



Programa de Pós-Graduação em
Sociedade, Tecnologia e
Meio Ambiente

UNIVERSIDADE EVANGÉLICA DE GOIÁS – UniEVANGÉLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SOCIEDADE, TECNOLOGIA E
MEIO AMBIENTE (PPG STMA)

WESLEY DOS SANTOS COSTA

MODELOS DE APRENDIZADO DE MÁQUINA PARA
AVALIAÇÃO PREDITIVA DE ECOTOXICIDADE DE
AGROTÓXICOS EM *Apis mellífera*

ANÁPOLIS-GO

2021

WESLEY DOS SANTOS COSTA

**MODELOS DE APRENDIZADO DE MÁQUINA PARA
AVALIAÇÃO PREDITIVA DE ECOTOXICIDADE DE
AGROTÓXICOS EM *Apis mellífera***

Dissertação submetida ao Centro Universitário Anápolis, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Ambientais. Área de concentração: Tecnologia e Meio Ambiente. Sociedade, Tecnologia e Meio Ambiente.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Josana de C. Peixoto.

Co-Orientador: Prof. Dr. Bruno Junior Neves.

ANÁPOLIS-GO

2021

WESLEY DOS SANTOS COSTA

**MODELOS DE APRENDIZADO DE MÁQUINA PARA
AVALIAÇÃO PREDITIVA DE ECOTOXICIDADE DE
AGROTÓXICOS EM *Apis mellífera***

Prof.^a Dr.^a. Josana de Castro Peixoto
Universidade Evangélica de Goiás
UniEVANGÉLICA
Presidente da Banca Examinadora
Orientadora

Prof.^a. Dr.^a. Lucimar Pinheiro Rosseto
Centro Universitário de Anápolis,
UniEVANGÉLICA
Membro interno da Banca
Examinadora

Prof. Dr. Marcelo do Nascimento
Gomes Faculdade Metropolitana
de Anápolis (FAMA)
Membro externo da Banca
Examinadora

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus e aos meus espíritos protetores, por me conceder sabedoria e paciência nas escolhas dos melhores caminhos. Por sempre me mostrarem que as provações vividas só nos dão mais força para enfrentarmos nossos desafios com mais serenidade.

Aos meus pais, por terem me dado, educação, amor e por acreditarem em mim, nos meus sonhos, por terem sido compreensivos ao me incentivar a cada tropeço. Sem vocês seria impossível chegar até aqui. Obrigado por todo apoio, paciência, amor e colo

A minha família e amigos, que me apoiaram e compartilharam momentos de descontração e muita alegria e por sempre estarem presentes quando mais precisei.

Em especial, ao meu amigo e co-orientador Professor Dr. Bruno Junior Neves, obrigado pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional, confiança, compreensão das minhas dificuldades e aflições, incentivo, paciência, dedicação, generosidade, carinho, disponibilidade, amizade, exemplo de tolerância, competência e humanismo em todos os momentos que busquei seu auxílio. Segue aqui minha admiração e respeito por acreditar e confiar em mim nesse trabalho.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Josana de Castro Peixoto, pelo suporte disponibilizado, pelas correções e incentivos por ter encontrado potencial em mim, por ser minha companheira nessa caminhada, pelos conselhos e pela sabedoria, na qual aprendi, cresci e amadureci.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Sociedade Tecnologia e Meio Ambiente – PPSTMA do Centro Universitário de Anápolis – UniEVANGÉLICA que com muito empenho, preocuparam-se em transmitir seus conhecimentos para formação de novos mestres.

Ao Dr. Rodolpho de Campos Braga da InsilicAll, pela implementação dos modelos de QSAR gerados no aplicativo BeeToxAI.

Ao Dr. José Teófilo Moreira Filho do LabMol-UFG, por compartilhar os *scripts* escritos em linguagem de programação Python para construção dos modelos de QSAR para classificação.

Aos colegas do PPSTMA, que compartilharam comigo momentos difíceis, duvidosos, descontraídos, de aprendizado, crescimento pessoal e profissional até que chegássemos aqui.

“Imagine uma nova história para sua vida e acredite nela”

(Paulo Coelho)

RESUMO

As abelhas constituem um dos principais grupos de animais associados à polinização de diversas plantas nativas e cultivadas, à regeneração de ecossistemas fragmentados e à apicultura, com destaque para *Apis mellifera* L., espécie exótica introduzida no Brasil no século XIX. Entretanto, a intensificação do uso de agrotóxicos na agricultura tem contribuído para o extermínio das populações de abelhas e, conseqüentemente, ameaçado a estabilidade da biodiversidade e os serviços ecossistêmicos. O presente trabalho objetiva a construção e validação de modelos de inteligência artificial (IA) capazes de prever a ecotoxicidade de compostos tóxicos em *Apis mellifera*. Inicialmente, os maiores conjuntos de dados públicos de produtos químicos com dados experimentais de toxicidade aguda oral e por contato para *A. mellifera* foram integrados e preparados. Em seguida, modelos de classificação robustos e preditivos (taxa de acerto ~91-92%) foram desenvolvidos para ambos os endpoints (toxicidade oral e por contato) acordo com as melhores práticas de modelagem preditiva e seguindo recomendações da OECD. Em seguida, os modelos mais preditivos foram implementados no aplicativo BeeToxAI, o qual está disponível gratuitamente em <http://beetoxai.labmol.com.br/>. Após a implementação, um conjunto externo de agrotóxicos com dados de toxicidade aguda oral (9 compostos) e por contato (14 compostos) para *A. mellifera* foi utilizado para avaliação adicional da preditividade dos modelos. O BeeToxAI foi capaz de prever a toxicidade aguda por contato de 12 dos 14 agrotóxicos e a toxicidade aguda oral de 7 dos 9 agrotóxicos. Além da predição de toxicidade, o BeeToxAI também disponibiliza a confiança (probabilidade) da predição, o domínio de aplicabilidade, e gera mapas codificados por cores das contribuições de fragmentos relativos à toxicidade. Esta valiosa contribuição pode ser utilizada como método alternativo ao uso de animais para otimização dos fluxos de registro e reavaliação de agrotóxicos no IBAMA e demais agências governamentais, de modo a estimar de forma rápida e confiável o risco inaceitável desses produtos para as abelhas

Palavras-chave: Polinizadores; *Apis mellifera*; aprendizado de máquina; ecotoxicologia, modelagem preditiva; método alternativo.

ABSTRACT

The former bees one of the main groups of animals associated with the pollination of several native and cultivated plants, the regeneration of fragmented ecosystems and beekeeping, with emphasis on *Apis mellifera* L., an exotic species introduced in Brazil in the 19th century. However, the intensification of the use of pesticides in agriculture has contributed to the extermination of bee populations and, consequently, has threatened the stability of biodiversity and ecosystem services. The present work aims to build and validate artificial intelligence (AI) models capable of predicting the ecotoxicity of toxic compounds in *Apis mellifera*. Initially, the largest public chemical data sets with experimental data on acute oral and contact toxicity for *A. mellifera* were integrated and prepared. Then, robust and predictive classification models (hit rate ~ 91-92%) were developed for both end points (oral and contact toxicity) according to best predictive modeling practices and following OECD recommendation. Then, the most predictive models were implemented in the BeeToxAI application, which is available for free at <http://beetoxai.labmol.com.br/>. After implementation, an external set of pesticides with acute oral toxicity (9 compounds) and contact (14 compounds) toxicity data for *A. mellifera* was used to further evaluate the predictability of the models. BeeToxAI was able to predict acute contact toxicity in 12 of the 14 pesticides and acute oral toxicity in 7 of the 9 pesticides. In addition to the toxicity prediction, BeeToxAI also provides the confidence (probability) of the prediction, the applicability domain, and generates color-coded maps of the contributions of fragments related to toxicity. This valuable contribution can be used as an alternative method to the use of animals to optimize the registration flows and reevaluation of pesticides at IBAMA and other government agencies, in order to quickly and reliably estimate the unacceptable risk of these products to bees.

Key-words: Pollinators; *Apis mellifera*; machine learning; ecotoxicology; predictive modeling; alternative method.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Representação de uma curva dose-resposta típica obtida em testes de toxicidade. 7
- Figura 2 -Diversidade estrutural dos compostos (nós) pertencentes aos conjuntos modelagem e de validação externa gerados para os conjuntos de toxicidade aguda por contato (a) e toxicidade aguda oral (b). Os compostos com coeficiente de Tanimoto $>0,8$ estão conectados por vértices. 20
- Figura 3 -Distribuição dos compostos tóxicos e não tóxicos dos conjuntos de dados de toxicidade aguda por contato (a) e toxicidade aguda oral (b) ao longo do espaço químico de agrotóxicos comerciais. Os clusters de compostos com coeficiente de Tanimoto $>0,8$ estão destacados pelos círculos pretos e numerados de 1–3. Os compostos dos conjuntos de toxicidade aguda por contato e oral mais representativos de cada cluster (1–3) estão representados em (c) e (d), respectivamente. 21
- Figura 4 - Interface gráfica do aplicativo BeeToxAI. Após submeter um agrotóxico para avaliação, o usuário receberá os valores de predição para toxicidade aguda por contato e oral, valores de probabilidade (confiança), estimativas de DA e mapas codificados por cores das contribuições de cada fragmento na estrutura química para a toxicidade. 26
- Figura 5 - Resultados de predição de 14 agrotóxicos comerciais usando o aplicativo BeeToxAI. NR = não reportado. Os fragmentos moleculares com contribuição positiva e negativa para a toxicidade estão coloridos em vermelho e verde, respectivamente..... 28
- Figura 6 - Continuação. NR = não reportado. Os fragmentos moleculares com contribuição positiva e negativa para a toxicidade estão coloridos em vermelho e verde, respectivamente. 29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Definição de alguns termos utilizados em testes de toxicidade	6
Tabela 2 - Informações gerais dos conjuntos de dados utilizados para geração de modelos de classificação.	19
Tabela 3 -Performance estatística dos melhores modelos de classificação desenvolvidos para toxicidade aguda oral e por contato.	23
Tabela 4 - Comparação das performances externas dos modelos de classificação desenvolvidos para toxicidade aguda em abelhas melíferas reportados na literatura. ...	24

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 - As performances estatísticas dos modelos preliminares para (a) toxicidade de contato aguda e (b) toxicidade oral aguda 41

Anexo 2 - Comparação dos melhores modelos QSAR desenvolvidos para (a) toxicidade de contato aguda e (b) toxicidade oral aguda em várias métricas usando calibração de movimento de limiar. 41

SUMÁRIO

1. REFERENCIAL TEÓRICO	2
1.1. ECOSISTEMA	2
1.2. AGROTÓXICOS E ABELHAS.....	3
1.3. NEONICOTINOIDES.....	4
1.4. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ECOTOXICOLÓGICO EM ABELHAS ..	5
2. INTRODUÇÃO	8
2.1. Aprendizado de máquina	8
3. JUSTIFICATIVA	10
4. OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICOS	12
5. METODOLOGIA	13
5.1. Conjunto de dados	13
5.2. Preparo e padronização dos dados	13
5.3. Análise do espaço químico	13
5.4. Divisão do conjunto de dados	14
5.5. Descritores moleculares do tipo <i>fingerprints</i>	14
5.6. Geração dos modelos e otimização de hiperparâmetros	14
5.7. Performance estatística.....	15
5.8. Calibração dos modelos.....	16
5.9. Domínio de aplicabilidade	17
5.10. Interpretação mecanística.....	17
5.11. Implementação dos modelos	17
6. RESULTADOS.....	19
6.1. Análise do espaço químico	20
6.2. Modelos de classificação	21
6.3. Comparação com modelos previamente publicados.....	24
6.4. BeeToxAI	25
6.4.1. Aplicação prática do BeeToxAI na avaliação toxicológica de novos agrotóxicos.....	27
7. CONCLUSÕES	31
8. REFERÊNCIAS.....	32
ANEXOS	41

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1. ECOSISTEMA

As abelhas estão entre os insetos mais importantes porque transferem o pólen entre plantas e culturas selvagens e, conseqüentemente, fornecem serviços ecológicos vitais como polinizadores. Durante os voos de forrageamento, ou enquanto eles coletam néctar, pólen, resinas de plantas e ingerem néctar e água, as abelhas, inadvertidamente, entram em contato com uma grande variedade de substâncias tóxicas, como agrotóxicos e produtos químicos industriais. Quase sempre, elas acabam levando esses produtos químicos perigosos de volta para a colônia onde eles podem induzir efeitos subletais ou letais para toda a colmeia (OERKE, 2006; OSBORNE, 2012; FRISCHE *et al.*, 2018).

Os agrotóxicos têm um papel importante na agricultura através da proteção de culturas de pragas, como fungos, ervas daninhas, insetos e doenças de plantas. Como consequência, os agrotóxicos favorecem uma melhora a produtividade e a segurança alimentar. Todavia, pesquisadores diversos países têm percebido uma queda dramática no número de abelhas devido a toxicidade destes produtos químicos (CAMERON *et al.*, 2011; OSBORNE, 2012; RHODES, 2018; BUTLER, 2018). Estudos recentes têm demonstrado diversos efeitos subletais de agrotóxicos em abelhas (ORLLETON, 2017; BUTLER, 2018; SPONSLER *et al.*, 2019). Esses produtos químicos podem alterar a atividade o perfil de atividade enzimática, a função imune, o comportamento alimentar, desenvolvimento, proporções sexuais de prole, comportamento de oviposição, mobilidade, navegação, orientação e aprendizado (OECD, 1998; BLACQUIÈRE *et al.*, 2012; FAIRBROTHER *et al.*, 2014; ORLLETON, 2017; THORBEEK *et al.*, 2017; SPONSLER *et al.*, 2019; BCC 2019; BANKS *et al.*, 2020; OECD, 2020).

Em resposta a esses problemas, agências governamentais e órgãos consultivos científicos tem desenvolvido e padronizado métodos e estratégias para avaliar os efeitos tóxicos de agrotóxicos e produtos químicos industriais em abelhas. Atualmente, a Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD)(EPA, 2020) e o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA) (EPA, 2018) recomendam que os efeitos tóxicos de produtos químicos em abelhas sejam determinados com 24 ou 48 horas de exposição, com o intuito de determinar a dose e/ou concentração que induz a morte de 50% de uma população de abelhas (DL₅₀ e LC₅₀, respectivamente). Entretanto, a avaliação completa da toxicidade para uma grande quantidade de substâncias químicas (em várias doses e concentrações) por meio destes ensaios experimentais é demorada,

dispendiosa e representa um problema ético. Portanto, o desenvolvimento de novos métodos e tecnologias para acessar a ecotoxicidade em abelhas é urgentemente necessário.

1.2. AGROTÓXICOS E ABELHAS

Os agrotóxicos têm um papel essencial na proteção das plantas e na redução das perdas de safra por insetos e patógenos durante os processos de agricultura em grande escala (OERKE, 2006; FRISCHE *et al.*, 2018). No entanto, vários efeitos nocivos dos agrotóxicos têm sido descritos na literatura, afetando os ecossistemas aquáticos e terrestres, principalmente para espécies não-alvo, como peixes, minhocas, pássaros e abelhas (OSBORNE, 2012; RHODES, 2018). Nos últimos anos, houve um aumento no impacto dos agrotóxicos nas abelhas (CAMERON *et al.*, 2011; BLACQUIÈRE *et al.*, 2012; FAIRBROTHER *et al.*, 2014; THORBEEK *et al.*, 2017; BUTLER, 2018; BANKS *et al.*, 2020). Durante seus voos de forrageamento ou enquanto coletam néctar, pólen e água, as abelhas podem inadvertidamente ser contaminadas com uma grande variedade de agrotóxicos (SPONSLE *et al.*, 2019). Muitas vezes, as abelhas contaminadas carregam esses produtos químicos perigosos de volta para a colmeia, podendo induzir efeitos subletais ou letais para toda a colônia (OLLERTON, 2017; SPONSLE *et al.*, 2019).

A toxicidade induzida quimicamente é a principal causa da extinção recente de abelhas (*Apis mellifera*), que pode resultar em uma séria ameaça à segurança alimentar global e aos serviços do ecossistema planetário. O consumo anual de agrotóxicos no Brasil é superior a 300 mil toneladas de produtos formulados. Expresso em ingredientes ativos, isto representa mais de 130 mil toneladas de consumo anual destes produtos químicos no país. Nos últimos quarentas anos, o consumo de agrotóxicos aumentou 700%, enquanto a área agrícola aumentou apenas 78% (SPADOTTO *et al.*, 2004). Estes dados mostram a situação alarmante da agricultura, o que pode acarretar sérios danos ao meio ambiente.

No Brasil, têm ocorrido muitos relatos de apicultores sobre a mortalidade súbita de suas abelhas, em diversas regiões do país. Em todos os casos foram relatos dos apicultores uma alta mortalidade nas colmeias atingidas. Infelizmente na grande maioria dos casos, não foi possível coletar amostras das abelhas mortas para análise e comprovação da contaminação. Inúmeras suspeitas já foram levantadas a fim de encontrar os motivos da intoxicação e morte das abelhas. Entre alguns motivos estão as mudanças climáticas globais, que alteram o regime de chuvas de muitas regiões, provocando secas

prolongadas, a intoxicação por plantas tóxicas e, principalmente a exposição das abelhas aos agrotóxicos em nossos campos de cultivo (EMBRAPA, 2016; PIRES *et al.*, 2016; SPONSLE *et al.*, 2019).

1.3. NEONICOTINOIDES

Os agentes polinizadores e a reprodução vegetal proporcionada por sua ação são elementos cruciais no funcionamento de quase todos os ecossistemas terrestres, incluindo aqueles dominados pela agricultura (EMBRAPA, 2016; PIRES *et al.*, 2016; BBC, 2019). No entanto, o uso irracional de inseticidas nos ecossistemas pode ocasionar o desequilíbrio da população de abelhas que visitam estes locais, bem como a exposição a agrotóxicos também pode afetar a sobrevivência da colônia. Em particular, a aplicação de inseticidas neonicotinóides, que aumentou substancialmente em escala global ao longo do última década, foi suspeita de representar uma grande ameaça à sobrevivência das abelhas (CAMERON *et al.*, 2011; BLACQUIÈRE *et al.*, 2012; OLLERTON, 2017).

Os neonicotinóides são neurotoxinas que agem como agonistas do receptor nicotínico da acetilcolina, interrompendo o colinérgico neuronal transdução de sinal, levando a um comportamento anormal, imobilidade e morte de pragas de insetos alvo (MATSUDA *et al.*, 2001; TOMIZAWA E CASIDA, 2005; ELBERT *et al.*, 2008). Frequentemente, insetos não-alvo, como as abelhas, entram em contato com esses inseticidas (PISA *et al.*, 2015). Os neonicotinóides são chamados de "sistêmicos", pois são absorvidos pelas plantas e espalhados por todos os tecidos através de seus sistema vascular (ELBERT *et al.*, 2008). Assim, pólen, néctar e também os fluidos de gutação podem conter neonicotinóides (DESNEUX *et al.*, 2007; CRESSWELL, 2011; BLACQUIÈRE *et al.*, 2012; GOULSON, 2013; VAN DER SLUIJS *et al.*, 2013; EASAC, 2015). Assim, as abelhas forrageiras podem entrar contato com pólen e néctar contaminados com neonicotinóides e transportá-los para a colmeia, onde são frequentemente detectados em pão de mel e abelha

Efeitos letais diretos dos neonicotinóides, causados por acidentes a exposição de abelhas forrageiras a concentrações tóxicas agudas de neonicotinóides ocorre apenas raramente. Mas comumente, as abelhas estão expostas a concentrações mais baixas de neonicotinóides, levando a efeitos subletais, como aprendizagem prejudicada ou homing comportamento. Alguns neonicotinóides como o tiaclopride são aplicados como sprays em colheitas com flores, e. colza. Outras, como imidacloprida, clotianidina ou tiametoxam são principalmente aplicado como curativo de sementes ou aplicações no

solo. Recentemente, estes últimos três neonicotinóides foram temporariamente proibidos pelo Comissão Europeia (2013), devido às crescentes preocupações sobre o risco que eles podem representar para as abelhas e outros polinizadores (GROSS, 2013; EFSA, 2013a, b, c, 2014). As perdas de colônias são frequentemente associadas a altos níveis de infecção de patógenos e parasitas. Isso sugere uma ligação causal entre fatores de estresse e função imunológica reduzida. A defesa imunológica depende em vários fatores internos e externos, como o nutricional estado ou a idade das abelhas. Além disso, há evidências de que o ectoparasita invasivo *Varroa destructor* Anderson e Trueman (2000) prejudica o defesa imunológica das abelhas, reduzindo a expressão de genes imuno-relevantes e aumentando a replicação viral, assim afetando a longevidade e a resistência a doenças.

1.4. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ECOTOXICOLÓGICO EM ABELHAS

Testes de toxicidade são ensaios laboratoriais, realizados sob condições experimentais específicas e controladas, utilizados para estimar a toxicidade de substâncias, efluentes industriais e amostras ambientais (águas ou sedimentos). Nesses ensaios, organismos-testes são expostos a diferentes concentrações de amostra e os efeitos tóxicos produzidos sobre eles são observados e quantificados (OERKE, 2006; OSBORNE, 2012; FRISCHE *et al.*, 2018). Os testes de toxicidade não permitem obter uma resposta absoluta sobre o risco que uma determinada amostra apresenta para a população humana, uma vez que é muito difícil extrapolar para os seres humanos os resultados de toxicidade obtidos para os organismos em laboratório e até mesmo correlacionar os resultados de toxicidade entre organismos de diferentes espécies (OERKE, 2006; GOULSON, 2013; PIRES *et al.*, 2016).

A ciência que estuda os efeitos nocivos causados por substâncias químicas sobre organismos vivos é chamada toxicologia (FAIRBROTHER *et al.*, 2014). A toxicologia tem como principais objetivos identificar os riscos associados a uma determinada substância e determinar em quais condições de exposição esses riscos são induzidos (THORBEEK *et al.*, 2017). A ocorrência, natureza, incidência, mecanismo e fatores de risco associados às substâncias tóxicas são parâmetros experimentalmente investigados pela toxicologia (OEKER, 2006).

A ecotoxicologia é uma área especializada da toxicologia ambiental que centra seus estudos nos efeitos ocasionados por agentes químicos e físicos sobre a dinâmica de

populações e comunidades integrantes de ecossistemas definidos (FRISCHE *et al.*, 2018; BLACQUIÈRE *et al.*, 2012). O termo ecotoxicologia é algumas vezes utilizado como sinônimo do termo toxicologia ambiental, entretanto, este último também abrange os efeitos dos agentes químicos do ambiente sobre os seres humanos (OLLETON, 2017).

Tabela 1 - Definição de alguns termos utilizados em testes de toxicidade

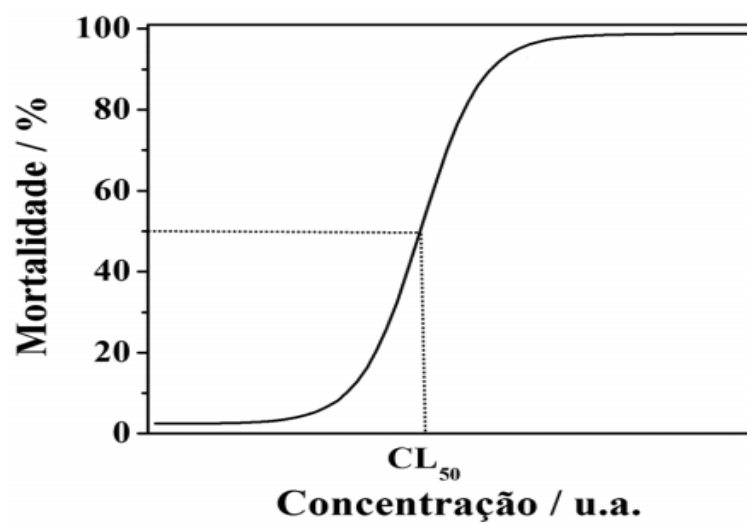
Parâmetro	Definição	Tempo de exposição
DL₅₀	Dose Letal Média: dose de amostra que causa mortalidade de 50% dos organismos no tempo de exposição e condições do teste.	24 a 96h
CL₅₀	Concentração Letal Média: concentração de amostra que causa mortalidade de 50% dos organismos no tempo de exposição e nas condições do teste.	24 a 96h

Fonte: (Adaptado de OGA *et al.*, 2008).

Na Tabela 2 são definidos os parâmetros mais freqüentemente utilizados em testes de toxicidade. A DL₅₀ é um parâmetro normalizado pelo peso do organismo, ou seja, é expresso em mg de substância química por massa do organismo em kg (JIANG, 2020). O termo dose refere-se à quantidade de substância tóxica que entra no organismo e, portanto, pode ser inferior à dose à qual o organismo é exposto (BUTLER, 2018). DL₅₀ é um parâmetro bastante utilizado em farmacocinética e medicina (FAIRBROTHER *et al.*, 2014). Os parâmetros CL₅₀, CE₅₀, CENO e CEO, freqüentemente utilizados em ecotoxicologia aquática, são normalizados em função do ambiente em que os organismos são expostos (JIANG, 2020). Por esse motivo, eles são expressos em termos da concentração ambiental da substância química, a qual é geralmente expressa em mg de substância por litro de solução preparada em água natural ou sintética apropriada (água de diluição) (SPONSLER *et al.*, 2019).

A relação entre a concentração de uma substância química à qual é exposta um determinado organismo e o efeito nocivo que lhe é produzido, conhecida como relação dose-resposta, é um dos aspectos mais importantes da ecotoxicologia aquática. A relação dose-resposta constitui a base fundamental para a avaliação do risco gerado pelas substâncias químicas no meio ambiente porque permite quantificar a toxicidade aguda dessas substâncias.

Figura 1 - Representação de uma curva dose-resposta típica obtida em testes de toxicidade.



Fonte: (Adaptado de OGA et al., 2008).

2. INTRODUÇÃO

Os agrotóxicos possuem um papel fundamental no controle de pragas agrícolas. (OERKE, 2006; FRISCHE *et al.*, 2018). No entanto, vários efeitos nocivos desses produtos químicos vêm sendo relatados para organismos aquáticos e terrestres prestadores de serviços ecológicos, tais como abelhas (OERKE, 2006; OSBORNE, 2012; BLACQUIÈRE *et al.*, 2012; FAIRBROTHER *et al.*, 2014; FRISCHE *et al.*, 2018). Durante seus voos de forrageamento ou enquanto coletam néctar, pólen e água, as abelhas podem inadvertidamente ser contaminadas com uma grande variedade de produtos químicos tóxicos (BANKS *et al.*, 2020). Muitas vezes, as abelhas contaminadas carregam esses produtos químicos perigosos de volta para a colmeia, podendo induzir efeitos subletais ou letais para toda a colônia (THORBEEK *et al.*, 2017; BANKS *et al.*, 2020)

A redução drástica do número de abelhas representa uma séria ameaça à manutenção da biodiversidade e segurança alimentar global (ORLLETON, 2017; SPONSLER *et al.*, 2019). Apenas nos três primeiros meses de 2019, os neonicotinoides (inseticidas derivados de nicotina) foram responsáveis pela morte de 400 milhões de abelhas no Rio Grande do Sul, 45 milhões no Mato Grosso do Sul e 7 milhões em São Paulo. Conseqüentemente, órgãos consultivos científicos e agências governamentais como o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) têm implementados protocolos padronizados para avaliação toxicológica de agrotóxicos em abelhas melíferas (*Apis mellifera*) (OECD 1998). Os testes de toxicidade aguda exigidos avaliam a dose do agrotóxico que é letal para 50% das abelhas submetidos à experimentação (DL₅₀). As vias de exposição predominantes são por contato (ou seja, pulverização direta) ou incubação oral (ou seja, consumo de néctar e pólen).

2.1. Aprendizado de máquina

A característica laboriosa e preço dos ensaios experimentais com abelhas representa a principal entrave para avaliação de risco ecotoxicológico durante o registro e reavaliação de agrotóxicos. Por exemplo, o custo médio para avaliação de toxicidade aguda de um único agrotóxico em abelhas adultas é de R\$ 71 mil (EPA, 2020) Conseqüentemente, métodos computacionais tem sido sugeridos como solução estratégia para substituição dos testes com animais (MYATT *et al.*, 2018). Uma vez estando em conformidade com os princípios de substituição, refinamento e redução (3R's) de animais propostos por Russell e colaboradores (1959).

Os métodos computacionais tradicionais são baseados no conceito de que compostos que compartilham similaridade estrutural (*read-across*) ou certas subestruturas (*structural alerts*) podem compartilhar as mesmas propriedades toxicológicas. No entanto, essas metodologias baseadas em regras têm sido abandonadas por conta de sua limitada taxa de acerto durante as extrapolações (ALVES *et al.*, 2016). Nesse sentido, os esforços no campo da toxicologia preditiva têm sido direcionados para a construção e validação de modelos de classificação usando aprendizado de máquina (ML, do inglês *Machine Learning*), por se tratar de uma metodologia com maior poder de predição (ALVES *et al.*, 2016; GOB *et al.*, 2017; JING *et al.*, 2018).

O ML representa um subcampo da inteligência artificial que evoluiu do estudo de reconhecimento de padrões e da teoria do aprendizado computacional. Conceitualmente, o algoritmo de ML possui a capacidade de aprender com dados sem ser explicitamente programados para isso (FOURCHES, 2014; TETKO *et al.*, 2016). Dois tipos de informação são necessários para a geração de um modelo supervisionado: um conjunto de compostos (variável independente) e seus respectivos valores de toxicidade experimental (variável dependente). A variável dependente pode ser uma medida quantitativa contínua (*e.g.*, DL_{50}) ou categórica, utilizando um limiar para separar os compostos em classes (*e.g.*, tóxico e não tóxico) quando o intuito é gerar modelos de classificação (KUBINYI, 1993). O processo de desenvolvimento e validação de um modelo pode ser representado em quatro etapas, conforme ilustrado na Figura 1.

Na primeira etapa, o conjunto de dados é dividido em dois subconjuntos: conjunto modelagem e conjunto externo. O conjunto de treinamento, geralmente constituído por 80% dos compostos do conjunto total, é utilizado na construção do modelo. Já os compostos do conjunto externo (20%) são utilizados para avaliar a capacidade preditiva do modelo (CHERKASOV *et al.*, 2014); Na segunda etapa, todas as estruturas químicas são convertidas em descritores moleculares (transformação a informação química em um número útil) (TODESCHINI; CONSONNI, 2001); Na terceira etapa, métodos de ML (*e.g.*, *Random Forest* (RF) (BREIMAN, 2001), *Deep Neural Networks* (DNN) (LECUN *et al.*, 2015; SCHMIDHUBER, 2015), *Support Vector Machine* (SVM) (VAPNIK, 2000)) são utilizados para estabelecer relações quantitativas entre os descritores moleculares (conjunto modelagem) e propriedade toxicológica em estudo (QSAR, do inglês, *Quantitative Structure-Activity/Toxicity Relationship*). Esta etapa consiste em gerar uma hipótese capaz estabelecer e otimizar uma relação entre descritores (x) e propriedade

toxicológica (Y) utilizando parâmetros de ajuste (a e b) (WELLING, 2011; MITCHELL, 2014; LAVECCHIA, 2015), conforme descrito na Equação abaixo:

$$Y(x) = a + bx$$

Na quarta etapa, a capacidade preditiva do modelo gerado é determinada utilizando métricas apropriadas, as quais irão avaliar a habilidade do modelo em prever corretamente a toxicidade de compostos do conjunto externo. Uma vez validado, o modelo gerado representa uma ferramenta inestimável para a predição de toxicidade de agrotóxicos não testados experimentalmente. (VAPNIK ,2000; BREIMAN,2001; TODESCHINI; CONSONNI, 2001; WELLING, 2011; CHERKASOV *et al.*, 2014; MITCHELL, 2014; LECUN *et al.*, 2015; SCHMIDHUBER, 2015; LAVECCHIA, 2015)

3. JUSTIFICATIVA

Considerando (i) o papel fundamental dos agrotóxicos no controle de pragas; (ii) o declínio drástico da população de abelhas no mundo inteiro; (iii) o papel das abelhas como organismos prestadores de serviços ecológicos fundamentais para manutenção da biodiversidade e segurança alimentar; e (iv) o alto custo e baixa usabilidade dos métodos experimentais de avaliação toxicológica, o presente projeto justifica-se pelas seguintes razões:

- I. Os modelos de classificação baseados em ML apresentam performance preditiva superior aos métodos baseados em regras (*read-across* e *structural alerts*) e métodos de regressão clássicos usados para construção de QSAR;
- II. Os modelos de classificação disponíveis na literatura científica para avaliação de toxicidade aguda em abelhas não obedecem às boas práticas de modelagem preditiva e princípios da (OECD);
- III. Modelos de classificação podem reduzir o tempo e custo associados ao registro e reavaliação de agrotóxicos e favorecer a comercialização de produtos químicos menos tóxicos;
- IV. Uma vez validados, os modelos de classificação podem ser utilizados para triagem virtual de todo o espaço químico de agrotóxicos;
- V. Um aplicativo digital baseado em ML para predição de toxicidade aguda de agrotóxicos em abelhas pode ser considerado um método alternativo ao uso de

animais. Uma vez validado, essa ferramenta pode otimizar os fluxos de registro e reavaliação de agrotóxicos no IBAMA e demais agências governamentais do Mercosul.

4. OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICOS

Diante do exposto, o objetivo geral dessa proposta foi desenvolver um aplicativo (BeeToxAI) utilizando métodos de ML para avaliação preditiva de toxicidade aguda oral e por contato de agrotóxicos em *A. mellifera*.

Os objetivos específicos foram:

- Coletar, integrar e padronizar os maiores conjuntos de dados de compostos com dados de toxicidade aguda oral e por contato para *A. mellifera*;
- Desenvolver e validar modelos de QSAR para classificação utilizando cinco tipos de impressões digitais moleculares e três métodos de aprendizado de máquina;
- Realizar a interpretação mecanística dos modelos de QSAR utilizando os mapas de probabilidade;
- Implementar os modelos construídos em um servidor e aplicativo de acesso livre.
- Diminuir o alto custo dos modelos experimentais e baixa vasão
- Evitar a morte desnecessária de abelhas

5. METODOLOGIA

5.1. Conjunto de dados

Inicialmente, todos os compostos com dados de toxicidade aguda (DL_{50}) para *A. mellifera* disponíveis nas bases de dados US EPA's Ecotox, EFSA's OpenFoodTox e OCHEM foram compilados e integrados. Em seguida, os compostos foram categorizados em "tóxicos" e "não tóxicos" usando um limiar de 11 $\mu\text{g}/\text{abelha}$ e depois divididos em dois conjuntos de dados com base no tipo de exposição (toxicidade aguda oral ou por contato).

5.2. Preparo e padronização dos dados

Todas as estruturas químicas e dados toxicológicos correspondentes foram padronizadas usando o programa Standardizer v.16.9.5.0 (ChemAxon Inc., Budapest, Hungary) e de acordo com protocolo padrão desenvolvido por Fourches e colaboradores (2010, 2015, 2016). Nesta etapa, hidrogênios explícitos foram adicionados as estruturas químicas, enquanto sais, misturas, polímeros e compostos organometálicos foram removidos. Além disso, quimiotipos específicos, como anéis aromáticos e grupos nitro foram normalizados. Em seguida, duplicatas (*i.e.*, registros químicos idênticos repetidos no conjunto de dados) foram identificadas e excluídas usando as seguintes regras: (i) se as duplicatas apresentassem discordância (*e.g.*, tóxico vs. não tóxico), ambas as entradas foram excluídas; (ii) se os resultados forem concordantes, uma entrada foi retida no conjunto de dados e a outras excluídas.

5.3. Análise do espaço químico

O espaço químico de cada conjunto de dados foi analisado através dos mapas de similaridade gerados no programa OSIRIS DataWarrior v.05.02.01 (SANDER *et al.*, 2015). O mapa de similaridade usa uma abordagem *Rubberbanding Forcefield*, que traduz similaridade (vértices) entre compostos (nós). A abordagem pode ser executada de acordo com as seguintes etapas: (i) posicionamento aleatório de todos os compostos no espaço bidimensional (2D); (ii) cálculo da matriz de similaridade entre todos os compostos usando o coeficiente de Tanimoto (T_c) e descritores FragFP; (iii) identificação dos vizinhos mais próximos ($T_c > 0,8$) de cada composto; e (iv) realocação gradual de todos os compostos para garantir que estruturas químicas semelhantes sejam agrupadas. (SANDER *et al.*, 2015).

5.4. Divisão do conjunto de dados

Os conjuntos de dados foram divididos aleatoriamente em dois subconjuntos: conjunto modelagem (80% dos compostos) e conjunto externo (20% dos compostos). Os compostos do conjunto modelagem foram então submetidos à estratégia de validação cruzada de *5-folds* (5FCV), enquanto o conjunto externo foi usado para avaliar a preditividade externa do modelo. Em seguida, cinco subconjuntos de tamanho igual foram gerados para o conjunto modelagem usando a estratégia de 5FCV. Nessa estratégia, quatro subconjuntos (80% do conjunto de modelagem) foram utilizados para construir o modelo (conjunto de treinamento) enquanto os 20% restantes foram utilizados como conjunto teste para avaliar a robustez do modelo. Os modelos de ML foram desenvolvidos cinco vezes, permitindo que cada um dos cinco subconjuntos seja usado como um conjunto teste momentâneo.

5.5. Descritores moleculares do tipo *fingerprints*

Os *fingerprints* são descritores moleculares representados através de dígitos binários (*bits*) que codificam a presença ou ausência de subestruturas específicas em uma estrutura química. Na presente proposta, *fingerprints* circulares do tipo Morgan (ECFP) e FeatMorgan (FCFP), e *Molecular ACCess System keys* (MACCS) foram calculados para todos os compostos usando o programa de código aberto RDKit, (RINIKER, 2015) executado em Python v.3.7. Morgan e Feat Morgan foram gerados com raio variando entre 2–4 e comprimento de 2.048 *bits*.

5.6. Geração dos modelos e otimização de hiperparâmetros

Modelos de classificação baseados em ML foram gerados através da combinação dos *fingerprints* moleculares com os algoritmos SVM e RF, disponíveis na biblioteca Scikit-learn v.0.19.2. A biblioteca TensorFlow⁴⁸ foi utilizada como *backend*. Os hiperparâmetros de ML foram otimizados usando uma abordagem bayesiana implementada na biblioteca Scikit-Optimize v.0.7.4. A otimização bayesiana pode ser representada através seguinte equação:

$$P(f|D_{1:t}) \propto P(D_{1:t}|f)P(f)$$

Em que, x_i é a i -ésima amostra e $f(x_i)$ é a observação da função objetivo (G -mean) em x_i . Como as observações $D_{1:t} = \{x_{1:t}, f(x_{1:t})\}$ são acumuladas, a distribuição anterior é combinada com a função de probabilidade $P(D_{1:t}|f)$ de estimar $D_{1:t}$, dado o modelo f multiplicado pela probabilidade anterior de $P(f)$. Em outras palavras, a otimização bayesiana identificará os valores que maximizam a função objetivo construindo uma função substituta (modelo probabilístico) com base nas combinações de hiperparâmetros explorados (WU *et al.*, 2019; JIANG *et al.*, 2020).

5.7. Performance estatística

O desenho interno (conjunto de modelagem) e externo (conjunto externo) dos modelos foi avaliada utilizando as seguintes métricas: acurácia (ACC), sensibilidade (SE), especificidade (SP), valor preditivo positivo (PPV), valor preditivo negativo (NPV), coeficiente de correlação de Matthews (MCC) e área sobre a curva ROC (AUC). Essas métricas foram calculadas conforme as equações:

$$\begin{aligned} \text{ACC} &= \frac{\text{VP} + \text{VN}}{N} \\ \text{SE} &= \frac{\text{VP}}{\text{VP} + \text{FN}} \\ \text{SP} &= \frac{\text{VN}}{\text{VN} + \text{FP}} \\ \text{PPV} &= \frac{\text{VP}}{\text{VP} + \text{FP}} \\ \text{NPV} &= \frac{\text{VN}}{\text{VN} + \text{FN}} \\ \text{MCC} &= \frac{\text{VP} \times \text{VN} - \text{FP} \times \text{FN}}{\sqrt{(\text{VP} + \text{FP})(\text{VP} + \text{FN})(\text{VN} + \text{FP})(\text{VN} + \text{FN})}} \\ \text{AUC} &= \sum_i [(SE_{i+1})(SP_{i+1} - SP_i)] \end{aligned}$$

Em que N representa o número de compostos, VP e VN representam o número de verdadeiros positivos e verdadeiros negativos, FP e FN representam o número de falsos positivos e falsos negativos, respectivamente. Em seguida, o kappa de Cohen (κ) foi usado para medir a concordância entre os valores experimentais e preditos através das seguintes equações:

$$\Pr(a) = \frac{VP + VN}{N}$$

$$\Pr(e) = \frac{(VP + FP) \times (VP + FN) + (VN + FN) \times (VN + FP)}{N}$$

$$\kappa = \frac{\Pr(a) - \Pr(e)}{1 - \Pr(e)}$$

Em que $\Pr(e)$ é a probabilidade hipotética de concordância por acaso e $\Pr(a)$ representa a concordância relativa observada entre a predição gerada pelo modelo e o dado experimental.

5.8. Calibração dos modelos

Os modelos gerados foram calibrados usando uma abordagem *threshold-moving* implementada em Scikit-learn v.0.19.2 (PEDREGOSA *et al.*, 2012). Essa abordagem usa diferentes limiares de probabilidade (entre 0% e 100%) obtidos a partir das curvas ROC para identificar o limiar com o maior valor de média geométrica (*G-mean*). Assim, os exemplos de classes minoritárias são mais fáceis de serem previstos corretamente. Após ajustar o limiar de probabilidade às predições, uma classe Python foi usada para sobrepor o valor de predição original à estrutura Scikit-learn, enquanto os valores de probabilidade foram escalonados da equação:

$$x_{\text{normalizado}} = \frac{x - \min(x)}{\max(x) - \min(x)}$$

Em que $\min(x)$ representa o limiar de probabilidade (LP) atualizado após calibração, $\max(x)$ representa o valor máximo da faixa de distribuição e $x \in [\min(x), \max(x)]$ representa a medição a ser escalonada. Assim a probabilidade x da classe minoritária (tóxicos) foi atribuída dentro de um intervalo de [LP, 100%], com $x = \min(x)$ representando o limiar LP e $x = \max(x)$ mapeado como 100%. Por outro lado, a probabilidade x da classe majoritária (não tóxicos) foi atribuída dentro de um intervalo de [0%, LP], com $x = \min(x)$ representado como 0% e $x = \max(x)$ mapeado como o LP.

5.9. Domínio de aplicabilidade

O domínio de aplicabilidade (DA) dos modelos foi determinado usando a similaridade Dice (D_S) entre um composto sob predição e os compostos dos conjuntos treinamento momentâneos (SØRENSEN, 1948). Em seguida, um valor de corte de similaridade (D_T) foi usado para estimar a confiabilidade das predições, conforme destacado na equação abaixo:

$$D_T = \bar{y} + Z\sigma$$

Em que \bar{y} representa a D_S média entre o composto sob predição e os compostos do conjunto treinamento momentâneo, σ é o desvio padrão da D_S e Z é um parâmetro arbitrário que controla o nível de significância. Se a D_S exceder o valor de D_T , a predição pode ser considerada menos confiável (GOLBRAIKH, 2003).

5.10. Interpretação mecanística

Mapas de contribuição foram gerados a partir de modelos de classificação para visualizar os fragmentos moleculares que contribuem positivamente ou negativamente para a toxicidade aguda oral e por contato (RINIKER, 2013; NEVES *et al.*, 2020). Nessa abordagem, o "peso" de um fragmento codificado através de um *bit* é considerado como uma diferença de probabilidade predita obtida quando o *bit* do *fingerprint* é removido. Em seguida, os pesos normalizados de cada *bit* são usados para colorir os átomos ou fragmentos em um mapa topográfico. A cor verde indica a contribuição negativa para toxicidade (*i.e.*, a probabilidade aumenta quando o *bit* é removido), enquanto a cor vermelha indica uma contribuição positiva para toxicidade (*i.e.*, probabilidade predita diminui quando o *bit* é removido) (RINIKER, 2013; NEVES *et al.*, 2020).

5.11. Implementação dos modelos

O aplicativo digital BeeToxAI foi implementado em uma estrutura multiplataforma com tecnologia pronta para suportar demandas de grande escala em ambientes Kubernetes e arquitetura de microserviços. O *backend* (ponte entre os dados que vem no navegador rumo ao banco de dados e vice-versa) é um sistema de exibição flexível e de alto desempenho para modelos de aprendizado de máquina, projetado para ambientes de produção. O serviço de *backend* facilita a implantação de novos algoritmos e experimentos, mantendo a arquitetura de servidor e Application Programming Interface (APIs). A API é um conjunto de rotinas e pares para acesso a um aplicativo de software

ou plataforma baseado na web que funciona com infraestrutura JSON e permite integração pronta para uso com qualquer outro *software* de computador (*e.g.*, KNIME). As principais bibliotecas integradas são Python, RDKit, Scikit-learn, uWSGI, JavaScript, Flask, Matplotlib e Seaborn. O BeeToxAI também inclui a ferramenta JSME de JavaScript, para desenho e edição de estruturas químicas. Além disso, o *back-* e *frontend* usa GitLab para integração contínua (CI), entrega contínua (CDE) e implantação contínua (CD). A base de código do aplicativo está hospedada em um repositório Git e, para cada *push*, executa um pipeline de *scripts* para construir, testar, validar e implantar o aplicativo para produção.

6. RESULTADOS

No presente projeto, o maior conjunto de dados de domínio público com dados de LD₅₀ para *A. mellifera* foi compilado usando as melhores práticas para preparo de dados químicos e toxicológicos (FOURCHES; MURATOV; TROPSHA, 2010, 2015, 2016). Em seguida, um limiar de 11 µg/abelha foi usado para categorizar os compostos em tóxicos (≤ 11 µg/abelha) e não tóxicos (> 11 µg/abelha) (EPA, 2020). Os compostos foram então agrupados em dois conjuntos de dados, “toxicidade aguda por contato” e “toxicidade aguda oral”, de acordo com o tipo de exposição das abelhas durante os ensaios experimentais. Os detalhes de ambos os conjuntos de dados estão descritos na Tabela 2.

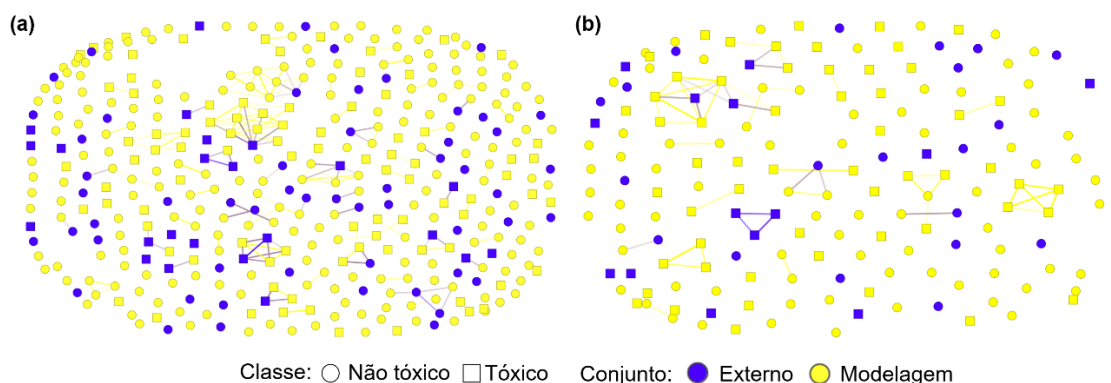
Tabela 2 - Informações gerais dos conjuntos de dados utilizados para geração de modelos de classificação.

Conjunto de dados	Tóxicos	Não tóxicos	Total	Proporção tóxicos/não tóxicos
Toxicidade aguda por contato	112	269	381	1:2.4
Modelagem	89	215	304	1:2.4
Externo	23	54	77	1:2.3
Toxicidade aguda oral	71	98	169	1:1.4
Modelagem	57	78	135	1:1.3
Externo	14	20	34	1:1.4

Fonte: Própria.

Após o preparo e padronização dos dados, o conjunto com dados de toxicidade aguda por contato tinha 381 compostos (tóxicos: 112, não tóxicos: 269), enquanto o conjunto com dados de toxicidade aguda oral tinha 169 compostos (tóxicos: 71, não tóxicos: 98). Em seguida, os conjuntos de dados foram divididos em conjuntos de modelagem (80%) e externos (20%). Assim, 304 compostos do conjunto de toxicidade aguda por contato foram usados para o desenvolvimento dos modelos de classificação, enquanto os 72 compostos restantes foram usados para validar os modelos. Da mesma forma, 135 compostos do conjunto de toxicidade aguda oral foram usados para o desenvolvimento dos modelos, enquanto os 34 compostos restantes foram usados na validação externa. A qualidade geral da divisão dos conjuntos de dados é mostrada na Figura 2, a qual indica que os compostos do conjunto externo são relativamente distribuídos em todas as regiões do espaço químico dos compostos do conjunto de modelagem.

Figura 2 - Diversidade estrutural dos compostos (nós) pertencentes aos conjuntos modelagem e de validação externa gerados para os conjuntos de toxicidade aguda por contato (a) e toxicidade aguda oral (b). Os compostos com coeficiente de Tanimoto >0,8 estão conectados por vértices.



Fonte: Propria.

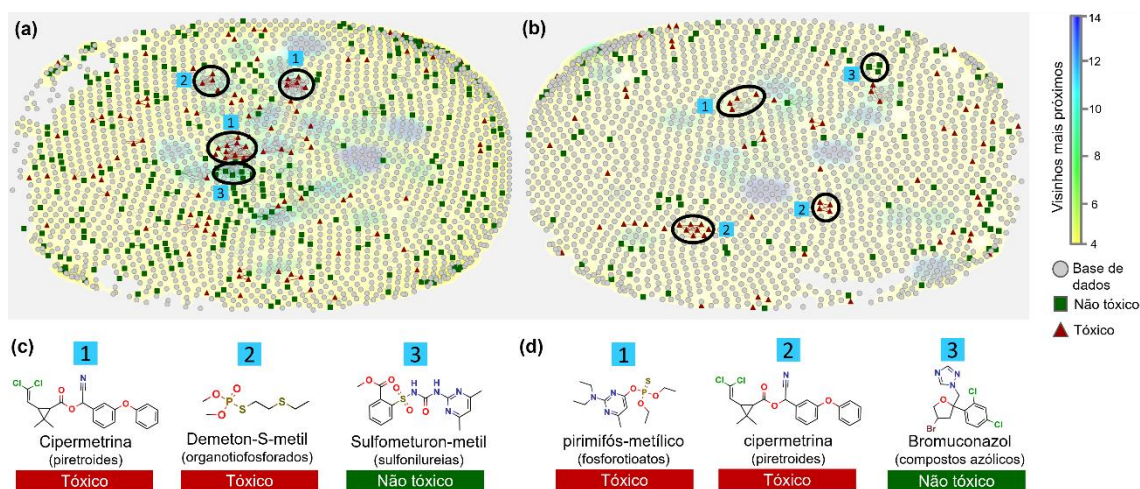
6.1. Análise do espaço químico

A análise do espaço químico foi realizada usando mapas de similaridade (SANDER *et al.*, 2015) gerados a partir dos conjuntos de toxicidade aguda oral e por contato e um conjunto de 2.044 agrotóxicos coletados da base de dados *Pesticide Product Information System Database*. De acordo com a Figura 3, ambos os conjuntos (*i.e.*, toxicidade aguda por contato e oral) são estruturalmente diversos, contendo grupos pequenos de compostos tóxicos e não tóxicos (círculos pretos), distribuídos ao longo de todas as regiões do espaço químico de agrotóxicos comerciais. Esta descoberta corrobora com o estudo de Alves *et al.*⁶⁷ que demonstraram que a propriedade toxicológica de um composto depende de sua estrutura química e não de sua classe industrial (ALVES *et al.*, 2018).

Os mapas de similaridade também demonstraram que os compostos tóxicos e não tóxicos não compartilham os mesmos *clusters*. Nesse contexto, ambos os conjuntos, toxicidade aguda por contato (Figura 3a) e oral (Figura 3b), possuem poucos “*cliffs*” de toxicidade (*i.e.*, compostos estruturalmente semelhantes com uma grande diferença na toxicidade) (WASSERMANN *et al.*, 2010; STUMPFE; BAJORATH, 2012). Os compostos representativos dos *clusters* 1-3 do conjunto de dados de toxicidade aguda por contato estão representados na Figura 3c. O *cluster* 1 contém piretroides tóxicos; *cluster* 2 – organotiofosforados tóxicos; *cluster* 3 – sulfonilureias não tóxicas. Já os compostos representativos dos *clusters* 1-3 do conjunto de dados de toxicidade aguda oral estão representados na Figura 3d. O *cluster* 1 contém fosforotioatos tóxicos; *cluster* 2 –

piretroides tóxicos; e *cluster 3* – compostos azólicos não tóxicos. Essas informações indicam que ambos os conjuntos de dados apresentam boa cobertura do espaço químico e, conseqüentemente, podem ser utilizados para geração de modelos de classificação usando ML.

Figura 3 -Distribuição dos compostos tóxicos e não tóxicos dos conjuntos de dados de toxicidade aguda por contato (a) e toxicidade aguda oral (b) ao longo do espaço químico de agrotóxicos comerciais. Os clusters de compostos com coeficiente de Tanimoto >0,8 estão destacados pelos círculos pretos e numerados de 1–3. Os compostos dos conjuntos de toxicidade aguda por contato e oral mais representativos de cada cluster (1–3) estão representados em (c) e (d), respectivamente.



Fonte: própria.

6.2. Modelos de classificação

Modelos de classificação foram gerados e validados usando os conjuntos de toxicidade aguda por contato e oral para distinguir compostos tóxicos de não tóxicos. Ao todo, 20 modelos foram gerados através da combinação de dois métodos de ML (RF e SVM) com três tipos de *fingerprints* moleculares: MACCS, FeatMorgan e Morgan (raio 2: FeatMorgan_2, Morgan_2; raio 4: FeatMorgan_4, Morgan_4). As performances estatísticas dos modelos preliminares gerados estão disponíveis no **Anexo 1a** (modelos de toxicidade aguda por contato) e **Anexo 1b** (modelos de toxicidade aguda oral).

Em seguida, os modelos de classificação gerados foram calibrados alterando os limites de probabilidade (valor padrão = 50%) usados para a rotulação das classes (ZAKHAROV *et al.*, 2014). A estimativa de probabilidade representa um importante parâmetro para avaliação de confiança de previsões toxicológicas. Usualmente, compostos com estimativas de probabilidade >50% são rotulados como tóxicos, enquanto compostos com probabilidade <50% são rotulados como não tóxicos. Entretanto, os

modelos de classificação desenvolvidos com conjuntos de dados desbalanceados geralmente fornecem estimativas de probabilidade pobres para a classe minoritária. Curiosamente, mesmo quando o desempenho geral é satisfatório, o modelo tem dificuldade em distinguir entre as classes e a confiança dessas predições é baixa (NICULESCU-MIZIL; CARUANA, 2005; WALLACE; DAHABREH, 2012). Conseqüentemente, o limiar de 50% pode não representar um “corte” adequado para rotulação de compostos como tóxicos e não tóxicos.

As performances estatísticas dos modelos de classificação calibrados estão disponíveis no **Anexo III** (modelos de toxicidade aguda por contato) e **Anexo IV** (modelos de toxicidade aguda oral). De forma geral, a abordagem de calibração resultou em melhorias significativas no desempenho estatístico dos modelos gerados para predição de toxicidade aguda por contato. Conforme destacado na Tabela 3, o modelo Morgan_2 + RF (limiar de probabilidade = 0,29) demonstrou a melhor performance interna (ACC = 0,87; SE = 0,79; SP = 0,91; e κ = 0,68) e externa (ACC = 0,92; SE = 0,83; SP = 0,96; e κ = 0,81) entre todos os modelos.

Tabela 3 -Performance estatística dos melhores modelos de classificação desenvolvidos para toxicidade aguda oral e por contato.

<i>Fingerprint</i>	Método	LP	Conjunto	ACC	SE	SP	PPV	NPV	κ	MCC	AUC	Cobertura
Modelos de toxicidade aguda por contato												
Morgan_2	RF	29%	Modelagem	0,87	0,79	0,91	0,78	0,91	0,68	0,68	0,85	0,68
			Externo	0,92	0,83	0,96	0,9	0,93	0,81	0,81	0,89	0,74
Morgan_4	RF	33%	Modelagem	0,85	0,79	0,88	0,73	0,91	0,65	0,65	0,83	0,64
			Externo	0,91	0,74	0,98	0,94	0,9	0,77	0,78	0,86	0,67
FeatMorgan_2	RF	32%	Modelagem	0,87	0,73	0,93	0,81	0,89	0,68	0,68	0,83	0,65
			Externo	0,90	0,78	0,94	0,86	0,91	0,75	0,75	0,86	0,70
Modelos de toxicidade aguda oral												
MACCS	RF	50%	Modelagem	0,81	0,70	0,90	0,83	0,80	0,61	0,62	0,80	0,75
			Externo	0,88	0,86	0,90	0,86	0,90	0,76	0,76	0,88	0,85
MACCS	SVM	50%	Modelagem	0,77	0,72	0,81	0,73	0,80	0,53	0,53	0,76	0,75
			Externo	0,91	0,93	0,90	0,87	0,95	0,82	0,82	0,91	0,85
Morgan_4	SVM	50%	Modelagem	0,84	0,74	0,91	0,86	0,83	0,66	0,66	0,82	0,66
			Externo	0,88	0,79	0,95	0,92	0,86	0,75	0,76	0,87	0,79

LP: limiar de probabilidade ótimo obtido durante a calibração dos modelos; RF: *Random Forest*; SVM: *Support Vector Machine*; LP: limiar de probabilidade; ACC: acurácia; SE: sensibilidade; SP: especificidade; PPV: valor preditivo positivo; NPV: valor preditivo negativo; κ : kappa de Cohen; MCC: coeficiente de correlação de Matthews; AUC: área sobre a curva ROC; Cobertura: taxa de compostos do conjunto teste ou externo dentro do domínio de aplicabilidade. Os melhores modelos estão destacados em negrito.

Por outro lado, o processo de calibração não resultou em melhorias aparentes nos desempenhos estatísticos interno e externo dos modelos de classificação para toxicidade aguda oral. Curiosamente, os limiares de probabilidade ajustados durante a calibração se mantiveram próximos a 50%, possivelmente em decorrência da proporção semelhante de compostos tóxicos e não tóxicos (1:1,4) no conjunto modelagem. Assim, o modelo original MACCS + SVM (ACC = 0,91; SE = 0,93; SP = 0,90; e κ = 0,82) sem calibração (Tabela 2) foi escolhido como melhor modelo para predição de toxicidade aguda oral.

6.3. Comparação com modelos previamente publicados

Nos últimos anos, diversos modelos de classificação foram desenvolvidos para prever a toxicidade aguda de produtos químicos em abelhas melíferas. Portanto, uma comparação do desempenho preditivo desses modelos com os modelos de classificação descritos nesse projeto é mostrada na Tabela 4.

Tabela 4 - Comparação das performances externas dos modelos de classificação desenvolvidos para toxicidade aguda em abelhas melíferas reportados na literatura.

Modelo	Tipo	Método	Descritor	ACC	SE	SP	MCC
Modelos desenvolvidos nesse projeto							
Toxicidade por contato	Classificação	RF	Morgan_2	0,92	0,83	0,96	0,81
Toxicidade oral	Classificação	SVM	MACCS	0,91	0,93	0,90	0,82
Modelos da literatura							
Venko <i>et al.</i> ⁷⁴	Classificação	CPANN	Dragon	0,77	0,75	0,79	0,48
Singh <i>et al.</i> ⁷⁵	Classificação	PNN	CDK	0,87	0,85	1,00	–
	Multiclasse	PNN	CDK	0,89	0,85	0,91	–
Li <i>et al.</i> ⁷⁶	Classificação	SVM	SubFP	0,90	0,83	0,93	0,76
Como <i>et al.</i> ⁷⁷	Classificação	k-NN	VEGA	0,84	0,80	0,86	0,67
Carnesecchi <i>et al.</i> ⁷⁸	Classificação	k-NN	Dragon	0,90	0,93	0,85	0,78
Wang <i>et al.</i> ⁷⁹	Classificação	GACNN	Grafos	0,83	0,69	0,89	0,59

RF: Random Forest; Morgan_2: Fingerprints Morgan com raio 2; SVM: Support Vector Machine; PNN: Probabilistic Neural Network; k-NN: k-Nearest Neighbor; CPANN: Counter-Propagation Artificial Neural Network; GACNN: Graph Attention Convolutional Neural Network; MACCS: Molecular ACCess System keys; CDK: Chemistry Development Kit; SubFP: Substructure fingerprint; ACC: acurácia; SE: sensibilidade; SP: especificidade; MCC: coeficiente de correlação de Matthews.


De forma geral, os modelos QSAR reportados nesse projeto apresentam desempenho superior quando comparados com os modelos de classificação

desenvolvidos por Como e colaboradores (2017), Venko e colaboradores (2018) e Wang e colaboradores (2020). Por outro lado, os modelos de classificação desenvolvidos por Li e colaboradores (2017), Singh e colaboradores (2014) e Carnesecchi e colaboradores (2020) apresentam performance estatística externa semelhante, embora os modelos reportados aqui tenham valores de ACC (>2–3%) e MCC (>3–5%) superiores. Embora esses modelos pareçam estar bem ajustados, uma análise crítica revela que boa parte deles não respeita as boas práticas para modelagem preditiva (FOURCHES, 2010; TROPSHA, 2010; OECD, 2020). As principais limitações desses modelos são: (i) falta de evidências sobre preparo dos dados e análise duplicatas (SINGH *et al.*, 2014; COMO *et al.*, 2017; VENKO *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2020); (ii) uso de *endpoint* (propriedade toxicológica experimental) não definidos ou confusos (WANG *et al.*, 2020); (iii) falta de estimativa do DA (COMO *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2020) e (iv) falta de interpretação mecanicista (COMO *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2017; CARNESECCH *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2020). Além disso, nenhum deles respeita o limiar de >11 µg/abelha definido pela US EPA para categorização dos compostos como tóxicos e não tóxicos. Tais limitações comprometem a aplicabilidade desses modelos em estudos regulatórios para avaliação do risco toxicológico e registro de novos agrotóxicos.


6.4. BeeToxAI

Após uma rigorosa validação, os modelos de classificação mais preditivos foram implementados no aplicativo BeeToxAI (<http://beetoxai.labmol.com.br/>). O BeeToxAI possui uma interface gráfica intuitiva (Figura 4), na qual o usuário pode desenhar a estrutura química de um composto sob investigação na caixa “**Draw molecule or load a file**” ou colar diretamente o código SMILES (do inglês, *Simplified Molecular Input Line Entry Specification*) da estrutura química no campo “**Enter SMILES**”. Depois de clicar no botão “**Submit analysis**”, o usuário receberá os resultados das predições (*e.g.*, tóxico e não tóxico) para toxicidade aguda por contato e toxicidade aguda oral. Essas previsões virão acompanhadas pelas estimativas de DA, valores de probabilidade, que são úteis para estimar a confiança das predições (GOLBRAIKH *et al.*, 2003), e interpretação mecanística das predições usando mapas de contribuição (RINIKER; LANDRUM, 2013; NEVES *et al.*, 2019). Nesse sentido, os fragmentos moleculares com contribuição positiva para a toxicidade estarão destacados em vermelho, enquanto as frações estruturais que diminuem a toxicidade estarão destacadas em verde.


Figura 4 - Interface gráfica do aplicativo BeeToxAI. Após submeter um agrotóxico para avaliação, o usuário receberá os valores de predição para toxicidade aguda por contato e oral, valores de probabilidade (confiança), estimativas de DA e mapas codificados por cores das contribuições de cada fragmento na estrutura química para a toxicidade.


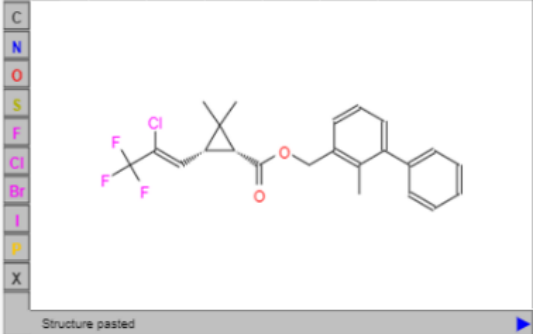
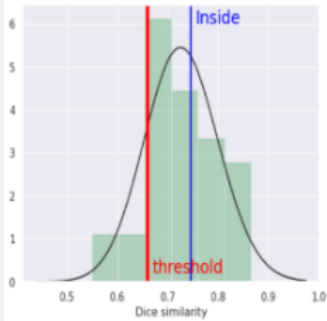
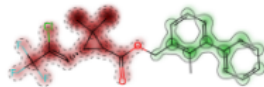
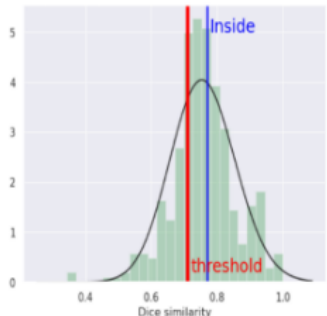
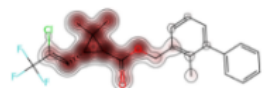


BeeTox



An artificial intelligence web app to assess acute toxicity of chemicals in honey bees



Enter SMILES	Endpoint	Prediction (confidence)	Applicability domain	Contribution map
<p><chem>CC1=C(COC(=O)[C@@H]2[C@H](\C=C(/Cl)C(F)(F)F)C2(C)C</chem></p> <p>Draw molecule or load a file</p>   <p>Structure pasted</p> <p style="text-align: center; background-color: red; color: white; padding: 5px; margin-top: 10px;">SUBMIT ANALYSIS</p>	<p><u>Acute oral Toxicity</u></p> <p>Assay type: Acute Oral Toxicity Test (OECD 213)</p> <p>Animal: Honey bee (<i>Apis mellifera</i>)</p> <p>ML Algorithm: SVM</p> <p>Descriptors: MACCS</p>	<p>Toxic (+)</p> <p>75.0%</p>		
	<p><u>Acute Contact Toxicity</u></p> <p>Assay type: Acute Contact Toxicity Test (OECD 214)</p> <p>Animal: Honey bee (<i>Apis mellifera</i>)</p> <p>ML Algorithm: Random Forest</p> <p>Descriptors: Morgan EFCP2 with bit-vector size of 2048 bits</p>	<p>Toxic (+)</p> <p>(100%)</p>		

6.4.1. Aplicação prática do BeeToxAI na avaliação toxicológica de novos agrotóxicos

O desempenho preditivo e aplicabilidade do BeeToxAI em processos de registro e reavaliação de agrotóxicos no Brasil e outros países do Mercosul foi avaliado utilizando uma lista de 83 agrotóxicos com dados de DL_{50} usados nos Estados Unidos de 1992 a 2014 foi compilada e preparada (DIBARTOLOMEIS *et al.*, 2019). Após uma análise rigorosa, constatou-se que 14 desses agrotóxicos não estavam incluídos nos conjuntos de dados originais usados para a construção dos modelos de classificação. Conseqüentemente, esses 14 agrotóxicos foram submetidos à avaliação preditiva de toxicidade aguda oral e por contato em abelhas. Em paralelo, uma pesquisa bibliográfica as bases de dados CompTox, PubMed e os mecanismos de busca Google foi realizada para encontrar informações adicionais sobre esses compostos (ALVES *et al.*, 2015).

Conforme destacado nas Figuras 6 e 7, o modelo de toxicidade aguda por contato implementado no BeeToxAI previu erroneamente o agrotóxico etion ($DL_{50} = 20,6 \mu\text{g/abelha}$) como tóxico (IWASA *et al.*, 2004). No entanto, uma busca adicional na literatura indica que esse composto apresenta $DL_{50} = 0,85 \mu\text{g/abelha}$,⁸⁶ o que corrobora com o resultado da predição. Da mesma forma, o modelo de contato agudo previu erroneamente o agrotóxico acetamiprida como não tóxico, mas o estudo de Zhu e colaboradores (2015) corrobora com a predição ($DL_{50} = 276 \mu\text{g/abelha}$). Os mesmos autores indicaram que a acetamiprida é relativamente seguro para abelhas forrageadoras porque pode matar menos 1% desses animais em estudos de campo. Por fim, o agrotóxicos fosfamidona e fenopropatrina não tinham dados de toxicidade oral aguda reportados no conjunto de dados compilado. Todavia, após uma busca mais sofisticada, constatou-se que seus valores de DL_{50} são $0,17 \mu\text{g/abelha}$ and $0,54 \mu\text{g/mL}$, respectivamente, confirmando as predições do BeeToxAI por essa via de administração (RASULI *et al.*, 2015).

Com base nesses resultados, pode-se afirmar que o modelo de toxicidade aguda por contato do BeeToxAI previu corretamente 12 dos 14 agrotóxicos e o modelo de toxicidade aguda oral previu corretamente 7 dos 9 agrotóxicos (cinco compostos da lista não tinham dados experimentais sobre toxicidade aguda oral). Esses resultados corroboram com o alto poder preditivo externo reportado nas seções anteriores e demonstram que o BeeToxAI tem poder de extrapolação das predições para compostos fora do DA.

Figura 5 - Resultados de predição de 14 agrotóxicos comerciais usando o aplicativo BeeToxAI. NR = não reportado. Os fragmentos moleculares com contribuição positiva e negativa para a toxicidade estão coloridos em vermelho e verde, respectivamente.

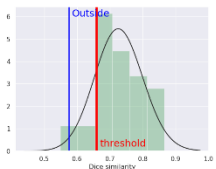
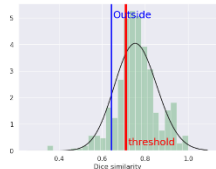
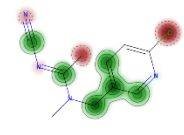
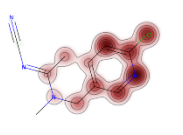


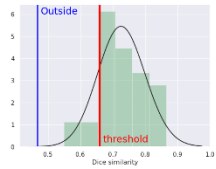
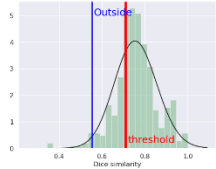
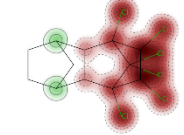
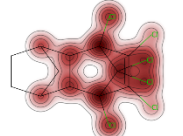


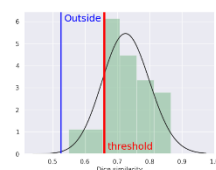
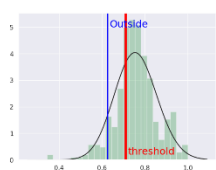
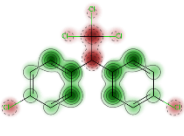
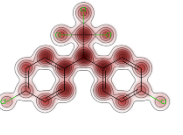


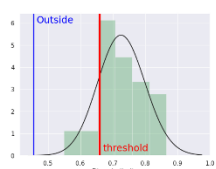
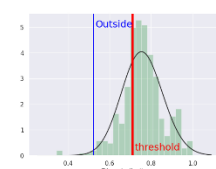
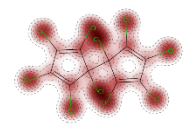
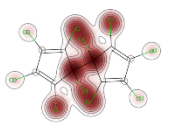


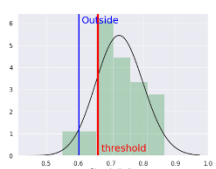
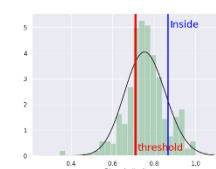
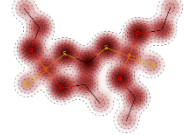
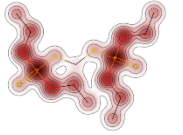



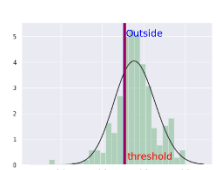
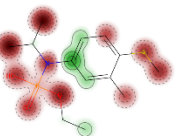
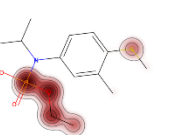


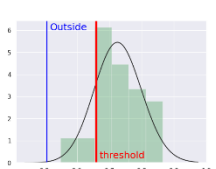
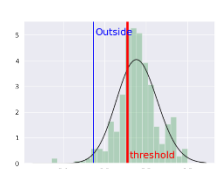
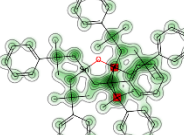
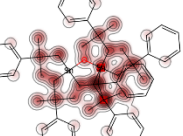


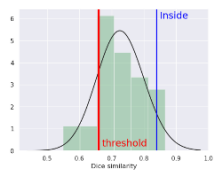
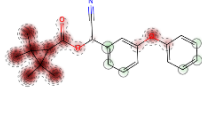
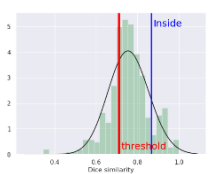
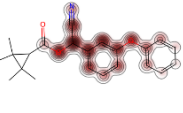
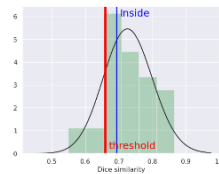
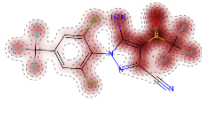
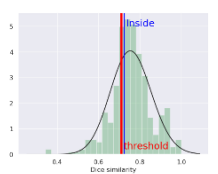
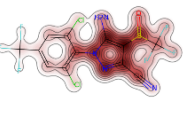
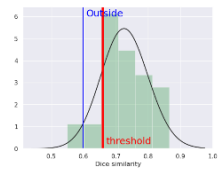
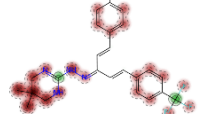
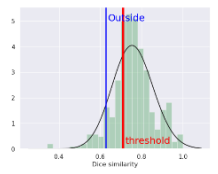
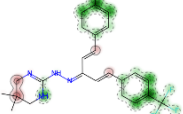
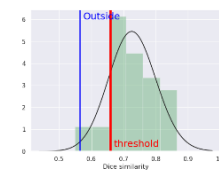
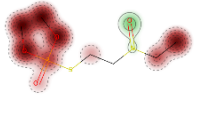
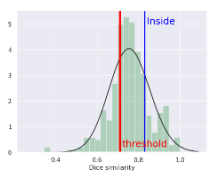
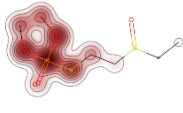
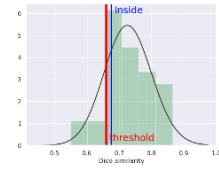
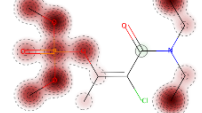
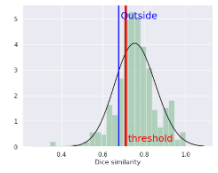
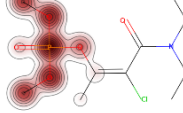
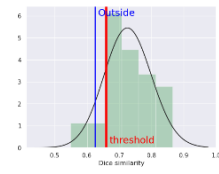
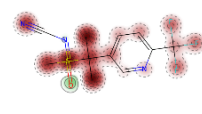
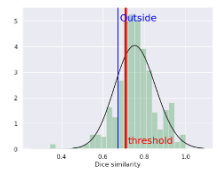
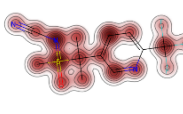
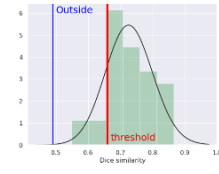
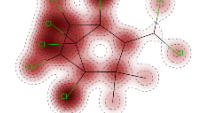
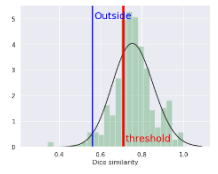
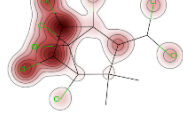
Experimental	Toxicidade aguda oral (predita)	Toxicidade aguda por contato (predita)
Acetamiprida CAS: 135410-20-7 Oral DL ₅₀ = 14.8 µg/abelha (Não tóxico) Contato DL ₅₀ = 8.1 µg/abelha (Tóxico)	 DA: Fora	 DA: Fora
		
	 Não tóxico (63%)	 Não tóxico (80%)
Aldrin CAS: 309-00-2 Oral DL ₅₀ = 0,35 µg/abelha (Tóxico) Contato DL ₅₀ = 0,35 µg/abelha (Tóxico)	 DA: Fora	 DA: Fora
		
	 Tóxico (73%)	 Não tóxico (60%)
DDT CAS: 50-29-3 Oral DL ₅₀ = 5,3 µg/abelha (Tóxico) Contato DL ₅₀ = 5,5 µg/abelha (Tóxico)	 DA: Fora	 DA: Fora
		
	 Tóxico (52%)	 Tóxico (60%)
Dienoclor CAS: 2227-17-0 Oral DL ₅₀ = NR Contato DL ₅₀ = 36 µg/abelha (Não tóxico)	 DA: Fora	 DA: Fora
		
	 Tóxico (83%)	 Não tóxico (80%)
Etion CAS: 563-12-2 Oral DL ₅₀ = NR Contato DL ₅₀ = 20,6 µg/abelha (Não tóxico)	 DA: Fora	 DA: Dentro
		
	 Tóxico (84%)	 Tóxico (100%)
Fenamifós CAS: 22224-92-6 Oral DL ₅₀ = 0,45 µg/abelha (Tóxico) Contato DL ₅₀ = 1,08 µg/abelha (Tóxico)	 DA: Dentro	 DA: Fora
		
	 Tóxico (51%)	 Tóxico (60%)
Óxido de febutatina CAS: 13356-08-6 Oral DL ₅₀ = 200 µg/abelha (Não tóxico) Contato DL ₅₀ = 3982 µg/abelha (Não tóxico)	 DA: Fora	 DA: Fora
		
	 Não tóxico (68%)	 Não tóxico (90%)

Figura 6 - Continuação. NR = não reportado. Os fragmentos moleculares com contribuição positiva e negativa para a toxicidade estão coloridos em vermelho e verde, respectivamente.

Experimental	Toxicidade aguda oral (predita)	Toxicidade aguda por contato (predita)		
Fenpropatrina CAS: 39515-41-8 Oral DL ₅₀ = NR Contato DL ₅₀ = 0.05 µg/abelha (Tóxico)	 DA: Dentro	 Tóxico (75%)	 DA: Dentro	 Tóxico (80%)
Fipronil CAS: 120068-37-3 Oral DL ₅₀ = 0,003 µg/abelha (Tóxico) Contato DL ₅₀ = 0,009 µg/abelha (Tóxico)	 DA: Dentro	 Tóxico (83%)	 DA: Dentro	 Tóxico (70%)
Hidrametilona CAS: 67485-29-4 Oral DL ₅₀ = NR Contato DL ₅₀ = 67 µg/abelha (Não tóxico)	 DA: Fora	 Não tóxico (53%)	 DA: Fora	 Não tóxico (90%)
Oxidemetona-metil CAS: 206-110-7 Oral DL ₅₀ = 0,25 µg/abelha (Tóxico) Contato DL ₅₀ = 0,9 µg/abelha (Tóxico)	 DA: Fora	 Tóxico (69%)	 DA: Dentro	 Tóxico (90%)
Fosfamidona CAS: 13171-21-6 Oral DL ₅₀ = NR Contato DL ₅₀ = 1.46 µg/abelha (Tóxico)	 DA: Dentro	 Tóxico (87%)	 DA: Fora	 Tóxico (50%)
Sulfoxaflor CAS: 946578-00-3 Oral DL ₅₀ = 0.16 µg/abelha (Tóxico) Contato DL ₅₀ = 0.23 µg/abelha (Tóxico)	 DA: Fora	 Não tóxico (52%)	 DA: Fora	 Não tóxico (90%)
Toxafeno CAS: 8001-35-2 Oral DL ₅₀ = 20 µg/bee (Não tóxico) Contato DL ₅₀ = 50 µg/bee (Não tóxico)	 DA: Fora	 Tóxico (86%)	 DA: Fora	 Não tóxico (70%)

Além de apresentar alto poder de predição, o BeeToxAI também foi planejado para ser o primeiro aplicativo no campo da Ecotoxicologia que gera predições mecanisticamente interpretáveis. Em outras palavras, o BeeToxAI também é capaz de gerar mapas de contribuição codificados por cores para identificação de subunidades estruturas com contribuição positiva e negativa para toxicidade. Metodologicamente, esses mapas estimam o peso de fragmentos individuais ou átomos para a toxicidade, removendo-os da estrutura e calculando a diferença de probabilidade entre a estrutura química inicial e a estrutura com fragmento removido (RINIKER; LANDRUM, 2013).

Conforme destacado nas Figuras 5 e 6, diversos fragmentos moleculares apresentaram contribuição positiva para toxicidade aguda oral e por contato, tais como grupos policlorados (*e.g.*, aldrin, Figura 4), fosfinatos (*e.g.*, fenamifós, Figura 4), fosfonatos (*e.g.*, oxidemetona-metil e fosfamidona, Figura 5) e grupos trifluorometilas ou trifluorometanossulfinilas (*e.g.*, fipronil, Figura 5). Essas informações podem ser utilizadas para construção de alertas estruturais; (ii) investigação do modo de ação dos agrotóxicos; e (iii) otimização estrutural de novos protótipos de agrotóxicos menos tóxicos (POLISHCHUK, 2017; SHERIDAN, 2019).

7. CONCLUSÕES

A presente proposta reporta o desenvolvimento e validação de modelos de classificação baseados em ML altamente preditivos e em conformidade com as recomendações da OECD. Esses modelos foram implementados em um aplicativo (BeeToxAI) com interface gráfica intuitiva. O BeeToxAI é capaz de prever a toxicidade aguda oral e por contato de novos agrotóxicos para abelhas e fase de registro e reavaliação no IBAMA e demais agências governamentais do Mercosul. O aplicativo não requer conhecimento prévio de programação ou habilidades computacionais para sua utilização. Além disso, os resultados de predição são gerados em poucos segundos. O aplicativo está disponível para acesso público em <http://beetoxai.labmol.com.br/>. Em resumo, o BeeToxAI representa a experiência do jovem pesquisador proponente desse projeto no campo da Toxicologia e Inteligência Artificial. Esta valiosa contribuição pode ser utilizada como método alternativo ao uso de animais para otimização dos fluxos de registro e reavaliação de agrotóxicos, de modo a estimar de forma rápida e confiável o risco inaceitável desses produtos para as abelhas.

8. REFERÊNCIAS

- Abadi, M.; Barham, P.; Chen, J.; Chen, Z.; Davis, A.; Dean, J.; Devin, M.; Ghemawat, S.; Irving, G.; Isard, M.; Kudlur, M.; Levenberg, J.; Monga, R.; Moore, S.; Murray, D. G.; Steiner, B.; Tucker, P.; Vasudevan, V.; Warden, P.; Wicke, M.; Yu, Y.; Zheng, X.; Brain, G. In 12th USENIX Symposium on Operating Systems Design and Implementation (OSDI '16); 2016; pp. 265–284.
- Ali, A. D.; Bakry, N. M.; Abdellatif, M. A.; El-Sawaf, S. K. *Zeitschrift für Angew. Entomol.* 1973, 74, 170.
- Alves, V. M.; Muratov, E. N.; Capuzzi, S. J.; Politi, R.; Low, Y.; Braga, R. C.; Zakharov, A. V.; Sedykh, A.; Mokshyna, E.; Farag, S.; Andrade, C. H.; Kuz'min, V. E.; Fourches, D.; Tropsha, A. *Green Chem.* 2016, 18, 4348.
- Alves, V. M.; Muratov, E. N.; Zakharov, A.; Muratov, N. N.; Andrade, C. H.; Tropsha, A. *Food Chem. Toxicol.* 2018, 112, 526.
- Alves, V. M.; Muratov, E.; Fourches, D.; Strickland, J.; Kleinstreuer, N.; Andrade, C. H.; Tropsha, A. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2015, 284, 273.
- Banks, J. E.; Banks, H. T.; Myers, N.; Laubmeier, A. N.; Bommarco, R. *Ecotoxicology* 2020, 29, 237.
- BBC O agrotóxico que matou 50 milhões de abelhas em Santa Catarina em um só mês <https://www.bbc.com/portuguese/brasil-49657447> (accessed Nov 5, 2019).
- Benefits Of Kubernetes For Microservices Architecture.
- Bienfait, B.; Ertl, P. J. *Cheminform.* 2013, 5, 24.
- Blacquièrre, T.; Smagghe, G.; van Gestel, C. A. M.; Mommaerts, V. *Ecotoxicology* 2012, 21, 973.

Breiman, L. *Mach. Learn.* 2001, 45, 5.

Butler, D. *Nature* 2018, 555, 150.

Cameron, S. A.; Lozier, J. D.; Strange, J. P.; Koch, J. B.; Cordes, N.; Solter, L. F.; Griswold, T. L. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2011, 108, 662.

Carnesecchi, E.; Toma, C.; Roncaglioni, A.; Kramer, N.; Benfenati, E.; Dorne, J. L. C. *M. Sci. Total Environ.* 2020, 735, 139243.

Cherkasov, A.; Muratov, E. N.; Fourches, D.; Varnek, A.; Baskin, I. I.; Cronin, M.; Dearden, J.; Gramatica, P.; Martin, Y. C.; Todeschini, R.; Consonni, V.; Kuz'min, V. E.; Cramer, R.; Benigni, R.; Yang, C.; Rathman, J.; Terfloth, L.; Gasteiger, J.; Richard, A.; Tropsha, A. *J. Med. Chem.* 2014, 57, 4977.

Como, F.; Carnesecchi, E.; Volani, S.; Dorne, J. L.; Richardson, J.; Bassan, A.; Pavan, M.; Benfenati, E. *Chemosphere* 2017, 166, 438.

DiBartolomeis, M.; Kegley, S.; Mineau, P.; Radford, R.; Klein, K. *PLoS One* 2019, 14, 1.

Dorne, J. Lou; Richardson, J.; Kass, G.; Georgiadis, N.; Monguidi, M.; Pasinato, L.; Cappe, S.; Verhagen, H.; Robinson, T. *EFSA J.* 2017, 15, e15011.

Embrapa. *Pesquisadores avaliam mortalidade de abelhas no Brasil. Estudos socioeconômicos e ambientais Produção animal.* Brasília. Set. 2016.

Fairbrother, A.; Purdy, J.; Anderson, T.; Fell, R. *Environ. Toxicol. Chem.* 2014, 33, 719.

Fourches, D. In *Application of Computational Techniques in Pharmacy and Medicine*; Gorb, L.; Kuz'min, V. E.; Muratov, E. N., Eds.; Springer Netherlands, 2014; pp. 539–546.

Fourches, D.; Muratov, E.; Tropsha, A. *J. Chem. Inf. Model.* 2010, 50, 1189.

Fourches, D.; Muratov, E.; Tropsha, A. *J. Chem. Inf. Model.* 2016, 56, 1243.

Fourches, D.; Muratov, E.; Tropsha, A. *Nat. Chem. Biol.* 2015, 11, 535.

Frische, T.; Egerer, S.; Matezki, S.; Pickl, C.; Wogram, J. *Environ. Sci. Eur.* 2018, 30, 8.

Git <https://git-scm.com/> (accessed Aug 2, 2020).

GitLab <https://about.gitlab.com/> (accessed Jul 2, 2020).

Goh, G. B.; Hodas, N. O.; Vishnu, A. *J. Comput. Chem.* 2017, 38, 1291.

Golbraikh, A.; Shen, M.; Xiao, Z.; Xiao, Y.-D.; Lee, K.-H.; Tropsha, A. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 2003, 17, 241.

Hunter, J. D. *Comput. Sci. Eng.* 2007, 9, 90.

Iwasa, T.; Motoyama, N.; Ambrose, J. T.; Roe, R. M. *Crop Prot.* 2004, 23, 371.

Jiang, D.; Lei, T.; Wang, Z.; Shen, C.; Cao, D.; Hou, T. *J. Cheminform.* 2020, 12, 16.

Jing, Y.; Bian, Y.; Hu, Z.; Wang, L.; Xie, X.-Q. *S. AAPS J.* 2018, 20, 58.

Kubinyi, H. *QSAR: Hansch Analysis and Related Approaches*; Kubinyi, H., Ed.; Methods and Principles in Medicinal Chemistry; Wiley-VCH Verlag GmbH: Weinheim, Germany, 1993.

Landrum, G. *RDKit: Open-Source Cheminformatics Software* 2017.

Lavecchia, A. *Drug Discov. Today* 2015, 20, 318.

LeCun, Y.; Bengio, Y.; Hinton, G. *Nature* 2015, 521, 436.

Li, X.; Zhang, Y.; Chen, H.; Li, H.; Zhao, Y. *J. Chem. Inf. Model.* 2017, 57, 2948.

Michael Waskom; Olga Botvinnik; Drew O’Kane; Paul Hobson; Saulius Lukauskas;
David C Gemperline; Tom Augspurger; Yaroslav Halchenko; John B. Cole; Jordi
Warmenhoven; Julian de Rooter; Cameron Pye; Stephan Hoyer; Jake Vanderplas;
Santi Villalba; Gero Kunt mwaskom/seaborn: v0.8.1.

Mitchell, J. B. O. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* 2014, 4, 468.

Myatt, G. J.; Ahlberg, E.; Akahori, Y.; Allen, D.; Amberg, A.; Anger, L. T.; Aptula, A.;
Auerbach, S.; Beilke, L.; Bellion, P.; Benigni, R.; Bercu, J.; Booth, E. D.; Bower,
D.; Brigo, A.; Burden, N.; Cammerer, Z.; Cronin, M. T. D.; Cross, K. P.; Custer,
L.; Dettwiler, M.; Dobo, K.; Ford, K. A.; Fortin, M. C.; Gad-McDonald, S. E.;
Gellatly, N.; Gervais, V.; Glover, K. P.; Glowienke, S.; Van Gompel, J.; Gutsell,
S.; Hardy, B.; Harvey, J. S.; Hillegass, J.; Honma, M.; Hsieh, J.-H.; Hsu, C.-W.;
Hughes, K.; Johnson, C.; Jolly, R.; Jones, D.; Kemper, R.; Kenyon, M. O.; Kim,
M. T.; Kruhlak, N. L.; Kulkarni, S. A.; Kümmerer, K.; Leavitt, P.; Majer, B.;
Masten, S.; Miller, S.; Moser, J.; Mumtaz, M.; Muster, W.; Neilson, L.; Oprea, T.
I.; Patlewicz, G.; Paulino, A.; Lo Piparo, E.; Powley, M.; Quigley, D. P.; Reddy,
M. V.; Richarz, A.-N.; Ruiz, P.; Schilter, B.; Serafimova, R.; Simpson, W.;
Stavitskaya, L.; Stidl, R.; Suarez-Rodriguez, D.; Szabo, D. T.; Teasdale, A.;
Trejo-Martin, A.; Valentin, J.-P.; Vuorinen, A.; Wall, B. A.; Watts, P.; White, A.
T.; Wichard, J.; Witt, K. L.; Woolley, A.; Woolley, D.; Zwickl, C.; Hasselgren, C.
Regul. Toxicol. Pharmacol. 2018, 96, 1.

National Center for Biotechnology Information PubMed

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/> (accessed Sep 10, 2020).

Neves, B. J.; Braga, R. C.; Alves, V. M.; Lima, M. N. do N.; Cassiano, G. C.; Muratov,
E. N.; Costa, F. T. M.; Andrade, C. H. *PLoS Comput. Biol.* 2019, in press.

- Neves, B. J.; Braga, R. C.; Alves, V. M.; Lima, M. N. N.; Cassiano, G. C.; Muratov, E. N.; Costa, F. T. M.; Andrade, C. H. PLOS Comput. Biol. 2020, 16, e1007025.
- Niculescu-Mizil, A.; Caruana, R. In Proceedings of the 22nd international conference on Machine learning - ICML '05; ACM Press: New York, New York, USA, 2005; pp. 625–632.
- OECD. Principles for the validation, for regulatory purposes, of (quantitative) structure-activity relationship models <https://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/37849783.pdf> (accessed Apr 27, 2020).
- Oerke, E. C. J. Agric. Sci. 2006, 144, 31.
- Ollerton, J. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. 2017, 48, 353.
- Organization for Economic Cooperation and Development 1998.
- Organization for Economic Cooperation and Development Test No. 214: Honeybees, Acute Contact Toxicity Test <http://dx.doi.org/10.1787/9789264070189-en> (accessed May 14, 2020).
- Osborne, J. L. Nature 2012, 491, 43.
- Pallets Flask Web Development, One Drop at Time <https://flask.palletsprojects.com/en/1.1.x/> (accessed May 17, 2020).
- Pedregosa, F.; Varoquaux, G.; Gramfort, A.; Michel, V.; Thirion, B.; Grisel, O.; Blondel, M.; Prettenhofer, P.; Weiss, R.; Dubourg, V.; Vanderplas, J.; Passos, A.; Cournapeau, D.; Brucher, M.; Perrot, M.; Duchesnay, É. J. Mach. Learn. Res. 2012, 12, 2825.
- Pires, C. S. S., Pereira, F. D. M., Lopes, M. T. D. R., Nocelli, R. C. F., Malaspina, O., Pettis, J. S., & Teixeira, É. W. (2016). Enfraquecimento e perda de colônias de

abelhas no Brasil: há casos de CCD? Pesquisa Agropecuária Brasileira, 51, 422-442.

Pluralsight JavaScript <https://www.javascript.com/> (accessed May 17, 2020).

Polishchuk, P. J. Chem. Inf. Model. 2017, 57, 2618.

Python Software Foundation Python Language Reference <http://www.python.org> (accessed Apr 13, 2020).

Rasuli, F.; Rafie, J. N.; Sadeghi, A. J. Apic. Sci. 2015, 59, 17.

Rhodes, C. J. Sci. Prog. 2018, 101, 121.

Riniker, S.; Landrum, G. a. J. Cheminform. 2013, 5, 1.

Riniker, S.; Landrum, G. A. J. Cheminform. 2013, 5, 26.

Russell, W.; Burch, R. The Principles of Humane Experimental Technique; 1st ed.; Methuen & Co Ltd: London, 1959.

Sander, T.; Freyss, J.; von Korff, M.; Rufener, C. J. Chem. Inf. Model. 2015, 55, 460.

Schmidhuber, J. Neural Networks 2015, 61, 85.

Scikit-Optimize: Sequential model-based optimization in Python <https://scikit-optimize.github.io/> (accessed Apr 13, 2020).

Sheridan, R. P. J. Chem. Inf. Model. 2019, 59, 1324.

Singh, K. P.; Gupta, S.; Basant, N.; Mohan, D. Chem. Res. Toxicol. 2014, 27, 1504.

- Sørensen, T. J. A method of establishing groups of equal amplitude in plant sociology based on similarity of species content and its application to analyses of the vegetation on Danish commons.; 5th ed.; I kommission hos E. Munksgaard, 1948.
- Sponsler, D. B.; Grozinger, C. M.; Hitaj, C.; Rundlöf, M.; Botías, C.; Code, A.; Lonsdorf, E. V.; Melathopoulos, A. P.; Smith, D. J.; Suryanarayanan, S.; Thogmartin, W. E.; Williams, N. M.; Zhang, M.; Douglas, M. R. *Sci. Total Environ.* 2019, 662, 1012.
- Stumpfe, D.; Bajorath, J. *J. Med. Chem.* 2012, 55, 2932.
- Stumpfe, D.; Hu, Y.; Dimova, D.; Bajorath, J. *J. Med. Chem.* 2014, 57, 18.
- Sushko, I.; Novotarskyi, S.; Körner, R.; Pandey, A. K.; Rupp, M.; Teetz, W.; Brandmaier, S.; Abdelaziz, A.; Prokopenko, V. V.; Tanchuk, V. Y.; Todeschini, R.; Varnek, A.; Marcou, G.; Ertl, P.; Potemkin, V.; Grishina, M.; Gasteiger, J.; Schwab, C.; Baskin, I. I.; Palyulin, V. A.; Radchenko, E. V.; Welsh, W. J.; Kholodovych, V.; Chekmarev, D.; Cherkasov, A.; Aires-de-Sousa, J.; Zhang, Q.-Y.; Bender, A.; Nigsch, F.; Patiny, L.; Williams, A.; Tkachenko, V.; Tetko, I. V. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 2011, 25, 533.
- Tetko, I. V.; Engkvist, O.; Chen, H. *Future Med. Chem.* 2016, 8, 1801.
- Thorbek, P.; Campbell, P. J.; Thompson, H. M. *Environ. Toxicol. Chem.* 2017, 36, 831.
- Todeschini, R.; Consonni, V. *Handbook of molecular descriptors*; Todeschini, R.; Consonni, V., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH: Weinheim, Germany, 2008.
- Tropsha, A. *Mol. Inform.* 2010, 29, 476.
- U.S. Environmental Protection Agency (EPA) CompTox Chemicals Dashboard
<https://comptox.epa.gov/dashboard> (accessed Sep 10, 2020).

U.S. Environmental Protection Agency (EPA) Cost Estimates of Studies Required for Pesticide Registration.

U.S. Environmental Protection Agency (EPA) Honeybee Toxicity Testing Frequently Asked Questions – August 16, 2018.

Unbit The uWSGI project <https://uwsgi-docs.readthedocs.org> (accessed Apr 13, 2020).

United States Environmental Protection Agency Pesticide Product Information System Database <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products> (accessed Apr 13, 2020).

United States Environmental Protection Agency Ecotoxicology Database (ECOTOX) <https://cfpub.epa.gov/ecotox/> (accessed Apr 13, 2020).

United States Environmental Protection Agency Guidance for Assessing Pesticides Risks to Bees <https://www.epa.gov/pollinator-protection/pollinator-risk-assessment-guidance> (accessed Apr 13, 2020).

University of Hertfordshire The Pesticide Properties Data Base (PPDB).

Vapnik, V. V. *The Nature of Statistical Learning Theory*; 2nd ed.; Springer: New York, 2000.

Venko, K.; Drgan, V.; Novič, M. *SAR QSAR Environ. Res.* 2018, 29, 743.

Wallace, B. C.; Dahabreh, I. J. In *IEEE 12th International Conference on Data Mining*; IEEE, 2012; pp. 695–704.

Wang, F.; Yang, J.-F.; Wang, M.-Y.; Jia, C.-Y.; Shi, X.-X.; Hao, G.-F.; Yang, G.-F. *Sci. Bull.* 2020, 65, 1184.

Wassermann, A. M.; Wawer, M.; Bajorath, J. *J. Med. Chem.* 2010, 53, 8209.

Welling, M. *A First Encounter with Machine Learning*; 1st ed.; University of California: Irvine, CA, 2011.

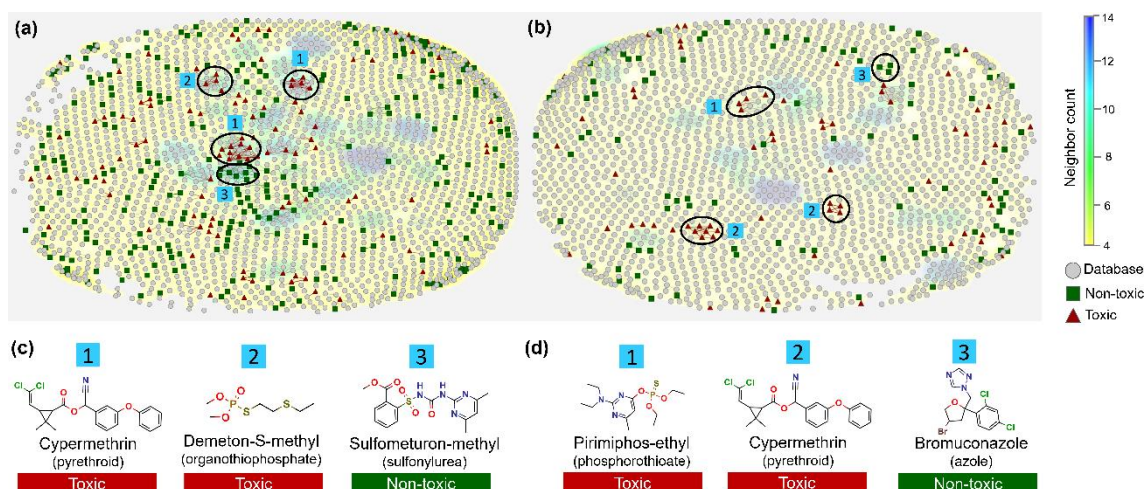
Wu, J.; Chen, X. Y.; Zhang, H.; Xiong, L. D.; Lei, H.; Deng, S. H. *J. Electron. Sci. Technol.* 2019, 17, 26.

Zakharov, A. V.; Peach, M. L.; Sitzmann, M.; Nicklaus, M. C. *J. Chem. Inf. Model.* 2014, 54, 705.

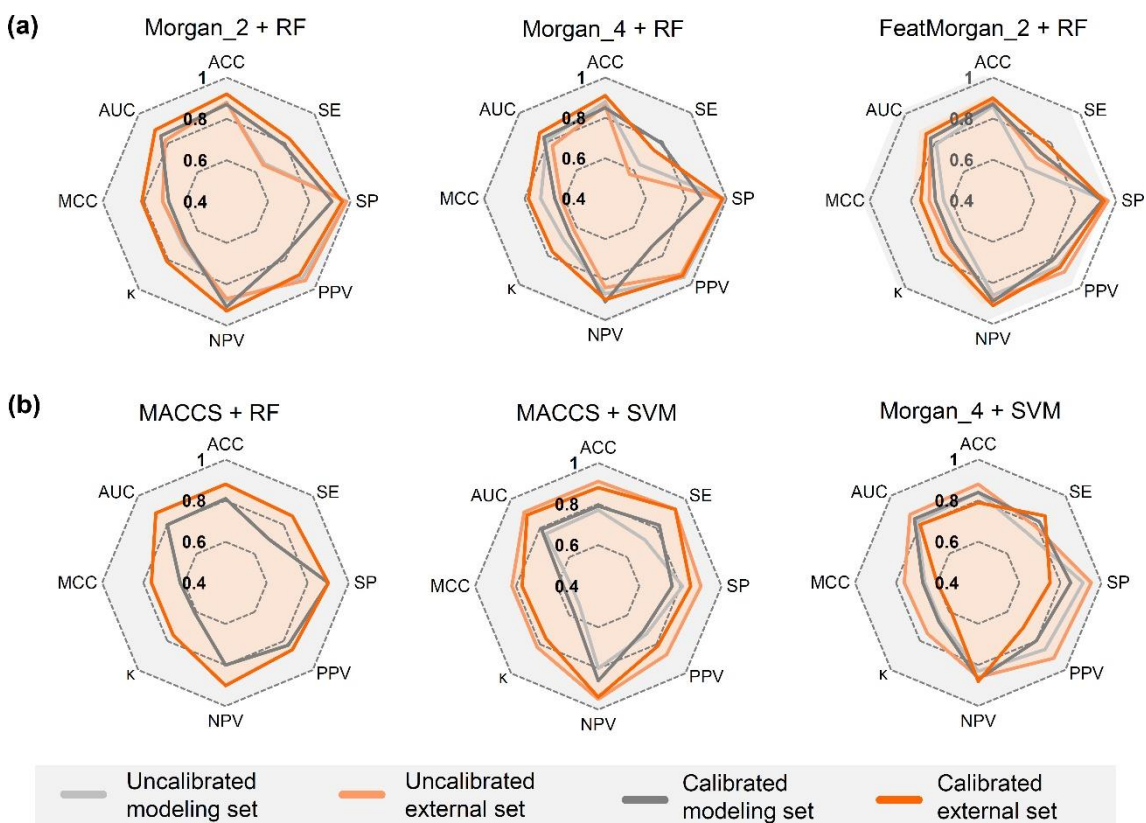
Zhu, Y. C.; Adamczyk, J.; Rinderer, T.; Yao, J.; Danka, R.; Luttrell, R.; Gore, J. J. *Econ. Entomol.* 2015, 108, 2640.

ANEXOS

Anexo 1 - As performances estatísticas dos modelos preliminares para (a) toxicidade de contato aguda e (b) toxicidade oral aguda



Anexo 2 - Comparação dos melhores modelos QSAR desenvolvidos para (a) toxicidade de contato aguda e (b) toxicidade oral aguda em várias métricas usando calibração de movimento de limiar.



ACC: precisão; SE: sensibilidade; SP: especificidade; VPP: valor preditivo positivo; e NPV: valor preditivo negativo; κ : kappa de Cohen; MCC: coeficiente de correlação de Matthew; AUC: área sob a curva ROC.