

# Descobrimiento de novas moléculas com ação fungicida

*MARILENE IAMAUTI*

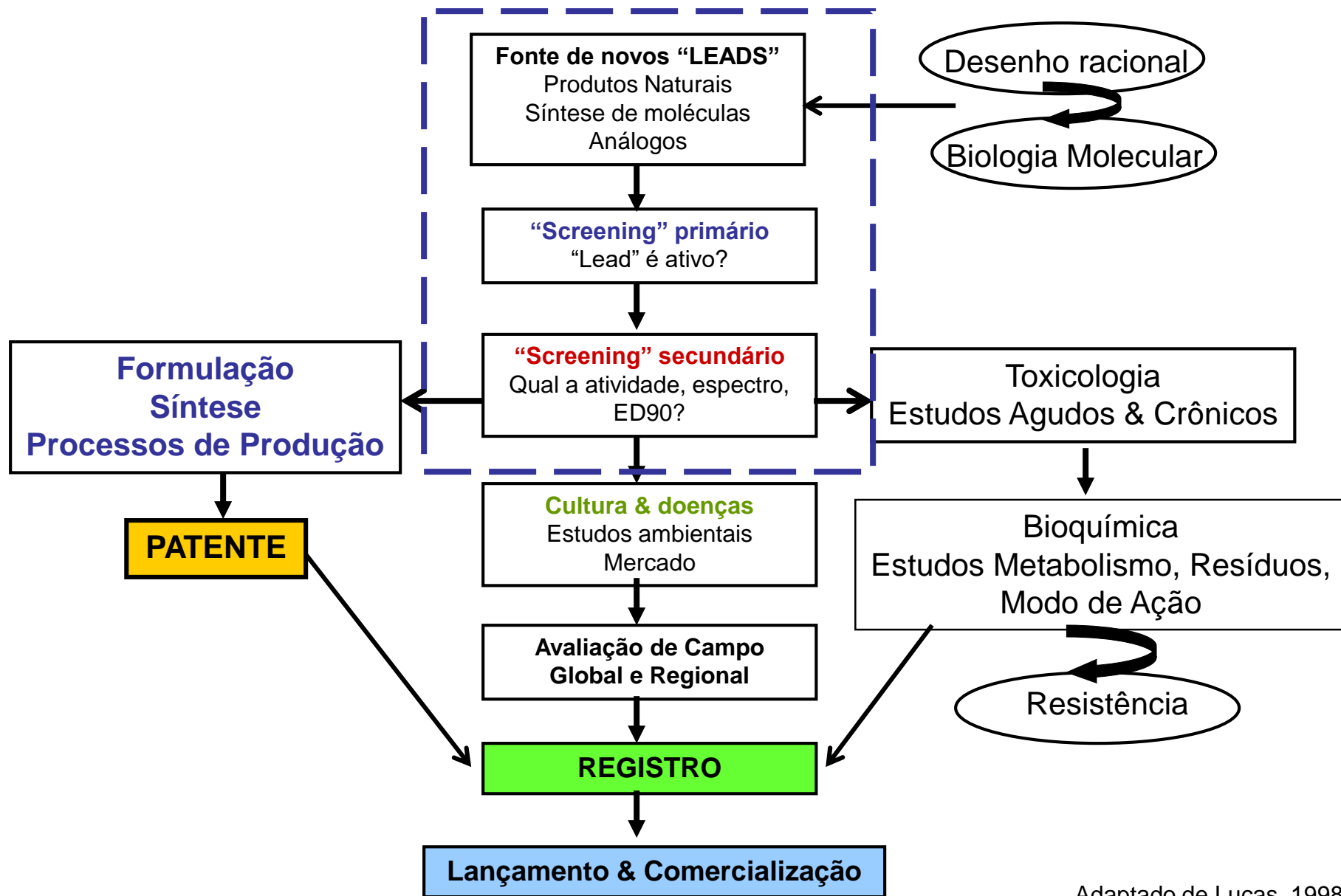
**Disciplina:** *Controle Químico de Doenças*  
6 de abril de 2017  
Piracicaba, SP



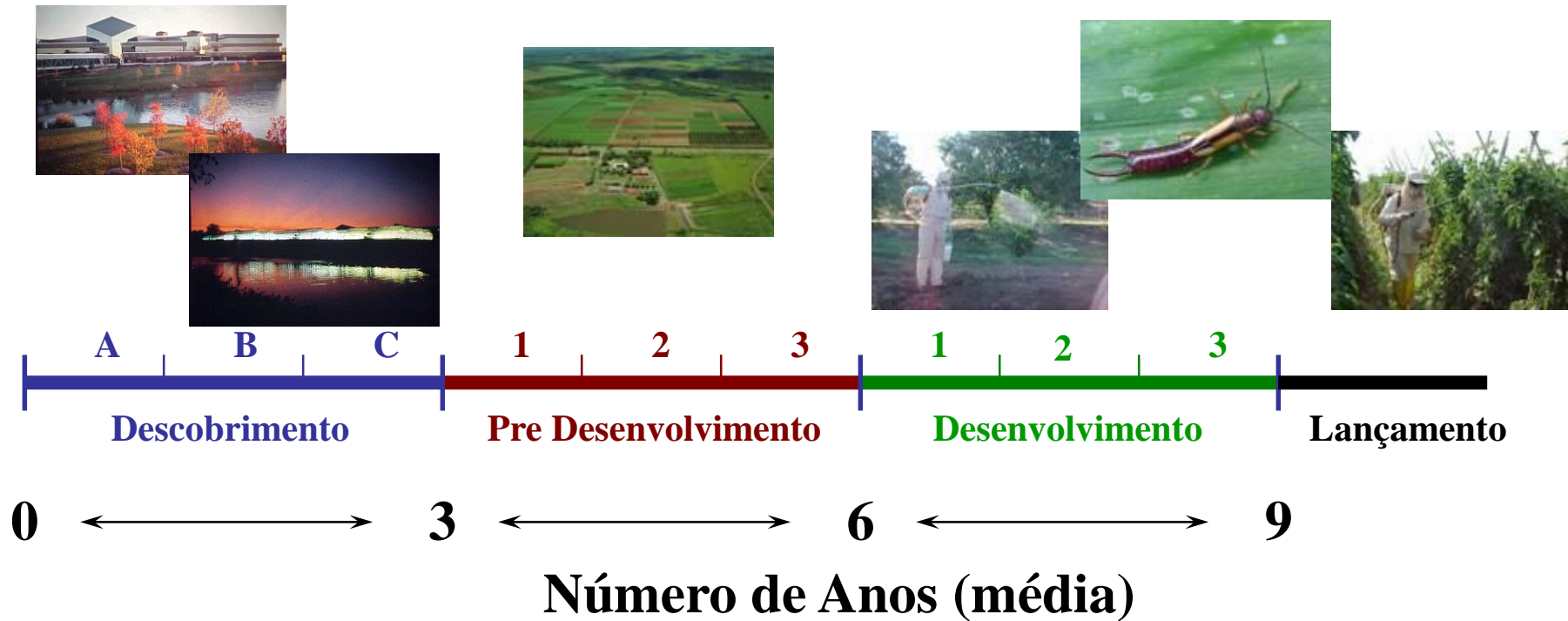
# Literatura consultada

- **Fungicides in crop protection.** Hewitt, H.G. Chapter 3: Fungicide Discovery. Pages 60-85. CAB International, 1998.
- **Plant Pathology and Plant Pathogens.** Lucas, J. A. Chapter 11: Disease management by chemicals. Pages 195-216. Blackwell Science, 1998.

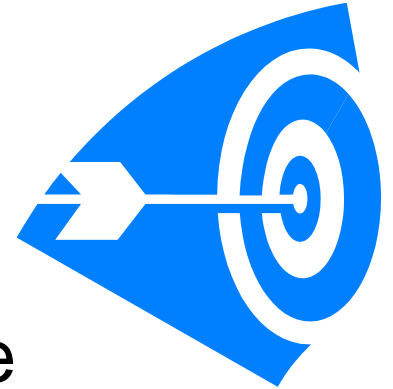
# Atividades envolvidas no **Descobrimento** e Desenvolvimento de um novo FUNGICIDA



# Processo de Pesquisa & Desenvolvimento



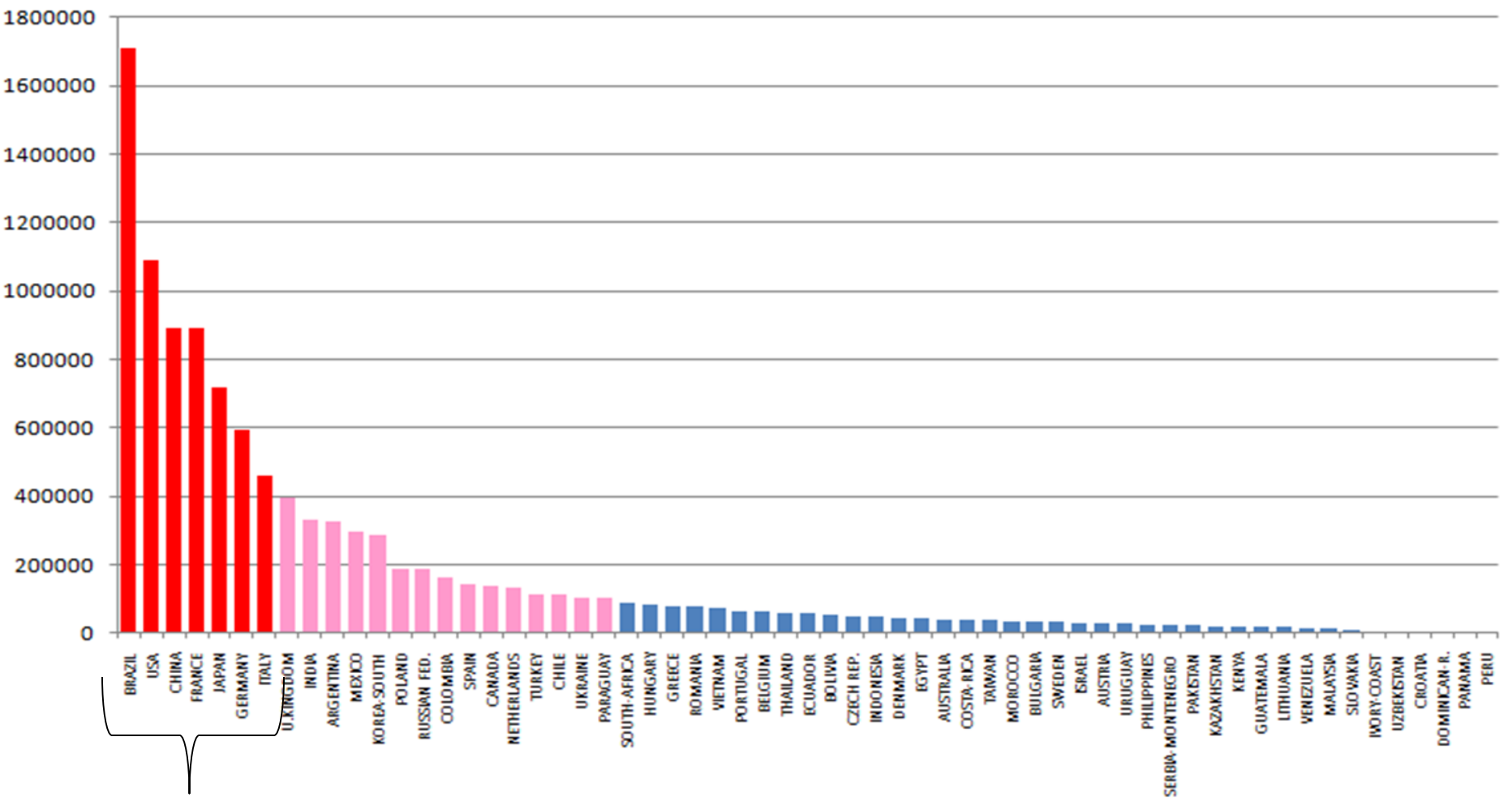
# Como se define o ALVO que um novo fungicida deve controlar?



- **Importância Global (mercado)**
  - Frequência com que a doença ocorre
  - Severidade
  - Perdas ocasionadas pela doença
  - Risco de perdas (\$) caso a doença não seja controlada

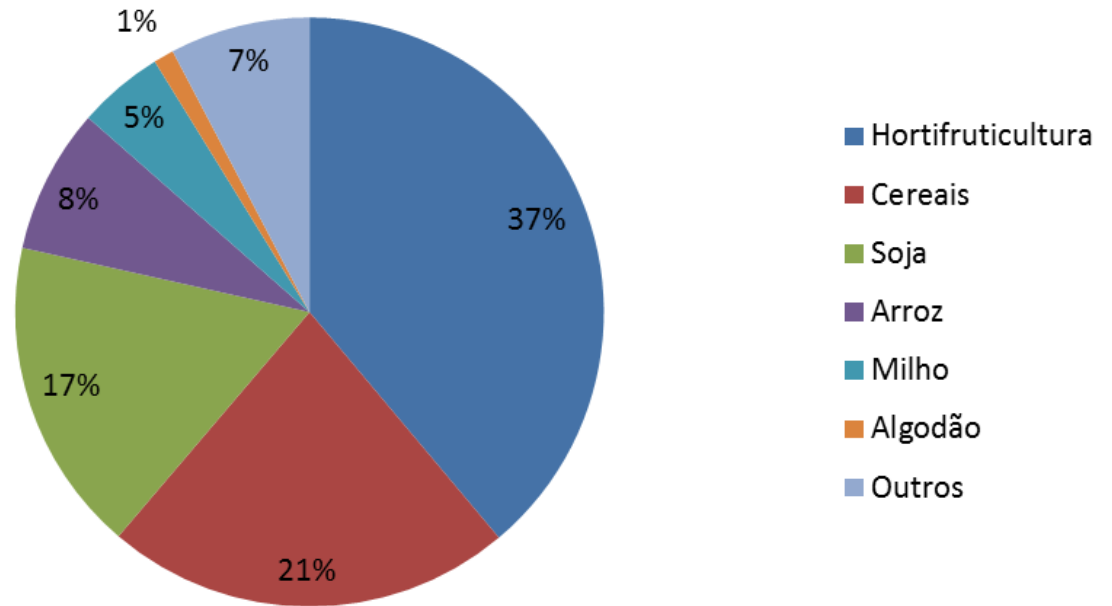
# Mercado Global de Fungicidas: 2013

## total US\$ 15.7 B



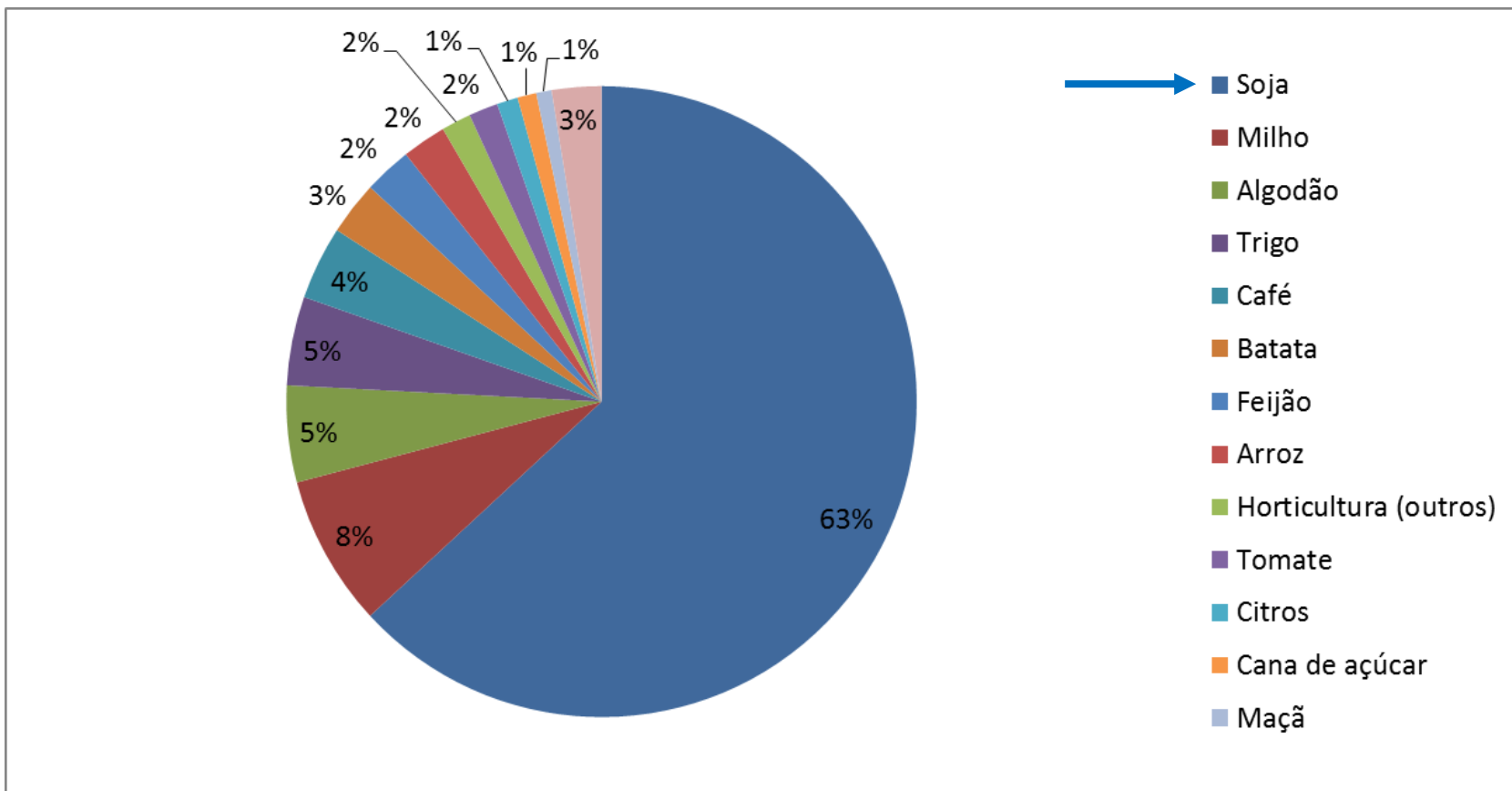
60% do mercado

# Mercado Global de Fungicidas 2015 por cultura (US\$ 13.7 Bn)





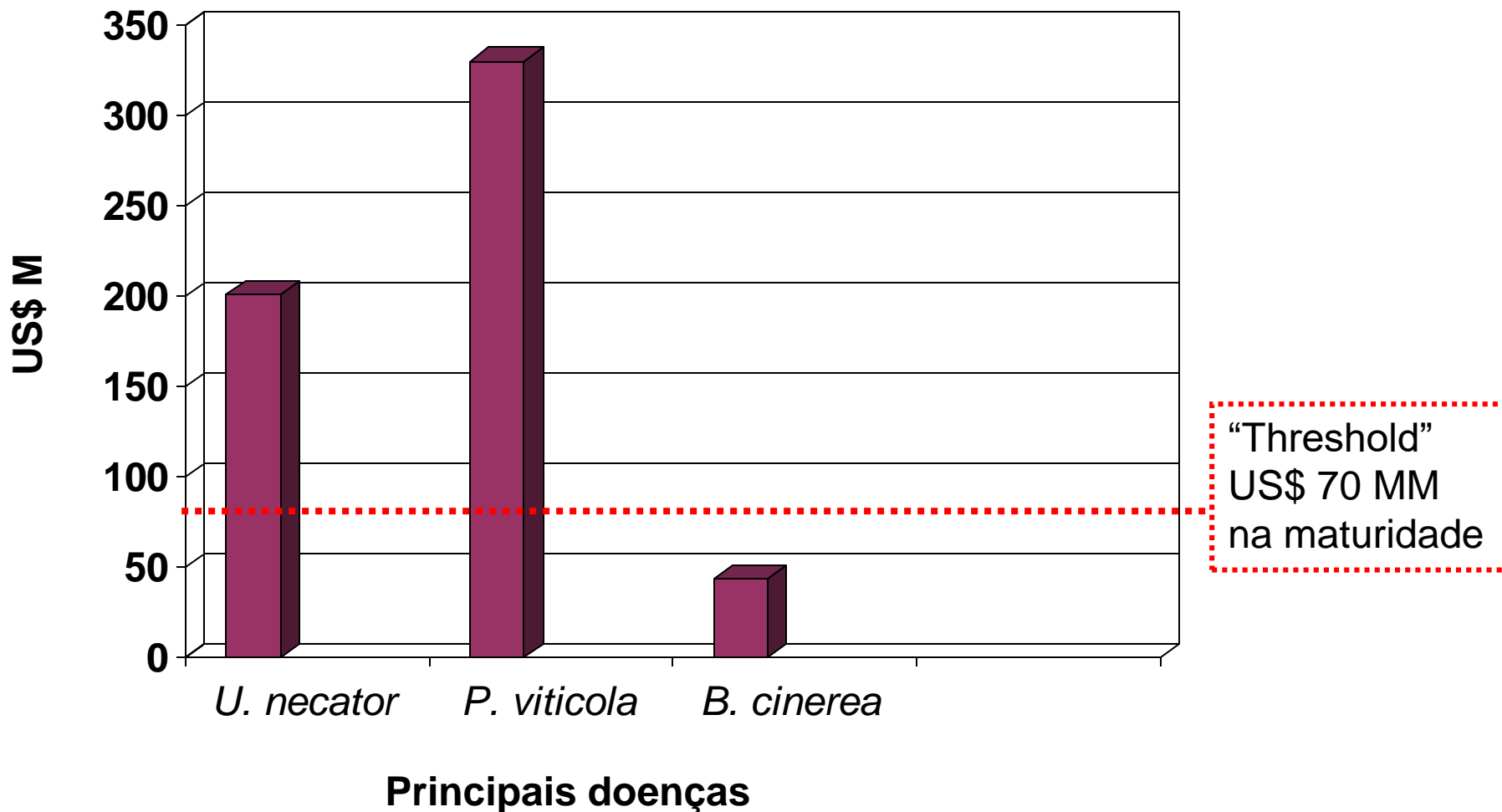
# Mercado Brasileiro de Fungicidas em 2015: US\$ 2.9 B





## Estudo de caso: Desenvolvimento de Fungicidas em uva

Balanço entre distribuição global da cultura e ocorrência da doença





# “Screening” de fungicidas

- **“Screen”**:

Testes (biológicos ou bioquímicos) em série que são necessários para selecionar potenciais candidatos (moléculas) com ação fungicida.

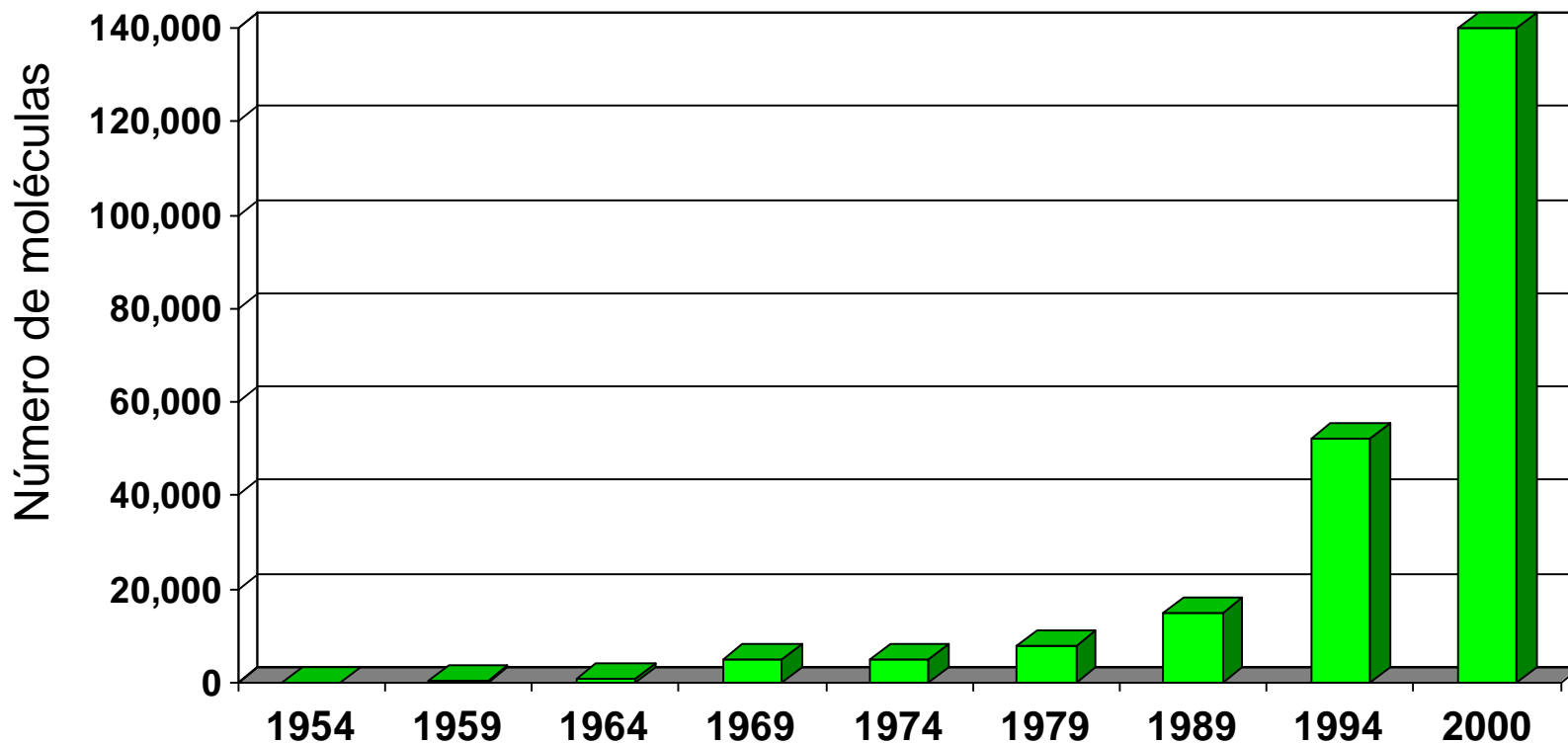
- **Etapas da seleção**: qualquer atributo que seja necessário para o usuário final

- Espectro
- Fitotoxicidade
- Redistribuição na planta
- Modo de ação
- Capacidade de redistribuição na planta

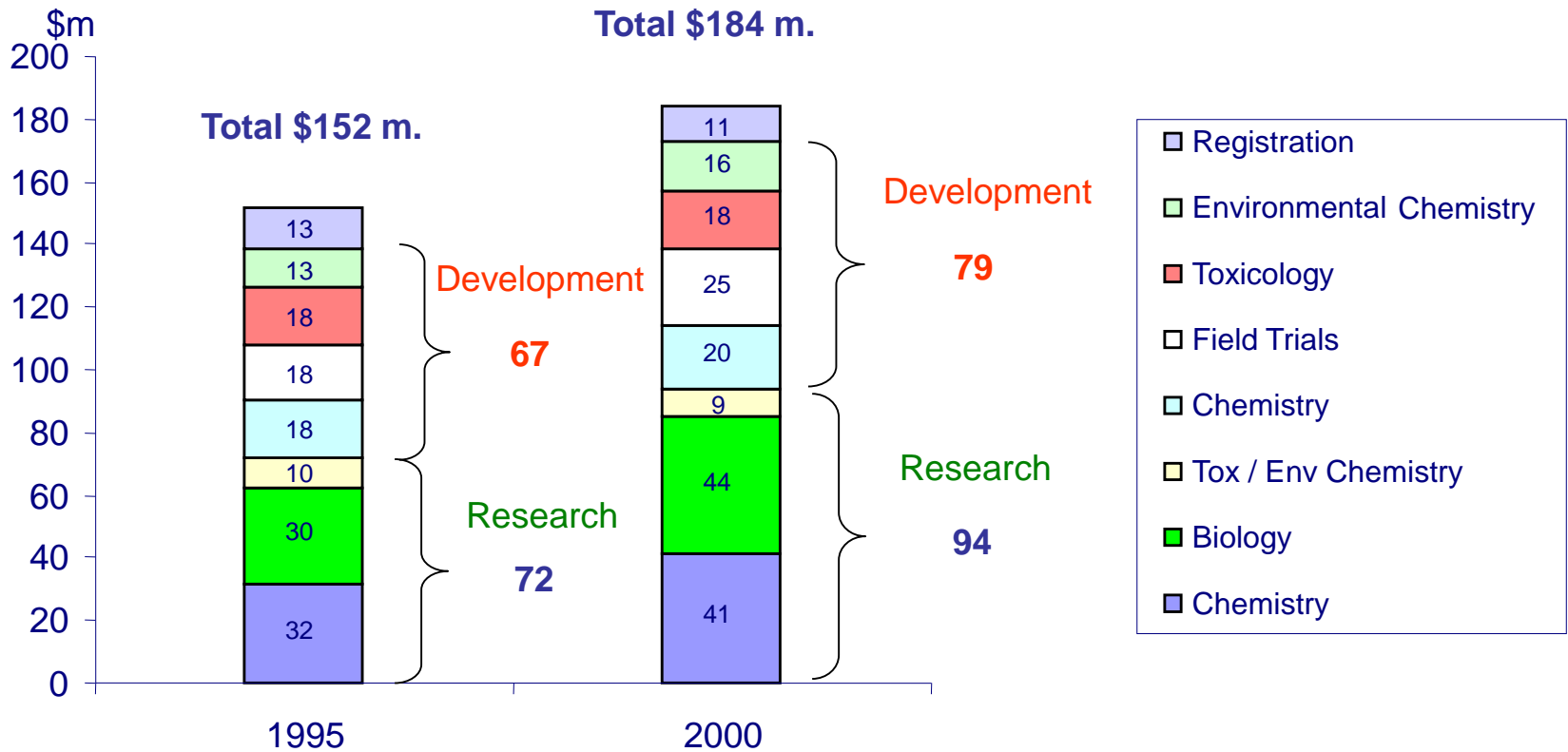
**Condições controladas:  
Laboratório e casa de vegetação**



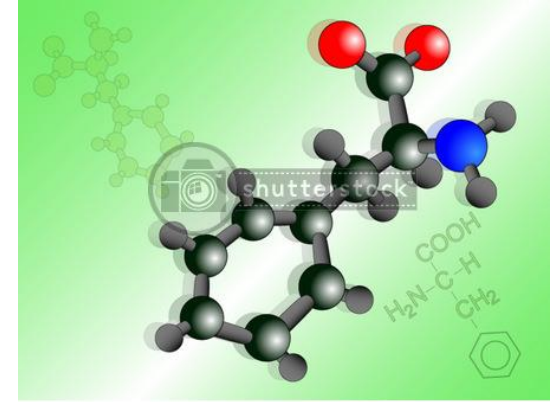
# “Screening” Taxa de sucesso



# Custo do Desenvolvimento de um novo produto



Source : Phillips McDougall study for ECPA and Crop Life America



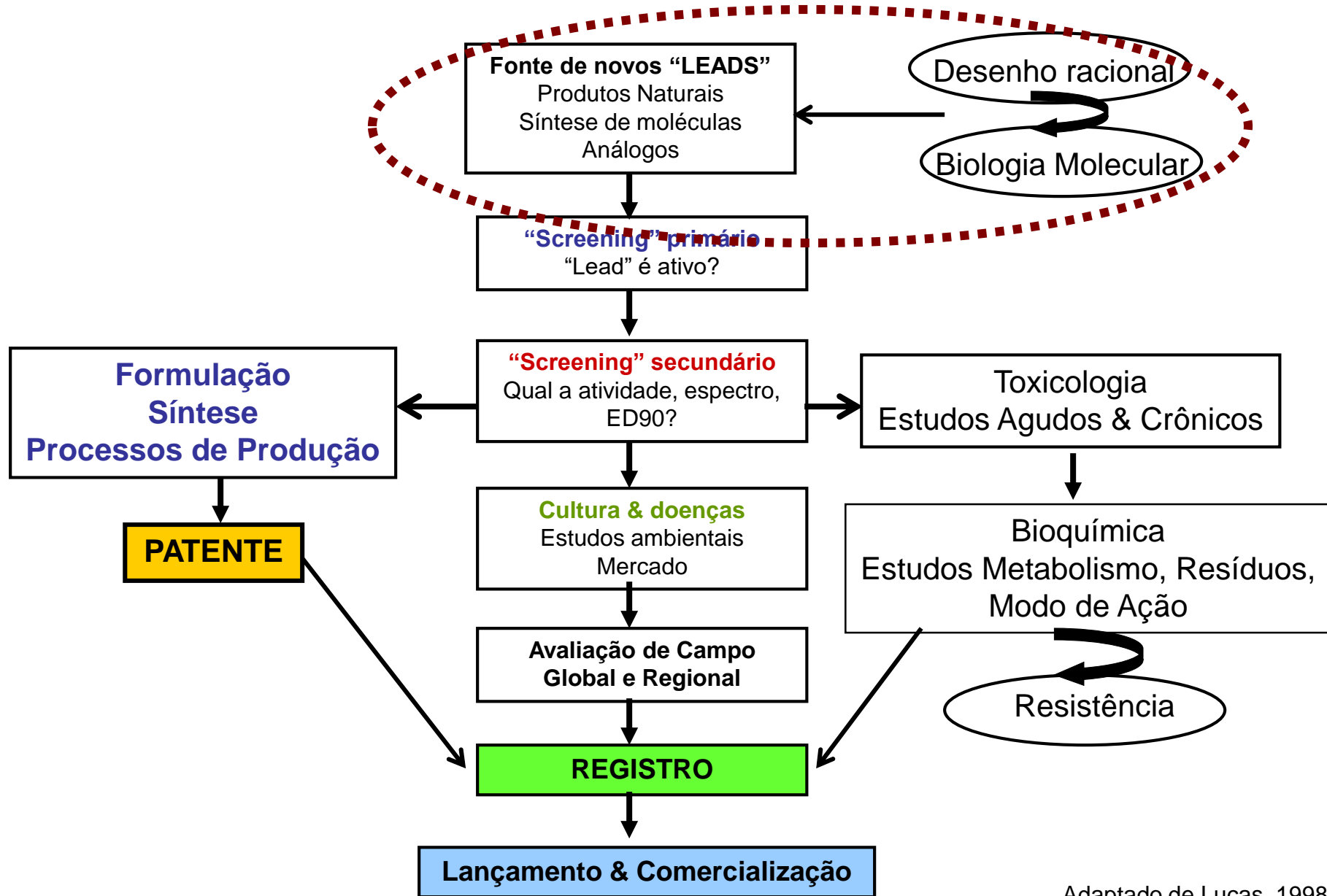
www.shutterstock.com · 2261416

# “Screening” de fungicidas Como achar potenciais “Leads” ?



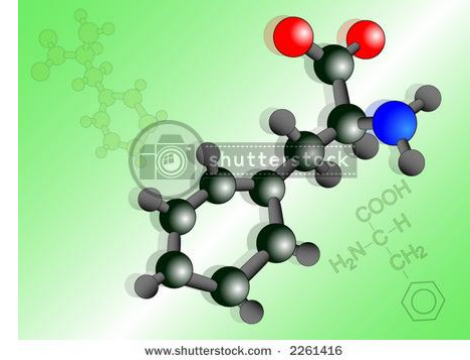
www.shutterstock.com · 2510925

# Atividades envolvidas no descobrimento e desenvolvimento de um novo FUNGICIDA



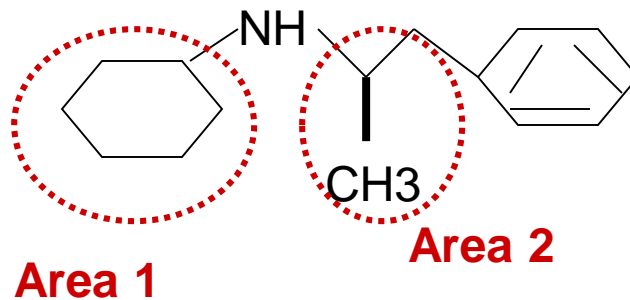
# “Screening” de fungicidas

## O que é um “Lead” ?



- “LEAD”

- Candidato inicial a partir do qual um futuro fungicida poderá ser desenvolvido
- Performance, atividade e características finais poderão ser muito diferentes da molécula inicial





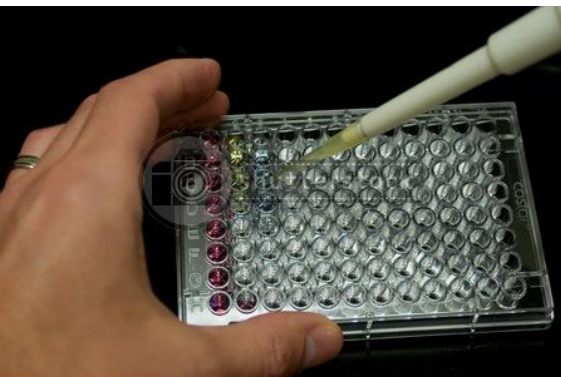
# “Screening” de fungicidas Como achar um “Lead” ?

- Existem 2 abordagens clássicas:

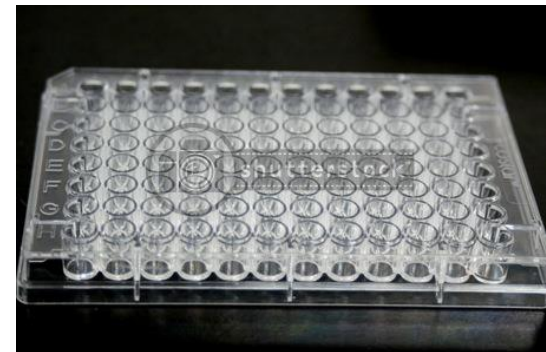
1. **Qualquer atividade deve ser investigada** independente se o alvo é de interesse econômico (**Non-target approach**)
  - **HTS (High-throughput screen)**: ensaios bioquímicos para comparar atividade com padrões já conhecidos
  - **Testes “in vitro” (multi-well plates)**: avalia grande número de moléculas em vários fungos (alvos)



www.shutterstock.com · 1129975



www.shutterstock.com · 1489686



www.shutterstock.com · 1489683

# “Screening” de fungicidas Como achar um “Lead” ?



## 2. Somente investigar atividade em alvos de interesse econômico (Target approach)

- Vantagem de achar “leads” com maior probabilidade de se tornarem produtos comerciais
- Seleção deve ser modificada de acordo com o alvo (banco de dados fica comprometido)
- Testes são geralmente “in vivo”
- Interações físico-químicas estão implícitas na atividade demonstrada (por ex. Redistribuição na planta, translocação etc)



# De onde os “leads” surgem?

- São 3 as principais “fontes” de novos leads:
  - Ao acaso
    - Screening em fontes diversas
    - “Combinatorial chemistry”
  - Síntese de Análogos
    - “Me-too”
    - “In house”
  - Desenho racional



www.shutterstock.com · 2036019



# De onde os “leads” surgem? (cont.)

**Ao acaso (“procurando uma agulha no palheiro”)**

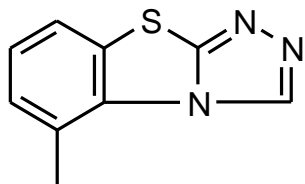
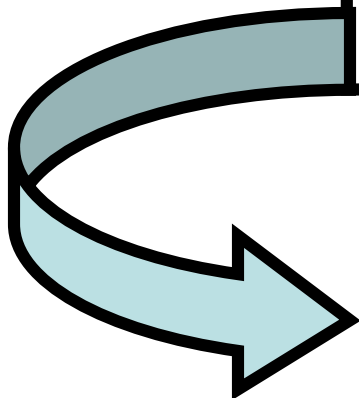
– Screening em fontes diversas

- Library
- Third parties (companhias menores ou instituições de pesquisa)
- Intermediários no processo de produção

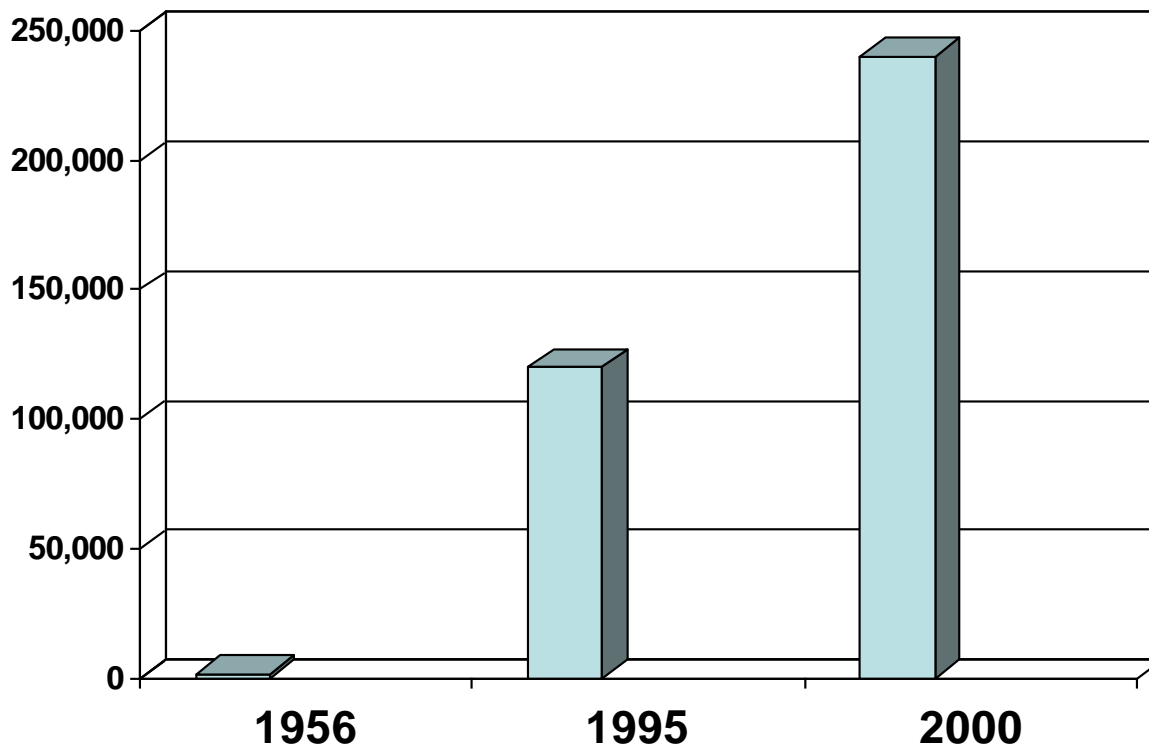


# “Procurando uma agulha no palheiro”

Para cada um “lead- fungicida”  
encontrado este foi o número  
de moléculas avaliadas



**Tricyclazole**  
**(DAS 1976)**



# De onde os “leads” surgem? (cont.)

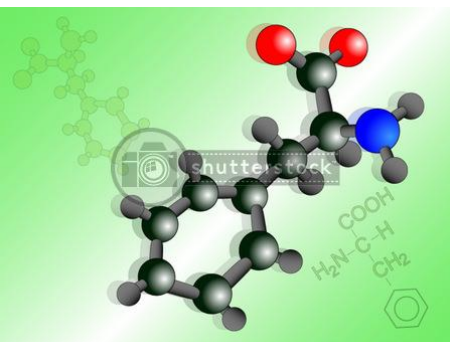
## “Combinatorial chemistry”:

- Uso de uma série de reações com múltiplos reagentes para “criar” uma coleção com milhões de moléculas
- Utilizado na indústria farmacêutica
- Nenhuma garantia que a molécula “criada” não tenha sido descoberta anteriormente
- Vantagem: custo baixo, grande número de moléculas podem ser avaliadas

# De onde os “leads” surgem? (cont.)

## Síntese de Análogo:

- baseia-se na otimização de análogos já conhecidos da companhia (“in – house”) ou de concorrentes (“me-too”)
- Exemplo – triazóis
  - Primeiro em 1973 (Triadimefon – Bayer)

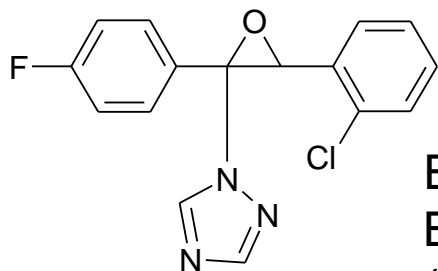


www.shutterstock.com · 2261416

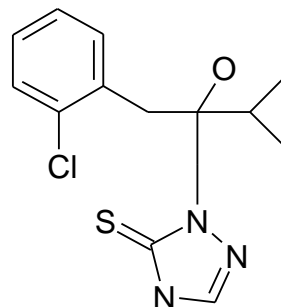




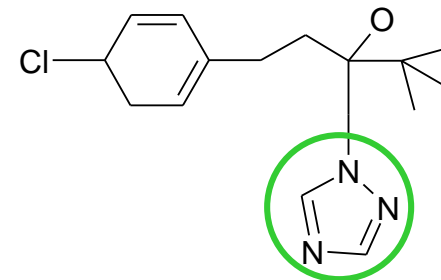
# Inibidores da 14 $\alpha$ -Demethylase - Triazóis



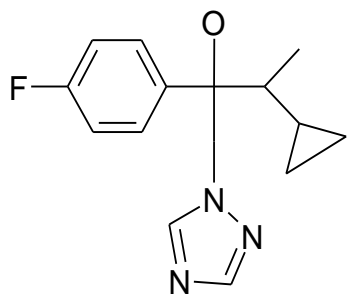
Epoxiconazole  
BASF, 1994  
(cereais)



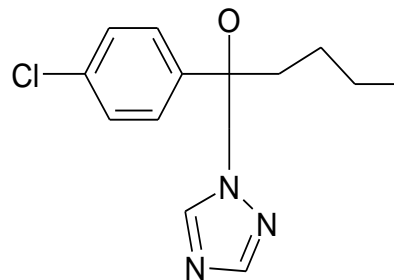
Prothioconazole  
Bayer, 2004



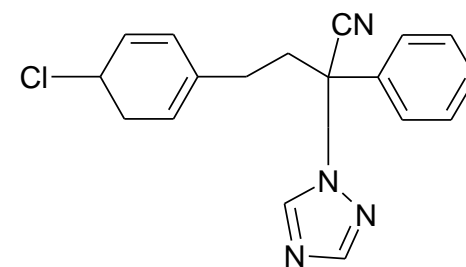
Tebuconazole  
Bayer, 1986  
(cereais)



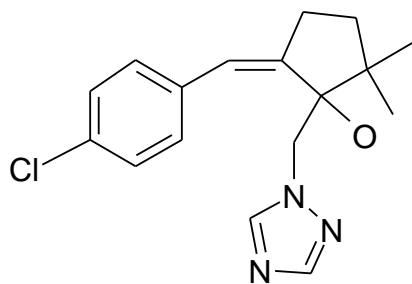
Cyproconazole  
Syngenta, 1986  
(cereais)



Myclobutanil  
DAS, 1984



Fenbuconazole  
DAS, 1991



Triticonazole  
Bayer, 1995  
(cereais)

(ativo contra muitos  
fungos  
fitopatogênicos)

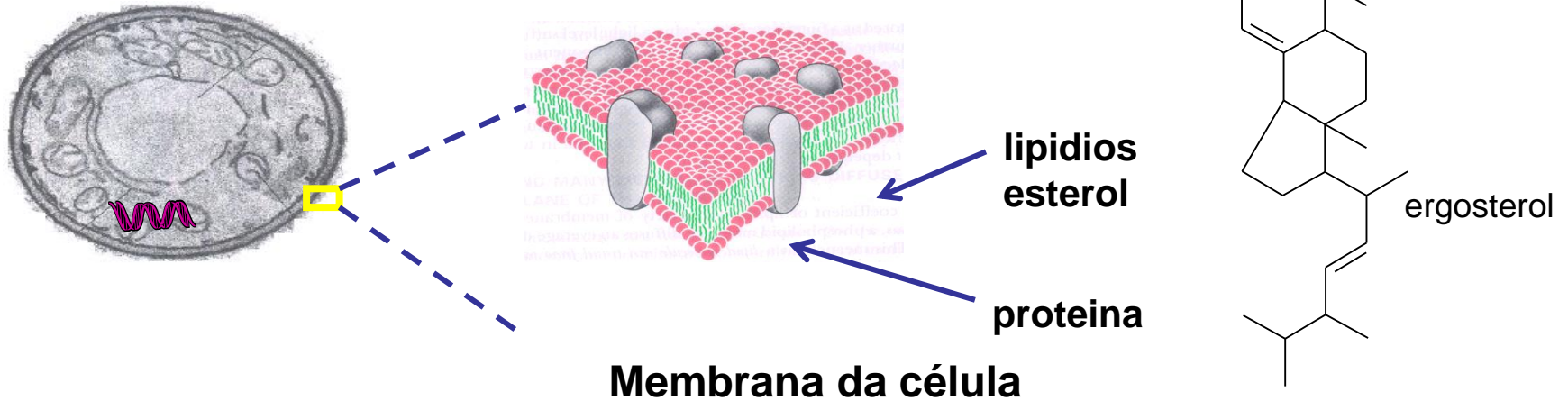
# De onde os “leads” surgem? (cont.)

## Desenho racional:

- Molécula é sintetizada a partir de informações específicas. É necessário conhecer os processos metabólicos do fungo e aonde o fungicida irá atuar.
- Atividade normalmente verificada somente “in vivo”
- Exemplo: inibidores C14-demethylation
  - Fungicidas desta classe inibem a enzima P450 14 $\alpha$  demethylase
  - Conhecimento das propriedades físicas e químicas dos inibidores foi possível desenhar a estrutura química necessária para atuar no sítio de ação.
  - Moléculas descobertas através desta técnica – flutriafol e cyproconazole



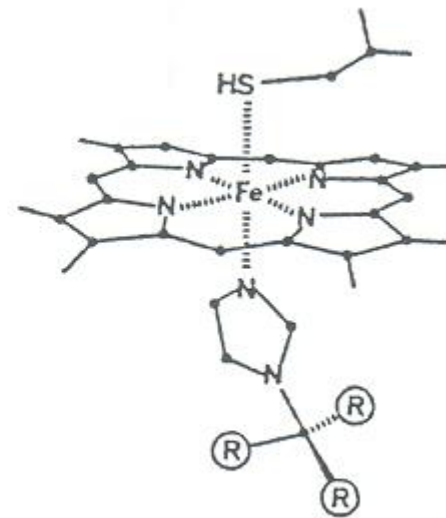
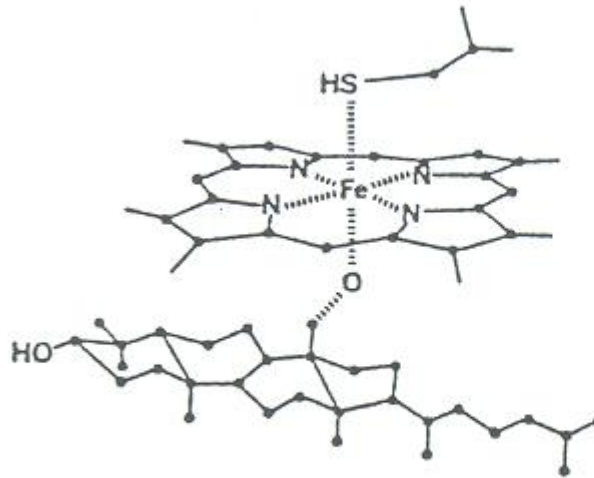
# Biosíntese do Ergosterol



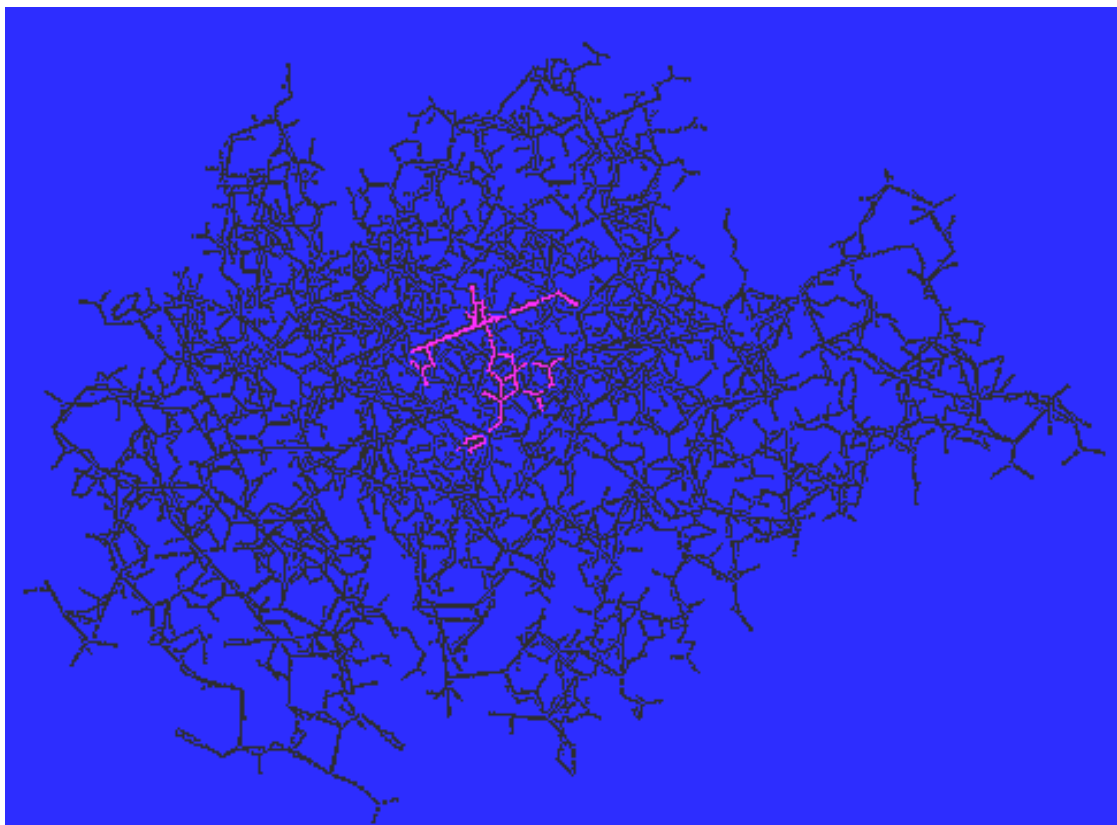
- Ergosterol é o principal esterol da membrana do fungo
  - encontrada em Ascomycetos e Basidiomycetos, **mas não em Oomycetos**
- Essencial para o funcionamento da membrana celular
- Metabolicamente complexa de ser produzida

# Inibidores da biosíntese do Ergosterol

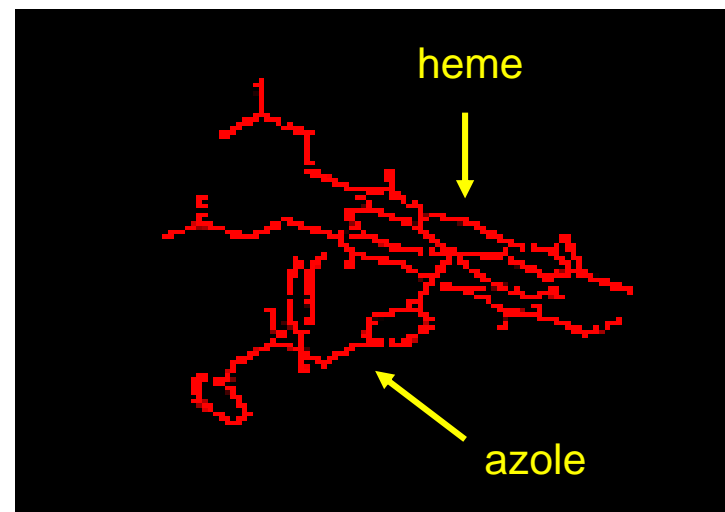
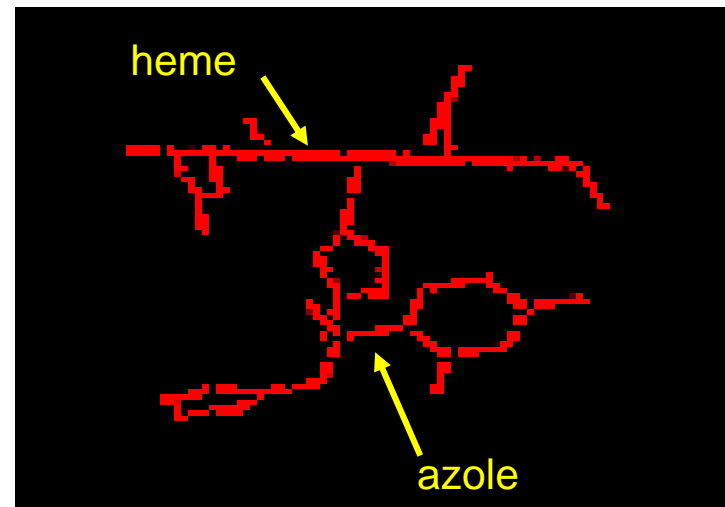
- Características dos inibidores da C-14 demethylase:
  - Radicais lipofílicos aderem ao P-450 enzyme normalmente ocupada pelo  $14\alpha$ -methyl sterol
  - O anel de nitrogênio tem afinidade com o cátion heme do grupo da enzima P-450 e bloqueia oxigênio



# 14 $\alpha$ -Demethylase X-Ray Crystal Structure



Triazole-bound crystal structure of the 14 $\alpha$ -demethylase



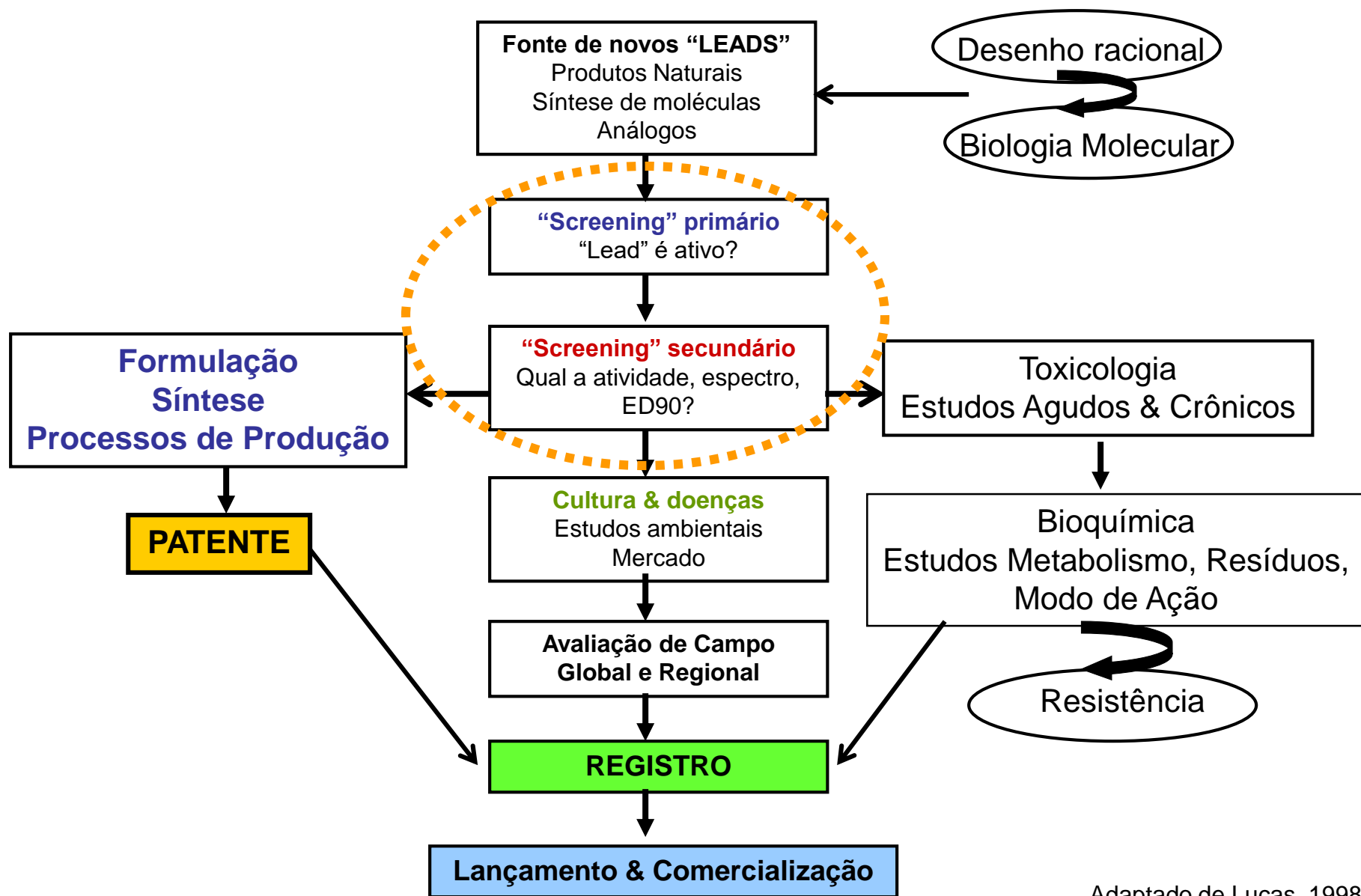


## “Screening” de fungicidas

Como selecionar e caracterizar  
potenciais “Leads” ?



# Atividades envolvidas no descobrimento e desenvolvimento de um novo FUNGICIDA





# Como selecionar e caracterizar potenciais “Leads” ?

- Testes em sequência para avaliar performance dos análogos quanto:
  - ATIVIDADE
    - nos organismos alvos e seletividade ao hospedeiro
  - PERFORMANCE
    - Persistência
    - Mobilidade
    - Método de aplicação
    - Manejo da resistência

# O grande desafio do fitopatologista:

Desenvolver testes confiáveis e que “traduzam” os resultados no campo

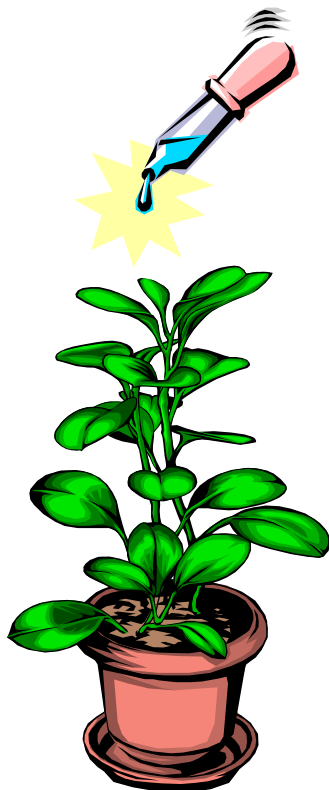
- Plantas padrões e estirpes patogênicas (“linha de montagem de fábrica”)
- Resultados em curto espaço de tempo (10-15 dias)
- Uso de “formulações testes”
  - Diluição em acetona
  - Padrões de CE (concentrado emulsionável)
- Dose Resposta – diluições em série
- Aplicação
  - Volume de calda



# Efeito protetor/ residual dos fungicidas

## Casa-de-vegetação

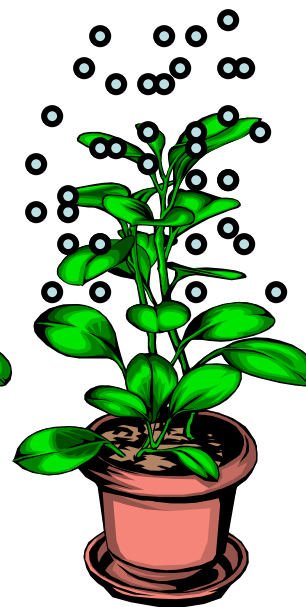
Tratamento com fungicidas



Inoculação com esporos



7 (R1)



14 (R4)



21 (R5)



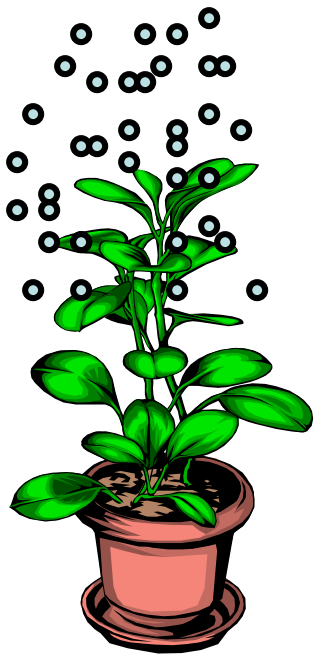
28 (R5.5)

dias após o tratamento

# Efeito CURATIVO dos fungicidas

## Casa-de-vegetação

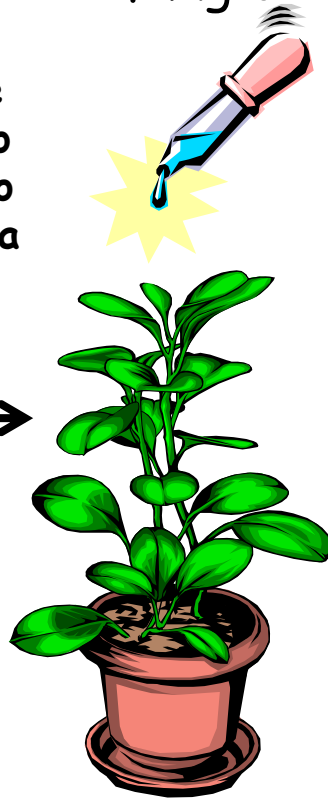
Inoculação  
com esporos



Depende  
do tempo  
incubação  
da doença  
Por ex:  
3 DC



Tratamento  
com  
fungicidas



Avaliação

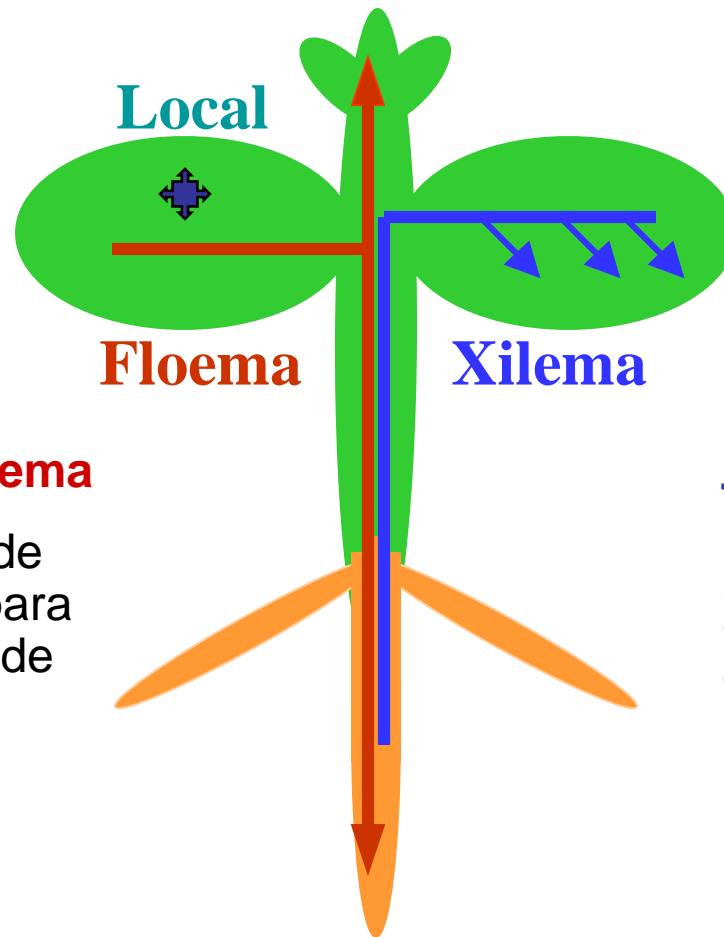


7 (R1)

14 (R4)

dias após o tratamento

# Padrões de Redistribuição de Fungicidas na planta



## Translocação Via Floema

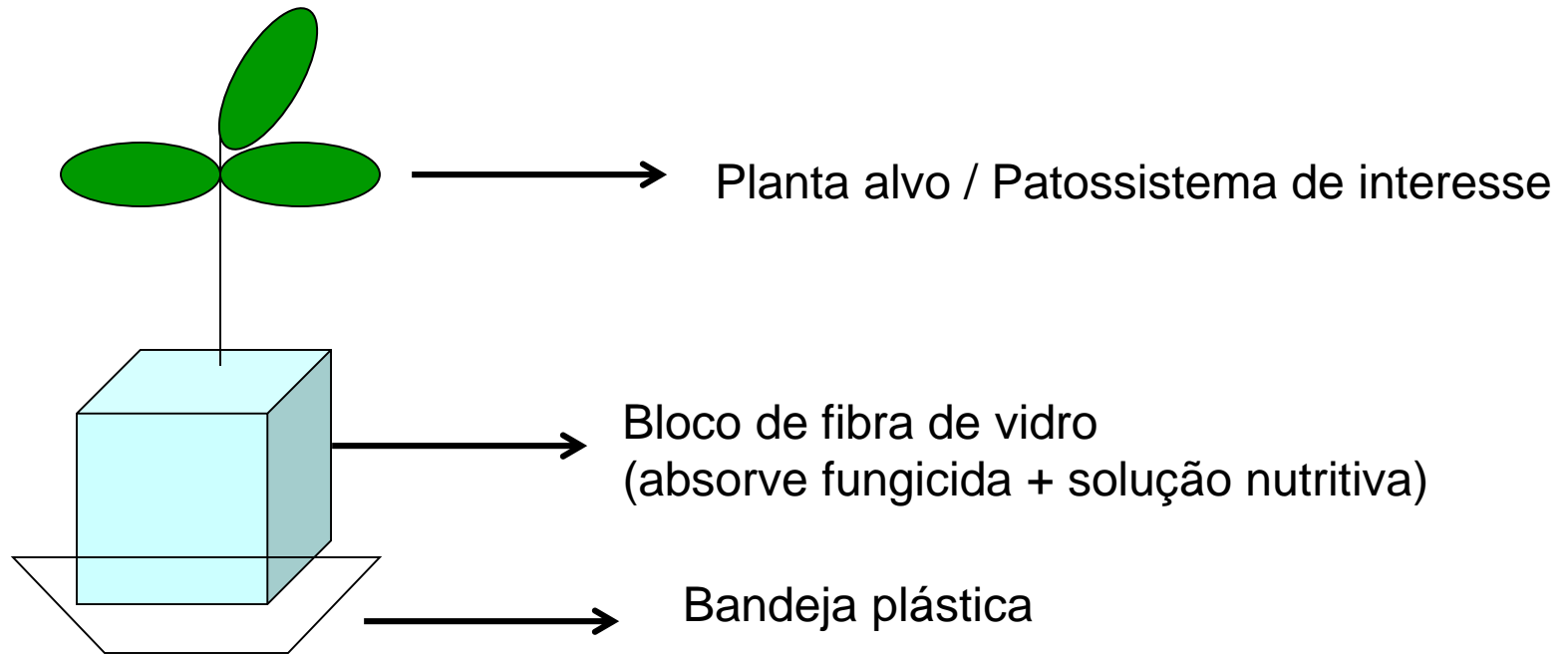
Fluxo ocorre da fonte de produção de energia para as áreas de demanda de energia

## Translocação Via Xilema

Acúmulo nas áreas de alta transpiração (pontas das folhas)

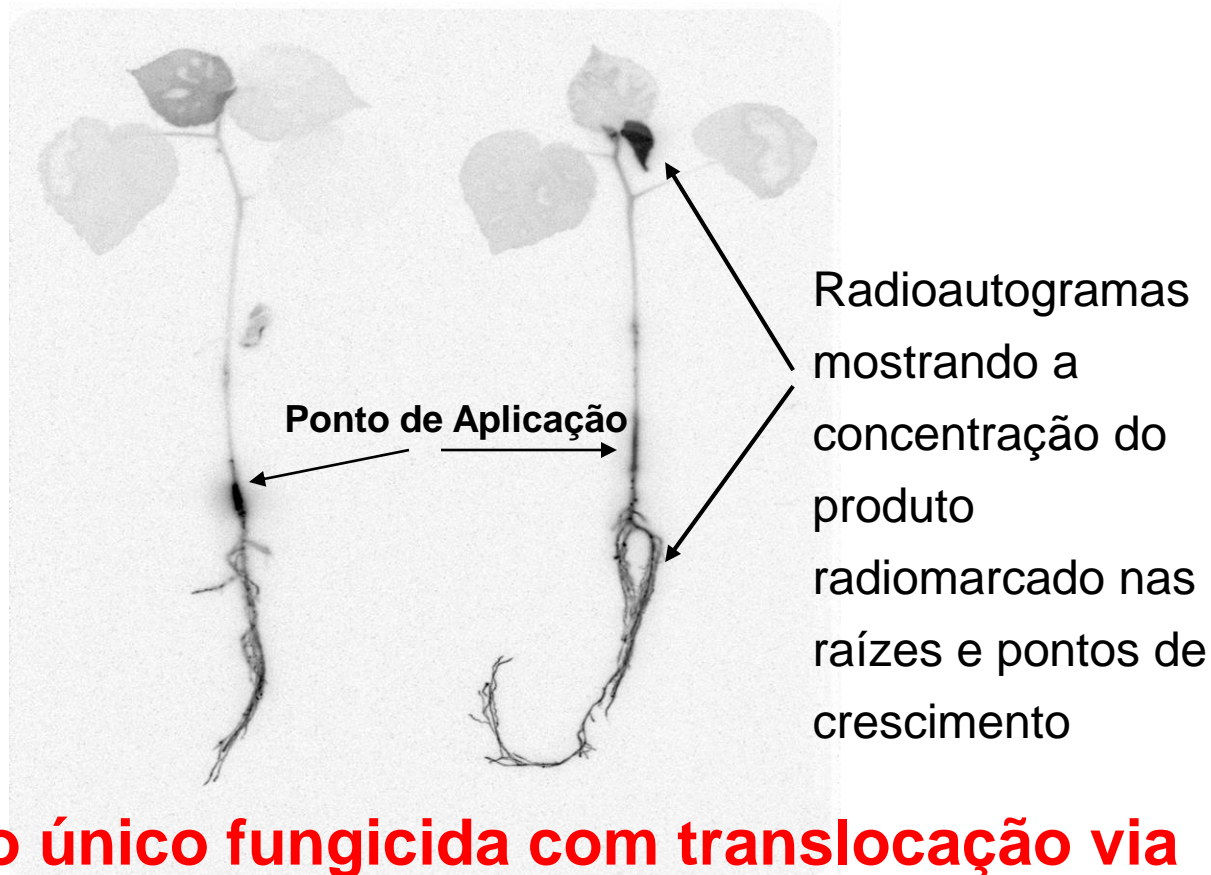
Sem movimentação para novos tecidos/ folhas

# Teste para avaliar translocação de fungicidas em plantas



# Exemplo de translocação via floema

Padrão de redistribuição de Glifosato em  
corda-de-viola



**Fosetyl AI é o único fungicida com translocação via floema**



# Variabilidade do transporte via xilema para diferentes moléculas

Strobilurin X566729



Planta tratada

FSA XR-804



Planta tratada



Imagem com molécula radiomarcada

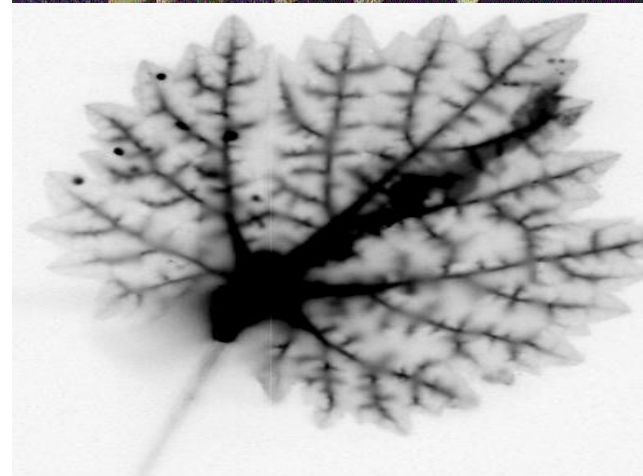
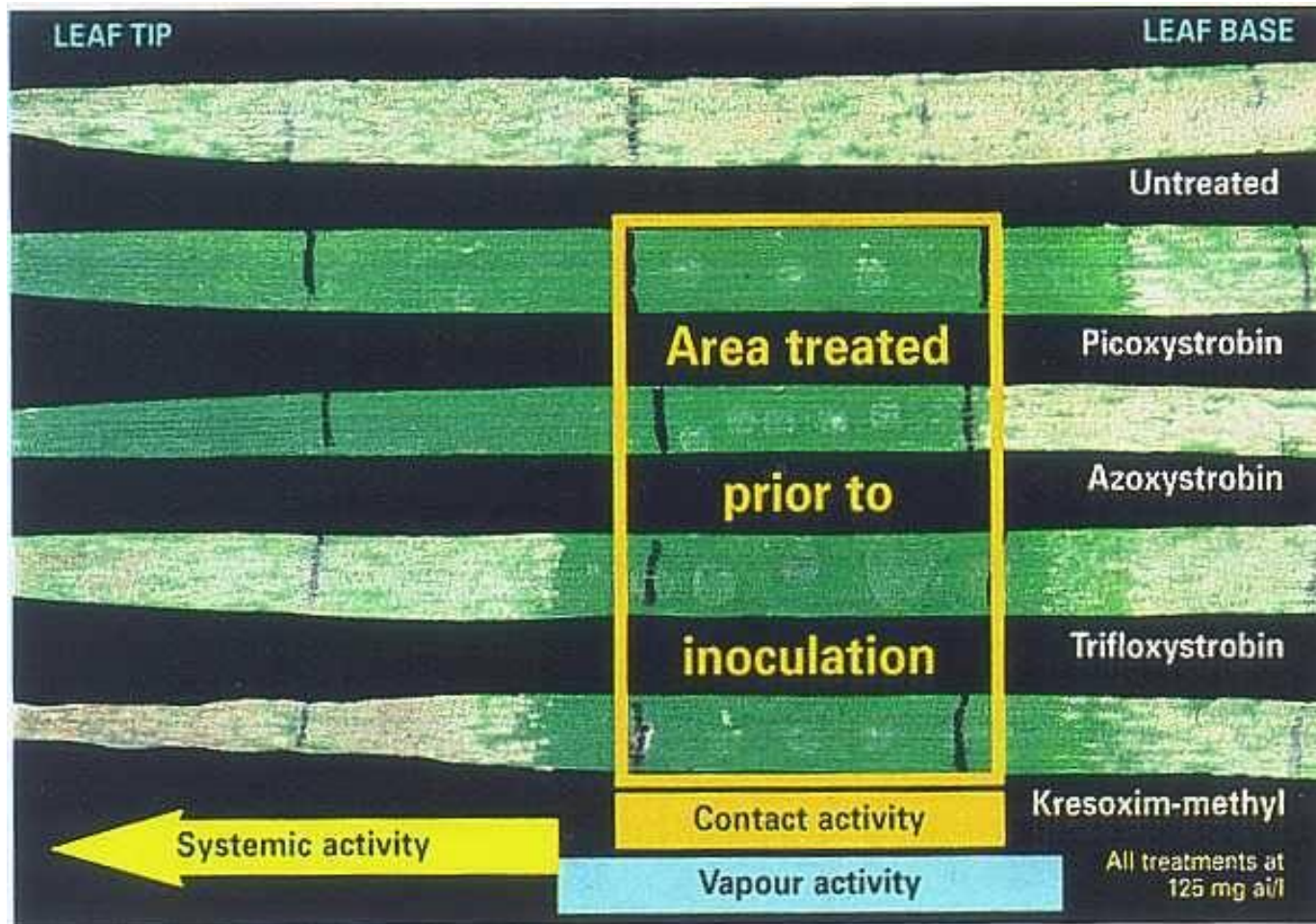


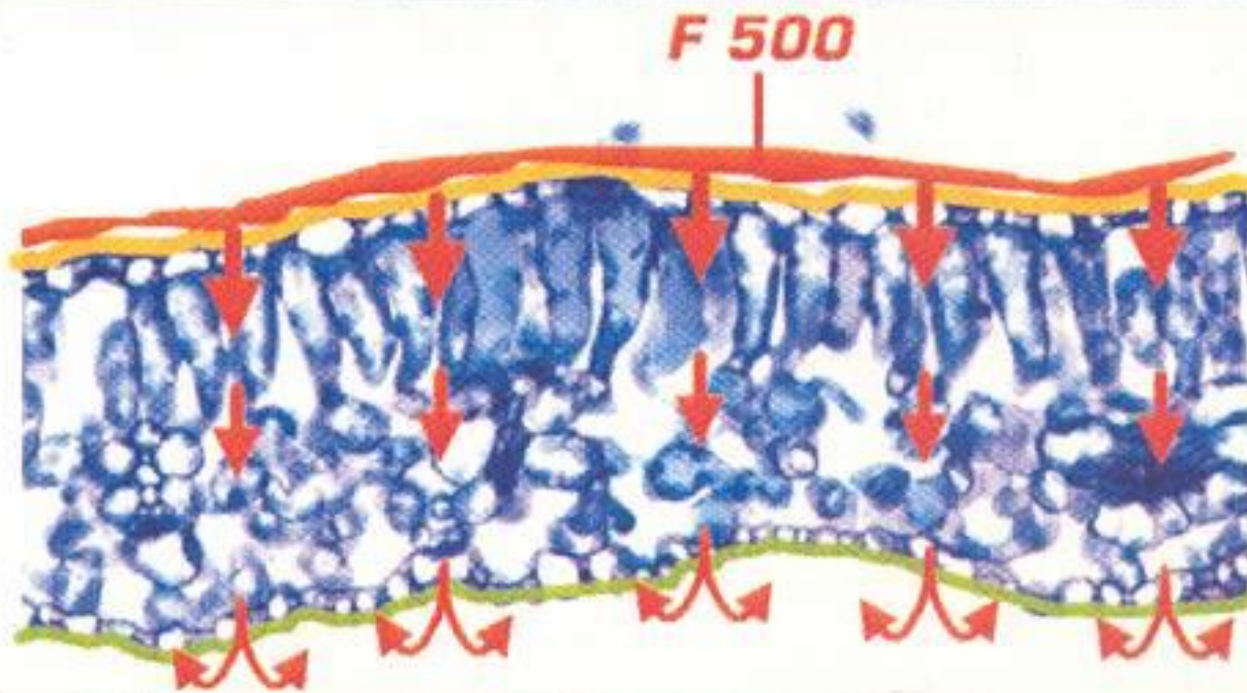
Imagem com molécula radiomarcada

# Tipos de Redistribuição de Estrobilurinas



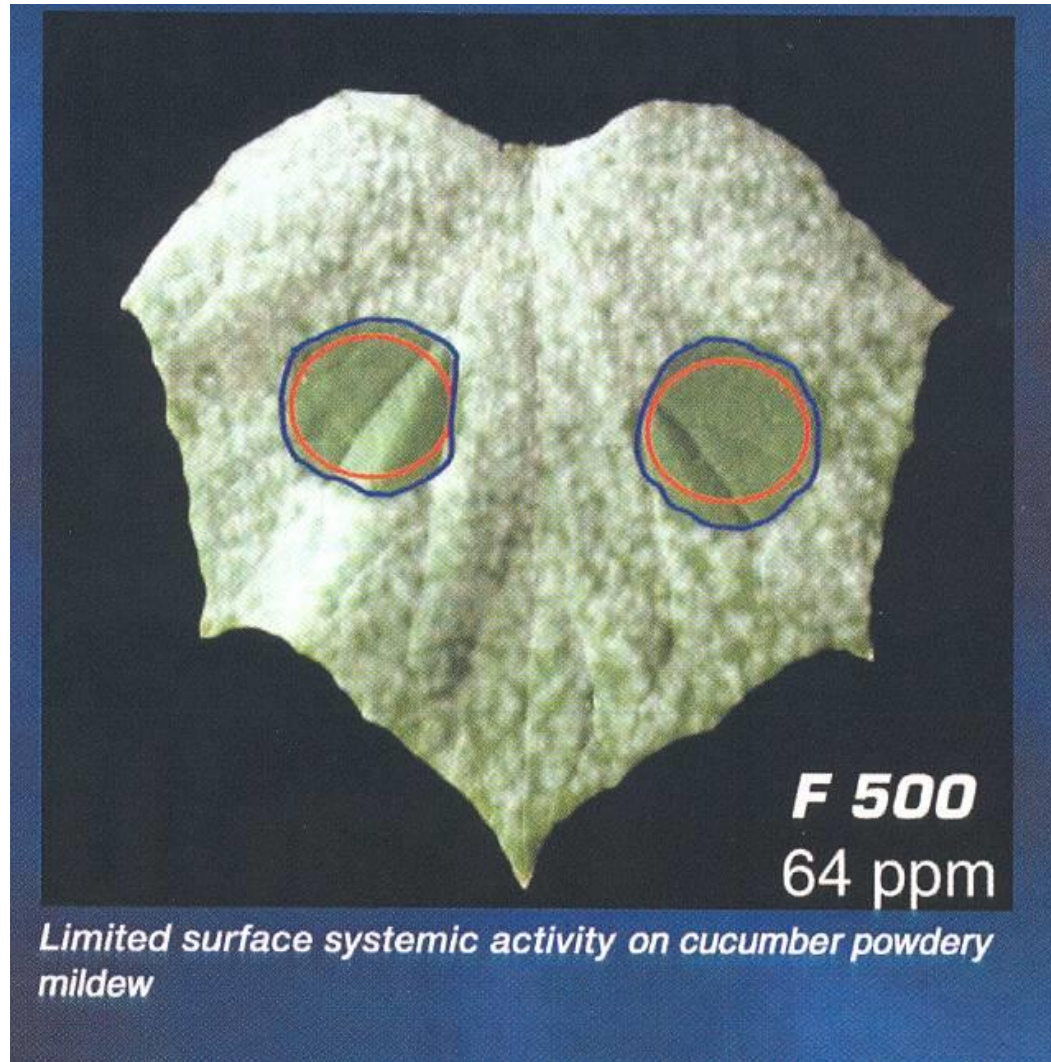


# Movimiento Translaminar

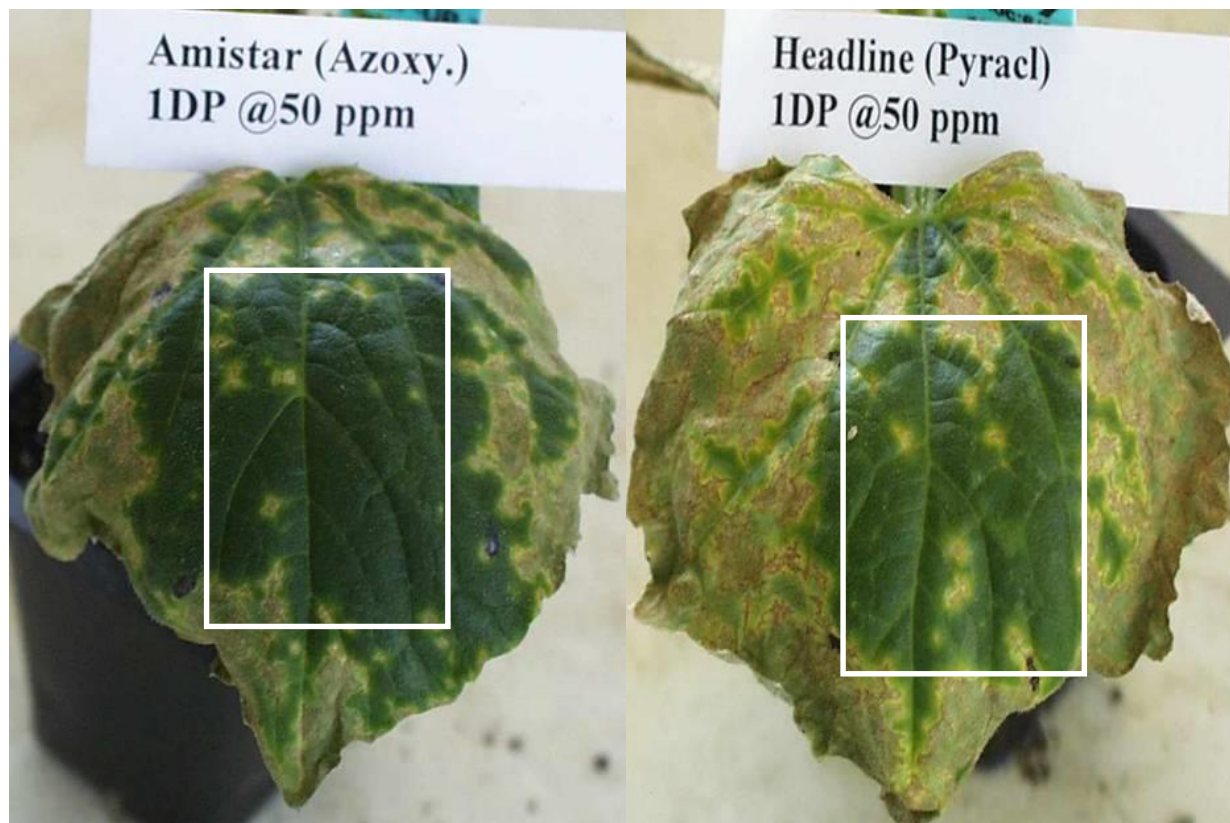


*Translaminar activity of F 500 (Pyraclostrobin)*

# Limitada Redistribuição de Pyraclostrobin em oídio (pepino)

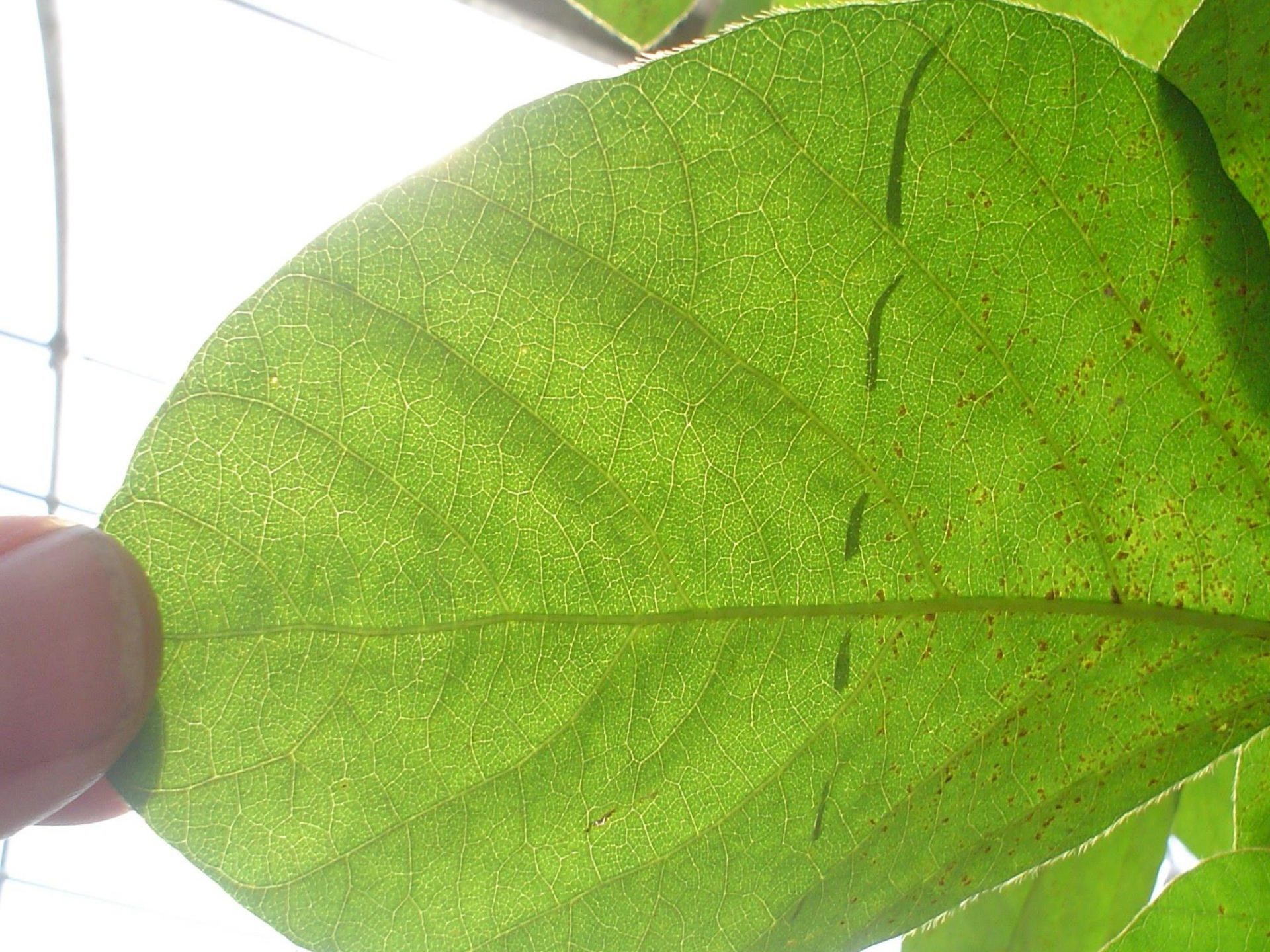


# Movimento Loco-Sistêmico e Translaminar do Pyraclostrobin



Fungicida aplicado na parte superior (marcado com quadrado) e inoculado com antracnose na parte inferior da folha de pepino.





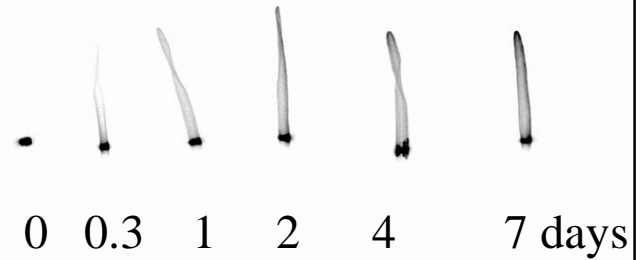


# Mobilidade de Estrobilurinas em trigo avaliada com moléculas radiomarcadas

**Azoxystrobin**



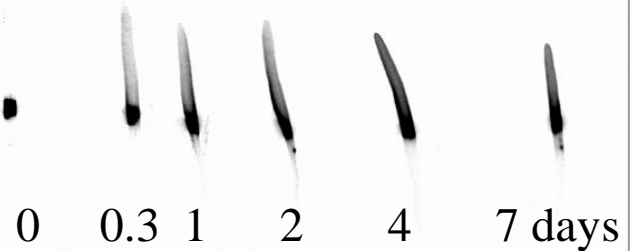
Radio-image



**Picoxystrobin**



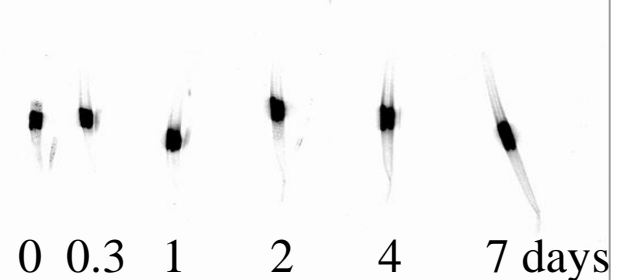
Radio-image



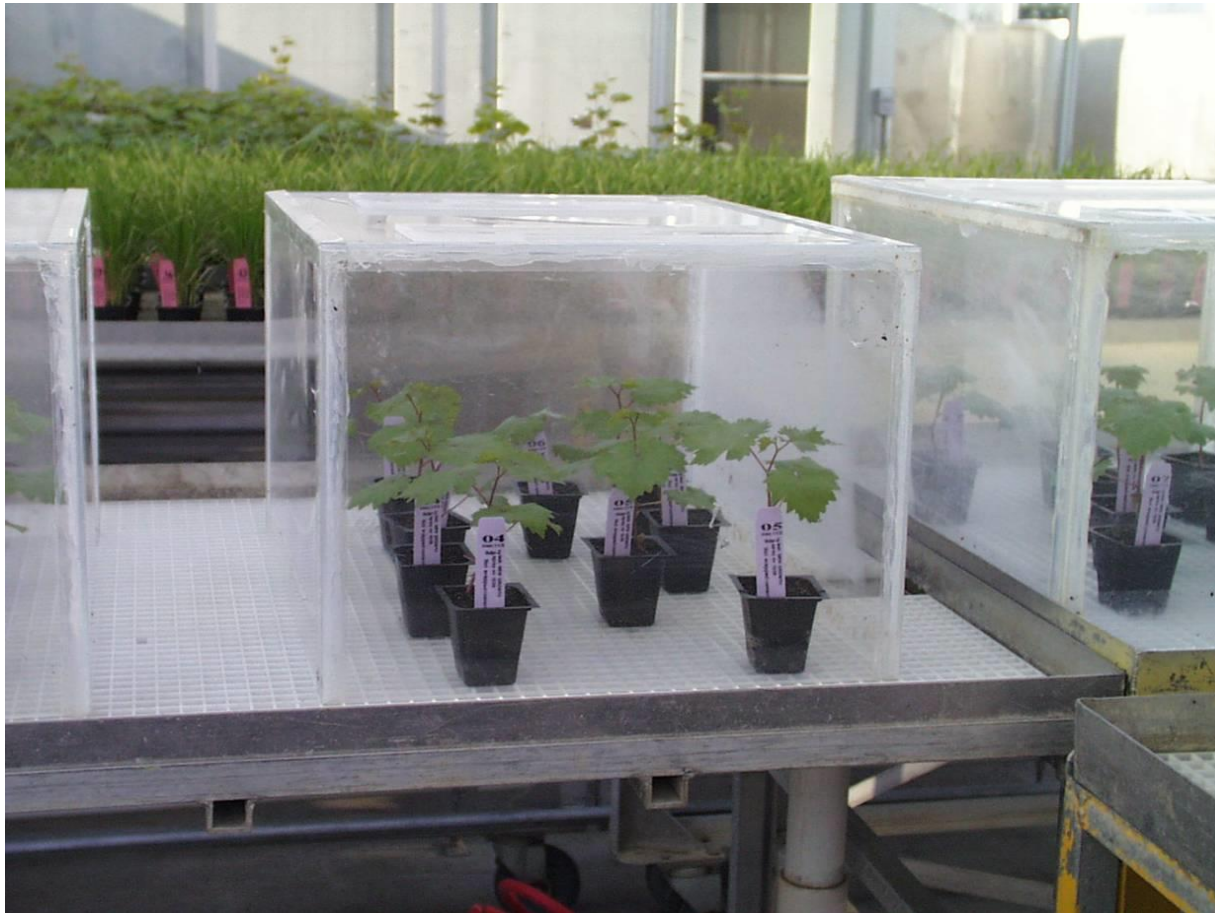
**Trifloxystrobin**



Radio-image



# Experimento em casa de vegetação para detectar atividade de vaporização





## **Método de aplicação**

**Estudo de caso: “Planter Box” em  
arroz irrigado (Ásia)**



専用の計量カップで所定量の薬剤を計る。



徒長の少ない健苗に使用し茎葉に付着した薬剤を軽く払い落とす。



Moving away the nursery from the box. Nothing left in the nursery box.



移植後直ちに2~3cm(上面が露出しないよう)の水深に湛水する。



薬剤処理当日に移植する。



薬剤が落ちないように注意し田植機にセットする。



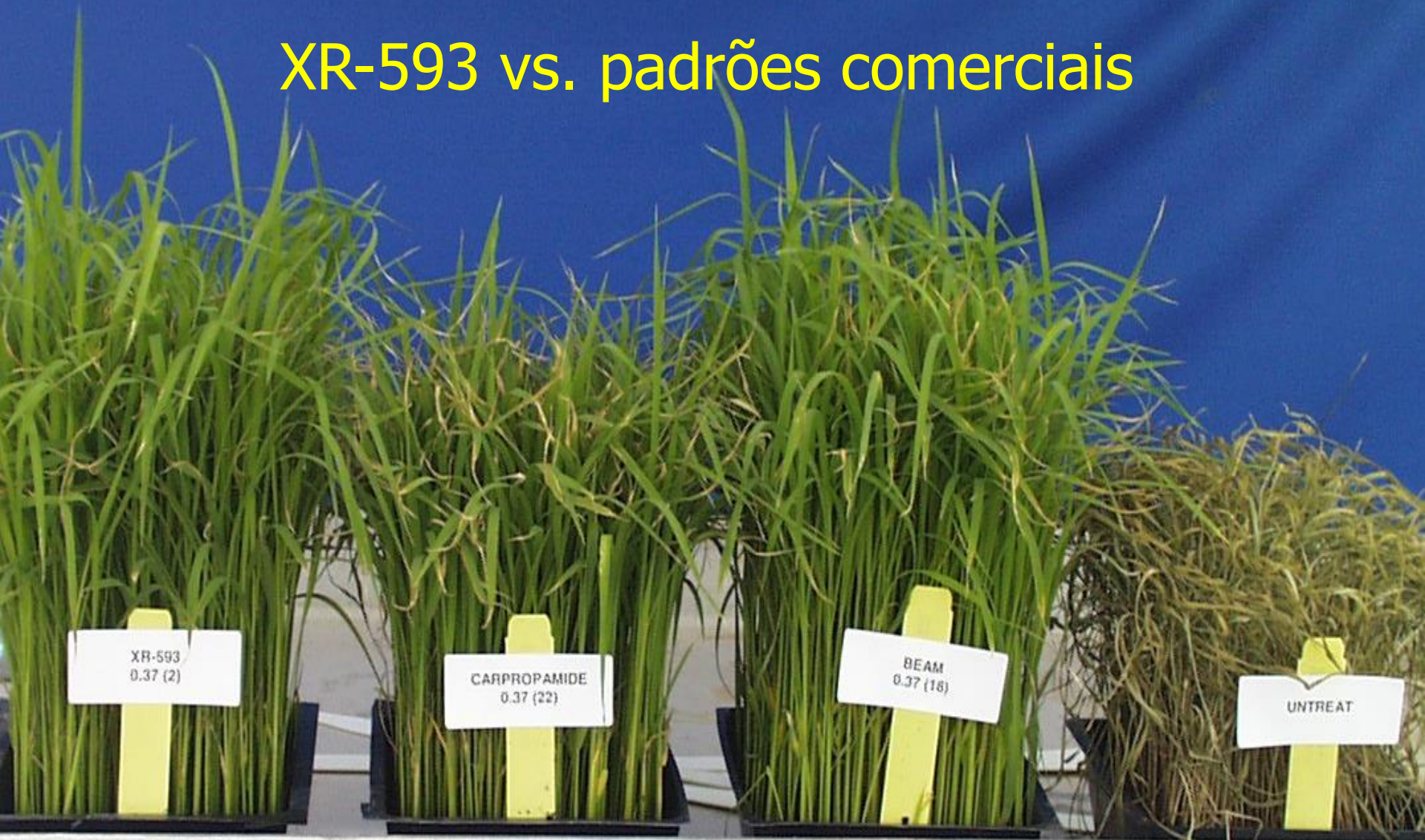
# Planter Box – Ensaio em casa de vegetação





# Planter Box – Ensaio em casa de vegetação

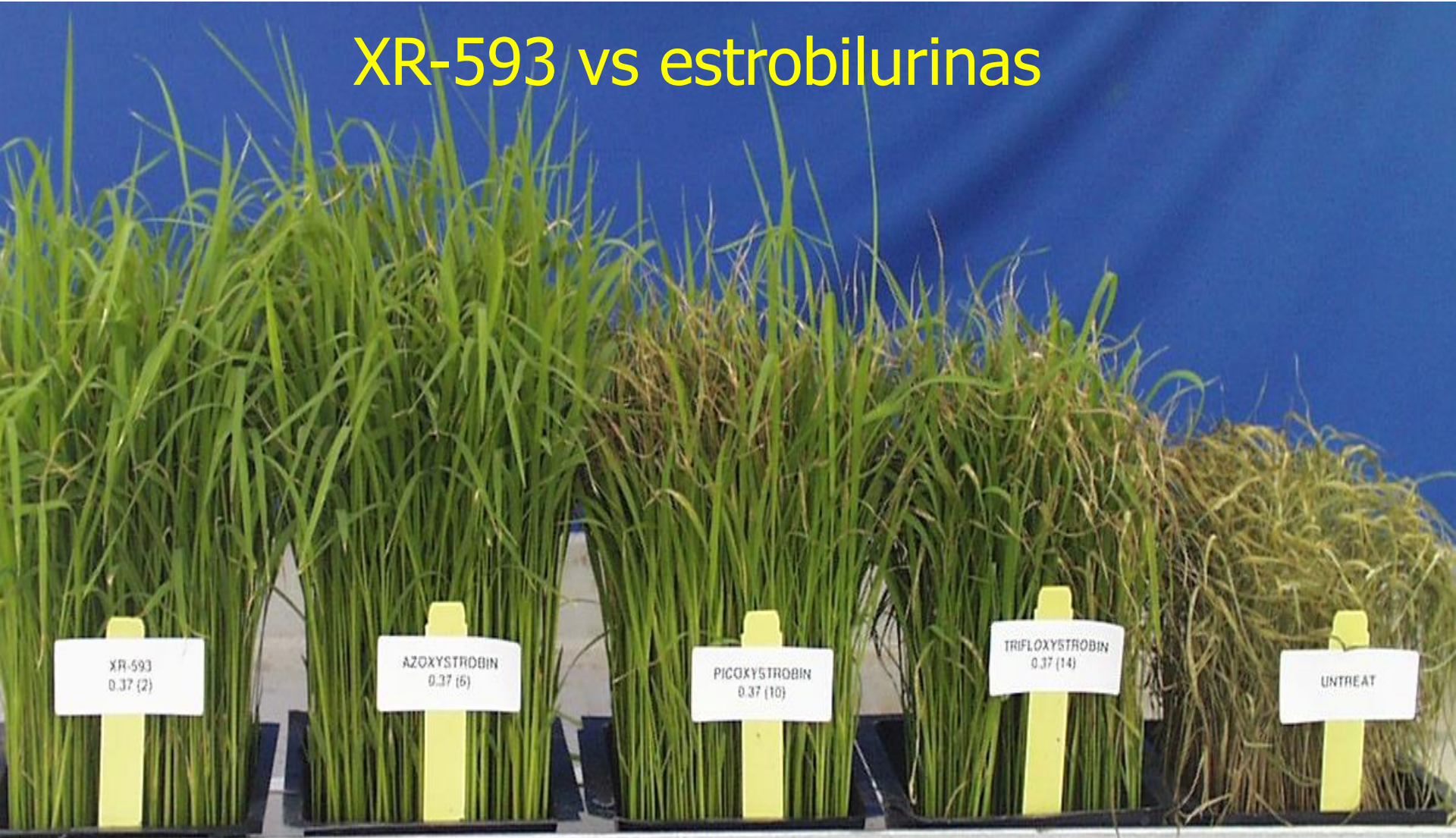
## XR-593 vs. padrões comerciais





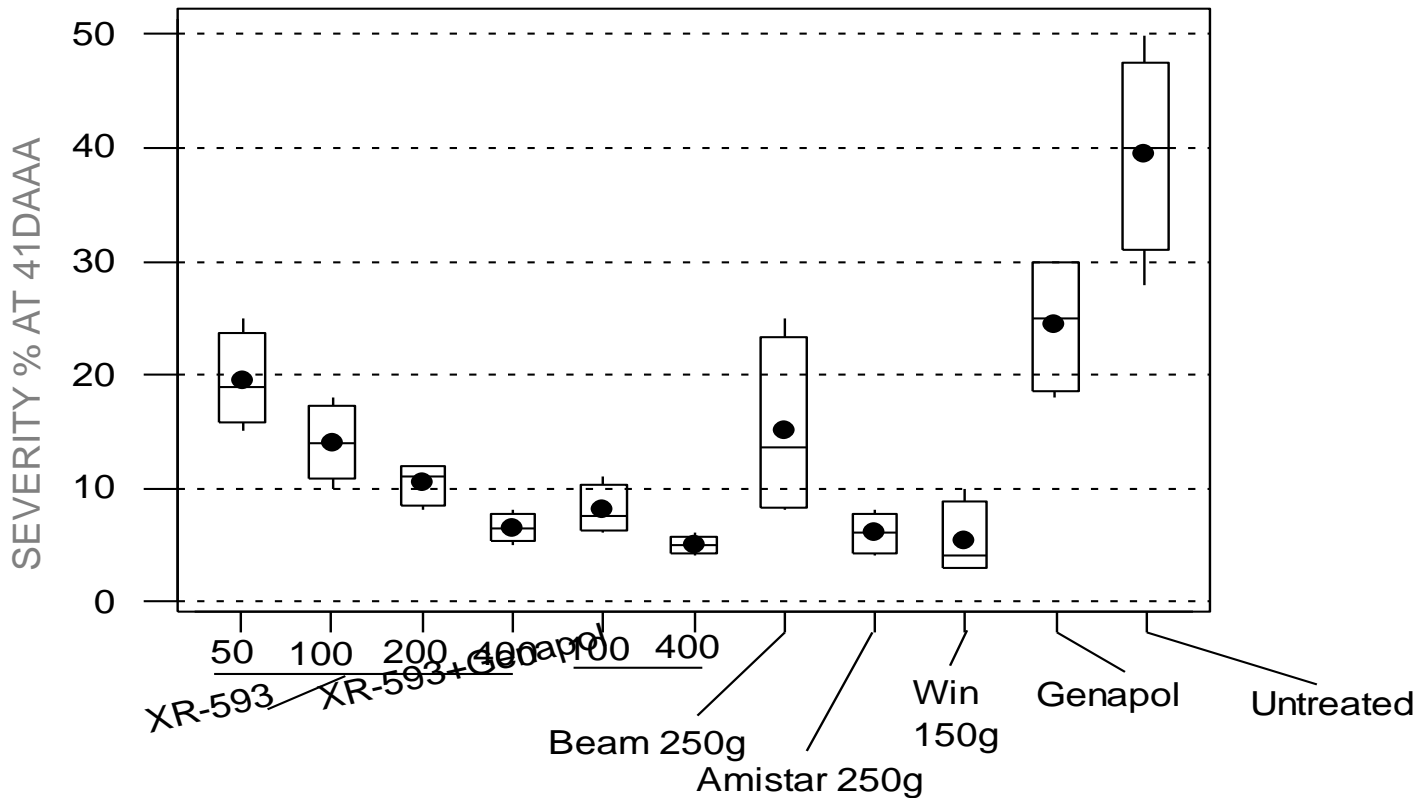
# Planter Box – Ensaio em casa de vegetação

## XR-593 vs estrobilurinas



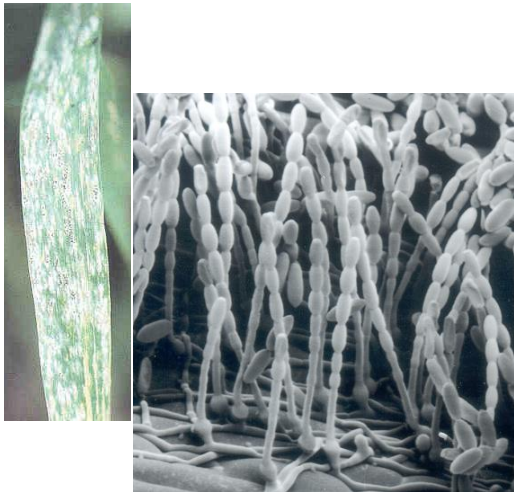
# XR-593 – Prova de eficácia em campo

## JAPAN EFFICACY ON RICE BLAST DIRECT SEEDING PROTECTIVE

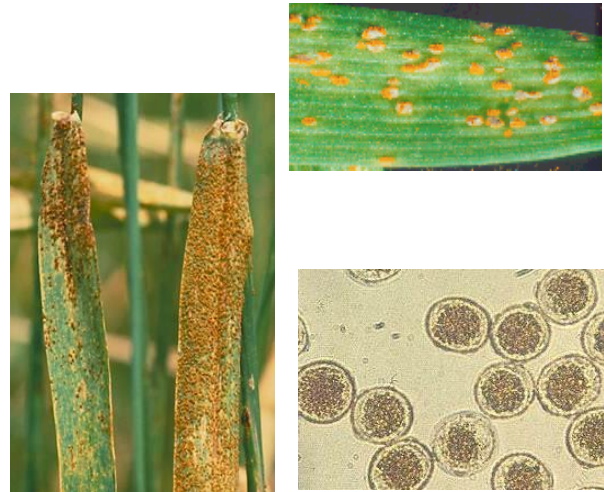


# Entendendo o Modo de Ação dos Fungicidas

- Requer entendimento das funções biológicas e bioquímicas do fungo



***Erysiphe graminis***  
**Ascomycete**

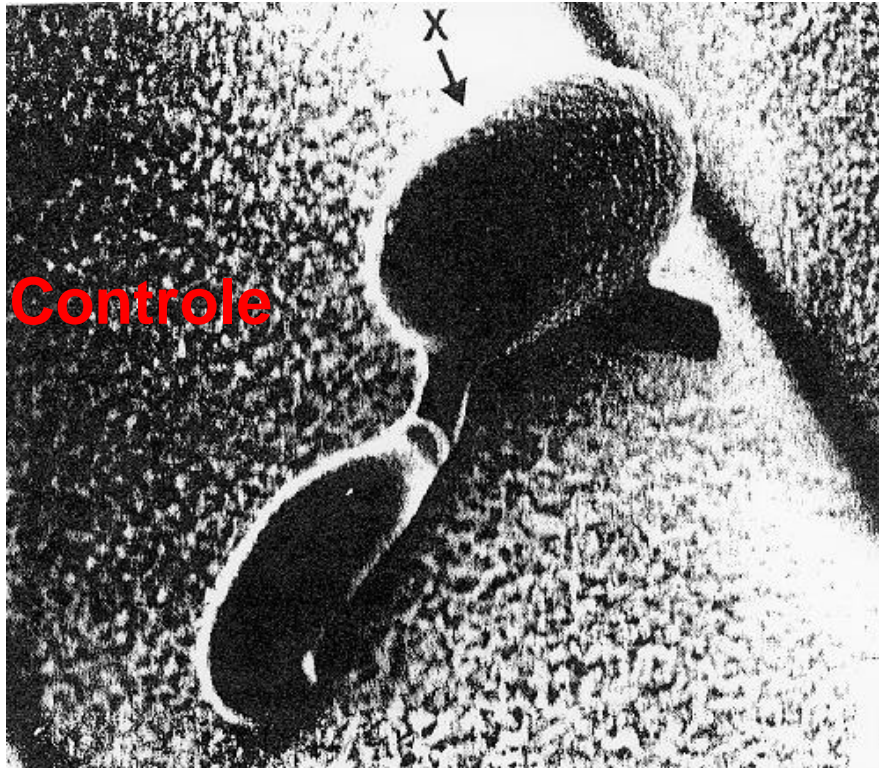


***Puccinia recondita***  
**Basidiomycete**



***Plasmopara viticola***  
**Oomycete**

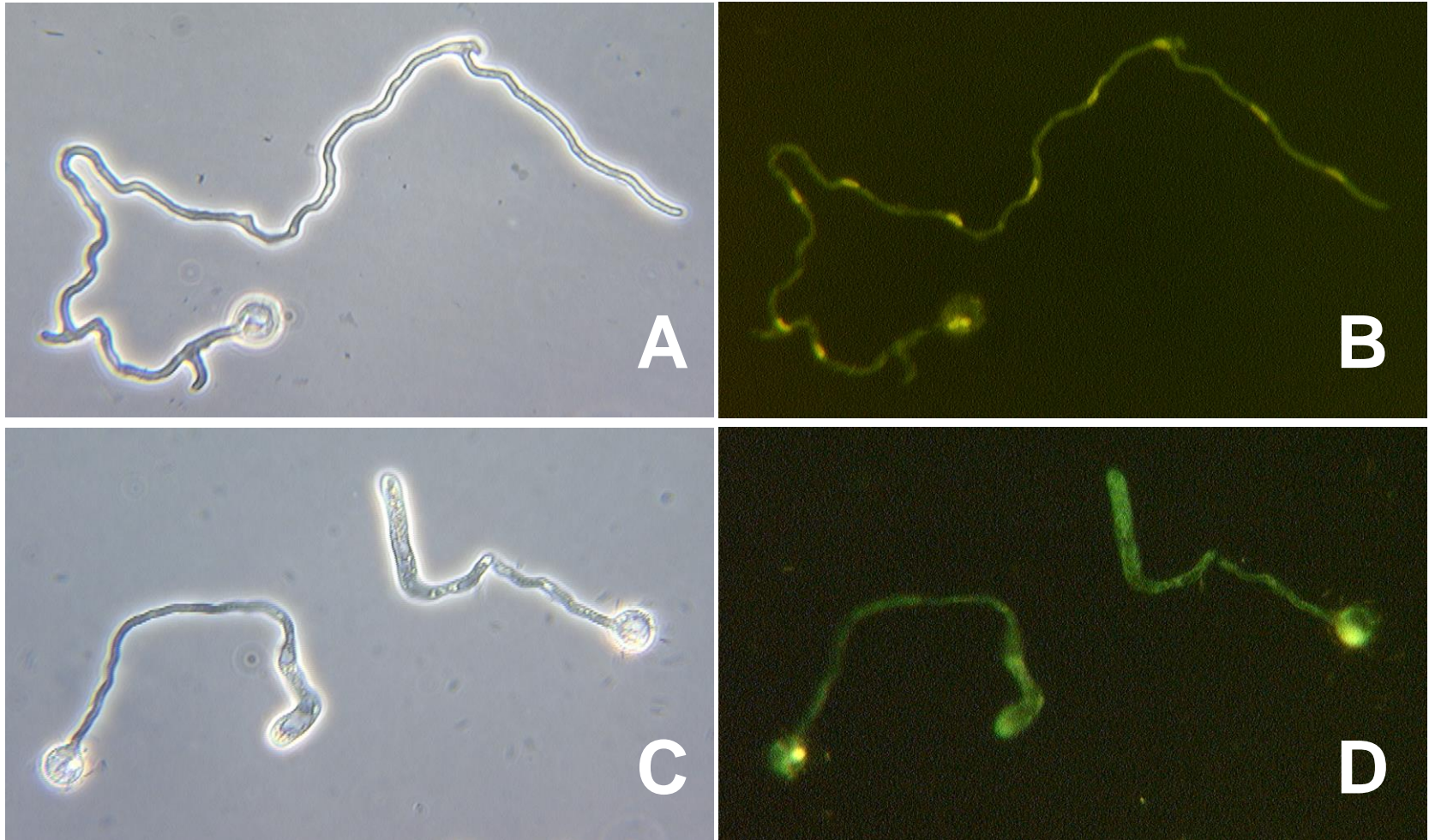




**Fotografia eletrônica mostrando a germinação de esporos de *Erysiphe graminis* com e sem tratamento de quinoxifen em folhas de cevada.**



# Efeito do Zoxamide na morfologia e na divisão nuclear em *Phytophthora capsici*



**A. Testemunha (controle)**

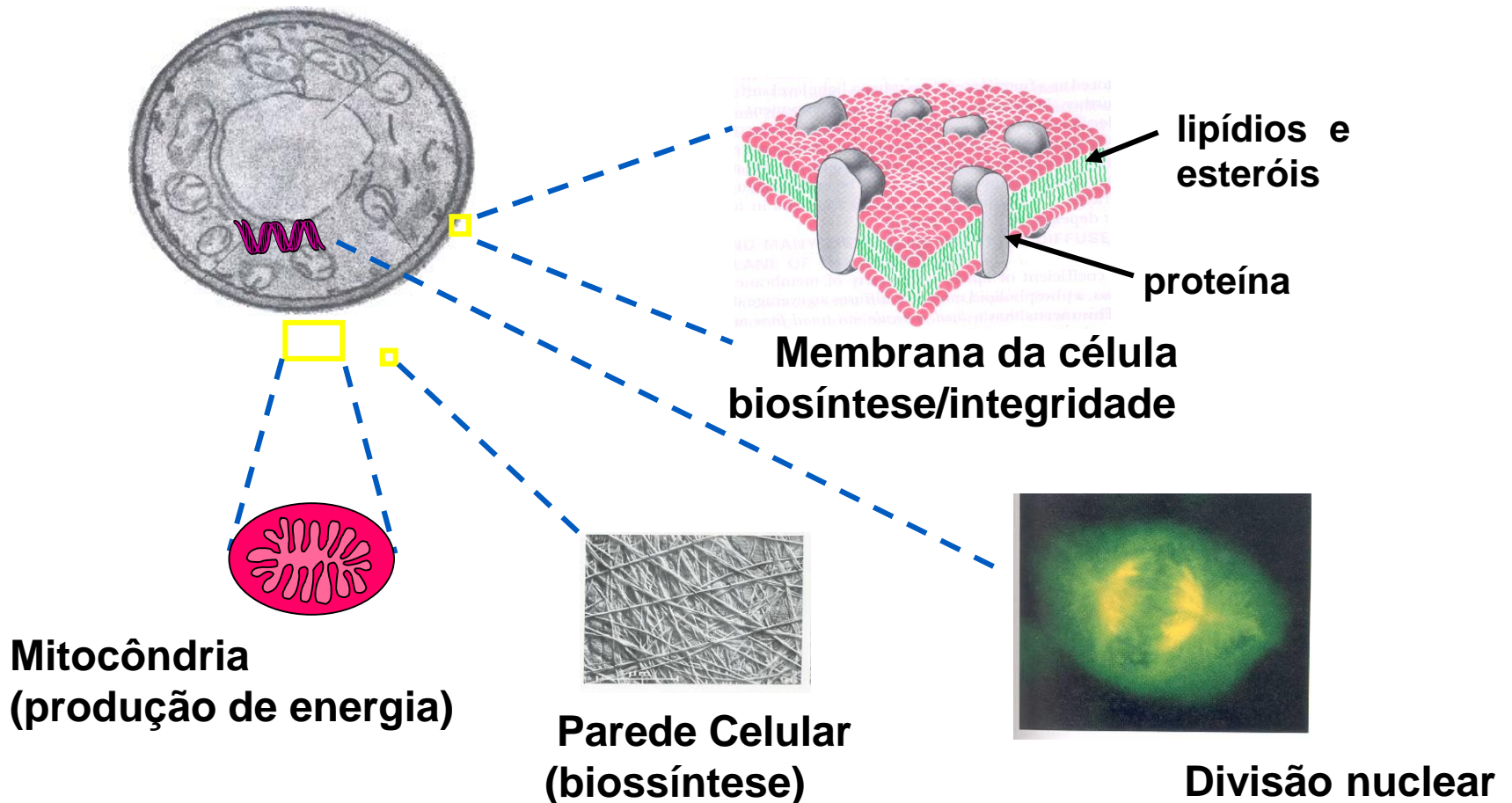
**B. Testemunha (controle) colorida com mithramycin, mostrando um núcleo multinucleado**

**C. Zoxamide tratamento com 0.5 ppm. Note o tubo germinativo alongado e “inchado” na ponta**

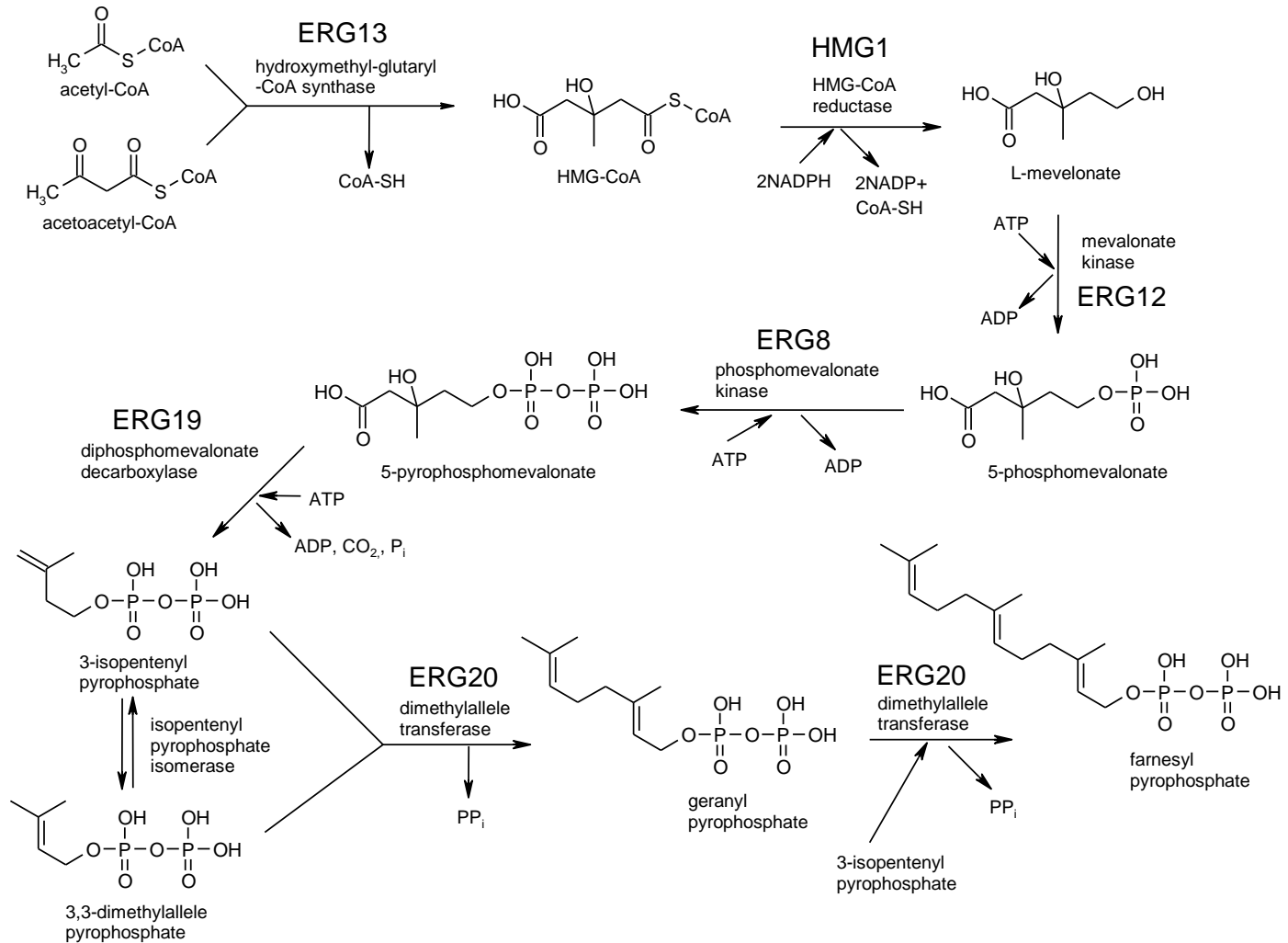
**D. Zoxamide tratamento com 0.5 ppm. Cada célula contém um único núcleo que apresentou falha na divisão**

# Modo de Ação dos Fungicidas

- Fungicidas interferem com processos essenciais da célula
- Fungicidas geralmente interferem com proteínas (enzimas, estruturais, reguladoras)



# Biossíntese do Ergosterol

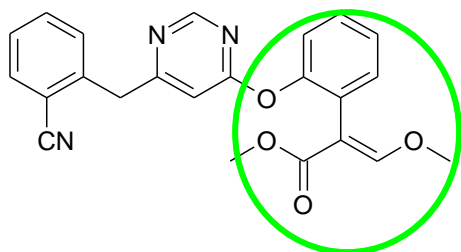


# Inibidores do Complex III

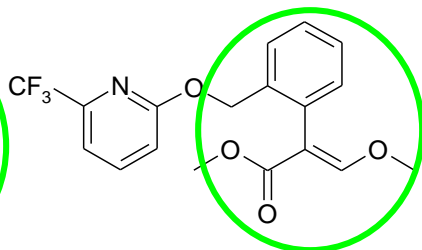
## - Q<sub>o</sub> Site -

Atividade de amplo espectro (várias classes de fungos)

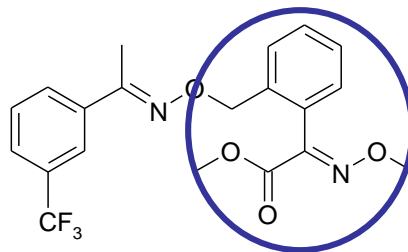
Azoxystrobin  
(Syngenta, 1997)



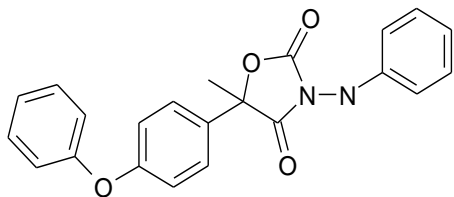
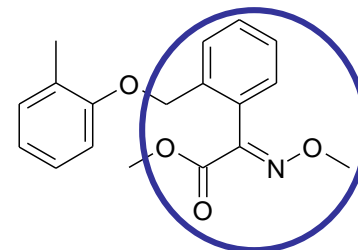
Picoxystrobin  
(Syngenta, 2002)



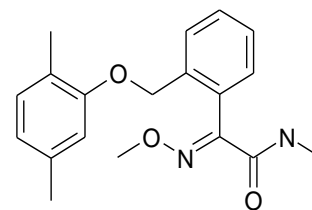
Trifloxystrobin  
(Bayer, 1999)



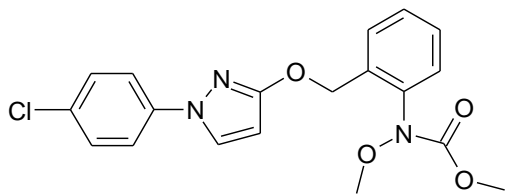
Kresoxim-methyl  
(BASF, 1997)



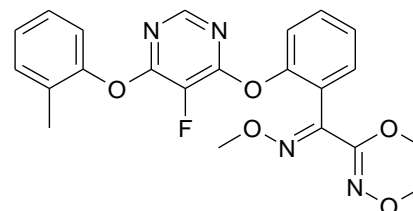
Famoxadone  
(DuPont, 1998)



Dimoxystrobin  
(BASF, 2003)



Pyraclostrobin  
(BASF, 2002)



Fluoxastrobin  
(Bayer, 2003)



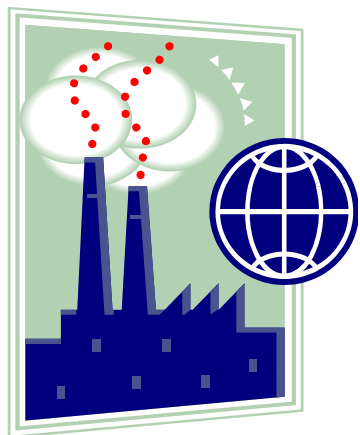
***Fatores que influenciam o descobrimento e a introdução de novas moléculas***



# Fatores que influenciam o descobrimento e a introdução de novas moléculas



- Mudanças na indústria agroquímica
- Inovações tecnológicas e seus desafios
- Globalização e formadores de opinião pública





# Mudanças na Indústria Agroquímica: *Consolidação da Indústria*

- *Em 1985...*

- 15 empresas multinacionais com programas de desenvolvimento de novos fungicidas

- Cada empresa precisava descobrir fungicidas para suprir deficiências no seu portfólio



# Mudanças na Indústria Agroquímica: *Consolidação da Indústria*

- ***Em 2006...***
  - 5 empresas multinacionais com programas de desenvolvimento de fungicidas
  - Poucas deficiências no portfolio
  - Programas de pesquisa extremamente específicos





# Consolidação da Indústria Agroquímica

1960  
(~42)

Allied Chem  
AmCy  
**BASF**  
**BAYER**  
Boots  
Ciba  
Diamond  
**DOW**  
**DuPont**  
E. Merck  
ESSO  
Fisons  
**FMC**  
Geigy  
Gulf  
Hercules  
Hoescht  
Hoffman  
LaRoche  
Hooker  
ICI  
Merck  
MGK  
**Monsanto**

Morton  
Norwich  
Murphy Oil  
Olin Math  
Pennwalt  
Phillips Petro  
Rhone  
Poulanc  
Rohm & Haas  
Sandoz  
Sauffer  
Schering  
Shell Int'l  
Shell US  
Spencer  
Chem.  
Standard Oil  
Sterling  
Union  
Carbide  
Universal Oil  
Velsicol  
Wyandotte

1980  
(~33)

Abbott  
AmCy  
**BASF**  
**BAYER**  
BCF  
Celamerck  
Chevron  
Ciba-Geigy  
**DOW**  
Duphar  
**DuPont**  
Elanco  
**FMC**  
Gulf  
Hoescht  
Hoffman  
LaRoche  
ICI  
Maag

Mobile  
**Monsanto**  
NOR-AM  
(Schering)  
Rhone Poulanc  
Rohm & Haas  
Sandoz  
Sauffer  
Shell Int'l  
Shell US  
Union Carbide  
Uniroyal  
Upjohn  
Velsicol  
Zoecon

2006  
(8)

**BASF**  
**BAYER**  
**Dow AgroSciences**  
**DuPont**  
**FMC**  
**Monsanto**  
**Syngenta**  
**Uniroyal**

*Consolidação de cias  
agroquímicas  
Americanas e  
Européias*

2016  
(5)

**BASF**  
**BAYER** **Monsanto**  
**Dow** **DuPont**  
**FMC**  
**Syngenta**

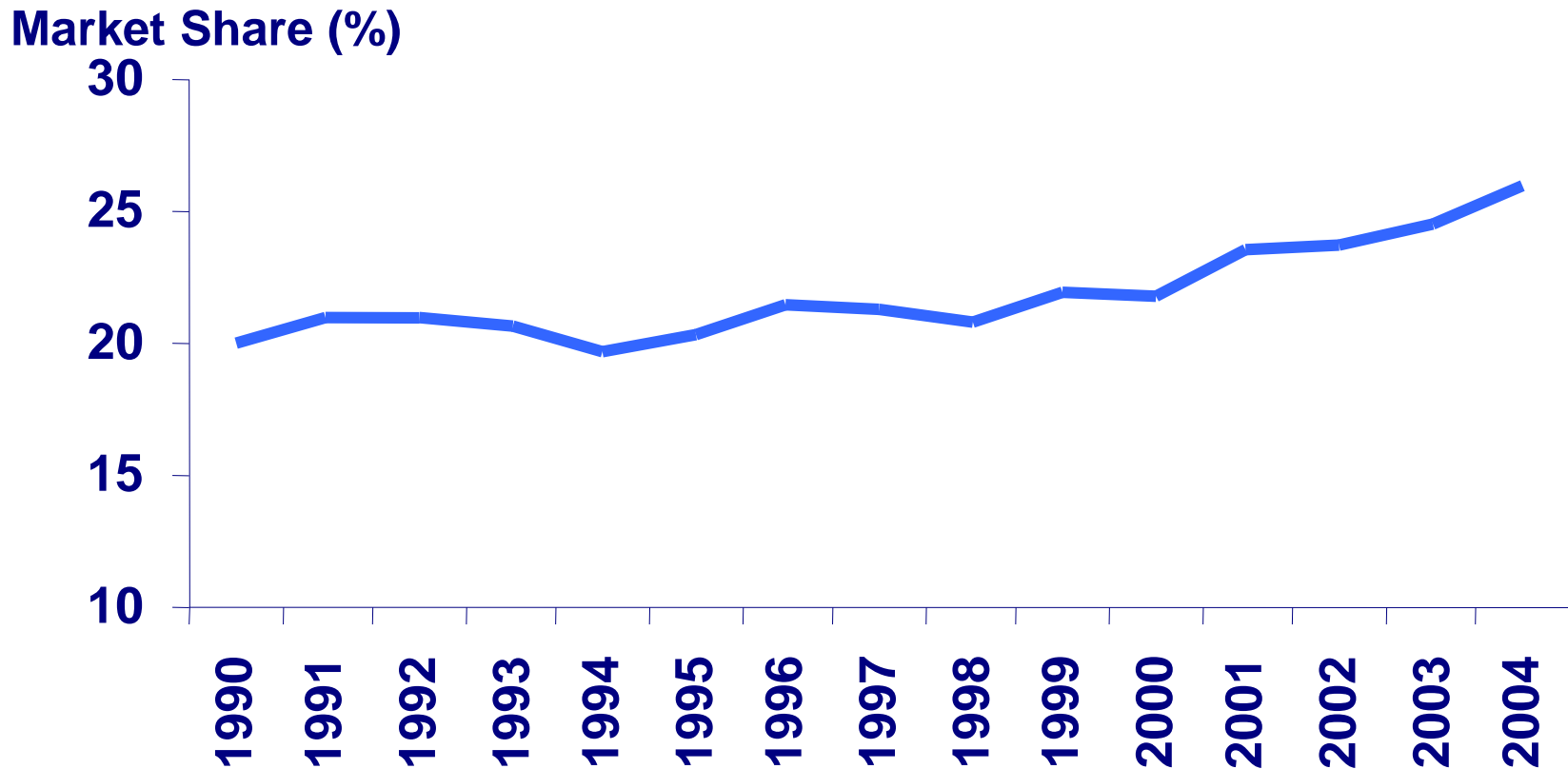
# Mudanças na Indústria Agroquímica: *Fungicidas Genéricos*



- Desenvolvimento de novos produtos - requer massivos investimentos em programas de pesquisa (P&D)
- Verba para investimentos em P&D se origina da venda e margem de lucro dos produtos comerciais
- Porém... baixas margens reduzem verbas disponíveis para P&D
- Novos fungicidas precisam exceder relação custo/benefício estabelecido pelos produtos existentes no mercado

# Genéricos

“Market Share” de cias de Genéricos no mercado global



Source : Phillips McDougall

# Mudanças na Indústria Agroquímica: *Análise de custo de P&D*



Aumento do custo de descobrimento e desenvolvimento de novas moléculas:

- US\$ 80 - 180 milhões por fungicida
- Processo de desenvolvimento = 8 a 10 anos
- Alta probabilidade de fracasso
- Potencial e tamanho do mercado determinam a priorização de projetos



# Inovações tecnológicas e seus desafios:

## *Biotechnologia*

Influência da biotecnologia em fungicidas é bem menor do que nas áreas de herbicidas e inseticidas:

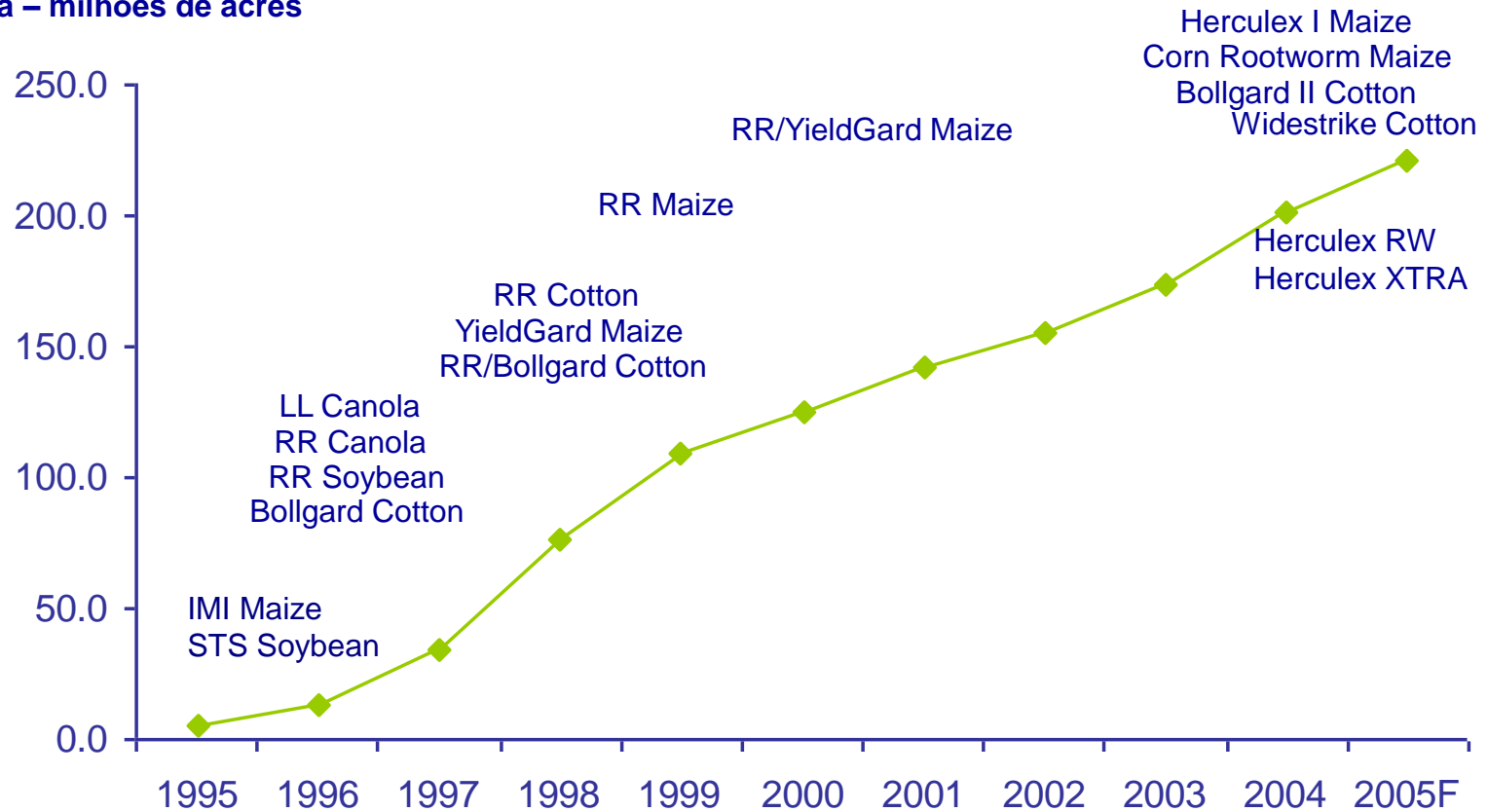
- O desenvolvimento de variedades resistentes está disponível há muitos anos
- Maioria das culturas
  - outras características agronômicas são mais importantes do que a resistência à doenças
  - agricultores necessitam controlar muitas doenças
- O custo-benefício não será efetivo em culturas perenes



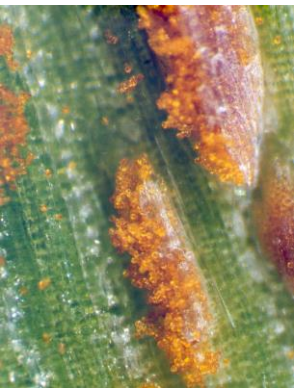
# Biotecnologia – “Crop protection Traits”

## Mercado Global – desenvolvimento a partir de 1995

Área – milhões de acres

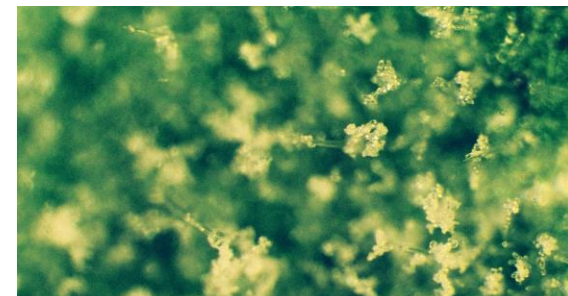
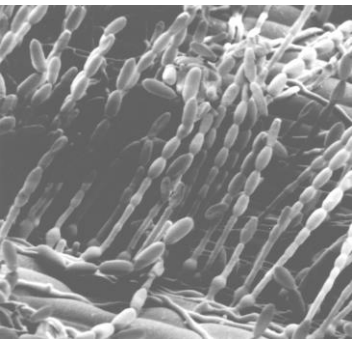


Source: Adapted from Phillips McDougall, 2005

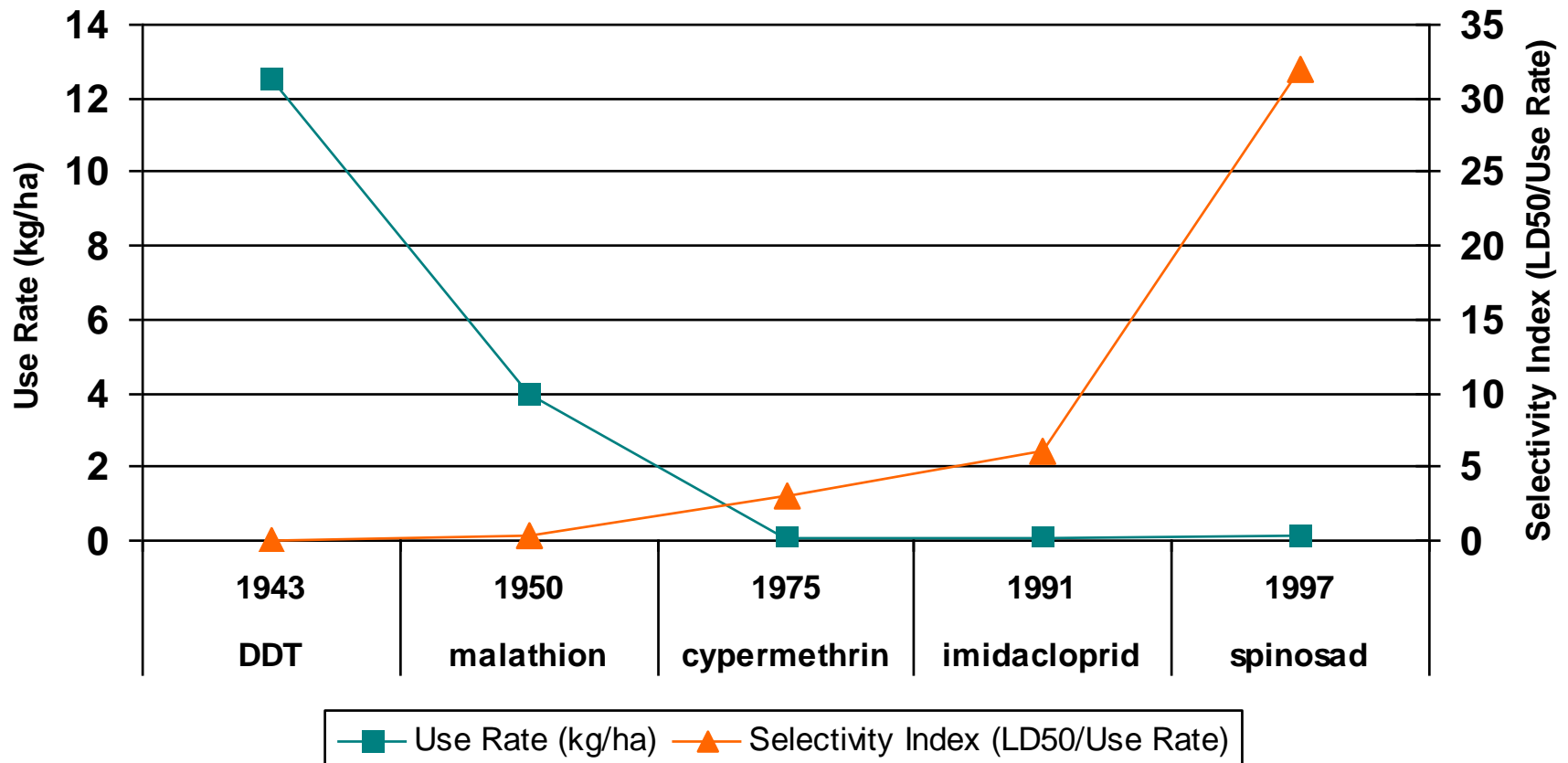


# Inovações tecnológicas e seus desafios: *Resistência a fungicidas*

- Sítio de ação específico = maior probabilidade de resistência
- Oídios, míldios e ferrugens são particularmente propensos a desenvolver resistência a fungicidas
- Novos fungicidas com modo de ação diferenciado serão necessários para manejar resistência



# Inovações tecnológicas: exemplo dos inseticidas





# Globalização e formadores de opinião pública: *O desafio criado pelos sistemas de Regulamentação*



Agriculture and  
Agri-Food Canada

Agriculture et  
Agroalimentaire Canada

中华人民共和国农业部  
MINISTRY OF AGRICULTURE, P. R. CHINA



# Globalização e formadores de opinião pública: *O desafio criado pelos sistemas de Regulamentação*

- Falta de harmonização entre os sistemas de regulamentação (EPA, JMPR, EU e Mercosul) aumenta significativamente os custos de desenvolvimento de novos fungicidas
- Processo de registro longo e custoso representa barreira para inovações tecnológicas (ex. novas formulações)
- Custos elevados limitam desenvolvimento e introdução de produtos com perfil toxicológico e ambiental mais favorável



# Globalização e formadores de opinião pública: *O desafio criado pelos sistemas de Regulamentação*



- **Re-registro de moléculas na Europa** (Directive 91/414)
  - 126 ingredientes ativos cancelados
  - US\$ 560 milhões de vendas na Europa e US\$ 2,8 bilhões de vendas globais
  - Oportunidade para modernização



- **Novas regulamentações (EPA - reduced risk pesticide)** que favorecem produtos com menor risco ao ambiente e usuário - oportunidade para atender vários setores da sociedade



## Globalização e formadores de opinião pública: *Grupos de interesse*

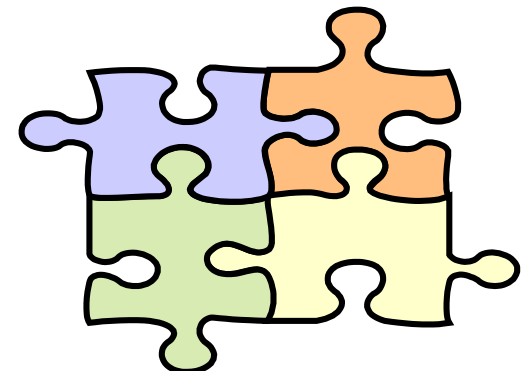
- Organizações não-governamentais (ONGs): tendências impactam direta ou indiretamente nas decisões sobre proteção de plantas
- ONGs incluem processadores de alimentos, supermercados, associação de exportadores, consumidores, controle alternativo
- Objetivos: produção integrada
  - redução de resíduos
  - redução de micotoxinas
  - manejo integrado de doenças
- Novos fungicidas com estas características atenderão expectativas de ONGs



www.shutterstock.com · 2155551

# Atributos importantes para novos fungicidas a serem descobertos

- Eficácia superior (sistêmico, curativo, etc.)
- Novo modo de ação/ Manejo de resistência
- Seguro para a cultura
- Amplo espectro
- Dose reduzida
- Baixo impacto sobre insetos benéficos/MIP
- Resíduo baixo ou inexistente na cultura aplicada
- Rápida dissipação no ambiente
- Baixa toxicidade
- Seguro para o aplicador

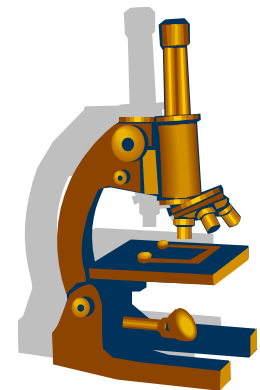


# Quais são as perspectivas para novos fungicidas?



Oportunidades existem e elas serão direcionadas por:

- Alterações nos sistemas de regulamentação
- Contínuo desenvolvimento de resistência a fungicidas
- Necessidades não atendidas de controle de doenças
- Grupos de interesse - novas tendências



# Quais são as perspectivas para novos fungicidas?



Novos fungicidas continuarão sendo desenvolvidos, porém...

- Custos de descobrimento e desenvolvimento serão cada vez mais impeditivos
- Reduzido número de novas moléculas
- Alto custo de P&D
- Barreiras técnicas a serem superadas





A close-up photograph of a cornfield. The plants are densely packed, and many of the leaves are yellowed and dried, suggesting they are ready for harvest or have experienced some stress. The text "Obrigada pela atenção!" is overlaid in the center in a white, bold, italicized font.

***Obrigada pela atenção!***