



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA (CCEN)
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL (DQF)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ESTUDO TEÓRICO DO POTENCIAL CARCINOGENÉTICO DE
HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS E SEUS
METABÓLITOS**

Douglas Lopes Bernardo
Orientador: Antonio Carlos Pavão

Recife, 2014

**ESTUDO TEÓRICO DO POTENCIAL CARCINOGENICO DE
HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS E SEUS
METABÓLITOS**

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para a obtenção do grau de
Mestre em Química pela Universidade
Federal de Pernambuco.

Recife, 2014

Catálogo na fonte
Bibliotecário Jefferson Luiz Alves Nazareno CRB4-1758

B518e Bernardo, Douglas Lopes.
Estudo teórico do potencial carcinogênico de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e seus metabólitos. / Douglas Lopes Bernardo. – Recife: O Autor, 2014.
75 f.: fig.

Orientador: Antônio Carlos Pavão.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. Química Fundamental, 2014.
Inclui referências.

1. Química. 2. Físico-química. 3. Química teórica
I. Pavão, Antônio Carlos. (Orientador). II. Título.

541 CDD (22. ed.) UFPE-FQ 2014-59

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 Doutor em Química.

Aprovada:

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

Prof. Ricardo Oliveira da Silva
Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Luciano de Azevedo Soares Neto
Departamento de Química
Universidade Federal Rural de Pernambuco

"Estudo teórico do potencial carcinogênico de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e seus metabólitos"

Por

Douglas Lopes Bernardo

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

A minha esposa, Ana Alice Mano Sampaio, pelo apoio, compreensão e motivação que tanto contribuíram para a finalização deste trabalho.

A minha mãe, Patrícia Lopes de Farias, que tanto me ajudou e me fortaleceu.

A minha vó, Eronilda Lopes de Farias, que me mostrou sempre a direção certa.

A minha família, que tanto sempre me ajudou.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre iluminar o meu caminho;

A minha querida esposa que sempre me apoiou, ajudou e fortaleceu nos momentos mais difíceis;

A minha mãe por tudo aquilo que me ensinou, por toda sua dedicação, conselhos e paciência;

A minha vovó por todo carinho e tranquilidade;

A minha tia Ana Paula que nunca mediu esforços para me ajudar;

Ao meu pai Arlindo de Oliveira que sempre me apoiou;

Aos meus primos e toda a minha família pelo apoio e momentos de descontração;

A minha sogra Hilda e cunhada Thereza que sempre me acolheram de forma maravilhosa;

Ao Professor Pavão pela orientação e ao grupo de pesquisa pelas conversas que sempre ajudavam no desenvolvimento do trabalho;

A Karina e Renato que tanto contribuíram para a realização deste trabalho;

A todos os meus amigos pela força e momentos de alegria;

E a todos que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento desse trabalho.

RESUMO

A avaliação do potencial carcinogênico de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) e seus metabólitos é realizada através de Análise de Componentes Principais (ACP) e da Relação Quantitativa da Estrutura-Atividade (QSAR) usando descritores hidrofóbico (LogP), estéreos (volume e área superficial) e eletrônicos (E_{adia} , μ e $\Delta E_{\text{L-H}}$). Os descritores eletrônicos foram obtidos com cálculos químico-quânticos do tipo AM1. O modelo de interação DNA-HPA usado é baseado na Teoria de Ressonância não sincronizada da ligação covalente (RVB) de L. Pauling, onde essa interação é descrita como uma transferência de elétron entre os orbitais de fronteira HOMO e LUMO. No estudo QSAR foram reproduzidos valores experimentais do LD50 (dose letal para matar 50% de uma população de ratos) com seis modelos matemáticos de regressão validados estatisticamente com 95% de confiança, com destaque para o modelo 4 que reproduziu com erro relativo $< 1\%$ o LD50 do antraceno, benzo[a]antraceno e benzo[a]pireno. A ACP foi refinada utilizando dados eletrônicos de metabólitos dos HPA, obtendo-se uma indicação de que são potencialmente carcinógenos, um resultado importante, uma vez que muitos dos HPA estudados estão no grupo 3 do IARC (*International Agency for Research on Cancer*), ou seja, não estão classificados quanto à sua carcinogenicidade, indicando que eles precisam urgentemente serem reavaliados.

Palavra-chave: Hidrocarboneto policíclico aromático (HPA). Relação quantitativa estrutura-atividade (QSAR). LD50. Análise de componentes principais (ACP). Cálculos AM1.

ABSTRACT

The assessment of the carcinogenic potential of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and their metabolites is performed through Principal Component Analysis (PCA) and Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) by using hydrophobic descriptors (LogP), stereo (volume and surface area) and electronic (E_{adia} , μ and $\Delta E_{\text{L-H}}$). Electronic descriptors were obtained from AM1 (*Austin Model 1*) quantum-chemical calculations. The HPA-DNA interaction model used is based on the unsynchronized resonance of covalent bond theory (RVB) of L. Pauling by considering this process as an electron transfer between the HOMO and LUMO frontier orbitals. The QSAR study reproduces the experimental LD50 values (lethal dose to kill 50% of a population of rat) with six regression mathematical models validated statistically with confidence 95%, especially the model 4, which reproduce LD50 of anthracene, benzo [a] anthracene and benzo [a] pyrene with relative error <1%. The PCA was refined using electronic database of metabolites of PAH, giving indication that are potential carcinogens, an important result, since many of the HPA are in group 3 of the IARC (*International Agency for Research on Cancer*), that is, are not classified according its carcinogenicity, indicating that they need to be urgently reassessed.

Keyword: Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH). Quantitative structure-activity relationship (QSAR). LD50. Principal component analysis (PCA), AM1 calculations.

LISTAS DE FIGURAS

| | Página |
|--|--------|
| Figura 1 Ativação metabólica do benzo[a]pireno com formação de diolepóxidos. | 19 |
| Figura 2 Ativação metabólica do naftaleno via formação de quinona. | 20 |
| Figura 3a Modelo de interação DNA-carcinógeno. | 24 |
| Figura 3b Formação do aduto entre o B(a)P-diolepoxido e guanina. | 24 |
| Figura 4 Os HPA e seus respectivos carcinógenos utilizados na análise. | 30 |
| Figura 5 Os adutos entre a guanina e metabólitos dos HPA. | 31-32 |
| Figura 6 Comportamento do calor de formação ao longo do processo de formação do aduto. | 47 |
| Figura 7 ACP comparando os HPA não metabolizados e os seus metabólitos. | 50 |
| Figura 8 Resultado da ACP comparando metabólitos dos HPA, carcinógenos, não carcinógenos e protetores.. | 53 |
| Figura 9 Valor experimental versus valor calculado obtido com modelo 1. | 58 |
| Figura 10 Análise residual obtido com o modelo 1. | 59 |
| Figura 11 Valor experimental versus valor calculado obtido com modelo 2. | 59 |
| Figura 12 Análise residual obtido com o modelo 2. | 60 |
| Figura 13 Valor experimental versus valor calculado obtido com modelo 3 | 61 |
| Figura 14 Análise residual obtido com o modelo 3. | 61 |
| Figura 15 Valor experimental versus valor calculado obtido com modelo 4. | 62 |
| Figura 16 Análise residual obtido com o modelo 4. | 63 |
| Figura 17 Valor experimental versus valor calculado obtido com modelo 5. | 63 |
| Figura 18 Análise residual obtido com o modelo 5. | 64 |
| Figura 19 Valor experimental versus valor calculado obtido com modelo 6. | 65 |

LISTAS DE TABELAS

| | Página |
|--|--------|
| Tabela 1 Propriedades físico-químicas de alguns HPA. | 15-16 |
| Tabela 2 Substâncias utilizadas no trabalho com a classificação no IARC. | 27 |
| Tabela 3 Comprimento de ligação dos HPA. | 44 |
| Tabela 4 Calores de formação dos HPA, seus metabólitos e adutos com a guanina. | 46 |
| Tabela 5 Descritores eletrônicos para os HPA e seus metabólitos. | 48 |
| Tabela 6 Descritores eletrônicos usados na segunda ACP. | 51-52 |
| Tabela 7 Descritores usados no estudo QSAR e o seu resultado. | 54 |
| Tabela 8. Matriz de colinearidade das variáveis independentes. | 55 |
| Tabela 9 Matriz de correlação entre as variáveis e o Log (LD50) ⁻¹ . | 55 |
| Tabela 10 Resultado da análise QSAR. | 56 |
| Tabela 11 Informações estatísticas dos modelos com n = 8 e 95% de confiança. | 57 |

LISTAS DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------|--|
| HPA | Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos. |
| MM, | Massa molar. |
| g/mol | Grama por mol. |
| PV, | Pressão de vapor. |
| Log $K_{(o/a)}$, | Coeficiente de partição octanol/água (experimentais). |
| S | Solubilidade em água. |
| d | Dias. |
| a | Ano. |
| $\mu\text{g}/\text{kg}$ | Micrograma por quilograma. |
| g | Grama. |
| μg | Micrograma. |
| $\mu\text{g}/\text{L}$ | Micrograma por litro. |
| B(a)P | Benzo[a]Pireno. |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico. |
| 1,2-NQ | 1,2-NaftoQuinona. |
| RNA | Ácido ribonucleico. |
| ACP | Análise de Componentes Principais. |
| QSAR | Relação quantitativa da estrutura-atividade. |
| RVB | Teoria da Ressonância Não-Sincronizada das Ligações Covalentes de Pauling. |
| AM1 | Austin Model 1. |
| LD50 | Dose necessária para matar 50% de uma população de ratos. |
| HOMO | Orbital Ocupado de Maior Energia. |
| LUMO | Orbital Desocupado de Menor Energia. |
| GUA | Guanina. |
| ΔE_{L-H} | Diferença de energia entre orbitais LUMO e HOMO. |
| N7 | Nitrogênio-7. |
| O6 | Oxigênio-6. |
| PC1 | Primeira Componente principal. |
| PC2 | Segunda Componente principal. |
| R | Coeficiente de correlação. |

| | |
|----------------|--|
| s | Desvio-padrão. |
| R^2 | Coefficiente de determinação. |
| teste-F | Teste de Fisher. |
| Q^2 | Coefficiente da validação cruzada. |
| RLM | Regressão Linear Múltipla. |
| IC50 | Concentração Inibitória |
| IARC | Internaitonal Agency for Research on Cancer. |
| ΔH_f | Calores de formação. |
| $E_{A_{adia}}$ | Eletroafinidade adiabática. |
| logP | Coefficiente de partição octanol/água (teóricos). |
| μ | Momento de dipolo. |
| STO | Slater type orbitals. |
| ZDO | Zero Differential Overlap. |
| CNDO | Complete Neglect of Differential Overlap. |
| INDO | Intermediate Neglet of Differential Overlap. |
| NDDO | Neglet of Diatomic Differential Overlap. |
| MINDO/1 | Modified Intermediate Neglect of Differential Overlap Version 1. |
| MINDO/2 | Modified Intermediate Neglect of Differential Overlap Version 2. |
| MINDO/3 | Modified Intermediate Neglect of Differential Overlap Version 3. |
| MNDO | Modified Neglect of Diatomic Overlap. |
| MNDO/d | Modified Neglect of Diatomic Overlap for d orbitals. |
| PM3 | Parametric Method 3. |
| PM5 | Parametric Method 5. |
| RM1 | Recife Model 1. |
| DQF | Departamento de Química Fundamental. |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| Capítulo 1 - Introdução | 15 |
| 1.1 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos | 15 |
| 1.1.1 Propriedades dos HPA | 15 |
| 1.1.2 Fontes de emissão | 16 |
| 1.1.3 Atividade carcinogênica dos HPA | 17 |
| 1.1.3.1 Ativação metabólica dos HPA | 18 |
| 1.2 Estudos químico-quânticos do potencial carcinogênico dos HPA | 21 |
| Capítulo 2 – Objetivos | 22 |
| 2.1 Objetivo Geral | 22 |
| 2.2 Objetivo específicos | 22 |
| Capítulo 3 – Metodologia | 23 |
| 3.1 Modelo RVB de interação HPA-DNA | 23 |
| 3.2 Análises das componentes principais | 25 |
| 3.3 Relação quantitativa de estrutura-atividade | 25 |
| 3.4 Compostos | 27 |
| 3.5 Descritores | 32 |
| 3.6 Métodos computacionais | 34 |
| 3.6.1 Equação de Schrödinger | 34 |
| 3.6.2 Aproximação de Born-Oppenheimer | 36 |
| 3.6.3 O método Hartree-Fock | 37 |
| 3.6.4 Métodos semiempíricos | 38 |
| 3.6.4.1 Método MNDO | 39 |
| 3.6.4.2 Método AM1 (Austin Model 1) | 41 |
| 3.6.5 Programas computacionais | 42 |
| 3.6.6 Otimização das estruturas | 42 |
| Capítulo 4 – Resultado e discussões | 44 |
| 4.1 Estruturas otimizadas | 44 |
| 4.2 Análise de estabilidade de HPA, metabólitos e adutos | 46 |
| 4.3 ACP com HPA e seus metabólitos | 48 |
| 4.4 Avaliação do potencial carcinogênico dos HPA | 50 |
| 4.5 O estudo QSAR | 54 |

| | |
|---|-----------|
| Capítulo 5 – Conclusões e perspectivas | 67 |
| Referências | 69 |

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Hidrocarbonetos Policíclicos aromáticos

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) são uma classe de compostos exaustivamente estudados, devido principalmente ao potencial carcinogênico e mutagênico que as substâncias do grupo e seus derivados apresentam. Neste capítulo descreveremos as propriedades dos HPA, uma vez que elas são importantes na compreensão do comportamento desses compostos no meio biológico e ambiental. Descreveremos também as principais fontes de emissão de HPA e atividade carcinogênica desse grupo, que é o tema desta dissertação. Em seguida apresentaremos as vias de ativação metabólica que os HPA sofrem depois de entrar no organismo. Finalmente faremos uma discussão breve sobre os trabalhos químico-quânticos realizados com a finalidade de investigar o potencial carcinogênico dos HPA.

1.1.1 Propriedades dos HPA

As propriedades físico-químicas exercem papel fundamental na compreensão do comportamento biológico e ambiental dos HPA, por isso algumas dessas propriedades são mostradas na Tabela 1. Uma análise dos dados revelam que os HPA apresentam baixa solubilidade em água, principalmente, aqueles que possuem maior número de anel aromático, por exemplo, o benzo[a]pireno (B(a)P). Além da solubilidade, os valores do coeficiente de partição octanol/água ($\text{Log } K_{(o/a)}$), que indica a afinidade de uma substância por sistemas lipofílicos, mostram que os HPA possuem alto caráter lipofílico, principalmente os de maior massa molar. Na tabela 1 temos o benzo[a]pireno com maior $\text{Log } K_{(o/a)}$.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas de alguns HPA (Adaptada da ref. 1-2). MM, massa molar; PV, pressão de vapor; $\text{Log } K_{(o/a)}$, coeficiente de partição octanol/água; S, solubilidade em água

| Substância | Número de anéis | MM (g/mol) | PV (Pa, 298K) | $\text{Log } K_{(o/a)}$ | S (mg/L) |
|------------|-----------------|------------|---------------|-------------------------|----------|
| Naftaleno | 2 | 128 | 36,8 | 3,37 | 31 |
| Fluoreno | 3 | 166 | 0,71 | 4,18 | 1,9 |
| Fenantreno | 3 | 178 | 0,110 | 4,57 | 1,1 |
| Antraceno | 3 | 178 | 0,078 | 4,54 | 0,045 |

| | | | | | |
|-------------------|---|-----|----------------------|------|-------|
| Acenafteno | 3 | 154 | 0,3 | 3,92 | 3,8 |
| Pireno | 4 | 202 | 0,012 | 5,18 | 0,132 |
| Benzo[a]antraceno | 4 | 228 | $2,80 \cdot 10^{-5}$ | 5,91 | 0,011 |
| Criseno | 4 | 228 | $5,70 \cdot 10^{-7}$ | 5,86 | - |
| Fluoranteno | 4 | 202 | 0,00123 | 5,22 | 0,26 |
| Benzo[a]pireno | 5 | 252 | $2,13 \cdot 10^{-5}$ | 6,04 | 0,004 |

Outro ponto fundamental é a volatilidade dos HPA. Como é de se esperar, a volatilidade diminui com o aumento da massa molar e, conseqüentemente, os HPA de massa molar mais baixa são mais voláteis e apresentam maiores pressões de vapor que os mais pesados¹.

Devido às propriedades físico-químicas e grande distribuição ambiental dos HPA, o risco de contaminação humana por essas substâncias é significativo. Em virtude do alto caráter lipofílico os HPA e seus derivados podem ser absorvidos pela pele, por ingestão ou por inalação, sendo rapidamente distribuídos pelo organismo¹.

1.1.2 Fontes de emissão

Os HPA são emitidos para atmosfera em vários processos largamente empregados, como combustão do material orgânico (principalmente de combustíveis), fumaça de cigarro, incineração de rejeitos, gaseificação do coque e etc. Uma grande parte da quantidade de HPA emitida para o ar é de fonte antropogênica, sendo que a mais importante é o processo de combustão ou pirólise de materiais que contenham carbono e hidrogênio². Existem também fontes significativas com processos que não envolvem a combustão, por exemplo, a produção de alumínio, como indica a comparação nos níveis de concentração de HPA na atmosfera com outras áreas poluídas da indústria e tráfego denso⁴.

Na queima de combustível, os mecanismos de formação e emissão de HPA podem ser classificados em dois processos:

(i) Pirólise que ocorre por aquecimento onde os compostos orgânicos são parcialmente decompostos em fragmentos menores e instáveis;

(ii) Pirossíntese em que os fragmentos formados no processo anterior, levam à formação de HPA mais estável através de reações de recombinação. Isso ocorre, principalmente com radicais livres altamente reativos que possuem tempo de vida médio muito curto.

Os dois mecanismos são responsáveis pela formação de B(a)P e outros HPA nos processos de queima da gasolina, diesel, metano, acetileno, butadieno e outros combustíveis³.

Os HPA estão amplamente distribuídos no ambiente, por isso eles também estão presentes nos alimentos, que contêm níveis significativos desses compostos, geralmente em $\mu\text{g}/\text{kg}$. A presença de HPA ocorre tanto em alimentos crus quanto após o cozimento, sendo que este procedimento pode gerar maiores concentrações de HPA. As principais fontes alimentares são os cereais e vegetais, exceto nos casos onde há alto consumo de churrasco⁵. A presença de diferentes hidrocarbonetos é observada também em outros alimentos, como é o caso do chá-mate e café em pó⁶.

Os HPA também são encontrados em cachaça, rum, uísque e álcool combustível. Observa-se que o naftaleno e o fenantreno são os HPA mais abundantes nas amostras de cachaça e rum, enquanto que no uísque os mais abundantes são o naftaleno e o fluoranteno. Já no álcool combustível o antraceno e o fluoranteno estão presentes em maior quantidade. A formação desses compostos pode ocorrer durante as etapas de produção. A cachaça e rum podem sofrer contaminação devido ao processo de queima da cana-de-açúcar durante a colheita. Outro exemplo é a contaminação a partir dos tonéis de madeira cuja parte inferior foi submetida à queima durante sua confecção⁷.

As fontes de emissão do HPA aumentam a concentração dessas substâncias na atmosfera, e o que se espera em breve é a melhora da qualidade do ar com o controle das emissões³. No caso dos alimentos, a dieta contribui substancialmente para exposição não ocupacional de HPA, já para os não fumantes mais de 70 % de risco é atribuído à dieta⁵. Portanto o controle de formação/emissão dessas substâncias é de fundamental importância para a sociedade.

1.1.3 Atividade carcinogênica dos HPA

Os HPA entram no organismo através da pele, boca e outros pontos de entrada, depois sofrem várias transformações metabólicas, formando os metabólitos com alta natureza eletrofílica denominados carcinógenos efetivos. Esses novos compostos podem interagir como DNA e RNA, criando condições suficientes para sua modificação, o que possibilita o surgimento de tumores⁸.

Em relação aos pontos de entrada no organismo, os HPA são absorvidos rapidamente pelo pulmão, intestino e pele de animais de laboratório. Independente da rota de administração, o padrão de distribuição dentro do corpo é similar depois da administração subcutânea, intravenosa e intratraqueal, tanto em camundongos quanto em ratos³. Os maiores níveis de HPA são encontrados no fígado que é local onde ocorre a biotransformação dessas substâncias,

contudo são observados níveis detectáveis em muitas regiões do organismo como pulmões, pele e trato gastrointestinal⁹. Outra região que poderia apresentar significativos depósitos de estocagem desses compostos devido às suas propriedades físico-químicas é a glândula mamária e o tecido adiposo, entretanto pela rápida degradação por processos metabólicos são demonstrados níveis não significativos de HPA¹⁰.

O B(a)P, um dos HPA mais estudados, pode cruzar rapidamente a barreira placentária de ratos e camundongos, afetando o feto e seu desenvolvimento. Em ratos, foi observado que quase metade da dose oral de B(a)P e pireno foram rapidamente absorvidas e a maior parte dos compostos foi rapidamente metabolizada no fígado. Os HPA penetram rapidamente na pele de camundongos e ratos. No caso do B(a)P é observado que 80% desse composto absorvido pela derme podem ser recuperados nas fezes dos camundongos tratados num período de sete dias, enquanto que em ratos a taxa de recuperação nas fezes é de 42%¹¹. Em relação ao sistema respiratório, os HPA inalados são predominantemente absorvidos sob a forma de fuligem. Eles se depositam nas vias aéreas e depois podem ser eliminados por reflexo bronquial ou podem penetrar nas células do epitélio bronquial, onde são metabolizados².

1.1.3.1 Ativação metabólica dos HPA

Os HPA, depois de absorvido pelo organismo por diversas vias, vão sofrer transformações metabólicas por meio de ativações enzimáticas através do citocromo P450 (CYP1A). Esse processo leva à formação de metabólitos com alta natureza eletrofílica denominados carcinógenos efetivos ou pre-carcinógenos, os quais são capazes de se ligar ao DNA e outras moléculas¹.

Quatro mecanismos foram propostos para elucidar a ativação metabólica sofrida pelos HPA no organismo até formar o metabólito que pode interagir com o material genético:

(a) Oxidação enzimática seguida de hidrólise com a formação de diolepóxidos (é o mecanismo mais aceito)¹²⁻¹⁸;

(b) De-hidrogenação enzimática produzindo quinonas capazes de reagirem diretamente com o DNA ou capazes de reagirem com O₂, gerando espécies oxigenadas reativas que podem atacar o DNA^{12,19-21};

(c) Formação de ésteres benzílicos e eletrofílicos, por meio de uma série de reações de substituição¹²;

(d) Produção de radicais catiônicos através da oxidação enzimática com envolvimento de um elétron¹²;

É importante considerar que esses mecanismos não são excludentes e podem ocorrer simultaneamente¹.

Na Figura 1 temos o exemplo da ativação metabólica do benzo(a)pireno (B(a)P) com formação de diolepóxido que ocorre em três etapas:

(i) A oxidação de uma dupla ligação catalisada por P450 com formação de óxido de areno instável;

(ii) A hidrólise do óxido de areno catalisada por epóxido hidrolase;

(iii) Uma segunda oxidação catalisada por P450 da ligação dupla adjacente ao diol, formando o diolepóxido vicinal que é o metabólito ou carcinógeno efetivo¹².

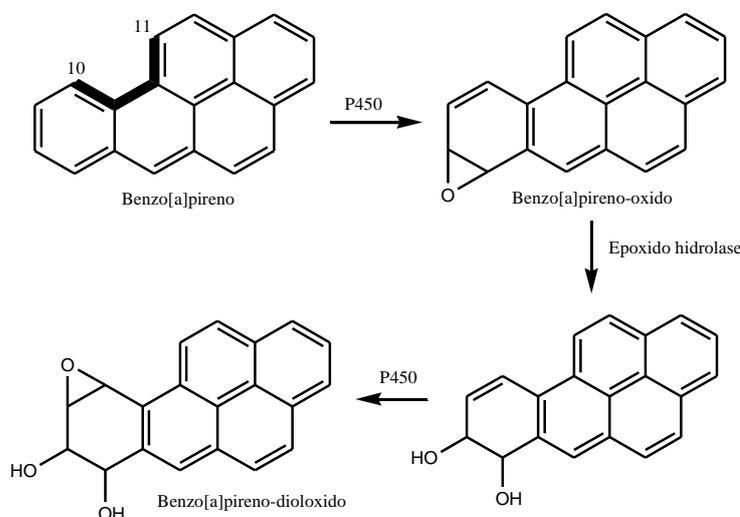


Figura 1. Ativação metabólica do benzo[a]pireno com formação de diolepóxido.

Uma vez formado o metabólito, é provável que ocorra o ataque eletrofílico ao DNA através do mecanismo S_N1 com a formação de carbocátions estáveis, portanto a sua reatividade com o DNA está diretamente ligada à facilidade de formação desses cátions²². Na Figura 1, o diolepóxido formado é o B(a)P-7,8-diol-9,10-epóxido (B(a)P-diolepóxido). Esse metabólito possui maior tendência à carcinogenicidade em relação a outros metabólitos do B(a)P que possuem o anel epóxido em outras posições, ou seja, a interação com o DNA é favorecida quando o B(a)P-7,8-diol-9,10-epóxido é formado na ativação metabólica. Esse comportamento é explicado pela teoria da região de baía (*bay-region*)^{2,23}. A hipótese básica da teoria é que o anel epóxido a ser formado no diol fará parte da região de baía dos HPA, que no caso do B(a)P fica entre as posições 10 e 11, conforme podemos verificar na Figura 1. A região de baía é o

local onde ocorre a perda da ressonância para o envelope aromático, provocando a deslocalização dos elétrons π o que aumenta o caráter eletrofílico da região, favorecendo o processo. Como resultado desse fenômeno a ativação metabólica e a ligação entre HPA e DNA tem maior possibilidade de ocorrer nesta região da estrutura²³. O suporte experimental para a teoria veio de interpretações de dados sobre a carcinogenicidade dos HPA, que indicam uma redução do potencial carcinogênico quando são adicionados radicais metila à região de baía²³.

Para os HPA que não possuem a região de baía, outros caminhos de ativação metabólica podem ocorrer. O naftaleno e benzeno, por exemplo, são ativados via formação de quinona conforme podemos verificar na Figura 2. Esse processo pode ocorrer em quatro etapas¹⁹:

- (i) A oxidação catalisada pelo citocromo P450 com formação de epóxido;
- (ii) A hidrólise do epóxido catalisada por epóxido hidrolase com produção de diois;
- (iii) A desidrogenação catalisada por dihidrodiol desidrogenase;
- (iv) A oxidação formando a quinona.

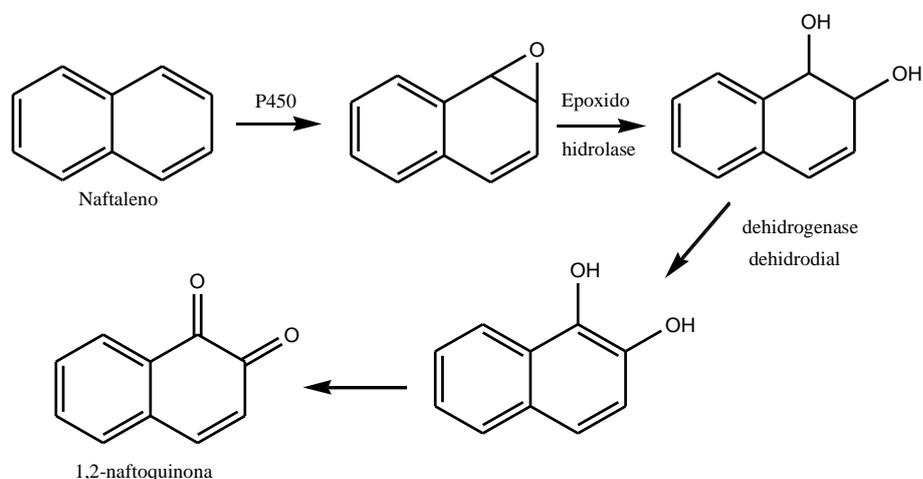


Figura 2. Ativação metabólica do naftaleno via formação de quinona.

A Figura 2 mostra a ativação metabólica do naftaleno com formação do 1,2-naftoquinona (1,2-NQ). Esse metabólito apresenta natureza eletrofílica, logo ele pode se ligar covalentemente aos nucleófilos celulares de DNA e RNA. O Benzeno é ativado metabolicamente de maneira análoga ao naftaleno, formando o catecolquinona²⁰.

1.2 Estudos químico-quânticos do potencial carcinogênico dos HPA

Os HPA e seus derivados estão associados à incidência de câncer no homem, portanto existe um grande esforço da ciência em explicar os diversos aspectos envolvidos no processo carcinogênico/mutagênico no qual essas substâncias participam. Uma das correntes de pesquisa é a utilização da química quântica acoplada à análise multivariada, como Análise de Componentes Principais (ACP) e Relação Quantitativa da Estrutura-Atividade (QSAR). Esse tipo de estudo busca parâmetros (ou descritores) químico-quânticos, obtidos através de cálculos computacionais, que possam relacionar a estrutura química dos HPA com o seu potencial carcinogênico e mutagênico. Nesse sentido inúmeros trabalhos já foram relatados na literatura^{8,24-29}.

Nesse tipo de investigação é necessária a busca de parâmetros físico-químicos que descrevam pontos importantes no processo de carcinogênese química em que os possíveis carcinógenos participam. Essa investigação pode levar aos modelos teóricos mais refinados que possam avaliar cada vez melhor o potencial carcinogênico desses compostos, na perspectiva de classificar essas e outras substâncias em relação a sua carcinogenicidade, principalmente para aquelas que possuem dados teóricos e experimentais insuficientes em relação ao seu efeito carcinogênico.

2.0 OBJETIVO

2.1 Geral

Baseado num modelo RVB de interação DNA-carcinógeno, desenvolver uma avaliação do potencial carcinogênico de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e seus metabólitos através de análise estatística multivariada e do estudo da relação estrutura-atividade, utilizando descritores eletrônicos obtidos com cálculos químico-quânticos do tipo AM1.

2.2 Específicos

- Realizar cálculos do tipo AM1 com otimização de geometria de 18 HPA, seus metabólitos e de respectivos adutos com a base guanina do DNA;
- Analisar a estabilidade dos adutos formados entre HPA e seus metabólitos com a guanina;
- Avaliar o potencial carcinogênico dos HPA e seus metabólitos através da Análise de Componentes Principais (ACP);
- Calcular o LD50 dos HPA usando a relação quantitativa estrutura-atividade (QSAR).

3.0 METODOLOGIA

Nesse capítulo descreveremos o modelo RVB de interação carcinógeno-DNA adotado neste trabalho, bem como os fundamentos básicos dos dois métodos multivariados, ACP e QSAR. Apresentaremos as estruturas dos HPA, seus metabólitos e adutos que foram utilizados no trabalho e os parâmetros usados nas análises realizadas. Em seguida, discutiremos brevemente a metodologia computacional e os conceitos básicos de Química Quântica que foram fundamentais para o desenvolvimento do trabalho.

3.1 Modelo RVB de interação HPA-DNA

No estudo químico-quântico do potencial carcinogênico, é necessário utilizar parâmetros que descrevam bem o processo de interação entre o possível carcinógeno e o material genético. Neste trabalho utilizaremos parâmetros eletrônicos baseados no modelo de interação DNA-carcinógeno proposto por Leão e Pavão²⁹, que combina a Teoria do Orbital Molecular de Fronteira e a Teoria da Ressonância Não-Sincronizada das Ligações Covalentes de Pauling (RVB)³⁰. O modelo descreve a interação DNA-carcinógeno como sendo uma transferência de elétron do HOMO (Orbital Ocupado de Maior Energia) da base do DNA para o LUMO (Orbital Desocupado de Menor Energia) do carcinógeno. A Figura 3 mostra a interação entre DNA, representado pela guanina, e HPA, representado pelo B(a)P-diolepóxido, o metabólito do B(a)P.

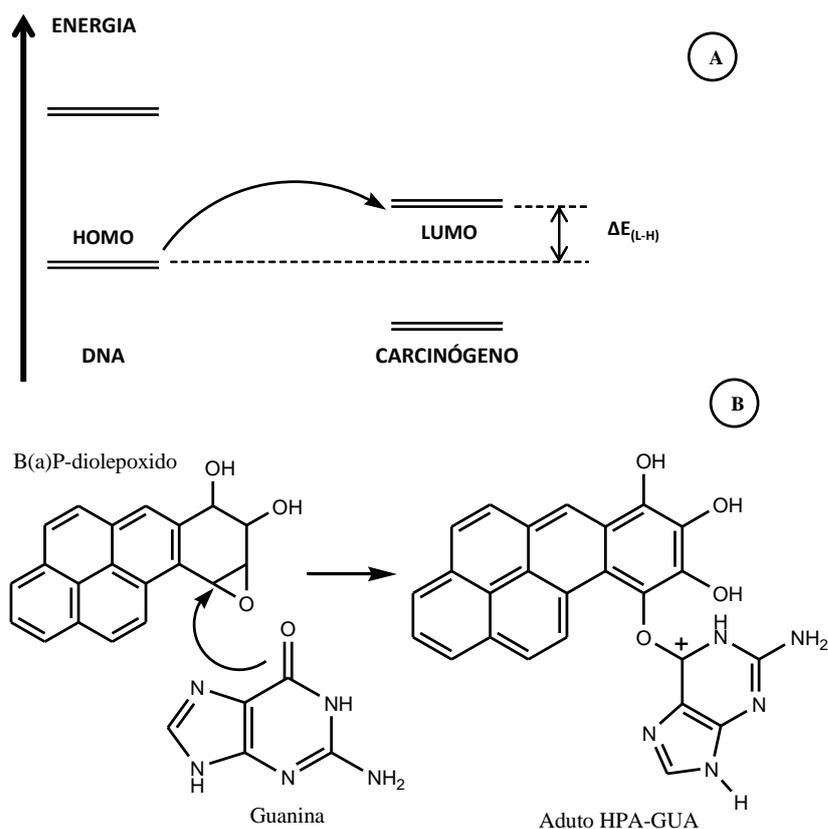


Figura 3. (A) Modelo de interação DNA-carcinógeno. (B) Formação do aduto entre o B(a)P-diolepóxido e guanina.

No processo de interação, a guanina tem caráter nucleofílico, utilizando o seu par de elétrons, enquanto que o B(a)P-diolepóxido tem caráter eletrofílico, recebendo o par de elétrons. Portanto, a interação será mais forte quanto maior for o caráter eletrofílico do B(a)P-diolepóxido. Já do ponto de vista da interação LUMO-HOMO (ΔE_{L-H}), quanto menor a diferença de energia entre eles, mais efetiva será a interação (Figura 3A). O resultado da interação HPA-GUA é a formação da ligação covalente entre essas moléculas, formando um aduto (Figura 3B). A nova ligação modifica o material genético, criando condições para o surgimento de tumores.

A ligação covalente entre carcinógeno e guanina pode se formar no nitrogênio-7 (N7) ou no oxigênio-6 (O6), pois esses são os átomos mais susceptíveis ao ataque oxidante de acordo com Leão, Longo e Pavão³¹. Neste mesmo trabalho, o estudo teórico mostra que o O6 da guanina possui maior carga negativa do que o N7, sugerindo uma maior atração entre o oxigênio e o átomo do carcinógeno que a ligação será formada. Assim sendo, neste trabalho consideramos que a guanina interagiu com o HPA através do seu átomo de oxigênio conforme Figura 3B, na qual temos um aduto formado pela ligação HPA-guanina no O6. O modelo de

interação apresentado já foi utilizado com sucesso para avaliar o potencial carcinogênico de várias substâncias^{8,32-36}.

3.2 Análises das Componentes Principais

A ACP é uma análise muito útil para separar informações importantes quando temos um grande conjunto de dados distribuídos numa série de variáveis químicas e biológicas. Sendo assim, ela é usada na tentativa de escolher o conjunto de dados mais representativo por meio de combinações lineares das variáveis originais, reconhecendo assim, alguns padrões que os dados possivelmente apresentam. Matematicamente, a ACP corresponde a fatoração da matriz \mathbf{X} dos dados originais com n pontos (HPA) e p parâmetros. Esse procedimento consiste na diagonalização da matriz de covariância \mathbf{XtX} em que \mathbf{Xt} é a transposição da matriz \mathbf{X} . Os autovalores da ACP são denominados pesos e representam a contribuição de cada eixo original na componente formada, o qual é chamada de componente principal. A PC1 (primeira componente principal) descreve o eixo de maior variância e a PC2 (segundo componente principal), ortogonal à PC1, representa o eixo com a segunda maior variância e assim por diante. Esses eixos representam um padrão que permite relacionar as variáveis com o potencial carcinogênico^{8,35,37}.

3.3 Relação quantitativa de estrutura-atividade

O estudo QSAR tem como principal objetivo a construção de modelos matemáticos que relacionem a estrutura química e a atividade biológica das substâncias³⁸. A ação biológica de uma substância é dependente de suas interações com o meio biológico, conseqüentemente, é dependente de fatores relacionados com a sua estrutura química, portanto com suas propriedades físico-químicas. Essas propriedades que podem ser de caráter eletrônico, hidrofóbico ou estéreo podem ser utilizadas para prever a atividade biológica das substâncias³⁹.

Na construção do modelo temos o conjunto de dados que contém os valores da atividade biológica \mathbf{Y} e das m variáveis descritivas \mathbf{X} referentes aos n compostos. O conjunto de dados será utilizado para determinar modelos matemáticos, que em geral são lineares e multidimensionais, representados genericamente pela equação 1.

$$\hat{Y} = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + \dots + b_kX_k \quad (1)$$

Nessa equação, \hat{Y} representa os valores previstos da atividade biológica, X_1, X_2, \dots, X_k representam as propriedades físico-químicas e $b_0, b_1, b_2, \dots, b_k$ são os coeficientes de ajuste, que podem ser obtidos através da regressão linear múltipla (RLM). Com a equação podemos prever a atividade biológica como a concentração inibitória (IC50), o LD50 e etc.³⁸.

Um modelo QSAR depois de ser desenvolvido necessita de validação estatística, assim como qualquer outro método estatístico, no caso dele, a avaliação consiste em verificar se a especificação do modelo adapta-se convenientemente aos dados observados. A validação pode ser dividida em três partes:

- (i) Avaliação do grau de ajuste;
- (ii) Avaliação do grau de confiança;
- (iii) Avaliação do grau de previsibilidade.

O grau de ajuste é medido em termos da capacidade do modelo em reproduzir os valores experimentais, uma vez que desejamos modelos que reproduzam valores com os menores desvios possíveis. Essa avaliação é feita através do cálculo do coeficiente de correlação (R), do desvio-padrão (s), do coeficiente de determinação (R^2) e da análise de dispersão dos pontos em relação à reta de regressão no gráfico. O que se espera de um modelo em relação ao grau de ajuste é que ele apresente R com o valor mais próximo de um e desvio próximo de zero. Já o coeficiente de determinação que expressa a capacidade do modelo em explicar a variabilidade dos valores experimentais, também deve ser próximo de um para bons modelos QSAR⁴⁰.

O gráfico de atividade experimental em função da atividade calculada deve apresentar os pontos bem alinhados, tanto em relação à reta ajustada quanto ao longo do intervalo de valores estudados, indicando que os valores experimentais e calculados apresentam boa concordância e que o modelo está bem ajustado. A dispersão dos valores residuais deve apresentar característica aleatória, assim a análise visual gráfica deve mostrar pontos dispersos aleatoriamente. Além disso, os valores precisam estar distribuídos em torno do zero, que corresponde à linha horizontal central, indicando que o modelo está bem ajustado⁴⁰.

O grau de significância é medido através da execução do teste de validação, ou seja, teste estatístico de hipótese que pode ser feito por meio do teste de Fisher (teste-F) com 95% ou 99% de confiança. Um bom modelo deve apresentar valor de $F_{\text{calculado}}$ maior que o de F_{Tabelado} . O p-valor também é usado na avaliação do grau de significância, ele expressa o erro envolvido na afirmação da hipótese de que o modelo é estatisticamente significativo. Portanto, um bom modelo deve possuir p-valor menor que 0,05 para 95% de confiança⁴¹.

O grau de previsibilidade do modelo é testado por meio da validação cruzada (*cross validation*), essa avaliação é muito útil quando se deseja comparar a capacidade de previsão de dois modelos, o que apresentar maior coeficiente de correlação da validação cruzada (Q^2) possuirá maior grau de previsibilidade. Contudo não existem regras que estabeleçam, em termos absolutos, se o grau de previsibilidade é bom ou ruim, essa avaliação é feita quando existe interesse de comparar dois modelos em relação ao seu grau de previsão⁴¹.

3.4 Compostos

As substâncias estudadas estão listadas na Tabela 2 e suas estruturas químicas mostradas nas Figuras 4 e 5. Essas substâncias estão separadas em seis grupos distintos:

- (i) HPA não metabolizados e benzeno, substâncias 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 e 18;
- (ii) Os metabólitos, substâncias 1.1, 2.1, 3.1, 4.1, 5.1, 6.1, 7.1, 8.1, 9.1, 10.1, 11.1, 12.1, 13.1, 14.1, 15.1, 16.1, 17.1 e 18.1;
- (iii) Os adutos formados entre os metabólitos e a guanina, substâncias 1.2, 2.2, 3.2, 4.2, 5.2, 6.2, 7.2, 8.2, 9.2, 10.2, 11.2, 12.2, 13.2, 14.2, 15.2, 16.2, 17.2 e 18.2;
- (iv) Não carcinógenos, substâncias 19 até 26;
- (v) Carcinógenos, substâncias 27 até 29;
- (vi) Protetores, 30 e 31.

Tabela 2. Substâncias utilizadas no trabalho com a classificação no IARC

| Número | Composto | Classificação | | Número | Composto | Classificação IARC |
|--------|--|--------------------|--|--------|-------------------------------|--------------------|
| | | IARC ⁴¹ | | | | |
| 1 | Antraceno | 3 | | 12.1 | Benzo[b]fluoreno-diolpepoxido | - |
| 1.1 | Antracenoquinona | - | | 12.2 | Benzo[b]fluoreno-guanina | |
| 1.2 | Antraceno-guanina | - | | 13 | Trifenileno | 3 |
| 2 | Benzo[a]antraceno | 2B | | 13.1 | Trifenileno-diolepoxido | - |
| 2.1 | Benzo[a]antraceno-diolepoxido ^{13,14} | - | | 13.2 | Trifenileno-guanina | - |
| 2.2 | Benzo[a]antraceno-guanina ^{13,14} | - | | 14 | Naftaceno | - |
| 3 | Pireno | 3 | | 14.1 | Naftacenoquinona | - |
| 3.1 | Pirenoquinona | - | | 14.2 | Naftaceno-guanina | - |
| 3.2 | Pireno-guanina | - | | 15 | Benzo[a]fluoreno | 3 |
| 4 | Fluoranteno | 3 | | 15.1 | Benzo[a]fluoreno-diolepoxido | - |

| | | | | | |
|------|---|----|------|------------------------------------|----|
| 4.1 | Fluoranteno-diolepoxido ⁴³ | - | 15.2 | Benzo[a]fluoreno-guanina | - |
| 4.2 | Fluoranteno-guanina | - | 16 | Naftaleno | 2B |
| 5 | Benzeno | 1 | 16.1 | 1,2-Naftoquinona ¹⁹⁻²⁰ | - |
| 5.1 | Catecolquinona ²⁰⁻²¹ | - | 16.2 | Naftaleno-guanina ¹⁹⁻²⁰ | - |
| 5.2 | Benzeno-guanina | - | 17 | Dibenzo[a,c]antraceno | 3 |
| 6 | Benzo[a]pireno | 1 | 17.1 | Dibenzo[a,c]antraceno-diolepoxido | - |
| 6.1 | Benzo[a]pireno-diolepoxido ^{13,15-17,42} | - | 17.2 | Dibenzo[a,c]antraceno-guanina | - |
| 6.2 | Benzo[a]pireno-guanina ^{13,15-17} | - | 18 | Dibenzo[a,h]antraceno | 2A |
| 7 | Fenantreno | 3 | 18.1 | Dibenzo[a,h]antraceno-diolepoxido | - |
| 7.1 | Fenantreno-diolepoxido | - | 18.2 | Dibenzo[a,h]antraceno-guanina | - |
| 7.2 | Fenantrano-guanina | - | 19 | Glicose | - |
| 8 | Acenafteno | 3 | 20 | Sacarose | - |
| 8.1 | Acenaftenoquinona | - | 21 | Frutose | - |
| 8.2 | Acenafteno-guanina | - | 22 | Água | - |
| 9 | Criseno | 2B | 23 | Glicerol | - |
| 9.1 | Criseno-diolepoxido | - | 24 | Leucina | - |
| 9.2 | Criseno-guanina | - | 25 | Lactose | - |
| 10 | Fluoreno | 3 | 26 | Galactose | - |
| 10.1 | Fluoreno-diolepoxido | - | 27 | Tetracloro de carbono | 2B |
| 10.2 | Fluoreno-guanina ¹⁶ | - | 28 | 2-naftilamina | 1 |
| 11 | Benzo[e]pireno | 3 | 29 | 4-aminobifenil | 1 |
| 11.1 | Benzo[e]pireno-diolepoxido ⁴² | - | 30 | Resveratrol-H | - |
| 11.2 | Benzo[e]pireno-guanina | - | 31 | Acetilsalicilato | - |
| 12 | Benzo[b]fluoreno | 3 | | | |

Grupo 1 = Cancerígeno para os seres humanos;

Grupo 2A = Provavelmente cancerígeno para os seres humanos;

Grupo 2B = Possivelmente cancerígeno para os seres humanos;

Grupo 3 = Não classificável quanto à sua carcinogenicidade para seres humanos;

Grupo 4 = Provavelmente não cancerígeno para os seres humanos.

No primeiro grupo da tabela 2, algumas substâncias já são classificadas como carcinogênicas, por exemplo, o benzeno e o benzo[a]pireno, os quais estão classificados no Grupo 1 da lista da IARC (*International Agency for Research on Cancer*), indicando que são carcinógenos definitivos em humanos. Temos o dibenzo[a,h]antraceno que recentemente foi incluído no Grupo 2A, indicando que ele é um provável carcinógeno com evidências limitadas em humanos e suficientes em animais. Temos também o benzo[a]antraceno, o criseno e o naftaleno que se classificam no Grupo 2B, indicando que são possíveis carcinógenos com

evidências limitadas em humanos e animais. Contudo a maioria dos HPA do primeiro grupo da Tabela 2 (HPA não metabolizado e benzeno) se classificam no Grupo 3 da IARC, ou seja, eles não são classificados quanto à sua carcinogenicidade, nesses casos, o estudo teórico é fundamental para determinar o potencial carcinogênico destas substâncias.

No segundo grupo da tabela 2, temos os metabólitos que são formados no processo de ativação metabólica dos HPA. As vias utilizadas como base para construir as moléculas foram duas:

(i) Oxidação enzimática com formação de diolepóxidos para aqueles HPA que possuem região de baía que é o local mais provável da reação ocorrer, por exemplo, o benzo[a]pireno e benzo[a]antraceno;

(ii) Desidrogenação enzimática, produzindo quinonas para aqueles HPA que não possuem região de baía, por exemplo, naftaleno e benzeno, conforme mostra a Figura 4.

No caso dos HPA que apresentaram mais de um metabólito possível através da ativação enzimática foi usada a estrutura mais estável, com base no calor de formação calculado.

O grupo três da Tabela 2 é composto por adutos formados entre o metabólito de cada HPA estudado e a guanina. Essas estruturas são teóricas e foram construídas formando uma ligação covalente entre as estruturas da guanina e do metabólito. A posição da ligação foi determinada com base nas vias de ativação metabólica usadas para a formação destes metabólitos. Os HPA que possuem a região de baía tiveram a ligação realizada nesse ponto, já que a interação com o DNA é favorecida nessa região de acordo com a teoria da região de baía²³. Para os HPA que não possuem esta região utilizamos a via de formação de quinona, realizando a ligação no local viável do ponto de vista químico e que deixasse a estrutura mais estável.

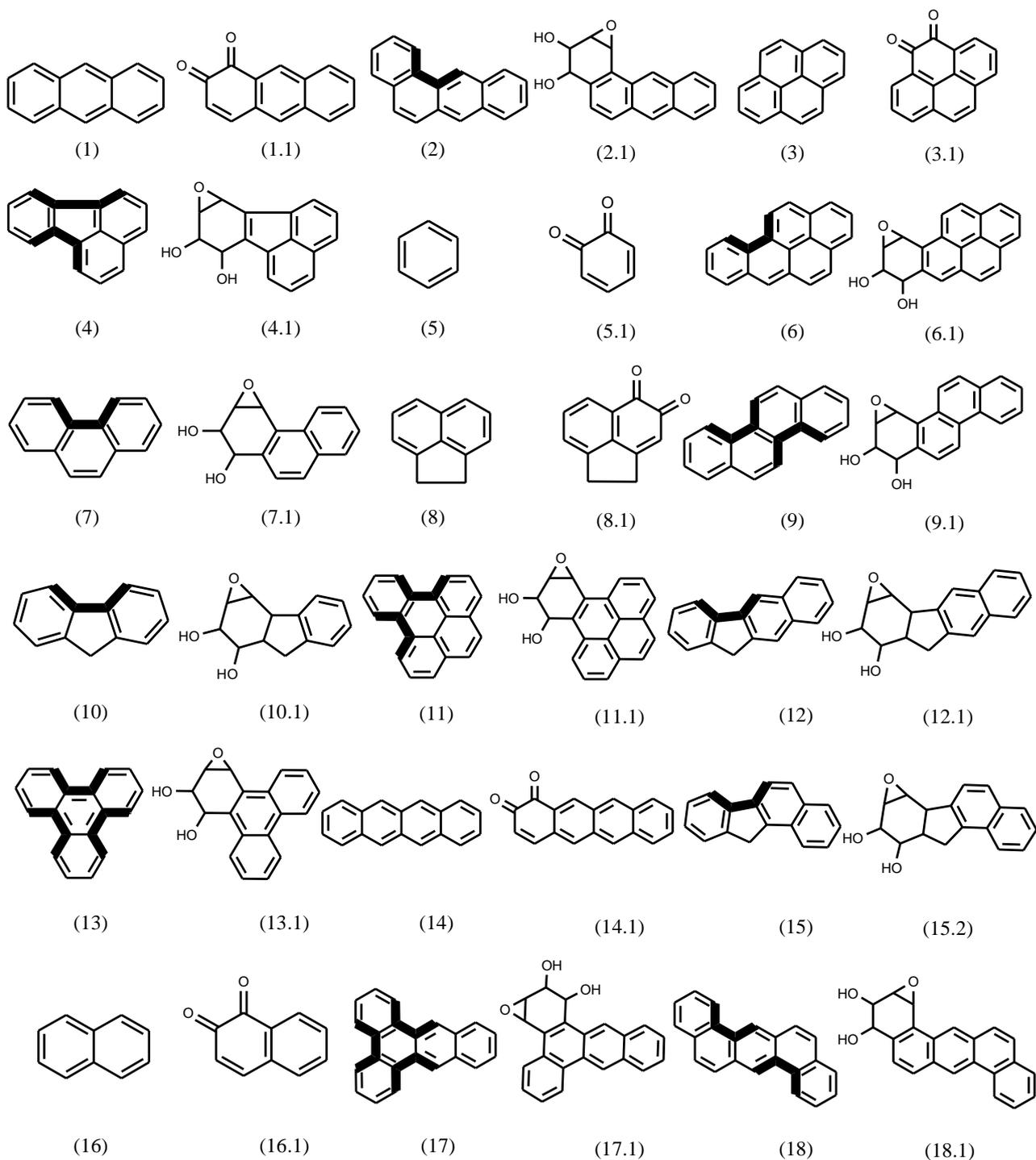
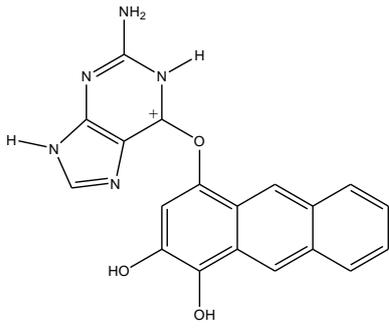
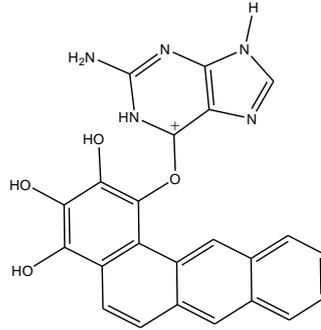


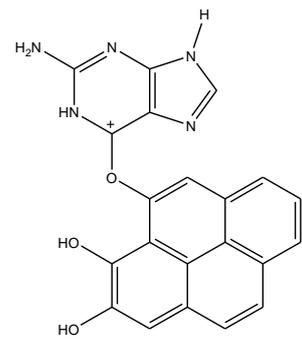
Figura 4. Os HPA e seus respectivos metabólitos utilizados na análise. Os HPA que apresentam a região de baía estão destacados.



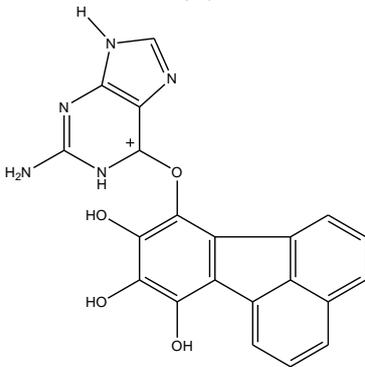
(1.2)



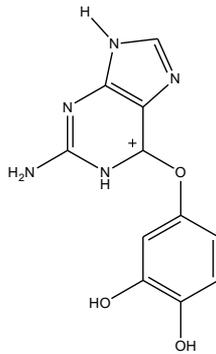
(2.2)



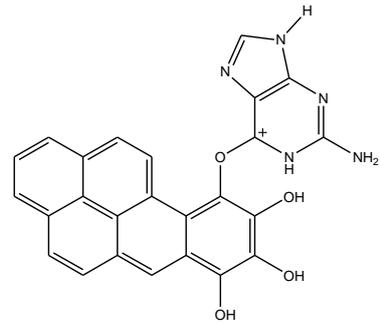
(3.2)



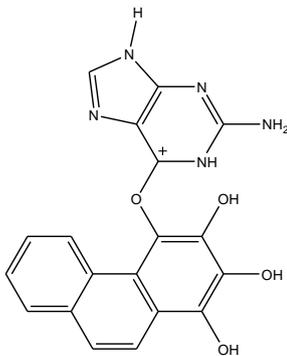
(4.2)



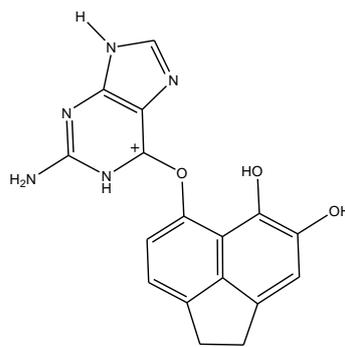
(5.2)



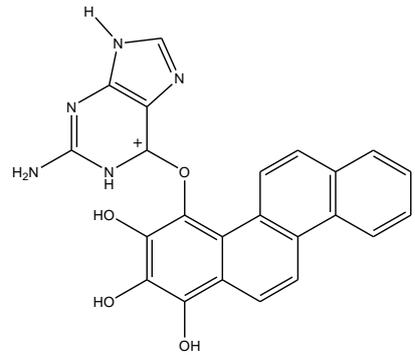
(6.2)



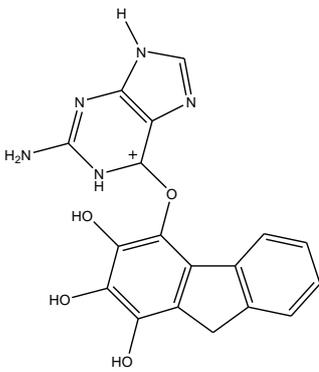
(7.2)



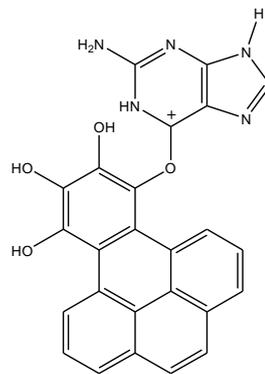
(8.2)



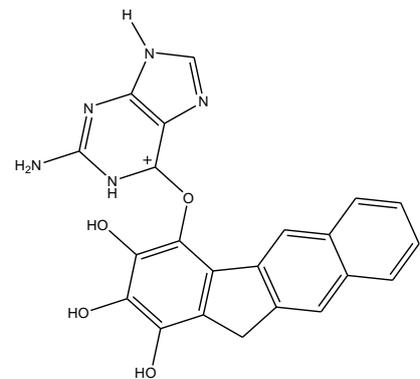
(9.2)



(10.2)



(11.2)



(12.2)

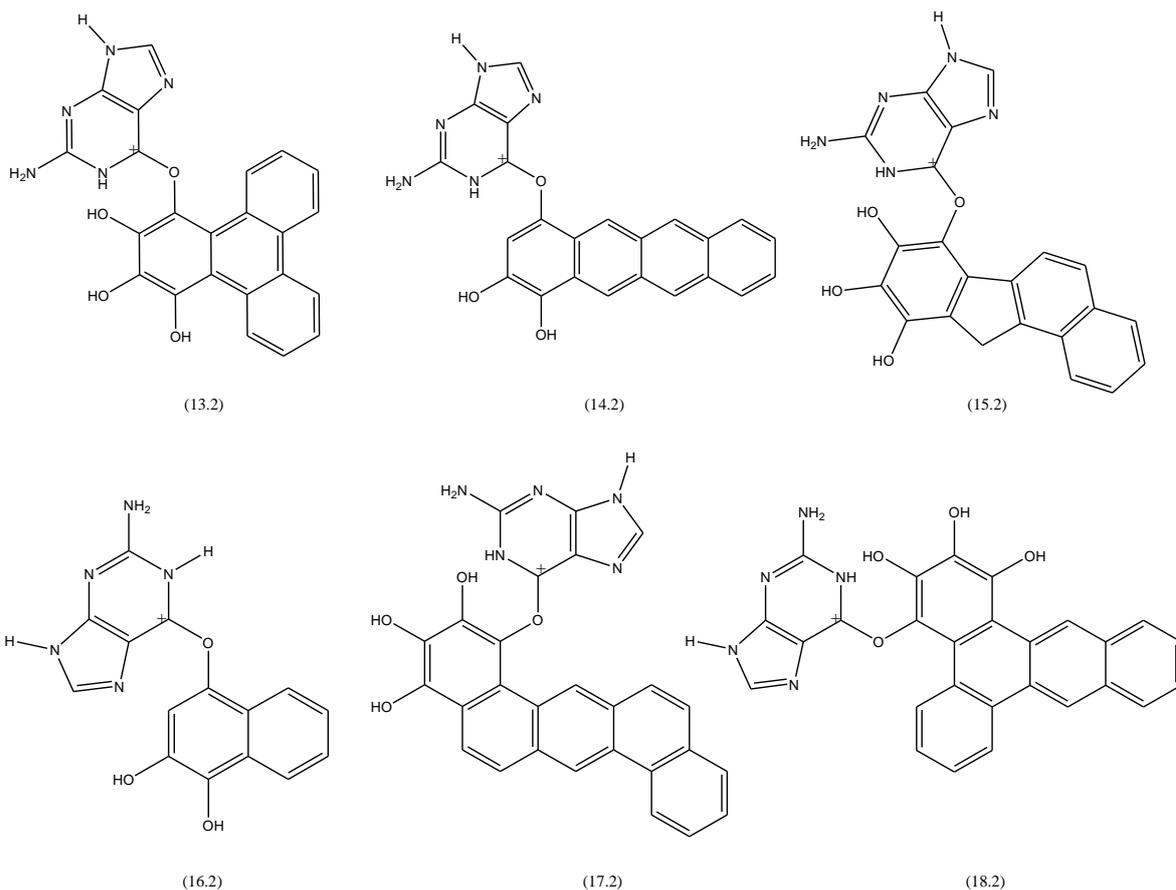


Figura 5. Os adutos entre a guanina e metabólitos dos HPA.

O grupo dos não carcinógenos (substâncias 19 até 27), carcinógenos (substâncias 27 até 29) e protetores (substâncias 30 e 31) citados na Tabela 2 são os padrões que serão utilizados para separar os HPA em grupos, classificando-os quanto à sua carcinogenicidade. Os protetores são substâncias antioxidantes que competem com o DNA (guanina) na doação de elétrons para o carcinógeno, ou seja, eles possuem maior facilidade de doar os seus elétrons, dessa forma eles conseguem proteger o DNA das substâncias cancerígenas. Os protetores usados foram acetilsalicilato e resveratrol-H⁴⁴.

3.5 Descritores

O estudo do processo de ativação metabólica e formação de adutos foi realizada comparando os calores de formação (ΔH_f) calculados dos HPA não metabolizados, metabólitos e adutos. O ΔH_f é uma boa estimativa da estabilidade química de uma molécula⁴⁵, por isso foi utilizado para realizar a comparação. Uma estrutura será mais estável quanto menor for o seu ΔH_f .

A análise de componentes principais foi realizada com os compostos listados na Tabela 2. Os adutos entre HPA e guanina não foram utilizados na ACP, visto que para realizar a análise seria necessário também as informações dos adutos entre a guanina e as substâncias de outros grupos, como os não carcinógenos e protetores. Esses adutos não puderam ser construídos, uma vez que é muito difícil, por exemplo, a água se ligar à guanina, portanto a ACP foi realizada excluindo os dados dos adutos.

A ACP foi dividida em duas partes, a primeira foi uma comparação entre os 18 HPA e seus respectivos metabólitos, utilizando os parâmetros eletroafinidade adiabática (EA_{adia}), interação LUMO-HOMO ($\Delta E_{\text{L-H}}$) e calor de formação (ΔH_f). A segunda foi uma comparação entre os HPA, os não carcinógenos, os carcinógenos e os protetores, usando os parâmetros coeficiente de partição octanol/água ($\log P$), momento de dipolo (μ), EA_{adia} e $\Delta E_{\text{L-H}}$. Nessa análise os valores de $\log P$ e μ utilizados para os HPA foram calculados a partir das estruturas dos HPA não metabolizados, enquanto que os valores de EA_{adia} e $\Delta E_{\text{L-H}}$ utilizados foram calculados a partir das estruturas dos metabólitos. A combinação de dados teve a finalidade de refinar o modelo teórico, visto que a estrutura que irá interagir diretamente com o HPA é o metabólito.

O estudo QSAR foi realizado com os 16 HPA não metabolizados listados na Tabela 2, utilizando os parâmetros área superficial, volume molecular, $\log P$, EA_{adia} e $\Delta E_{\text{L-H}}$. A variável dependente empregada como atividade biológica foi o LD50, que expressa a toxicidade aguda do composto. Deste modo os dados dos descritores serão usados para reproduzir os valores de LD50 experimentais dos HPA.

Os descritores μ , $\log P$, área superficial, volume molecular, EA_{adia} e $\Delta E_{\text{L-H}}$ foram selecionados para o estudo da ACP e do QSAR, porque descrevem bem processos fundamentais como a entrada e o transporte do carcinógeno no meio celular, o acoplamento do composto com o receptor e a interação química com o DNA (guanina)^{45,46}. O $\log P$ é um parâmetro hidrofóbico que descreve o transporte do HPA no meio biológico e sua facilidade de interação com a membrana celular, portanto a facilidade dessa substância em penetrar na célula⁴⁶. O μ também descreve a capacidade de transporte do HPA e sua facilidade de entrar na célula⁸.

Os descritores área superficial e volume molecular são parâmetros estéreos associados à facilidade de encaixe do HPA no receptor, que neste trabalho é o DNA. Esses descritores também estão relacionados à polarizabilidade e dureza molecular, propriedades formuladas de acordo com o conceito de ácido e base de Lewis, que auxiliam a interpretação dos mecanismos de interação entre um composto e seu receptor biológico⁴⁵. Os parâmetros EA_{adia} e $\Delta E_{\text{L-H}}$

descrevem a interação DNA-HPA de acordo com o modelo adotado neste trabalho. A $E_{A_{adia}}$ descreve o caráter eletrofílico do HPA, indicando a sua facilidade em receber elétrons, ela foi calculada usando a diferença $E_{neutra} - E_{ânion}$. A ΔE_{L-H} foi calculada por meio da diferença de energia entre o LUMO do HPA e o HOMO da guanina, descrevendo a interação entre HPA e DNA, representado pela guanina. A interação será mais efetiva quanto menor for a ΔE_{L-H} .

3.6 Métodos computacionais

O objetivo principal da Química Quântica é a obtenção de soluções da equação de Schrödinger por meio de um conjunto de técnicas computacionais, a fim de determinar precisamente as propriedades de sistemas atômicos e moleculares. As técnicas computacionais possibilitam avaliar e prever características como a energia mínima de uma molécula e suas propriedades físico-químicas, que são fundamentais na compreensão de vários processos importantes.

Existem dois principais métodos computacionais utilizados no cálculo de propriedades moleculares e eles classificam-se em semiempírico e *ab initio*. No método *ab initio* as equações são resolvidas sem qualquer aproximação, enquanto nos semiempíricos as soluções são geradas utilizando dados experimentais ou aproximações.

3.6.1 Equação de Schrödinger

As propriedades associadas à estrutura eletrônica de uma molécula são obtidas através da solução da equação de Schrödinger independente do tempo (equação 2), que fornece a descrição quântica dos estados eletrônicos estacionários do sistema⁴⁷⁻⁴⁸.

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

Na equação 2, \hat{H} é o operador hamiltoniano do sistema de partículas, Ψ é a função de onda de um estado molecular total e E é a energia do estado. Essas três componentes contêm todas as informações sobre o estado do sistema que elas descrevem. A função de onda Ψ possui um número complexo, logo não possui significado físico. Segundo o postulado de interpretação probabilística de Born, o produto da função de onda pelo seu complexo conjugado corresponde

à probabilidade \mathbf{P} de encontrar uma partícula em um dado volume ($d\tau = r^2 \sin \theta dr d\theta d\phi$, no caso de coordenadas esféricas) em um determinado ponto \mathbf{x} , conforme equação 3:

$$P = \Psi^* \Psi d\tau \quad (3)$$

A máxima probabilidade de encontrar uma partícula nesse determinado espaço em um tempo \mathbf{t} , denominado densidade de probabilidade ou distribuição de probabilidade, é dada pela equação 4:

$$\int_{-\infty}^{\infty} |\Psi|^2 d\tau = 1 \quad (4)$$

Para determinar a energia total do sistema, o primeiro passo é estabelecer o hamiltoniano para seu conjunto de núcleos e elétrons, no qual todas ou a maioria das interações existentes sejam consideradas. O hamiltoniano molecular considerando núcleos e elétrons como massas pontuais e desprezando as interações relativísticas é dado pela equação 5 que também pode ser escrita como a equação 6:

$$H_{tot} = T_N + T_e + V_{ee} + V_{eN} + V_{NN} \quad (5)$$

$$\hat{H} = - \sum_a \frac{1}{2M_a} \nabla_a^2 - \sum_i \frac{1}{2} \nabla_i^2 + \sum_i \sum_{j>i} \frac{1}{r_{ij}} - \sum_i \sum_a \frac{Z_a}{r_{ia}} + \sum_{a<b} \frac{Z_a Z_b}{r_{ab}} \quad (6)$$

O primeiro termo da equação 5 e 6 expressa a energia cinética dos núcleos, que é denominado por \mathbf{T}_N , sendo \mathbf{M}_a a massa do núcleo \mathbf{a} e ∇_a^2 o operador gradiente relativo às coordenadas eletrônicas. O segundo termo é a energia cinética dos elétrons (\mathbf{T}_e), onde ∇_i^2 é o operador gradiente relativo às coordenadas nucleares. O terceiro termo representa a energia potencial de repulsão entre os elétrons (\mathbf{V}_{ee}) e \mathbf{r}_{ij} expressa a distância entre o elétron \mathbf{i} e \mathbf{j} . O quarto termo expressa a energia potencial de interação coulombiana atrativa (\mathbf{V}_{eN}) entre elétrons e núcleos, sendo \mathbf{Z}_a a carga do núcleo \mathbf{a} e \mathbf{r}_{ia} a distância entre o elétron \mathbf{i} e o núcleo \mathbf{a} . Finalmente, o quinto termo expressa a energia potencial de repulsão entre os núcleos (\mathbf{V}_{NN}), onde \mathbf{Z}_a e \mathbf{Z}_b refere-se à carga do núcleo \mathbf{a} e \mathbf{b} , respectivamente, e \mathbf{r}_{ab} a distância entre o núcleo \mathbf{a} e \mathbf{b} ⁴⁸.

A aplicação do hamiltoniano apresentado para sistemas moleculares resulta em solução exata, apenas para o caso diatômico, no restante dos casos a solução exata não é factível, tornando necessária a utilização de simplificações na finalidade de descrever sistemas multiatômicos que envolvem grande número de variáveis, mesmo que seja de maneira aproximada⁴⁷.

3.6.2 Aproximação de Born-Oppenheimer

Segundo Born e Oppenheimer uma das formas de simplificar a equação 6 é separar o movimento dos núcleos e dos elétrons. Isso é feito mantendo-se os núcleos fixos durante cada ciclo do movimento eletrônico, o que é conhecido como aproximação de Born-Oppenheimer⁴⁸. Desse modo podemos reescrever o hamiltoniano total do sistema molecular para núcleos fixos como sendo a soma de uma parte eletrônica e outra nuclear, como mostra a equação 7:

$$\hat{H} = \hat{H}_{(elétrons)} + \hat{H}_{(núcleos)} \quad (7)$$

A função de onda total do sistema, que é autofunção da equação de schrödinger, como sendo um produto das funções de onda nuclear e eletrônica, é descrita na equação 8:

$$\hat{H} = - \sum_{i=1}^N \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}} \quad (8)$$

Nesta expressão Z_A é número atômico do núcleo A , r_{ij} é a distância entre os elétrons i e j , e r_{iA} a distância entre o elétron i e o núcleo a , N e M indicam, respectivamente, os números de elétrons e núcleos do sistema. A aproximação realizada por Born e Oppenheimer resultou em uma simplificação considerável, entretanto a equação de Schrödinger somente será resolvida de maneira exata para sistemas monoelétrônicos, visto que para sistemas polieletrônicos o termo repulsão elétron-elétron torna a solução da equação inviável.

3.6.3 O método Hartree-Fock

A solução para o problema eletrônico que impossibilita a resolução exata da equação de Schrödinger foi proposta por Douglas Rayner Hartree e Vladimir Fock⁴⁷⁻⁴⁸, sendo conhecida como método Hartree-Fock (HF). A ideia do método é combinar o princípio variacional com a suposição de que a função de onda que descreve o sistema molecular é um determinante de Slater. Deste modo podemos dizer que a melhor função de onda (mais próxima da solução exata) é aquela que conduz a um valor médio mínimo do operador hamiltoniano, que nesse contexto é um funcional dos spin-orbitais moleculares. Outro conceito importante desse método é o limite de Hartree-Fock, que é a menor energia que um átomo ou molécula pode assumir. Do ponto de vista operacional, quando qualquer aumento do tamanho da base ou da qualidade das funções não produz uma diminuição de energia, o limite teria sido atingido.

O maior desafio do método HF era selecionar quais as funções matemáticas adequadas para representar os orbitais de Hartree-Fock, por isso foi necessário o seu aperfeiçoamento. Sendo assim C. C. J. Roothaan propôs que cada orbital, atômico ou molecular, poderia ser descrito como uma combinação linear de um conjunto de funções de base obtida através do procedimento do campo autoconsistente (HF-SCF-LCAO-MO), esse método ficou conhecido como Hartree-Fock-Roothaan⁴⁸. A equação 9 mostra a combinação linear de orbitais atômicos.

$$\Psi_i = \sum_{k=1}^n C_{ik} \chi_k \quad (9)$$

O C_{ik} é o coeficiente da combinação linear e χ_k são as n funções de base usadas na expansão, as quais são funções conhecidas. Os coeficientes C_{ik} são determinados através da desigualdade representada pela equação 10.

$$\frac{\langle \Psi | \hat{H} | \Psi \rangle}{\langle \Psi | \Psi \rangle} \geq E_0 \quad (10)$$

O \hat{H} é o hamiltoniano exato do sistema. Para encontrar o melhor conjunto de coeficientes C_{ik} deve-se minimizar o valor esperado da energia, E_0 , até atingir um valor mínimo, e a partir daí encontrar soluções para a função de onda, determinando a energia do estado fundamental de um sistema, sem resolver a equação de Schrödinger de forma exata.

3.6.4 Métodos semiempíricos

Os métodos semiempíricos são assim denominados porque além das constantes universais, existem também parâmetros empíricos, que foram introduzidos com a finalidade de diminuir o tempo computacional sem tornar os resultados muito diferentes em relação aos valores experimentais⁴⁸.

Atualmente os métodos semiempíricos vêm sendo utilizados com certa eficiência, em várias situações, das quais podemos citar três⁴⁷:

(i) O cálculo de muitas moléculas pequenas, objetivando o estudo de efeitos de substituintes na formulação de fármacos;

(ii) Cálculos repetitivos para um mesmo sistema, como em simulações que combinam os métodos semiempíricos e dinâmica molecular ou Monte Carlo;

(iii) Cálculo de moléculas gigantes, por exemplo, proteínas.

Todos os casos citados fogem da capacidade de serem tratados por métodos *ab initio*⁴⁷.

Os vários métodos semiempíricos diferem na abordagem teórica utilizada, na aproximação integral adotada, nas expressões usadas nos cálculos das inúmeras integrais necessárias e no procedimento de parametrização⁴⁷.

Os métodos semiempíricos procuram solucionar aproximações às equações de Hartree-Fock-Roothan (equação 9), utilizando parâmetros ou resultados experimentais a fim de tornar fácil a resolução das equações. Geralmente, utilizam um conjunto de base formado por funções do tipo Slater (STOs – *Slater type orbitals*). Uma das aproximações que apresentam impacto no custo computacional é conhecida como aproximação ZDO (*Zero Differential Overlap*). Essa aproximação considera nulo o produto de dois orbitais atômicos diferentes, o que implica em reduzir a equação generalizada de autovalores Hartree-Fock-Roothan, a uma forma mais simplificada, levando à sua resolução a partir de uma simples diagonalização da matriz de Fock.⁴⁷

O primeiro método semiempírico foi desenvolvido por Hückel em 1930 para tentar explicar o comportamento particular de hidrocarbonetos aromáticos e insaturados, onde apenas elétrons π eram considerados nos cálculos. Posteriormente, os métodos semiempíricos foram se aperfeiçoando com ajustes na parte de cálculo, possibilitando resultados cada vez mais aproximados dos valores experimentais.

O método Pariser-Parr-Pople, por exemplo, foi desenvolvido em 1953 com a finalidade de ajustar o método Hückel. Em 1965 o método CNDO (*Complete Neglect of Differential*

Overlap) foi publicado por Pople e colaboradores. Este método considera todos os elétrons de valência, mas desconsidera todas as integrais de repulsão eletrônica que possuam produtos envolvendo orbitais atômicos diferentes. Em 1967 surgiu o aperfeiçoamento do método CNDO, denominado método INDO (*Intermediate Neglect of Differential Overlap*) que inclui integrais do tipo troca quando todos os orbitais estão centrados no mesmo centro^{47,48}.

O método NDDO (*Neglect of Diatomic Differential Overlap*) foi proposto em 1965 sendo um aperfeiçoamento do método INDO, omitindo nas formulações as integrais de recobrimento (ou de superposição) diatômicas centradas em átomos diferentes⁴⁸. A aproximação NDDO é a que considera uma maior quantidade de integrais, portanto é uma melhor aproximação do que os métodos INDO e CNDO⁴⁷.

Na busca por métodos mais eficazes para descrever propriedades de sistemas moleculares, em 1969, Dewar e colaboradores propuseram o método MINDO/1 (*Modified Intermediate Neglect of Differential Overlap Version 1*). Nesse método foram incluídos parâmetros que possibilitaram a determinação de calores de formação, o mais próximo possível dos dados experimentais. Logo depois surgiu o método MINDO/2 que incluiu na parametrização as geometrias das moléculas e, posteriormente, surgiu o seu aperfeiçoamento, o método MINDO/3. Entretanto, ele ainda não era eficiente em reproduzir algumas propriedades moleculares, como calor de formação para sistemas aromáticos e sistemas com triplas ligações⁴⁷.

Em 1977, o método NDDO foi modificado por Dewar e colaboradores, surgindo o método MNDO (*Modified Neglect of Diatomic Overlap*)⁴⁸. Esse método é o ponto de partida para os métodos semiempíricos mais modernos existentes⁴⁷.

3.6.4.1 Método MNDO

As bases usadas no método MNDO são funções STO formadas por um orbital s e três orbitais p para cada átomo, exceto para o hidrogênio. As expressões para os elementos da matriz de Fock para moléculas de camada fechada e para átomos possuindo esse conjunto de bases, são dadas por⁴⁷:

$$F_{\mu\mu} = H_{\mu\mu} + \sum_v^A P_{vv} \left[(\mu\mu|vv) - \frac{1}{2} (\mu v|\mu v) \right] + \sum_B \sum_{\lambda\sigma}^B P_{\lambda\sigma} (\mu\mu|\lambda\sigma) \quad (11)$$

$$F_{\mu\nu} = H_{\mu\nu} + \frac{1}{2}P_{\mu\nu}[3(\mu\nu|\mu\nu) - (\mu\mu|\nu\nu)] + \sum_B \sum_{\lambda\sigma} P_{\lambda\sigma}(\mu\nu|\lambda\sigma) \quad \therefore \mu, \nu \in A \quad (12)$$

$$F_{\mu\lambda} = H_{\mu\lambda} - \frac{1}{2} \sum_{\nu}^A \sum_{\sigma}^B P_{\nu\sigma}(\mu\nu|\lambda\sigma) \quad \therefore \mu \in A \quad \lambda \in B \quad (13)$$

$$P_{\lambda\sigma} = \sum_i^{occ} c_{\lambda i}^* c_{\sigma i} \quad (14)$$

A equação 11 é aplicada para elementos da diagonal da matriz de Fock, ou seja, quando $\mu = \nu$. Contudo se μ e ν são diferentes e estão localizados no mesmo centro, aplicamos, para estes elementos fora da diagonal, a equação 12. Caso μ e λ estejam em centros diferentes, os elementos da matriz de Fock correspondes são obtidos através da equação 13. Nas três situações (equação 11-13), o termo $P_{\lambda\sigma}$ é determinado por meio da equação 14.

Com a matriz de Fock e da densidade conhecidas podemos determinar a energia total e, conseqüentemente, o calor de formação para o sistema estudado. Esse parâmetro é transformado e, a partir daí, utilizado em outros métodos semiempíricos que se baseiam no método MNDO. A transformação ocorre somando à energia total, uma parcela que diz respeito aos átomos que compõe a molécula, de acordo com a equação 15.

$$\Delta H_f^{mol} = E_{tot} + \sum_A (\Delta H_f^A - E_{el}^A) \quad (15)$$

Na equação 15, ΔH_f^A é o calor de formação experimental dos elementos A em seus estados padrões e o termo E_{el} representa a energia eletrônica dos átomos constituintes, calculado usando os parâmetros ajustados.

No método MNDO foram introduzidos várias integrais de aproximação, como a integral de um elétron e um centro denominado hamiltoniano de caroço, $U_{\mu\mu}$, que pode ser determinado através da equação 16. A integral de um elétron e dois centros, $H_{\mu\lambda}$, mais conhecida como integral de ressonância, que pode ser calculada por meio da equação 17. Finalmente, as integrais de repulsão caroço-caroço do par de átomos envolvidos, E_N , que pode ser calculada pela equação 18 para os pares N-H e O-H e pela equação 19 para os demais átomos.

$$H_{\mu\mu} = U_{\mu\mu} - \sum_{B \neq A} (\mu\mu | s_B s_B) \quad (16)$$

$$H_{\mu\lambda} = \frac{1}{2} S_{\mu\lambda} (\beta_\mu + \beta_\lambda) \quad (17)$$

$$E_N(A, H) = Z_A Z_H (s_A s_A | s_H s_H) (1 + R_{AH} e^{-\alpha_A R_{AH}} + e^{-\alpha_H R_{AH}}) \quad (18)$$

$$E_N(A, B) = Z_A Z_B (s_A s_A | s_B s_B) (1 + e^{-\alpha_A R_{AB}} + e^{-\alpha_B R_{AB}}) \quad (19)$$

O método MNDO possibilitou a correção de muitos problemas que o método MINDO/3 apresentava, contudo não descreveu bem as ligações de hidrogênio, propriedade importante para a maioria dos processos biológicos. Além disso, as energias de ativação obtidas com o método eram tendenciosamente superestimadas^{47,48}.

3.6.4.2 Método AM1 (*Austin Model 1*)

O método AM1⁴⁹ foi criado em 1985 por Dewar e colaboradores para solucionar os defeitos do método NDDO. A grande inovação do método AM1 foi a inclusão de funções Gaussianas esféricas nas integrais de repulsão *core-core*, (equação 20), justificáveis pelo fato de que o MNDO possuía tendência à superestimar as repulsões entre os átomos. As funções Gaussianas permitiu descrever, entre outras coisas, ligações de hidrogênio para alguns casos em sistemas biológicos⁴⁷.

$$E_N(A, B) = E_N^{MNDO}(A, B) + \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \left(\sum_k a_{kA} e^{-b_{kA} (R_{AB} - c_{kA})^2} \sum_l a_{lB} e^{-b_{lB} (R_{AB} - c_{lB})^2} \right) \quad (20)$$

Na equação 20, o termo $E_N^{MNDO}(\mathbf{A}, \mathbf{B})$ é a integral de repulsão *core-core* determinada pelo método MNDO e o segundo termo é a inclusão das funções Gaussianas implementado pelo método AM1. Nesta equação **a**, **b** e **c** são os coeficientes ajustáveis que definem a intensidade, largura e posição das funções Gaussianas, respectivamente⁴⁷.

Outros métodos semiempíricos foram criados como PM3 (*Parametric Method 3*), que é idêntico ao AM1, exceto pelo conjunto de parâmetros. O método MNDO/d que incluiu orbitais d no seu conjunto de dados. O PM5 (*Parametric Method 5*) que é uma extensão do PM3. O

modelo Sparkle (*Sparkle Model for the Calculation of Lanthanide Complexes*) o qual tem sido bastante aplicado para prever propriedades de complexos de lantanídeos. O método RM1 (*Recife Model 1*), que é semelhante ao AM1, contudo foi parametrizado de forma mais elaborada. Os dois últimos métodos citados foram desenvolvidos no Departamento de Química Fundamental (DQF) da UFPE.

Neste trabalho realizaremos cálculos AM1, visto que eles descrevem bem propriedades dos sistemas aqui estudados, como será mostrado no capítulo 4.

3.6.5 Programas computacionais

Todos os descritores, exceto o LogP, foram obtidos a partir de cálculos semiempíricos AM1 (*Austin Modelo 1*)⁴⁹ através do programa MOPAC 2012⁵⁰⁻⁵², usando as estruturas químicas otimizadas. O MOPAC é um dos programas implementados com métodos semiempíricos mais conhecidos e existem versões que podem ser usadas tanto em Linux como em Windows, possuindo versões comerciais e gratuitas⁴⁸.

O descritor logP foi calculado para todas as substâncias, usando o *software* ALOGPS 2.1⁵⁹ encontrado na plataforma VCCLAB⁵⁴, enquanto que ACP e QSAR foram desenvolvidos no *software* STATISTICA 8.0.

3.6.6 Otimização das estruturas

Otimizar a estrutura molecular significa manipular as principais variáveis, que podem ser usadas para minimizar a energia de uma molécula, por exemplo, as distâncias interatômicas, os ângulos entre três átomos e os ângulos diedros. Os mínimos de energia podem ser locais ou globais. Quando dizemos que certa estrutura encontra-se no mínimo global, significa que ela apresenta a menor energia em uma superfície de potencial e deve ser a mais próxima da molécula real.

Uma estrutura em um mínimo local apresenta uma energia baixa, contudo ainda possui energia maior que a do mínimo global⁴⁸, portanto é necessário averiguar se a estrutura final realmente está em um mínimo global. Isso é possível utilizando dados cristalográficos experimentais, como comprimento de onda e ângulo diedro, que podem ser comparados com os valores calculados a partir das estruturas otimizadas, esse procedimento pode garantir que a otimização ocorreu de forma eficaz.

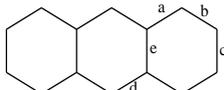
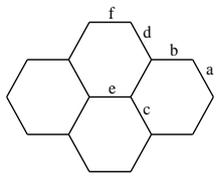
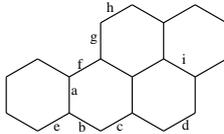
4.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES

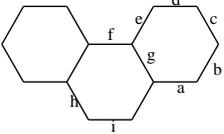
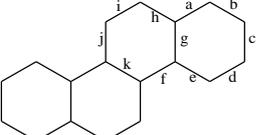
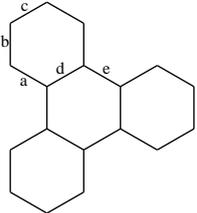
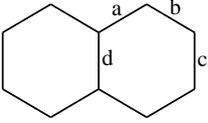
Neste capítulo será apresentado o resultado das estruturas otimizadas, utilizando cálculos químico-quânticos com método AM1, bem como a análise de estabilidade dos HPA, metabólitos e adutos usando o calor de formação. O resultado da ACP com a separação de HPA e seus metabólitos em carcinógenos ou não carcinógenos também será mostrado, assim como os modelos de regressão desenvolvidos com a finalidade de reproduzir o LD50 dos 16 HPA estudados.

4.1 Estruturas otimizadas

A Tabela 3 mostra a comparação entre os comprimentos de ligação calculados a partir de algumas estruturas otimizadas e os valores experimentais.

Tabela 3. Comprimento de ligação dos HPA^{46,55}

| Composto | Ligação | Comprimento de ligação (Å) | | Desvio |
|---|---------|----------------------------|-------|--------|
| | | Exp | Calc | |
| Antraceno  | a | 1,444 | 1,433 | -0,011 |
| | b | 1,375 | 1,365 | -0,010 |
| | c | 1,418 | 1,426 | 0,008 |
| | d | 1,405 | 1,399 | -0,006 |
| | e | 1,433 | 1,429 | -0,004 |
| Pireno  | a | 1,395 | 1,393 | -0,002 |
| | b | 1,406 | 1,401 | -0,005 |
| | c | 1,425 | 1,419 | -0,006 |
| | d | 1,438 | 1,440 | 0,002 |
| | e | 1,430 | 1,433 | 0,003 |
| | f | 1,367 | 1,357 | -0,010 |
| Benzo[a]pireno  | a | 1,410 | 1,420 | 0,010 |
| | b | 1,418 | 1,418 | 0,000 |
| | c | 1,361 | 1,378 | 0,017 |
| | d | 1,342 | 1,351 | 0,009 |
| | e | 1,425 | 1,422 | -0,003 |
| | f | 1,436 | 1,433 | -0,003 |
| | g | 1,423 | 1,434 | 0,011 |

| | | | | |
|---|---|-------|-------|--------|
| | h | 1,352 | 1,362 | 0,010 |
| | i | 1,415 | 1,424 | 0,009 |
| Fenantreno | | | | |
|  | a | 1,423 | 1,413 | -0,010 |
| | b | 1,386 | 1,380 | -0,006 |
| | c | 1,394 | 1,406 | 0,012 |
| | d | 1,401 | 1,381 | -0,020 |
| | e | 1,409 | 1,414 | 0,005 |
| | f | 1,465 | 1,446 | -0,019 |
| | g | 1,420 | 1,416 | -0,004 |
| | h | 1,453 | 1,435 | -0,018 |
| | i | 1,350 | 1,357 | 0,007 |
| Criseno | | | | |
|  | a | 1,428 | 1,441 | 0,013 |
| | b | 1,363 | 1,416 | 0,053 |
| | c | 1,394 | 1,427 | 0,033 |
| | d | 1,381 | 1,362 | -0,019 |
| | e | 1,409 | 1,430 | 0,021 |
| | f | 1,468 | 1,441 | -0,027 |
| | g | 1,409 | 1,416 | 0,007 |
| | h | 1,421 | 1,427 | 0,006 |
| | i | 1,369 | 1,362 | -0,007 |
| | j | 1,428 | 1,430 | 0,002 |
| Trifenileno | | | | |
|  | a | 1,410 | 1,410 | 0,000 |
| | b | 1,381 | 1,385 | 0,004 |
| | c | 1,397 | 1,399 | 0,002 |
| | d | 1,413 | 1,415 | 0,002 |
| | e | 1,458 | 1,452 | -0,006 |
| Naftaleno | | | | |
|  | a | 1,422 | 1,422 | 0,000 |
| | b | 1,371 | 1,373 | 0,002 |
| | c | 1,412 | 1,416 | 0,004 |
| | d | 1,420 | 1,412 | -0,008 |

Percebe-se que os valores estão em concordância, indicando que as moléculas otimizadas estão no mínimo de energia global em uma superfície de potencial. Assim, podem ser utilizadas para obter os parâmetros necessários para realizar a análise.

4.2 Análise de estabilidade de HPA, metabólitos e adutos.

O processo de ativação enzimática levando à formação de metabólitos e posteriormente originando adutos foi analisado usando os calores de formação. A Tabela 4 mostra os calores de formação obtidos através de cálculo AM1, ela contém o ΔH_f dos HPA não metabolizados (nM), metabólitos (M) e Adutos. Os valores $\Delta H_{f(1)}$, $\Delta H_{f(2)}$ e $\Delta H_{f(3)}$ correspondem a diferença de ΔH_f entre M – nM, Aduto – M e Aduto – nM, respectivamente.

Tabela 4. Calores de formação dos HPA, seus metabólitos e adutos com a guanina

| Número | HPA | ΔH_f (kcal/mol) | | | | | |
|--------|-----------------------|--------------------------|--------------------|--------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | | Não metabolizado (nM) | Metabólitos (M) | Aduto | $\Delta H_{f(1)}$ | $\Delta H_{f(2)}$ | $\Delta H_{f(3)}$ |
| 1 | Antraceno | 62,762 | 5,239 | 47,108 | -57,523 | 41,869 | -15,655 |
| 2 | Benzo[a]antraceno | 78,042 | -34,675 | 20,556 | -112,717 | 55,231 | -57,485 |
| 3 | Pireno | 67,165 | 21,413 | 52,829 | -45,752 | 31,416 | -14,335 |
| 4 | Fluoranteno | 87,740 | -17,257 | 34,226 | -104,997 | 51,483 | -53,515 |
| 5 | Benzeno | 21,955 | -22,735 | 16,699 | -44,690 | 39,434 | -5,256 |
| 6 | Benzo[a]pireno | 87,286 | -25,374 | 26,251 | -112,660 | 51,625 | -61,035 |
| 7 | Fenantreno | 57,283 | -52,151 | 4,416 | -109,434 | 56,567 | -52,866 |
| 8 | Acenafteno | 42,453 | -13,232 | 32,191 | -55,685 | 45,423 | -10,262 |
| 9 | Criseno | 76,007 | -34,916 | 20,887 | -110,923 | 55,803 | -55,120 |
| 10 | Fluoreno | 54,210 | -47,503 | 0,162 | -101,713 | 47,665 | -54,048 |
| 11 | Benzo[e]pireno | 83,764 | -22,059 | 30,139 | -105,823 | 52,198 | -53,625 |
| 12 | Benzo[b]fluoreno | 71,817 | -32,929 | 16,227 | -104,746 | 49,156 | -55,590 |
| 13 | Trifenileno | 75,291 | -31,463 | 24,989 | -106,754 | 56,452 | -50,302 |
| 14 | Naftaceno | 86,740 | 27,385 | 62,577 | -59,355 | 35,192 | -24,163 |
| 15 | Dibenzo[a]fluoreno | 73,981 | -28,187 | 17,479 | -102,168 | 45,666 | -56,503 |
| 16 | Naftaleno | 40,468 | -13,109 | 30,906 | -53,577 | 44,015 | -9,562 |
| 17 | Dibenzo[a,c]antraceno | 95,315 | -15,966 | 28,325 | -111,281 | 44,291 | -66,990 |
| 18 | Dibenzo[a,h]antraceno | 93,949 | -19,134 | 35,653 | -113,083 | 54,787 | -58,296 |

$$\Delta H_{f(1)} = M - nM;$$

$$\Delta H_{f(2)} = \text{Aduto} - M;$$

$$\Delta H_{f(3)} = \text{Aduto} - nM.$$

Percebe-se que o benzeno ($\Delta H_f = 21,955$ kcal/mol) é o composto mais estável entre os estudados. Os dados mostram que o calor de formação aumenta em geral com o número de

anéis na cadeia (peso molecular), logo os compostos com os maiores valores são dibenzo[a,c]antraceno ($\Delta H_f = 95,315$ kcal/mol) e dibenzo[a,h]antraceno ($\Delta H_f = 93,949$ kcal/mol). Essa observação já é esperada, visto que cadeias maiores devem possuir maiores valores de ΔH_f .

A Figura 6 mostra o comportamento do calor de formação encontrado para o processo de ativação metabólica e, posteriormente, a formação da ligação covalente entre o metabólito e a guanina. Nota-se que todos os metabólitos são mais estáveis que os HPA não metabolizados que os originam, mesmo considerando rotas metabólicas diferentes. Este resultado é baseado na análise dos dados da Tabela 4.

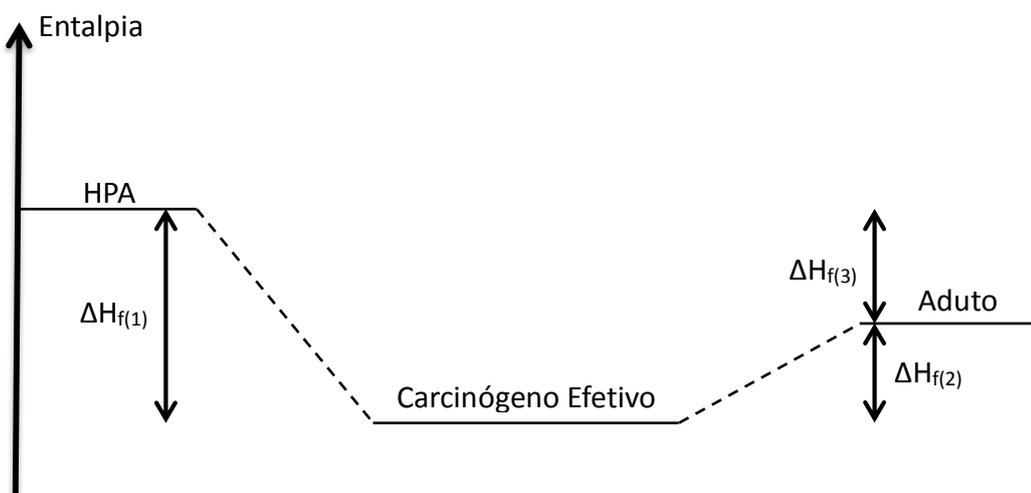


Figura 6. Comportamento do calor de formação ao longo do processo de formação do aduto.

A partir da análise dos calores de formação dos adutos formados entre o metabólito e a guanina, observa-se que todos eles são mais estáveis do que os HPA de partida. Essa informação está contida nos valores de $\Delta H_{f(3)}$, que indica a diferença entre os calores de formação do aduto e do HPA não metabolizado. O efeito é mais pronunciado para benzo[a]pireno ($\Delta H_{f(3)} = -61,035$ kcal/mol) e benzo[a]antraceno ($\Delta H_{f(3)} = -57,485$ kcal/mol) e menos pronunciado para benzeno ($\Delta H_{f(3)} = -5,256$ kcal/mol) e naftaleno ($\Delta H_{f(3)} = -9,562$ kcal/mol).

Os resultados sugerem que a formação dos metabólitos partindo dos HPA é favorecida do ponto de vista de estabilidade, assim como a formação dos adutos. Todavia existem outros parâmetros importantes que devem ser considerados na investigação do processo de carcinogênese química, como propriedades eletrônicas e estéricas.

4.3 ACP com HPA e seus carcinógenos efetivos

A Tabela 5 mostra os dados obtidos com cálculos AM1 para os HPA e seus metabólitos usados na ACP.

Tabela 5. Descritores eletrônicos para os HPA (ΔH_f , EA_{adia} e ΔE_{L-H}) e seus metabólitos (ΔH_f^* , EA_{adia}^* e ΔE_{L-H}^*)

| Número | HPA | ΔH_f (kcal·mol ⁻¹) | ΔH_f^* (kcal·mol ⁻¹) | EA_{adia} (eV) | EA_{adia}^* (eV) | ΔE_{L-H} (eV) | ΔE_{L-H}^* (eV) |
|--------|-----------------------|---|---|---------------------|-----------------------|--------------------------|----------------------------|
| 1 | Antraceno | 62,762 | 5,239 | 0,840 | 1,429 | 7,680 | 7,091 |
| 2 | Benzo[a]antraceno | 78,042 | -34,675 | 0,814 | 1,201 | 7,706 | 7,319 |
| 3 | Pireno | 67,165 | 21,413 | 1,683 | 2,057 | 7,591 | 6,463 |
| 4 | Fluoranteno | 87,740 | -17,257 | 0,929 | 1,280 | 7,591 | 7,240 |
| 5 | Benzeno | 21,955 | -22,735 | -0,555 | 1,663 | 9,075 | 6,857 |
| 6 | Benzo[a]pireno | 87,286 | -25,374 | 1,111 | 1,071 | 7,409 | 7,449 |
| 7 | Fenantreno | 57,283 | -52,151 | 0,408 | 0,564 | 8,112 | 7,956 |
| 8 | Acenafteno | 76,007 | -13,232 | 1,462 | 1,410 | 7,845 | 7,110 |
| 9 | Criseno | 76,007 | -34,916 | 0,675 | 0,616 | 7,845 | 7,904 |
| 10 | Fluoreno | 54,210 | -47,503 | 0,219 | 0,303 | 8,301 | 8,217 |
| 11 | Benzo[e]pireno | 83,764 | -22,059 | 0,855 | 0,987 | 7,665 | 7,533 |
| 12 | Benzo[b]fluoreno | 71,817 | -32,929 | 0,488 | 0,639 | 8,032 | 7,881 |
| 13 | Trifenileno | 75,291 | -31,463 | 0,453 | 0,629 | 8,067 | 7,891 |
| 14 | Naftaceno | 86,740 | 27,385 | 1,234 | 1,453 | 7,286 | 7,067 |
| 15 | Benzo[a]fluoreno | 73,981 | -28,187 | 0,561 | 0,594 | 7,959 | 7,926 |
| 16 | Naftaleno | 40,468 | -13,109 | 0,265 | 1,518 | 8,255 | 7,002 |
| 17 | Dibenzo[a,c]antraceno | 95,315 | -15,966 | 0,797 | 1,107 | 7,723 | 7,413 |
| 18 | Dibenzo[a,h]antraceno | 93,949 | -19,134 | 0,805 | 1,073 | 7,715 | 7,447 |

Analisando a Tabela podemos perceber que a EA_{adia} aumenta para os metabólitos formados, ou seja, eles apresentam um maior caráter eletrofílico em relação aos HPA não metabolizados, indicando o aumento na facilidade de receber os elétrons do DNA. O maior aumento ocorreu entre benzeno e seu metabólito, sugerindo que este último apresenta um caráter eletrofílico muito maior que o primeiro. É importante considerar que o benzeno já é uma substância classificada como carcinogênica pelo IARC (Tabela 2), por isso apresenta um metabólito com alto caráter eletrofílico.

O descritor ΔE_{L-H} (metabólito-guanina) diminuiu para os metabólitos formados, mostrando que a interação entre ele e o DNA é mais efetiva do que entre os HPA não

metabolizados e o DNA. Essas observações são um forte indício de que a possibilidade dos HPA não metabolizados interagirem diretamente com o material genético é pequena. Portanto, estes HPA precisariam ser metabolizados no organismo para formar substâncias com maior caráter eletrofílico e maior facilidade de interação LUMO-HOMO com o DNA.

As equações 21 e 22 mostram a contribuição dos parâmetros na primeira componente principal (PC1) e na segunda componente principal (PC2), respectivamente.

$$PC1 = -0,22 \Delta H_f + 0,97 EA_{\text{adia}} - 0,98 \Delta E_{L-H} \quad (21)$$

$$PC2 = 0,97 \Delta H_f + 0,16 EA_{\text{adia}} - 0,07 \Delta E_{L-H} \quad (22)$$

Verifica-se que os descritores EA_{adia} e ΔE_{L-H} possuem maior contribuição na PC1 e o ΔH_f tem maior contribuição na PC2. Uma análise do gráfico (Figura 7) sugere que a PC2 contribuiu mais efetivamente para a separação dos compostos em dois grupos, entretanto a PC1 também é importante, visto que a separação só ocorre quando PC1 e PC2 estão combinadas.

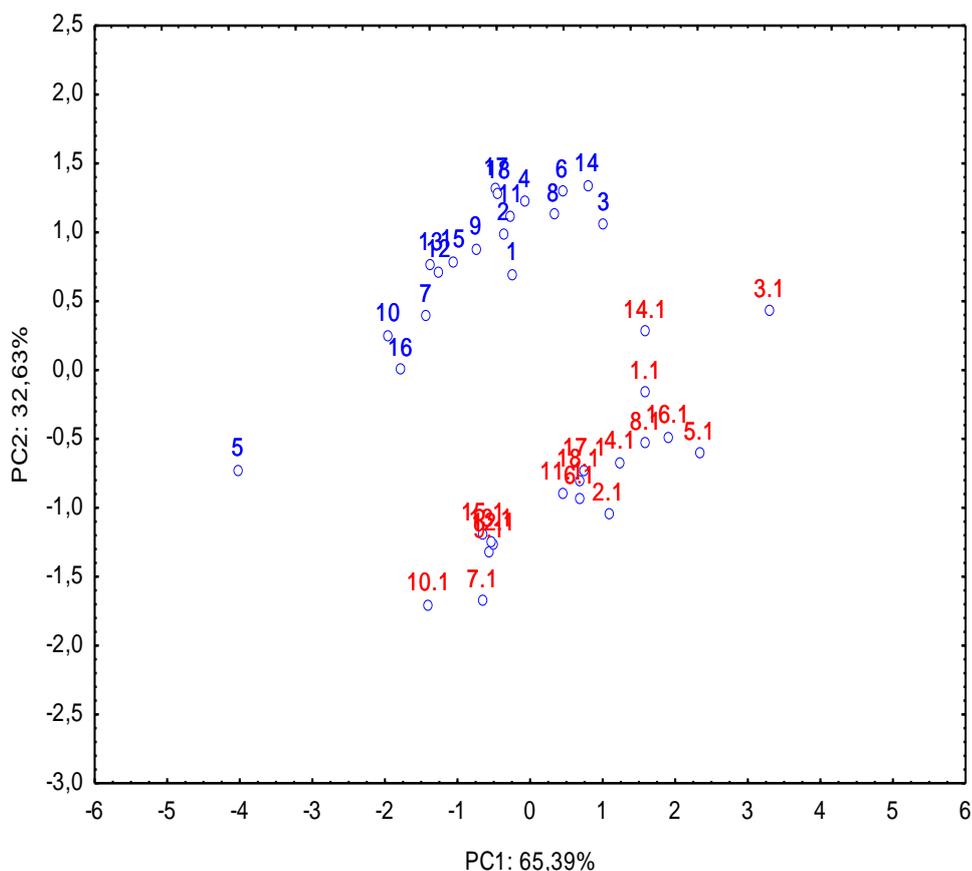


Figura 7. ACP comparando os HPA não metabolizados e os seus metabólitos.

A PC1 apresentou 65,39% da variância total enquanto que a PC2 apresentou 32,63%, somando 98,02% da variância total. Isso indica que mais de 50% dos resultados foi explicado pelo 1º e 2º eixo da ACP, mostrando que existe uma correlação entre os descritores usados. Analisando o gráfico da ACP (Figura 7) percebe-se que ocorreu uma separação entre os HPA não metabolizados (azul) e seus metabólitos (vermelho). Verifica-se que a maioria dos metabólitos estão à direita da PC1, indicando maiores valores de EA_{adia} e menores valores de ΔE_{L-H} , que é o comportamento esperado para as substâncias com maior potencial carcinogênico.

Os HPA não metabolizados (azul) estão na parte superior da PC2 o que indica maiores valores de ΔH_f , mostrando que estes compostos são menos estáveis do que os metabólitos, logo eles dificilmente irão interagir com o DNA, pois serão facilmente degradados no organismo. O benzeno (substância 5) é o composto mais estável entre os compostos não metabolizados e também é o que apresenta menor comportamento carcinogênico, mostrando que ele deverá ser ativado metabolicamente para interagir com o DNA.

4.4 Avaliação do potencial carcinogênico dos HPA

A segunda ACP foi realizada considerando informações dos metabólitos, visto que são eles que vão interagir de fato com o DNA. A Tabela 6 mostra os dados utilizados na análise. Os parâmetros μ e $\log P$ foram adicionados nessa análise porque eles descrevem o transporte no meio biológico e a entrada no meio celular. Os dados utilizados para esses dois parâmetros foram dos HPA não metabolizados, pois eles são ativados metabolicamente dentro da célula, ou seja, o metabólito será formado depois de entrar no meio celular, por isso os valores de μ e $\log P$ dos HPA não metabolizados descrevem melhor o processo de interação com a membrana celular.

Na análise realizada consideramos os compostos 2.1, 5.1, 6.1 e 18.1 como carcinogênicos, porque são originários do benzo[a]antraceno, benzeno, benzo[a]pireno e dibenzo[a,h]antraceno, que já são classificados como substâncias carcinogênicas.

Tabela 6. Descritores eletrônicos usados na segunda ACP

| Número | Substância | EA _{adia} (eV) | ΔE_{L-H} (eV) | μ (D) | LogP |
|--------|-----------------------------------|----------------------------|--------------------------|-----------|--------|
| 1.1 | Antracenoquinona | 2,274 | 7,091 | 0,018 | 4,560 |
| 2.1 | Benzo[a]antraceno-diolepoxido | 1,912 | 7,319 | 0,045 | 5,720 |
| 3.1 | Pirenoquinona | 2,057 | 6,463 | 0,000 | 5,190 |
| 4.1 | Fluoranteno-diolepoxido | 2,204 | 7,240 | 0,239 | 5,040 |
| 5.1 | Catecolquinona | 2,185 | 6,857 | 0,000 | 2,030 |
| 6.1 | Benzo[a]pireno-diolepoxido | 1,996 | 7,449 | 0,037 | 6,390 |
| 7.1 | Fenantreno-diolepoxido | 1,419 | 7,956 | 0,020 | 4,550 |
| 8.1 | Acenaftenoquinona | 1,410 | 7,110 | 0,557 | 4,010 |
| 9.1 | Criseno-diolepoxido | 1,564 | 7,904 | 0,001 | 5,710 |
| 10.1 | Fluoreno-diolepoxido | 1,175 | 8,217 | 0,367 | 4,260 |
| 11.1 | Benzo[e]pireno-diolepoxido | 1,778 | 7,533 | 0,033 | 6,330 |
| 12.1 | Benzo[b]fluoreno-diolepoxido | 1,726 | 7,881 | 0,339 | 5,310 |
| 13.1 | Trifenileno-diolepoxido | 1,519 | 7,891 | 0,000 | 5,770 |
| 14.1 | Naftacenoquinona | 2,579 | 7,067 | 0,001 | 5,710 |
| 15.1 | Benzo[a]fluoreno-diolepoxido | 1,486 | 7,926 | 0,386 | 5,460 |
| 16.1 | 1,2-Naftoquinona | 2,124 | 7,002 | 0,000 | 3,330 |
| 17.1 | Dibenzo[a,c]antraceno-diolepoxido | 2,045 | 7,413 | 0,036 | 6,930 |
| 18.1 | Dibenzo[a,h]antraceno-diolepoxido | 1,883 | 7,447 | 0,001 | 6,930 |
| 19 | Glicose | 0,101 | 10,537 | 2,128 | -2,570 |
| 20 | Sacarose | 0,090 | 10,255 | 4,900 | -2,630 |
| 21 | Frutose | 0,874 | 10,603 | 2,435 | -2,450 |
| 22 | Água | -2,606 | 12,085 | 1,551 | -0,400 |
| 23 | Glicerol | -1,821 | 11,433 | 2,859 | -1,930 |
| 24 | Leucina | 0,028 | 9,431 | 1,128 | -1,820 |
| 25 | Lactose | -0,987 | 10,125 | 5,122 | -3,010 |
| 26 | Galactose | 0,356 | 10,645 | 1,509 | -2,570 |
| 27 | Tetracloroeto de carbono | 1,885 | 7,403 | 0,000 | 2,640 |
| 28 | 2-naftilamina | 0,890 | 8,223 | 1,353 | 2,250 |
| 29 | 4-aminobifenil | 1,093 | 8,192 | 0,040 | 2,890 |
| 30 | Resveratrol | -1,607 | 11,133 | 14,983 | 2,570 |
| 31 | Acetilsalicilato | -2,988 | 12,256 | 7,728 | 1,430 |

Os valores da EA_{adia} listados na Tabela 6 mostram que o grupo dos carcinógenos (27, 28 e 29), em vermelho, apresentam elevadas eletrofilicidade, indicando que terão maior facilidade de receber os elétrons da guanina (DNA). Esse comportamento também é verificado entre os metabólitos. Os dados da ΔE_{L-H} mostram que a interação com o DNA será mais efetiva

para os grupos dos carcinógenos (vermelho) e metabólitos (marron), uma vez que são os compostos que apresentam menores diferenças entre os orbitais.

As equações 23 e 24 são da ACP realizada com os dados da Tabela 6. Nessa análise todos os quatro parâmetros tiveram pesos significativos tanto na PC1 quanto na PC2, no entanto os parâmetros que mais influenciaram na separação dos grupos foram EA_{adia} e ΔE_{L-H} , já que apresentaram maior contribuição na PC1. O μ e LogP também apresentaram pesos consideráveis, indicando que parâmetros hidrofóbicos são importantes na investigação do potencial carcinogênico.

$$PC1 = 0,948 EA_{\text{adia}} - 0,969 \Delta E_{L-H} - 0,785 \mu + 0,800 \text{LogP} \quad (23)$$

$$PC2 = 0,067 EA_{\text{adia}} + 0,077 \Delta E_{L-H} - 0,559 \mu - 0,534 \text{LogP} \quad (24)$$

A PC1 e PC2 apresentaram, respectivamente, 77,37% e 15,21% da variância total (Figura 8), mostrando que existe uma correlação entre os quatro descritores usados, uma vez que as duas componentes somaram 92,58% da variância total, indicando que mais de 50% dos resultados foi explicado pelo 1º e 2º eixo da ACP.

A Figura 8 mostra que foi obtida uma separação das substâncias em três grupos, não carcinogénos (verde), protetores (azul) e carcinogénos (vermelho e marron). O grupo dos não carcinogénos apresentou um comportamento contrário ao que é esperado para substâncias potencialmente carcinogênicas, eles ficaram do lado direito da PC1, indicando baixos valores de ΔE_{L-H} e LogP e altos valores de ΔE_{L-H} e μ . Os protetores tiveram comportamento parecido com o grupo de não carcinogénos em relação à PC1, entretanto mais acentuado, indicando que eles não apresentam facilidade de interagir com a guanina. Em relação à PC2, os dois protetores apresentaram o mesmo comportamento, todavia o resveratrol (substância 30) possui um μ muito elevado, ficando no ponto mais negativo da PC2, visto que o μ tem contribuição negativa nesse eixo. Já o grupo dos carcinogénos apresentaram comportamento esperado, com altos valores de EA_{adia} e LogP e baixo valores de ΔE_{L-H} e μ .

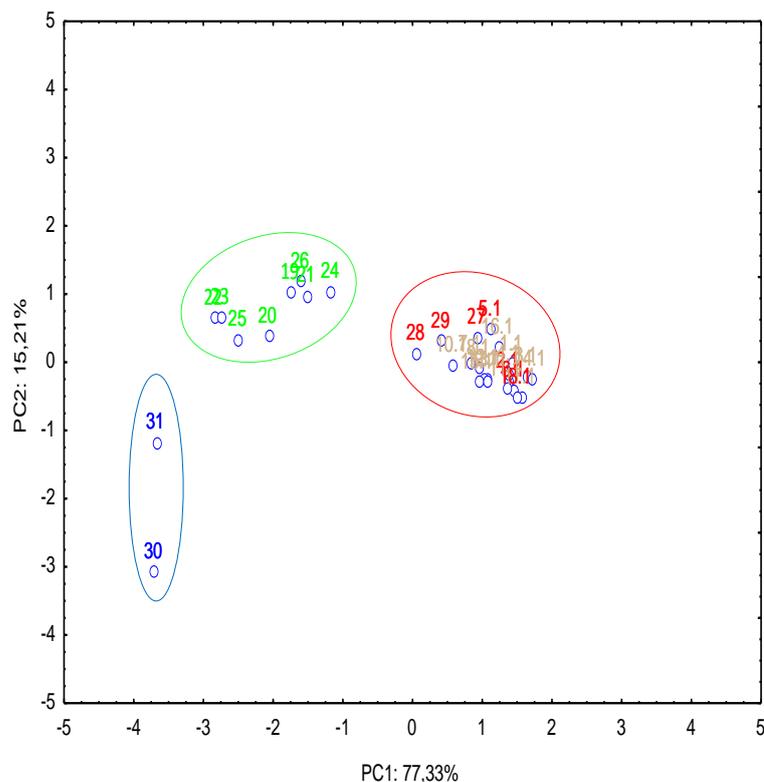


Figura 8. Resultado da ACP comparando metabólitos dos HPA, carcinógenos, não carcinógenos e protetores.

O resultado mostrado na Figura 8 indica que os metabólitos dos HPA estudados agruparam-se entre as substâncias cancerígenas, portanto eles apresentam propriedades semelhantes às substâncias já classificadas como carcinogênicas. Deste modo, podemos classificar os metabólitos e os HPA que os originam em substâncias potencialmente cancerígenas, com base no modelo de interação carcinógeno-DNA considerado neste trabalho.

Baseado nos resultados da ACP verificamos que os parâmetros eletrônicos combinados com parâmetros hidrofóbicos conseguem descrever bem os processos investigados.

4.5 O estudo QSAR

O estudo da relação estrutura-atividade dos HPA levou à construção de seis modelos matemáticos eficazes na previsão dos valores experimentais do LD50. Os dados e parâmetros usados na construção dos modelos estão listados na Tabela 7.

Tabela 7. Descritores usados no estudo QSAR e o seu resultado

| Número | HPA | EA _{adia} (eV) | ΔE_{L-H} (eV) | Área (Å ²) | Volume (Å ³) | LogP |
|--------|-------------------|-------------------------|-----------------------|------------------------|--------------------------|-------|
| 1 | Antraceno | 1,454 | 7,680 | 211,90 | 219,35 | 4,560 |
| 2 | Benzo[a]antraceno | 1,547 | 7,706 | 255,36 | 273,37 | 5,720 |
| 3 | Pireno | 1,571 | 7,631 | 222,24 | 239,58 | 5,190 |
| 4 | Fluoranteno | 1,683 | 7,591 | 227,56 | 242,88 | 5,040 |
| 5 | Benzeno | -0,058 | 9,075 | 118,88 | 107,16 | 2,030 |
| 6 | Benzo[a]pireno | 1,922 | 7,409 | 265,68 | 292,48 | 6,390 |
| 7 | Fenantreno | 1,145 | 8,112 | 209,23 | 218,50 | 4,550 |
| 8 | Acenafteno | 0,809 | 8,307 | 187,76 | 193,96 | 4,010 |
| 9 | Criseno | 1,462 | 7,845 | 251,77 | 271,15 | 4,560 |
| 10 | Fluoreno | 0,968 | 8,301 | 200,76 | 207,22 | 4,260 |
| 11 | Benzo[e]pireno | 1,569 | 7,665 | 262,67 | 291,97 | 6,330 |
| 12 | Benzo[b]fluoreno | 1,301 | 8,032 | 246,51 | 263,04 | 5,310 |
| 13 | Trifenileno | 1,215 | 8,067 | 249,3 | 271,64 | 5,770 |
| 14 | Naftaceno | 1,916 | 7,286 | 257,95 | 273,58 | 5,710 |
| 15 | Benzo[a]fluoreno | 1,349 | 7,959 | 244,85 | 262,45 | 5,460 |
| 16 | Naftaleno | 0,826 | 8,255 | 165,59 | 163,60 | 3,330 |

Primeiramente investigamos a colinearidade entre os descritores utilizados no QSAR (Tabela 8), uma vez que se as variáveis tiverem valores significativos de colinearidade elas descreverão a mesma propriedade, nesse caso, elas não poderão ser usadas no mesmo modelo de regressão^{38,40}. O resultado da Tabela 8 mostra que os parâmetros EA_{adia} e ΔE_{L-H} são colineares, logo não podemos utilizá-los simultaneamente numa regressão. O mesmo ocorre com área superficial, volume e LogP, todavia temos baixas correlações quando combinamos um parâmetro eletrônico com um parâmetro estérico ou hidrofóbico.

Tabela 8. Matriz de colinearidade das variáveis independentes.

| | EA _{adia} | ΔE_{L-H} | Área superficial | Volume | LogP |
|--------------------|--------------------|------------------|------------------|--------|--------|
| EA _{adia} | 1,000 | 0,978 | -0,489 | 0,454 | 0,391 |
| ΔE_{L-H} | 0,978 | 1,000 | -0,479 | 0,449 | 0,398 |
| Área superficial | -0,489 | -0,479 | 1,000 | -0,972 | -0,934 |
| Volume | 0,454 | 0,449 | -0,972 | 1,000 | 0,834 |
| LogP | 0,391 | 0,398 | -0,934 | 0,834 | 1,000 |

A Tabela 9 apresenta as correlações entre variáveis independentes (descritores) e variável dependente (Log(LD50)⁻¹). Os parâmetros com valores mais altos de correlação com a resposta

biológica foram área superficial, volume e LogP, entretanto os valores não são significativos, portanto para construir modelos capazes de reproduzir eficientemente os valores experimentais do LD50, foi necessário combinar os parâmetros hidrofóbicos com os descritores eletrônicos, que também apresentaram valores baixos de correlação. Observa-se também que EA_{adia}, LogP, volume e área superficial tiveram correlações positivas, ou seja, à medida que seus valores aumentam, a toxicidade aguda (Log (LD50)⁻¹) dos HPA também aumenta. Já no caso do μ e ΔE_{L-H} as correlações são negativas indicando relação inversa com a toxicidade aguda.

Tabela 9. Matriz de correlação entre as variáveis e o Log (LD50)⁻¹

| | Log (LD50) ⁻¹ |
|--------------------|--------------------------|
| μ | -0,117 |
| EA _{adia} | 0,421 |
| ΔE_{L-H} | -0,366 |
| Área superficial | 0,648 |
| Volume | 0,644 |
| LogP | 0,633 |

A Tabela 10 mostra os valores experimentais e os valores teóricos obtidos com os modelos matemáticos construídos. Os valores do LD50 estão em escala logarítmica inversa por dois motivos. Primeiro porque alguns valores de LD50 dos HPA são bem diferentes, exemplo o benzo[a]antraceno (LD50 = 10 mg/Kg) e antraceno (LD50 = 18000 mg/Kg), resultando em desvios muito distantes, por isso é indicado o uso da escala logarítmica, o que possibilita desvios com valores próximos contribuindo para o sucesso estatístico da análise. O segundo motivo é a utilização da escala inversa que facilita a interpretação das relações com o LD50, ou seja, quanto menor o LD50 da substância maior a sua toxicidade e com escala inversa, quanto maior o log(LD50)⁻¹ maior a toxicidade do composto.

Tabela 10. Resultado da análise QSAR

| HPA | Log (LD50) ⁻¹ | | | | | | |
|-------------------|--------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | Exp | Modelo1 | Modelo2 | Modelo3 | Modelo4 | Modelo5 | Modelo6 |
| Antraceno | -4,255 ⁵⁶ | -4,045 | -3,781 | -4,030 | -4,247 | -4,038 | -4,263 |
| Benzo[a]antraceno | -1,000 ⁵⁷ | -1,231 | -1,098 | -1,254 | -1,396 | -1,624 | -1,698 |
| Pireno | -3,431 ⁵⁷ | -3,605 | -3,533 | -3,345 | -3,428 | -2,995 | -3,126 |
| Fluoranteno | -3,301 ⁵⁸ | -3,439 | -3,623 | -3,640 | -3,430 | -3,812 | -3,607 |
| Benzeno | -3,729 ⁵⁸ | -4,053 | -4,098 | -4,075 | -4,034 | -4,003 | -3,967 |
| Benzo[a]pireno | -1,699 ⁵⁹ | -1,820 | -1,920 | -1,756 | -1,684 | -1,531 | -1,483 |
| Fenantreno | -2,845 ⁵⁷ | -2,420 | -2,691 | -2,738 | -2,462 | -2,810 | -2,532 |

| | | | | | | | |
|------------------|----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Acenafteno | -3,301 ⁶⁰ | -2,948 | -2,817 | -2,724 | -2,881 | -2,748 | -2,885 |
| Criseno | - | -0,871 | -0,995 | -1,010 | -0,930 | -1,304 | -1,156 |
| Fluoreno | - | -2,158 | -2,555 | -2,631 | -2,241 | -2,792 | -2,380 |
| Benzo[e]pireno | - | -0,939 | -0,668 | -0,248 | -0,636 | -0,246 | -0,571 |
| Benzo[b]fluoreno | - | -0,424 | -0,701 | -0,789 | -0,549 | -1,615 | -1,245 |
| Trifenileno | - | -0,105 | -0,149 | 0,091 | 0,035 | -0,159 | -0,128 |
| Naftaceno | - | -2,804 | -2,435 | -2,837 | -3,172 | -3,143 | -3,424 |
| Benzo[a]fluoreno | - | -0,830 | -1,017 | -1,032 | -0,888 | -1,448 | -1,223 |
| Naftaleno | -3,708 ⁶¹ | -4,540 | -4,451 | -4,584 | -4,647 | -4,455 | -4,538 |

Os valores teóricos mostrados na Tabela 10 foram obtidos com os modelos matemáticos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 representados pelas equações 25, 26, 27, 28, 29 e 30, respectivamente.

$$\text{Log (LD50)}^{-1} = -49,0867(\pm 7,1265) + 4,1466(\pm 0,6869) \Delta E_{L-H} + 0,0623(\pm 0,0082) \text{Área} \quad (25)$$

$$\text{Log (LD50)}^{-1} = -12,7277(\pm 1,4883) - 4,1329(\pm 0,8286) EA_{(\text{adia})} + 0,0706(\pm 0,0115) \text{Área} \quad (26)$$

$$\text{Log (LD50)}^{-1} = -10,6355(\pm 1,0843) - 4,3398(\pm 0,8066) EA_{(\text{adia})} + 0,0589(\pm 0,0090) \text{Volume} \quad (27)$$

$$\text{Log (LD50)}^{-1} = -47,8816(\pm 7,0992) + 4,2326(\pm 0,7103) \Delta E_{L-H} + 0,0507 (\pm 0,0068) \text{Volume} \quad (28)$$

$$\text{Log (LD50)}^{-1} = -9,1217(\pm 1,2295) - 4,0506(\pm 1,0887) EA_{\text{adia}} + 2,4062(\pm 0,5270) \text{LogP} \quad (29)$$

$$\text{Log (LD50)}^{-1} = -45,0946(\pm 9,2884) + 4,0577(\pm 0,9473) \Delta E_{L-H} + 2,1202(\pm 0,3955) \text{LogP} \quad (30)$$

Os modelos matemáticos conseguem prever de maneira aproximada a maioria dos valores experimentais, no entanto podemos destacar aqueles que reproduziram valores mais aproximados para antraceno (modelo 4 e 6), benzo[a]antraceno (modelo 2), fenantreno (modelo 5), pireno e benzo[a]pireno (modelo 4). Observa-se que o modelo 4 se destacou por reproduzir mais eficientemente os valores experimentais do log (LD50)^{-1} , por exemplo, o erro relativo foi de 0,18%, 0,09% e 0,88%, respectivamente, para benzo[a]antraceno, pireno e benzo[a]pireno.

A validação estatística dos modelos QSAR é muito importante, por isso as informações estatísticas dos modelos mostrados nas equações 15-20 estão listadas na Tabela 11. Nota-se que todos os modelos apresentaram valores significativos de coeficientes de correlação (R) e coeficientes de determinação (R²). O **R** indica que existe correlação entre os descritores usados e o log(LD50)^{-1} . Os modelos 1 e 4 são os que apresentam maior correlação com a toxicidade aguda. O R² corresponde à fração da variabilidade total que o modelo consegue explicar, no caso, os modelos 1 e 4 explicam 93 % e 92,8 %, respectivamente, da variabilidade dos valores observados do Log(LD50)^{-1} .

Tabela 11. Informações estatísticas dos modelos com $n = 8$ e 95% de confiança.

| Modelo | R | R ² | s | F _(2,5) | p |
|--------|-------|----------------|-------|--------------------|--------|
| 1 | 0,964 | 0,930 | 0,338 | 33,24 | 0,0013 |
| 2 | 0,950 | 0,903 | 0,398 | 23,28 | 0,0029 |
| 3 | 0,956 | 0,914 | 0,375 | 26,48 | 0,0022 |
| 4 | 0,963 | 0,928 | 0,344 | 32,085 | 0,0014 |
| 5 | 0,917 | 0,841 | 0,510 | 13,214 | 0,0101 |
| 6 | 0,934 | 0,872 | 0,458 | 16,971 | 0,0059 |

Em relação ao teste de confiança, todos os modelos satisfazem o teste de Fisher (F) a um nível de 95% de confiança ($F_{\text{calculado}} > F_{(2,5)\text{Tabelado}} = 5,79$). Apresentam desvio padrão (s) baixo e um bom nível de confiabilidade com $p < 0,05$, portanto todos os modelos fornecem valores estatisticamente confiáveis com nível de confiança de 95%.

Além dos testes citados é importante a avaliação do gráfico de valores experimentais versus valores calculados, que deve apresentar pontos bem alinhados em relação à reta de regressão para modelos bem ajustados. Já o gráfico dos resíduos deve apresentar pontos dispersos aleatoriamente ao redor do zero (linha horizontal do gráfico).

A Figura 9 mostra o gráfico obtido com o modelo 1, que utilizou os parâmetros ΔE_{L-H} e área superficial. Nesta Figura perceber-se que todos os pontos estão próximos da reta de regressão, isso indica que os valores preditos e experimentais estão em boa concordância, o que se espera para modelos bem ajustados.

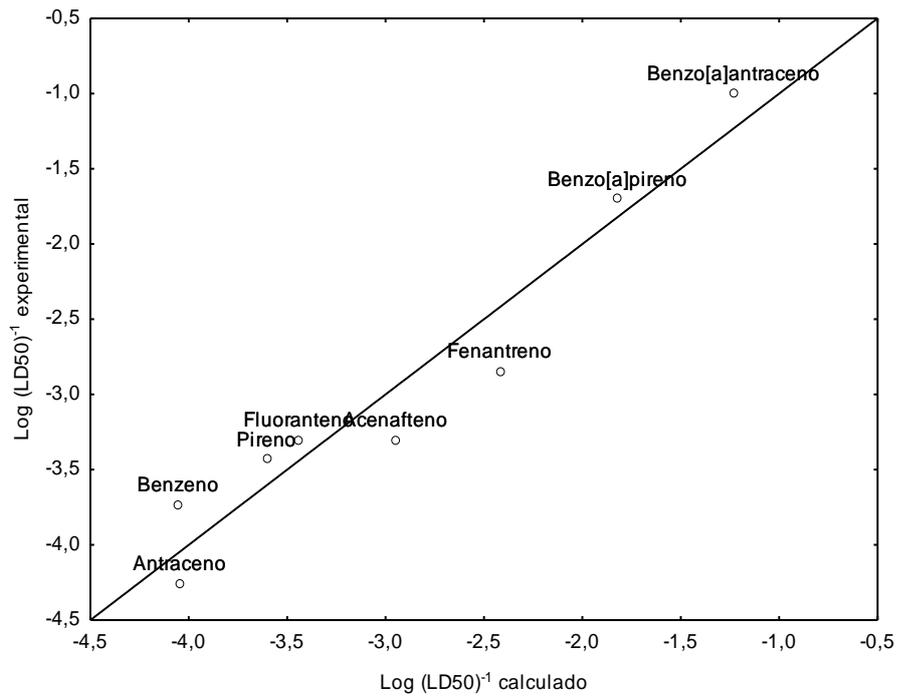


Figura 9. Valor experimental versus valor calculado obtido com modelo 1.

A Figura 10 apresenta a dispersão dos resíduos em torno do zero. Nota-se que todos os compostos possuem erros baixos e a dispersão dos pontos é aleatória, sugerindo que o modelo está bem ajustado.

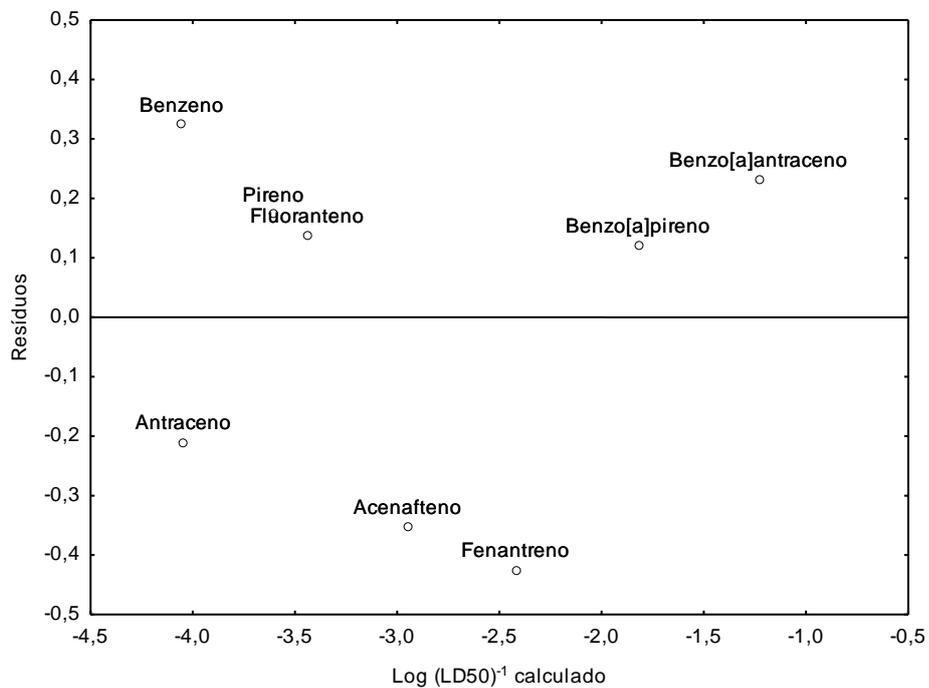


Figura 10. Análise residual obtido com o modelo 1.

O modelo 2 originou o gráfico apresentado na Figura 11. O resultado é semelhante ao do modelo 1 uma vez que ambos possuem área superficial como um dos parâmetros utilizados. A diferença entre eles é que o modelo 1 foi desenvolvido usando o ΔE_{L-H} e o modelo 2 a $EA_{(adia)}$, mesmo assim o resultado foi semelhante, isso ocorreu porque esses parâmetros descrevem o mesmo tipo de processo.

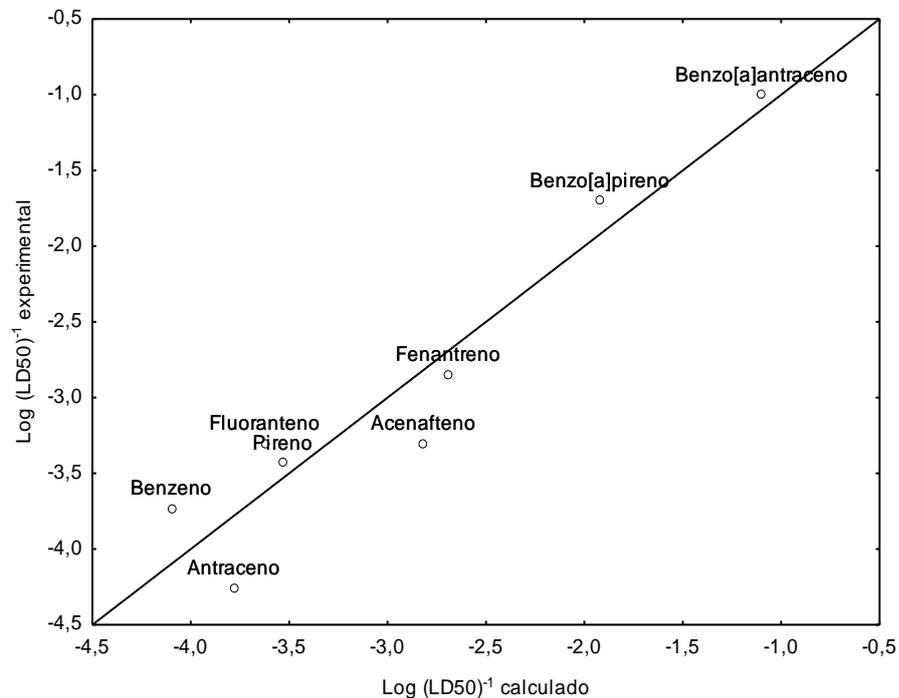


Figura 11. Valor experimental versus valor calculado obtido com modelo 2

A dispersão dos resíduos formados a partir do modelo 2, que está mostrado na Figura 12, é semelhante à dispersão originada pelo modelo 1. Nota-se, entretanto que o modelo 1 descreve melhor o fluoranteno (menor erro) do que o modelo 2, e este por sua vez descreve melhor o fenantreno do que o modelo 1.

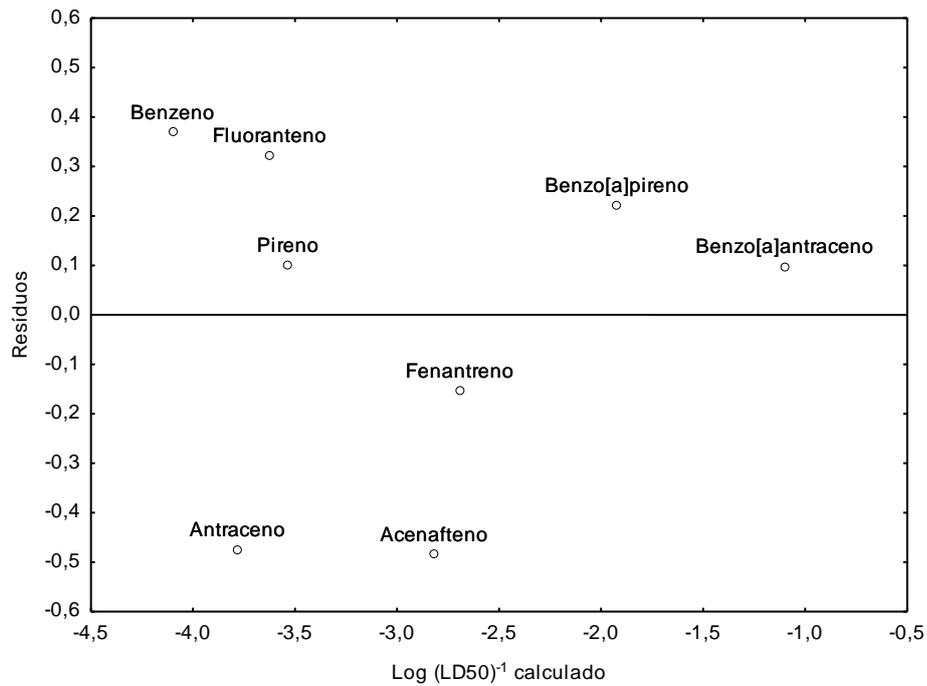


Figura 12. Análise residual obtido com o modelo 2.

A Figura 13 mostra o gráfico obtido a partir do modelo 3 que foi desenvolvido com os parâmetros EA_(adía) e volume molecular. Percebe-se que o modelo está bem ajustado, visto que todos os pontos do gráfico estão próximos da reta de regressão e dentro do intervalo de confiança.

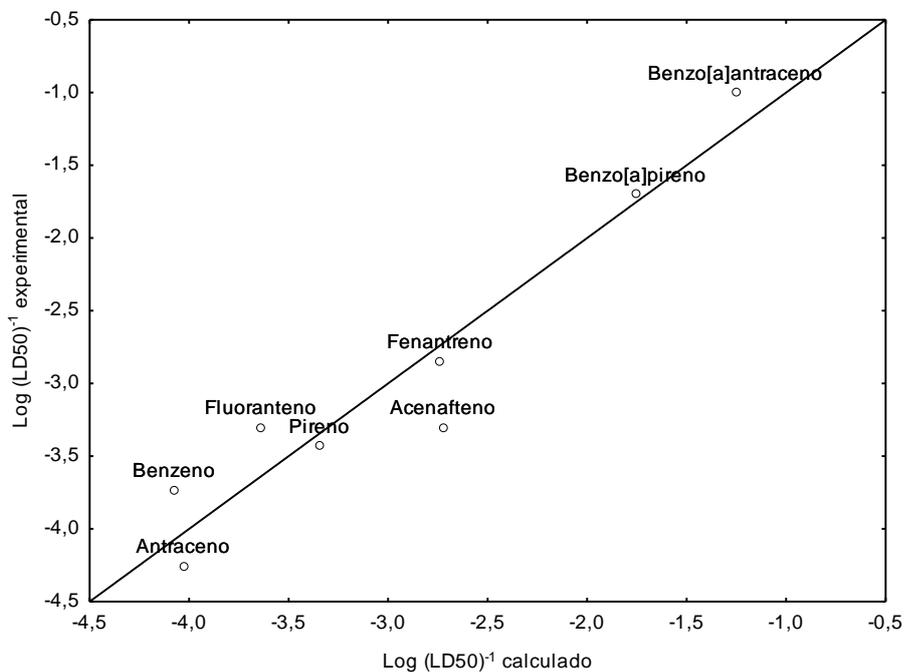


Figura 13. Valor experimental versus valor calculado obtido com modelo 3.

A análise residual do modelo 3 mostrada na Figura 14 confirma que ele está bem ajustado, uma vez que a dispersão dos valores em torno do zero é aleatória. Nota-se que o modelo 3 descreve bem o pireno, benzo[a]pireno e fenantreno (erros baixos).

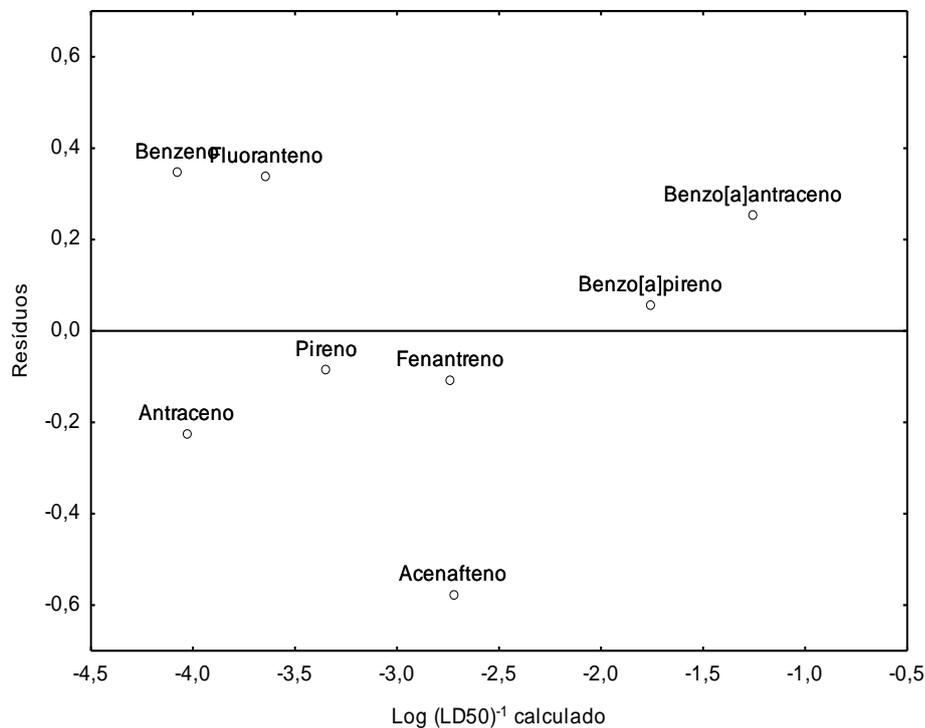


Figura 14. Análise residual obtido com o modelo 3.

O gráfico obtido a partir do modelo 4 é apresentado na Figura 15. Esse modelo foi desenvolvido com os parâmetros ΔE_{L-H} e volume molecular, fornecendo o melhor resultado entre os seis modelos construídos. Verifica-se na Figura 15 que o modelo está bem ajustado, já que todos os pontos estão alinhados com a reta de regressão e dentro do intervalo.

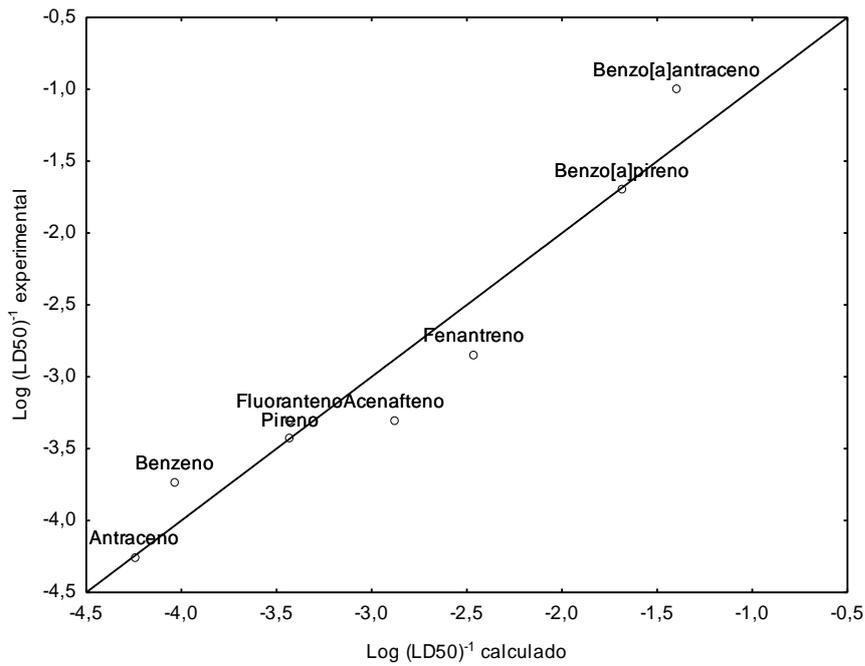


Figura 15. Valor experimental versus valor calculado obtido com modelo 4.

O gráfico de dispersão dos resíduos obtido a partir do modelo 4 é mostrado na Figura 16. Uma análise do gráfico confirma que o modelo está bem ajustado e foi o mais eficiente na reprodução dos valores experimentais do LD50, principalmente para o antraceno, pireno e benzo[a]pireno com desvios próximos de zero.

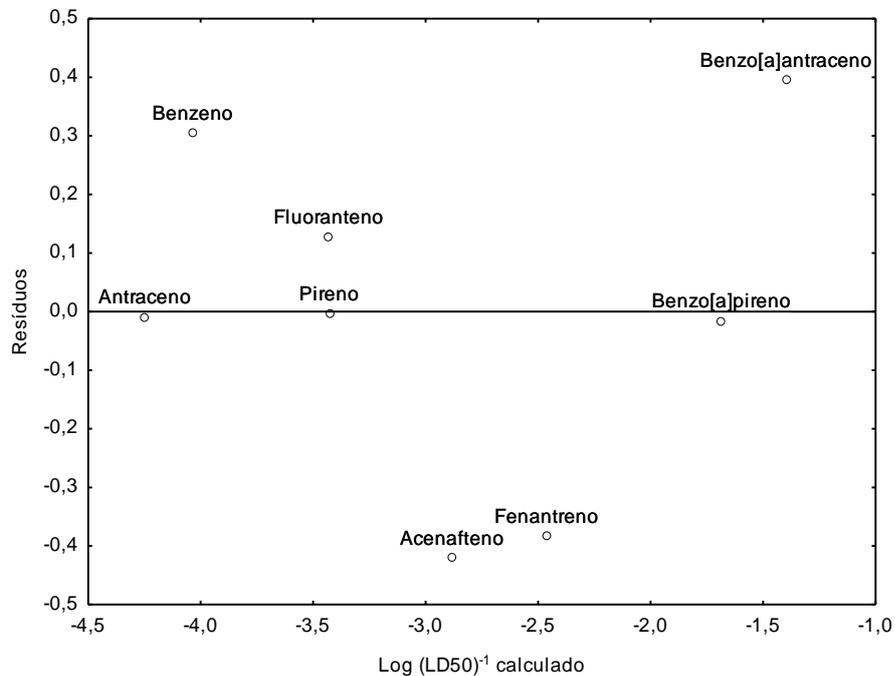


Figura 16. Análise residual obtido com o modelo 4.

O modelo 5 originou o gráfico mostrado na Figura 17. Esse modelo foi desenvolvido com os parâmetros $EA_{(adia)}$ e $\log P$, apresentando valores calculados em concordância com os experimentais. O melhor resultado do modelo foi a reprodução do valor experimental do fenantreno.

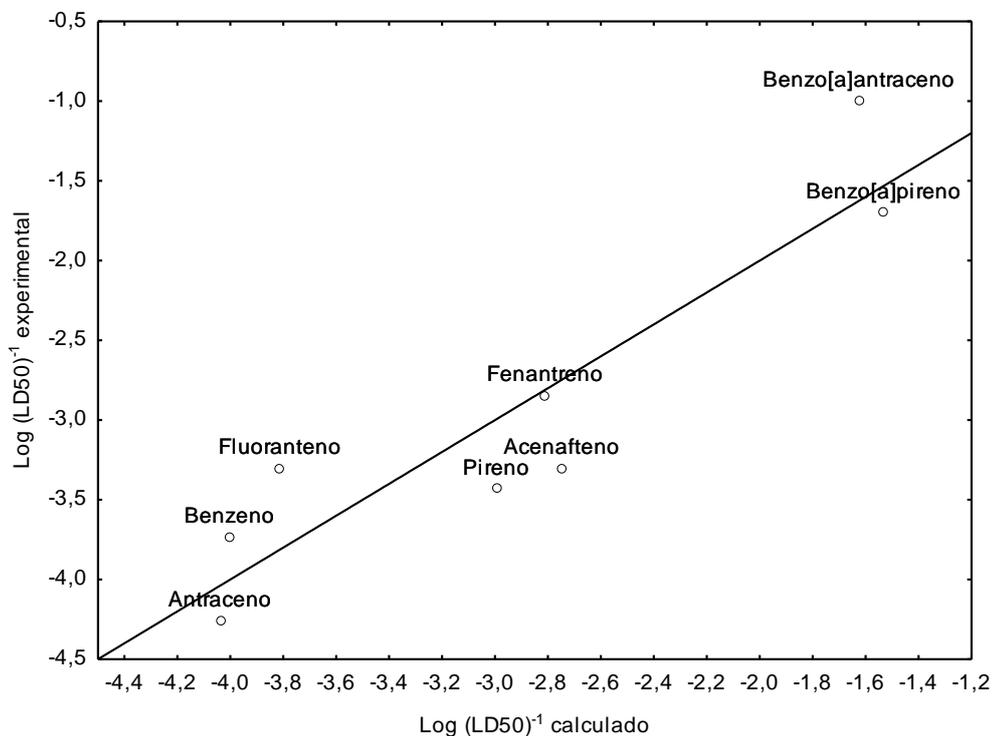


Figura 17. Valor experimental versus valor calculado obtido com modelo 5.

A análise residual do modelo 5 apresentado na Figura 18 mostra que os pontos estão dispersos aleatoriamente em torno do zero e confirma que o fenantreno foi o HPA melhor descrito pelo modelo. O benzo[a]antraceno e acenafteno tiveram os maiores erros entretanto ainda estão dentro do intervalo.

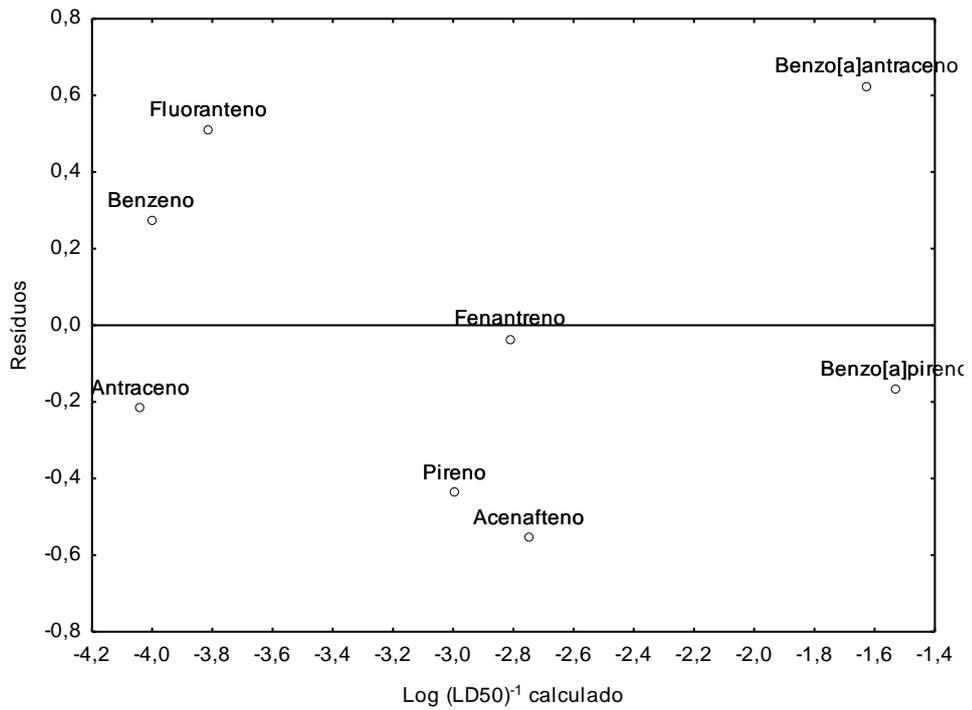


Figura 18. Análise residual obtido com o modelo 5.

A Figura 19 mostra o gráfico originado a partir do modelo 6. A análise do gráfico mostra que os pontos calculados e experimentais estão em concordância, indicando que o modelo está bem ajustado.

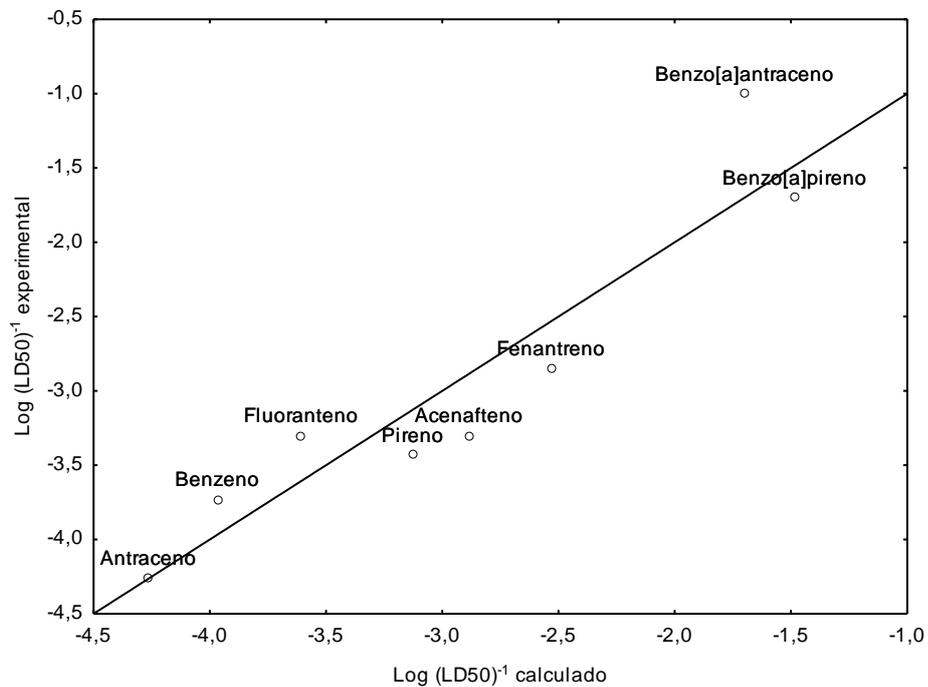


Figura 19. Valor experimental versus valor calculado obtido com modelo 6.

A análise residual do modelo 6 é mostrada na Figura 2. Percebe-se que os pontos estão dispersos aleatoriamente em torno do zero, indicando que o modelo está bem ajustado. O melhor resultado do modelo foi a reprodução do valor experimental de LD50 para o antraceno.

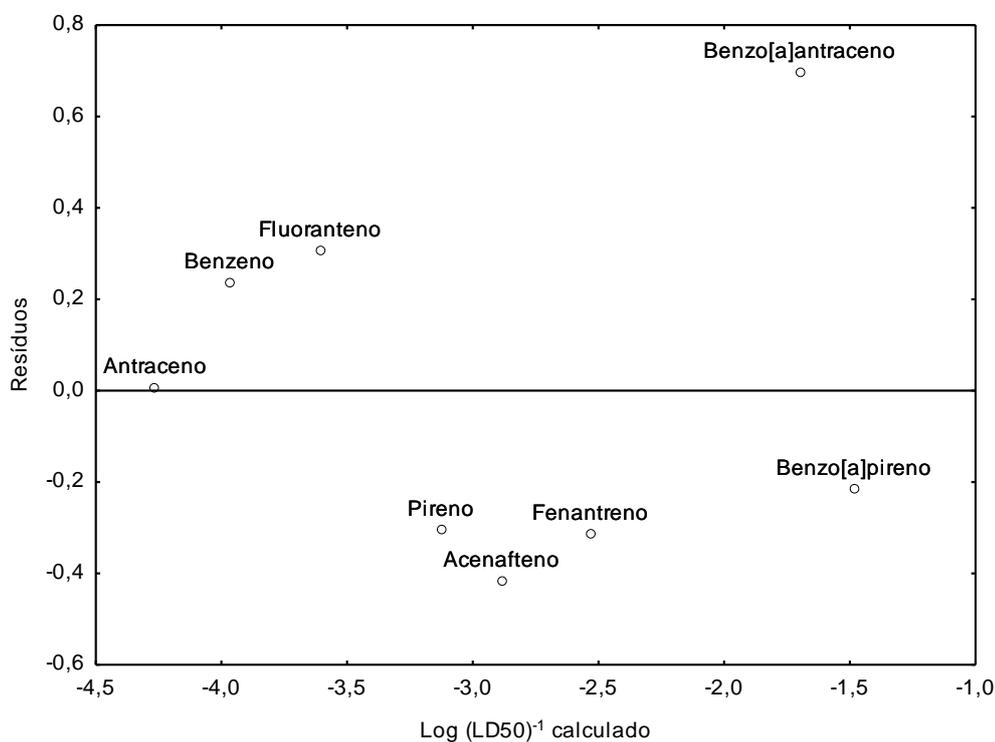


Figura 20. Análise residual obtido com o modelo 6.

Os gráficos obtidos a partir dos modelos desenvolvidos mostram que as regressões estão bem ajustadas, uma vez que os seis modelos apresentaram pontos alinhados com a reta de regressão, indicando que os valores experimentais e calculados estão em concordância a um nível de 95% de confiança. Os resíduos possuem uma dispersão aleatória em torno do zero, confirmando que todos os modelos estão bem ajustados. O gráfico com a melhor dispersão em torno da média foi do modelo 4, confirmando que esse modelo é o mais eficiente para reproduzir os valores experimentais de LD50.

Os modelos desenvolvidos estão todos validados estatisticamente com 95% de confiança e são eficazes na reprodução dos valores da toxicidade aguda. Essa observação sugere que a combinação entre parâmetros eletrônicos e hidrofóbicos ou estéreos é importante na investigação do potencial carcinogênico dos compostos estudados. As relações matemáticas desenvolvidas podem ser úteis na investigação do potencial carcinogênico de substâncias pouco estudadas com informações insuficientes sobre a sua carcinogenicidade. Provavelmente

um dos seis modelos desenvolvidos reproduzirá eficientemente o valor de LD50 para essas substâncias.

5.0 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A análise ACP utilizando descritores eletrônicos (EA_{adia} , $\Delta_{\text{L-H}}$ e μ) e hidrofóbico (LogP) avaliou os HPA como potenciais carcinógenos. Este resultado é importante porque mostra que os HPA que ainda não são classificados quanto à sua carcinogenicidade, aqueles que estão na lista 3 do IARC, precisam ser urgentemente reavaliados. A utilização de dados dos metabólitos na ACP foi extremamente relevante, uma vez que possibilitou o refino do modelo de avaliação do potencial carcinogênico. O modelo desenvolvido com a ACP pode ser expandido para outros HPA com pouca informação experimental e teórica, visto que as rotas de ativação metabólica para os HPA são conhecidas e semelhantes.

A avaliação da estabilidade dos adutos e do processo de ativação metabólica mostrou que os HPA não interagem diretamente com o material genético, em concordância com outros trabalhos¹²⁻¹⁸. Os HPA originam metabólitos mais estáveis e isso ocorreu para todos os compostos estudados, em especial para benzo[a]pireno e benzo[a]antraceno. Observação semelhante é obtida para os adutos, todos eles são mais estáveis que os HPA originais. Esse resultado indica que tanto a formação dos metabólitos, quanto a formação dos adutos é favorecida do ponto de vista da estabilidade química.

O estudo QSAR resultou em modelos matemáticos bem ajustados e estatisticamente satisfatórios, com nível de confiança de 95%. Portanto, esses modelos são eficazes na reprodução dos valores experimentais de LD50 para os HPA classificados em potenciais carcinógenos. Podemos destacar o modelo 4, que reproduziu muito bem os valores experimentais do antraceno, pireno e benzo[a]pireno, além de outros modelos que também reproduziram os valores com aproximação.

O modelo de interação HPA-DNA, assim como os descritores eletrônicos envolvidos nesse processo tiveram papel fundamental na avaliação do potencial carcinogênico e também no estudo QSAR. Todavia foi necessária a combinação entre parâmetros hidrofóbicos e estéreis para refinar a ACP e produzir modelos de regressão eficientes para reproduzir os valores experimentais do LD50, indicando que essa combinação é fundamental, uma vez que é importante considerar, nesses tipos de estudos, processos relacionados à lipofilia e impedimentos estéreis.

Os modelos teóricos apresentados neste trabalho podem ser aplicados a outras classes de substâncias com a finalidade de identificar seu potencial carcinogênico, destacando assim a importância desta metodologia para avaliação da toxicidade de compostos químicos. De imediato, abre-se então a perspectiva de aplicar os modelos teóricos aqui utilizados a outros

hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, além de expandir a análise para outros grupos de moléculas. Além disso, fica como perspectiva a inclusão de novos parâmetros para descrever cada vez melhor os processos estudados e refinar os modelos teóricos.

REFERÊNCIAS

1. NETTO, A. D. P.; MOREIRA, J. C.; DIAS, A. E. X. O.; ARBILLA, G.; FERREIRA, L. F. V.; OLIVEIRA, A. S.; BAREK, J. Avaliação da contaminação Humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) e seus derivados nitrados (NHPA): Uma revisão metodológica. **Química Nova**, v. 23, n.6, 765-773, 2000.
2. MEIRE, R. O.; AZEREDO, A.; TORRES, J. P. M. Aspectos ecotoxicológicos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. **Oecol. Bras.**, v.11, p.188-201, 2007.
3. MASTRAL, A.M.; CALLÉN, M. S. A review on polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) emissions from energy generation. **Environmental Science & Technology**, v. 34, p. 3051-3057, 2000.
4. THRANE, K. E. Ambient air concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons, fluoride, suspended particles and particulate carbon in areas near aluminum production plants. **Atmospheric Environment**, v. 21, p. 617-628, 1987.
5. PHILLIPS, D. H. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. **Mutation Research**, v. 443, p. 139-147, 1999.
6. CAMARGO, M. C. R.; TOLEDO, M. C. F. Chá-mate e café como fontes de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) na dieta da população de Campinas. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, p. 49-53, 2002.
7. GALINARO, C. A.; FRANCO, D. W. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) em cachaça, rum, uísque e álcool combustível. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1447-1451, 2009.
8. LEÃO, M. B. C.; PAVÃO, A. C.; ESPINOZA, V. A. A.; TAFT, C. A.; BULNESD, E. P. A multivariate model of chemical carcinogenesis, **Journal of Molecular Structure**, v. 719, p. 129-135, 2005.
9. FOTH, H.; KAHL, R.; KAHL, G.F. Pharmacokinetics of low doses of benzo[a]pyrene in the rat. **Food. Chemistry & Toxicology**, v. 26, p. 45-51, 1988.

10. MODICA, R.; FIUME, M.; GUAITANI, A. ;BARTOSEK, I. Comparative kinetics of benz(a)anthracene, chrysene and triphenylene in rats after oral administration. I. Study with single compounds. **Toxicology Letters**, v.18; p.103-109, 1983.
11. SANDERS, C. L.; SKINNER, C.; GELMAN, R.A. Percutaneous absorption of [7.10-14C]benzo[a]pyrene and [7,12-14C]dimethylbenz[a]anthracene in mice. **Environmental Research**, v. 33, p. 353–360, 1984.
12. XUE, W.; WARSHAWSKY, D. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: A review. **Toxicology and Applied Pharmacology**. V. 206, p.73-93, **2005**.
13. VIJAVALAKSHMI, K. P.; SURESH,C. H. Theoretical studies on the carcinogenic activity of diol epoxide derivatives of PAH: proton affinity and aromaticity as decisive descriptors. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 6, p. 4384–4390, 2008.
14. CHEH, A. M.; CHADHA, A.; SAYER, J. M.; YEH, H. J. C.; YAGI, H.; PANNELL, L. K.; JERINA, D. M. Structures of Covalent Nucleoside Adducts Formed from Adenine, Guanine, and Cytosine Bases of DNA and the Optically Active Bay-Region 3,4-Diol 1,2-Epoxides of Benz[a]anthracene. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 58, p. 4013-4022, 1993.
15. LIN, C. H.; HUANG, X.; KOLBANOVSKII, A.; HINGERTY, B. E. ; AMIN, S.; BROYDE, S.; GEACINTOV, N. E.; PATEL, D. J. Molecular Topology of Polycyclic Aromatic Carcinogens Determines DNA Adduct Conformation: A Link to Tumorigenic Activity. **Journal of Molecular Biology**, v. 306, p. 1059-1080, 2001.
16. PAGES, V.; FUCHS, R. P. How DNA lesions are turned into mutations within cells? **Oncogene** v. 21, p. 8957- 8966, 2002.
17. TRUSHIN, N.; ALAM, S.; EL-BAYOUMI, K.; KRZEMINSKI, J.; AMIN, S. G.; GULLETT, J.; MEVERS, C.; PROKOPCZVK, B. Comparative metabolism of benzo[a]pyrene by human keratinocytes infected with high-risk human papillomavirus types 16 and 18 as episomal or integrated genomes. **Journal of carcinogenesis**, V. 11, 2012.

18. CAVALIERI, E. L.; ROGAN, E. G. The approach to understanding aromatic hydrocarbon carcinogenesis. The central role of radical cations in metabolic activation. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 55, p. 183-199, 1992.
19. SAEED, M.; HIGGINBOTHAM, S.; ROGAN, E.; CAVALIERI, E. L. Formation of depurinating N3adenine and N7guanine adducts after reaction of 1,2-naphthoquinone or enzyme-activated 1,2 dihydroxynaphthalene with DNA Implications for the mechanism of tumor initiation by naphthalene. **Chemico-Biological Interactions**, v. 165, p. 175-188, 2007.
20. CAVALIERI, E. L.; ROGAN, E. G. The etiology and prevention of breast cancer. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v. 9, p. 55-69, 2012.
21. CAVALIERI, E. L.; LI, K. M.; BALU, N.; SAEED, M.; DEVANESAN, P.; HIGGINBOTHAM, S.; ZHAO, J.; GROSS, M. L.; ROGAN, E. G. Catechol ortho-quinones: the electrophilic compounds that form depurinating DNA adducts and could initiate cancer and other diseases. **Carcinogenesis**, v. 23, p. 1071-1077, 2002.
22. FETZER, S. M.; HUANG, C. R.; HARVEY, R. G.; LEBRETON, P. R. Photoelectron and ab Initio Molecular Orbital Investigations of Genotoxic Benz[a]anthracene Metabolites: Electronic Influences on DNA Binding. **Journal of Physical Chemistry**, v. 97, p. 2385-2394, 1993.
23. JERINA, D. M.; THAKKER, D. R.; YAGI, H. Carcinogenicity of benzo[a]pyrene derivatives: The bay region theory. **Pure and Applied Chemistry**, v.50, p.1033-1044, 1978.
24. LI, F.; LI, X.; LIUA, X.; ZHANGA, L.; YOUA, L.; ZHAOA, J.; WUA, H. Noncovalent interactions between hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbon and DNA: Molecular docking and QSAR study. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 32 p. 373-381, 2011.

25. VIKAS; REENU. Electron-correlation based externally predictive QSARs for Mutagenicity of nitrated-PAHs in Salmonella typhimurium TA100. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 101, p. 42–50, 2014.
26. LOEW, G. H.; SUDHINDRA, B. S.; FERRELL JR, J. E. Quantum chemical studies of polycyclic aromatic hydrocarbons and their metabolites: correlations to carcinogenicity. **Chemico-Biological Interactions**, v. 26, p. 75-89, 1979.
27. SMITH, I. A.; BERGER, G. D.; SEYBOLD, P. G.; SERVE, M. P. Relationships between Carcinogenicity and Theoretical Reactivity Indices in Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. **American Journal of Cancer Research**, v. 38, p. 2968-2977, 1978.
28. VENDRAME, R.; BRAGA, R. S.; TAKAHATA, Y.; GALVÃO, D. S. Structure-Activity Relationship Studies of Carcinogenic Activity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Using Calculated Molecular Descriptors with Principal Component Analysis and Neural Network Methods. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 39, p. 1094-1104, 1999.
29. LEÃO, M. B. C. **Um modelo teórico para a carcinogenicidade química**. 1999. Tese (Doutorado em Química fundamental) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1999.
30. PAULING, L. The metallic orbital and the nature of metals. **Journal of Solid State Chemistry**, v.54, n. 3, p. 297-307, 1984.
31. LEÃO, M. B. C.; LONGO, R. L.; PAVÃO, A. C. A molecular orbital analysis of the DNA bases. **Journal of Molecular Structure**, v. 490, p. 145-153, 1999.
32. LEÃO, M. B. C.; PAVÃO, A. C. An electron transfer mechanism for the dimethylnitrosamine carcinogenic action. **Journal of Molecular Structure**, v. 539, p. 297-301, 2001.
33. BEDOR, C. N. G. **Estudo do potencial carcinogênico dos agrotóxicos empregados na fruticultura e sua implicação para vigilância da saúde**. 2008. 110f. Tese Doutorado em

Ciências Pública – Programa de Pós-Graduação em Ciências, CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, Recife, 2008.

34. BARROS, K. A. **Estudo químico-quântico do potencial carcinogênico de agrotóxicos**. 2010. 65f. Dissertação Mestrado em Química – Programa de pós-graduação em Química, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

35. BEDOR, C. N. G.; MORAIS, R.J.L.; CAVALCANTE, L.S.; FERREIRA, J.V.; PAVÃO, A. C. Carcinogenic potential of endosulfan and its metabolites based on a quantum chemical model. **Science of the Total Environment**, v. 408, p.6281-6284, **2010**.

36. BEZERRA, A. G.; SOUZA, A. T.; CARVALHO, P. R. L.; BEDOR, C.N. G. Identificação do potencial carcinogênico dos e agrotóxicos: Tetraconazol, ciproconazol, triadimenol, poxadiazona e cloransulam-metílico. **Evolvere Scientia**, v. 2, n. 1, p. 9-18, 2013.

37. MOITAS NETO, J. M.; MOITA, G. C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**, v. 21, p. 467-469, 1998.

38. FERREIRA, M. M. C.; MONTANARI, C. A.; GAUDIO, A. C. Seleção de variáveis em QSAR. **Química Nova**, v. 25, p. 439-448, 2002.

39. TAVARES, L. C. QSAR: A abordagem de hansch. **Química Nova**, v. 27, p. 631-639, 2004.

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

41. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**, v. 1-107. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ClassificationsAlphaOrder.pdf>>. Acesso em: Jan. 2014.

42. BOROSKY, G. L. Quantum Chemical Studies on Ultimate Carcinogenic Metabolites from Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 2901-2920, 2008.
43. LAALI, K. K.; OKAZAKI, T.; GALEMBECK, S. E. Stable ion and electrophilic chemistry of fluoranthene-PAHs. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, v. 3, p. 621–629, 2002.
44. LEÃO, M. B. C. SOUZA, F. N. TAFT, C. C.; PAVÃO, A. C. Cancer protector activity of antioxidant compounds. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 640, p. 163-165, 2003.
45. ARRORIO, A.; HONÓRIO, K. M.; SILVA, A. B. F. Propriedades químico-quânticas empregadas em estudos das relações estrutura-atividade. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 694-699, 2010.
46. TROCHE, K. S. **Estudo da atividade carcinogênica dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos através de descritores quânticos**. 2003. 91f. Dissertação Mestrado em Física- Programa de pós graduação em Física. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.
47. MORGON, N. H.; COUTINHO, K. **Métodos de química teórica e modelagem molecular**. Livraria da Física. São Paulo, 2007.
48. TRSIC, M.; PINTO, M. F. S. **Química Quântica: Fundamentos e Aplicações**. Manole Ltda. Barueri. 2009.
49. DEWAR, M. J. S.; ZOEBISCH, E. G.; HEALY, E. F.; STEWART, J. J. P. AM1: A New General Purpose Quantum Mechanical Molecular Model. **Journal of the American Chemical Society**. v. 107, p. 3902- 3909, 1985.
50. STEWART, J. J. P. **Mopac2012**; Colorado Springs, Estados Unidos, 2012.

51. STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semi-empirical methods I. Method. **Journal of Computational Chemistry**, v. 10, p. 209–220, 1989.
52. STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods II. Applications. **Journal of Computational Chemistry**, v. 10, p. 221–264, 1989.
53. TETKO, I. V.; GASTEIGER, J.; TODESCHINI, R.; MAURI, A.; LIVINGSTONE, D.; ERTL, P.; PALYULIN, V. A.; RADCHENKO, E. V.; ZEFIROV, N. S.; MAKARENKO, A. S.; TANCHUK, V. Y.; PROKOPENKO, V. V. Virtual computational chemistry laboratory – design and description. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 19, p. 453-463, 2005.
54. VCCLAB, **Virtual Computational Chemistry Laboratory**. Disponível em: <<http://www.vcclab.org>>. Acesso em Jan. 2014.
55. LI, S.; JIANG, Y. Bond Lengths, Reactivities, and aromaticities of benzenoid hydrocarbons based on the valence bond calculations. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, p. 8401- 8406, 1995.
56. UNITED NATIONS. **Global report – Regionally based assessment of persistent toxic substances**, 2003. Disponível em: <http://www.chem.unep.ch/pts/gr/Global_Report.pdf>. Acesso em Jan. 2014.
57. HOFFMANN, S.; OVASKAINEN, A. K.; PRIETO, P.; MANGELSDORF, I.; BIELER, C.; COLE, T. Acute oral toxicity: Variability, reliability, relevance and interspecies comparison of rodent LD50 data from literature surveyed for the ACuteTox project. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. v. 58, p. 395–407, 2010.
58. LAYTON, D.W.; MALLON, B. J.; ROSENBLATT, D.H.; SMALL, M. J. Deriving Allowable Daily Intakes for Systemic Toxicants Lacking Chronic Toxicity data. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.7, p. 96- 112, 1987.

59. CHENA, X.; ANB, H.; AOB, L.; SUNB, L.; LIUB, W.; ZHOUB, Z.; WANGA, Y.; CAO, J. The combined toxicity of dibutyl phthalate and benzo(a)pyrene on the reproductive system of male Sprague Dawley rats in vivo. **Journal of Hazardous Materials**, v.186, p. 835-841, 2011.

60. KNOBLOCH, K.; SZEDZIKOWSKI, S.; ZABLOBONA, A. S. Acute and subacute toxicity of acenaphthene and acenaphthylene. **Medycyna Pracy**, v. 20, p.210-22,1969.

61. DAISUKE, I.; TSUTOMU, S.; RYUTA, I. Acute toxicity, inhalation toxicity and skin irritation of cyclododecane, tricyclododecane, naphthalene, and p-dichlorobenzene (parazol). **Toho Igakkai Zasshi**, v.20, p.772-775, 1973.