

ESTIRIL-LACTONAS DE *Cryptocarya aschersoniana* Mez. (Lauraceae Juss.) COM ATIVIDADE CONTRA *Meloidogyne* spp. E INTERAÇÃO *IN SILICO* COM PROVÁVEL FUMARASE DE *Meloidogyne hapla*

Viviane A. C. Campos^a, Alan R. T. Machado^a, Willian J. R. Silva^a, Karina C. Lopes^a, Willian C. Terra^b, Vicente P. Campos^b e Denilson F. Oliveira^{a,*}

^aDepartamento de Química, Universidade Federal de Lavras, 37200-000 Lavras – MG, Brasil

^bDepartamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, 37200-000 Lavras – MG, Brasil

Recebido em 18/06/2015; aceito em 13/10/2015; publicado na web em 05/02/2016

STYRYLLACTONES FROM *Cryptocarya aschersoniana* MEZ. (LAURACEAE JUSS.) WITH ACTIVITY AGAINST *Meloidogyne* SPP. AND *IN SILICO* INTERACTION WITH A PUTATIVE FUMARASE FROM *Meloidogyne hapla*. In a previous study, substances with nematocidal properties were detected in the bark of *Cryptocarya aschersoniana*. Continuing such study, the methanol extract from this plant underwent fractionation guided by *in vitro* assays with the plant-parasitic nematode *Meloidogyne exigua*. Two active compounds were isolated and identified by spectroscopic methods as (*E*)-6-styrylpyran-2-one and (*R*)-goniothalamin. The latter compound was also active against *Meloidogyne incognita*. *In silico* studies carried out with (*R*)-goniothalamin and the enzyme fumarate hydratase, which was extracted from the genome of *Meloidogyne hapla* and modeled using computational methods, suggested that this substance acts against nematodes by binding to a cavity close to the active site of the enzyme.

Keywords: Lauraceae; root-knot nematode; (*R*)-goniothalamin; (*E*)-6-styrylpyran-2-one; docking.

INTRODUÇÃO

Um dos grandes problemas enfrentados pela agricultura mundial diz respeito aos nematoides parasitas de plantas, principalmente aqueles do gênero *Meloidogyne*, que estão distribuídos pelo mundo todo e atacam praticamente todas as plantas cultiváveis, acarretando prejuízos que excedem os 100 bilhões de dólares por ano em todo o mundo.¹ No caso específico do Brasil, as espécies *Meloidogyne exigua* Goeldi e *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood são responsáveis por elevadas perdas para culturas de grande importância econômica e social, como café e soja.^{2,3}

Para controlar os referidos nematoides, geralmente se faz uso de nematicidas comerciais que, além de aumentarem os custos de produção, podem contaminar o ambiente e o homem com substâncias de elevada toxicidade. Uma das possibilidades para contornar tal problema diz respeito ao emprego de produtos de origem vegetal, já que algumas plantas são capazes de produzir metabólitos com ação nematicida.⁴ Dessa forma, as plantas representam um grande potencial para o desenvolvimento de novos produtos de baixa toxicidade e menos onerosos para o controle de fitonematoides. Em decorrência, testes preliminares foram realizados para identificar espécies vegetais produtoras de substâncias ativas contra *M. exigua*. Com isso, foi possível selecionar *Cryptocarya aschersoniana* Mez (Lauraceae Juss.), cujos extratos apresentaram ação nematicida sobre o referido nematoide.

Estudos fitoquímicos têm demonstrado que o gênero *Cryptocarya* é reconhecido por produzir vasta gama de compostos bioativos, dentre os quais se destacam flavonoides, piranos, lignanas e alcaloides aporfínicos e benzilisoquinolínicos. Tais compostos têm atividades citotóxicas, antioxidantes, antituberculose⁵ e antitumoral,⁶ dentre outras. Apesar disso, nenhum relato foi encontrado na literatura sobre a produção de substâncias com atividade nematicida por parte de espécies do referido gênero. Consequentemente, o objetivo inicial do presente trabalho foi isolar e identificar as substâncias ativas contra *Meloidogyne* spp. produzidas por *C. aschersoniana*. Em seguida,

com o uso de técnicas computacionais, buscou-se identificar o alvo enzimático nos nematoides da substância mais ativa.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiais e equipamentos utilizados

Exceto quando mencionado de outra forma, os seguintes solventes apresentavam grau analítico (P.A.): Hex, AcOEt, MeOH, Tween 80[®] e CHCl₃. Para as análises por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizaram-se placas de alumínio recobertas com sílica gel (Merck) impregnada com indicador de fluorescência UV 254 nm. As substâncias foram reveladas nas placas de CCD com luz UV, vapor de iodo e solução de ácido fosfomolibdico a 0,05 g mL⁻¹ em etanol. Empregou-se sílica gel do tipo *flash* (230-400 mesh, Merck) nos fracionamentos por cromatografia em coluna (CC).

Preparo do extrato vegetal

Cascas do caule de *C. aschersoniana* foram coletadas no *campus* da Universidade Federal de Lavras (UFLA), no dia 1^o de junho de 2009, de um único indivíduo com aproximadamente 20 m de altura, que não apresentava doenças nem frutos. A referida espécie vegetal foi identificada pelos biólogos José Carlos Martins e Daniel Quedes Domingos (UFLA). Uma excisada de tal exemplar se encontra depositada no Herbário do Departamento de Botânica, localizado no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, sob o registro BHCB 175523. As cascas coletadas foram secas em estufa com ventilação e renovação de ar, por 48 horas, na temperatura de 40 °C. Em seguida, foram moídas, originando 1 kg de material que, em seguida, foi submetido a seis extrações sucessivas com MeOH por maceração estática durante 48 h. Os filtrados obtidos foram reunidos e a solução resultante foi concentrada até a *secura* em evaporador rotatório e, em seguida, liofilizada, dando origem a 63,92 g de extrato bruto seco. Uma alíquota (2 mg) do extrato seco foi dissolvida em 1,0 mL de Tween 80[®] a 0,01 g mL⁻¹, para ser submetida a teste *in vitro* com juvenis do segundo estágio (J2) de *M. exigua*.

*e-mail: denilson@dqi.ufla.br

Fracionamento do extrato bruto

O extrato bruto das cascas de *C. aschersoniana* (60 g) foi subseqüentemente submetido a extrações com Hex (4 x 300 mL), AcOEt (4 x 300 mL) e MeOH (4 x 300 mL). As três frações líquidas obtidas foram concentradas em evaporador rotatório e liofilizadas, dando origem a resíduos dos quais foram removidas alíquotas de 2 mg para serem dissolvidas em 1,0 mL de Tween 80® a 0,01 g mL⁻¹ e submetidas a teste *in vitro* com J2 de *M. exigua*. Uma parte (9,80 g) da fração solúvel em AcOEt foi eluída através de coluna com aproximadamente 7 x 15 cm de sílica gel, empregando-se sucessivamente 500 mL dos seguintes eluentes: Hex/AcOEt (95:5), Hex/AcOEt (65:35), AcOEt (puro), AcOEt/MeOH (90:10), MeOH (puro) e água destilada. Coletaram-se frações de 500 mL (F1-F4) e de 250 mL (F5-F8), que foram subseqüentemente submetidas à remoção dos solventes em evaporador rotatório e liofilizadora. Alíquotas de 1 mg de cada uma das oito frações (F1-F8) foram dissolvidas em 1,0 mL de Tween 80® a 0,01 g mL⁻¹, para serem submetidas a teste *in vitro* com J2 de *M. exigua*.

Parte (1 g) da terceira fração (F3) foi fracionada em coluna com 5x15 cm de sílica gel, empregando-se os seguintes eluentes: Hex/AcOEt (80:20, 1000 mL), Hex/AcOEt (70:30, 1000 mL), AcOEt (255 mL), MeOH (255 mL) e água destilada, nesta mesma seqüência. As frações obtidas (50 mL) foram combinadas de acordo com os seus perfis cromatográficos e concentradas conforme descrito anteriormente. Alíquotas das 17 frações resultantes (F3-1 a F3-17) foram dissolvidas em Tween 80® a 0,01 g mL⁻¹, até a concentração de 500 µg mL⁻¹, para serem submetidas a teste *in vitro* com J2 de *M. exigua*. Especificamente no caso das frações F3-5 [1, Rf: 0,30, eluente: Hex/AcOEt (70:30)] e F3-7 [2, Rf: 0,25, eluente: Hex/AcOEt (70:30)], os seus componentes estavam puros de acordo com a análise cromatográfica.

Teste *in vitro* com J2 de *M. exigua*

Raízes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.), infestadas com *M. exigua*, foram coletadas no campo, lavadas com água, cortadas e trituradas em liquidificador, por 40 segundos, com solução de hipoclorito de sódio a 0,005 g mL⁻¹, seguindo a técnica descrita na literatura.⁷ Os ovos retidos em peneira de 0,025 mm de abertura (500 mesh ASTM) foram recolhidos e mantidos em câmara de eclosão formada por uma tela fina de 0,025 mm de abertura e funil de vidro. Recolheram-se, para emprego nos testes, somente aqueles J2 que eclodiram 48 horas após a montagem da câmara.

Para o teste foram empregadas placas de polipropileno contendo 96 cavidades de 350 µL. Para tanto, em cada cavidade se depositaram 20 µL de uma suspensão aquosa contendo de 20 a 30 J2 e, em seguida, adicionaram-se 100 µL de cada uma das amostras a serem testadas. Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado, empregando-se quatro repetições por amostra. Como testemunhas foram utilizados Tween 80® a 0,01 g mL⁻¹ e água. As placas foram mantidas em câmara de crescimento, a 25,5 °C, por 48 horas. Em seguida, contaram-se os J2 móveis e imóveis, e se adicionou uma gota de solução recém-preparada de NaOH 1,0 mol L⁻¹ a cada cavidade. Os J2 retos e imóveis foram considerados mortos, enquanto os retorcidos e móveis foram considerados vivos. Os valores obtidos foram transformados em percentagem de J2 mortos e submetidos à análise de variância (ANOVA), empregando-se o programa computacional SISVAR.⁸ As médias foram comparadas segundo o teste de Scott e Knott ($P \leq 0,05$).⁹ Especificamente para a fração F3-7 (2), soluções a 150, 210, 300 e 600 µg mL⁻¹ foram preparadas em solução aquosa de Tween 80® a 0,01 g mL⁻¹ para serem submetidas ao teste *in vitro* com J2 de *M. exigua* com vistas

a obter dados para o cálculo da concentração letal para o nematoide (CL₅₀). Em tal teste também se avaliaram água, Tween 80® a 0,01 g mL⁻¹ e soluções aquosas do nematicida comercial carbofuran (2,2-dimetil-2,3-di-hidro-1-benzofuran-7-ilcarbamato de metila, Aldrich 98%) nas concentrações de 270, 293, 318 e 355 µg mL⁻¹. Os valores obtidos foram transformados em percentagem de J2 mortos para serem submetidos à análise de Logit, utilizando-se o pacote drc do software R® (R Development Core Team, 2013).

Identificação das substâncias isoladas (1 e 2)

Alíquotas das frações F3-5 (1; 1,2 mg) e F3-7 (2; 1,7 mg), que eram ativas contra J2 de *M. exigua* e estavam puras (segundo análises por CCD), foram dissolvidas em EtOH UV/HPLC até as concentrações de 5,0 e 7,08 µg mL⁻¹, respectivamente, para serem analisadas por espectroscopia no UV-Vis. Uma alíquota de cada uma das duas frações também foi depositada em janela de ATR para ser analisada por espectroscopia no IV, em espectrofotômetro Digilab Excalibur, modelo Series FTS 3000. Foram realizadas 16 varreduras com resolução de 4 cm⁻¹.

Aproximadamente 30 mg de cada amostra foram dissolvidos em 0,7 mL de CDCl₃ (Aldrich) para serem analisadas por espectroscopia de RMN de ¹H e ¹³C, em espectrômetro AVII 400, Bruker, de 400 MHz. Realizaram-se experimentos uni e bidimensionais empregando-se o sinal do solvente ou TMS como referência.

Para medir o desvio do plano da luz polarizada (α), na raia D do sódio, a 25 °C, foi utilizado um polarímetro Perkin Elmer 341 com caminho ótico de 1 dm. Para tanto, a substância 2 foi solubilizada em CHCl₃ até a concentração de 0,017 g mL⁻¹.

Teste *in vitro* das substâncias 1 e 2 contra J2 de *M. incognita*

Raízes de tomateiros (*Solanum lycopersicum* L.) cultivados em casa de vegetação e infestados com *M. incognita* raça 3 foram submetidas à extração de ovos e eclosão de J2 conforme o procedimento adotado para *M. exigua*, mencionado anteriormente. Para a realização do teste *in vitro* com J2 de *M. incognita* as frações F3-5 (1) e F3-7 (2) foram solubilizadas em Tween 80® a 0,01 g mL⁻¹ até a concentração de 625 µg mL⁻¹. Como testemunhas foram utilizados Tween 80® a 0,01 g mL⁻¹, água e carbofuran na concentração de 200 µg mL⁻¹. Empregaram-se cinco repetições para cada um dos tratamentos. A montagem e a avaliação do teste, bem como as análises estatísticas, também foram conduzidas segundo procedimentos adotados para o teste com *M. exigua*.

Seleção *in silico* do alvo enzimático da substância 2

A estrutura da substância 2 (F3-7), a mais ativa contra os nematoides, foi submetida a uma busca conformacional usando o software Open3Dalign 2.23.¹⁰ Para tanto, realizaram-se 1.000 simulações por dinâmica molecular, usando o Merck Molecular Force Field 94 (MMFF94), a 1.000 °C, com 1.000 etapas de 1 fs em cada simulação e considerando o solvente (água) implicitamente pelo emprego do modelo generalized Born surface area (GBSA). Para tanto, a constante dielétrica da água ($\epsilon = 80,4$) foi utilizada. A conformação mais estável em cada simulação foi otimizada usando o campo de força MMFF94s e classificada de acordo com a energia final. A conformação mais estável de 2 foi submetida à busca por ligantes de enzimas similares por meio do programa ReverseScreen3D.¹¹ Dentre os resultados obtidos, selecionou-se a enzima aspartato amônia liase. Também se trabalhou com a enzima fumarato hidratase, cujas características estruturais eram bem próximas às da aspartato amônia liase. As seqüências de aminoácidos de estruturas conhecidas para

estas enzimas foram, em seguida, obtidas do RCSB Protein Data Bank.¹² Tais sequências foram alinhadas com o programa SeaView 4.4.1¹³ e, após remoção daquelas que eram similares entre si, as resultantes foram utilizadas na busca por sequências de aminoácidos similares nos bancos de dados do INRA-*Meloidogyne incognita*¹⁴ e do Nematode.net v 3.0.¹⁵ A maior similaridade foi observada para uma sequência de aminoácidos (CDS_Mhap|MhA1_Contig705.frz3.gene3) oriunda do genoma de *Meloidogyne hapla* Chitwood, que foi extraída do banco de dados do Nematode.net denominado Mhapla.WS230.CDS_geneset.PREFIX_ADDED.fna com o programa Tblastn 2.0MP-WashU.¹⁶ Tal sequência foi simplesmente denominada Mhapla no presente trabalho.

Modelagem molecular da provável fumarato hidratase de *M. hapla*

A sequência de aminoácidos (Mhapla) do genoma de *M. hapla*, selecionada conforme descrito anteriormente, foi automaticamente modelada por homologia com o sistema Swiss-Model.¹⁷ Também se fez modelagem por *threading* com o programa I-TASSER,¹⁸ mas, neste caso, foram utilizadas as estruturas tridimensionais das fumarato hidratase 3E04¹⁹ e 1YFM²⁰ para refinar a modelagem. Todos os modelos gerados pelo sistema I-TASSER foram alinhados com as quatro cadeias das enzimas homotetraméricas 3E04 e 1YFM, utilizando-se o programa Swiss PDB Viewer 4.0.4,²¹ o que permitiu gerar nove homotetrâmeros diferentes para a provável fumarato hidratase de *M. hapla*.

Os nove homotetrâmeros obtidos tiveram as disposições espaciais de suas cadeias laterais refinadas pelo emprego do programa computacional SCWRL4²² e, em seguida, foram adicionados os átomos de hidrogênio com o *plugin* autoPSF do programa VMD 1.9.1,²³ que empregou o arquivo de topologia (top_all27_prot_lipid.rtf)²⁴ com o campo de força Charmm. Em seguida, os homotetrâmeros tiveram suas estruturas otimizadas pelo emprego do programa NAMD 2.9,²⁵ utilizando-se o arquivo de parâmetros para o campo de força Charmm (par_all27_prot_lipid.prm).²⁴ O solvente (água) foi implicitamente considerado pelo emprego do modelo Generalized Born Implicit Solvent (GBIS). As estruturas resultantes foram submetidas a mais duas rodadas de otimização das cadeias com o programa SCWRL4 e otimização de toda a estrutura com o programa NAMD 2.9. As estruturas finais obtidas foram avaliadas quanto às características estereoquímicas e energéticas, bem como quanto ao ambiente de cada resíduo de aminoácido. Para tanto, utilizaram-se os programas FoldX 2.5.2²⁶ e Goap.²⁷ A melhor estrutura (ita2-1YFM), segundo ambos os programas, foi selecionada para as etapas seguintes do trabalho.

Dinâmica molecular com a provável fumarato hidratase de *M. hapla*

A estrutura tridimensional da provável fumarato hidratase de *M. hapla* (ita2-1YFM), modelada e selecionada conforme descrito acima, foi colocada em caixa de água e teve a carga total neutralizada com a adição de oito cátions Na⁺. Para tanto, empregou-se o programa VMD 1.9.1, com o qual se fez com que a distância mínima entre os limites da caixa e a enzima fosse de 15 Å. O sistema resultante foi otimizado (5.000 iterações) com o programa computacional NAMD 2.9 (campo de força Charmm) e, em seguida, submetido à simulação por dinâmica molecular por 4 ns com o mesmo programa, sob condições periódicas de fronteira. Para tanto, foi considerado o *ensemble* isobárico-isotérmico (NPT), temperatura de 300 K controlada com a dinâmica de Langevin e etapas de 2 fs. O algoritmo Particle Mesh Ewald (PME) foi empregado para calcular as interações eletrostáticas, enquanto a pressão foi controlada com o piston de Nosé-Hoover Langevin.

Docking para identificar os sítios de ligação da enzima

As conformações da enzima fumarato hidratase de *M. hapla* (ita2-1YFM), presentes nos últimos 1.000 quadros (1 ns) do processo de simulação por dinâmica molecular (item anterior), foram alinhadas com o programa VMD 1.9.1 e convertidas ao formato pdbqt pelo *script* em Python prepare_receptor4.py, do programa computacional AutodockTools 1.5.6rc2.²⁸ Utilizando o mesmo programa computacional, preparou-se o arquivo pdbqt para a substância **2**. Em seguida, esta substância foi submetida a ancoramentos às cegas, em todas as conformações da enzima no formato pdbqt, utilizando o programa computacional Autodock Vina 1.1.2.²⁹ Cada ancoramento foi feito em região correspondente a uma caixa com as seguintes dimensões: 28,539 (x), 24,329 (y) e 26,329 (z) Å. As mudanças de regiões foram sempre feitas por meio das movimentações de valores correspondentes a metade das dimensões da caixa, de forma a cobrir todas as possibilidades na enzima, que tinha dimensão aproximada de 142 (x), 97 (y) e 158 (z) Å. Logo, para cada quadro (conformação), foram feitos 693 ancoramentos da substância **2**. À exceção do parâmetro *exhaustiveness* do programa Autodock Vina, que foi ajustado para 4, todos os outros foram utilizados com os valores normais do programa. Dentre todos os resultados, foram selecionados os 1.000 ancoramentos com as maiores afinidades da substância pela enzima, o que permitiu observar que estes ancoramentos estavam localizados em 10 regiões da enzima. Fizeram-se, então, novos ancoramentos das substâncias em tais regiões, utilizando todas as 1.000 conformações da enzima. Para tanto, empregou-se o programa Autodock Vina com o parâmetro *exhaustiveness* igual a 64. Por fim, selecionaram-se as quatro regiões na enzima, para as quais se observavam as maiores afinidades.

Docking para comparar as afinidades de **2** com as de ligantes de fumarato hidratases

As estruturas do fumarato, citrato, L-malato, (R)-3-nitro-2-hidroxiopropanoato, (S)-3-nitro-2-hidroxiopropanoato, oxalatoacetato, (S,S)-2,3-dicarboxilatoaziridina, *meso*-tartarato e 1,2,4,5-benzenotetracarboxilato foram preparadas e submetidas a buscas conformacionais, seguidas de conversões das conformações mais estáveis ao formato pdbqt, conforme já mencionado para **2** (F3-7). Em seguida, todas estas substâncias, inclusive **2**, foram ancoradas com o programa Autodock Vina 1.1.2 nas regiões da enzima anteriormente selecionadas e nos seus sítios ativos de acordo com dados da literatura. Para tal ancoramento, que foi realizado com todas as conformações da enzima presentes nos últimos 1.000 quadros da simulação por dinâmica molecular, utilizou-se o valor de 32 para o parâmetro *exhaustiveness* do programa Autodock Vina. Em seguida, todos os ancoramentos feitos pelo programa foram submetidos a ranqueamentos com os programas Plants 1.2,³⁰ AutoDock 4.2.3²⁸ e Paradocks 1.0.1.³¹ Empregaram-se sempre os valores normais para os diversos parâmetros de tais programas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Purificação e identificação das substâncias ativas contra *M. exigua*

Quando na concentração de 2.000 µg mL⁻¹, o extrato bruto das cascas de *C. aschersoniana* causou a mortalidade de todos os J2 de *M. exigua*, enquanto as mortalidades dos J2 expostos aos controles (água e Tween 80®) foram iguais ou próximas de 0%. Tais valores sugerem que esta espécie vegetal seja mais ativa contra nematoides do gênero *Meloidogyne* do que tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), cravo-da-índia

(*Syzygium aromaticum* L.), betel (*Piper betle* L.) e cálam (*Acorus calamus* L.), cujos extratos apresentaram CL_{50} contra J2 de *M. incognita* respectivamente iguais a 1.900, 3.900, 3.000 e 11.300 $\mu\text{g mL}^{-1}$.³² Nas mesmas condições os autores do trabalho relataram que nematicidas comerciais como chlorpyrifos e carbosulfan apresentavam valores de CL_{50} acima de 19.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Logo, a atividade nematicida descrita para *C. aschersoniana* no presente trabalho confirma os resultados preliminarmente obtidos e sugere que esta espécie botânica tenha potencial para uso no desenvolvimento de produtos para o controle de nematoides fitoparasitas.

O fracionamento do extrato bruto de *C. aschersoniana* por extração com solventes de diferentes polaridades resultou em três frações, dentre as quais aquela solúvel em MeOH era a de maior massa, correspondendo a cerca de 57,7% do extrato bruto. Entretanto, de acordo com o teste *in vitro* com J2 de *M. exigua*, na concentração de 2.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ as frações solúveis em Hex e AcOEt elevaram as mortalidades dos J2 para 100%, enquanto a fração solúvel em MeOH, nas mesmas condições, causou mortalidade de J2 que não diferenciava estatisticamente dos controles (água e Tween 80[®]), cujos valores de J2 mortos eram próximos de 0%. Consequentemente, deu-se continuidade ao processo de purificação das substâncias ativas com a fração solúvel em AcOEt, pelo fato de a mesma ter apresentado maior massa (20,66 g; 32,3%) que a fração solúvel em Hex.

O fracionamento da fração solúvel em AcOEt gerou oito subfrações, que foram nomeadas de F1 a F8. Embora F1, F2 e F5-F8 tenham proporcionado a obtenção de valores de J2 mortos que não diferenciavam estatisticamente dos valores observados para as testemunhas (água e Tween 80[®]), F3 e F4 causaram mortalidades de J2 de *M. exigua* iguais ou próximas de 100%, que não eram estatisticamente diferentes entre si. Deu-se continuidade ao fracionamento apenas com F3, pois a mesma apresentava um perfil cromatográfico menos complexo que o da fração F4, e massa suficiente (6,88 g) para as próximas etapas do trabalho. Em decorrência, a partir da fração F3 foram obtidas 17 subfrações (F3-1 a F3-17), dentre as quais as denominadas F3-5 (1) e F3-7 (2) estavam cromatograficamente puras, com massas de 298 e 163 mg, que correspondiam a rendimentos de 29,8% e 16,3%, respectivamente, em relação à massa empregada de F3.

A substância 2 foi mais ativa no teste *in vitro* que a substância 1, cujo maior percentual de mortalidade de J2 de *M. exigua* foi de 37% na concentração de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Na mesma concentração, a substância 2 causou mortalidade próxima de 100%. Quando testada em diferentes concentrações, tal substância acarretou a obtenção de valores de J2 mortos que corresponderam a CL_{50} de $214 \pm 3 \mu\text{g mL}^{-1}$. Logo, a substância 2 é mais ativa contra *M. exigua* do que o nematicida comercial carbofuran, que nas mesmas condições apresentou CL_{50} de $260 \pm 5 \mu\text{g mL}^{-1}$. No teste *in vitro* com J2 de *M. incognita* se observou que esta espécie de nematoide era menos sensível às substâncias isoladas de *C. aschersoniana*. Na concentração de 625 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a substância 1 não afetou o J2, enquanto 2 causou mortalidade de 85%.

A substância 1 apresentava o aspecto de um composto amorfo amarelo. A análise por espectroscopia no UV-Vis demonstrou a presença de cromóforos absorvendo acima de 200 nm, em regiões que indicavam a presença de anel aromático no sistema (Figura 1S). Isto foi corroborado pelo espectro de infravermelho obtido (Figura 2S). Quanto às análises por RMN (Figura 3S a 9S), observaram-se 13 sinais de carbono no espectro de RMN de ^{13}C , sendo todos acima de 100,00 ppm (105,03 - 161,81 ppm), o que sugeria a presença de vários carbonos sp^2 . Os sinais no espectro de RMN de ^1H em 7,35 e 7,50 ppm sugeriam as presenças de ^1H aromáticos, enquanto a presença dos sinais entre 6,63 e 7,50 ppm, com constante de acoplamento de 16,0 Hz, indicava a presença de ^1H olefínicos vicinais, em

configuração *trans*. Somando-se os dados dos espectros unidimensionais aos obtidos com os mapas de contorno de HSQC, HMBC e COSY, obteve-se como resultado a conclusão de que 1 correspondia à pirona natural (*E*)-6-estirilpiran-2-ona (Figura 1, Tabela 1S), o que está em pleno acordo com os dados espectroscópicos descritos na literatura para esta substância.³³

O anel pirânico pertencente a substância 1 consiste em intermediário-chave na biossíntese de vários metabólitos, sendo encontrado em animais, insetos, bactérias e plantas.³⁴ Várias atividades biológicas estão associadas a compostos que têm o referido anel em sua estrutura, dentre as quais se podem citar a antidepressiva e anti-HIV.^{35,36} Segundo estudo descrito na literatura,³⁷ a substância 1, encontrada nos frutos de *Aniba panurensis* (Meisn.) Mez (Fabaceae), apresenta atividade anseolítica e anticonvulsante. Entretanto, nenhum relato foi observado, na literatura, sobre a atividade nematicida desta substância.

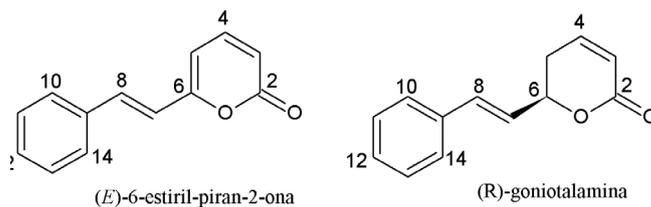


Figura 1. Estruturas da (*E*)-6-estirilpiran-2-ona (1) e da (*R*)-goniotalamina (2), isoladas da fração solúvel em AcOEt, do extrato metanólico das cascas de *Cryptocarya aschersoniana*

A substância 2 (F3-7) também apresentava o aspecto de um composto amorfo amarelo, cujo espectro no UV-Vis (Figura 10S) sugeria a presença de anel aromático. As interpretações dos dados de infravermelho (Figura 11S) e de RMN (Figura 12S a 19S e Tabela 2S) permitiram atribuir à substância 2 a estrutura de uma esteril-lactona conhecida como goniotalamina (Figura 1, Tabela 2S), o que está em perfeita consonância com os dados espectroscópicos da literatura para esta substância.³⁸ Quanto à estereoquímica absoluta da estrutura, comparou-se o valor de $[\alpha]_D$ obtido no presente trabalho (+107,4) com aquele descrito para a (*R*)-goniotalamina,³⁹ o que permitiu observar que 2 também tinha configuração *R*.

Assim como 1, a (*R*)-goniotalamina (2) pertence a um grupo de substâncias naturais com vasta atividade biológica, dentre as quais vale destacar a antimicrobiana, a larvicida, a anti-inflamatória e a antifúngica.⁴⁰ Ademais, a (*R*)-goniotalamina apresenta atividade antiproliferativa contra diversas linhagens tumorais, incluindo carcinomas mamários (MCF-7, de pulmão (NCI.460) e cólon (HT-29)).⁴¹ Entretanto, nenhum relato de atividade nematicida foi encontrado na literatura para 2 ou substâncias análogas. Vale mencionar que em testes com ratos, nenhum efeito tóxico foi observado sobre os animais após 14 dias de tratamento diário com 300 μg de 2,⁴² o que sugere baixíssima toxicidade desta substância contra organismos não alvo, como é o caso do ser humano.

Identificação *in silico* de alvos enzimáticos da (*R*)-goniotalamina (2)

Uma vez comprovada a atividade nematicida da (*R*)-goniotalamina (2) e, conseqüentemente, o seu potencial para emprego no desenvolvimento de novos produtos para o controle de nematoides fitoparasitas, buscou-se identificar os possíveis alvos enzimáticos da referida substância em *Meloidogyne* spp. Para tanto, inicialmente, buscaram-se ligantes de enzimas com semelhanças estruturais em relação a 2. Obtiveram-se vários resultados, sendo a aspartato amônia liase aquela com maior valor de 3D score.¹¹ Isto sugeria que, dentre as possibilidades existentes, tal enzima era aquela com o maior

potencial para corresponder ao alvo biológico de **2**. Como a referida enzima e a fumarato hidratase (fumarase) são proteínas homólogas, que possuem estruturas terciárias e quaternárias similares, bem como sítios ativos parecidos,⁴³ também se optou por empregar a fumarase na etapa seguinte do trabalho.

Não havia, na literatura, qualquer informação sobre a produção de aspartato amônia liase ou de fumarato hidratase por parte de nematoides fitoparasitas. Logo, utilizaram-se as sequências de aminoácidos de tais enzimas, produzidas por outros organismos, como é o caso da 1J3U⁴⁴ e 1JSW,⁴⁵ que são, respectivamente, produzidas por *Bacillus* spp. e *Escherichia coli*, para a procura por sequências similares nos genomas de *Meloidogyne* spp. Os melhores resultados foram obtidos para as buscas realizadas no genoma de *M. hapla* com sequências da fumarato hidratase, que propiciou a obtenção de uma sequência com 476 resíduos de aminoácidos (Mhapla), enquanto as enzimas fumarato hidratases produzidas por outros organismos tinham entre 466 e 495 resíduos de aminoácidos (Figura 20S). Logo, o valor obtido correspondia ao esperado. Além disso, segundo alinhamentos das sequências feitos com o algoritmo ClustalW 2,⁴⁶ no programa SeaView 4.3.3,¹³ a sequência oriunda do genoma de *M. hapla* apresentava similaridades entre 46% e 73% em relação às fumarato hidratases conhecidas (Tabela 3S).

As fumarato hidratases ou simplesmente fumarases, são homotetrâmeros com massa molecular em torno de 200 kDa nos organismos eucarióticos. Fazem parte do ciclo do ácido cítrico (ciclo de Krebs), pois catalizam a adição reversível de água ao fumarato para formar L-malato. Logo, são essenciais para a manutenção da viabilidade celular.⁴³ Conseqüentemente, utilizou-se a sequência Mhapla nas etapas seguintes do trabalho. Entretanto, como a referida sequência de aminoácidos era bastante longa, foi impossível modelá-la por métodos *ab initio*, já que estes só apresentam resultados satisfatórios com sequências mais curtas.⁴⁷ A modelagem por homologia também apresentou problema, pois não foi possível encontrar um molde que permitisse a modelagem de todos os resíduos de aminoácidos da sequência. Logo, o trabalho teve de ser realizado especificamente com a modelagem por *threading*. Como as fumarato hidratases conhecidas eram homotetraméricas, construíram-se homotetrâmeros a partir de todos os modelos obtidos e, em seguida, as estruturas foram várias vezes otimizadas antes dos seus ranqueamentos. A melhor estrutura (ita2-1YFM), segundo ambos os métodos utilizados, apresenta grande semelhança com as estruturas das fumarases já isoladas a partir de outros organismos. No caso daquela isolada de *Sacharomyces cerevisiae* (1YFM; Figuras 21S a 25S), observam-se sobreposições para os sítios ativos e para as estruturas como um todo. Logo, a estrutura ita2-1YFM está em consonância com aquilo que se sabe sobre as fumarato hidratases.

A estrutura ita2-1YFM foi submetida à simulação por dinâmica molecular para relaxamento (Figura 26S) e para a geração de conformações a serem empregadas na etapa de identificação dos sítios de ligação da (R)-goniotalamina (**2**) à enzima. No ancoramento às cegas, com as 1.000 conformações da enzima, correspondentes ao último 1 ns do processo de dinâmica molecular, observou-se que **2** se ligava preferencialmente em uma cavidade (Figura 2 e 27S a 32S) próxima a cada sítio de ligação da enzima que, segundo dados da literatura⁴³ para as fumarato hidratases produzidas por outros organismos, era formado nas junções de três das quatro cadeias do homotetrâmero (Tabela 4S). Dentre as interações de **2** com a enzima cabe destacar a ligação de hidrogênio com o resíduo de aminoácido GLN114 (cadeia B) e o alinhamento do anel aromático da referida substância com os anéis aromáticos dos resíduos PHE23 e PHE44 da cadeia B (Figura 2).

Embora tenham ocorrido algumas discrepâncias entre os programas computacionais empregados nas etapas de ancoramentos,

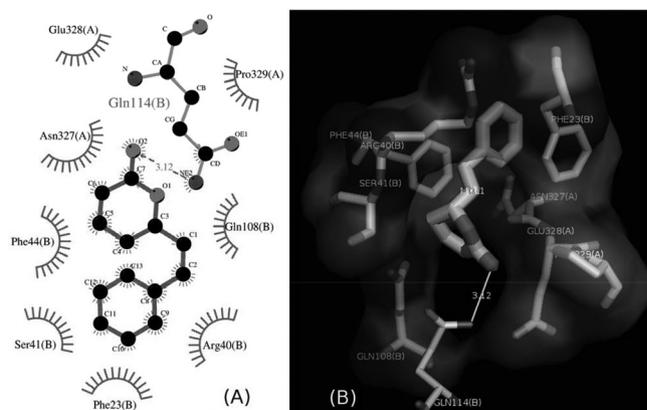


Figura 2. A) Representação em 2D, feita pelo programa LigPlot+ 1.4.5,⁴⁸ da interação da (R)-goniotalamina (**2**) com a enzima fumarato hidratase (ita2-1YFM) de *Meloidogyne hapla*, na qual é mostrada a ligação de hidrogênio com o resíduo GLN114 (cadeia B) e interações hidrofóbicas com outros resíduos das cadeias A e B da enzima. B) Representação em 3D da mesma interação, que foi criada pelo programa LigProt+ 1.4.5 no programa Pymol 1.4.1⁴⁹

observa-se claramente que a afinidade de **2** pela enzima foi maior que as calculadas para o fumarato, L-malato e substâncias inibidoras da fumarato hidratase,⁵⁰⁻⁵² que foram ancoradas nos sítios da enzima ou em regiões próximas aos mesmos (Figura 3). Isto sugere que o mecanismo de ação de **2** contra *Meloidogyne* spp. consista na inibição da fumarato hidratase de tais nematoides.

Assim como observado para a (R)-goniotalamina (**2**), as maiores afinidades das outras substâncias pela enzima ita2-1YFM ocorreram quando as mesmas foram ancoradas em regiões próximas aos sítios ativos da enzima (Ver exemplos nas Figuras 33S a 38S). Este resultado é coerente com a estrutura da fumarato hidratase proveniente de *Escherichia coli* (1FUR),⁵³ que foi cristalizada com moléculas de L-malato fora do seu sítio ativo (Figuras 39S e 40S). Isto sugere que nas conformações de menores energias os sítios ativos das fumarato hidrogenases não estejam aptos para a interação com os seus substratos, sendo necessário que os mesmos inicialmente interajam com a enzima através de outros sítios. Esta é uma situação normal para vários sistemas enzimáticos.^{54,55} Além disto, está em consonância com o trabalho realizado com a fumarato hidratase de *Mycobacterium tuberculosis* (4APB),⁵⁶ durante o qual ficaram nítidas as alterações conformacionais causadas na enzima pela complexação com L-malato, fumarato ou meso-tartarato.

CONCLUSÃO

A atividade nematicida do extrato das cascas da espécie vegetal *C. aschersoniana* foi confirmada através de teste *in vitro* com *M. exigua*. O fracionamento desse extrato por métodos cromatográficos resultou no isolamento de duas substâncias, que foram identificadas por meio de análises espectrométricas como sendo (E)-6-estirilpiran-2-ona (**1**) e (R)-goniotalamina (**2**). Os testes *in vitro* confirmaram a ação nematicida para ambas as substâncias, ressaltando **2** como a mais ativa contra *M. exigua* e *M. incognita*. O estudo *in silico* de **2**, com o objetivo de compreender seu mecanismo de ação, permitiu selecionar a enzima fumarato hidratase de *M. hapla* como o alvo mais provável de **2**. Ademais, em tal estudo esta substância apresentou maior afinidade pela enzima que o seu substrato natural e inibidores de fumarato hidratases descritos na literatura. Conseqüentemente, tanto a fumarato hidratase quanto as substâncias isoladas são bastante promissoras para uso no desenvolvimento de novos produtos para o controle de nematoides fitoparasitas.

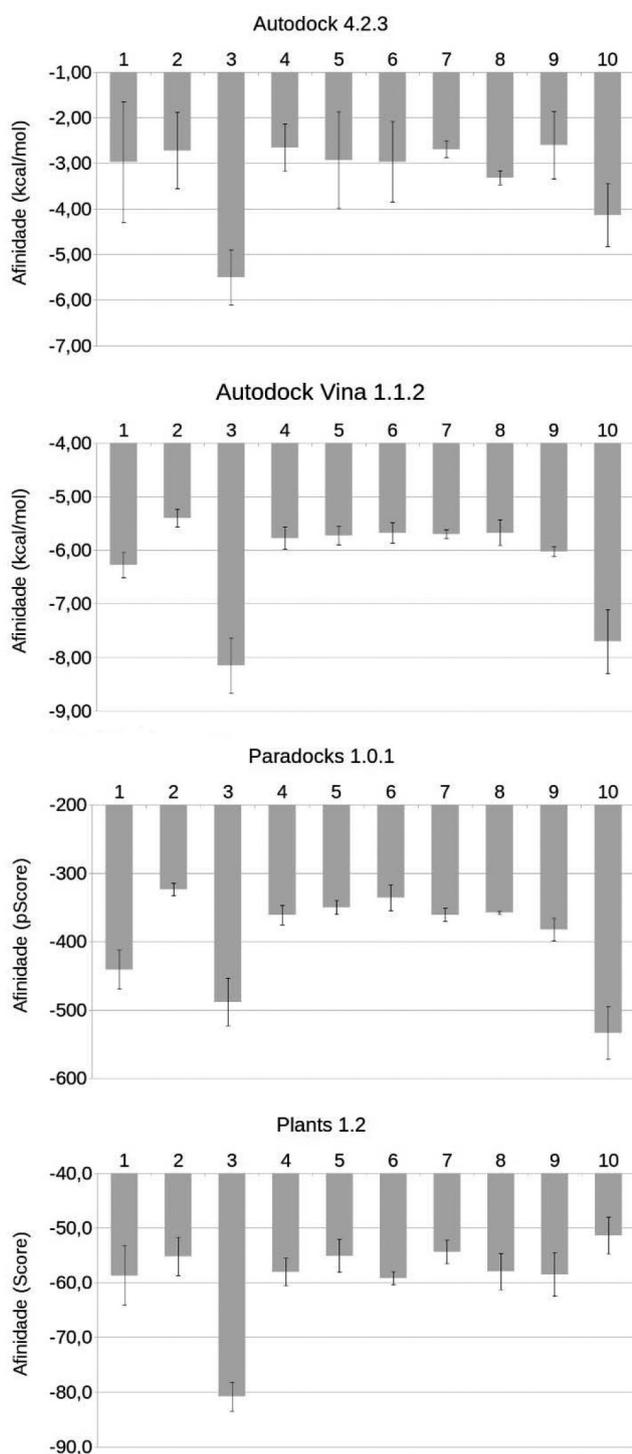


Figura 3. Afinidades das substâncias pela enzima fumarato hidratase de *Meloidogyne hapla* (ita2-1YFM), de acordo com os cálculos realizados com os programas computacionais Autodock Vina 1.1.2, Autodock 4.2.3, Paradocks 1.0.1 e Plants 1.2. 1: citrato; 2: fumarato; 3: (R)-goniotalamina (2); 4: L-malato; 5: (R)-3-nitro-2-hidroxiopropanoato; 6: (S)-3-nitro-2-hidroxiopropanoato; 7: oxalato; 8: (S,S)-2,3-dicarboxilatoaziridina; 9: meso-tartarato; 10: 1,2,4,5-benzenotetracarboxilato. O valor de cada barra corresponde à média para cada ligante, enquanto as barras de erro são iguais aos desvios padrões

MATERIAL SUPLEMENTAR

Algumas imagens e tabelas dos sistemas utilizados neste trabalho estão disponíveis em <http://quimicanova.sbq.org.br>, na forma de

arquivo PDF, com acesso livre.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), em especial ao Instituto de Ciências Exatas e ao Departamento de Química, onde os dados de RMN foram obtidos; ao Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho em São Paulo (CENAPAD-SP), onde os cálculos computacionais foram realizados; e ainda às agências de fomento, CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelos apoios financeiros.

REFERÊNCIAS

- Williamson, V. M.; Kumar, A.; *Trends Genet.* **2006**, *22*, 396.
- Randig, O.; Carneiro, R. M. D. G.; Castagnone-Sereno, P.; *Nematol. Bras.* **2004**, *28*, 1.
- Dias, W. P.; Garcia, A.; Silva, J. F. V.; Carneiro, G. E. S.; *Circular Técnica* **2010**, *76*, 1.
- Oliveira, D. F.; Carvalho, H. W. P.; Nunes, A. S.; Silva, G. H.; Cavalheiro, A. J.; Campos, V. P.; *Nematol. Bras.* **2007**, *31*, 202.
- Chou, T. H.; Chen, J. J.; Peng, C. F.; Cheng, M. J.; Chen, I. S.; *Chem. Biodivers.* **2011**, *8*, 2015.
- Giocondo, M. P.; Bassi, C. L.; Telascrea, M.; Cavalheiro, A. J.; Bolzani, V.S.; Silva, D. H. S.; Agustoni, D.; Mello, E. R.; Soares, C. P.; *Rev. Cienc. Farm. Basica Apl.* **2009**, *30*, 315.
- Hussey, R. S.; Baker, K. R.; *Plant. Dis. Rep.* **1973**, *57*, 1025.
- Ferreira, D. F.; *Ciênc. Agrotec.* **2011**, *35*, 1039.
- Scott, A. J.; Knott, M. A.; *Biometrics* **1974**, *30*, 502.
- Tosco, P.; Balle, T.; *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2011**, *25*, 777
- Kinnings, S. L.; Jackson, R. M.; *J. Chem. Inf. Model.* **2011**, *51*, 624.
- <http://www.pdb.org>, acessada em maio de 2014.
- Gouy, M.; Guindon, S.; Gascuel, O.; *Mol. Biol. Evol.* **2010**, *27*, 221.
- http://www6.inra.fr/meloidogyne_incognita, acessada em maio de 2014.
- http://nematode.net/NN3_frontpage.cgi, acessada em maio de 2014.
- Lopez, R.; Silventoinen, V.; Robinson, S.; Kibria, A.; Gish, W.; *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 3795.
- Arnold, K.; Bordoli, L.; Kopp, J.; Schwede, T.; *Bioinformatics* **2006**, *22*, 195.
- Zhang, Y.; *Bioinformatics* **2008**, *9*, 40.
- Kavanagh, K. L.; Picaud, S.; Pilka, E. S.; Yue, W. W.; Roos, A. K.; Filippakopoulos, P.; von Delft, F.; Arrowsmith, C. H.; Wikstrom, M.; Edwards, A. M.; Bountra, C.; Oppermann, U.; *S. G. C. doi:10.2210/pdb3e04/pdb*.
- Weaver, T.; Lees, M.; Zaitsev, V.; Zaitseva, I.; Duke, E.; Lindley, P.; McSweeney, S.; Svensson, A.; Keruchenko, J.; Keruchenko, I.; Gladilin, K.; Banaszak, L.; *J. Mol. Biol.* **1998**, *28*, 431.
- Guex, N.; Peitsch, M. C.; *Electrophoresis* **1997**, *18*, 2714.
- Krivov, G. G.; Shapovalov, M. V.; Dunbrack, R. L. Jr.; *Proteins* **2009**, *77*, 778.
- Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K.; *J. Mol. Graphics.* **1996**, *14*, 33.
- Vanommeslaeghe, K.; Hatcher, E.; Acharya, C.; Kundu, S.; Zhong, S.; Shim, J.; Darian, E.; Guvench, O.; Lopes, P.; Vorobyov, I.; Mackerell Jr., A. D.; *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 671.
- Kale, L.; Skeel, R.; Bhandarkar, M.; Brunner, R.; Gursoy, A.; Krawetz, N.; Phillips, J.; Shinozaki, A.; Varadarajan, K.; Schulten, K. J.; *Comp. Phys.* **1999**, *151*, 283.
- Schymkowitz, J.; Borg, J.; Stricher, F.; Nys, R.; Rousseau, F.; Serrano, L.; *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 382.
- Zhou, H.; Skolnick, J.; *Biophys. J.* **2011**, *101*, 2043.

28. Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J.; *J. Comput. Chem.* **2009**, *16*, 2785.
29. Trott, O.; Olson, A. J.; *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 455.
30. Korb, O.; Stutzle, T.; Exner, T. E.; *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49*, 84.
31. Muegge, I.; *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5895.
32. Wiratno; Taniwiryono, D.; Van den Berg, H.; Riksen, J. A. G.; Rietjens, I. M. C. M.; Djiwanti, S. R.; Kammenga, J. E.; Murk, A. J.; *Open Nat. Prod. J.* **2009**, *2*, 77.
33. Thibonnet, J.; Abarbri, M.; Parrain, J.; Duchene, A.; *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3941.
34. McGlacken, G. P.; Fairlamb, I. J.; *Nat. Prod. Rep.* **2005**, *22*, 369.
35. Mora S.; Díaz-Véliz, G. M. R.; Lungenstrass, H.; Quirós, S.; Coto-Morales, T.; Hellióon-Ibarrola, M. C.; *Pharm. Biochem. Behav.* **2005**, *82*, 373.
36. Li, G.; Haney, K. H.; Kellogg, G. E.; Zhang, Y.; *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49*, 120.
37. Chaves, E. M. C.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal do Ceará, Brasil, 2012.
38. Wattanapiromsakul, C.; Wangsintaweekul, B.; Sangprapan, P.; Itharat, A.; Keawpradub, N.; *Songklanakarín J. Sci. Technol.* **2005**, *27*, 479.
39. de Fátima, A.; Kohn, L. K.; Carvalho, J. E.; Pilli, R. A.; *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 622.
40. Dumitrescu, L.; Mai Huong, D. T.; Van Hung, N.; Crousse, B.; Bonnet-Delpon, D.; *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 3213.
41. de Fátima, A.; Kohn, L. K.; Antonio, M. A.; de Carvalho, J. E.; Pilli, R. A.; *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 2927.
42. Mosaddik, M. A.; Haque, M. E.; *Pharm. Pharmacol. Commun.* **1999**, *5*, 411.
43. Veetil, V. P.; Fibriansah, G.; Raj, H.; Thunnissen, A. M. W. H.; Poelarends, G. J.; *Biochemistry* **2012**, *51*, 4237.
44. Fujii, T.; Sakai, H.; Kawata, Y.; Hata, Y.; *J. Mol. Biol.* **2003**, *328*, 635.
45. Shi, W.; Dunbar, J.; Jayasekera, M. M.; Viola, R. E.; Farber, G. K.; *Biochemistry* **1997**, *36*, 9136.
46. Larkin, M. A.; Blackshields, G.; Brown, N. P.; Chenna, R.; Mcgettigan, P. A.; Mcwilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I. M.; Wilm, A.; Lopez, R.; Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; Higgins, D. G.; *Bioinformatics* **2007**, *23*, 2947.
47. Unger, R.; Harel, D.; Wherland, S.; Sussman, J. L.; *Proteins* **1989**, *5*, 355.
48. Laskowski, R. A.; Swindells, M. B.; *J. Chem. Inf. Model.* **2011**, *51*, 2778.
49. Schrodinger, L. L. C.; *The PyMOL Molecular Graphics System*, Version 1.3r1. 2010. (Book The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1).
50. Reyns, C.; Léonis, J.; *Biochimie* **1975**, *57*, 131.
51. Beeckmans, S.; Van Driessche, E.; *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 31661.
52. Greenhut, J.; Umezawa, H.; Rudolph, F. B.; *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 6684.
53. Weaver, T.; Lees, M.; Banaszak, L.; *Protein Sci.* **1997**, *6*, 834.
54. Weikl, T. R.; von Deuster, C.; *Proteins* **2009**, *75*, 104.
55. Csermely, P.; Palotai, R.; Nussinov, R.; *Trends. Biochem. Sci.* **2010**, *35*, 539.
56. Mechaly, A. E.; Haouz, A.; Miras, I.; Barilone, N.; Weber, P.; Shepard, W.; Alzari, P. M.; Bellinzoni, M.; *FEBS Lett.* **2012**, *586*, 1606.