiabática indicam que a molécula tem grande facilidade em receber elétrons. Este procedimento é mais realista do que simplesmente usar o Teorema de Koopmans ou calcular AE vertical, quando apenas a geometria da molécula neutra é otimizada.

Outro parâmetro eletrônico aqui considerado é a diferença de energia (ΔE_{H-L}) entre o orbital molecular ocupado de mais alta energia (HOMO) do DNA e o orbital molecular desocupado de mais baixa energia (LUMO) do carcinógeno. Segundo a teoria de ressonância não-sincronizada das ligações covalentes (RVB) desenvolvida por L. Pauling,¹⁹ a transferência de elétron do DNA para o carcinógeno leva à formação de uma ligação química covalente entre essas espécies (Figura 3).

A RVB considera dois tipos de ressonância: a sincronizada, como aquela amplamente conhecida no caso da ressonância do benzeno onde uma ligação é transferida sincronizadamente com outra, e a não-sincronizada, onde apenas uma ligação é transferida, resultando na transferência de elétron de um átomo para outro. É intrigante o fato de que, embora Pauling tenha explicitado essas duas ressonâncias em sua formulação original da teoria da ressonância e tenha utilizado a não-sincronizada para explicar diversos fenômenos, somente a ressonância sincronizada tenha se popularizado entre os químicos. Em diversos trabalhos que temos realizado também mostramos a utilidade

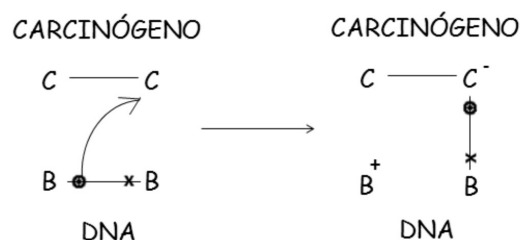


Figura 3. Ressonância não-sincronizada: C representa a espécie carcinogênica e B a base do DNA

da ressonância não-sincronizada para explicar fenômenos como magnetismo, supercondutividade, catálise, estabilidade molecular e outros.¹³ No caso presente da ressonância não-sincronizada envolvendo o carcinógeno e o DNA, o descritor ΔE_{H-L} é uma medida da interação entre essas espécies. Valores baixos da ΔE_{H-L} indicam que a interação será mais efetiva. Vale a pena destacar que este modelo de interação já foi aplicado para outras moléculas carcinogênicas conhecidas.¹²⁻¹⁷

Um esquema de orbitais moleculares da interação carcinógeno-DNA é mostrado na Figura 4, onde se representa a transferência de elétron do HOMO da guanina para o LUMO do carcinógeno. Dentre as bases nitrogenadas do DNA, a guanina é a que apresenta o menor valor da energia de ionização (energia do HOMO mais elevada), fato que justifica a preferência dos carcinógenos por esta base.¹²

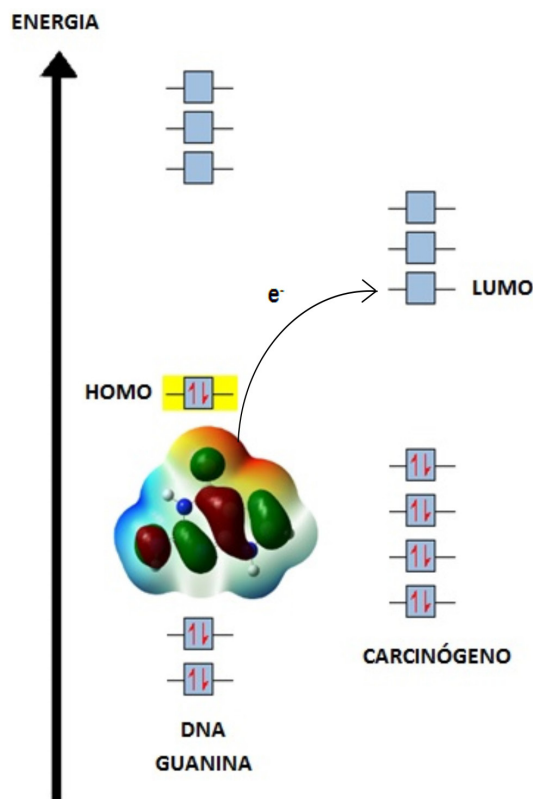


Figura 4. Modelo de transferência de elétron DNA/Guanina (HOMO) → Carcinógeno (LUMO)

Conforme mostrado na Figura 5, a densidade de carga negativa na guanina é mais pronunciada entre o oxigênio (O16) e o nitrogênio (N7). Com base nos cálculos DFT/BLYP 6-311++G(d,p), o oxigênio apresenta uma maior densidade eletrônica (com carga de Mulliken -0,308), sendo portanto o sítio provável da interação do carcinógeno, com a quebra da ligação do grupo carbonila.

A diferença de carga entre o O16 da guanina e o átomo mais positivo no sítio de ataque do carcinógeno, aqui denominada atração

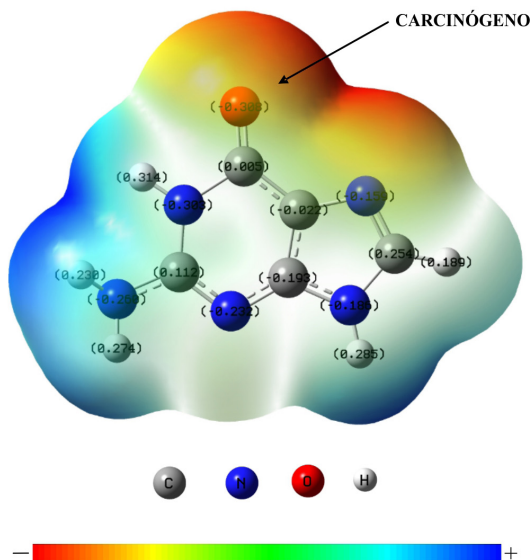


Figura 5. Mapa do potencial eletrostático e distribuição de cargas da guanina. Azul indica a densidade de carga positiva e vermelho a negativa

eletrostática carcinógeno-DNA, é outro descritor selecionado para a presente análise estatística. O Δq é um indicador da facilidade de aproximação do agente eletrofílico e o DNA para a transferência do elétron. Quanto mais elevada for a atração eletrostática do átomo mais positivo do carcinógeno e o O16 guanina, maior será a facilidade para transferência do elétron e para formar uma ligação química entre estas espécies.

Os dois outros descritores que completam a lista utilizada na ACP são: o logaritmo do coeficiente de partição (LogP) e momento de dipolo elétrico (μ). Ambos estão relacionados com a capacidade do carcinógeno em ultrapassar a membrana celular e atingir o núcleo. O LogP descreve a razão das concentrações do composto em dois meios líquidos imiscíveis em equilíbrio (água e octanol), sendo que quanto maior o valor de LogP, maior a afinidade com a região hidrofóbica da membrana. Em relação ao momento de dipolo, quanto menor o seu valor, maior será a permeabilidade do composto na membrana celular. Os valores do LogP foram calculados utilizando a versão do software ALOGPS 2.1.²⁰

É preciso lembrar que numa análise estatística não é necessário um grande número de descritores, mas sim o maior número possível de elementos no universo de análise. Em nosso caso, iremos analisar um total de 21 compostos, incluindo o carbendazim, seus metabólitos e os compostos controle. Foram utilizadas substâncias não carcinogênicas (água, glicose e glicerol), carcinógenos conhecidos (benzopireno, tetracloreto de carbono, aflatoxina-B1, dimetilnitrosamina, 2-naftilamina e 2-acetilaminofluoreno) e conhecidas substâncias protetoras antioxidantes: resveratrol na forma ionizada (resveratrol-H), acetilsalicilato e ascorbato. Todas as moléculas foram desenhadas com o software GaussView 5.0 e os cálculos computacionais de modelagem molecular foram efetuados com o software Gaussian 09.²¹ Nestes cálculos utilizamos a Teoria do Funcional da Densidade (DFT) em nível BLYP, que combina o funcional de troca proposto por Becke²² para correção da energia com o funcional de correlação desenvolvido por Lee, Yang e Parr.²³ O conjunto de funções de base utilizado foi o 6-311++G(d,p). Para verificar a adequação do método BLYP/6-311++G(d,p) no cálculo das propriedades aqui analisadas seria necessário realizar uma comparação com dados experimentais. Entretanto, estes dados são muito escassos para os compostos controle e inexistentes para os metabólitos do carbendazim, o que dificulta uma boa caracterização por esta via (de toda forma, observamos uma boa concordância com

alguns valores disponíveis, como por exemplo, para o resveratrol encontramos, $\mu = 14,4$ D e LogP = 2,9, enquanto os respectivos valores experimentais são, $\mu = 14,7$ D e LogP = 3,0).^{24,25} Uma alternativa que utilizamos para analisar a adequação do cálculo DFT foi realizar cálculos semi-empíricos com o modelo AM1, que em geral é bem parametrizado para reproduzir dados experimentais para o tipo de moléculas aqui analisadas (para o resveratrol encontramos, $\mu = 15,0$ D e LogP = 3,1). Veremos que ambos os níveis de cálculo levam a resultados semelhantes na análise estatística da carcinogenicidade do carbendazim e seus metabólitos. Tal concordância é uma indicação a favor da confiabilidade dos cálculos químico-quânticos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os parâmetros eletrônicos obtidos por cálculos DFT para o carbendazim, seus metabólitos e para os compostos controle.

A primeira componente principal (PC1) é resultado da combinação linear das cinco variáveis calculadas (AE, ΔE_{H-L} , μ , Δq e LogP). A PC1 foi composta por 61,39% da variância total, enquanto a segunda componente principal (PC2) foi composta por 19,95% da variância total, totalizando para as duas componentes principais 81,34% da variância total. Como mais de 50% dos resultados foi elucidado pelos 1° e 2° eixos, a correlação é claramente explícita.

$$PC1 = -0,63 \text{ LogP} + 0,96 \Delta E_{H-L} + 0,33 \mu - 0,96 \text{ AE} - 0,85 \Delta q \quad (1)$$

$$PC2 = +0,11 \text{ LogP} + 0,06 \Delta E_{H-L} - 0,92 \mu + 0,01 \text{ AE} - 0,36 \Delta q \quad (2)$$

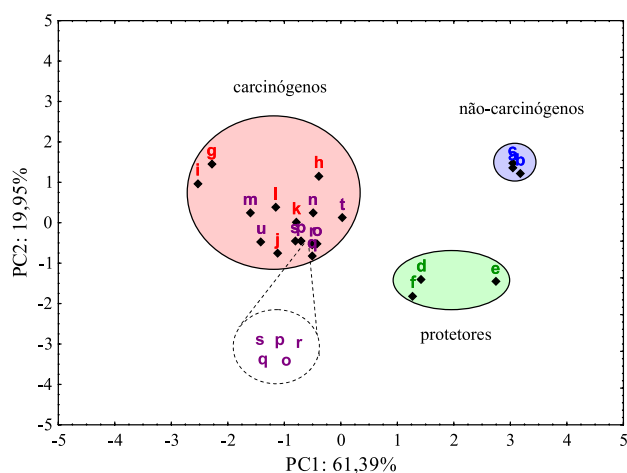
A Equação 1 da primeira componente principal (PC1) e a Equação 2 da segunda componente principal (PC2) permitem verificar as variáveis que mais contribuem para identificar o potencial carcinogênico dos compostos investigados. Os resultados da PC1, com maior peso para AE, ΔE_{H-L} , Δq e LogP, e PC2 com maior peso para a variável μ , separaram de forma clara no gráfico os três grupos de compostos (Figura 6): não-carcinógenos, carcinógenos e protetores.

Carbendazim e seus metabólitos têm parâmetros próximos aos dos compostos cancerígenos aqui utilizados e são, portanto, classificados como potencialmente cancerígenos com base nesse modelo. Na análise comparativa dos resultados, é possível afirmar pela posição do carbendazim (símbolo m) e o metabólito MBC-5,6-epóxido (símbolo u) na Figura 6, que estes compostos apresentam o maior potencial carcinogênico, uma vez que se encontram bem à esquerda da PC1. Compostos à esquerda (valores negativos) da PC1 têm alta AE, contribuindo com maior peso (96%) para o potencial carcinogênico. Também apresentam elevados valores de Δq (85%) e LogP (63%). Pode ser visto na Tabela 1 que o carbendazim apresentou um maior valor para o LogP, tendo uma correlação inversa com o momento de dipolo elétrico. Os outros metabólitos do carbendazim estão agrupados muito próximos na Figura 6, indicando que possuem um potencial carcinogênico muito semelhante. Os compostos não-carcinógenos (em azul) e protetores (em verde) na Figura 6 estão deslocados para a direita (valores positivos) da PC1, com elevados valores de ΔE_{H-L} . Ainda na Figura 6, vemos que dentre o grupo de substâncias protetoras, o resveratrol possui um momento de dipolo elétrico maior, o que o desloca para mais baixo na Figura 6 (valor negativo na PC2).

A Figura 7 mostra o resultado da ACP utilizando dados dos cálculos semi-empíricos AM1, que igualmente aos resultados DFT, separa os três tipos de compostos analisados. A variância total para as duas componentes principais é de 80,53%, muito próxima do valor obtido para os cálculos DFT (81,34%), explicitando claramente a correlação entre os descritores da carcinogenicidade do carbendazim e seus metabólitos. Tal como no resultado DFT, com AM1 a PC1 fornece

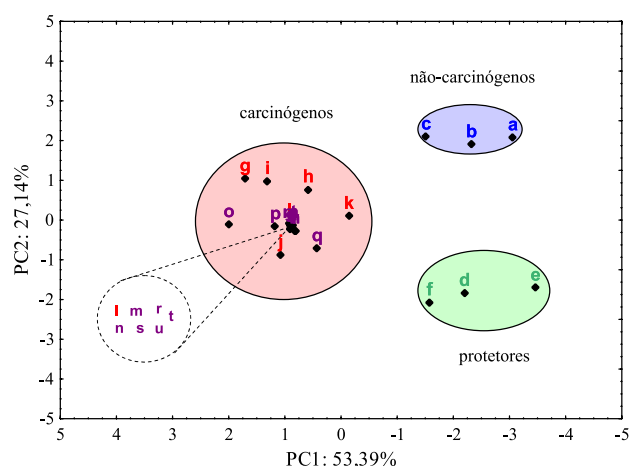
Tabela 1. Parâmetros eletrônicos do carbendazim, metabólitos e compostos controle (DFT)

Substância	Símbolo	AE (eV)	ΔE_{H-L} (eV)	μ (D)	Δq	LogP
Água	a	-0,734	6,517	2,130	0,551	-1,380
Glicerol	b	-0,408	5,863	3,424	0,257	-2,320
Glicose	c	-0,217	5,436	2,192	0,221	-3,170
Acetilsalicilato	d	0,380	4,654	12,837	0,988	1,190
Ascorbato	e	0,244	5,047	13,949	0,561	-2,410
Resveratrol-H	f	0,219	5,266	14,418	1,203	2,890
Benzopireno	g	3,530	2,457	0,018	1,198	6,400
2-Naftilamina	h	2,714	3,483	1,965	0,840	2,170
Tetracloroeto de carbono	i	4,183	2,013	0,001	1,550	2,860
Aflatoxina-B1	j	3,993	2,312	8,584	1,156	0,450
Dimetilnitrosamina	k	3,149	3,047	4,309	1,390	-0,640
2-acetilaminofluoreno	l	2,959	3,238	3,814	1,312	3,030
Carbendazim	m	3,918	2,982	3,313	1,502	1,520
5-HBC	n	2,442	3,755	3,735	1,404	0,780
5,6-HOBC-N-óxido	o	2,613	3,473	6,354	1,501	-0,790
5,6-DHBC-S	p	2,794	3,156	5,911	1,519	-0,500
5,6-DHBC-G	q	2,765	3,203	7,546	1,506	-1,010
5-HBC-S	r	2,712	3,348	6,444	1,489	-0,670
MBC-5,6-dihidro-diol	s	2,890	2,993	5,866	1,527	-0,590
MBC-5,6-diol	t	1,360	3,836	4,190	1,402	0,180
MBC-5,6-epóxido	u	3,987	2,938	5,747	1,612	0,040

**Figura 6.** PCA dos descritores eletrônicos do carbendazim, metabólitos e compostos controle (DFT)

maior peso para EA, ΔE_{H-L} e μ , e a PC2 para μ e Δq , que assim separaram de forma clara os três grupos de compostos: não-carcinógenos, carcinógenos e protetores.

Apesar dos poucos dados na literatura sobre a carcinogenicidade do carbendazim, estudos em animais apontam que ele pode prejudicar o sistema hepático, afetar a produção de hormônios causando anomalias da diferenciação sexual e da reprodução (sistema endócrino), provocar alterações cromossômicas com anomalias do número de cromossomos nas células, tanto em testes *in vitro*, como *in vivo*, trazendo danos à molécula do DNA (efeitos mutagênicos) e perturbar o desenvolvimento embrionário ou fetal (efeitos teratogênicos/embriotoxicidade).²⁶ Estudos recentes relatam que a toxicidade do carbendazim em ratos é capaz de afetar o aparelho reprodutor masculino com anomalias na formação dos espermatozoides, diminuição da fertilidade e atrofia testicular do epidídimo (toxicidade testicular reprodutiva).^{6,8} Assim, podemos concluir que nossos resultados para o carbendazim são compatíveis com os efeitos relatados acima.

**Figura 7.** PCA dos descritores eletrônicos do carbendazim, metabólitos e compostos controle (AM1)

Quanto aos metabólitos do carbendazim, não foi possível localizar na literatura evidências de suas atividades carcinogênicas (assim também como não localizamos valores experimentais de momento de dipolo elétrico, afinidade eletrônica e coeficiente de partição). No entanto, os parâmetros eletrônicos para estes metabólitos apresentaram similaridade aos carcinógenos conhecidos, mostrando assim a importância dos resultados obtidos nesse estudo para uma política baseada no princípio da precaução.

CONCLUSÃO

Com base numa análise estatística de parâmetros eletrônicos obtidos por cálculos de química quântica, o fungicida carbendazim e seus metabólitos são indicados como potencialmente carcinogênicos. Dado o risco para a saúde humana, principalmente para os trabalhadores agrícolas que estão mais expostos a este composto, seria recomendável a limitação do uso desta substância já que, de acordo

com a legislação brasileira, são proibidos o registro de agrotóxicos com potenciais mutagênicos e/ou carcinogênicos.²⁷ O presente estudo apresenta assim mais um exemplo da importância de modelos teóricos proporcionados pela química quântica para a identificação de espécies com atividades carcinogênicas.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) e ao CENAPAD-PE.

REFERÊNCIAS

- Kupper, K. C.; Corrêa, F. E.; Azevedo, F. A.; Silva, A. C.; *Sci. Hortic.* **2012**, *134*, 139.
- <http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/UCM292266.pdf>, acessada em Janeiro 2014.
- [http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP\[20903-1-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP[20903-1-0].PDF), acessada em Janeiro 2014.
- http://www.epa.gov/pesticides/factsheets/chemicals/carbendazim_ra.pdf, acessada em Janeiro 2014.
- Michael, A.; Irene, A. Em *Handbook of Preservatives*; Taft, A., eds.; Synapse Info Resources: New York, 2004, p. 319.
- Hidetaka, M.; Toshihiko, Y.; Masatoshi, N.; Taijiro, O.; Kiminobu, G.; Nobuhiro, H.; Hajime, N.; *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2004**, *145*, 1860.
- Escalada, J. P.; Pajares, A.; Gianotti, J.; Massad, W. A.; Bertolotti, S.; Amat-Guerri, F.; Garcia, N. A.; *Chemosphere* **2006**, *65*, 237.
- Lee, J.; Hong, W.; Yao, W.; Mark, G.; Steve, D. W.; *J. Pharm. Sci.* **2003**, *92*, 161.
- Muthuviveganandavel, V.; Muthuraman, P.; Muthu, S.; Srikumar, K.; *J. Toxicol. Sci.* **2008**, *33*, 25.
- http://www.apvma.gov.au/products/review/docs/carbendazim_prf_human_health.pdf, acessada em Janeiro 2014.
- Yu, G.; Guo, Q.; Xie, L.; Liu, Y.; Wang, X.; *Toxicol. Ind. Health.* **2009**, *25*, 41.
- Leão, M. B. C.; Pavão, A. C.; Espinoza, V. A. A.; Taft, C. A.; Bulnes, E. P.; *J. Mol. Struct.: THEOCHEM* **2005**, *710*, 129.
- Pavão, A. C.; Taft, C. A.; Guimarães, T. C. F.; Leão, M. B. C.; Mohallem, J. R.; Lester, W. A.; *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 5.
- Pavão, A. C.; Soares Neto, L. A.; Ferreira Neto, J.; Leão, M. B. C.; *J. Mol. Struct.: THEOCHEM* **1995**, *337*, 57.
- Leão, M. B. C.; Pavão, A. C.; *Int. J. Quantum Chem.* **1997**, *62*, 323.
- Leão, M. B. C.; Pavão, A. C.; *J. Mol. Struct.: THEOCHEM* **2001**, *539*, 297.
- Bedor, G. N. V.; Moraes, R. J. L.; Cavalcanti, L. S.; Ferreira, J. V.; Pavão, A. C.; *Sci. Total Environ.* **2010**, *408*, 6281.
- Elizabeth, C. M.; James, A. M.; *Cancer Cytopathol.* **1981**, *47*, 1055.
- Pauling, L. C.; *J. Solid State Chem.* **1984**, *54*, 297.
- Tetko, I. V.; Tanchuk, V. Y.; *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2002**, *42*, 1136.
- Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A., Jr.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, N. J.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, Ö.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J.; *GAUSSIAN-09; Revision D.01*; Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
- Becke, A. D.; *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5642.
- Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G.; *Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys.* **1988**, *37*, 785.
- Lou, B.; Wu, P.; Hou, C.; Cheng, F.; Chen, J.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, *94*, 99.
- Leopoldini, M.; Russo, N.; Toscano, M.; *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 3078.
- Talal, A. Z.; Atef, M. A.; *Riv. Eur. Sci. Med. Farmacol.* **2011**, *15*, 413.
- http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l7802.htm, acessada em Janeiro 2014.