



INGRID VITTORIA PEREIRA FARIA

**ESTUDOS DE MODELAGEM MOLECULAR E SIMULAÇÃO
COMPUTACIONAL DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS
DE 1,3,4-OXADIAZÓIS CONTRA XANTHOMONAS SP.
PATÓGENAS EM CITRUS E ARROZ**

**LAVRAS - MG
2026**

INGRID VITTORIA PEREIRA FARIA

**ESTUDOS DE MODELAGEM MOLECULAR E SIMULAÇÃO
COMPUTACIONAL DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS
DE 1,3,4-OXADIAZÓIS CONTRA XANTHOMONAS SP.
PATÓGENAS EM CITRUS E ARROZ**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração Química /Bioquímica, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. Matheus Puggina de Freitas

Orientador

Profa. Dra. Elaine Fontes Ferreira da Cunha

Coorientadora

**LAVRAS - MG
2026**

**Ficha Catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração
de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com
dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Pereira Faria, Ingrid Vittoria .

ESTUDOS DE MODELAGEM MOLECULAR E SIMULAÇÃO
COMPUTACIONAL DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS DE 1,3,4
OXADIAZÓIS CONTRA XANTHOMONAS SP. PATÓGENAS EM CITRUS E
ARROZ / Ingrid Vittoria Pereira Faria. - 2026.

126 p.

Orientador: Matheus Puggina de Freitas

Coorientadora: Elaine Fontes Ferreira da Cunha

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2026.

Bibliografia.

1. MIA-QSAR. . 2. Antibacterianos. 3. Xanthomonas. 4. Ancoramento
molecular. 5. Dinâmica molecular. I. Freitas, Matheus Puggina de. II. Cunha, Elaine
Fontes Ferreira da. III. Universidade Federal de Lavras. IV. Título.

INGRID VITTORIA PEREIRA FARIA

**ESTUDOS DE MODELAGEM MOLECULAR E SIMULAÇÃO
COMPUTACIONAL DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS
DE 1,3,4-OXADIAZÓIS CONTRA XANTHOMONAS SP.
PATÓGENAS EM CITRUS E ARROZ**

**MOLECULAR MODELING AND COMPUTATIONAL SIMULATION STUDIES OF
THE ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF 1,3,4-OXADIAZOLES AGAINST
PATHOGENIC XANTHOMONAS SP. IN CITRUS AND RICE.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração Química/Bioquímica, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA EM 04 de março de 2026.

Dra. Joyce Karoline Daré - Grupo Unis

Dra. Luciana Lopes Silva Pereira – UFLA

Dr Cleiton Antônio Nunes - UFLA

Dr. João Eustaquio Antunes – UFJF

Prof. Dr. Matheus Puggina de Freitas

Orientador

Profa. Dra. Elaine Fontes Ferreira da Cunha

Coorientadora

**LAVRAS - MG
2026**

À minha família pelo amor incondicional e sacrifícios feitos para que eu chegasse até aqui.

Ao meu esposo Ricardo por todo cuidado, ajuda, compreensão e incentivo nos momentos
mais difíceis desta jornada.

À minha doce irmã que me ensina a ter força para não desistir nos obstáculos da vida.

A Deus e à Nossa Senhora por serem meu sustento, fonte de paz e equilíbrio.

Dedico

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a Deus, por me permitir a existência, por direcionar minha vida e por permitir que mais essa etapa na minha vida fosse cumprida, tendo a certeza que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos.

Ao professor Matheus Puggina de Freitas, pela paciência, atenção, confiança e orientação, por ter me aberto as portas à pesquisa, mesmo diante de minhas dificuldades, para que pudéssemos concretizar este trabalho, meus sinceros agradecimentos.

A professora Elaine Fontes Ferreira da Cunha pela contribuição nos estudos de ancoramento molecular.

À banca examinadora pela disponibilidade e contribuições para este trabalho.

Ao Grupo de Pesquisa do Laboratório de Química Computacional da UFLA – MOLECC – UFLA, que me acompanhou durante o período de estudo e por toda amizade construída, sempre estarão na minha memória e coração, em especial ao Antônio, por toda ajuda durante essa caminhada.

Aos meus pais, Mário e Marcelena pelo carinho, incentivo e apoio em toda minha existência me ensinando a importância da educação, dedicação e trabalho.

A minha irmã, Yasmim por todo amor e torcida em importantes momentos da minha vida acadêmica.

Ao meu marido Ricardo que apoiou a finalizar esta grande etapa da minha vida.

A todos os professores e funcionários da UFLA.

À CAPES, FAPEMIG e CNPq, pelo apoio financeiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução dessa Tese de Doutorado.

MEU MUITO OBRIGADA!!!

“Todos nascemos originais, mas muitos de nós morremos como fotocópias.”

(São Carlo Acutis)

RESUMO

Xanthomonas é um gênero de bactérias Gram-negativas responsável por importantes doenças em plantas, afetando diversas culturas agrícolas. Esses fitopatógenos causam, entre outros sintomas, manchas foliares e comprometimento do desenvolvimento vegetal. A técnica de QSAR (Relação Quantitativa Estrutura–Atividade) consiste em uma abordagem de química computacional voltada à compreensão e à predição de propriedades biológicas de moléculas com base em suas características estruturais. No presente trabalho, empregou-se a metodologia MIA-QSAR para investigar a relação entre a estrutura de compostos químicos e sua atividade antibacteriana contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), *X. oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) e *X. oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*). Os modelos desenvolvidos foram utilizados para o planejamento de novos agentes antimicrobianos voltados ao controle das infecções causadas por essas bactérias. Para o conjunto de moléculas com atividade anti-*Xac*, foram construídos modelos estatísticos pelo método de mínimos quadrados parciais (PLS), validados interna e externamente. Também foram realizados estudos de ancoragem molecular com o objetivo de elucidar possíveis mecanismos de patogenicidade da *Xac*, etapa fundamental para o controle efetivo do cancro cítrico. O modelo anti-*Xac* apresentou métricas robustas ($r^2 = 0,88$; $q^2 = 0,82$; $r^2_{\text{pred}} = 0,91$), e os gráficos MIA-plots evidenciaram o potencial promissor de determinados derivados fluorados. Diante da ausência de um alvo biológico previamente descrito para esses compostos, realizaram-se estudos de ancoragem molecular em três enzimas: enoil-acil carreador redutase (FabV), superóxido dismutase (SOD) e glutationa S-transferase (GST), a fim de propor um possível mecanismo de inibição dos 1,3,4-oxadiazóis. Para as moléculas com atividade contra *Xoc* e *Xoo*, foram construídos modelos estatísticos utilizando PLS e máquinas de vetores de suporte (SVM), também validados interna e externamente. Estudos de ancoragem e dinâmica molecular foram conduzidos para compreender as interações entre os compostos e seus alvos moleculares. Embora o modelo PLS tenha apresentado previsibilidade moderada, a regressão por SVM demonstrou maior robustez e confiabilidade na estimativa do potencial antibacteriano dos 1,3,4-oxadiazóis. Os novos candidatos projetados exibiram atividades preditas superiores às do conjunto de dados original, destacando-se compostos contendo o substituinte 2,4-diclorofenil, que apresentaram atividade antibacteriana significativa e simultânea contra *Xoc* e *Xoo*. Os resultados de ancoragem e dinâmica molecular corroboraram as análises de QSAR, evidenciando as principais características estruturais responsáveis pelas afinidades ligantes–enzima.

Palavras-chave: MIA-QSAR; antibacterianos; Xanthomonas; ancoramento molecular; dinâmica molecular.

ABSTRACT

Xanthomonas is a genus of Gram-negative bacteria responsible for important plant diseases, affecting a wide range of agricultural crops. These phytopathogens cause, among other symptoms, leaf spots and impairment of plant development. Quantitative Structure–Activity Relationship (QSAR) is a computational chemistry approach aimed at understanding and predicting the biological properties of molecules based on their structural characteristics. In the present study, the MIA-QSAR methodology was employed to investigate the relationship between the structure of chemical compounds and their antibacterial activity against *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac), *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo), and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (Xoc). The developed models were used to design new antimicrobial agents targeting infections caused by these bacteria. For the set of molecules with anti-Xac activity, statistical models were constructed using the Partial Least Squares (PLS) method and validated both internally and externally. Molecular docking studies were also performed to elucidate possible pathogenicity mechanisms of Xac, a key step for the effective control of citrus canker. The anti-Xac model exhibited robust performance metrics ($r^2 = 0.88$; $q^2 = 0.82$; $r^2_{\text{pred}} = 0.91$), and MIA-plots highlighted the promising potential of certain fluorinated derivatives. Given the lack of previously reported biological targets for these compounds, molecular docking studies were conducted on three enzymes—enoyl-acyl carrier protein reductase (FabV), superoxide dismutase (SOD), and glutathione S-transferase (GST)—in order to propose a possible inhibition mechanism for 1,3,4-oxadiazoles. For molecules active against Xoc and Xoo, statistical models were developed using both PLS and Support Vector Machine (SVM) approaches, which were also internally and externally validated. Molecular docking and molecular dynamics studies were carried out to better understand the interactions between the compounds and their molecular targets. Although the PLS model showed moderate predictive ability, SVM regression demonstrated greater robustness and reliability in estimating the antibacterial potential of 1,3,4-oxadiazoles. The newly designed candidates exhibited predicted activities superior to those of the original dataset, particularly compounds containing a 2,4-dichlorophenyl substituent, which showed significant and dual antibacterial activity against Xoc and Xoo. Docking and molecular dynamics results corroborated the QSAR findings, highlighting the key structural features responsible for ligand–enzyme binding affinities.

Keywords: MIA-QSAR; antibacterials; *Xanthomonas*; molecular docking; molecular dynamics.

Impactos sociais, tecnológicos, econômicos e culturais

O presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de modelos preditivos por meio da abordagem MIA-QSAR, aliados a estudos de ancoramento molecular e dinâmica molecular, visando à identificação de compostos com potencial atividade antibacteriana contra bactérias do gênero *Xanthomonas*, responsáveis por importantes doenças em culturas agrícolas, como citros e arroz. Os impactos tecnológicos concentram-se na aplicação de ferramentas avançadas de química computacional, incluindo modelos de mínimos quadrados parciais (PLS) e máquinas de vetores de suporte (SVM), que apresentaram elevada robustez preditiva ($r^2 = 0,88$; $q^2 = 0,82$; $r^2_{\text{pred}} = 0,91$), possibilitando a proposição de novos compostos com maior eficiência biológica, com destaque para derivados contendo substituintes 2,4-diclorofenil. Sob a perspectiva econômica, os resultados indicam potencial redução de perdas agrícolas e otimização de custos no desenvolvimento de agroquímicos, uma vez que o uso de metodologias *in silico* contribui para a diminuição do tempo e dos investimentos necessários em etapas experimentais. No âmbito ambiental, o estudo favorece a redução do uso de bactericidas convencionais, como compostos à base de cobre, ao propor alternativas mais seletivas e potencialmente menos tóxicas, promovendo práticas agrícolas mais sustentáveis e a preservação dos ecossistemas. No contexto social, os impactos relacionam-se à segurança alimentar, ao fortalecimento do setor produtivo agrícola e à formação de recursos humanos qualificados. O trabalho apresenta caráter potencialmente extensionista, ao gerar conhecimento aplicável ao setor agrícola, beneficiando produtores rurais e a indústria agroquímica. O território impactado abrange regiões produtoras de citros e arroz, em escala regional e nacional. Embora os impactos diretos ainda se encontrem em estágio potencial, os resultados obtidos estabelecem bases consistentes para futuras aplicações práticas, alinhando-se aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável, especialmente aqueles relacionados à agricultura sustentável, inovação tecnológica, crescimento econômico e proteção ambiental.

Social, technological, economic and cultural impacts

The present study aims to develop predictive models using the MIA-QSAR approach, combined with molecular docking and molecular dynamics studies, in order to identify compounds with potential antibacterial activity against bacteria of the genus *Xanthomonas*, which are responsible for important diseases in agricultural crops such as citrus and rice. The technological impacts are centered on the application of advanced computational chemistry tools, including Partial Least Squares (PLS) and Support Vector Machine (SVM) models, which demonstrated high predictive robustness ($r^2 = 0.88$; $q^2 = 0.82$; $r^2_{\text{pred}} = 0.91$), enabling the proposal of new compounds with enhanced biological efficiency, particularly those containing 2,4-dichlorophenyl substituents. From an economic perspective, the results indicate a potential reduction in agricultural losses and optimization of costs in agrochemical development, as the use of *in silico* methodologies reduces both time and financial investment required in experimental stages. Environmentally, the study contributes to reducing the use of conventional bactericides, such as copper-based compounds, by proposing more selective and potentially less toxic alternatives, thereby promoting more sustainable agricultural practices and ecosystem preservation. In the social context, the impacts are associated with food security, strengthening of the agricultural sector, and the training of qualified human resources. The study presents a potentially extension-oriented character by generating knowledge applicable to the agricultural sector, benefiting farmers and the agrochemical industry. The impacted territory includes citrus- and rice-producing regions at both regional and national levels. Although direct impacts are still at a potential stage, the results establish a solid foundation for future practical applications, aligning with the Sustainable Development Goals, particularly those related to sustainable agriculture, technological innovation, economic growth, and environmental protection.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1 — Lesões causada pela bactéria <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> em cítricos.....	29
Figura 2 — Especificidade do tecido hospedeiro de <i>X. oryzae</i> patovares.	31
Figura 3 – Estrutura química do bismertiazol	35
Figura 4 — Etapas de uma Análise QSAR	38
Figura 5 — MIA-Plots baseados nos parâmetros VIP e b para 68 tricetonas com atividade de inibição da enzima hidroxifenilpiruvato desoxigenase (HPPD).....	41

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1 - Exploring the Antibacterial Potential of 1,3,4-Oxadiazoles Against *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in Citrus Species Through Molecular Modeling.

Fig. 1 Chemical structures of bismertiazol and 1,3,4-oxadiazoles studied herein.	65
Fig. 2 The plot of studentized residuals vs. sample leverages for applicability domain test using MIA descriptors based on electronegativity values.....	72
Fig. 3 Correlation plot of experimental vs. calculated pEC ₅₀ for the 1,3,4-oxadiazole derivatives in calibration, leave-one-out cross-validation, and external validation (test set selected through Kennard-Stone sampling) obtained from the MIA-QSAR model based on electronegativity descriptors.....	73
Fig. 4 Overlaid images used in the MIA-QSAR modeling (top) and MIA-plots of variable importance in projection (VIP) and PLS regression coefficients (b).	75
Fig. 5 Calculated log P (molinspiration.com) for the library (blue) and proposed (red) 1,3,4-oxadiazole derivatives.	76
Fig. 6 Plots of experimental/calculated pEC ₅₀ vs. docking scores (kcal mol ⁻¹) for the XacFabV enzyme complexed with the 1,3,4-oxadiazoles studied herein, and the lack of correlation with XacSOD and XacGST enzymes.	78
Fig. 7 Two-dimensional theoretical insight into the interactions of compounds as XacFabV inhibitors.....	79

ARTIGO 2 - QSAR and machine learning-driven proposition of novel 1,3,4-oxadiazoles and structure-based studies of their antibacterial activities against *Xanthomonas oryzae*.

Figure 1. William's plots for outlier detection in the data set of anti-Xoc and anti-Xoo compounds.....	99
Figure 2. Relationships between actual and calculated pEC ₅₀ values for the Xoc, Xoo, and Xoc/Xoo models.	100
Figure 3. MIA plots indicating the influence of substituents on the pEC ₅₀ values (VIP) and how they affect (decreasing or increasing) the bioactivities (b). Gradient colors from dark blue to dark red indicate an influence of substituents ranging from negligible to high (VIP) and a negative to positive effect on pEC ₅₀ (b). Bottom: overlaid images demonstrating the congruent scaffold (1,3,4-oxadiazole) and the variable moieties (more fuzzy atoms).....	104
Figure 4. Ligand-enzyme (Xoo FabH) interactions leading to the docking scores for representative 1,3,4-oxadiazole library compounds.	108
Figure 5. Ligand-enzyme (Xoo FabH) interactions leading to the docking score for bismertiazol.	108
Figure 6. Docking scores (kcal mol ⁻¹) for library compounds (blue), proposed compounds (red), and bismertiazol (green) obtained from interactions with the Xoo FabH binding pocket. Energy values for most compounds were consistently within the range of -120 to 160 kcal mol ⁻¹ with minimal fluctuation, correlating with the pEC ₅₀ values. These intermolecular interactions offer insights into the compounds' mode of action, contributing to elucidating their antibacterial activities.....	109
Figure 7. Ligand-enzyme (Xoo FabH) interactions leading to the docking scores for representative proposed compounds.....	110
Figure 8. Superposed poses of compounds P22 and P25 demonstrating their congruence and similar interactions with key amino acid residues of Xoo FabH.....	111
Figure 9. Molecular dynamics results for the 3FK5 complexed with proposals P21, P22 and P25. (a) Ligand-ligand RMSD; (b) Protein-protein RMSD; (c) RMSF per residues; (d) Hydrogen bonds between 3FK5 and P21; (e) Hydrogen bonds between 3FK5 and P22; (f) Hydrogen bonds between 3FK5 and P25; (g) Short range (SR) Coulomb energy; (h) Short range (SR) Lennard-Jones energy.	114
Figure 10. Snapshot of frame 728 from the molecular dynamics simulation, highlighting the P25 proposal and its interactions with key residues. The residues Thr272, His265, Gly326,	

Ile325, and Val267 are shown forming hydrogen bonds, which were maintained for the majority of the simulation time. 116

LISTA DE TABELAS

PRIMEIRA PARTE

Tabela 1 — Classificação quanto à toxicologia	33
Tabela 2 — Classificação conforme a Periculosidade Ambiental	34

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1- Exploring the Antibacterial Potential of 1,3,4-Oxadiazoles Against *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in Citrus Species Through Molecular Modeling.

Table 1. 1,3,4-Oxadiazole derivatives studied herein (Figure 1) and the respective experimental pEC ₅₀ data (EC ₅₀ in mol L ⁻¹).	69
Table 2. Statistical performance of the MIA-QSAR model using Kennard-Stone sampling for the test set selection and in the bootstrapping experiment (10 cycles).....	73
Table 3. Proposed 1,3,4-oxadiazole derivatives and calculated pEC ₅₀ through the MIA-QSAR model.	76
Table 4. Binding energy values (kcal mol ⁻¹) of the docked ligands into the enzymes.	77

ARTIGO 2- QSAR and machine learning-driven proposition of novel 1,3,4-oxadiazoles and structure-based studies of their antibacterial activities against *Xanthomonas oryzae*.

Table 1. 1,3,4-Oxadiazoles used to build the QSAR models and the respective pEC ₅₀ values (EC ₅₀ in mol L ⁻¹) representing the bioactivities against Xoc, Xoo, and the average values	96
Table 2. Average parameters for the PLS-based models obtained through the bootstrapping procedure using 10 random cycles.	101
Table 3. Average parameters for the SVR-based models obtained through the bootstrapping procedure using 10 random cycles.	102
Table 4. Predicted pEC ₅₀ (EC ₅₀ in mol L ⁻¹) for the proposed 1,3,4-oxadiazoles using the PLS- and SVM-based MIA-QSAR models.	105
Table 5. Active site residues with lower RMSF and minimum distances to proposal P25 less than 0.35 nm.	115

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LOOCV	leave-one-out cross-validation
LV	Variáveis Latentes
MAE	Mean Absolute Error
MIA	Multivariate Image Analysis
MIA-plot	Gráficos MIA
MIA-QSAR	Multivariate Image Analysis applied to Quantitative Structure- Activity Relationship
MLR	Regressão Linear Múltipla
PLS	Mínimos Quadrados Parciais
r^2	Coefficiente de determinação
r^2_c	Coefficiente de determinação da calibração
r^2_m	Coefficiente de determinação modificado
r^2_{rand}	Coefficiente de determinação Y randomization
r^2_{test}	Coefficiente de determinação da validação externa
RMSE	root mean square error
q^2	Coefficiente de determinação da validação cruzada
$Q^2_{F1}, Q^2_{F2}, Q^2_{F3}$	Predictive Squared Correlation Coefficients
QSAR	Quantitative Structure-Activity Relationship
RGB	Red, Green, and Blue
PDB	Protein Data Bank
pEC_{50}	Logaritmo negativo da concentração efetiva
VIP	Gráfico de scores da importância das variáveis em projeção
1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
4D	Quarta dimensão
5D	Quinta dimensão
6D	Sexta dimensão
7D	Sétima dimensão
<i>Xac</i>	<i>Xanthomonas axonopodis pv. citri</i>
<i>Xoo</i>	<i>Xanthomonas oryzae pv. oryzae</i>

Xoc

Xanthomonas oryzae pv. *oryzicola*

LISTA DE SÍMBOLOS

>	Maior
<	Menor
=	Igualdade
+	Adição
ϵ	Eletronegatividade de Pauling
rVdW	Raio de Van der Waals
rVdW/ ϵ	Razão Raio de Van der Waals por Eletronegatividade de Pauling

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	22
1 INTRODUÇÃO	23
1.1 Justificativa.....	24
2 OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo Geral.....	24
2.2 Objetivos Específicos.....	25
3 REFERENCIAL TEÓRICO	26
3.1 A Citricultura Brasileira e o Cancro Cítrico	26
3.2 Mancha bacteriana e estria bacteriana na cultura do arroz.....	27
3.3 <i>Xanthomonas</i>	28
3.3.1 <i>Xanthomonas axonopodis</i> : O agente etiológico do cancro cítrico.....	29
3.3.2 <i>Xanthomonas oryzae</i> : A espécie causadora das doenças em arroz.....	30
3.4 Agroquímicos e bactericidas contra <i>Xanthomonas</i>	32
3.4.1 Bactericidas contra <i>Xanthomonas</i>	34
3.5 Proposição de novos agroquímicos	36
3.5.1 Relação Quantitativa Estrutura-Atividade (QSAR).....	36
3.5.2 Análise Multivariada de Imagens aplicada a Relação Quantitativa Estrutura-Atividade (MIA-QSAR).....	39
3.5.3 Métodos de Calibração em QSAR.....	42
Máquinas de Vetores de suporte.....	43
3.5.4 Avaliação dos modelos QSAR.....	44
3.5.5 Ancoramento Molecular.....	46
3.5.5.1 Mecanismo de ação para combate de doenças bacterianas	48
3.5.6 Dinâmica Molecular	49
4. CONSIDERAÇÕES GERAIS	51
REFERÊNCIAS	52

PARTE 2.....	63
1 ARTIGO 1 - EXPLORING THE ANTIBACTERIAL POTENTIAL OF 1,3,4- OXADIAZOLES AGAINST <i>XANTHOMONAS AXONOPODIS</i> PV. <i>CITRI</i> IN CITRUS SPECIES THROUGH MOLECULAR MODELING, <i>J. PLANT PATHOL.</i>, 107, 2025, 873-882.....	64
Abstract	64
Introduction.....	65
Materials and Methods.....	67
Results	71
Discussion.....	79
Acknowledgments.....	84
References.....	84
2 ARTIGO 2 - QSAR AND MACHINE LEARNING-DRIVEN PROPOSITION OF NOVEL 1,3,4-OXADIAZOLES AND STRUCTURE-BASED STUDIES OF THEIR ANTIBACTERIAL ACTIVITIES AGAINST <i>XANTHOMONAS ORYZAE</i>, <i>THEOR. CHEM. ACC.</i>, 144, 2025, 19.	90
ABSTRACT	90
INTRODUCTION	91
MATERIALS AND METHODS.....	92
RESULTS AND DISCUSSION.....	95
QSAR.....	95
Docking.....	106
Molecular dynamics.....	111
CONCLUSIONS.....	117

ACKNOWLEDGMENTS.....117

REFERENCES118

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Xanthomonas* engloba diversas espécies fitopatogênicas que atacam plantas economicamente importantes, incluindo arroz, feijão, mandioca, tomate, trigo, citrus, plantas ornamentais, entre outros. O cancro cítrico causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*) é considerado em todo o mundo como uma das mais importantes doenças que afetam diretamente a produção e qualidade dos frutos.

Já as duas doenças que mais afetam as plantações de arroz em todo o mundo são causadas pelas bactérias *X. oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) e *X. oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*). Com base em estatísticas recentes e incompletas, a área de ocorrência de doenças bacterianas na China aumenta para 120 milhões de variedades a cada ano, tornando as doenças bacterianas a segunda maior categoria de doenças na agricultura (LIU et al., 2020).

A produção de citrus e arroz é um destaque mundial, tanto do ponto de vista econômico, quanto para a alimentação mundial.

Os citrus, principalmente as laranjas, têm importância econômica significativa em várias regiões do mundo. A produção dessas frutas contribui para a indústria alimentar (suco de frutas) e para a exportação de produtos correlatos. Os citrus são ricos em vitamina C e outros nutrientes, desempenhando um papel vital na dieta humana. Além disso, os produtos derivados, como sucos, são amplamente consumidos globalmente.

Já o arroz é um dos principais alimentos básicos para grande parte da população mundial, especialmente em países asiáticos. A produção de arroz é uma fonte significativa de receita para muitos agricultores e contribui para a economia global. O arroz é uma fonte fundamental de calorias para bilhões de pessoas em todo o mundo, desempenhando um papel crucial na segurança alimentar, proporcionando energia e nutrientes essenciais.

O Brasil e a China são os maiores produtores de citrus no mundo, enquanto o arroz é um dos grãos mais consumidos no mundo, sendo a China um destaque na produção desse grão. As plantações de citrus e arroz enfrentam desafios, tais como mudanças climáticas, pragas e doenças. As principais doenças que afetam essas culturas são causadas por bactérias do gênero *Xanthomonas*.

Os bactericidas utilizados contra as doenças citadas são os agentes de cobre e o bismertiazol. Já foram identificadas regiões na qual a resistência a esses compostos foi

verificada. Até o momento não se tem registro de produtos que tenham sido desenvolvidos para contornar esse problema (BEHLAU et al., 2012; ZHANG et al., 2015).

Portanto, o desenvolvimento de novas estruturas direcionadas a essas doenças bacterianas com múltiplos modos de ação para desativar a resistência bacteriana pode promover o seu manejo.

O desenvolvimento de moléculas bioativas pode ser auxiliado por meio de técnicas computacionais, tais como estudos por QSAR (Relação Quantitativa de Estrutura-Atividade), os quais são amplamente populares devido ao baixo custo, boa capacidade preditiva e à vantagem de não exigirem organismos vivos ou ensaios experimentais (embora os pontos finais sejam tipicamente derivados de dados experimentais) (MKHAYAR et al., 2023).

1.1 Justificativa

Segundo estudos recentes, derivados de 1,3,4-oxadiazóis possuem atividade antimicrobiana avaliadas contra as *X. axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), *X. oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) e *X. oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*). Na agricultura, verifica-se um problema de grande porte para o controle das doenças causadas por essas bactérias, uma vez que já foi verificado mundialmente a resistência a antibacterianos a base de cobre (os mais utilizados) e bismertiazol para controle e prevenção das principais doenças causadas por essas bactérias em citrus e arroz.

Assim, torna-se imprescindível que se desenvolvam novos candidatos a bactericidas para controle dessas pragas, as quais causam grandes perdas econômicas e ainda comprometem a produção de alimentos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho possui como objetivo o planejamento *in silico* de novos compostos com atividade bactericida contra as bactérias fitopatogênicas do gênero *Xanthomonas*, que são responsáveis pelas doenças cancro cítrico em citrus e, ainda, a mancha bacteriana e a estria bacteriana das folhas de arroz, que são responsáveis por perdas significativas na agricultura.

2.2 Objetivos Específicos

- 1) Construir modelos MIA-QSAR com elevada capacidade preditiva das atividades antimicrobianas contra *Xanthomonas*.
- 2) Interpretar os modelos construídos com base nos gráficos MIA-plots.
- 3) Realizar estudos de ancoramento molecular com o intuito de compreender os mecanismos de ação dos antibacterianos.
- 4) Realizar estudos de dinâmica molecular.
- 5) Realizar proposição de novos candidatos antibacterianos.
- 6) Propor uma rota sintética para a obtenção dos antibacterianos propostos.
- 7) Divulgar os resultados por meio de publicação em periódicos relevantes para área.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 A Citricultura Brasileira e o Cancro Cítrico

A citricultura refere-se ao cultivo de frutas cítricas e consiste em uma das atividades agrícolas com maior relevância mundial, superando os cultivos de banana, uva e maçã (EMBRAPA, 2007).

O maior produtor de citrus no mundo é a China, enquanto o Brasil ocupa o posto de segundo maior produtor mundial. O citrus mais cultivado mundialmente é a laranja e o Brasil se destaca como o maior produtor e exportador de frutas e suco de laranja doce, sendo responsável pela produção de 34% das laranjas e 56% do suco de laranja consumido no mundo, fornecendo três quartos das exportações globais. Aproximadamente 97% das laranjas colhidas no Brasil são transformadas em suco, que é exportado principalmente para Europa, EUA e Ásia. Na safra 2020/2021, o Brasil produziu cerca de 11 milhões de toneladas de laranja e aproximadamente 1,2 milhão de toneladas de suco concentrado (MOREIRA et al., 2022).

Os Estados brasileiros São Paulo, Minas Gerais, Pará, Paraná, Rio Grande do Sul e Bahia são as áreas produtoras de citrus no Brasil, sendo São Paulo o estado responsável por 80% da produção brasileira de laranjas (CARVALHO et al., 2022).

Considera-se que a citricultura é uma atividade agrícola consolidada no Brasil e que esta representa um fator econômico em destaque para o país. A citricultura é atingida, muitas vezes, por pragas e doenças agrícolas que prejudicam a sua produção, afetando diretamente a economia e o abastecimento de alimentos relacionado ao citrus. Os cítricos são suscetíveis a uma variedade de doenças, incluindo o cancro cítrico, que é a doença mais comum dos citros.

O cancro cítrico, originado no Sudeste Asiático, é uma das doenças mais importantes que afetam os citros, sendo considerada a doença que mais causa prejuízos na citricultura. Reduz tanto a produtividade das árvores cítricas, devido à queda prematura dos frutos afetados, quanto a comercialização dos frutos frescos. Além de causar depreciação na aparência dos frutos, o cancro cítrico restringe a comercialização da produção para outras regiões, devido ao risco de disseminação do patógeno, principalmente para regiões citrícolas livres de cancro (BEHLAU, 2020).

O cancro cítrico também é denominado como “cancro cítrico asiático” ou “cancrose A”. A utilização de composto à base de cobre durante a primavera e o verão é a principal medida

adotada para prevenção e controle contra a doença. As estações de chuvas frequentes e altas temperaturas coincidem com a presença de brotos e frutos jovens suscetíveis a infecção (FERREIRA et al., 2022).

O cancro cítrico é considerado uma “praga” quarentenária, ou seja, a não adoção de medidas de exclusão/erradicação, caso a bactéria seja detectada, impede o comércio de frutos cítricos, suco concentrado e seus derivados para países livres do patógeno, já que o comércio desses produtos é regulamentado por legislação internacional (BEHLAU, 2020).

A bactéria patogênica causadora do cancro cítrico é denominada *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (VAUTERIN et al., 1995).

3.2 Mancha bacteriana e estria bacteriana na cultura do arroz

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma cultura de destaque mundial, sendo o segundo cereal mais cultivado no mundo, e a área ocupada para o plantio é de aproximadamente 158 milhões de hectares, o que representa uma produção de aproximadamente 28% da produção mundial de cereais de 2,8 bilhões de toneladas, e é consumido pelas populações em todos os quadrantes do globo terrestre (SANTOS, 2021; SILVA; WANDER, 2023a).

Esta cultura é cultivada em todos os continentes, sendo o continente asiático o maior produtor mundial, com aproximadamente 89,9% da produção. Em seguida vem o continente americano, com 4,8%, seguido pelo africano, com 4,7%, o europeu, com 0,5%, e pôr fim a Oceania, com apenas 0,1%. Na Ásia estão os oito maiores produtores de arroz: em primeiro lugar está a China, seguida pela Índia, Bangladesh, Indonésia, Vietnã, Tailândia, Myanmar e Filipinas. A China contribui com uma produção equivalente a 27% da mundial e 30% da asiática (SILVA; WANDER, 2023a).

O arroz é o alimento de maior importância em países localizados na Ásia e Oceania, onde aproximadamente 90% de todo o arroz do mundo é cultivado e consumido na Ásia. Assim como na Ásia, o arroz é um produto importante para a economia de alguns países latino-americanos e faz parte da dieta da população, como no caso do Brasil, Colômbia e Peru. O Brasil está entre os 10 maiores produtores mundiais de arroz, ocupando a 9ª posição no ranking, sendo o maior produtor da América Latina (SANTOS, 2021; SILVA; WANDER, 2023 a, b).

A cultura de arroz apresenta uma boa capacidade adaptativa a diferentes condições de solo e clima, mas está sujeita a várias pragas que causam prejuízos, afetando diretamente a

economia e a alimentação mundial. Doenças causadas por patógenos bacterianos, fúngicos e virais ameaçam constantemente a produção de arroz e levam a enormes perdas de rendimento.

A mancha bacteriana e a estria bacteriana das folhas, causadas respectivamente pelas bactérias gram-negativas *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) e *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*) são duas doenças importantes que afetam a produção de arroz em todo o mundo (JIANG et al., 2020). Vale destacar que o patógeno ainda não foi encontrado nas lavouras brasileiras (REYNOL, 2017).

3.3 *Xanthomonas*

As *Xanthomonas* (duas palavras gregas; *xanthos*, que significa 'amarelo', e *monas*, que significa 'entidade') compreendem uma classe de bactérias gram-negativas (ou seja, apresenta coloração vermelha no corante Gram), com células em formato de bastonetes móveis em flagelo polar e possuem respiração aeróbia (VAUTERIN et al., 1995; SHARMA et al., 2014). Apresentam colônias de coloração amarelada devido à presença do pigmento xantomonadina, que é uma característica taxonômica importante, uma vez que é exclusiva do gênero (STARR; STEPHENS, 1964). O gênero *Xanthomonas* pertence à família “*Xanthomonadaceae*”, classe “*Gammaproteobacteria*”, filo “*Proteobacteria*”, do reino das Bactérias.

As *Xanthomonas* compreendem em várias espécies de bactérias fitopatogênicas, que estão distribuídas ao redor do mundo e são responsáveis por doenças em diversas plantas economicamente importantes, tais como arroz, citrus, banana, repolho, tomate, pimentão, feijão, entre outras culturas, causando enormes perdas na produção agrícola através de lesões necróticas em folhas, caules e frutos, murchas, maceração de tecidos e hiperplasias (RYAN et al., 2011; FENG et al., 2023).

As espécies patogênicas de *Xanthomonas* mostram um alto grau de especificidade da planta hospedeira e as espécies podem ser ainda diferenciadas em patovares (“pv.”), que são definidos pela gama característica do hospedeiro e/ou especificidade do tecido (RYAN et al., 2011; JACQUES et al., 2016; AN et al., 2019) Por exemplo, *X. oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) é um patógeno vascular do arroz, enquanto *X. oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*) infecta o parênquima foliar do arroz (JACQUES et al., 2016; AN et al., 2019).

3.3.1 *Xanthomonas axonopodis*: O agente etiológico do cancro cítrico

O cancro cítrico é uma das maiores ameaças aos citrus em todo o mundo, é causado pela bactéria Gram-negativa *X. axonopodis* pv. *citri* (*Xac*) (sinônimo = *Xanthomonas citri* pv. *citri*); essa bactéria, causadora do cancro cítrico, ataca todas as variedades e espécies de citrus (LEDUC et al., 2015; ZHU et al., 2022).

Esse patógeno bacteriano teve sua espécie hospedeira originária na Ásia e já se espalhou por quase todo o mundo. É listado como um organismo de quarentena em áreas livres de doenças, como, por exemplo, países mediterrâneos, Nova Zelândia, Austrália e África do Sul, onde foi erradicado em 1938 (LEDUC et al., 2015).

A infecção das plantas acontece com a penetração da bactéria por meio de aberturas naturais dos tecidos (estômatos) ou por ferimentos causadas por vento, espinhos, insetos ou operações agrícolas. O patógeno é naturalmente disperso em distâncias curtas através do efeito concomitante da chuva e do vento, bem como através de operações de manutenção. A dispersão de longa distância ao longo de vários quilômetros pode ocorrer em condições meteorológicas extremas, como, por exemplo, furacões. No entanto, acredita-se que dependa predominantemente do movimento mediado pelo homem, transportando mudas de citrus, restos de cultura (frutos ou folhas) e equipamentos contaminados (LEDUC et al., 2015).

A bactéria sobrevive em tecido doente por períodos de até vários anos. Os sintomas do cancro cítrico variam de pústulas a lesões necróticas com tecidos cortiça erupcionados circundados por margens oleosas ou úmidas e um halo amarelo. Desfolha, morte, queda prematura dos frutos e frutos imperfeitos são sintomas da gravidade da doença. Frutas com lesões são economicamente afetadas de forma mais significativa e têm valor muito baixo, porque não podem ser vendidas frescas (LI et al., 2022; PRASANNA et al., 2023).

Figura 1 — Lesões causada pela bactéria *X. axonopodis* pv. *citri* em cítricos



Fonte: Elaborada elaborado pela autora com base em imagens do google (2026).

A ausência de uma estratégia de controle efetivo pode causar perdas diretamente (rendimento de frutas e qualidade reduzida) e indiretamente (proibição de exportação de frutas frescas para alguns países livres de doenças). A eliminação da bactéria de uma área da planta infectada exige a erradicação das plantas doentes e das demais suspeitas de contaminação (PRASANNA et al., 2023).

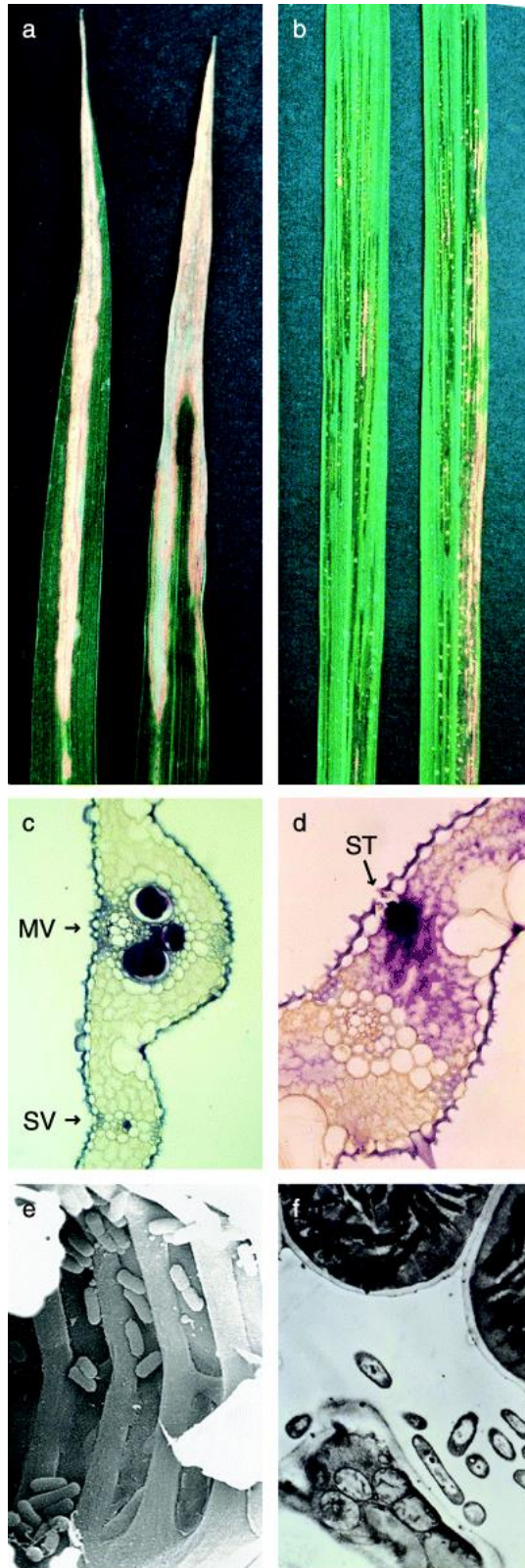
O controle do cancro cítrico envolve práticas agrícolas preventivas, como a eliminação de plantas infectadas, o uso de mudas livres da bactéria, a aplicação de antibióticos (bactericidas - controle químico) e a adoção de medidas para evitar a disseminação da doença. O manejo integrado, que combina diferentes estratégias é, geralmente, recomendado para minimizar os impactos do cancro cítrico nas plantações (PRASANNA et al., 2023; ZHU et al., 2022).

3.3.2 *Xanthomonas oryzae*: A espécie causadora das doenças em arroz

O arroz alimenta metade da população mundial; portanto, aumentar o rendimento da produção de arroz é fundamental para satisfazer as necessidades alimentares de uma população mundial em rápido crescimento. A doença bacteriana causada pela bactéria *X. oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) é a mais grave do arroz e causa perdas de rendimento de até 70%, enquanto as estrias bacterianas nas folhas causadas pela bactéria *X. oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*) são cada vez mais importantes e causam perdas no rendimento de até 20% (KE et al., 2019).

X. oryzae pv. *oryzae* (*Xoo*) e *X. oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*) levam às devastadoras doenças bacterianas do arroz e têm uma relação genética muito próxima (CAO et al., 2020). A *Xoo* se coloniza nos vasos do xilema ao entrar no sistema vascular, resultando em longas lesões ao longo da lâmina foliar, enquanto a *Xoc* se coloniza no mesofilo, não atingindo o xilema, resultando em lesões encharcadas de água (POULIN et al., 2015). Ambas as bactérias possuem como principal meio de penetração nas plantas as feridas; a *Xoc* através dos estômatos, enquanto a *Xoo* entra na folha do arroz normalmente através de hidátodos (estrutura semelhantes aos estômatos) na ponta e na margem da folha (NIÑO-LIU et al., 2006). A principal diferença se encontra na maneira como a infecção acontece, uma vez que elas infectam seu hospedeiro de maneiras distintas.

Figura 2 — Especificidade do tecido hospedeiro de *X. oryzae* patovares.



Legenda: (a) Folhas de arroz com lesões de macha bacteriana estendendo-se ao longo das nervuras da ponta e das margens da folha, resultantes da invasão do xilema via hidatódios por *X. oryzae* pv. *oryzae*.

(b) Folhas de arroz com sintomas de estrias foliares causadas pela colonização do tecido internerval via estômatos por *X. oryzae* pv. *oryzicola*. (c) Corte transversal de uma folha de arroz infectada com *X. oryzae* pv. *oryzae*, corados para mostrar a localização das células bacterianas, aparentes como cor azul escura a roxa dentro dos vasos do xilema da veia média (MV) e de uma veia secundária (SV). (d) Corte transversal de uma folha de arroz infectada com *X. oryzae* pv. *oryzicola* corado como em (c), mostrando colonização bacteriana da câmara subestomática e do parênquima mesofílico. ST, estoma. (e) Micrografia eletrônica de varredura de *X. oryzae* pv. *oryzae* em um vaso de xilema de uma folha de arroz. (f) Micrografia eletrônica de transmissão de *X. oryzae* pv. *oryzicola* nos espaços intercelulares do parênquima mesofílico de uma folha de arroz.

Fonte: NIÑO-LIU et al. (2006)

Os sintomas de *Xoo* e *Xoc* são facilmente diferenciados nos estágios iniciais da doença e refletem os diferentes modos de infecção por cada patógeno. Os sintomas foliares da *Xoo* geralmente se tornam evidentes na fase de perfilhamento, como pequenas manchas verdes encharcadas de água nas pontas e margens das folhas totalmente desenvolvidas. As manchas se expandem ao longo das nervuras, fundem-se e tornam-se cloróticas e depois necróticas, formando lesões opacas, de cor branca a cinza, que normalmente se estendem da ponta da folha para baixo ao longo das nervuras e margens da folha (Figura 2a). Os sintomas de *Xoc*, por outro lado, começam com pequenas lesões encharcadas de água em qualquer lugar ao longo da folha, entre as nervuras. As veias atuam como barreiras à medida que as áreas infectadas se expandem e se aglutinam longitudinalmente, resultando no sintoma que dá nome à doença. As listras são translúcidas e geralmente amarelas (Figura 2b). Em fases posteriores, as folhas infectadas tornam-se brancas acinzentadas e morrem (NIÑO-LIU et al., 2006).

3.4 Agroquímicos e bactericidas contra *Xanthomonas*

Prevê-se que a população mundial seja de 9,6 mil bilhões de pessoas em 2050 e que a produção global de cereais precise ser aumentada em 70% para satisfazer a procura alimentar da população mundial em rápido crescimento (GUHA et al., 2020). No entanto, para garantir o aumento da produtividade das culturas, os agricultores utilizam, frequentemente, fertilizantes e pesticidas.

A utilização de pesticidas na agricultura é uma necessidade em termos de produção em massa de alimento. Uma vez que as culturas agrícolas podem e são afetadas por pragas e doenças (WILMS et al., 2020). A aplicação de pesticidas na agricultura aumenta o rendimento, melhora a qualidade e amplia o tempo de armazenamento das culturas alimentares (PÉREZ-LUCAS et al., 2023).

Os termos pesticidas, agroquímicos, agrotóxicos, defensivos agrícolas, praguicida, produtos fitossanitários e biocidas referem-se a uma classe de substâncias naturais ou sintéticas, com ação biológica cuja finalidade é prevenir, combater e controlar pragas, defendendo a espécie de interesse contra algum agente considerado nocivo para a agricultura (FRANCISCO; FONTANETTI, 2015).

Os agrotóxicos são regulamentados aqui no Brasil pela Lei Federal 7.802/1989, conhecida como “Lei dos agrotóxicos”, e são definidos como “produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos utilizados na produção, armazenamento e benefício da agricultura, com a finalidade de preservar as plantações de organismos vivos considerados nocivos”. Resumidamente, são substâncias utilizadas para proteger as plantações de organismos nocivos (BRASIL,1989).

Os agroquímicos podem ser agrupados em grupos com o intuito de classificá-los, sendo os principais critérios adotados: o tipo de pragas que combatem, a estrutura química da substância ativa, a toxicidade (TABELA 1) e a periculosidade ao meio ambiente (TABELA 2) (BASTOS; PEREIRA, 2020).

A classificação mais comum e utilizada pela população é quanto ao tipo de praga que o agroquímico combate, como: inseticidas (contra insetos em geral), fungicidas (contra fungos), acaricidas (contra ácaros), herbicidas (contra plantas daninhas outros vegetais indesejáveis, mesmo do porte de arbustos ou árvores), larvicidas (contra larvas de insetos), formicidas (contra formigas), carrapaticidas (contra carrapatos de animais), nematicidas (contra nematoides parasitas de plantas, que formam nódulos ou "galhas" nas raízes), moluscicidas (para combate a moluscos), rodenticidas (para combate a roedores em geral), raticidas (para combate a ratos, em particular), avicidas (para controle de algumas aves comedoras de sementes), e bactericidas (contra bactérias que atingem a agricultura-antibacterianos) (ALMEIDA et al., 1985).

Tabela 1 — Classificação quanto à toxicologia

Classe Toxicológica	Toxicidade	Cor da Faixa
Categoria 1	Produto Extremamente Tóxico	Faixa Vermelha
Categoria 2	Produto Altamente Tóxico	Faixa Vermelha
Categoria 3	Produto Moderadamente Tóxico	Faixa Amarela
Categoria 4	Produto Pouco Tóxico	Faixa Azul
Categoria 5	Produto Improvável de Causar Dano Agudo	Faixa Azul
Não Classificado	Produto Não Classificado	Faixa Verde

Fonte: ANVISA, 2022.

Tabela 2 — Classificação conforme a Periculosidade Ambiental

Classe Toxicológica	Toxicidade ao Meio Ambiente
Classe I	ALTAMENTE PERIGOSO
Classe II	MUITO PERIGOSO
Classe III	PERIGOSO
Classe IV	POUCO PERIGOSO

Fonte: IBAMA,1996; IBAMA,2023.

Eles também podem ser classificados de acordo com o grupo químico predominante, tais como organofosforados, ditiocarbamatos, organoclorados, piretróides, bipiridilos, organomercuriais, dinitrofenóis, dentre outros (MENDES et al., 2019; PARANÁ, 2018).

3.4.1 Bactericidas contra *Xanthomonas*

Os bactericidas são os agroquímicos utilizados para o combate e controle de bactérias na agricultura. O controle de *Xanthomonas* na agricultura é um desafio, uma vez que requer uma abordagem integrada, que inclua práticas culturais, resistência genética e, em alguns casos, a utilização de produtos químicos, como bactericidas.

Em geral, o controle de infecções causadas pelos diversos patógenos de *Xanthomonas* é realizado através do uso de espécies ou variedades menos suscetíveis, o uso de quebra-ventos, desinfestação de equipamentos e ferramentas, adição de produtos químicos à base de cobre e erradicação de plantas contaminadas (PEITL et al., 2017; LIU et al., 2016). Porém, essas medidas têm sido ineficientes, devido ao acúmulo de material químico no ambiente, à suscetibilidade de variedades supostamente resistentes e à perda de área plantada (PERNEZNY et al., 2017).

As doenças bacterianas causadas pelo gênero *Xanthomonas* afetam culturas agrícolas de grande importância mundial. Devido a sua rápida propagação, a procura por um controle químico eficaz é fundamental (MARIN et al., 2019).

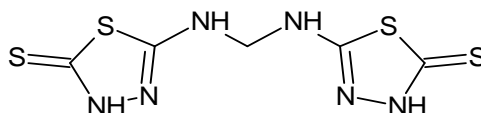
Os bactericidas mais utilizados contra as doenças bacterianas causadas por *Xanthomonas* são os agentes de cobre, que atingem a atividade bactericida, destruindo a integridade da membrana. O cobre é tóxico para a célula bacteriana por induzir a produção de radicais livres e, conseqüentemente, danificar as membranas lipídicas e o DNA (MARIN et al., 2019; ZHU et al., 2022).

As formulações fixas de cobre contendo oxicloreto de cobre, hidróxido de cobre ou óxido cuproso são as mais utilizadas (GRAHAM et al., 2016). Esses compostos formam uma película quando aplicados nas folhas jovens e nos frutos, impedindo ou dificultando a penetração das *xanthomonas* através de aberturas naturais, estômatos ou feridas. O filme atua como um reservatório que, em contato com a água e sob baixo pH, libera lentamente íons de cobre, que são tóxicos quando absorvidos em altas concentrações pelas células microbianas (MARIN et al., 2019)

Para obter proteção adequada, são necessárias múltiplas aplicações de um agente de cobre, levando à poluição do solo e da água, devido à degradação indesejável do cobre, e patógenos resistentes ao cobre surgiram durante o uso a longo prazo (ZHU et al., 2022).

O bismertiazol tem sido o bactericida mais comumente utilizado na China desde a década de 1970. Com nomes comerciais como Saikuzuo, Yekuning e Yeqingshuang, foi desenvolvido pela Sichuan Chemical Industry Design Academy, Sichuan, China (ZHU et al., 2013).

Figura 3 – Estrutura química do bismertiazol



Fonte: Elaborada pela autora (2026).

O bismertiazol vem sendo utilizado para controlar doenças causadas por *Xanthomonas*, tais como a mancha bacteriana e a estria bacteriana das folhas do arroz e cancro cítrico (NI et al., 2021). Esse bactericida possui atividade protetora e curativa contra as bactérias aqui estudadas; no entanto, sua atividade protetora é muito maior que sua atividade curativa. A atividade curativa do bismertiazol resulta da inibição direta do crescimento bacteriano (ZHU et al., 2013).

Atualmente, as plantas vêm desenvolvendo resistências a esses bactericidas, sendo fundamental o estudo de novos agentes antibacterianos e o entendimento do mecanismo de ação dos mesmos contra as bactérias do gênero aqui estudado (NI et al., 2021) (PIERRE et al., 2025).

3.5 Proposição de novos agroquímicos

3.5.1 Relação Quantitativa Estrutura-Atividade (QSAR)

Nos últimos anos, vem crescendo significativamente o número de pesquisas nos quais os métodos computacionais têm sido empregados para construção de modelos de previsão de propriedades (DE et al., 2022). Modelos são representações simplificadas de objetos e fenômenos físicos reais. A modelagem é o ramo que se dedica na construção e manipulação de modelos com objetivo de compreender mais profundamente as entidades por eles representadas. A modelagem molecular consiste na utilização de métodos computacionais para geração, manipulação ou representações realistas de estruturas químicas para prever e calcular propriedades físico-químicas e biológicas associadas (BARREIRO et al., 1997).

A modelagem quantitativa da relação estrutura-atividade (QSAR) vem do inglês *Quantitative Structure-Activity Relationship* e consistem em uma técnica *in silico* popular realizada para descobrir uma correlação quantitativa entre as características estruturais (através dos chamados descritores) e uma resposta conhecida (atividade/propriedade/toxicidade) para um conjunto de moléculas por meio de metodologias estatísticas (DEARDEN, 2016).

Os descritores moleculares são índices numéricos que codificam algumas informações relacionadas à estrutura molecular. Podem ser propriedades físico-químicas experimentais de moléculas e índices teóricos calculados por fórmulas matemáticas ou algoritmos computacionais. Os descritores moleculares estão intimamente ligados à estrutura molecular e desempenham um papel fundamental na pesquisa científica, constituindo o núcleo teórico de uma complexa rede de conhecimento (TODESCHINI et al., 2020).

Os modelos QSAR são definidos como uma relação matemática que relaciona os atributos estruturais com a atividade farmacológica ou outra propriedade de interesse para uma série de compostos químicos (MURATOV, 2020).

O principal objetivo é identificar e otimizar novas mudanças estruturais para encurtar o tempo e reduzir os gastos com a descoberta de medicamentos e agroquímicos (HSU et al., 2017). A suposição fundamental em relação à modelagem QSAR é que uma estrutura química possui características únicas (propriedades geométricas, estéricas e eletrônicas) responsáveis por suas propriedades físicas, químicas e biológicas (DE et al., 2022).

Assim, o QSAR tornou-se uma ferramenta essencial para o aprimoramento e otimização de compostos com atividade farmacológica, e sua utilização se estendeu também para análises que envolvem propriedades físico-químicas, o que gerou o conceito de QSPR (do inglês *Quantitative Structure-Property Relationships*) (YOUSEFINEJAD; HEMMATEENEJAD, 2015).

A primeira técnica de análise de QSAR surgiu na década de 1960 com os trabalhos de Hansch e Fujita (1964) e Free e Wilson (1964). Em seu trabalho, Hansch e Fujita, ao invés de uma, combinaram várias propriedades em um modelo linear (HANSCH, FUJITA, 1964). Ao mesmo tempo e de maneira independente à de Hansch e Fujita, Free e Wilson, em seu estudo de uma série de compostos análogos, postularam uma equação onde a contribuição de substituintes para a atividade biológica ocorre de maneira aditiva, dependendo apenas da posição e do tipo de grupo (FREE; WILSON, 1964). Em seguida vários outros trabalhos surgiram e novas técnicas foram sendo desenvolvidas, sendo o QSAR, atualmente, classificado desde 1D até 7D (as dimensões indicam diferentes propriedades, características e informações que a técnica consegue capturar).

Resumidamente, as técnicas 1D consideram representações moleculares e fragmentos moleculares, os quais apresentam correlação, como, por exemplo, pKa e log *P*. Já a 2D a resposta biológica passou a ser relacionada a padrões estruturais, como índices de conectividade e grupos funcionais (DAMALE et al., 2014). A técnica 3D inclui descritores que consideram o arranjo espacial dos átomos em uma molécula; duas técnicas bastante conhecidas dentro dessa abordagem são CoMFA (*Comparative Molecular Field Analysis*) e CoMSIA (*Comparative Molecular Similarity Indices Analysis*) (CRAMER et al., 1988) (KLEBE et al., 1994). Em 1997, Hopfinger et al. (1997) propuseram o método de QSAR-4D, no qual consideram-se interações entre ligante e receptor, e/ou múltiplas conformações do ligante. A metodologia de QSAR-5D, além da múltipla representação do ligante (quarta dimensão do QSAR), considera a flexibilidade do receptor por meio de diferentes protocolos de encaixe induzido, a quinta dimensão (VEDANI & DOBLER, 2002). A metodologia QSAR- 6D alia os efeitos de solvatação ao 5D-QSAR (VEDANI et al., 2005). A abordagem de QSAR-7D considera modelos reais ou virtuais da interação ligante-receptor (POLANSKI, 2009).

A técnica de modelagem QSAR existe há mais de cinquenta anos, permitindo com que Fujita e Winkler (2016) identificassem duas linhas de pesquisa diferentes nessa área, que foram se desenvolvendo ao longo do tempo. A primeira é relacionada a um modelo considerado

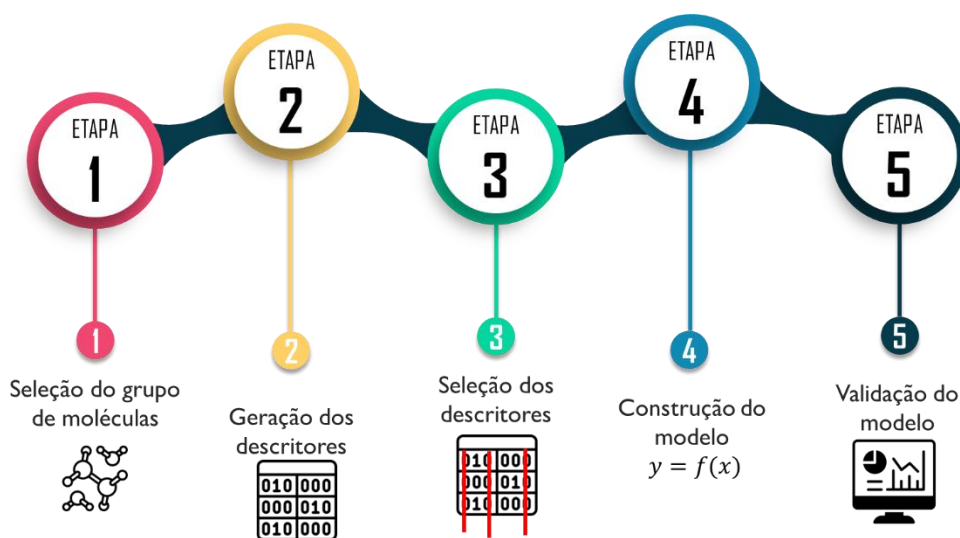
relativamente simples, linear e interpretável em termos de interações moleculares ou mecanismos biológicos, denominado pelos autores como QSAR “puro” ou clássico. A segunda abordagem concentra-se muito mais na modelagem de relações estrutura-atividade de grandes conjuntos de dados com alta dessemelhança química, usando uma variedade de métodos de regressão ou classificação, e seu objetivo principal é fazer previsões confiáveis de propriedades de novas moléculas; no entanto, muitas vezes, a interpretação do modelo é obscura ou impossível nessa segunda abordagem (FUJITA; WINKLER, 2016).

Paola Gramatica (2020) ainda aborda duas classificações de QSAR, os “QSARs descritivos” e os “QSARs estatísticos”. O primeiro consiste na exploração da compreensão de como a estrutura molecular influencia o modo de ação biológica dos compostos em estudo. O “QSAR estatístico”, também denominado “QSAR preditivo”, preocupa-se com a validação estatística para verificar seu desempenho em robustez e previsibilidade, e ainda em aplicar diversos modelos quimiométricos para o estudo QSAR (GRAMATICA, 2020).

Ambas as classificações possuem sua importância e são úteis para o pesquisador utilizar aquela que melhor se adapta ao objetivo de estudo.

Independente da metodologia adotada, as principais etapas para uma análise QSAR é exemplificada na Figura 2:

Figura 4 — Etapas de uma Análise QSAR



Fonte: elaborado pela autora com base em Yousefinejad e Hemmateenejad (2015), Gramatica (2020), e Muratov, 2020.

Na etapa de geração de descritores (etapa 2), é possível utilizar dois tipos principais, empíricos e teóricos. Os empíricos são obtidos experimentalmente, e os teóricos, também chamados de descritores moleculares teóricos, são calculados com base na estrutura da molécula (KATRITZKY et al., 2010; ESTRADA, 2008). Tais descritores teóricos representam informações codificadas na estrutura molecular e são obtidos por meio de procedimentos essencialmente computacionais (SAHOO et al., 2016).

3.5.2 Análise Multivariada de Imagens aplicada a Relação Quantitativa Estrutura-Atividade (MIA-QSAR)

O MIA-QSAR (*Multivariate Image Analysis applied to QSAR*) consiste em uma metodologia baseada no tratamento de imagens 2D (bidimensionais) para a modelagem molecular. Compreende-se que as imagens (constituídas por pixels) das moléculas contêm informações topoquímicas e topoestruturais relevantes e fundamentais para a modelagem de propriedades químicas, físicas e biológicas (DARÉ et al., 2017).

A essência dessa técnica consiste em que, para uma série de imagens de moléculas congêneres, as mudanças nos substituintes gerarão variações na orientação (posição) dos pixels, o que, por sua vez, explica as variações na variável resposta (propriedade biológica) (NUNES; FREITAS, 2013).

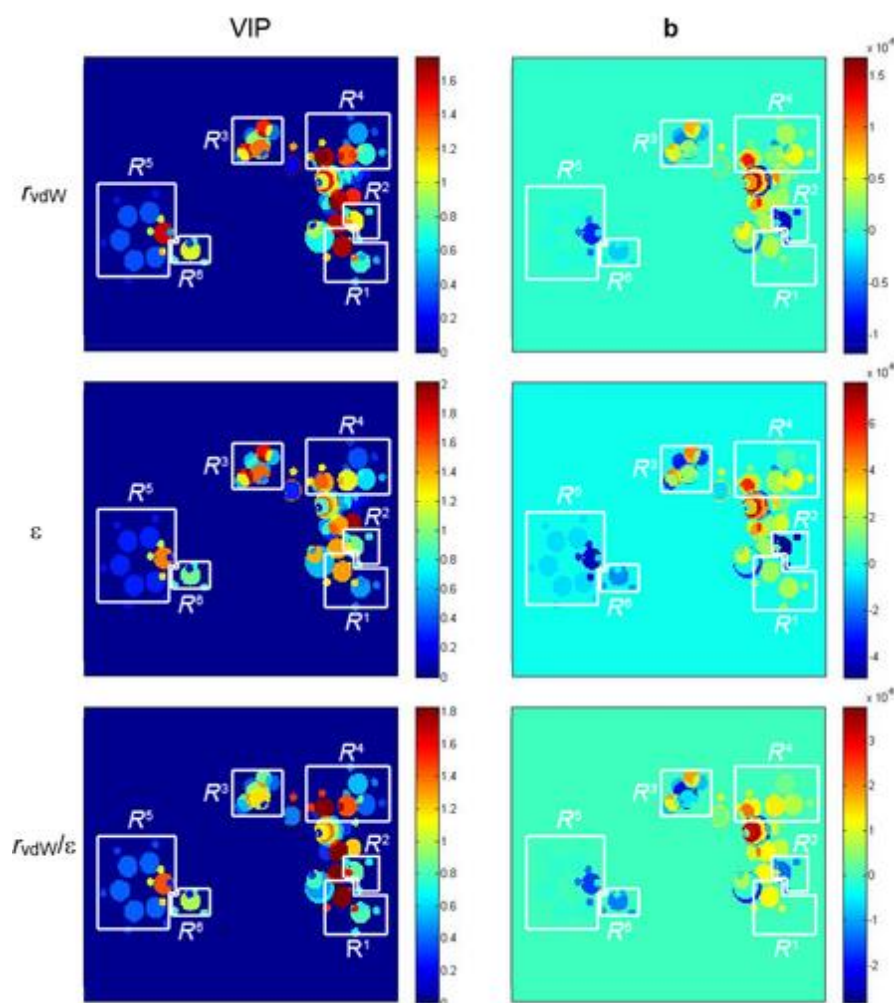
A técnica MIA-QSAR foi aperfeiçoada a partir de uma simples representação de moléculas em wireframes (imagens preto e branco) para geração de descritores (FREITAS et al., 2005) até modelos no qual as estruturas são representadas em cores (NUNES; FREITAS, 2013), evoluindo até abordagem mais recente, na qual os átomos são representados por círculos (correspondentes aos raios de van der Waals) de cores sólidas (oriundas do sistema RGB) para representação dos átomos. As cores dos átomos são cuidadosamente escolhidas para garantir a correspondência direta às diferentes propriedades atômicas, por exemplo, eletronegatividade, raio de Van der Waals, razão raio/eletronegatividade (BARIGYE; FREITAS, 2016).

Os descritores MIA são unidades digitais correspondentes aos pixels que formam a imagem de uma molécula e podem ser numerados de acordo com o sistema de cores RGB, cuja combinação dos três canais (vermelho, verde e azul) fornece valores que variam de zero (preto) a 765 (branco). Considerando que os átomos de uma molécula podem ser representados como círculos com tamanhos proporcionais aos respectivos raios de Van der Waals e que os

descritores MIA variam tanto em valor quanto em orientação à medida que a estrutura química muda, então as propriedades topológicas e atômicas são codificadas (PEREIRA, et al., 2022).

O MIA-QSAR conta com uma ferramenta gráfica nomeada MIA-Plot, que colabora para interpretação química dos modelos gerados, o que ajuda os pesquisadores a compreender como os diferentes substituintes e suas respectivas posições afetam a propriedade de interesse (BARIGYE et al., 2016). Os MIA-plots consistem de dois gráficos coloridos, sendo o primeiro denominado gráfico de coeficientes de regressão do PLS (**b**), e o segundo é um gráfico de scores da importância das variáveis em projeção (VIP) (BARIGYE et al., 2016). O mapa de scores VIP descreve o quão importante um determinado descritor é para o modelo, enquanto o gráfico de coeficientes de regressão PLS (**b**) indica como um determinado descritor molecular afeta a propriedade de interesse (aumentando ou diminuindo). Uma análise conjunta dos gráficos VIP e **b** é recomendável (BARIGYE et al., 2016).

Figura 5 — MIA-Plots baseados nos parâmetros VIP e b para 68 tricetonas com atividade de inibição da enzima hidroxifenilpiruvato desoxigenase (HPPD).



Fonte: CAPUCHO et al., 2023.

A técnica é bem consolidada e conta com diversos trabalhos publicados na literatura (RODRIGUES et al., 2022; LICONA et al., 2022). Uma tentativa de abordagem 3D que leva em conta a informação conformacional para a técnica MIA- QSAR foi estudada e avaliada (DARÉ et al., 2019; DARÉ et al., 2020; DARÉ; FREITAS, 2022). Contudo, a inclusão de informações 3D nos descritores MIA-QSAR implicou em modelos menos preditivos do que a abordagem MIA-QSAR convencional (DARÉ; FREITAS, 2022).

Portanto, a análise convencional MIA-QSAR baseada no alinhamento de subestruturas farmacofóricas congruentes provou ser mais eficiente que as tentativas de inclusão de informação 3D nos descritores (DARÉ; FREITAS, 2021).

Recentemente, foram construídos modelos por SVR (máquinas de vetores de suportes aplicadas a regressão) que podem ser aplicados quando os dados possuem algum grau de não linearidade para realizar previsões, o que mostrou ser eficaz e robusto para realizar as predições das variáveis (FARIA et al., 2025).

3.5.3 Métodos de Calibração em QSAR

A calibração é um processo fundamental em análises científicas e instrumentação, onde se estabelece uma relação entre as medidas instrumentais e os valores reais das propriedades que estão sendo avaliadas. Existem dois principais tipos de métodos de calibração: univariada e multivariada (BRAGA; POPPI, 2004).

A calibração univariada é um método que envolve apenas uma medida instrumental para cada amostra, por exemplo a relação linear entre a resposta instrumental de um espectrômetro e a concentração de uma substância alvo. Já a calibração multivariada ocorre quando há duas ou mais respostas instrumentais que se relacionam com a propriedade de interesse, como, por exemplo, em técnicas espectroscópicas em que pode haver vários comprimentos de onda medidos para cada amostra. A calibração multivariada leva em consideração todas essas variáveis simultaneamente para estabelecer uma relação mais completa (BARROS NETO et al., 2002).

O método de calibração multivariada mais simples consiste na Regressão Linear Múltipla (MLR), que se refere a uma técnica estatística que modela a relação entre múltiplas variáveis independentes (variáveis X) e uma variável dependente (variável Y). É uma extensão da regressão linear simples, onde existe apenas uma variável independente. Na MLR, o objetivo é ajustar uma equação linear aos dados que melhor expliquem a relação entre as variáveis (KOUADRI et al., 2021).

Um dos métodos mais utilizados em análises QSAR consiste nos Mínimos Quadrados Parciais - PLS (*Partial Least Squares*), que é um método estatístico que combina recursos de regressão linear múltipla (MLR) e análise de componentes principais (PCA). É comumente usado no contexto de análise e regressão multivariada de dados. O PLS é particularmente útil ao lidar com dados de alta dimensão ou quando há problemas de multicolinearidade entre as variáveis preditoras. O objetivo principal do PLS é encontrar as variáveis latentes (VL) (também conhecidas como fatores ou componentes) que explicam a covariância máxima nas

variáveis independentes e dependentes. Isso é feito extraindo iterativamente essas variáveis latentes e criando um conjunto de fatores ortogonais que são usados para modelar os dados. A regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) relaciona uma matriz de dados X com uma ou mais respostas (vetor ou matriz Y). (FERREIRA, 2015).

Há muitos outros métodos multivariados de calibração, tanto lineares, como o PLS, quanto não lineares, como é o caso do *Support Vector Machines* (SVM). Todos esses métodos são utilizados para construir modelos para relacionar a propriedade de interesse com a estrutura química.

Máquinas de Vetores de suporte

O método de Mínimos Quadrados Parciais (PLS) apresenta bom desempenho na construção de modelos quando as relações entre as variáveis são predominantemente lineares. No entanto, sua capacidade preditiva tende a ser limitada na presença de padrões não lineares nos dados. Nessas situações, torna-se mais apropriado o emprego de métodos capazes de capturar relações não lineares complexas, como as Máquinas de Vetores de Suporte (Support Vector Machines – SVM), que têm ganhado destaque em estudos de QSAR.

As SVM constituem uma classe de métodos de aprendizado de máquina supervisionado fundamentados no princípio da minimização do risco estrutural (Structural Risk Minimization – SRM) e na teoria do aprendizado estatístico desenvolvida por Vapnik e Chervonenkis (VAPNIK; CHERVONENKIS, 1974; VAPNIK, 1999). Esses métodos podem ser aplicados tanto a problemas de classificação quanto de regressão, apresentando elevada eficiência em espaços de alta dimensionalidade e boa capacidade de generalização.

No contexto da classificação, o SVM busca determinar o hiperplano ótimo que maximiza a margem de separação entre diferentes classes. Para problemas de regressão, a abordagem correspondente, conhecida como Support Vector Regression (SVR), consiste em encontrar uma função que descreva os dados com o menor erro possível, penalizando apenas os pontos que excedem uma margem de tolerância previamente definida (TRAFALIS; INCE, 2000; ZHANG et al., 2016).

A principal característica que confere ao SVM a capacidade de lidar com relações não lineares é o uso do denominado *truque do kernel*. Esse procedimento consiste na transformação dos dados de entrada para um espaço de maior dimensionalidade por meio de uma função de

mapeamento, no qual a separação linear torna-se viável. Após essa transformação, o algoritmo SVM pode ser aplicado de forma análoga ao caso linear. Diversas funções kernel podem ser utilizadas, incluindo os kernels linear, polinomial e de função de base radial (Radial Basis Function – RBF), sendo a escolha do kernel determinante para o desempenho do modelo (LE, 2018; SHI, 2021).

3.5.4 Avaliação dos modelos QSAR

O procedimento de validação de modelos QSAR é uma etapa crucial para garantir que o modelo construído seja robusto, preciso e generalizável para dados não utilizados anteriormente. Essa etapa consiste na avaliação do desempenho de ajuste e na avaliação da capacidade de predição do modelo. A capacidade preditiva dos modelos QSAR é considerada a característica mais importante para que um modelo seja aceitável (ROY et al., 2012; TODESCHINI et al., 2020).

Como um dos objetivos do QSAR é aplicar o modelo para estimar a atividade de outras moléculas, sua capacidade preditiva deve ser avaliada. Para conseguir isso, pode-se usar um conjunto externo de valores de descritores conhecidos e atividades biológicas que não foram incluídos na construção dos modelos QSAR e, em seguida, usar as atividades previstas nos cálculos do modelo. Alguns autores argumentam que este é o melhor método para garantir a confiabilidade dos modelos matemáticos construídos (CHERKASOV et al., 2014; TROPSHA, 2010).

Para a construção do modelo, geralmente, o conjunto de dados é dividido em dois subconjuntos: O conjunto de treinamento (usado para construção do modelo) e o conjunto de teste (consiste em 25-30 % do conjunto de dados original - é utilizado para a avaliação preditiva do modelo) (TODESCHINI et al., 2020; GRAMATICA, 2007; KIRALJ; FERREIRA, 2009). Essa divisão pode ser realizada de forma aleatória ou utilizando algum algoritmo de amostragem, tal como o Kennard-Stone (KN). O algoritmo KN seleciona as amostras com base na maior distância euclidiana de seus scores em um componente principal. As amostras são removidas do conjunto de dados e colocados no grupo teste (KENNARD; STONE, 1969).

Duas validações internas comumente utilizadas são a validação cruzada do tipo *leave-one-out* (LOOCv) e o teste de randomização do bloco Y (*y-randomization*). A validação cruzada avalia a robustez e a previsibilidade interna do modelo e testa a significância estatística do

modelo. Em sua forma mais simples, uma amostra é omitida do conjunto de calibração e o modelo é então recalculado para prever a atividade da amostra excluída. Esse processo é repetido até que todas as amostras tenham sido removidas do modelo uma vez (GRAMATICA, 2007; KIRALJ; FERREIRA, 2009; TODESCHINI et al., 2020). As diferenças entre os valores experimentais e preditos são usadas para calcular o erro quadrático médio da validação cruzada ($RMSE_{CV}$) e o seu coeficiente de determinação (q^2), que avalia a capacidade de prever novos dados. (ROY et al., 2012). A literatura designa que, para que o modelo QSAR seja aceito, o q^2 seja maior que 0,5 (KIRALJ; FERREIRA, 2009).

O teste de randomização do bloco Y consiste na randomização do bloco y em várias execuções, mantendo-se a matriz X original fixa. Os modelos obtidos nessas condições devem ser de baixa qualidade e sem significado real; a presença de bons resultados indica que a correlação foi obtida ao acaso ou que o modelo está superajustado (*overfitting*) (KIRALJ; FERREIRA, 2009).

O $r^2_{y-random}$ obtido no teste y-randomization (coeficiente de determinação obtido após a randomização do bloco das variáveis dependentes) apresenta, como objetivo, detectar e quantificar as correlações aleatórias entre a variável dependente (y) e os descritores (x). Já o risco de correlação ao acaso pode ser analisado por meio do parâmetro $^c r^2_p$ (MITRA et al., 2010 (ROY et al., 2011).

$$\left[^c r^2_p = r \times (r^2 - r^2_{y-random})^{1/2} \right]$$

O erro quadrático médio (RMSE) mede a média dos quadrados dos erros entre os valores observados e preditos; este deve ser calculado na calibração do modelo, validação cruzada, teste do bloco Y e ainda na validação externa. Outro parâmetro que deve ser calculado tanto para o conjunto de treinamento e teste é o coeficiente de determinação (r^2), que indica a proporção da variabilidade na variável dependente que é explicada pelo modelo.

A proximidade entre os valores experimentais de atividade biológica e os valores calculados para o grupo teste pode ser avaliada estatisticamente utilizando o parâmetro r^2_m (ROY et al., 2013):

$$r^2_m = r^2 \times [1 - (r^2 - r^2_o)^{1/2}]$$

No qual r^2 e r^2_o são os coeficientes de determinação entre as atividades biológicas observadas e preditas com e sem intercepto, respectivamente.

A validação externa baseada no Erro Médio Absoluto – MAE, é considerada um determinante mais simples e direto dos erros de predição (ROY et al., 2015).

Os parâmetros k e k' estão relacionados com a inclinação da reta. Quando as respostas observadas são plotadas no eixo y , as respostas previstas são plotadas no eixo x é chamado k . Quando o contrário acontece, ou seja, trocando os eixos obtemos o chamado k' . Os valores de k ou k' devem ser próximos de 1 (variando de 0,85 a 1,15) (CHIRICO; GRAMATICA, 2012).

Os parâmetros externos Q^2_{F1} , Q^2_{F2} e Q^2_{F3} (Q^2_{Fn}), avaliam o desempenho preditivo do modelo em um conjunto externo. As previsões externas para Q^2_{Fn} são consideradas boas quando o limite usado apresenta um valor maior que 0,6 (CHIRICO; GRAMATICA, 2011).

O coeficiente de correlação de concordância (CCC) mede a concordância entre os dados experimentais e preditos, servindo como uma estimativa da precisão (a qual distância as observações estão da linha de ajuste) e da exatidão (quanto a linha de regressão se desvia da reta ideal, que possui inclinação 1 e que passa pela origem, ou seja, a linha de concordância) (CHIRICO; GRAMATICA, 2011). Os valores de $CCC > 0,80$ são considerados aceitáveis pela literatura para validar o modelo (SHAYANFAR; SHAYANFAR, 2022).

O método de validação denominado *bootstrapping* avalia a robustez e estabilidade do modelo matemático construído, consistindo em dividir aleatoriamente os conjuntos de dados em treinamento e teste várias vezes (recomendado de 10 a 25 ciclos), obtendo assim valores médios dos parâmetros estatísticos (KIRALJ; FERREIRA, 2009).

Enfim, é altamente recomendado na literatura a definição do domínio de aplicabilidade dos modelos. O domínio de aplicabilidade (DA) é um espaço teórico definido pelos descritores e resposta biológica do conjunto de dados. Apenas compostos que estejam dentro desse domínio serão bem preditos pelo QSAR (CHERKASOV et al., 2014; GRAMATICA, 2007). O DA é uma ferramenta importante a se considerar em qualquer modelo QSAR. O DA é formidável para detectar amostras atípicas ou anômalas (outliers), que são os compostos que apresentam comportamento inesperado (ALVES et al., 2018).

3.5.5 Ancoramento Molecular

A técnica de ancoramento molecular, também conhecida como atracamento molecular ou ainda ancoragem molecular (do inglês *molecular docking*) consiste em um experimento computacional (*in silico*) que realiza simulações entre duas moléculas, como um ligante

(molécula pequena) e um receptor (proteína, enzima entre outros), gerando o complexo denominado proteína-ligante ou ainda proteína-proteína (VERLI, 2014).

O docking molecular é uma técnica computacional usada para prever a interação entre duas moléculas, normalmente um ligante pequeno e uma macromolécula maior, como uma proteína (CAVASOTTO et al., 2018).

O estudo das interações proteína-ligante é importante para o sucesso na descoberta e planejamento de novas moléculas bioativas. As proteínas são macromoléculas que desempenham diversas funções biológicas, interagindo com outras moléculas chamadas ligantes, que podem ser drogas, metais, moléculas de solvente ou outras macromoléculas, como lipídios, peptídeos, ácidos nucleicos e outras proteínas (DU et al., 2016).

DU et al. (2016), Verli (2014), Leelananda e Lindert (2016), e Bender et al. (2021) destacam que o processo de ancoramento molecular envolve as seguintes etapas:

- Preparação de Estruturas: As estruturas do ligante e da proteína alvo são preparadas para a simulação de acoplamento. Isso inclui atribuir cargas, adicionar átomos de hidrogênio e otimizar as estruturas.
- Algoritmo de pesquisa: um algoritmo de pesquisa explora os possíveis modos de ligação do ligante dentro do sítio de ligação da proteína alvo. Diferentes algoritmos usam várias estratégias para amostrar o espaço conformacional.
- Função de pontuação: Uma função de pontuação é empregada para avaliar a energia e a afinidade de cada modo de ligação. O objetivo é prever a pose de ligação energeticamente mais favorável.
- Análise: Os resultados são analisados para identificar o modo de ligação mais provável e para compreender as interações entre o ligante e a proteína alvo.

A interação entre uma proteína e um determinado ligante resulta na formação de um complexo proteína-ligante. As formas complexas baseiam-se unicamente na afinidade e especificidade de ligação entre a proteína e o ligante. A afinidade e especificidade entre o receptor e o ligante são dados por interações intermoleculares, dentre as quais estão as forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas, π - π , interações iônicas ou eletrostáticas, ligações de hidrogênio e ligações covalentes (GURYANOV et al., 2016).

O docking molecular é valioso na descoberta de medicamentos, pois ajuda os pesquisadores a priorizar e otimizar potenciais candidatos a moléculas bioativas antes dos testes

experimentais. Pode economizar tempo e recursos ao restringir a lista de compostos com maior probabilidade de exibir a atividade biológica desejada.

3.5.5.1 Mecanismo de ação para combate de doenças bacterianas

Um dos mecanismos mais relevantes para o controle de bactérias do gênero *Xanthomonas oryzae* envolve a desestabilização da membrana celular, resultando na perda da integridade estrutural e, conseqüentemente, na morte celular. Nesse contexto, a via de biossíntese de ácidos graxos do tipo II (FAS II) tem sido amplamente descrita como um alvo promissor para o desenvolvimento de novos agentes antibacterianos, uma vez que está diretamente relacionada à formação da membrana bacteriana (ZHAO et al., 2020; YAN et al., 2023).

Dentre os alvos moleculares dessa via, a enzima β -cetoacil-ACP sintase III (FabH) desempenha papel central na fisiologia de *Xanthomonas oryzae*. Essa enzima catalisa a etapa inicial da biossíntese de ácidos graxos, sendo essencial para a produção de lipídios estruturais da membrana celular. A inibição da FabH compromete diretamente a síntese lipídica, impedindo a formação adequada da membrana e levando à inviabilidade celular (ZHAO et al., 2020).

A via FAS II inicia-se com a conversão de acetil-CoA em malonil-CoA, seguida de sua transferência para a proteína carreadora de acila (ACP), formando o malonil-ACP. A FabH catalisa a condensação entre uma molécula de acil-CoA e o malonil-ACP, gerando β -cetoacil-ACP e liberando dióxido de carbono, sendo esta a etapa determinante para o início da elongação da cadeia de ácidos graxos (BORAM et al., 2023).

O mecanismo catalítico da FabH envolve uma tríade conservada de aminoácidos (cisteína, histidina e asparagina). Inicialmente, a cisteína atua como nucleófilo, formando um intermediário acil-enzima. Em seguida, o malonil-ACP sofre descarboxilação, gerando um intermediário reativo que ataca o complexo acil-enzima, culminando na formação do β -cetoacil-ACP. Esse produto será posteriormente processado por outras enzimas da via, originando ácidos graxos de cadeia longa (BORAM et al., 2023).

Em *Xanthomonas oryzae*, a FabH apresenta relevância adicional devido à sua participação indireta na produção de moléculas sinalizadoras associadas ao quorum sensing. Estudos demonstram que a enzima está relacionada à biossíntese dos fatores difusíveis (DSF),

moléculas que regulam processos essenciais à patogenicidade bacteriana, como formação de biofilme, motilidade e produção de exopolissacarídeos (YU et al., 2016; WANG et al., 2024).

O sistema de quorum sensing exerce papel fundamental na virulência de *Xanthomonas oryzae*, controlando a expressão de genes envolvidos na infecção do hospedeiro. Dessa forma, a FabH atua não apenas no metabolismo lipídico, mas também como um elo entre a biossíntese de membrana e a regulação da virulência. A inativação dessa enzima resulta em redução significativa da capacidade infecciosa da bactéria (YAN et al., 2023).

Outro aspecto relevante refere-se à seletividade desse alvo. A via FAS II é altamente conservada em bactérias, mas apresenta diferenças estruturais em relação aos sistemas de síntese de ácidos graxos em organismos eucarióticos, o que favorece o desenvolvimento de compostos seletivos e com menor toxicidade (MCNAUGHT et al., 2023).

No controle de *Xanthomonas oryzae*, destacam-se os compostos à base de cobre e o bismertiazol, que apresentam mecanismos de ação distintos. Os compostos cúpricos atuam de forma inespecífica, promovendo danos celulares generalizados por meio da liberação de íons Cu^{2+} , que levam à desorganização da membrana, desnaturação de proteínas e indução de estresse oxidativo (YAN et al., 2023).

Por outro lado, o bismertiazol apresenta um mecanismo de ação mais específico, atuando na inibição da biossíntese de ácidos graxos, possivelmente por interação com enzimas-chave como a FabH. Essa inibição compromete a integridade da membrana celular e interfere na produção de moléculas sinalizadoras associadas ao quorum sensing, resultando na redução da virulência bacteriana (ZHAO et al., 2020).

Dessa forma, enquanto os compostos à base de cobre apresentam ação multissítio e amplo espectro, o bismertiazol atua de maneira mais direcionada, reforçando a importância de alvos moleculares como a FabH no desenvolvimento de novas estratégias de controle de fitopatógenos.

3.5.6 Dinâmica Molecular

A Dinâmica Molecular (DM) é uma técnica de simulação computacional que modela o movimento de átomos e moléculas ao longo do tempo. Essa abordagem é amplamente utilizada em várias áreas da química, física e biologia para entender o comportamento e as propriedades de sistemas moleculares complexos (NAMBA et al., 2008).

O principal objetivo da DM é a simulação da evolução temporal das posições e velocidades de átomos e moléculas em um sistema. Permitindo assim estudar fenômenos como mudanças conformacionais, interações intermoleculares, e propriedades termodinâmicas como: temperatura, pressão efeito do solvente (GELPI et al., 2015) (PALMA; SOTTILE, 2023).

O estudo de DM é baseado na mecânica clássica, ou seja, nas leis fundamentais da física, como as equações de Newton. As posições e velocidades das partículas são calculadas iterativamente, levando em consideração as forças entre elas. No processo de simulação, é necessário o conhecimento das forças entre os átomos, para isso são utilizados os modelos de forças interatômicas, como o potencial de Lennard-Jones e o potencial coulombiano, são os mais comumente usados para descrever as interações entre os átomos (VOLLMAYR-LEE, 2020) (PALMA; SOTTILE, 2023).

Realizar uma simulação de dinâmica molecular envolve vários passos. Aqui está uma visão geral simplificada do processo (NAMBA et al., 2008) (GELPI et al., 2015) (PALMA; SOTTILE, 2023):

1. Preparação do Sistema: Definir o sistema molecular de interesse e atribuir as condições iniciais, como posições e velocidades das partículas.

2. Escolha do Potencial: Esta etapa consiste em escolher o potencial intermolecular que descreva as interações entre as partículas (forças, energias).

3. Integração das Equações de Movimento: Momento no qual é aplicado um algoritmo numérico para integrar as equações de movimento, como o algoritmo de Verlet ou de Leapfrog.

Existem vários algoritmos de integração numérica usados para resolver as equações diferenciais que governam o movimento molecular. O algoritmo de Verlet é comumente utilizado devido à sua precisão e estabilidade (ALLEN, 2004).

4. Condições de Contorno: Estabeleça as condições de contorno, considerando fatores como temperatura constante, pressão constante etc.

As simulações de Dinâmica Molecular geralmente ocorrem em uma caixa periódica para evitar artefatos de borda. Isso significa que as moléculas que saem de um lado da caixa reaparecem no lado oposto (VOLLMAYR-LEE, 2020).

5. Aquecimento (Equilibração): Aqueça o sistema gradualmente para atingir a temperatura desejada. Em seguida realize uma fase de equilibração para permitir que o sistema atinja uma distribuição de energia e posição estáveis.

6. Simulação Principal: Após a fase de equilibrção execute a simulação principal, e registre os dados relevantes, como trajetórias atômicas e propriedades termodinâmicas.

7. Análise de Dados: Analise os resultados da simulação para extrair informações sobre a estrutura e dinâmica do sistema.

8. Visualização: Utilize ferramentas de visualização para examinar a trajetória da simulação e entender a dinâmica molecular.

9. Interpretação: Como última etapa interprete os resultados em termos de propriedades físicas ou químicas do sistema em estudo.

A Dinâmica Molecular tem contribuído significativamente para a compreensão detalhada do comportamento molecular em escalas de tempo e comprimento que são difíceis ou impossíveis de alcançar experimentalmente. É uma ferramenta valiosa para explorar fenômenos complexos em sistemas moleculares (KOBAYASHI et al., 2023).

Lembrando que a dinâmica molecular é computacionalmente intensiva, exigindo recursos significativos de hardware e tempo de processamento. As escolhas específicas de parâmetros e métodos dependem do sistema e das questões de pesquisa (PALMA; SOTTILE, 2023).

4. CONSIDERAÇÕES GERAIS

O presente trabalho consistiu na construção de modelos MIA-QSAR empregando o método de mínimos quadrados parciais, os quais apresentaram desempenho estatístico satisfatório. Adicionalmente, foram desenvolvidos modelos QSAR utilizando máquinas de vetores de suporte aplicadas à regressão (SVR), que também exibiram bons resultados estatísticos, indicando que os dados apresentam certo grau de não linearidade. Foram ainda elaborados gráficos MIA-plots, os quais auxiliaram na interpretação dos fatores estruturais que influenciam a propriedade de interesse. Complementarmente, realizaram-se estudos de ancoramento molecular e dinâmica molecular com o objetivo de elucidar as principais interações envolvidas no reconhecimento molecular, contribuindo, assim, para o desenvolvimento racional de novos agentes bactericidas contra bactérias do gênero *Xanthomonas*, responsáveis por significativos prejuízos à agricultura.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, M. P. Introduction to Molecular Dynamics Simulation. **Computational Soft Matte**, S.L., v. 23, p. 1-28, 2004.
- ALMEIDA, W.de et al. Agrotóxicos. **Cadernos de Saúde Pública**, [S.L.], v. 1, n. 2, p. 220-249, jun. 1985. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-311x1985000200008>.
- ALVES, V. et al. QUIMIOINFORMÁTICA: uma introdução. **Química Nova**, [S.L.], v. 41, n. 2, p. 202-212, 2018. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170145>.
- AN, S. et al. Mechanistic insights into host adaptation, virulence and epidemiology of the phytopathogen *Xanthomonas*. **Fems Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 44, n. 1, p. 1-32, 3 out. 2019. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/femsre/fuz024>.
- ANVISA-AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Publicada **reclassificação toxicológica de agrotóxicos**. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2019/publicada-reclassificacao-toxicologica-de-agrotoxicos>. Acesso em: 22 nov. 2023.
- BARIGYE, S. J. et al. MIA-plot: a graphical tool for viewing descriptor contributions in MIA-QSAR. **RSC Advances**, v. 6, n. 55, p. 49604-49612, 2016. Available at: <http://dx.doi.org/10.1039/C6RA09593C>.
- BARIGYE, S. J.; FREITAS, M. P. Ten Years of the MIA-QSAR Strategy: Historical Development and Applications. *International Journal of Quantitative Structure-Property Relationships*, v. 1, n. 1, p. 64-77, 2016.
- BARREIRO, E. J. de L. et al. Modelagem Molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal. **Química Nova**, [S.L.], v. 20, n. 3, p. 300-310, jun. 1997. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40421997000300011>.
- BARROS NETO, B. de et al. Recomendações para calibração em química analítica: parte i. fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). **Química Nova**, [S.L.], v. 25, n. 5, p. 856-865, set. 2002. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422002000500024>.
- BASTOS, F. A.; PEREIRA, I.V. A temática “agrotóxico” no ensino de química em sala de aula: análise de textos publicados na literatura. **Química Nova na Escola**, [S.L.], v. 42, n. 4, p. 373-381, nov. 2020. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/0104-8899.20160221>.
- BEHLAU, F. An overview of citrus canker in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, [S.L.], v. 46, n. 1, p. 1-12, 24 jun. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s40858-020-00377-2>.

BEHLAU, F. et al. Copper resistance genes from different xanthomonads and citrus epiphytic bacteria confer resistance to *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **European Journal of Plant Pathology**, [S.L.], v. 133, n. 4, p. 949-963, 9 mar. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-012-9966-8>.

BENDER, B.J. et al. A practical guide to large-scale docking. **Nature Protocols**, [S.L.], v. 16, n. 10, p. 4799-4832, 24 set. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41596-021-00597-z>.

BORAM, T.J. et al. Activity of Fatty Acid Biosynthesis Initiating Ketosynthase FabH with Acetyl/Malonyl-oxa/aza(dethia)CoAs. **Acs Chemical Biology**, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 49-58, 10 jan. 2023. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acscchembio.2c00667>.

BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Validação de modelos de calibração multivariada: uma aplicação na determinação de pureza polimórfica de carbamazepina por espectroscopia no infravermelho próximo. **Química Nova**, [S.L.], v. 27, n. 6, p. 1004-1011, dez. 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422004000600027>.

BRASIL. **Lei Nº 7.802 de 11 de julho de 1989**. Brasília, 12 jul. 1989.

CAO, J. et al. Different Cell Wall-Degradation Ability Leads to Tissue-Specificity between *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. **Pathogens**, [S.L.], v. 9, n. 3, p. 178-187, 4 mar. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/pathogens9030187>.

CAPUCHO, L. R. et al. Multivariate image analysis applied to quantitative structure–activity relationships and docking studies of recent hydroxyphenylpyruvate deoxygenase inhibitors. **Journal of The Science of Food and Agriculture**, [S.L.], v. 103, n. 11, p. 5231-5241, 18 abr. 2023. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.12608>.

CARVALHO, D. U.de et al. Late-Season Sweet Orange Selections Under Huanglongbing and Citrus Canker Endemic Conditions in the Brazilian Humid Subtropical Region. **Frontiers In Plant Science**, [S.L.], v. 13, p. 1-19, 31 maio 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2022.915889>.

CAVASOTTO, Claudio N. et al. Computational chemistry in drug lead discovery and design. **International Journal of Quantum Chemistry**, [S.L.], v. 119, n. 2, p. 1-19, 24 set. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/qua.25678>.

CHERKASOV, A. et al. QSAR modeling: Where have you been? Where are you going to? **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 57, n. 12, p. 4977–5010, 2014.

CHIRICO, N.; GRAMATICA, P. Real External Predictivity of QSAR Models: How to Evaluate It? Comparison of Different Validation Criteria and Proposal of Using the Concordance Correlation Coefficient. **Journal of Chemical Information and Modeling**, 51, n. 9, p. 2320-2335, 2011/09/26 2011.

CHIRICO, N.; GRAMATICA, P. Real External Predictivity of QSAR Models. Part 2. New Intercomparable Thresholds for Different Validation Criteria and the Need for Scatter Plot Inspection. **Journal of Chemical Information and Modeling**, 52, n. 8, p. 2044-2058, 2012/08/27 2012.

CRAMER, R.D. et al. Comparative molecular field analysis (CoMFA). 1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins. **Journal of the American Chemical Society**, [S.L.], v. 110, n. 18, p. 5959-5967, ago. 1988. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ja00226a005>.

DARÉ, J. K. et al., Multi-Objective Modeling of Herbicidal Activity from an Environmentally Friendly Perspective. **International Journal of Quantitative Structure Property Relationships**, v. 2, n. 2, p. 16–26, 2017.

DARÉ, J. K. et al. Conformational fingerprints in the modelling performance of MIA-QSAR: a case for SARS-CoV protease inhibitors. **Molecular Simulation**, [S.L.], v. 46, n. 14, p. 1055-1061, 4 ago. 2020. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/08927022.2020.1800691>.

DARÉ, J.K. et al. 3D perspective into MIA-QSAR: a case for anti :hcv agents. **Chemical Biology & Drug Design**, [S.L.], v. 93, n. 6, p. 1096-1104, 25 nov. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/cbdd.13440>.

DARÉ, J.K.; FREITAS, M.P. Different approaches to encode and model 3D information in a MIA-QSAR perspective. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, [S.L.], v. 212, p. 104286, maio 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemolab.2021.104286>.

DARÉ, J.K.; FREITAS, M. P. Is conformation relevant for QSAR purposes? 2D Chemical representation in a 3D-QSAR perspective. **Journal of Computational Chemistry**, [S.L.], v. 43, n. 13, p. 917-922, 22 mar. 2022. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.26848>.

DAMALE, M. et al. Recent Advances in Multidimensional QSAR (4D-6D): A Critical Review. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 14, n. 1, p. 35–55, 2014.

DE, P. et al. Prediction reliability of QSAR models: an overview of various validation tools. **Archives of Toxicology**, [S.L.], v. 96, n. 5, p. 1279-1295, 10 mar. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-022-03252-y>

DEARDEN, J. C. The History and Development of Quantitative Structure-Activity Relationships (QSARs). **International Journal of Quantitative Structure-Property Relationships**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 1-44, 1 Jan. 2016. IGI Global. <http://dx.doi.org/10.4018/ijqspr.2016010101>.

DU, X. et al. Insights into Protein–Ligand Interactions: mechanisms, models, and methods. **International Journal of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 17, n. 2, p. 144-178, 26 Jan. 2016. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms17020144>.

EMBRAPA, 2007, Bahia. **Tendência da citricultura brasileira e mundial**. Cruz das Almas, Ba: Artigo em Anais e Proceedings, 2007.

FENG, Y. et al. Research on Diffusible Signal Factor-Mediated Quorum Sensing in *Xanthomonas*: a mini-review. **Molecules**, [S.L.], v. 28, n. 2, p. 876, 15 jan. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules28020876>.

FERREIRA, D. H. et al. Copper rate and spray interval for joint management of citrus canker and citrus black spot in orange orchards. **European Journal of Plant Pathology**, [S.L.], v. 163, n. 4, p. 891-906, 28 Maio 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-022-02527-5>.

FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria: conceitos, métodos e aplicações**. Campinas, Sp: Editora da Unicamp, 2015. 496 p.

FRANCISCO, A.; FONTANETTI, C. S. Diplopods and Agrochemicals—a Review. **Water, Air, & Soil Pollution**, [S.L.], v. 226, n. 3, p. 1-12, 24 fev. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11270-015-2346-1>.

FREE, S. M. J.; WILSON, J. W. A Mathematical Contribution to Structure-Activity Studies. *Journal of Medicinal Chemistry*, Washington, v. 7, n. 4, p. 395–399, 1964.

FREITAS, M. et al MIA-QSAR: A simple 2D image-based approach for quantitative structure-activity relationship analysis. *Journal of Molecular Structure*, v. 738, p. 149-154, 2005.

FUJITA, T.; WINKLER, D. A. Understanding the Roles of the “Two QSARs”. **Journal Of Chemical Information and Modeling**, [S.L.], v. 56, n. 2, p. 269-274, 20 jan. 2016. American Chemical Society (ACS).

GELPI, J. et al. Molecular dynamics simulations: advances and applications. **Advances And Applications in Bioinformatics and Chemistry**, [S.L.], p. 37, nov. 2015. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.2147/aabc.s70333>.

GRAHAM, J. H. et al. Importance of Early Season Copper Sprays for Protection of Hamlin Orange Fruit Against Citrus Canker Infection and Premature Fruit Drop. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Florida, n. 129, p. 74-78, 2016.

GRAMATICA, P. Principles of QSAR Modeling. **International Journal of Quantitative Structure-Property Relationships**, [S.L.], v. 5, n. 3, p. 61-97, 1 jul. 2020. IGI Global. <http://dx.doi.org/10.4018/ijqspr.20200701.oa1>.

GRAMATICA, P. Principles of QSAR models validation: internal and external. **QSAR & Combinatorial Science**, Weinheim, v. 26, n. 5, p. 694–701, 2007.

GUHA, T. et al. Nanocomposites for Delivering Agrochemicals: a comprehensive review. **Journal Of Agricultural and Food Chemistry**, [S.L.], v. 68, n. 12, p. 3691-3702, 4 mar. 2020. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.9b06982>.

GURYANOV, I. et al. Receptor-ligand interactions: advanced biomedical applications. **Materials Science and Engineering: C**, [S.L.], v. 68, p. 890-903, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.07.072>.

HANSCH, C.; FUJITA, T. ρ - σ - π Analysis. A Method for the Correlation of Biological Activity and Chemical Structure. **Journal of American Chemical Society**, Washington, v. 86, p. 1616–1626, 1964.

HOPFINGER, A. J. et al. Construction of 3D-QSAR Models Using the 4D-QSAR Analysis Formalism. **Journal of American Chemical Society**, Washington, v. 119, n. 43, p. 10509–10524, 1997.

HSU, H. et al. An integrated approach with new strategies for QSAR models and lead optimization. **Bmc Genomics**, [S.L.], v. 18, n. 2, p. 1-9, mar. 2017. Springer Science and Business Media LLC.

IBAMA. **Avaliação ambiental para registro de agrotóxicos, seus componentes e afins de uso agrícola**. Disponível em: <https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/avaliacao-ambiental>. Acesso em: 22 nov. 2023.

IBAMA- Instituto brasileiro do meio ambiente e dos recursos naturais renováveis. Portaria **84/1996**. 1996. Disponível em: <https://www.ibama.gov.br/sophia/cnia/legislacao/IBAMA/PT0084-151096.pdf>. Acesso em: 22 nov. 2023.

JACQUES, M. et al. Using Ecology, Physiology, and Genomics to Understand Host Specificity in *Xanthomonas*. **Annual Review of Phytopathology**, [S.L.], v. 54, n. 1, p. 163-187, 4 ago. 2016. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-100147>.

JIANG, N. et al. Resistance Genes and their Interactions with Bacterial Blight/Leaf Streak Pathogens (*Xanthomonas oryzae*) in Rice (*Oryza sativa* L.)—an Updated Review. **Rice**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 1-12, 8 jan. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12284-019-0358-y>.

KE, Y. et al. Hd3a and OsFD1 negatively regulate rice resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [S.L.], v. 513, n. 4, p. 775-780, jun. 2019. Elsevier BV.

KENNARD, R. W.; STONE, L. A. Computer aided design of experiments. **Technometrics**, v. 11, n. 1, p. 137-148, 1969.

KIRALJ, R.; FERREIRA, M. M. C. Basic Validation Procedures for Regression Models in QSAR and QSPR Studies: Theory and Application. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 20, n. 4, p. 770–787, 2009.

KLEBE, G. et al. Molecular Similarity Indices in a Comparative Analysis (CoMSIA) of Drug Molecules to Correlate and Predict Their Biological Activity. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 37, n. 24, p. 4130-4146, nov. 1994. American Chemical Society (ACS).

<http://dx.doi.org/10.1021/jm00050a010>.

KOBAYASHI, K. et al. Machine learning molecular dynamics reveals the structural origin of the first sharp diffraction peak in high-density silica glasses. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 1-12, 16 nov. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-023-44732-0>.

KOUADRI, S. et al. Prediction of irrigation groundwater quality parameters using ANN, LSTM, and MLR models. **Environmental Science and Pollution Research**, [S.L.], v. 29, n. 14, p. 21067-21091, 8 nov. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-021-17084-3>.

LE, J. **Support Vector Machines in R**. 2018. Disponível em: <https://www.datacamp.com/tutorial/support-vector-machines-r>. Acesso em: 27 dez. 2023. LEDUC, A. et al. Bridgehead invasion of a monomorphic plant pathogenic bacterium: *Xanthomonas citri* pv. *citri*, an emerging citrus pathogen in mali and burkina faso. **Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 17, n. 11, p. 4429-4442, 9 jun. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1462-2920.12876>.

LEELANANDA, S. P; LINDERT, S. Computational methods in drug discovery. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, [S.L.], v. 12, p. 2694-2718, 12 dez. 2016. Beilstein Institut. <http://dx.doi.org/10.3762/bjoc.12.267>.

LICONA, J. S.F. et al. In silico-guided proposition of potential nematocidal and antibacterial N-(1,3,4-thiadiazol-2-yl) benzamides. **Journal of Natural Pesticide Research**, [S.L.], v. 1, p. 100003, jun. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.napere.2022.100003>.

LI, W. et al. Characterization of *Xanthomonas citri* pv. *citri* from China based on spoligotyping. **Horticultural Plant Journal**, [S.L.], v. 8, n. 6, p. 727-736, nov. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.hpj.2022.02.003>.

LIU, H. et al. Antibacterial Functions and Proposed Modes of Action of Novel 1,2,3,4-Tetrahydro- β -carboline Derivatives that Possess an Attractive 1,3-Diaminopropan-2-ol Pattern against Rice Bacterial Blight, Kiwifruit Bacterial Canker, and Citrus Bacterial Canker. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S.L.], v. 68, n. 45, p. 12558-12568, 3 Nov. 2020. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.0c02528>.

LIU, K. et al. Antagonism of black rot in cabbage by mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). **Biocontrol**, [S.L.], v. 61, n. 5, p. 605-613, 25 Maio 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10526-016-9742-3>.

MARIN, T. G. S. et al. Description of copper tolerant *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and genotypic comparison with sensitive and resistant strains. **Plant Pathology**, [S.L.], v. 68, n. 6, p. 1088-1098, 17 abr. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/ppa.13026>.

MARIN, V. R. et al. Recent advances in the biocontrol of *Xanthomonas* spp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S.L.], v. 35, n. 5, p. 1-11, 22 abr. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-019-2646-5>.

MCNAUGHT, K. J. et al. Initiation of fatty acid biosynthesis in *Pseudomonas putida* KT2440. **Metabolic Engineering**, [S.L.], v. 76, p. 193-203, mar. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2023.02.006>.

MENDES, C. R. A. et al. AGROTÓXICOS: principais classificações utilizadas na agricultura brasileira - uma revisão de literatura. **Revista Maestria**, S.L., v. 17, n. 17, p. 95-107, 2019.

MITRA, I. et al. Exploring quantitative structure–activity relationship studies of antioxidant phenolic compounds obtained from traditional Chinese medicinal plants. **Molecular Simulation**, v. 36, n. 13, p. 1067-1079, 2010.

MOREIRA, R. R. et al. Impact of diseases and pests on premature fruit drop in sweet orange orchards in São Paulo state citrus belt, Brazil. **Pest Management Science**, [S.L.], v. 78, n. 6, p. 2643-2656, 18 abr. 2022. Wiley.

MURATOV, E. N. et al. QSAR without borders. **Chemical Society Reviews**, [S.L.], v. 49, n. 11, p. 3525-3564, 2020. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/d0cs00098a>.

NAMBA, A. M. et al. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármaco. **Eclética: Química**, Ribeirão Preto, SP, v. 33, n. 4, p. 13-24, 2008.

NI, Y. et al. ATP-Dependent Protease ClpP and Its Subunits ClpA, ClpB, and ClpX Involved in the Field Bismertiazol Resistance in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Phytopathology®**, [S.L.], v. 111, n. 11, p. 2030-2040, nov. 2021. Scientific Societies. <http://dx.doi.org/10.1094/phyto-01-21-0011-r>.

NIÑO-LIU, D. et al. *Xanthomonas oryzae* pathovars: model pathogens of a model crop. **Molecular Plant Pathology**, [S.L.], v. 7, n. 5, p. 303-324, 31 ago. 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1364-3703.2006.00344.x>.

NUNES, C. A.; FREITAS, M. P. Introducing new dimensions in MIA-QSAR: A case for chemokine receptor inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 62, p. 297– 300, 2013.

PALMA, J.; SOTTILE, G. P. Dinâmica Molecular de Biomoléculas. **Divulgatio. Perfis Acadêmicos de Posgrado**, [S.L.], v. 7, n. 20, p. 63-99, 31 maio 2023. Universidad Nacional de Quilmes. <http://dx.doi.org/10.48160/25913530di20.292>.

PARANÁ, J.C. C. -. **INTOXICAÇÕES AGUDAS POR AGROTÓXICOS ATENDIMENTO INICIAL DO PACIENTE INTOXICADO**. S.L: Secretário de Saúde do Estado do Parana, 2018.

PEITL, D. C. et al. Biological control of bacterial spot of tomato by saprobe fungi from semi-arid areas of northeastern Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, [S.L.], v. 38, n. 3, p. 1251-1264, 13 jun. 2017. Universidade Estadual de Londrina. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2017v38n3p1251>.

PEREIRA, I. V. et al. MIA-QSAR study of the structural merging of (thio)benzamide herbicides with photosynthetic system II inhibitory activities. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, [S.L.], v. 41, n. 9, p. 3772-3778, 28 mar. 2022. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/07391102.2022.2055649>.

PÉREZ-LUCAS, G. et al. Comprehensive Review on Monitoring, Behavior, and Impact of Pesticide Residues during Beer-Making. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S.L.], v. 71, n. 4, p. 1820-1836, 18 jan. 2023. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.2c07830>.

PERNEZNY, K. et al. CHAPTER 11: management of important bacterial diseases. **Tomato Health Management**, [S.L.], p. 103-112, 2 ago. 2017. The American Phytopathological Society. <http://dx.doi.org/10.1094/9780890544884.011>.

PIERRE, Ketsira et al. Effectiveness of Hexanoic Acid for the Management of Bacterial Spot on Tomato Caused by *Xanthomonas perforans*. **Agriculture**, [S.L.], v. 15, n. 7, p. 695, 25 mar. 2025. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/agriculture15070695>.

POLANSKI, J. Receptor Dependent Multidimensional QSAR for Modeling Drug - Receptor Interactions. *Current Medicinal Chemistry*, Sharjah, v. 16, n. 25, p. 3243–3257, 2009.

POULIN, L. et al. New Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis Tool for Surveillance and Local Epidemiology of Bacterial Leaf Blight and Bacterial Leaf Streak of Rice Caused by *Xanthomonas oryzae*. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 81, n. 2, p. 688-698, 15 Jan. 2015. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.02768-14>.

PRASANNA, G.L. et al. Colonial and morphological variability among the isolates of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* Causing acid lime canker. **The Pharma Innovation Journal**, Andhra Pradesh, India, v. 6, n. 12, p. 101-105, 8 abr. 2023.

REYNOL, F. **Brasil se prepara para uma das mais temidas doenças do arroz**. 2017. Disponível em: <https://www.embrapa.br/xxi-ciencia-para-a-vida/busca-de-noticias/-/noticia/24103448/brasil-se-prepara-para-uma-das-mais-temidas-doencas-do-arroz>. Acesso em: 11 dez. 2023.

RODRIGUES, N. E. et al. QSAR-Guided Proposition of N-(4-methanesulfonyl) Benzoyl-N'-(Pyrimidin-2-yl) Thioureas as Effective and Safer Herbicides. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, [S.L.], v. 108, n. 6, p. 1019-1025, 25 Jan. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00128-022-03467-w>.

ROY, K. et al. Comparative Studies on Some Metrics for External Validation of QSPR Models. *Journal of Chemical Information and Modeling*, [S.L.], v. 52, n. 2, p. 396-408, 17 jan. 2012. American Chemical Society (ACS).

ROY, K. et al. On a simple approach for determining applicability domain of QSAR models. *Chemometrics And Intelligent Laboratory Systems*, [S.L.], v. 145, p. 22-29, jul. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemolab.2015.04.013>.

ROY, Kunal et al. On Various Metrics Used for Validation of Predictive QSAR Models with Applications in Virtual Screening and Focused Library Design. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, [S.L.], v. 14, n. 6, p. 450-474, 1 jul. 2011. Bentham Science Publishers Ltd. <http://dx.doi.org/10.2174/138620711795767893>.

ROY, K. et al. Some case studies on application of —rm 2 || metrics for judging quality of quantitative structure-activity relationship predictions: emphasis on scaling of response data. *Journal of Computational Chemistry*, v. 34, n. 12, p. 1071-1082, 2013.

RYAN, R. P. et al. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. **Nature Reviews Microbiology**, [S.L.], v. 9, n. 5, p. 344-355, 11 abr. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2558>.

SANTOS, A. B. dos. **Cultivo de arroz: sistema de cultivo**. Sistema de cultivo. 2021. Embrapa. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/arroz/producao/sistema-de-cultivo>. Acesso em: 08 dez. 2023.

SHARMA, A. et al. *Xanthomonas*. **Encyclopedia Of Food Microbiology**, [S.L.], p. 811-817, jan. 2014. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-384730-0.00359-1>.

SHAYANFAR, S.; SHAYANFAR, A. Comparison of various methods for validity evaluation of QSAR models. **Bmc Chemistry**, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 1-9, 23 ago. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13065-022-00856-4>.

SHI, Y. Support vector regression-based QSAR models for prediction of antioxidant activity of phenolic compounds. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 1-9, 22 abr. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-021-88341-1>.

SILVA, O. da; WANDER, A. E. **Cultivo do arroz: estatística de produção**. Estatística de produção. 2023. Embrapa. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/arroz/pre-producao/socioeconomia/estatistica-de-producao>. Acesso em: 08 dez. 2023a.

SILVA, O. F. da; WANDER, A. E. **Cultivo do arroz: importância econômica e social**. Importância econômica e social. 2023. Embrapa. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/arroz/pre-producao/socioeconomia/importancia-economica-e-social>. Acesso em: 08 dez. 2023.b

STARR, M. P.; STEPHENS, W. L. Pigmentation and taxonomy of the genus *Xanthomonas*. *Journal of Bacteriology*, v. 87, p. 293-302, 1964.

TODESCHINI, R. et al. 4.25 - Chemometrics for QSAR Modeling. In: BROWN, S. D.; TAULER, R., et al (Ed.). *Comprehensive Chemometrics (Second Edition)*. Oxford: Elsevier, 2020. p. 599-634.

TRAFALIS, T. B.; INCE, H. Support vector machine for regression and applications to financial forecasting. *Proceedings of the IEEE-INNS-ENNS International Joint Conference on Neural Networks*, v. 6, p. 348–353, 2000.

TROPSHA, A. Best Practices for QSAR Model Development, Validation, and Exploitation. *Molecular Informatics*, Weinheim, v. 29, n. 6-7, p. 476–488, 2010.

VAPNIK, V.N. An overview of statistical learning theory. **Ieee Transactions on Neural Networks**, [S.L.], v. 10, n. 5, p. 988-999, 1999. Institute of Electrical and Electronics Engineers (IEEE). <http://dx.doi.org/10.1109/72.788640>.

VAPNIK, V.N; CHERVONENKIS, A, *Theory of Pattern Recognition*. Nauka, Moscow, 1974.

VAUTERIN, L. et al. Reclassification of Xanthomonas. **International Journal of Systematic Bacteriology**, [S.L.], v. 45, n. 3, p. 472-489, 1 jul. 1995. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-45-3-472>.

VEDANI, A.; DOBLER, M. 5D-QSAR: the key for simulating induced fit?. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 45, n. 11, p. 2139-2149, 18 abr. 2002. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jm011005p>.

VEDANI, A. et al. Combining Protein Modeling and 6D-QSAR. Simulating the Binding of Structurally Diverse Ligands to the Estrogen Receptor. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 48, n. 11, p. 3700-3703, 3 maio 2005. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jm050185q>.

VERLI, H. **Bioinformática da Biologia à Flexibilidade Molecular**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014. 282 p.

VOLLMAYR-LEE, K. Introduction to molecular dynamics simulations. **Arxiv**, [S.L.], p. 1-25, 2020. ArXiv. <http://dx.doi.org/10.48550/ARXIV.2001.07089>.

WANG, Z. et al. Exploring Fatty Acid β -Oxidation Pathways in Bacteria: from general mechanisms to dsf signaling and pathogenicity in xanthomonas. **Current Microbiology**, [S.L.], v. 81, n. 10, p. 1-12, 2 set. 2024. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-024-03866-8>.

WILMS, W. et al. Herbicidal Ionic Liquids: a promising future for old herbicides? review on synthesis, toxicity, biodegradation, and efficacy studies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S.L.], v. 68, n. 39, p. 10456-10488, 12 ago. 2020. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.0c02894>.

YAN, M. et al. 3-Ketoacyl-ACP synthase III FabH1 is essential for branched-chain DSF family signals in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Phytopathology Research**, [S.L.], v. 5, n.

1, 13 jun. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s42483-023-00180-2>.

YU, Y.-H. et al. Xanthomonas campestris FabH is required for branched-chain fatty acid and DSF-family quorum sensing signal biosynthesis. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 6, n. 1, 6 set. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep32811>.

YOUSEFINEJAD, S.; HEMMATEENEJAD, B. Chemometrics tools in QSAR/QSPR studies: A historical perspective. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 149, p. 177–204, 2015.

ZHANG, Y. et al. The screening of bismertiazol-resistant genes in Xanthomonas oryzae pv. oryzae. **Australasian Plant Pathology**, [S.L.], v. 44, n. 5, p. 541-543, 28 ago. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13313-015-0370-7>.

ZHANG, F. et al. Time series forecasting for building energy consumption using weighted support vector regression with differential evolution optimization technique. *Energy and Buildings*, v. 126, p. 94–103, 2016.

ZHAO, S. et al. Discovery of Natural FabH Inhibitors Using an Immobilized Enzyme Column and Their Antibacterial Activity against Xanthomonas oryzae pv. oryzae. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S.L.], v. 68, n. 48, p. 14204-14211, 17 nov. 2020. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.0c06363>.

ZHU, M. et al. Antibacterial Activity of Allicin-Inspired Disulfide Derivatives against Xanthomonas axonopodis pv. citri. **International Journal of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 23, n. 19, p. 11947, 8 out. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms231911947>.

ZHU, X. et al. Detection and characterization of bismertiazol-resistance of Xanthomonas oryzae pv. oryzae. **Crop Protection**, [S.L.], v. 47, p. 24-29, maio 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2012.12.026>.

PARTE 2

Esta segunda parte consta os dois artigos publicados.

Artigo 1: Exploring the antibacterial potential of 1,3,4-oxadiazoles against *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in citrus species through molecular modeling.

O artigo 1 foi publicado em 20 de dezembro de 2024 em *Journal of Plant Pathology* volume 107, páginas 873 – 882. (<https://doi.org/10.1007/s42161-024-01823-9>).

Artigo 2: QSAR and machine learning-driven proposition of novel 1,3,4-oxadiazoles and structure-based studies of their antibacterial activities against *Xanthomonas oryzae*.

O artigo 2 foi publicado em 10 de fevereiro de 2025 em *Theoretical Chemistry Accounts*, volume 144, número 19. (<https://doi.org/10.1007/s00214-025-03174-9>).

1 ARTIGO 1 - Exploring the Antibacterial Potential of 1,3,4-Oxadiazoles Against *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in Citrus Species Through Molecular Modeling, *J. Plant Pathol.*, 107, 2025, 873-882.

Exploring the Antibacterial Potential of 1,3,4-Oxadiazoles Against *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in Citrus Species Through Molecular Modeling

Ingrid V. Pereira de Faria,^a Elaine F. F. da Cunha,^a Matheus P. Freitas^{a,*}

^a *Department of Chemistry, Institute of Natural Sciences, Federal University of Lavras, 37200-900, Lavras, MG, Brazil*

* Corresponding author: matheus@ufla.br (ORCID: [0000-0002-7492-1801](https://orcid.org/0000-0002-7492-1801))

Abstract

Xanthomonas axonopodis pv. *citri* (*Xac*) poses a significant threat to key crops like citrus, leading to substantial economic losses in agriculture. Current strategies for combating this bacterium involve using agrochemical molecules containing the 1,3,4-oxadiazole moiety. In this study, we present a quantitative structure-activity relationship (QSAR) analysis of three series of 1,3,4-oxadiazole derivatives, consolidated into a unified dataset to construct a predictive model for assessing the antibacterial efficacy of novel analogs. Leveraging multivariate image analysis (MIA) molecular descriptors based on atomic electronegativity, our model exhibited strong performance metrics ($r^2 = 0.88$, $q^2 = 0.82$, and $r^2_{\text{pred}} = 0.91$). Consequently, the partial least squares (PLS) regression coefficients were utilized to predict the pEC₅₀ values for previously uncharacterized 1,3,4-oxadiazoles. Our findings highlight the potential advantages of certain fluorinated derivatives, prompting the development of a synthetic pathway to produce them. Docking studies were conducted on three enzymes—enoyl-acyl carrier reductase (FabV), superoxide dismutase (SOD), and glutathione transferase (GST)—to elucidate the probable inhibition mechanism of 1,3,4-oxadiazoles, given the absence of a reported biological target for these compounds. Among these enzymes, FabV emerged as particularly promising, with fluorinated candidates exhibiting enhanced affinity towards FabV compared to bismertiazol.

Keywords: 1,3,4-Oxadiazoles; Antibacterials; Docking; MIA-QSAR; Organofluorines

Introduction

Citrus canker, caused by the bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), poses a threat to various citrus species, including lime, orange, and grapefruit, affecting leaves, stems, and fruits. The bacteria infiltrate leaves through stomata or wounds induced by weather or insect damage (Gottwald, 2000). Major symptoms include defoliation, shoot dieback, and fruit drop, resulting in significant costs for control measures and yield losses (Hu et al., 2014). Management strategies encompass pruning and incinerating infected twigs, cultivating canker-resistant varieties, and employing biological or chemical control methods (Islam et al., 2019).

Among chemical management approaches, the development of 1,3,4-oxadiazole derivatives (see Figure 1) as antibacterial agents has proven effective in inhibiting *Xac* growth, with certain molecules outperforming commercial antibacterial agents like bismertiazol and thiadiazole-copper (Wang et al., 2016, 2017a, 2018). Structure-activity analyses have revealed that electronegative groups attached to the 1,3,4-oxadiazole ring, rather than bulky ones, enhance antibacterial activity (Wang et al., 2018). However, such analyses have been limited to a small subset of quinazoline-substituted 1,3,4-oxadiazoles, while a comprehensive study involving all three series of 1,3,4-oxadiazoles reported elsewhere (Wang et al., 2016, 2017a, 2018) would offer deeper insights into substituent effects on bioactivity. Consequently, this could lead to the design and proposal of novel compounds with enhanced features.

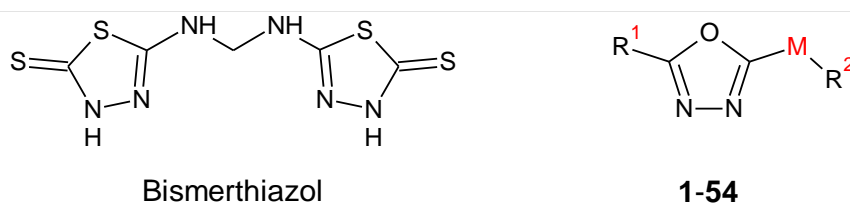


Fig. 1 Chemical structures of bismertiazol and 1,3,4-oxadiazoles studied herein.

There is limited understanding regarding the mechanism behind inhibiting *Xac* growth. However, research indicates that bismertiazol, a commercial inhibitor of *Xac* growth, reduces the virulence of *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* (*Xoo*) by targeting the histidine utilization (*Hut*) pathway and quorum sensing (QS). The *HutG*, *HutH*, *HutI*, and *HutU* genes control the synthesis of enzymes responsible for degrading histidine to glutamate in the *Hut* pathway of *Xoo* (Liang et al., 2017). Additionally, ferredoxin-NADP(H) reductase (FNR, EC 1.18.1.2) is crucial for *Xac* survival, contributing to the bacterial response to oxidative stress conditions typically encountered during plant colonization (Martinez-Júlvez et al., 2018). Consequently, inhibiting *Xac*FNR (PDB code: 4B4D) could impact antibacterial activity, warranting evaluation as an enzyme target for 1,3,4-oxadiazoles.

Moreover, bacterial death is associated with cell membrane disruption (Xia et al., 2019; Liu et al., 2021), prompting investigation into pivotal outer membrane lipoproteins from *Xac*, such as enoyl-acyl carrier reductase (ENR) (Vanini et al., 2009). ENR (EC 1.3.1.9) is a key enzyme in the type II fatty acid synthesis (FAS-II) system, crucial for bacterial viability (Hirschbeck et al., 2012). Notably, four ENR isoenzymes are known: FabI, FabL, FabV, and FabK, with FabV catalyzing the final step of the FAS-II pathway. The predicted structure of *Xanthomonas axonopodis* enoyl-acyl carrier reductase (*Xac*FabV) can be obtained from UniprotKB (Code: AF-Q8PR25-F1).

Furthermore, other potential enzyme targets include superoxide dismutase (SOD) and glutathione transferase (GST) (Cabrejos et al., 2019; Hilario et al., 2020). SOD (EC 1.15.1.1) is involved in the oxidative stress response, while GST (EC 2.5.1.18) plays a vital role in cellular detoxification.

Considering that electronegative substituents at the 1,3,4-oxadiazole scaffold enhance bioactivity and fluorine is prevalent in agrochemicals worldwide (Ogawa et al., 2020), the

development of organofluorine antibacterials holds promise. C-F bonds are polar and stable, facilitating ligand-enzyme interactions (Theodoridis, 2006; Fujiwara & O'Hagan, 2014). Additionally, replacing chlorine with fluorine in agrochemicals can be eco-friendly and enhance pesticidal activity (Martins et al., 2020).

Quantitative structure-activity relationship (QSAR) modeling, coupled with molecular docking studies, can elucidate the antibacterial activities of 1,3,4-oxadiazoles, particularly fluorinated ones. Herein, we present multivariate image analysis applied to QSAR (MIA-QSAR) to model the antibacterial activities of three sets of 1,3,4-oxadiazoles against *Xac*. Docking studies explore ligand-enzyme interactions in the aforementioned enzymes to decipher their biological behavior. With available regression parameters, the pEC₅₀ of unknown compounds can be predicted, facilitating the proposal of a synthetic route for the most promising candidates.

Materials and Methods

In MIA-QSAR modeling, molecular descriptors are derived from RGB (red-green-blue) pixels of chemical images representing molecular structures aligned by the congruent scaffold—the 1,3,4-oxadiazole moiety. Molecular structures corresponding to 54 synthesized and assayed 1,3,4-oxadiazole compounds (Table 1) were categorized into 13 thioether/sulfoxide/sulfone derivatives (Wang et al., 2016), 17 pyridinium-functionalized derivatives (Wang et al., 2017a), and 24 quinazoline derivatives (Wang et al., 2018). The inhibition concentrations (EC₅₀) for *Xac* growth were uniformly measured across all studies, enabling the use of pEC₅₀ values as the y-block in partial least squares (PLS) regression for MIA-QSAR modeling.

For generating MIA descriptors, each molecule was depicted as a ball-and-stick diagram of 300×354 pixels using GaussView software (Dennington et al., 2008). Atom representations were scaled based on van der Waals radii and colored according to default program settings. RGB pixel values (ranging from zero for black to 765 for white) were substituted with van der Waals radii (r_{vdW}), Pauling's electronegativity (ϵ), and the r_{vdW}/ϵ ratio for each atom, providing insights into steric and electrostatic effects. The ϵ model was prioritized due to superior performance. The resulting 300×354 data for each molecule were flattened into a row vector of dimensions $1 \times 106,200$, then grouped to form an **X**-matrix of dimensions $54 \times 106,200$. This matrix was divided into training (75%) and test (25%) sets using Kennard-Stone sampling (Kennard & Stone, 1969), with the former utilized for calibration and internal validation, and the latter for external validation.

Evaluation of model quality relied on root mean square errors (RMSE), determination coefficients for calibration (r^2) (Benfenati, 2012), leave-one-out cross-validation (q^2) (Consonni et al., 2009), external validation (r^2_{pred}) (Tropsha, 2010), and *y*-randomization (r^2_{y-rand}) (Mitra et al., 2010), along with other parameters confirming congruence between predicted and experimental values (r^2_m , Δr^2_m , and CCC) (Chirico & Gramatica, 2011; Roy et al., 2013), and chance correlation (r^2_p) (Mitra et al. 2010). Model stability was assessed via bootstrapping, randomly dividing the dataset ten times into training and test sets to obtain statistical parameters in each iteration (Kiralj & Ferreira, 2009).

Substituent effects were analyzed using MIA plots of variable importance in projection (VIP) scores, indicating the influence magnitude of each substituent on pEC₅₀ data, and PLS regression coefficients (**b**), revealing whether substituents positively or negatively affected pEC₅₀ values (Barigye et al., 2016). These calculations were performed using the Chemoface program (Nunes et al., 2012).

Table 1. 1,3,4-Oxadiadiazole derivatives studied herein (Figure 1) and the respective experimental pEC₅₀ data (EC₅₀ in mol L⁻¹).

Compound	R ¹	M	R ²	pEC ₅₀
1	Ph	S	Quinazoline	3.69
2	3,4,5-tri-OMePh	S	Quinazoline	3.96
3	4-ClPh	S	Quinazoline	3.64
4	4-NO ₂ Ph	S	Quinazoline	4.28
5	2-MePhCH ₂	S	Quinazoline	4.11
6	4-ClPhCH ₂	S	Quinazoline	4.23
7	4-FPhCH ₂	S	Quinazoline	4.18
8	4-ClPhOCH ₂	S	Quinazoline	4.11
9	PhOCH ₂	S	Quinazoline	4.18
10	Ph	S	6-Cl-Quinazoline	3.64
11	3,4,5-tri-OMePh	S	6-Cl-Quinazoline	4.03
12	4-ClPh	S	6-Cl-Quinazoline	3.61
13	2-MePhCH ₂	S	6-Cl-Quinazoline	4.35
14	4-ClPhCH ₂	S	6-Cl-Quinazoline	4.42
15	4-FPhCH ₂	S	6-Cl-Quinazoline	4.41
16	4-ClPhOCH ₂	S	6-Cl-Quinazoline	4.38
17	4-FPhOCH ₂	S	6-Cl-Quinazoline	4.27
18	PhOCH ₂	S	6-Cl-Quinazoline	4.23
19	Ph	S	8-Me-Quinazoline	3.60
20	4-ClPh	S	8-Me-Quinazoline	3.64
21	4-FPhCH ₂	S	8-Me-Quinazoline	4.11
22	4-ClPhCH ₂	S	8-Me-Quinazoline	4.12
23	4-FPhOCH ₂	S	8-Me-Quinazoline	4.15
24	4-ClPhOCH ₂	S	8-Me-Quinazoline	4.00
25	2,4-diClPh	S	C ₄ H ₈ Pyr	4.74
26	2,4-diClPh	S	C ₆ H ₁₂ Pyr	5.04
27	2,4-diClPh	S	C ₈ H ₁₆ Pyr	5.24
28	2,4-diClPh	S	C ₁₀ H ₂₀ Pyr	5.37
29	2,4-diClPh	S	C ₁₂ H ₂₄ Pyr	5.48
30	2,4-diClPh	SO	C ₈ H ₁₆ Pyr	4.35
31	2,4-diClPh	SO	C ₁₀ H ₂₀ Pyr	5.00
32	2,4-diClPh	SO	C ₁₂ H ₂₄ Pyr	5.49
33	2,4-diClPh	SO ₂	C ₄ H ₈ Pyr	3.98
34	2,4-diClPh	SO ₂	C ₆ H ₁₂ Pyr	4.10

35	2,4-diClPh	SO ₂	C ₈ H ₁₆ Pyr	4.35
36	2,4-diClPh	SO ₂	C ₁₀ H ₂₀ Pyr	4.78
37	2,4-diClPh	SO ₂	C ₁₂ H ₂₄ Pyr	5.31
38	Ph	S	C ₈ H ₁₆ Pyr	4.57
39	Ph	S	C ₁₀ H ₂₀ Pyr	5.12
40	Ph	S	C ₁₂ H ₂₄ Pyr	5.52
41	4-FPh	S	C ₈ H ₁₆ Pyr	4.66
42	4-FPh	S	C ₁₀ H ₂₀ Pyr	5.23
43	4-FPh	S	C ₁₂ H ₂₄ Pyr	5.77
44	4-CH ₃ Ph	S	C ₈ H ₁₆ Pyr	4.91
45	4-CH ₃ Ph	S	C ₁₀ H ₂₀ Pyr	5.33
46	4-CH ₃ Ph	S	C ₁₂ H ₂₄ Pyr	6.20
47	3-ClPh	S	C ₈ H ₁₆ Pyr	5.02
48	3-ClPh	S	C ₁₀ H ₂₀ Pyr	5.56
49	3-ClPh	S	C ₁₂ H ₂₄ Pyr	6.06
50	2-ClPh	S	C ₈ H ₁₆ Pyr	5.11
51	2-ClPh	S	C ₁₀ H ₂₀ Pyr	5.44
52	3-NO ₂ Ph	S	C ₈ H ₁₆ Pyr	4.76
53	3-NO ₂ Ph	S	C ₁₀ H ₂₀ Pyr	5.10
54	3-NO ₂ Ph	S	C ₁₂ H ₂₄ Pyr	5.83
Bismerthiazol				3.84

The investigation of the binding mode of the 1,3,4-oxadiazoles using molecular docking techniques involved several steps:

1. Ligand Preparation: The ligands were prepared and optimized using BIOVIA Discovery Studio, employing AMBER force field (GAFF) parameters and AM1-BCC charges.
2. Receptor Structure Acquisition: Three-dimensional structures of the receptors were obtained from the Protein Data Bank (PDB) using their respective codes.
3. Receptor Preparation: The receptors were prepared by removing duplicate residues present at the binding site and water molecules. Additionally, the protonation state of each receptor was adjusted according to the pH of the enzymatic medium.

4. Docking Procedure: The ligands were docked into the binding site of the receptors using Molegro Virtual Docker software (Thomsem & Christensen, 2006). This software employs the Moldock Score (GRID) function, which is a hybrid search algorithm combining the differential evolution optimization technique with a cavity prediction algorithm during the searching procedure. This approach allows for the rapid and accurate recognition of potential binding modes of the ligands.
5. Grid-Based Scoring Functions: The software utilized grid-based scoring functions to precalculate potential-energy values on an evenly spaced cubic grid, accelerating calculations. The energy potential was evaluated using tri-linear interpolation between relevant grid points. A grid of 0.30 Å in resolution and 10 Å in radius from the inhibitor as the binding site was used.
6. Docking Parameters: MolDock SE (Simplex Evolution) was employed as the search algorithm, with the maximum number of poses to generate set at 100. Potential binding sites were identified using the built-in cavity detection algorithm. A grid covering the protein was created, and spheres were placed at every grid point. These spheres were then checked for overlap with any determined by the van der Waals radii of the protein atoms. Identified cavities were used by the guided differential evolution search algorithm to focus the search on specific areas during the docking simulation.

By following these procedures, the investigation aimed to determine the most likely conformation between the protein and ligand by estimating the interaction energy, providing insights into the binding modes of the 1,3,4-oxadiazoles with their respective molecular targets.

Results

The analysis aimed to determine whether the 54 compounds shared the same chemical space and could be treated as a congeneric series of 1,3,4-oxadiazoles. An applicability domain

analysis, based on sample leverages and studentized residuals, was conducted to identify outliers. However, outliers could not be unequivocally assigned (Figure 2), suggesting that the compounds may indeed belong to the same chemical space.

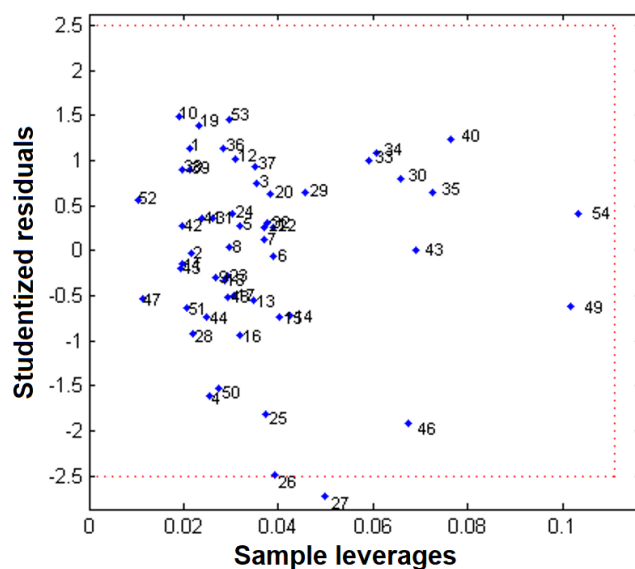


Fig. 2 The plot of studentized residuals vs. sample leverages for applicability domain test using MIA descriptors based on electronegativity values.

The model based on MIA descriptors encoding atomic electronegativity (ϵ) exhibited satisfactory performance metrics (Table 2), with an r^2 value exceeding 0.6, indicating proper modeling of the pEC_{50} data. Additionally, the high $^c r_p^2$ value (> 0.5) suggested that the correlation was not fortuitous. Internal validation ($q^2 > 0.5$) confirmed the robustness of the model, and it demonstrated the ability to predict the antibacterial activity of external compounds, as indicated by r_{pred}^2 and r_m^2 values above 0.5. The concordance correlation coefficient (CCC) exceeding 0.85 further supported the model's reliability (Figure 3), aligning with established standards (Chirico & Gramatica, 2011; Roy et al., 2013).

Table 2. Statistical performance of the MIA-QSAR model using Kennard-Stone sampling for the test set selection and in the bootstrapping experiment (10 cycles).

Parameter	Kennard-Stone	Bootstrapping
PLS components	2	2.6 ± 1.2
RMSEC	0.231	0.201 ± 0.025
r^2	0.882	0.910 ± 0.025
RMSE _{y-rand}	0.580	0.565 ± 0.039
r^2_{y-rand}	0.258	0.305 ± 0.085
$^c r^2_p$	0.742	0.740 ± 0.034
RMSECV	0.286	0.258 ± 0.022
q^2	0.819	0.854 ± 0.027
RMSEP	0.208	0.260 ± 0.033
r^2_{pred}	0.914	0.845 ± 0.053
r^2_m	0.763	0.655 ± 0.116
CCC	0.949	0.903 ± 0.030
Avg. r^2_m	0.801	0.741 ± 0.078
Δr^2_m	0.082	0.117 ± 0.047

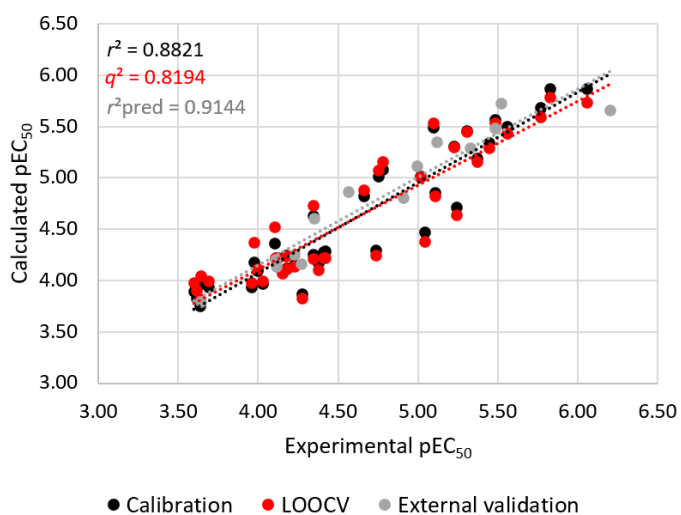


Fig. 3 Correlation plot of experimental vs. calculated pEC₅₀ for the 1,3,4-oxadiazole derivatives in calibration, leave-one-out cross-validation, and external validation (test set

selected through Kennard-Stone sampling) obtained from the MIA-QSAR model based on electronegativity descriptors.

VIP scores and PLS regression coefficients unveil substituent contributions to pEC_{50} values. In Figure 4, we illustrate the plots derived from VIP scores and PLS regression coefficients (b), elucidating the significant impact of substituents on the antibacterial potency of 1,3,4-oxadiazoles. Identifying pivotal substituents crucial for enhancing antibacterial activities facilitated the formulation of derivatives proposed in Table 3. These compounds' calculated $\log P$ values are presented in Figure 5, which also highlights the lipophilicity parameter across the dataset compounds.

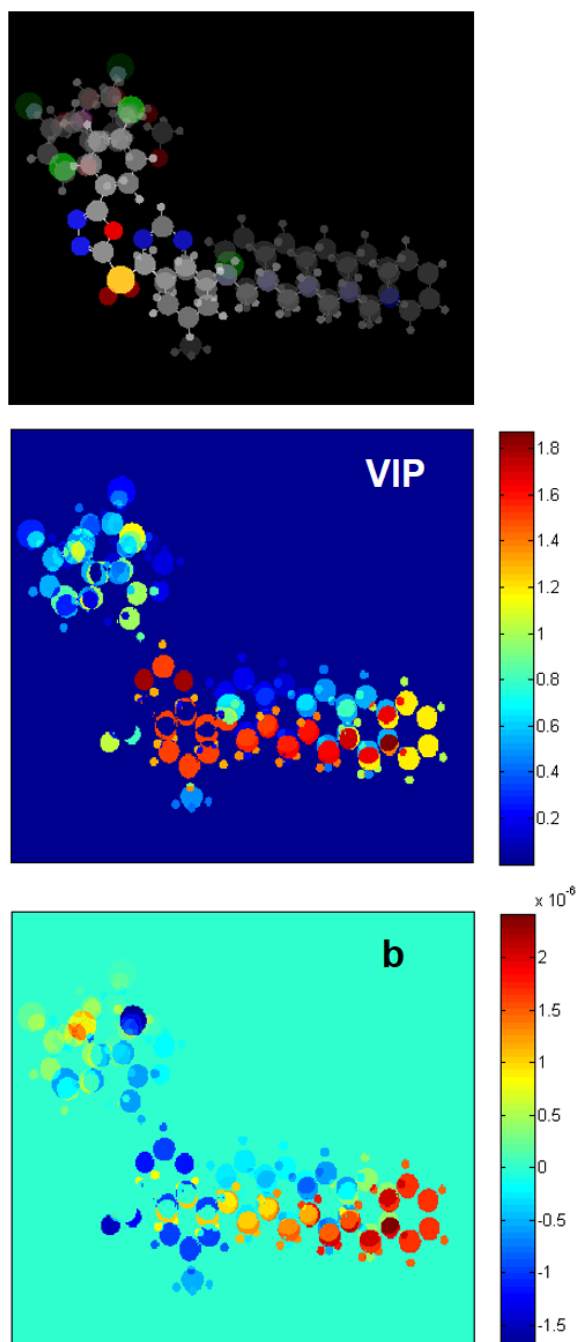


Fig. 4 Overlaid images used in the MIA-QSAR modeling (top) and MIA-plots of variable importance in projection (VIP) and PLS regression coefficients (b).

Table 3. Proposed 1,3,4-oxadiazole derivatives and calculated pEC₅₀ through the MIA-QSAR model.

Compound	R ¹	M	R ²	pEC ₅₀
P1	3-Cl,4-CH ₃ Ph	S	C ₁₂ H ₂₄ Pyr	5.87
P2	3-NO ₂ ,4-CH ₃ Ph	S	C ₁₂ H ₂₄ Pyr	5.87
P3	3-Cl,4-FPh	S	C ₁₂ H ₂₄ Pyr	5.88
P4	3-NO ₂ ,4-FPh	S	C ₁₂ H ₂₄ Pyr	5.88
P5	4-CH ₃ Ph	SO	C ₁₂ H ₂₄ Pyr	5.69
P6	3-ClPh	SO	C ₁₂ H ₂₄ Pyr	5.84
P7	3-NO ₂ Ph	SO	C ₁₂ H ₂₄ Pyr	5.84
P8	4-FPh	SO	C ₁₂ H ₂₄ Pyr	5.70
P9	3-Cl,4-CH ₃ Ph	SO	C ₁₂ H ₂₄ Pyr	5.80
P10	3-NO ₂ ,4-CH ₃ Ph	SO	C ₁₂ H ₂₄ Pyr	5.80
P11	3-Cl,4-FPh	SO	C ₁₂ H ₂₄ Pyr	5.81
P12	3-NO ₂ ,4-FPh	SO	C ₁₂ H ₂₄ Pyr	5.80

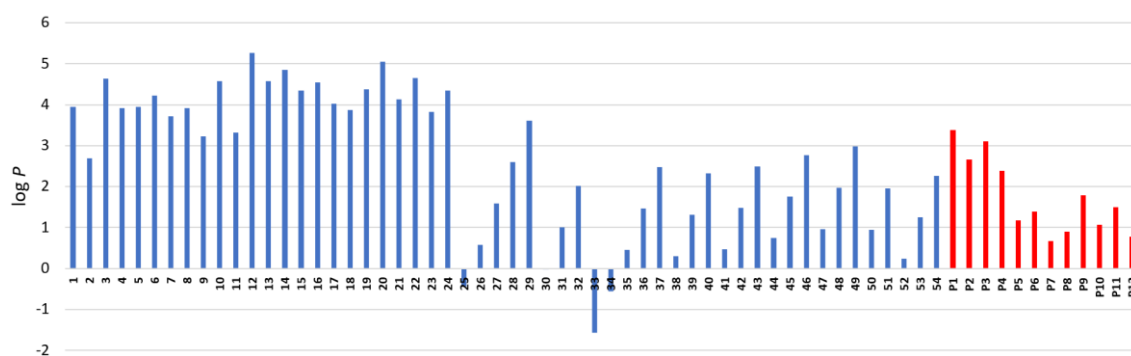


Fig. 5 Calculated log *P* (molinspiration.com) for the library (blue) and proposed (red) 1,3,4-oxadiazole derivatives.

To shed light on the action mechanism of the studied compounds, molecular docking calculations were performed with the *XacFabV*, *XacSOD*, and *XacGST* enzymes as potential macromolecular targets. Correlations between calculated energy scores and experimental

activity values were plotted (Figure 6), revealing a meaningful relationship only with the pEC₅₀ of all studied compounds for the *XacFabV* enzyme ($R^2 \approx 0.6$). The QSAR outcomes couldn't be directly compared with docking scores in the *XacFNR* enzyme (EC 1.18.1.2) due to steric hindrance caused by the long carbon chain in R², which prevents ligand approach to the binding pocket. The length of the carbon chain is of great importance to the antimicrobial activity of 1,3,4-oxadiazole drugs (Glomb & Swiatek, 2012; Wang et al. 2017b; Xie et al., 2018). Table 4 presents compounds **43**, **P3**, **P4**, and bismertiazol with corresponding docking score values into the binding site of *XacFabV*, *XacSOD*, and *XacGST* enzymes. Moreover, relevant intermolecular interactions of these compounds with *XacFabV*, identified as the most likely target, are illustrated in Figure 7.

Table 4. Binding energy values (kcal mol⁻¹) of the docked ligands into the enzymes.

Compound	<i>XacFabV</i>	<i>XacSOD</i>	<i>XacGST</i>
43	-127.03	-104.41	-129.79
P3	-106.50	-86.50	-104.23
P4	-127.37	-87.11	-99.27
Bismertiazol	-89.09	-68.09	-76.73

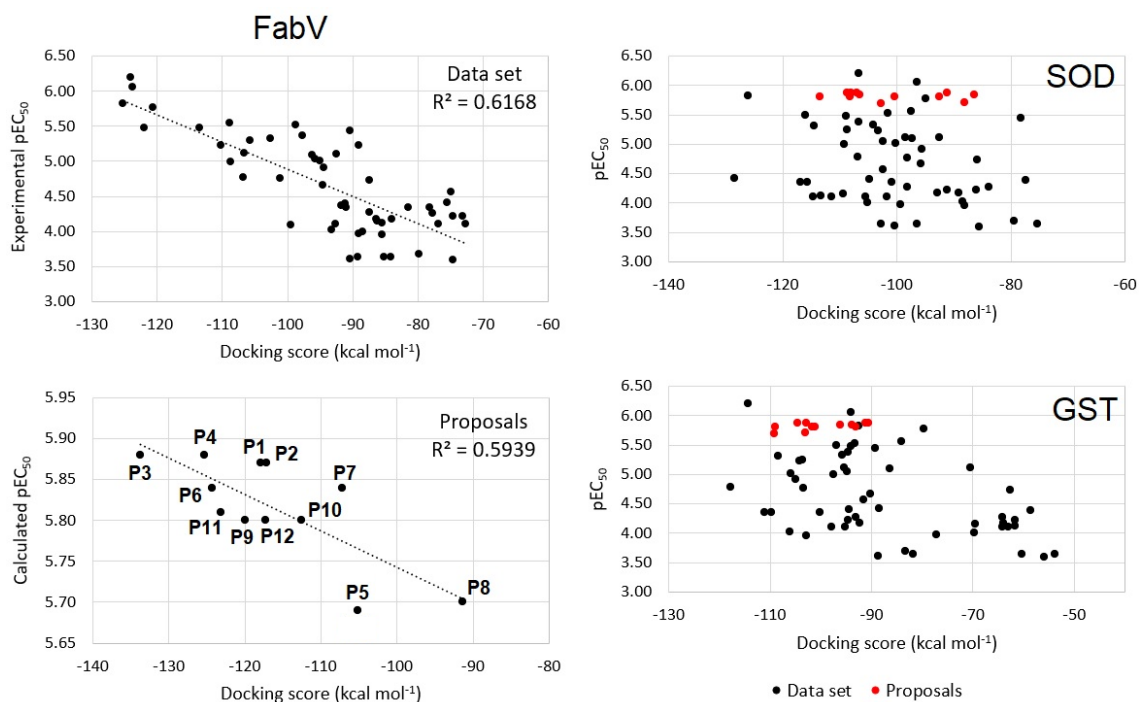


Fig. 6 Plots of experimental/calculated pEC₅₀ vs. docking scores (kcal mol⁻¹) for the *Xac*FabV enzyme complexed with the 1,3,4-oxadiazoles studied herein, and the lack of correlation with *Xac*SOD and *Xac*GST enzymes.

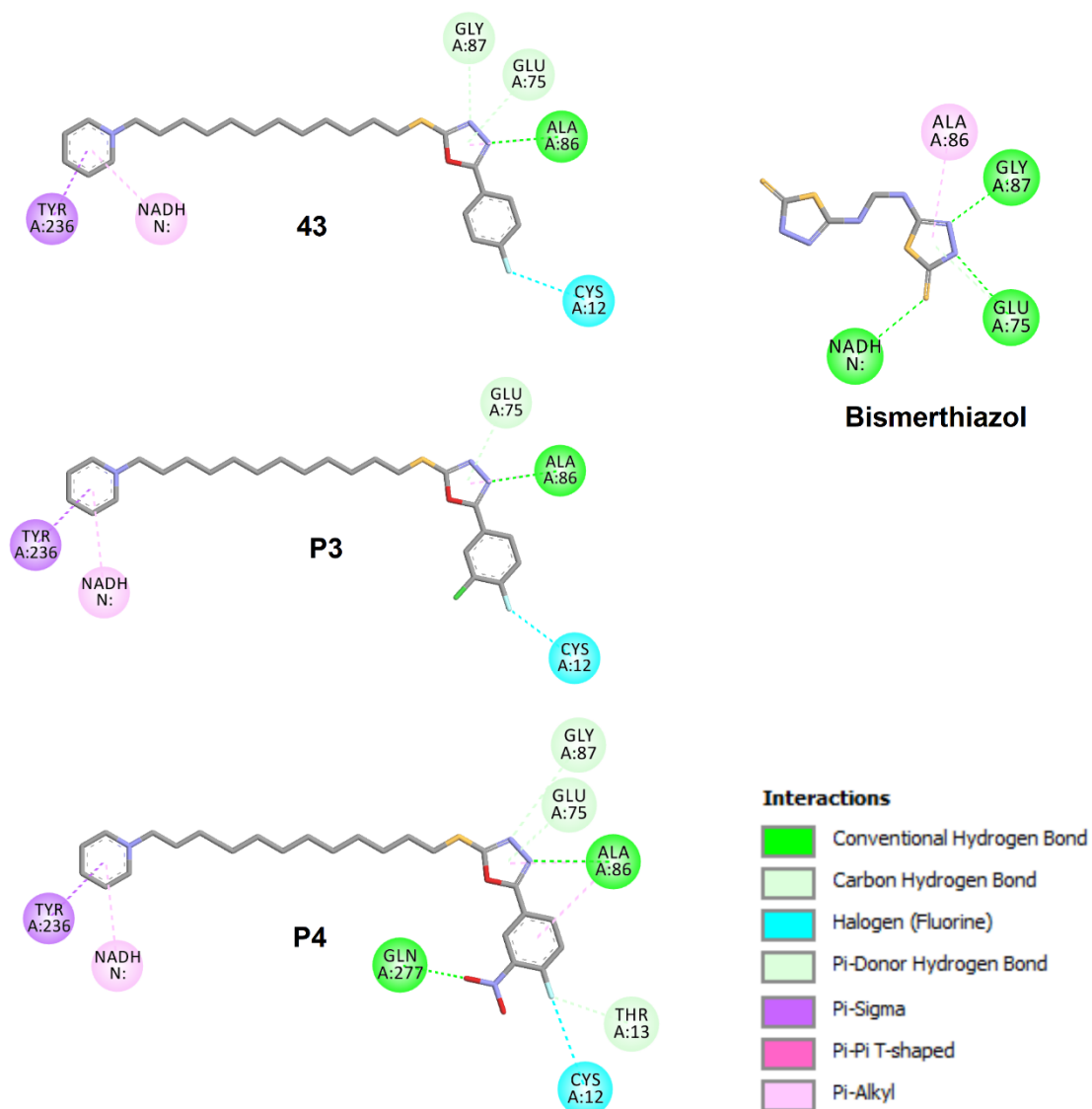


Fig. 7 Two-dimensional theoretical insight into the interactions of compounds as *XacFabV* inhibitors.

Discussion

Multivariate Image Analysis (MIA) descriptors based on electronegativity (ϵ) values outperformed descriptors based on van der Waals radii (r_{vdW}) and r_{vdW}/ϵ ratios (Table 2). This indicates that electrostatic interactions in the binding pocket contribute more significantly to

antibacterial activity than steric or hydrophobic-related effects. Therefore, only the MIA-QSAR model based on ϵ was further analyzed.

With the QSAR model suitable for predicting the pEC_{50} of new antibacterial candidates, it's valuable to analyze the substituent effects that explain the variance in the bioactivity data using the MIA plots based on variable importance in projection (VIP) scores and PLS regression coefficients (**b**) (Figure 4). The VIP plot indicates the influence of substituents on the pEC_{50} values, with blue regions representing low contributions and red regions indicating high contributions. Meanwhile, the **b**-plot illustrates whether substituents lead to a decrease (blue regions) or an increase (red regions) in the pEC_{50} values.

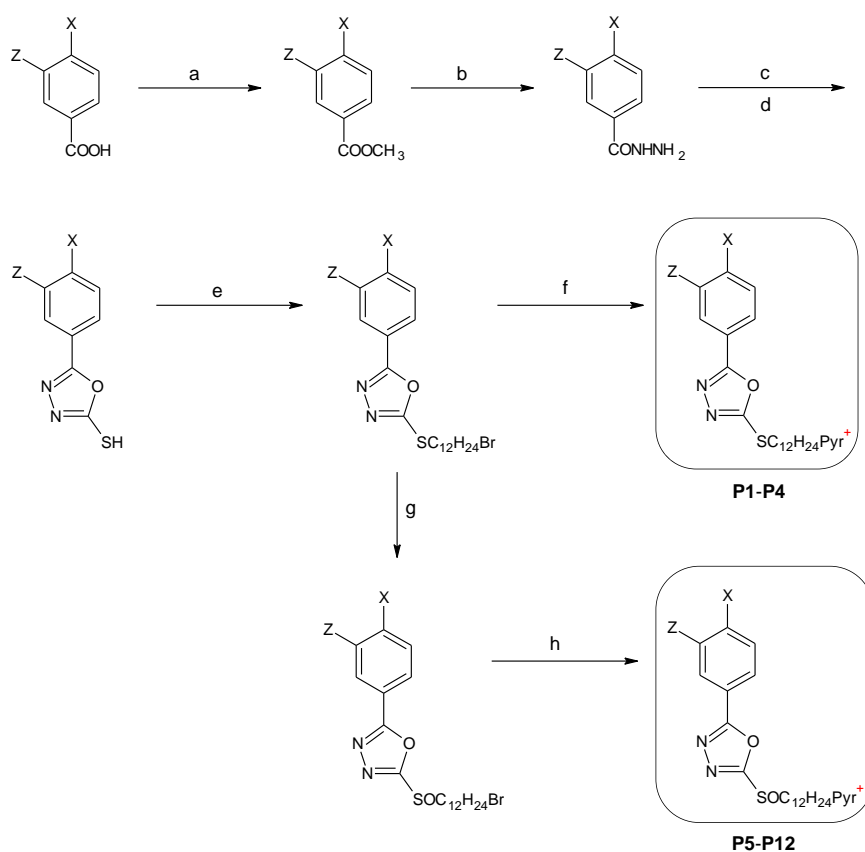
From the analysis: a) Substituents at R^2 are more influential than R^1 and M. b) Long chains with the pyridinium ring increase bioactivity. c) Oxidized sulfur disfavors bioactivity. d) The quinazoline ring decreases bioactivity. e) 3-Cl, 3-NO₂, and 4-CH₃ substituents in R^1 favor bioactivity, while 4-Cl disfavors it (the effect of 4-H and 4-F is hidden in the MIA contour maps).

These insights, combined with the substructures of the most active compounds within the series (**43**, **46**, **49**, and **54**), enable the construction of new molecules, named proposals **P1-P12** (Table 3). Additionally, sulfoxide derivatives (**P5-P12**) were proposed because compounds **29** (M = S) and **32** (M = SO), which differ only in the M substituent, exhibit similar pEC_{50} values.

The predicted pEC_{50} values for the proposed compounds in Table 3 indicate that thioethers are slightly favored compared to sulfoxides, consistent with the findings from the MIA plots. Additionally, subtle but irregular differences between mono- and di-substitution in the phenyl ring at R^1 are observed. For instance, while the mono-substituted rings in **P6** and **P7**

yield the most active sulfoxide derivatives, **P5** and **P8** (also containing mono-substituted Ph at R¹) are the least active proposals.

However, it's noteworthy that thioethers **P3** and **P4** are predicted to be the most active fluorinated derivatives within the entire series of compounds. For instance, while compound **43** is experimentally the most active fluorinated 1,3,4-oxadiazole (with a pEC₅₀ of 5.77), the predicted pEC₅₀ for **P3** and **P4** is 5.88. Therefore, a synthetic route to obtain **P3** and **P4**, as outlined in Scheme 1, could be highly valuable.



Scheme 1. The synthetic route proposed for the preparation of **P1–P4** (X = F or CH₃, and Z = Cl or NO₂) and **P5–P12** (X = H, F, or CH₃, and Z = H, Cl, or NO₂), similar to a procedure described elsewhere (Wang et al., 2016). Reagents and solvents: a) H₂SO₄, CH₃OH; b)

NH₂NH₂.H₂O, CH₃OH; c) KOH, CS₂, EtOH; d) 5% HCl; e) BrC₁₂H₂₄Br, K₂CO₃, DMF; f) pyridine; g) H₂O₂, NaWO₄.H₂O; h) pyridine.

Fluorination is highly advantageous in pharmaceuticals and agrochemicals due to the inertness of the polar C-F bond, rendering organofluorines less susceptible to degradation (Alabugin, 2016). Additionally, fluorination influences the lipophilicity of compounds (Jefferies et al., 2020), typically described in terms of the octanol-water partition coefficient ($\log P$). This parameter is crucial as it relates to both bioactivity, due to the ease of permeating cell membranes, and environmental impact.

The $\log P$ values for the proposed compounds, as well as for the dataset, were calculated using the molinspiration.com platform, and the results are depicted in Figure 5. Quinazoline derivatives (compounds **1-24**) generally exhibited the highest lipophilicities, while compounds **25**, **33**, and **34** displayed negative $\log P$ values.

The proposed compounds demonstrated intermediate lipophilicity, with $\log P$ values ranging from 0.7 to 3.4. This intermediate range is advantageous compared to compounds with extremely high $\log P$ values, which may lead to significant bioaccumulation, and those with very low $\log P$ values, which may result in increased mobility in soils rich in organic matter, leading to potential groundwater contamination (Langenbach, 2013; Da Silva et al. 2022).

Therefore, the intermediate lipophilicity of the proposed compounds makes them favorable candidates, as they strike a balance between bioactivity and environmental impact.

Table 4 displays compounds **43**, **P3**, **P4**, and bismertiazol alongside their respective docking score values within the binding site of *XacFabV*, *XacSOD*, and *XacGST* enzymes. Notably, both proposals demonstrate superior affinity to *XacFabV* compared to bismertiazol. Furthermore, **P4** exhibits more robust interactions with *XacFabV* than the most active fluorinated compound within the dataset (**43**). Compound **43** was chosen for deeper analysis

due to the presence of the fluorine atom rather than other substituents and halogens, since it possesses unique properties that enhance its agrochemical capabilities (Fujiwara & O'Hagan, 2014; Ogawa et al., 2020).

These compounds form π -sigma and/or π -alkyl interactions with amino acid residue Tyr236 and NADH. Fluorine atoms interact with Cys12, while the nitro group interacts with Gln277. Hydrogen bond interactions are observed with Glu75, Ala86, Gly87, and Gln277 (Figure 7). This comprehensive analysis provides insights into the potential mechanisms of action of the studied compounds against *XacFabV*.

In summary, alkylpyridinium derivatives of 1,3,4-oxadiazoles have showcased superior antibacterial performance compared to quinazolines and commercial agrochemicals. Through structural modifications guided by the highly predictive QSAR model obtained in this study, improvements have been achieved, including the synergistic effect of two substituents attached to the phenyl ring in R¹ and a magnification of the fluorine effect as seen in compounds **P3** and **P4**.

Docking studies have revealed that compounds with long carbon chains at R² do not properly fit into *XacFNR*'s binding pocket. However, the *XacFabV* enzyme predicts good affinities for the proposed ligands, indicating a likely antibacterial action mechanism of 1,3,4-oxadiazoles.

Furthermore, considering a balanced log *P* value that considers both bioaccumulation and leaching, the proposed compounds demonstrate potential eco-friendliness. Therefore, a synthetic route has been designed for future development, as promising compounds targeting *Xac* have been identified using a rigorously validated molecular modeling approach. This comprehensive approach holds promise for the advancement of effective antibacterial agents against *Xac* while also considering environmental sustainability.

Statements and Declarations: There are no conflicts to declare.

Data Availability Statement: Data available on request from the authors

Acknowledgments

The authors express their gratitude to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, funding code 001), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, grant number 306830/2021-3), and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) for their financial support of this research.

References

- Alabugin IV (2016) Stereoelectronic Effects: A Bridge Between Structure and Reactivity. Wiley, Hoboken. <https://doi.org/10.1002/9781118906378>
- Barigye SJ, Duarte MH, Nunes CA, Freitas MP (2016) MIA-plot: a graphical tool for viewing descriptor contributions in MIA-QSAR. RSC Advances 6:49604-49612. <https://doi.org/10.1039/C6RA09593C>
- Benfenati E (2012) Theory, Guidance and Applications on QSAR and REACH. Orchestra, Milan.
- Cabrejos DAL, Alexandrino AV, Pereira CM, Mendonça DC, Pereira HD, Novo-Mansur MTM, Garratt RC, Goto LS (2019) Structural characterization of a pathogenicity-related superoxide dismutase codified by a probably essential gene in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Plos One 14:e0209988. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209988>
- Chirico N, Gramatica P (2011) Real external predictivity of QSAR models: How to evaluate it? Comparison of different validation criteria and proposal of using the concordance correlation coefficient. J Chem Inf Model 51:2320-2335. <https://doi.org/10.1021/ci200211n>
- Consonni V, Ballabio D, Todeschini R (2009) Comments on de definition of the Q^2 parameter for QSAR validation. J Chem Inf Model 49:1669-1678. <https://doi.org/10.1021/ci900115y>

- Da Silva CC, De Almeida AHB, De Freitas DV, Da Silva FD, Das Chagas PSF, Silva DV (2022) Sorption, desorption, half-life and leaching of sulfometuron-methyl in different soil classes. *Rev Caatinga* 35:557-566. <https://doi.org/10.1590/1983-21252022v35n306rc>
- Dennington RD, Keith TA, Millam JM (2008) GaussView, Gaussian, Inc, Wallingford.
- Fujiwara T, O'Hagan D (2014) Successful fluorine-containing herbicide agrochemicals. *J Fluor Chem* 167:16-29. <https://doi.org/j.jfluchem.2014.06.014>
- Fujiwara T, O'Hagan D (2014) Successful fluorine-containing herbicide agrochemicals. *J Fluor Chem* 167:16-29. <https://doi.org/j.jfluchem.2014.06.014>
- Gottwald TR (2000) Citrus canker. *The Plant Health Instructor*. <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2000-1002-01>
- Hilario E, De Keyser S, Fan L (2020) Structural and biochemical characterization of a glutathione transferase from the citrus canker pathogen *Xanthomonas*. *Acta Cryst D* 76:778-789. <https://doi.org/10.1107/S2059798320009274>
- Hirschbeck MW, Kuper J, Lu H, Liu N, Neckles C, Shah S, Wagner S, Sotriffer CA, Tonge PJ, Kisker C (2012) Structure of the *Yersinia pestis* FabV Enoyl-ACP Reductase and Its Interaction with Two 2-Pyridone Inhibitors. *Structure* 20:89-100. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.07.019>
- Hu G, Zhang J, Jia H, Sosso D, Li T, Frommer WB, Yang B, White FF, Wang N, Jones JB (2014) Lateral organ boundaries 1 is a disease susceptibility gene for citrus bacterial canker disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:E521-E529. <https://doi.org/10.1073/pnas.1313271111>
- Islam MN, Ali MS, Choi SJ, Hyun JW, Baek KH (2019) Biocontrol of citrus canker disease caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* using an endophytic *Bacillus thuringiensis*. *Plant Pathol J* 35:486-497. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.03.2019.0060>

- Jefferies B, Wang Z, Troup RI, Goupille A, Le Questel JY, Fallan C, Scott JS, Chiarparin E, Graton J, Linclau B (2020) Lipophilicity trends upon fluorination of isopropyl, cyclopropyl and 3-oxetanyl groups. *Beilstein J Org Chem* 16:2141-2150. <https://doi.org/10.3762/bjoc.16.182>
- Kennard RW, Stone LA (1969) Computer-aided Design of Experiments. *Technometrics* 11:137-148. <https://doi.org/10.1080/00401706.1969.10490666>
- Kiralj R, Ferreira MMC (2009) Basic validation procedures for regression models in QSAR and QSPR studies: Theory and application. *J Braz Chem Soc* 20:770-787. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532009000400021>
- Langenbach T (2013) Persistence and Bioaccumulation of Persistent Organic Pollutants (POPs). In: Patil YB, Rao P (eds.) *Applied Bioremediation - Active and Passive Approaches*. IntechOpen, London. <https://doi.org/10.5772/56418>
- Liang X, Yu X, Pan X, Wu J, Duan Y, Wang J, Zhou M (2016) A thiadiazole reduces the virulence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* by inhibiting the histidine utilization pathway and quorum sensing. *Mol Plant Pathol* 19:116-128. <https://doi.org/10.1111/mpp.12503>
- Liu T, Peng F, Cao X, Liu F, Wang Q, Liu L, Xue W (2021) Design, synthesis, antibacterial activity, antiviral activity, and mechanism of myricetin derivatives containing a quinazolinone moiety. *ACS Omega* 6:30826-30833. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c05256>
- Martínez-Júlvez M, Goni G, Pérez-Amigot D, Laplaza R, Ionescu IA, Petrocelli S, Tondo ML, Sancho J, Orellano EG, Medina M (2018) Identification of inhibitors targeting ferredoxin-NADP⁺ reductase from the *Xanthomonas citri* subsp. *citri* phytopathogenic bacteria. *Molecules* 23:29. <https://doi.org/10.3390/molecules23010029>

- Martins FA, Daré JK, Freitas MP (2020) Theoretical study of fluorinated bioisosteres of organochlorine compounds as effective and eco-friendly pesticides. *Ecotoxicol Environ Saf* 199:110679. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110679>
- Mitra I, Saha A, Roy K (2010) Exploring quantitative structure–activity relationship studies of antioxidant phenolic compounds obtained from traditional Chinese medicinal plants. *Mol Simul* 36:1067-1079. <https://doi.org/10.1080/08927022.2010.503326>
- Nunes CA, Freitas MP, Pinheiro ACM, Bastos SC (2012) Chemoface: A novel free user-friendly interface for chemometrics. *J Braz Chem Soc* 23:2003–2010. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532012005000073>
- Ogawa Y, Tokunaga E, Kobayashi O, Hirai K, Shibata N (2020) Current contributions of organofluorine compounds to the agrochemical industry. *iScience* 23:101467. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101467>
- Roy K, Chakraborty P, Mitra I, Ojha PK, Kar S, Das RN (2013) Some case studies on application of “ r_m^2 ” metrics for judging quality of quantitative structure–activity relationship predictions: Emphasis on scaling of response data. *J Comput Chem* 34:1071-1082. <https://doi.org/10.1002/jcc.23231>
- Theodoridis G (2006) Fluorine-containing agrochemicals: An overview of recent developments. In: Tressaud A. (ed) *Fluorine and the Environment: Agrochemicals Archaeology Green Chemistry & Water*. Elsevier, Amsterdam. [https://doi.org/10.1016/S1872-0358\(06\)02004-5](https://doi.org/10.1016/S1872-0358(06)02004-5)
- Thomsen R, Christensen MH (2006) MolDock: A new technique for high-accuracy molecular docking. *J Med Chem* 49:3315–3321. <https://doi.org/10.1021/jm051197e>
- Tropsha A (2010) Best practices for QSAR model development, validation, and exploitation. *Mol Inf* 29:476-488. <https://doi.org/10.1002/minf.201000061>

- Vanini MMT, Spisni A, Sforça ML, Pertinhez TA, Benedetti CE (2009) The solution structure of the outer membrane lipoprotein OmlA from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* reveals a protein fold implicated in protein–protein interaction. *Proteins* 71:2051-2064. <https://doi.org/10.1002/prot.21886>
- Wang PY, Zhou L, Zhou J, Wu ZB, Xue W, Song BA, Yang S (2016). Synthesis and antibacterial activity of pyridinium-tailored 2,5-substituted-1,3,4-oxadiazole thioether/sulfoxide/sulfone derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 26:1214-1217. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.01.029>
- Wang PY, Zhou L, Zhou J, Fang HS, Wu ZB, Xue W, Song BA, Yang S (2017a) Potential antibacterial agents: pyridinium-functionalized amphiphiles bearing 1,3,4-oxadiazole scaffolds. *Chem Pap* 71, 1013-1018. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2017.04.005>
- Wang C-H, Xie X-R, Liu W-S, Hou G-G, Sun J-F, Zhao F, Cong W, Li H-J, Xin W-Y (2017b) Quaternary ammonium salts substituted by 5-phenyl-1,3,4-oxadiazole-2-thiol as novel antibacterial agents with low cytotoxicity. *Chem Biol Drug Des* 90:943-952. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13020>
- Wang X, Yan J, Wang M, Liu M, Zhang J, Chen L, Xue W (2018) Synthesis and three-dimensional quantitative structure-activity relationship study of quinazoline derivatives containing a 1,3,4-oxadiazole moiety as efficient inhibitors against *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Mol Divers* 22:791-802. <https://doi.org/10.1007/s11030-018-9837-0>
- Xia R, Guo T, Chen M, Su S, He J, Tang X, Jiang S, Xue W (2019) Synthesis, antiviral and antibacterial activities and action mechanism of penta-1,4-dien-3-one oxime ether derivatives containing a quinoxaline moiety. *New J Chem* 43:16461-16467. <https://doi.org/10.1039/C9NJ03019K>

Xie X-R, Cong W, Zhao F, Li H-J, Xin W-Y, Hou G-G, Wang C-H (2018) Synthesis, physicochemical properties and antimicrobial activity of novel quaternary ammonium salts. *J Enzyme Inhib Med Chem* 33:98-105. [https://doi.org/ 10.1080/14756366.2017.1396456](https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1396456)

2 ARTIGO 2 - QSAR and machine learning-driven proposition of novel 1,3,4-oxadiazoles and structure-based studies of their antibacterial activities against *Xanthomonas oryzae*, *Theor. Chem. Acc.*, 144, 2025, 19.

QSAR and machine learning-driven proposition of novel 1,3,4-oxadiazoles and structure-based studies of their antibacterial activities against *Xanthomonas oryzae*

Ingrid V. P. de Faria,^a Antônio Pedro Lemos de Mesquita^a Elaine F. F. da Cunha,^a Matheus P. Freitas^{a,*}

^a Department of Chemistry, Institute of Natural Sciences, Federal University of Lavras, 37200-900, Lavras, MG, Brazil

* Correspondence to: matheus@ufla.br

Abstract

1,3,4-Oxadiazole derivatives have demonstrated significant efficacy in protecting rice crops against bacterial pathogens, particularly *Xanthomonas oryzae* (*Xo*). Modern molecular modeling strategies are cutting-edge methods for designing chemicals that target enzymes responsible for plant diseases. In this study, we present quantitative structure-activity relationship (QSAR) analyses of a series of 1,3,4-oxadiazoles, evaluating their activity against *Xo* pv. *oryzicola* (*Xoc*) and *Xo* pv. *oryzae* (*Xoo*). Our goal is to identify candidate derivatives capable of targeting both bacteria simultaneously. Using a partial least squares model, we achieved moderate predictability; however, support vector machine regression proved more robust and reliable in estimating the antibacterial potential of the 1,3,4-oxadiazoles. The novel candidates exhibited superior calculated bioactivities compared to the existing library, with compounds containing a 2,4-dichlorophenyl substituent showing significant dual antibacterial activity

against *Xoc* and *Xoo*. Docking studies and molecular dynamics simulations corroborated the QSAR findings, highlighting the chemical features critical for ligand-enzyme affinities.

Keywords: 1,3,4-oxadiazole derivatives, antibacterials, molecular docking, molecular dynamics simulations, QSAR, rice.

Introduction

Rice feeds around half of the world's population, particularly in Asia, Latin America, and parts of Africa (<https://education.nationalgeographic.org/resource/food-staple/>, accessed on Jan 11, 2024). However, the *Xanthomonas oryzae* bacteria affect rice production as they cause narrow, pale/grey/dark-greenish, water-soaked, interveinal streaks of various lengths, initially restricted to the leaf blades [1]. Agrochemicals, such as bismethiazol usually control the leaf blight caused by this disease [2]. Nevertheless, the ongoing development of resistance by the bacteria makes imperative the design, synthesis, and bioassays of novel antibacterials aimed at tackling the “rice disease” [3]. This work focuses on the first part of such workflow (computational design) by performing ligand- and structure-based studies and using machine learning methods to obtain reliable models and valuable molecular prospects against *X. oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) and *X. oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*).

Quantitative structure-activity relationships (QSAR) are straightforward ligand-based methods for predicting biological activities using molecular descriptors—mathematical indices employed to build correlation models through linear or non-linear expressions [4]. QSAR is widely popular due to its low cost, predictive capability, and the advantage of not requiring living organisms or experimental assays (though the endpoints are typically derived from experimental data). On the other hand, molecular docking and molecular dynamics are structure-based approaches used to evaluate ligand-enzyme interactions and binding energies,

as well as to assess the stability of ligand-enzyme complexes over time. When combined, these techniques offer a powerful and reliable means to gain detailed insights into molecular systems [5–10].

The ligand-based approach used herein is based on multivariate image analysis applied to QSAR (MIA-QSAR) [11]. Partial least squares (PLS) regression was carried out to obtain predictive models and, most importantly, generate variable importance in projection (VIP) and PLS regression coefficients (**b**) that guide the choice of chemical substituents that most likely influence biological activities [12]. Because the correlation of the MIA descriptors with the activities block may be somewhat nonlinear, a support vector regression (SVR) was further applied to model the antibacterial activities [13]. Support vector machines have been successfully applied to solve various nonlinear problems, including those within the QSAR scope [14-20]. Finally, to gain insight into the action mechanism of the proposed antibacterials, a docking strategy followed by molecular dynamics experiments was conducted on the β -ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) enzyme. Recently identified as a potential target for antibacterials, FabH is crucial for pathogenic bacterial survival. The enzyme catalyzes the condensation of acetyl-CoA with malonyl-CoA to initiate fatty acid biosynthesis, and its inhibition disrupts this reaction [21, 22].

Materials and Methods

The MIA-QSAR has already been fully described elsewhere [11], thus only a brief description is given here. A total of 87 molecules were obtained from the literature [23-25], whose pEC₅₀ (EC₅₀ in mol L⁻¹ as the concentration required to reduce 50% of the *Xoo* and *Xoc* activities) values were available and obtained from identical procedures. These molecules were sketched using a ball-and-stick scheme in the GaussView program [26] and saved as bitmaps

of 354×300 RGB pixels. The atoms (balls) were colored with pixel values corresponding to the respective van der Waals radii (r_{vdW}), electronegativity (ϵ), and the r_{vdW}/ϵ ratio. Each image was unfolded to a $1 \times 106,200$ -row vector and then collapsed to form dimension $87 \times 106,200$ matrices. The three matrices were split into training (75%) and test (25%) sets using a bootstrapping procedure, in which the matrices were randomly sampled 10 times and then regressed (training set) against the activities block using PLS and SVM (using a polynomial kernel) regressions. The PLS experiment was conducted using the Chemoface program [27], while the SVM was performed with the R program [28]. The variable importance in projection (VIP) scores and regression coefficients (**b**) were extracted from the PLS outcomes to map the atomic contributions of the variable chemical structures on the biological activities; the VIP scores indicate the moieties most affecting the pEC_{50} values, while **b** indicates if the atoms contribute by increasing or decreasing the bioactivities. The quality of the models was evaluated using several metrics to attest to internal and external linearity, accuracy, reproducibility, and stability, according to the best practices in QSAR [29-32].

The molecular docking study was conducted to validate the results of QSAR and explain the affinity of 1,3,4-oxadiazole derivatives at the *Xoo* FabH binding site (PDB: 3FK5) using the Molegro Virtual Docker software [33], which provides the most likely binding conformation of a ligand to a macromolecule. The Moldock Score [GRID] function is a hybrid search algorithm that combines differential evolution optimization technique with cavity prediction algorithm during the search procedure, enabling fast and accurate recognition of potential binding modes (poses). It is derived from Piecewise Linear Potential (PLP), a simplified potential whose parameters are suitable for protein ligand structures and scoring functions, and further extended in the GEMDOCK program (Generic Evolutionary Method for Molecular Docking) with a new hydrogen bonding term and novel charging schemes [33]. Grid-based scoring functions pre-

calculate potential energy values on a uniformly spaced cubic grid to accelerate computations. The energy potential was evaluated using trilinear interpolation between relevant grid points. A restriction sphere of 10 \AA^3 was allocated to the binding site and the calculations were conducted using a grid resolution of 0.30 \AA . The sphere was centered at coordinates $(x, y, z) = (-7.60, 24.33, 29.27)$. MolDock SE (Simplex Evolution) served as the search algorithm with a maximum number of 100 poses to be generated. Potential binding sites were identified using the integrated cavity detection algorithm. A grid covering the protein is created with a sphere placed at each grid point. It is checked whether these spheres overlap with those determined by the van der Waals radii of the protein atoms. Cavities identified by the cavity detection algorithm were then used by the guided differential evolution search algorithm to focus the search in that specific area during docking simulation.

Molecular dynamics (MD) simulations were carried out using GROMACS software (version 2021.4) [34, 35] to evaluate the stability of the proposed complexes. Selected poses of the compounds P21, P22, and P25 were submitted to the Automated Topology Builder (ATB) server [36] for parameterization and topology file generation, utilizing the GROMOS54a7 force field [37]. The three-dimensional structure of the target protein (PDB-ID: 3FK5) was protonated at pH 7.0 using the PDB2PQR server [38], with pKa predictions conducted via the ProPKA server [39]. Protein preparation was performed using GROMOS57, incorporating ion and SPC water models native to the force field. A cubic solvation box with 1.5 nm spacing beyond the protein boundaries was created and filled with 28,386 water molecules. Six sodium ions (Na^+) were added to neutralize the system. Energy minimization of the protein-ligand complexes was conducted using the steepest descent algorithm with and without position restraints, followed by LBFGS minimizations, employing the Verlet algorithm. System equilibration was carried out via two 100 ps simulations: the canonical (NVT) ensemble at 295 K and the isothermal-

isobaric (NPT) ensemble at 1 bar. Solvent relaxation was achieved with a 500 ps water dynamics step. Subsequently, a 200 ns production MD simulation was performed using the leap-frog integrator and the Verlet algorithm. Post-simulation analyses, including root-mean-square deviation (RMSD), root-mean-square fluctuation (RMSF), hydrogen bonding, and interatomic distances, were conducted with GROMACS tools. Graphs were plotted using XMGrace, while visual inspections were carried out with Visual Molecular Dynamics (VMD) [40] and Biovia's Discovery Studio.

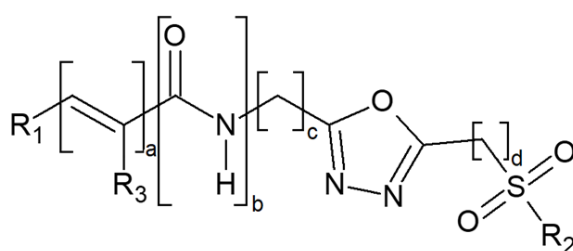
Results and Discussion

QSAR

Three data sets available elsewhere [23-25] have been merged to generate an extended and diverse set of 87 1,3,4-oxadiazole congeners with experimentally obtained pEC₅₀ (EC₅₀ in mol L⁻¹) values against *Xoc* and *Xoo* (Table 1). However, compounds **37**, **85**, and **87** (for *Xoc*), as well as **80** and **84-86** (for *Xoo*) exhibited anomalous behavior (high leverages or studentized residuals) and, therefore, were removed from the data set (Figure 1). Including these compounds in the dataset slightly reduced the statistical performance. The compounds are highly selective as the most active molecules for *Xoc* are **45** and **87** (pEC₅₀ of 6.23 and 7.24, respectively), whereas for *Xoo* they correspond to **64** and **68** (pEC₅₀ of 6.52 and 6.48, respectively). The substituents at R₁ and R₂ positions also differ in these compounds, while R₃ is H in all four molecules, but their effect on pEC₅₀ should be evaluated in a multivariate perspective, because they may exhibit synergistic or antagonistic interactions. We also considered average pEC₅₀ values to account for compounds that are bad or good antibacterials against both bacteria. Before starting the modeling, it is worth mentioning that QSAR may account for two distinct objectives: interpretability and predictiveness [41]. For the first objective, we have built PLS-based models, which provide variable importance in projection (VIP) scores and correlation

coefficients (**b**) that can be used in MIA plots to inform on the substituent effects over the pEC₅₀ values. On the other hand, considering the second objective and because the data may contain some degree of nonlinearity, SVR was applied to model the bioactivities of the compounds and then used to predict the pEC₅₀ values of proposed 1,3,4-oxadiazoles.

Table 1. 1,3,4-Oxadiazoles used to build the QSAR models and the respective pEC₅₀ values (EC₅₀ in mol L⁻¹) representing the bioactivities against *Xoc*, *Xoo*, and the average values



Cpd	R ₁	R ₂	R ₃	a	b	c	d	pEC ₅₀ (<i>Xoc</i>)	pEC ₅₀ (<i>Xoo</i>)	Avg. pEC ₅₀
1	2,4-diClPh	CH ₃	-	0	1	1	0	5.34	5.77	5.56
2	2,4-diClPh	C ₂ H ₅	-	0	1	1	0	5.10	5.61	5.36
3	2-CH ₃ Ph	CH ₃	-	0	1	1	0	5.24	5.69	5.47
4	2-CH ₃ Ph	C ₂ H ₅	-	0	1	1	0	5.24	5.71	5.48
5	2,3-diCH ₃ Ph	CH ₃	-	0	1	1	0	5.17	5.71	5.44
6	2,3-diCH ₃	C ₂ H ₅	-	0	1	1	0	5.09	5.47	5.28
7	4-CH ₃ Ph	CH ₂ CH ₂ CH ₃	-	0	1	1	0	5.08	5.17	5.13
8	4-CH ₃ Ph	C ₂ H ₅	-	0	1	1	0	5.19	5.34	5.27
9	4-FPh	C ₂ H ₅	-	0	1	1	0	4.89	5.17	5.03
10	2,6-diFPh	C ₂ H ₅	-	0	1	1	0	5.20	5.16	5.18
11	4-CF ₃ Ph	C ₂ H ₅	-	0	1	1	0	5.18	5.48	5.33
12	3-FPh	CH ₃	H	1	1	1	0	5.17	5.67	5.42
13	3-FPh	C ₂ H ₅	H	1	1	1	0	5.10	5.45	5.28
14	3,4-diFPh	CH ₃	H	1	1	1	0	5.46	5.58	5.52
15	3,4-diFPh	C ₂ H ₅	H	1	1	1	0	5.27	5.51	5.39
16	2-FPh	CH ₃	H	1	1	1	0	5.28	5.81	5.55
17	2-FPh	C ₂ H ₅	H	1	1	1	0	5.07	5.53	5.30
18	3-ClPh	CH ₃	H	1	1	1	0	5.45	5.69	5.57
19	4-NO ₂ Ph	C ₂ H ₅	H	1	1	1	0	5.31	5.66	5.49
20	4-CF ₃ Ph	CH ₃	H	1	1	1	0	5.34	5.73	5.54

21	4-CF ₃ Ph	C ₂ H ₅	H	1	1	1	0	5.27	5.36	5.32
22	4-CH ₃ Ph	CH ₂ CH ₂ CH ₃	H	1	1	1	0	5.05	5.40	5.23
23	2,4-diClPh	C ₂ H ₅	H	1	1	1	0	5.11	5.39	5.25
24	2-Furan	CH ₃	H	1	1	1	0	5.11	5.30	5.21
25	2-Furan	C ₂ H ₅	H	1	1	1	0	5.02	5.26	5.14
26	Ph	CH ₃	H	1	0	0	0	4.98	4.86	4.92
27	Ph	C ₂ H ₅	H	1	0	0	0	4.61	4.89	4.75
28	Ph	n-C ₃ H ₇	H	1	0	0	0	4.65	5.13	4.89
29	Ph	i-C ₃ H ₇	H	1	0	0	0	4.73	5.38	5.06
30	Ph	n-C ₄ H ₉	H	1	0	0	0	4.17	5.22	4.70
31	Ph	i-C ₄ H ₉	H	1	0	0	0	4.77	4.91	4.84
32	Ph	s-C ₄ H ₉	H	1	0	0	0	4.98	4.76	4.87
33	Ph	n-C ₅ H ₁₁	H	1	0	0	0	3.92	4.58	4.25
34	3-FPh	CH ₃	H	1	0	0	0	5.27	5.19	5.23
35	3-FPh	C ₂ H ₅	H	1	0	0	0	5.27	5.07	5.17
36	3-FPh	i-C ₃ H ₇	H	1	0	0	0	5.23	5.69	5.46
37	3-FPh	n-C ₅ H ₁₁	H	1	0	0	0	5.45	4.44	4.95
38	4-FPh	CH ₃	H	1	0	0	0	5.36	5.07	5.22
39	4-FPh	C ₂ H ₅	H	1	0	0	0	5.28	5.23	5.26
40	4-FPh	i-C ₃ H ₇	H	1	0	0	0	4.65	5.32	4.99
41	4-FPh	n-C ₅ H ₁₁	H	1	0	0	0	4.88	5.33	5.11
42	4-ClPh	CH ₃	H	1	0	0	0	5.47	5.60	5.54
43	4-ClPh	C ₂ H ₅	H	1	0	0	0	5.94	5.71	5.83
44	4-BrPh	CH ₃	H	1	0	0	0	5.60	5.53	5.57
45	4-BrPh	C ₂ H ₅	H	1	0	0	0	6.23	5.89	6.06
46	4-OCH ₃ Ph	CH ₃	H	1	0	0	0	5.87	5.02	5.45
47	4-OCH ₃ Ph	C ₂ H ₅	H	1	0	0	0	5.41	5.18	5.30
48	Ph	benzyl	H	1	0	0	0	4.30	4.16	4.23
49	4-FPh	benzyl	H	1	0	0	0	5.09	4.94	5.02
50	Ph	3-CH ₃ -benzyl	H	1	0	0	0	4.94	4.21	4.58
51	Ph	4-F-benzyl	H	1	0	0	0	4.32	4.24	4.28
52	4-OCH ₃ Ph	4-F-benzyl	H	1	0	0	0	4.59	4.37	4.48
53	Ph	4-Cl-benzyl	H	1	0	0	0	4.47	4.27	4.37
54	Ph	2,4-di-Cl-benzyl	H	1	0	0	0	4.53	4.95	4.74
55	4-FPh	2,4-di-Cl-benzyl	H	1	0	0	0	5.19	5.48	5.34
56	Ph	4-NO ₂ -benzyl	H	1	0	0	0	5.02	4.97	5.00
57	4-BrPh	i-C ₃ H ₇	H	1	0	0	0	5.95	6.08	6.02
58	4-BrPh	n-C ₃ H ₇	H	1	0	0	0	5.85	5.47	5.66

59	4-BrPh	t-C ₄ H ₉	H	1	0	0	0	5.39	4.78	5.09
60	4-BrPh	CH ₂ Cl	H	1	0	0	0	5.72	6.08	5.90
61	4-BrPh	CH ₂ CH ₂ CN	H	1	0	0	0	5.66	5.87	5.77
62	4-BrPh	(CH ₂) ₃	H	1	0	0	0	5.15	5.54	5.35
63	4-CF ₃ Ph	CH ₃	H	1	0	0	0	5.66	6.20	5.93
64	4-CF ₃ Ph	C ₂ H ₅	H	1	0	0	0	5.68	6.52	6.10
65	4-CF ₃ Ph	i-C ₃ H ₇	H	1	0	0	0	5.69	5.94	5.82
66	4-CF ₃ Ph	t-C ₄ H ₉	H	1	0	0	0	5.44	4.64	5.04
67	3,4-diFPh	CH ₃	H	1	0	0	0	5.61	6.16	5.89
68	3,4-diFPh	C ₂ H ₅	H	1	0	0	0	5.63	6.48	6.06
69	3,4-diFPh	i-C ₃ H ₇	H	1	0	0	0	5.35	6.20	5.78
70	2,4-diClPh	CH ₃	H	1	0	0	0	5.90	6.20	6.05
71	2,4-diClPh	C ₂ H ₅	H	1	0	0	0	6.05	6.22	6.14
72	4-OHPh	CH ₃	H	1	0	0	0	5.08	5.95	5.52
73	4-OHPh	C ₂ H ₅	H	1	0	0	0	5.97	6.15	6.06
74	4-OHPh	i-C ₃ H ₇	H	1	0	0	0	5.87	5.69	5.78
75	4-NO ₂ Ph	C ₂ H ₅	H	1	0	0	0	6.01	6.01	6.01
76	4-NO ₂ Ph	i-C ₃ H ₇	H	1	0	0	0	5.61	5.91	5.76
77	4-NO ₂ Ph	C ₂ H ₅	H	1	0	0	0	5.75	5.97	5.86
78	4-NO ₂ Ph	i-C ₃ H ₇	H	1	0	0	0	5.86	6.16	6.01
79	4-NO ₂ Ph	CH ₂ Cl	H	1	0	0	0	5.57	6.17	5.87
80	Ph	CH ₃	CH ₃	1	0	0	0	5.94	6.12	6.03
81	Ph	C ₂ H ₅	CH ₃	1	0	0	0	5.75	5.54	5.65
82	Ph	i-C ₃ H ₇	CH ₃	1	0	0	0	5.51	4.54	5.03
83	4-BrPh	CH ₃	H	1	0	0	1	5.19	4.74	4.97
84	4-BrPh	C ₂ H ₅	H	1	0	0	1	5.32	5.30	5.31
85	4-BrPh	i-C ₃ H ₇	H	1	0	0	1	5.57	4.69	5.13
86	4-BrPh	i-C ₃ H ₇	H	1	0	0	2	4.96	5.98	5.47
87	2,4-di-ClPh	i-C ₃ H ₇	H	1	0	0	0	7.24	5.94	6.59

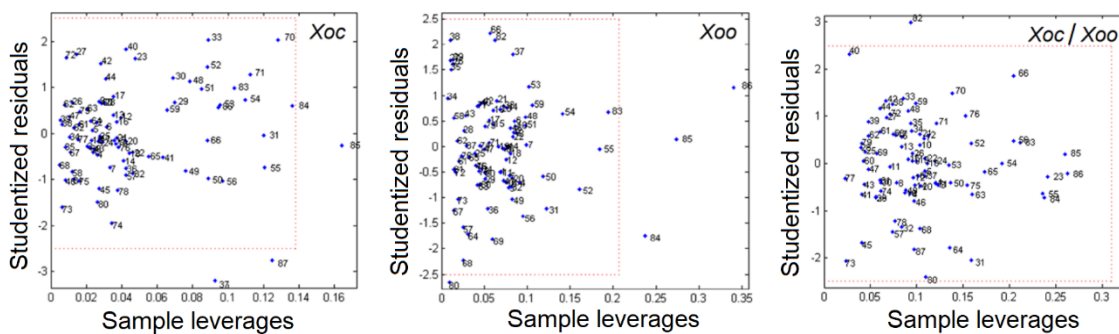


Figure 1. William's plots for outlier detection in the data set of anti-*Xoc* and anti-*Xoo* compounds.

The MIA descriptors used in the PLS-based models encode atomic radii (r_{vdW}), the r_{vdW}/ϵ ratio, and ϵ for *Xoc*, *Xoo* and the average of *Xoc* and *Xoo*, respectively, indicating that atomic size is an important parameter for the bioactivity against *Xoc*, while both size and electronegativity are relevant descriptors ruling the pEC_{50} for *Xoo*. These data sets were modellable as the calibration and internal validation using leave-one-out cross-validation (LOOCV) yielded acceptable determination coefficients, which are > 0.6 and > 0.5 , respectively (Figure 2). However, to attest to the actual robustness and predictive ability of the models, a complete external validation test should be performed, which was accomplished by a bootstrapping experiment in which the data set was randomly split into training and test sets for 10 times and several metrics were determined to evaluate the models (Table 2). Again, the statistics of the models for both bacteria demonstrate that they are reliable for prediction, particularly for *Xoo*, but some values that are only marginally superior to the cut-off criteria established elsewhere, such as $^c r_p^2$, r_m^2 , and CCC [31, 42, 43], indicate that the structure-activity relationship may not be entirely linear. Therefore, an SVR was carried out to attest to the nonlinear nature of the residual data.

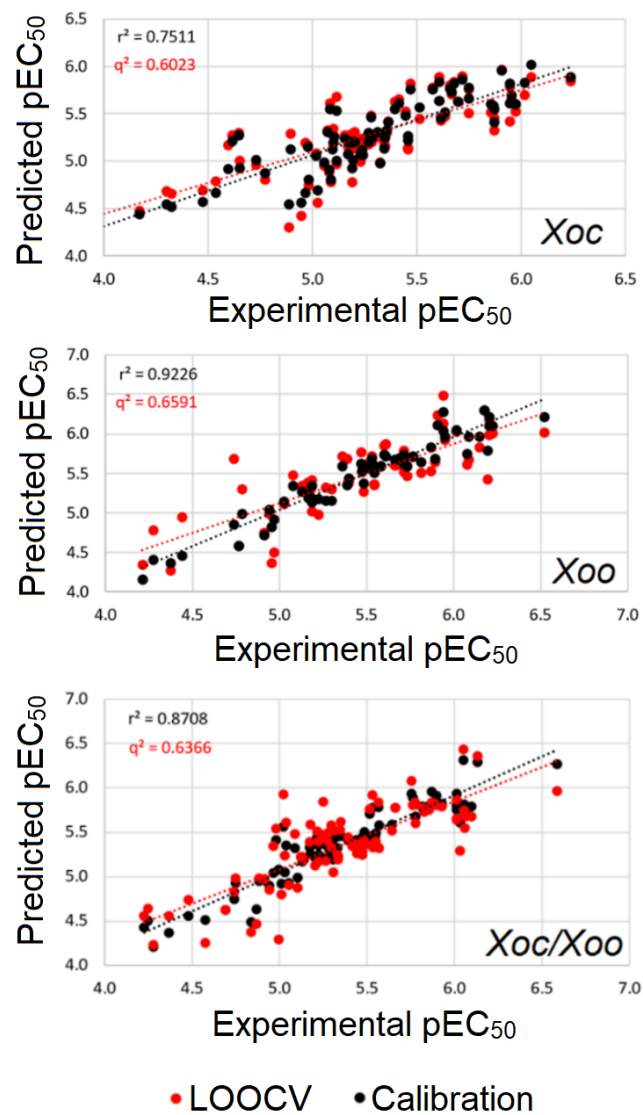


Figure 2. Relationships between actual and calculated pEC₅₀ values for the *Xoc*, *Xoo*, and *Xoc/Xoo* models.

Table 2. Average parameters for the PLS-based models obtained through the bootstrapping procedure using 10 random cycles.

Parameter	<i>Xoc</i>	<i>Xoo</i>	<i>Xoc/Xoo</i>
PLS components	4.9 ± 0.7	7.1 ± 0.8	6.2 ± 1.8
RMSEC	0.212 ± 0.023	0.211 ± 0.024	0.194 ± 0.036
r^2	0.788 ± 0.033	0.845 ± 0.023	0.832 ± 0.061
RMSE _{y-rand}	0.339 ± 0.026	0.362 ± 0.035	0.338 ± 0.031
r^2_{y-rand}	0.459 ± 0.044	0.539 ± 0.036	0.501 ± 0.079
$c_r^2_p$	0.507 ± 0.021	0.506 ± 0.033	0.522 ± 0.034
RMSECV	0.315 ± 0.020	0.363 ± 0.025	0.327 ± 0.015
q^2	0.546 ± 0.053	0.553 ± 0.035	0.559 ± 0.045
RMSEP	0.303 ± 0.038	0.322 ± 0.061	0.302 ± 0.035
r^2_{pred}	0.598 ± 0.068	0.693 ± 0.075	0.648 ± 0.062
r^2_m	0.518 ± 0.060	0.518 ± 0.106	0.571 ± 0.075
k	1.013 ± 0.012	0.990 ± 0.014	0.997 ± 0.012
k'	0.984 ± 0.012	1.007 ± 0.015	1.000 ± 0.012
MAE	0.221 ± 0.018	0.260 ± 0.046	0.240 ± 0.030
Avg. r^2_m	0.498 ± 0.085	0.583 ± 0.070	0.549 ± 0.076
Δr^2_m	0.124 ± 0.089	0.162 ± 0.072	0.147 ± 0.084
CCC	0.812 ± 0.059	0.838 ± 0.035	0.813 ± 0.041
Q^2_{F1}	0.547 ± 0.096	0.666 ± 0.094	0.593 ± 0.118
Q^2_{F2}	0.527 ± 0.104	0.660 ± 0.094	0.571 ± 0.122
Q^2_{F3}	0.612 ± 0.074	0.604 ± 0.191	0.600 ± 0.100

The SVR models not only enhanced modeling capability, as demonstrated by the increased r^2 values illustrated in Table 3, but also showed improved predictive performance according to leave-one-out cross-validation experiments, with q^2 values ranging between 0.7 and 0.8. Other metrics indicate that the SVR models are robust and reliable in potentially predicting the dependent variables of unknown derivatives of 1,3,4-oxadiazoles.

Table 3. Average parameters for the SVR-based models obtained through the bootstrapping procedure using 10 random cycles.

Parameter	<i>Xoc</i>	<i>Xoo</i>	<i>Xoc/Xoo</i>
Degree	1.00 ± 0.00	1.33 ± 0.47	2.00 ± 0.00
Scale	0.004 ± 0.004	0.007 ± 0.004	0.006 ± 0.002
C	0.417 ± 0.118	0.333 ± 0.118	0.250 ± 0.000
RMSE _C	0.263 ± 0.077	0.222 ± 0.110	0.242 ± 0.064
r ²	0.872 ± 0.012	0.893 ± 0.064	0.968 ± 0.001
RMSE _{y-rand}	0.307 ± 0.006	1.176 ± 1.151	0.251 ± 0.138
r ² _{y-rand}	0.557 ± 0.010	0.446 ± 0.171	0.837 ± 0.071
c _{r²_p}	0.524 ± 0.021	0.620 ± 0.173	0.501 ± 0.013
RMSE _{CV}	0.294 ± 0.105	0.383 ± 0.078	0.288 ± 0.027
q ²	0.809 ± 0.078	0.827 ± 0.153	0.718 ± 0.061
RMSE _P	0.358 ± 0.054	0.396 ± 0.047	0.278 ± 0.024
r ² _{pred}	0.638 ± 0.055	0.656 ± 0.117	0.699 ± 0.048
r ² _m	0.548 ± 0.055	0.584 ± 0.049	0.632 ± 0.006
<i>k</i>	0.975 ± 0.008	0.995 ± 0.020	0.999 ± 0.001
<i>k'</i>	0.985 ± 0.009	0.994 ± 0.014	0.998 ± 0.001
MAE	0.250 ± 0.035	0.297 ± 0.066	0.220 ± 0.004
Avg. r ² _m	0.550 ± 0.106	0.540 ± 0.011	0.623 ± 0.022
Δr ² _m	0.216 ± 0.062	0.233 ± 0.017	0.172 ± 0.016
CCC	0.818 ± 0.026	0.801 ± 0.005	0.838 ± 0.006
Q ² _{F1}	0.578 ± 0.124	0.577 ± 0.051	0.659 ± 0.008
Q ² _{F2}	0.540 ± 0.172	0.567 ± 0.053	0.635 ± 0.012
Q ² _{F3}	0.640 ± 0.185	0.568 ± 0.022	0.621 ± 0.025

To facilitate the proposal of novel derivatives, both MIA plots and a combination of substructures from the main existing compounds were analyzed and utilized to generate the proposals outlined in Table 4. The MIA plots rely on variable importance in projection (VIP) scores, which indicate the substituents most significantly affecting the pEC₅₀ values, along with

PLS regression coefficients (**b**) that reveal whether substituents positively or negatively influence biological activities. Notably, the VIP plots highlight the pivotal role of substituents at R₁ in determining the biological outcomes in both *Xoc* and *Xoo*, while the ring or long open chain in R₂ also influences pEC₅₀. Additionally, for *Xoo*, there is a noticeable strong effect of a methyl group present in R₂. The **b** plot underscores the importance of methyl and chlorine substituents at R₁ in enhancing biological activity, while the aforementioned groups in R₂ tend to decrease the pEC₅₀ values. Based on these findings, and considering that compounds **45**, **71**, **75**, and **87** demonstrated good performances against *Xoc* (pEC₅₀ > 6.0), and compounds **64** and **68** exhibited high pEC₅₀ values against *Xoo* (≈ 6.5), the pEC₅₀ data for the proposals were estimated using the PLS- and SVR-based models.

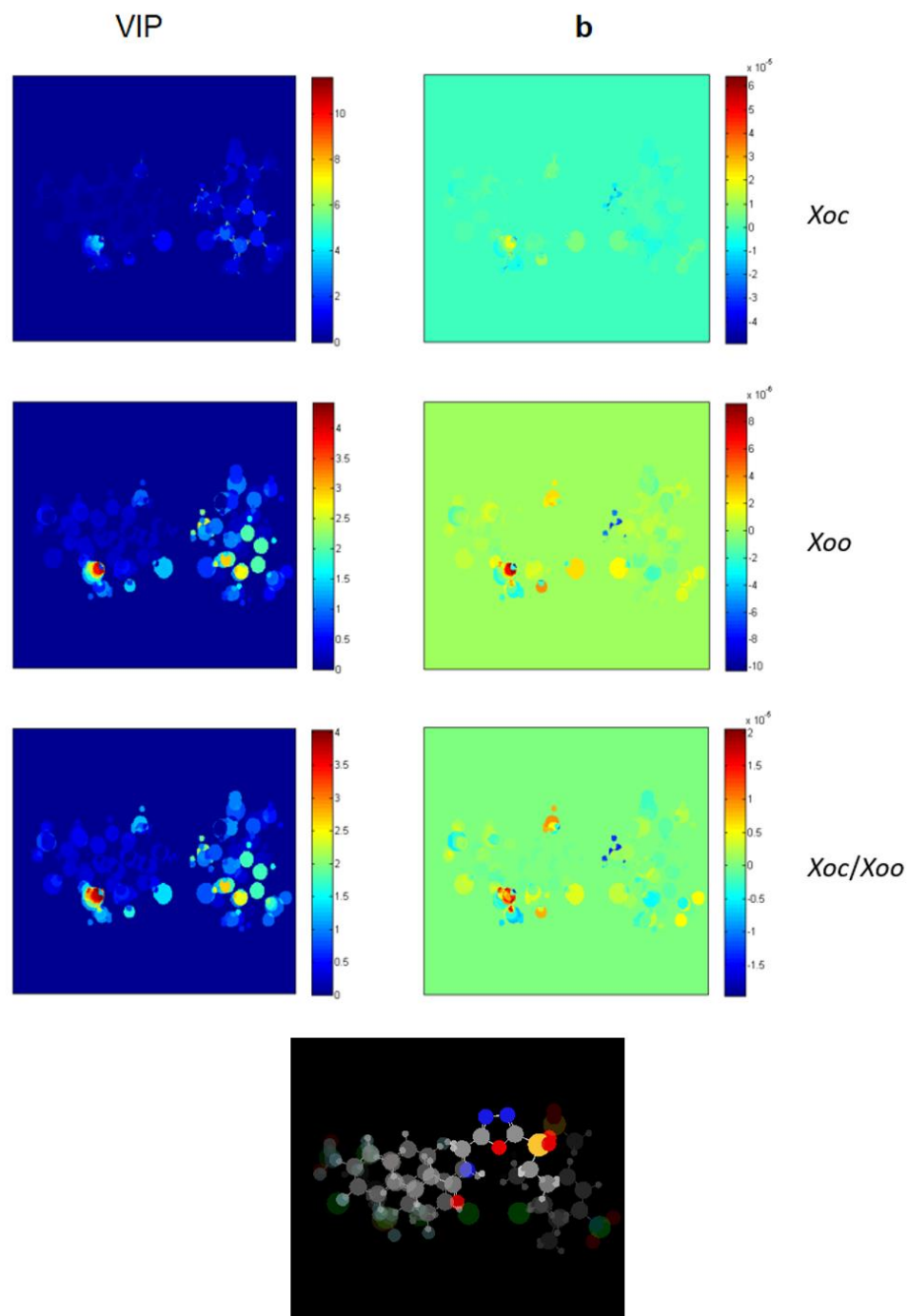
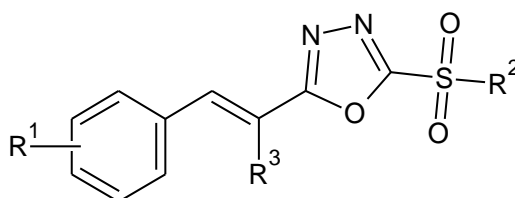


Figure 3. MIA plots indicating the influence of substituents on the pEC_{50} values (VIP) and how they affect (decreasing or increasing) the bioactivities (**b**). Gradient colors from dark blue to dark red indicate an influence of substituents ranging from negligible to high (VIP) and a negative to positive effect on pEC_{50} (**b**). Bottom: overlaid images demonstrating the congruent scaffold (1,3,4-oxadiazole) and the variable moieties (more fuzzy atoms).

Among the 35 proposals (**P1–P35**) originating from combinations of substructures found within the most active compounds in the dataset, certain ones exhibited synergistic effects, showing estimated pEC₅₀ values surpassing those of the parent compounds (Table 4). For instance, **P21** and **P22** displayed superior performance compared to most *Xoc* inhibitors, while **P20**, **P22**, **P25**, **P33**, and **P34** were predicted to significantly enhance activity against *Xoo*. Notably, candidates **P21**, **P22**, and **P25** were projected to have a substantial impact on both targets simultaneously, suggesting promise as antibacterials against *Xoc* and *Xoo*. As anticipated, the most prominent proposals feature 2,4-diCl substituents at R₁, while CH₃ at R₃ is also present in these compounds. Given the superior reliability of SVM predictions, as evidenced by modeling metrics, the calculated values by SVM are expected to align more closely with experimental outcomes over time.

Table 4. Predicted pEC₅₀ (EC₅₀ in mol L⁻¹) for the proposed 1,3,4-oxadiazoles using the PLS- and SVM-based MIA-QSAR models.



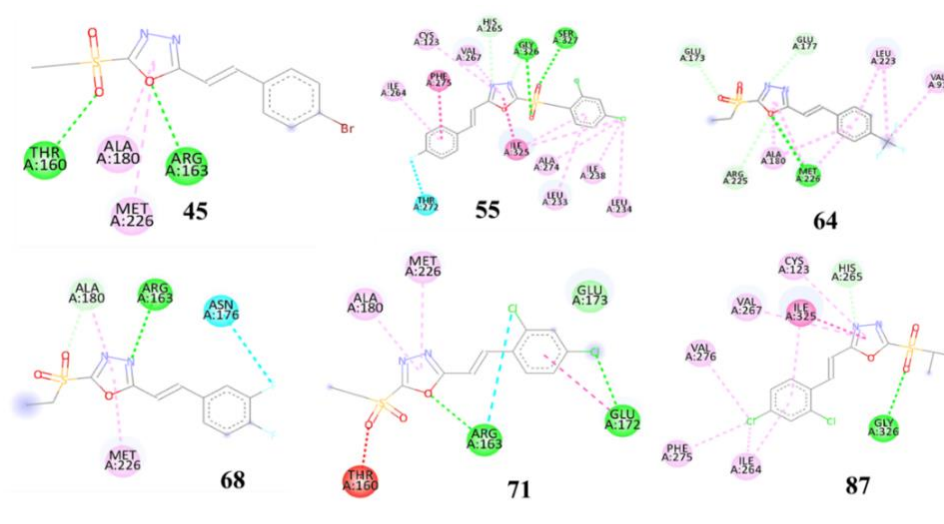
Cpd	R ₁	R ₂	R ₃	PLS			SVM		
				<i>Xoc</i>	<i>Xoo</i>	<i>Xoc/Xoo</i>	<i>Xoc</i>	<i>Xoo</i>	<i>Xoc/Xoo</i>
P1	4-Br	C ₂ H ₅	H	5.87	5.70	5.75	5.89	5.88	5.96
P2	4-CF ₃	CH ₃	CH ₃	6.65	6.09	6.47	6.57	6.76	6.90
P3	3,4-di-F	C ₂ H ₅	CH ₃	6.55	5.92	6.46	6.46	7.02	6.66
P4	3,4-di-F	<i>i</i> -C ₃ H ₇	H	5.53	5.92	5.81	5.52	6.28	5.70
P5	4-OH	CH ₃	CH ₃	6.54	5.92	6.36	6.70	6.46	6.64
P6	H	<i>i</i> -C ₃ H ₇	H	4.73	5.29	4.93	4.87	5.23	4.92
P7	4-Br, 2-Cl	C ₂ H ₅	H	6.13	6.04	6.29	6.08	6.32	6.26

P8	4-NO ₂ , 2-Cl	<i>i</i> -C ₃ H ₇	H	6.08	6.26	6.45	5.89	5.99	6.24
P9	4-Br	<i>i</i> -C ₃ H ₇	H	5.75	5.71	5.73	5.71	5.73	5.71
P10	2-Cl	C ₂ H ₅	H	5.10	5.51	5.47	5.18	5.19	5.11
P11	2-Cl	<i>i</i> -C ₃ H ₇	H	4.99	5.51	5.44	5.00	5.43	5.42
P12	4-Cl	<i>i</i> -C ₃ H ₇	H	5.61	5.77	5.73	5.62	5.66	5.75
P13	4-NO ₂	CH ₃	H	5.95	5.93	5.96	5.88	5.91	5.73
P14	4-NO ₂	CH ₃	CH ₃	6.86	6.04	6.61	6.71	6.50	6.75
P15	4-NO ₂	C ₂ H ₅	CH ₃	6.83	6.03	6.59	6.70	6.79	6.64
P16	4-NO ₂	<i>i</i> -C ₃ H ₇	CH ₃	6.71	6.13	6.58	6.59	6.47	6.14
P17	4-Br	CH ₃	H	5.89	5.71	5.78	5.89	5.65	5.67
P18	4-Br	CH ₃	CH ₃	6.80	5.82	6.43	6.72	6.24	6.68
P19	4-OH	C ₂ H ₅	CH ₃	6.51	5.91	6.33	6.69	6.72	6.66
P20	4-CH ₃	<i>i</i> -C ₃ H ₇	CH ₃	6.57	6.34	6.44	6.52	6.72	6.32
P21	2,4-di-Cl	CH ₃	CH ₃	6.93	6.22	6.97	6.83	6.71	6.97
P22	2,4-di-Cl	C ₂ H ₅	CH ₃	6.90	6.21	6.94	6.82	6.92	6.93
P23	4-CF ₃	C ₂ H ₅	CH ₃	6.62	6.09	6.44	6.57	7.10	6.69
P24	2,4-di-Cl	<i>i</i> -C ₃ H ₇	H	5.88	6.22	6.29	5.88	6.26	6.63
P25	2,4-di-Cl	<i>i</i> -C ₃ H ₇	CH ₃	6.79	6.33	6.95	6.71	6.91	7.05
P26	4-NO ₂	CH ₂ Cl	H	5.78	6.05	6.09	5.71	6.14	5.95
P27	4-NO ₂	CH ₂ Cl	CH ₃	6.69	6.16	6.74	6.54	6.78	6.62
P28	4-Br	CH ₂ Cl	CH ₃	6.63	5.94	6.56	6.55	6.52	6.65
P29	4-OH	CH ₂ Cl	H	5.46	5.92	5.83	5.70	6.08	5.99
P30	4-OH	CH ₂ Cl	CH ₃	6.37	6.03	6.49	6.53	6.71	6.66
P31	H	CH ₂ Cl	CH ₃	5.61	5.41	5.73	5.65	5.49	5.51
P32	3,4-di-F	CH ₃	CH ₃	6.58	5.92	6.49	6.47	6.74	6.81
P33	4-CH ₃	CH ₂ Cl	CH ₃	6.55	6.37	6.60	6.48	6.73	6.63
P34	3,4-di-F	<i>i</i> -C ₃ H ₇	CH ₃	6.44	6.03	6.47	6.35	6.94	6.15
P35	4-CF ₃	CH ₃	CH ₃	6.65	6.09	6.47	6.57	6.76	6.90

Docking

Given the availability of the crystal structure of *Xoo* FabH, which is crucial for antibacterial activity [44], docking studies were conducted using this enzyme to gain insights into the interactions governing the bioactivity mentioned above. The active site of *Xoo* FabH analyzed was defined as a subset region near the catalytic triad Cys/His/Asn. The binding site

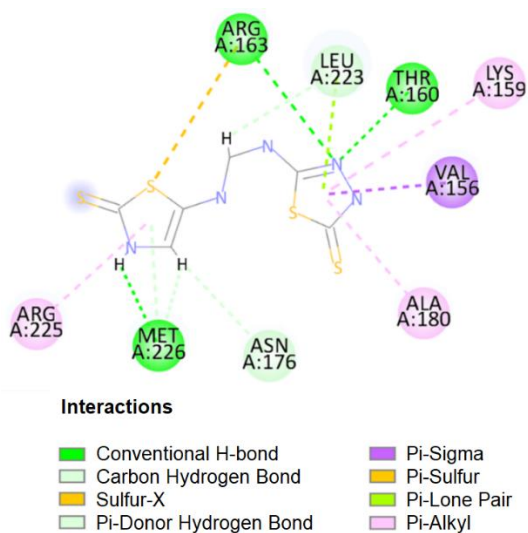
on the protein was defined as extending in the X, Y, and Z directions around the selected cavity (609.28 Å³) with a radius of 15.0 Å. To account for side chain flexibility, amino acid residues within 6.0 Å of the cavity center were selected to remain flexible during the docking simulation. Interactions such as π -alkyl, hydrogen bonding, and carbon-hydrogen bonding are observed between the thiadiazole ring of representative instances and amino acid residues Ala180, Met226, His265, Cys123, Arg163 (Figure 4). Similar interactions can also be observed in the commercial compound bismethiazol used as an antibacterial agent against *Xoo* (Figure 5). Hydrogen bonding interactions are observed between the nitrogen atom of the thiadiazole ring and His265, and between the SO₂ group and Gly326. In the case of compound **87**, hydrogen bonds between the nitrogen atom of the thiadiazole ring and histidine residue (His265), as well as between the sulfonyl group (SO₂) and glycine (Gly326), likely contribute to a stronger and more specific binding to the target. This strong interaction may be the reason why compound **87** shows higher average biological activity against both *Xanthomonas* species *Xoc* and *Xoo*. Compound **55** exhibited the lowest energy, indicating it may have a stable conformation and good interaction with the biological target. However, lower energy does not necessarily translate to higher biological activity; this is possibly the reason why the docking scores of Figure 6 are not suitably correlated with the pEC₅₀ values of the library compounds. Hydrogen bonding interactions of the sulfonyl group and Gly326, as well as the nitrogen atom of the thiadiazole ring and His265, are also observed, contributing to the interactions observed in compound **87**.



Interactions

- | | | |
|---|---|---|
| ■ Conventional H-bond | ■ Halogen (Cl, Br, I) | ■ Pi-Sigma |
| ■ Carbon Hydrogen Bond | ■ Halogen (F) | ■ Pi-Sulfur |
| ■ Sulfur-X | ■ Pi-Pi T-shaped | ■ Pi-Lone Pair |
| ■ Pi-Donor Hydrogen Bond | ■ Amide-Pi Stacked | ■ Pi-Alkyl |
| ■ van der Waals | ■ Alkyl | ■ Unfavorable Bump |

Figure 4. Ligand-enzyme (*Xoo* FabH) interactions leading to the docking scores for representative 1,3,4-oxadiazole library compounds.



Interactions

- | | |
|---|---|
| ■ Conventional H-bond | ■ Pi-Sigma |
| ■ Carbon Hydrogen Bond | ■ Pi-Sulfur |
| ■ Sulfur-X | ■ Pi-Lone Pair |
| ■ Pi-Donor Hydrogen Bond | ■ Pi-Alkyl |

Figure 5. Ligand-enzyme (*Xoo* FabH) interactions leading to the docking score for bismerthiazol.

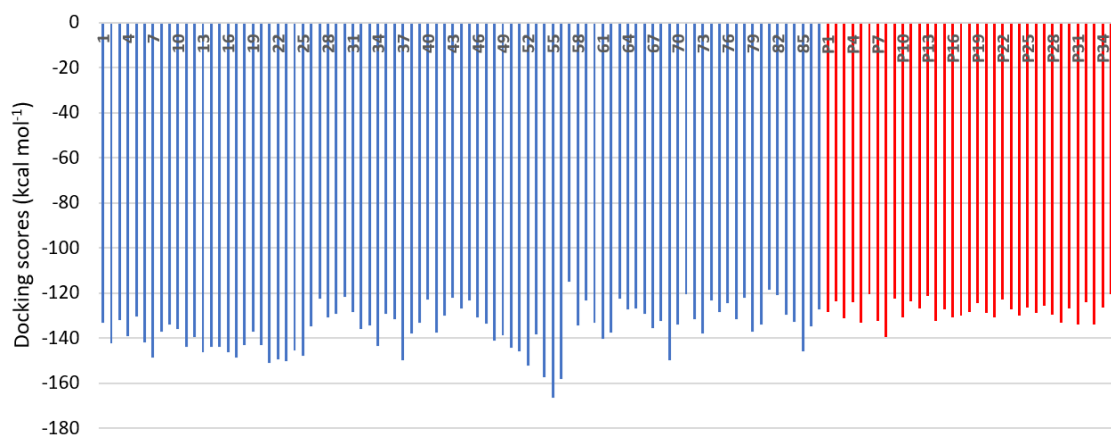


Figure 6. Docking scores (kcal mol^{-1}) for library compounds (blue), proposed compounds (red), and bismertiazol (green) obtained from interactions with the *Xoo* FabH binding pocket. Energy values for most compounds were consistently within the range of -120 to $160 \text{ kcal mol}^{-1}$ with minimal fluctuation, correlating with the pEC_{50} values. These intermolecular interactions offer insights into the compounds' mode of action, contributing to elucidating their antibacterial activities.

The proposed compounds were docked into the *Xoo* FabH active site, and Figure 7 demonstrates interactions with amino acids such as hydrogen bonds, π -sigma, π -alkyl, and π -sulfur interactions. Additionally, it can be observed that the chlorine group in R^1 showed unfavorable interactions with Leu329 in compounds **P22** and **P25**, and the same was observed for R^3 with Asn176 in **P21**. The energy scoring values obtained for compound **P21** were higher than compound **87**, while the values obtained for **P22** and **P25** are close to the energy scoring value of compound **87**. This indicates that these three proposals could be good candidates as antibacterials. Moreover, Figure 8 shows that the selected poses in the *Xoo* FabH active site have similar spatial coordinates for proposals **P22** and **P25**.

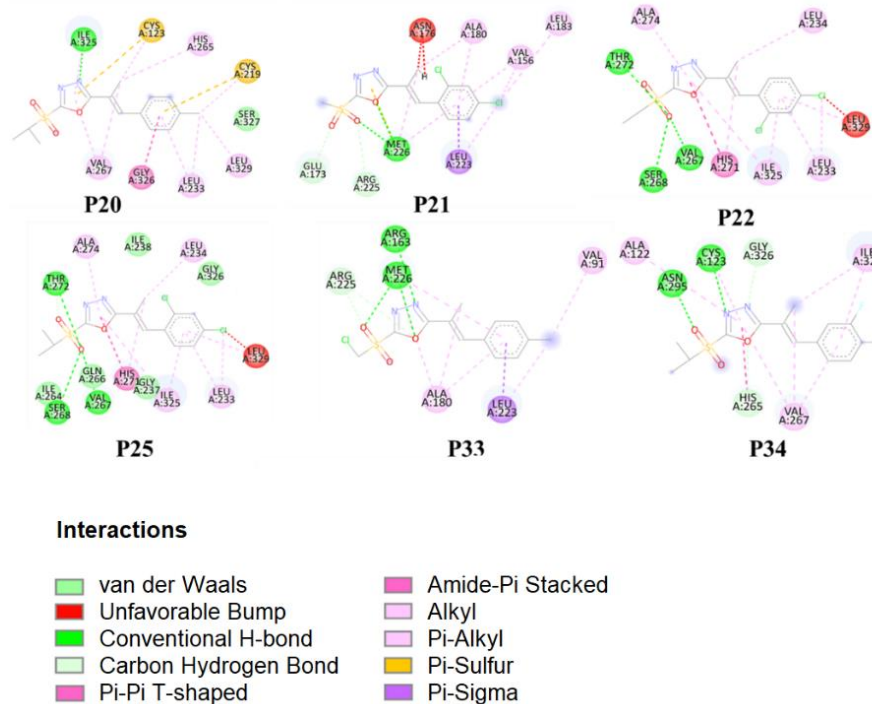


Figure 7. Ligand-enzyme (*Xoo* FabH) interactions leading to the docking scores for representative proposed compounds.

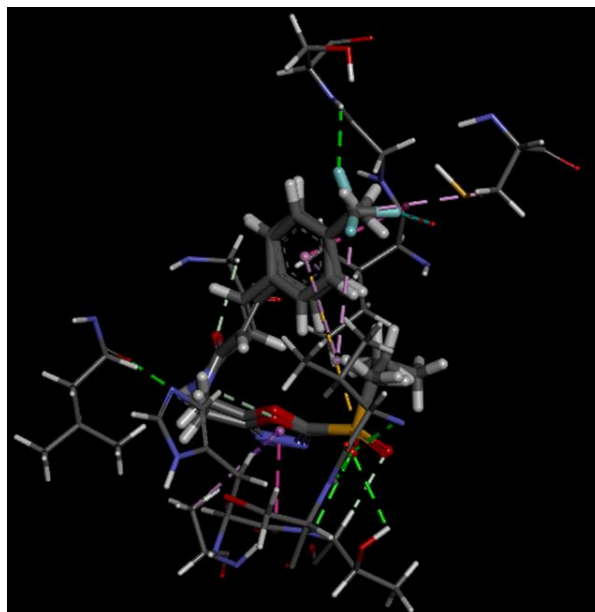


Figure 8. Superposed poses of compounds **P22** and **P25** demonstrating their congruence and similar interactions with key amino acid residues of *Xoo* FabH.

Molecular dynamics

The primary analyses in molecular dynamics (MD) simulations focus on assessing key metrics, including Root Mean Square Deviation (RMSD), Root Mean Square Fluctuation (RMSF), the number of hydrogen bonds (HB) over simulation time, and energy interactions.

The RMSD quantifies the average deviation of atomic positions relative to a reference structure, serving as a measure of structural deviation over time [45]. Figure 9(a) illustrates the RMSD results for the ligand proposals **P21**, **P22**, and **P25** in complex with 3FK5. Ligand **P21** (black) exhibited slightly higher fluctuations, with values ranging between approximately 0.125 and 0.150 nm. In contrast, ligands **P22** and **P25** demonstrated greater stability, with **P25** (green) showing the lowest average RMSD (0.106 nm). The RMSD values for the protein-ligand complexes, shown in Figure 9(b), reveal low fluctuation levels, indicative of stable protein conformations [45]. Among the complexes, the protein bound to **P21** displayed the highest

fluctuations, while those with **P22** and **P25** were more stable, with average RMSD values stabilizing around 0.25 nm.

RMSF evaluates the stability of individual amino acid residues in a protein structure. Higher RMSF values signify greater flexibility, whereas lower values reflect restricted movement, often due to stabilizing interactions like hydrogen bonding [46]. Figure 9(c) depicts the RMSF per residue for each protein-ligand complex. The complex with **P21** tended to show increased RMSF values, while those with **P22** and **P25** reduced RMSF values globally. Residues within the active site (200–300 range) exhibited reduced flexibility, particularly in the **P25** complex, suggesting stronger ligand-residue interactions.

Figures 9(d)–(f) display the hydrogen bond profiles for the protein-ligand complexes. Ligand **P21** (Figure 9(d)) formed a maximum of four hydrogen bonds within the first 60 ns, while **P22** (Figure 9(e)) formed three bonds in the initial 10 ns. Since hydrogen bonding interactions are largely absent in **P22** between 45 and 50 ns, we conducted a detailed analysis of this 5 ns interval. Our findings revealed 11 intermolecular interactions, including π - σ , π - π , alkyl, and π -alkyl types. The presence of numerous weaker interactions, compared to hydrogen bonds, accounts for the stability of the complex, as demonstrated by our simulations. Ligand **P25** (Figure 9(f)) exhibited a peak of five hydrogen bonds after 150 ns and consistently maintained interactions throughout the simulation. The average number of hydrogen bonds was 0.15, 0.34, and 1.03 for **P21**, **P22**, and **P25**, respectively, with **P25** showing the highest interaction frequency and continuity.

Figures 9(g)–(h) present the Coulomb (short-range) and Lennard-Jones (LJ, short-range) interaction energies, which are critical parameters for estimating ligand binding affinity. These energies quantify the interaction strength between the ligand and surrounding amino acid

residues [47]. Across all three proposals, the summed average interaction energies were remarkably similar, approximately $-1268 \text{ kJ mol}^{-1}$, indicating equivalent intermolecular interaction strengths.

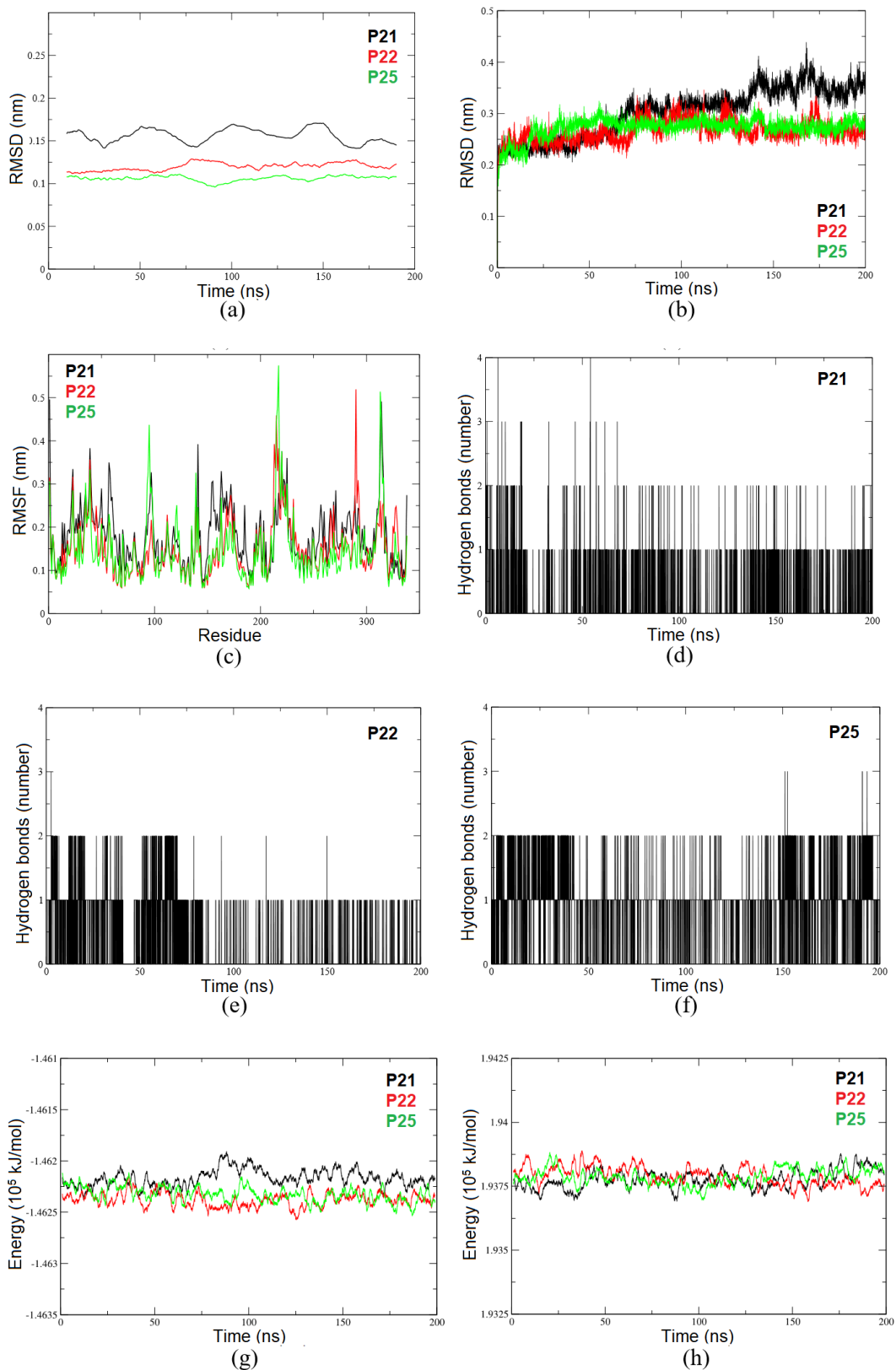


Figure 9. Molecular dynamics results for the 3FK5 complexed with proposals P21, P22 and P25. (a) Ligand-ligand RMSD; (b) Protein-protein RMSD; (c) RMSF per residues; (d)

Hydrogen bonds between 3FK5 and P21; (e) Hydrogen bonds between 3FK5 and P22; (f) Hydrogen bonds between 3FK5 and P25; (g) Short range (SR) Coulomb energy; (h) Short range (SR) Lennard-Jones energy.

Given that the complex with the **P25** proposal demonstrated strong potential in QSAR and molecular dynamics studies, with RMSD analyses confirming high stability for both the ligand and the protein complex, a detailed analysis of the minimum distances between the ligand and the protein complex, a detailed analysis of the minimum distances between the ligand and surrounding amino acid residues in the active site was conducted. A subset of 47 residues was selected for this analysis, and minimum distance graphs were plotted. Of these, seven residues exhibited distance values of less than 3.5 Å (0.35 nm) and RMSF values below 0.150, as summarized in Table 5. The distance threshold aligns with the typical range for hydrogen bond formation, which averages between 0.25 and 0.35 nm [48]. This investigation aimed to identify key amino acids contributing to the stability of the ligand within the 3FK5 complex. The combination of low RMSF values and minimum distances conducive to hydrogen bonding strongly supports the presence of stabilizing intermolecular interactions, thereby explaining the ligand's high affinity for the receptor.

Table 5. Active site residues with lower RMSF and minimum distances to proposal P25 less than 0.35 nm.

Residue	RMSF (nm)	Mean minimum distance (nm)
THR272	0.0919	0.3217
PHE275	0.0973	0.2756
HIS265	0.1043	0.2513
GLY326	0.1055	0.3489
ILE325	0.1067	0.2216
VAL267	0.1332	0.2978
HIS271	0.1400	0.2787

As observed during the docking stage, the molecular dynamics (MD) simulations confirmed the formation of hydrogen bonds between **P25** and the residues Thr272 and Val267. These residues maintained RMSF values and minimum distances consistent with hydrogen bonding throughout the simulation. Beyond the residues identified during docking, the MD analyses revealed additional promising interactions with His265, Gly326, and Ile325. These residues adopted conformations favorable for hydrogen bonding, consistently remaining in proximity to the five-membered heterocyclic ring containing nitrogen and oxygen atoms, as well as the SO₂ moiety in the **P25** structure. These interactions are illustrated in Figure 10. The residues Phe275 and His271 also exhibited average distances below 0.3 nm. However, they did not interact directly with the nitrogen or oxygen atoms of **P25**, indicating a low likelihood of hydrogen bond formation. Instead, Phe275 may have been stabilized through π - π interactions between its benzene ring and the aromatic system of **P25**, while His271 likely engaged in alkyl and π -alkyl interactions.

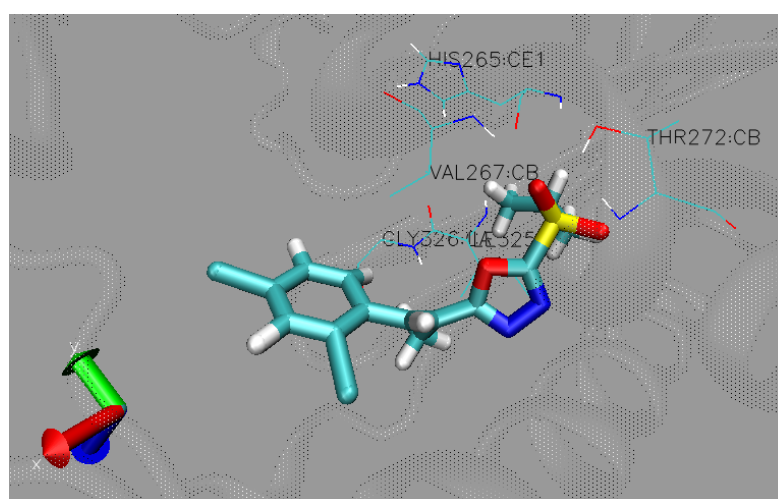


Figure 10. Snapshot of frame 728 from the molecular dynamics simulation, highlighting the P25 proposal and its interactions with key residues. The residues Thr272, His265, Gly326,

Ile325, and Val267 are shown forming hydrogen bonds, which were maintained for the majority of the simulation time.

Overall, our combined approach employs similar modeling strategies to those used in well-established studies with drug-like compounds [49-52], thereby reinforcing the adequacy and reliability of our results.

Conclusions

The QSAR study of antibacterial 1,3,4-oxadiazoles demonstrated that chlorination at the phenyl substituent leads to improved dual activity against both *Xanthomonas* species. Incorporating non-linear regression models, particularly support vector machines, significantly enhances the accuracy of activity prediction. Docking studies revealed that the most promising agrochemical candidate, **P25**, forms hydrogen bond interactions with key amino acid residues, stabilizing it within the *Xoo* FabH enzyme pocket and potentially improving its bioactivity compared to the commercial standard, bismertiazol. Furthermore, molecular dynamics simulations confirmed the structural stability of **P25** and related candidates over time within the enzyme binding site. This highlights that future synthesis and experimental evaluation of these optimized compounds may pave the way for the development of more effective antibacterial agents to combat *Xanthomonas*-related crop diseases.

Acknowledgments

The authors are thankful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, funding code 001), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, grant number 306830/2021-3), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) for the financial support of this research.

References

- [1] Hopkins CM, White FF, Choi SH, Guo A, Leach JE (1992) Identification of a family of avirulence genes from *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. *Mol Plant Microbe Interact* 5:451-495. <https://doi.org/10.1094/mpmi-5-451>.
- [2] Zhou P, Mo X, Wang W, Chen X, Lou Y (2018) The commonly used bactericide bismethiazol promotes rice defenses against herbivores. *Int J Mol Sci* 19:1271. <https://doi.org/10.3390/ijms19051271>.
- [3] Jiang N, Yan J, Liang Y, Shi Y, He Z, Wu Y, Zeng Q, Liu X, Peng J. (2020). Resistance Genes and their Interactions with Bacterial Blight/Leaf Streak Pathogens (*Xanthomonas oryzae*) in Rice (*Oryza sativa* L.)—an Updated Review. *Rice* 13:3. <https://doi.org/10.1186/s12284-019-0358-y>.
- [4] Todeschini R, Consonni V, Ballabio D, Grisoni F (2020) Chemometrics for QSAR Modeling. In: Brown SD, Tauler R, Walczak B (eds) *Comprehensive Chemometrics*, Elsevier, Amsterdam. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14703-1>.
- [5] Mkhayar K, Elkhatabi K, Elkhatabi R, Haloui R, Daoui O, Edache EI, Chtita S, Elkhatabi S (2023) Evaluation of dimedone-derived compounds as inhibitors against human colon cancer: Insights from 2D-QSAR, ADMET prediction, Osiris, Molinspiration, and molecular modeling. *Chin J Anal Chem* 51:100330. <https://doi.org/10.1016/j.cjac.2023.100330>.
- [6] Edache EI, Uzairu A, Mamza PA, Shallangwa GA, Azam M, Min K (2023) Methimazole and propylthiouracil design as a drug for anti-graves' disease: Structural studies, Hirshfeld surface analysis, DFT calculations, molecular docking, molecular

- dynamics simulations, and design as a drug for anti-graves' disease. *J Mol Struct* 1289:135913. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2023.135913>.
- [7] Ugbe FA, Shallangwa GA, Uzairu A, Abdulkadir I, Edache EI, Al-Megrin WAI, Al-Shouli ST, Wang Y, Abdalla M (2023) Cheminformatics-based discovery of new organoselenium compounds with potential for the treatment of cutaneous and visceral leishmaniasis. *J Biomol Struct Dyn* 42:13830-13853. <https://doi.org/10.1080/07391102.2023.2279269>.
- [8] Edache EI, Uzairu A, Mamza PA, Shallangwa GA, Yagin FH, Samee NA, Mahmoud NF (2023) Combining docking, molecular dynamics simulations, AD-MET pharmacokinetics properties, and MMGBSA calculations to create specialized protocols for running effective virtual screening campaigns on the autoimmune disorder and SARS-CoV-2 main protease. *Front Mol Biosci* 10:18. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2023.1254230>.
- [9] Edache EI, Uzairu A, Mamza PA, Shallangwa GA, Ibrahim MT (2024) Evaluation of novel Anti-SARS-CoV-2 compounds by targeting nucleoprotein and envelope protein through homology modeling, docking simulations, ADMET, and molecular dynamic simulations with the MM/GBSA calculation. *Intell Pharm* 2:346-366. <https://doi.org/10.1016/j.ipha.2024.02.008>.
- [10] Edache EI, Uzairu A, Mamza PA, Shallangwa GA, Ibrahim MT (2024) DFT studies on structure, electronics, bonding nature, NBO analysis, thermodynamic properties, molecular docking, and MM-GBSA evaluation of 4-methyl-3-[2-(4-nitrophenyl)-1,3-dioxo-2,3-dihydro-1*H*-isoindole-5-amido]benzoic acid: a potent inhibitor of Graves' disease. *J Umm Al-Qura Univ Appl Sci*. <https://doi.org/10.1007/s43994-024-00132-2>.

- [11] Freitas MR, Barigye SJ, Freitas MP (2015) Coloured chemical image-based models for the prediction of soil sorption of herbicides. *RSC Adv* 5:7547-7553. <https://doi.org/10.1039/c4ra12070a>.
- [12] Barigye SJ, Duarte MH, Nunes CA, Freitas MP (2016) MIA-plot: A graphical tool for viewing descriptor contributions in MIA-QSAR. *RSC Adv* 6:49604-49612. <https://doi.org/10.1039/c6ra09593c>.
- [13] Trafalis TB, Ince H (2000) Support vector machine for regression and applications to financial forecasting. *Proc IEEE-INNS-ENNS Int J Conf Neural Netw* 6:348-353. <https://doi.org/10.1109/ijcnn.2000.859420>.
- [14] Yao XJ, Panaye A, Doucet JP, Zhang RS, Chen HF, Liu MC, Hu ZD, Fan BT (2004) Comparative study of QSAR/QSPR correlations using support vector machines, radial basis function neural networks, and multiple linear regression. *J Chem Inf Comp Sci* 44:1257-1266. <https://doi.org/10.1021/ci049965i>.
- [15] Mei H, Zhou Y, Liang G, Li Z (2005) Support vector machine applied in QSAR modelling. *Chin Sci Bull* 50:2291-2296. <https://doi.org/10.1007/bf03183737>.
- [16] Shi Y (2021) Support vector regression-based QSAR models for prediction of antioxidant activity of phenolic compounds. *Sci Rep* 11:8806. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88341-1>.
- [17] Darnag R, Minaoui B, Fakir M (2017) QSAR models for prediction study of HIV protease inhibitors using support vector machines, neural networks and multiple linear regression. *Arab J Chem* 10:S600-S608. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2012.10.021>.
- [18] Goodarzi M, Freitas MP, Jensen R (2009) Feature Selection and Linear/Nonlinear Regression Methods for the Accurate Prediction of Glycogen

- Synthase Kinase-3 β Inhibitory Activities. *J Chem Inf Model* 49:824–832.
<https://doi.org/10.1021/ci9000103>.
- [19] Goodarzi M, Freitas MP, Jensen R (2009) Ant colony optimization as a feature selection method in the QSAR modeling of anti-HIV-1 activities of 3-(3,5-dimethylbenzyl) uracil derivatives using MLR, PLS and SVM regressions. *Chemom Intell Lab Sys* 98:123–129. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2009.05.005>.
- [20] Daré JK, Freitas MP (2021) Different approaches to encode and model 3D information in a MIA-QSAR perspective. *Chemom Intell Lab Sys* 212:104286. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2021.104286>.
- [21] Zhao S, Xiao C, Wang J, Tian K, Ji W, Yang T, Khan B, Qian G, Yan W, Ye Y (2020) Discovery of Natural FabH Inhibitors Using an Immobilized Enzyme Column and Their Antibacterial Activity against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *J Agric Food Chem* 68:14204–14211. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c06363>.
- [22] Nanson JD, Himiari Z, Swarbrick CMD, Forwood JK (2015) Structural Characterisation of the Beta-Ketoacyl-Acyl Carrier Protein Synthases, FabF and FabH, of *Yersinia pestis*. *Sci Rep* 5:14797. <https://doi.org/10.1038/srep14797>.
- [23] Chen Y, Luo X, Wang Y, Xing Z, Chen J (2022) Design and synthesis novel amide derivatives containing an 1,3,4-oxadiazole moiety as potential antibacterial agents. *J Heteroc Chem* 59:1160–1168. <https://doi.org/10.1002/jhet.4455>.
- [24] Wang S, Gan X, Wang Y, Li S, Yi C, Chen J, He F, Yang Y, Hu D, Song B (2019) Novel 1,3,4-oxadiazole derivatives containing a cinnamic acid moiety as potential bactericide for rice bacterial diseases. *Int J Mol Sci* 20:1020. <https://doi.org/10.3390/ijms20051020>.

- [25] S. Wang, J. Chen, J. Shi, Z. Wang, D. Hu, B. Song (2021) Novel cinnamic acid derivatives containing the 1,3,4-oxadiazole moiety: Design, synthesis, antibacterial activities, and mechanisms. *J Agric Food Chem* 69:11804-11815.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c03087>.
- [26] Dennington RD, Keith TA, Millam JM (2008) GaussView 5.0, Gaussian, Inc., Wallingford CT.
- [27] Nunes CA, Freitas MP, Pinheiro ACM, Bastos SC (2012) Chemoface: a novel free user-friendly interface for chemometrics. *J Braz Chem Soc* 23:2003–2010.
<https://doi.org/10.1590/S0103-50532012005000073>.
- [28] R 3.5.3 Core Team, R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria (2019).
<http://www.R-project.org/>
- [29] Kiralj R, Ferreira MMC (2009) Basic validation procedures for regression models in QSAR and QSPR studies: theory and application. *J Braz Chem Soc* 20:770–787. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532009000400021>.
- [30] Mitra I, Saha A, Roy K (2010). Exploring quantitative structure–activity relationship studies of antioxidant phenolic compounds obtained from traditional Chinese medicinal plants. *Mol Simul* 36:1067–1079.
<https://doi.org/10.1080/08927022.2010.503326>.
- [31] Roy K, Mitra I, Kar S, Ojha PK, Das RN, Kabir H (2012) Comparative Studies on Some Metrics for External Validation of QSPR Models. *J Chem Inf Model* 52:396–408. <https://doi.org/10.1021/ci200520g>.
- [32] Gramatica P, Sangion A (2016) A historical excursus on the statistical validation parameters for QSAR models: A clarification concerning metrics and

- terminology. *J Chem Inf Model* 56:1127–1131.
<https://doi.org/10.1021/acs.jcim.6b00088>.
- [33] Thomsen R, Christensen MH (2006) MolDock: A new technique for high-accuracy molecular docking. *J Med Chem* 49:3315–3321.
<https://doi.org/10.1021/jm051197e>.
- [34] Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B, Lindahl E. (2015). GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*1–2: 19–25.
<https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>.
- [35] Páll S, Abraham MJ, Kutzner B, Hess B, Lindahl E (2015) Tackling exascale software challenges in molecular dynamics simulations with GROMACS. In: Markidis S, Laure E (eds) *Solving Software Challenges for Exascale*. EASC 2014. *Lecture Notes in Computer Science* 8759:3-27. https://doi.org/10.1007/978-3-319-15976-8_1.
- [36] Malde AK, Zuo L, Breeze M, Stroet M, Poger D, Nair PC, Oostenbrink C, Mark AE (2011) An Automated Force Field Topology Builder (ATB) and Repository: Version 1.0. *J Chem Theory Comput* 7:4026–4037.
<https://doi.org/10.1021/ct200196m>.
- [37] Schmid N, Eichenberger AP, Choutko A, Riniker S, Winger M, Mark AE, van Gunsteren WF (2011) Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7. *Eur Biophys J* 40:843–856. <https://doi.org/10.1007/s00249-011-0700-9>.
- [38] Dolinsky TJ, Czodrowski P, Li H, Nielsen JE, Jensen JH, Klebe G, Baker NA (2007) PDB2PQR: expanding and upgrading automated preparation of biomolecular

- structures for molecular simulations. *Nucl Acids Res* 35:W522–W525.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkm276>.
- [39] Olsson MHM, Søndergaard CR, Rostkowski M, Jensen JH (2011) PROPKA3: Consistent treatment of internal and surface residues in empirical pKa predictions. *J Chem Theory Comput* 7:525–537. <https://doi.org/10.1021/ct100578z>.
- [40] Humphrey W, Dalke A, Schulten K (1996) VMD: Visual molecular dynamics. *J Mol Graph* 14:33-38. <https://doi.org/10.1021/ct100578z>.
- [41] Fujita T, Winkler DA (2016) Understanding the Roles of the “Two QSARs.” *J Chem Inf Model* 56:269–274. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.5b00229>.
- [42] Roy K, Chakraborty P, Mitra I, Ojha PK, Kar S, Das RN (2013) Some case studies on application of “ r_m^2 ” metrics for judging quality of quantitative structure–activity relationship predictions: Emphasis on scaling of response data. *J Comput Chem* 34:1071–1082. <https://doi.org/10.1002/jcc.23231>.
- [43] Shayanfar S, Shayanfar A (2022) Comparison of various methods for validity evaluation of QSAR models. *BMC Chem* 16:63. <https://doi.org/10.1186/s13065-022-00856-4>.
- [44] Licona JSF, Pereira IV, de Faria AC, Daré JK, da Cunha EFF, Freitas MP (2022). In silico-guided proposition of potential nematocidal and antibacterial N-(1,3,4-thiadiazol-2-yl) benzamides. *J Nat Pest Res* 1:100003. <https://doi.org/10.1016/j.napere.2022.100003>.
- [45] Pinitglang S, Saiprajong R, Dussadee T, Ratanakhanokchai K (2012) Structural bioinformatics and molecular dynamics simulations studies of cathepsins as a potential target for drug discovery. *Proc Comput Sci* 11:63–74. <https://doi.org/10.1016/j.procs.2012.09.008>.

- [46] Song X, Bao L, Feng C, Huang Q, Zhang F, Gao X, Han R (2024) Accurate prediction of protein structural flexibility by deep learning integrating intricate atomic structures and cryo-EM density information. *Nat Commun* 15:5538. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-49858-x>.
- [47] Pinitglang S, Saiprajong R, Dussadee T, Ratanakhanokchai K (2012) Structural Bioinformatics and Molecular Dynamics Simulations Studies of Cathepsins as a Potential Target for Drug Discovery. *Proc Comput Sci* 11:63–74. <https://doi.org/10.1016/j.procs.2012.09.008>.
- [48] MacLeod JM, Rosei F (2011) 3.02 - Directed assembly of nanostructures. In: D.L. Andrews, G.D. Scholes, G.P. Wiederrecht (eds.) *Comprehensive Nanoscience and Technology* Academic Press, London. 3:13-68, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374396-1.00098-2>.
- [49] Edache EI, Uzairu A, Mamza PA, Shallangwa GA (2024) 2D-QSAR, docking, molecular dynamics simulations with the mm/gbsa approaches against graves' disease and PTPN22. *Borneo J Pharm* 6:222-228. <https://doi.org/10.33084/bjop.v6i3.4915>.
- [50] Edache EI, Adedayo A, Dawi HA, Ugbe FA (2024) Drug-like screening, molecular docking, molecular dynamics simulations, and binding free energies on the interaction of pyrazole derivatives as inhibitors of lysosomal storage disorders and anticancer activity. *Discov Chem* 1:22 <https://doi.org/10.1007/s44371-024-00025-7>.
- [51] Edache EI, Uzairu A, Mamza PA, Shallangwa GA, Ibrahim MT (2024) Towards designing of some potential new autoimmune disorder inhibitors using crystal structures and Hirshfeld surface analyses in combination with molecular docking and molecular dynamics simulations. *Intell Pharm* 2:204-225. <https://doi.org/10.1016/j.ipha.2023.11.008>

[52] Edache EI, Uzairu A, Mamza PA, Shallangwa GA, Ibrahim MT (2024) Design of some potent non-toxic Autoimmune disorder inhibitors based on 2D-QSAR, CoMFA, molecular docking, and molecular dynamics investigations. *Intell Pharm* 2:688-706. <https://doi.org/10.1016/j.ipha.2023.12.009>.