



GIOVANNA CARDOSO GAJO

**SELEÇÃO VIRTUAL DE SUBSTÂNCIAS
INIBIDORAS DA CORISMATO MUTASE DE
Meloidogyne incognita E ESTUDO FITOQUÍMICO
E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE *Croton
floribundus* SPRENG PARA *Atta sexdens***

LAVRAS - MG

2013

GIOVANNA CARDOSO GAJO

**SELEÇÃO VIRTUAL DE SUBSTÂNCIAS INIBIDORAS DA
CORISMATO MUTASE DE *Meloidogyne incognita* E ESTUDO
FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE *Croton
floribundus* SPRENG PARA *Atta sexdens***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Agroquímica, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Denilson Ferreira de Oliveira

LAVRAS - MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Gajo, Giovanna Cardoso.

Seleção virtual de substâncias inibidoras da corismato mutase de *Meloidogyne incognita* e estudo fitoquímico e avaliação da toxicidade de *Croton floribundans* SPRENG para *Atta sexdens* / Giovanna Cardoso Gajo. – Lavras : UFLA, 2013.

129 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Denilson Ferreira de Oliveira.

Bibliografia.

1. Formiga cortadeira. 2. Nematoides fitoparasitos. 3. Controle. 4. Extrato botânico. 5. Dinâmica molecular. 6. Docking. 7. Inseto-praga. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 543.089

GIOVANNA CARDOSO GAJO

**SELEÇÃO VIRTUAL DE SUBSTÂNCIAS INIBIDORAS DA
CORISMATO MUTASE DE *Meloidogyne incognita* E ESTUDO
FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE *Croton
floribundus* SPRENG PARA *Atta sexdens***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Agroquímica, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 28 de fevereiro de 2013.

Dr. Ronald Zanetti Bonetti Filho UFLA

Dr. Vicente Paulo Campos UFLA

Dr. Denilson Ferreira de Oliveira
Orientador

LAVRAS - MG

2013

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Química pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Departamento de Entomologia pela realização dos testes biológicos.

Ao LNBio (Laboratório Nacional de Biociências) onde foram realizadas as análises de RMN.

A CAPES pela concessão de bolsa.

Ao professor Denilson, pela orientação e ensinamentos.

Ao professor Sebastião Claudino, pela colaboração e amizade apesar de toda a distância.

Aos colegas do Laboratório de Produtos Naturais Pacelli, Laene por tornarem essa experiência mais agradável, e a Viviane por compartilhar o aprendizado.

A Juliana Santos pela amizade e apoio que tornaram esta defesa possível.

A técnica Eliana Andrade pelo apoio nos testes biológicos.

A meus pais Cilaine e José Márcio pelo amor incondicional.

A minha sobrinha Ana Carolina e as minhas irmãs Janaína e Jordana pelos momentos de descontração e desabafos durante toda a minha vida, o fato de saber que vocês estão ao meu lado me dá coragem pra enfrentar tudo.

Aos amigos Eduardo Nunes Maciel por toda a colaboração e parceria; ao Ary Abdo por estar ao meu lado em todos os momentos e ao Daniel Gedder por ser o anti – bullying da pós-graduação.

“Nunca deixe que alguém te diga que não pode fazer algo. Nem mesmo eu. Se você tem um sonho, tem que protegê-lo. As pessoas que não podem fazer por si mesmas, dirão que você não consegue. Se quer alguma coisa, vá e lute por ela. Ponto final.”

Chris Gardner

RESUMO GERAL

Em decorrência da grande necessidade de novos métodos para o controle de pragas e doenças de plantas, com menores efeitos nocivos ao homem e ao ambiente em geral, buscou-se, no presente trabalho, contribuir para o desenvolvimento de novos produtos para o controle da formiga cortadeira *Atta sexdens*, que se trata de um inseto-praga que ataca várias culturas; e para o controle de *Meloidogyne incognita*, que se trata de um nematoide parasita de plantas de ampla ocorrência mundial. Para tanto, no caso do inseto o trabalho foi focado na purificação e elucidação estrutural da substância produzida por *Croton floribundus*, a qual pudesse ser atribuída à atividade formicida da planta. Em decorrência, a fração do seu extrato bruto que era solúvel em acetato de etila foi submetida a vários processos de fracionamento até que se alcançasse a purificação de uma substância. Pelo emprego de análises por ressonância magnética nuclear, concluiu-se que a substância se tratava do ácido caurenóico. Quanto ao nematoide, inicialmente se empregou a química computacional para modelar a sequência de aminoácidos da corismato mutase produzida por *M. incognita*, que se trata de uma das enzimas envolvidas no parasitismo do nematoide. Em seguida, utilizaram-se filtros farmacofóricos e de *docking* para selecionar substâncias inibidoras da referida enzima. Por fim, as substâncias orgânicas selecionadas no processo de *docking* foram ranqueadas com diferentes programas computacionais, e apenas aquelas apresentando as maiores afinidades pela enzima segundo todos os métodos empregados foram selecionadas para a realização de testes com *M. incognita*.

Palavras-chave: Controle de insetos. Extrato botânico. Dinâmica molecular. Docking.

GENERAL ABSTRACT

Due to the great necessity of new methods to control pests and diseases of plants, with less damaging effects to humans and the environment, the present work sought to contribute to the development of new products for controlling the leaf-cutting ant *Atta sexdens*, an insect-pest which attacks many cultures; and to control *Meloidogyne incognita*, a plant parasite nematode of worldwide occurrence. Thus, in the insect's case, this work focused on the purification and structural elucidation of the substance produced by *Croton floribundus* to which could be attributed to the plant's formicide activity. As a result, the fraction soluble in ethyl acetate from the plant crude extract, was submitted to various fractionating processes until the purification of a substance. We concluded that the substance was kaurenoic acid, by employing nuclear magnetic resonance analyses. Regarding the nematode, we initially employed computational chemistry in order to model a sequence of amino acids of the chorismate mutase produced by *M. incognita*, which is an enzyme involved in the nematode's parasitism. Subsequently, we used pharmacophoric and *docking* filters to select inhibitors to the modelled enzyme. Finally, the organic substances selected in the *docking* process were ranked with different computational programs and, only those presenting the highest affinities to the enzyme, according to all the employed methods, were selected for the tests with *M. incognita*.

Keywords: Insect control. Botanical extract. Molecular dynamics. Docking.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1 Estruturas de substâncias de origem vegetal com atividade contra insetos 19
- Figura 2 Estruturas de agrotóxicos organoclorados e o glicerol 22
- Figura 3 Estruturas de pesticidas organofosforados 22
- Figura 4 Estruturas de carbamatos utilizados como pesticidas 23

CAPÍTULO 2

- Figura 1 Exemplos de substâncias com propriedades formicidas extraídas de plantas 32
- Figura 2 Mortalidade de operárias de *Atta sexdens* após a ingestão de polpa cítrica impregnada com a fração aquosa (G-20-1) proveniente da fração solúvel em metanol (G-09-5) do extrato metanólico bruto de *Croton floribundus*. Foram empregadas três concentrações da fração aquosa: 200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica 51
- Figura 3 Mortalidade de operárias de *Atta sexdens* após a ingestão de polpa cítrica impregnada com a fração orgânica (G-20-2) proveniente da fração solúvel em metanol (G-09-5) do extrato metanólico bruto de *Croton floribundus*. Foram empregadas três concentrações da fração orgânica: 200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica 53

Figura 4	Mortalidade de operárias de <i>Atta sexdens</i> após a ingestão de polpa cítrica impregnada com a fração residual (G-20-3) proveniente do processo de partição líquido-líquido da fração solúvel em metanol (G-09-5) do extrato metanólico bruto de <i>Croton floribundus</i> . Foram empregadas três concentrações da fração: 200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica.....	54
Figura 5	Estrutura química de G-82-04 (ácido caurenoico)	55
Figura 6	Subestrutura A presente na estrutura da substância G-82-04 segundo a interpretação dos dados de RMN ¹ H e COSY. Os átomos de ¹ H da posição 17 acoplam com aqueles da posição 15 ...	58
Figura 7	Subestrutura presente na estrutura da substância G-82-04 segundo a interpretação dos dados de HMBC	59
Figura 8	Subestrutura presente na estrutura da substância G-82-04 segundo a interpretação dos dados de HMBC, sugerindo a presença de um sistema derivado da decalina.....	59
Figura 9	Subestrutura presente na estrutura da substância G-82-04 segundo a interpretação dos dados de HMBC, sugerindo que o grupo carboxila se ligue ao carbono 4.....	60

CAPÍTULO 3

Figura 1	Representação simplificada da via do Chiquimato modificada de Yamada e Castro (2004), demonstrando a atuação da enzima corismato mutase, que reduz a formação do triptofano	78
Figura 2	Sequências de aminoácidos de corismato mutases produzidas por <i>Meloidogyne incognita</i> (HUANG et al., 2005).....	93
Figura 3	Alinhamento das sequências de aminoácidos de MI-CM-2, 1ECM e 2F6L	96

Figura 4	Energias totais (kcal/mol) dos modelos homodiméricos da enzima corismato mutase de <i>M. incognita</i> , até 6 ns de simulação por dinâmica molecular, calculados com o programa FoldX	97
Figura 5	RMSD x tempo de simulação por dinâmica molecular para o modelo robb2 da enzima corismato mutase de <i>M. incognita</i>	98
Figura 6	Similaridade estrutural entre Robb2 em amarelo e 2F6L em vermelho	99
Figura 7	Uma molécula de TSA ancorada no sítio ativo de cada cadeia de Robb2	100

ANEXOS

Figura 1	Espectro de RMN ^{13}C de G-82-04(ácido caurenico) em CDCl_3 , 150 MHz.....	116
Figura 2	Espectro de RMN ^1H de G-82-04(ácido caurenico) em CDCl_3 , 600 MHz.....	117
Figura 3	Mapa da correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) de G-82-04 em CDCl_3 , 600 MHz	118
Figura 4	A Ampliação do mapa da correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) de G-82-04 em CDCl_3 , 600 MHz	119
Figura 5	Mapa da correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (600 MHz x 150 MHz) a curta distância (HSQC) de G-82-04 em CDCl_3 . Onde os pontos em azul representam CH_2 , os pontos em vermelho CH e CH_3	120
Figura 6	A Ampliação do mapa da correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (600 MHz x 150 MHz) a curta distância (HSQC) de G-82-04 em CDCl_3 . Onde os pontos em azul representam CH_2 , os pontos em vermelho CH e CH_3	121

Figura 7	Mapa da correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 MHz x 100 MHz) a longa distância (HMBC) de G-82-04 em CDCl_3	122
Figura 8	A Ampliação do mapa da correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 MHz x 100 MHz) a longa distância (HMBC) de G-82-04 em CDCl_3	123

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

- Tabela 1 Frações obtidas durante o fracionamento do extrato bruto metanólico de *Croton floribundus*, massa total de cada fração (MF), rendimento de cada fração em relação à massa total do extrato bruto ou à massa total da fração solúvel em metanol do extrato bruto, e massas das frações que foram utilizadas nas concentrações equivalentes a 200, 400 e 600 mg/g no experimento (MUE) com *Atta sexdens*..... 46
- Tabela 2 Comparação entre os dados de RMN ¹³C e ¹H de G-82-04 com os dados da literatura para o ácido caurenóico (MONTE et al., 1988)..... 56

CAPÍTULO 3

- Tabela 1 Resultados da avaliação dos modelos resultantes após a eliminação por RMSD, pelo emprego dos programas Qmean 6 Score-Swiss Expansy, Vadar 1.5, Dfire2, ProQ e FoldX 2.5.2. Os valores mais favoráveis segundo cada método empregado estão marcados em destaque..... 95
- Tabela 2 Valores de RMSD (Å) entre os modelos homodiméricos da corismato mutase de *M. incognita*: itasser1, itasser2, robb2 e robb4..... 97

ANEXOS

- Tabela 1 Concentração das amostras na pasta oferecida ([]), tempo letal mediano (TL₅₀)*, valores de parâmetros de forma (α) e parâmetros de escala (β), a probabilidade (P) e mortalidade acumulada (%) de formigas cortadeiras submetidas a bioensaios de ingestão de polpa cítrica impregnada com o extrato bruto metanólico de *C. floribundus*, com as suas frações e com a substância purificada a partir do mesmo..... 113
- Tabela 2 Ranqueamento dos melhores ligantes. Os melhores de cada método estão em destaque 124

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

^{13}C	Carbono treze
^1H	Hidrogênio
3D	Espaço Tridimensional
Å	Angstrons
Arg	Arginina
Asp	Aspartato
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDCl_3	Clorofórmio deuterado
cm	Centímetros
COSY	<i>Correlated spectroscopy</i>
EBMeOH	Extrato Bruto Metanólico
fs	Femtosegundos
g	Gramas
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum coherence</i>
Ile	Isoleucina
J2	Juvenil do segundo estágio
L	Litro
Leu	Leucina
Lys	Lisina
m	Multiplete
mg	Miligrama
MHz	Megahertz

mL	Militro
mm	Milímetro
ns	Nanosegundo
°C	Graus Celsius
ppm	Parte por milhão
ps	Pico segundo
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMSD	Desvio da raiz quadrada média
s	Singleto
Ser	Serina
TL ₅₀	Tempo letal mediano
TMS	Tetrametilsilano
TOCSY	<i>Total correlation spectroscopy</i>
TSA	(1R,3S,5S,8R)-8-hidroxi-2-oxabicyclo[3.3.1]non-6-eno-3,5-dicarboxilato
Val	Valina
δ _C	Deslocamento químico de carbono treze, cuja unidade será sempre parte por milhão (ppm)
δ _H	Deslocamento químico de hidrogênio, cuja unidade será sempre parte por milhão (ppm)

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 Introdução Geral	18
1	INTRODUÇÃO	18
	REFERÊNCIAS	26
	CAPÍTULO 2 Estudo fitoquímico e avaliação da toxicidade de <i>Croton floribundus</i> para a formiga cortadeira <i>Atta sexdens</i>	28
1	INTRODUÇÃO	30
2	REVISÃO LITERÁRIA	34
2.1	Família Euphorbiaceae	34
2.2	Gênero <i>Croton</i>	35
2.3	Espécie <i>Croton floribundus</i>	35
2.4	A formiga <i>Atta</i> spp.	36
3	MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1	Coleta do material botânico e preparo do extrato bruto	38
3.2	Fracionamento do extrato bruto metanólico.....	39
3.3	Partição líquido-líquido da fração solúvel em metanol do extrato bruto metanólico de <i>C. floribundus</i>	40
3.4	Fracionamento por cromatografia em coluna da fração solúvel em acetato de etila (G-09-3) do extrato bruto metanólico (EBMeOH)	41
3.5	Fracionamento das amostras G-38-02 e G-38-03, provenientes da fração solúvel em acetato de etila (G-09-3)	41
3.6	Fracionamento da amostra G-79-02 proveniente da fração solúvel em acetato de etila (G-09-3).....	42
3.7	Identificação da substância purificada.....	42
3.8	Experimentos com formigas realizados em condições de laboratório.....	43
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5	CONCLUSÃO	62
	REFERÊNCIAS	63
	CAPÍTULO 3 Seleção virtual de substâncias inibidoras da corismato mutase de <i>Meloidogyne incognita</i> Kofoid e White	69
1	INTRODUÇÃO	71
2	REVISÃO LITERÁRIA	73
2.1	Fitonematoides	73
2.2	Gênero <i>Meloidogyne</i>	74
2.3	<i>Meloidogyne incognita</i>	75
2.4	Corismato mutase	76
2.5	A Química Computacional	79
3	MATERIAIS E MÉTODOS	83

3.1	Modelagem molecular.....	83
3.2	Avaliação dos modelos gerados	83
3.3	Construção dos dímeros da corismato mutase de <i>M. incognita</i> ...	84
3.4	Avaliação e otimização dos dímeros	84
3.5	Dinâmica Molecular.....	85
3.6	Avaliação dos modelos após a simulação por dinâmica molecular.....	86
3.7	Seleção da conformação da corismato mutase de <i>M. incognita</i> mais apropriada para a seleção de ligantes.....	86
3.8	Seleção de inibidores para a corismato mutase de <i>M. incognita</i> ..	88
3.8.1	Utilizando o programa Autodock Vina	88
3.8.2	Utilizando o programa Igemdock.....	90
3.9	Ranqueamento dos ligantes	90
3.9.1	Utilizando o programa DSX 0.8.9.....	90
3.9.2	Utilizando o programa MGLTools 1.5.6-rc2.....	91
3.9.3	Utilizando o programa NNscore 1.0	91
3.9.4	Utilizando o programa Dock 6.6.....	91
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	93
5	CONCLUSÃO.....	102
	REFERÊNCIAS.....	103
	ANEXOS	113

CAPÍTULO 1 Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO

Com o desenvolvimento da agricultura no século XVIII, a densidade populacional aumentou rapidamente e, conseqüentemente, o homem aumentou seus estoques de vegetais e carne, para que pudesse alimentar os diversos agrupamentos humanos e seus animais domésticos (BARBOSA, 2004). Várias mudanças na relação entre as espécies passaram a ser observadas, pois os campos cultivados se tornaram fontes de alimento para as mais variadas espécies de insetos, roedores e de microrganismos em geral. Essas espécies se multiplicaram rapidamente por causa da grande quantidade de alimento e passaram a interferir no bem-estar das pessoas (BRAIBANTE; ZAPPE, 2012).

Na segunda metade do século XIX, novas práticas agrícolas foram introduzidas, dentre as quais se podem destacar a utilização de fertilizantes em larga escala e de máquinas para plantar sementes e para a colheita e o processamento de alimentos. Isto fez com que surgissem os primeiros estudos científicos sistemáticos sobre o uso de compostos químicos para o controle de pragas e doenças agrícolas (BRAIBANTE; ZAPPE, 2012). Os compostos inorgânicos mais utilizados foram os arseniatos de cálcio e chumbo (verde Paris), cupratos (calda bordalesa), enxofre em pó, vários sulfatos, cal, fluorossilicato de bário e aminoselenossulfito de potássio (criolite) (VIEGAS Jr., 2003).

É importante considerar que vários compostos inorgânicos utilizados em larga escala eram muito tóxicos, como foi o caso do ácido cianídrico, usado nos Estados Unidos para eliminar insetos em moradias. Além disto, após algum tempo os insetos desenvolveram resistência a esse ácido (ZAPPE, 2011).

Os compostos orgânicos de origem vegetal também foram utilizados no combate às pragas e doenças de plantas. Um exemplo é a nicotina (**1**) extraída das folhas de fumo (*Nicotiana tabacum* L.). O seu uso teve início no século XVII, quando era empregada para controlar insetos em jardins, o que ainda é feito por várias pessoas na nossa sociedade. Outros exemplos são: *nor*-nicotina (**2**), anabasina (**3**), os piretroides como a piretrina (**4**) (isolada inicialmente no século XIX, proveniente de flores secas de *Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis. e *Chrysanthemum coccineum* Willd., que se trata de uma planta encontrada na Iugoslávia e no Cáucaso), aletrina (**5**) e os rotenoides, sendo a rotenona (**6**) isolada de raízes de *Derris elliptica* Wallich, que se trata de uma planta comum na Malásia e na Indonésia, e de espécies de *Lonchocarpus* existentes na África e América do Sul, que são utilizadas para o controle de lagartas. Há também, alguns quassinoides como a quassina (**7**) (isolada das folhas de *Quassia amara* L.) (Figura 1) (VIEGAS Jr., 2003).

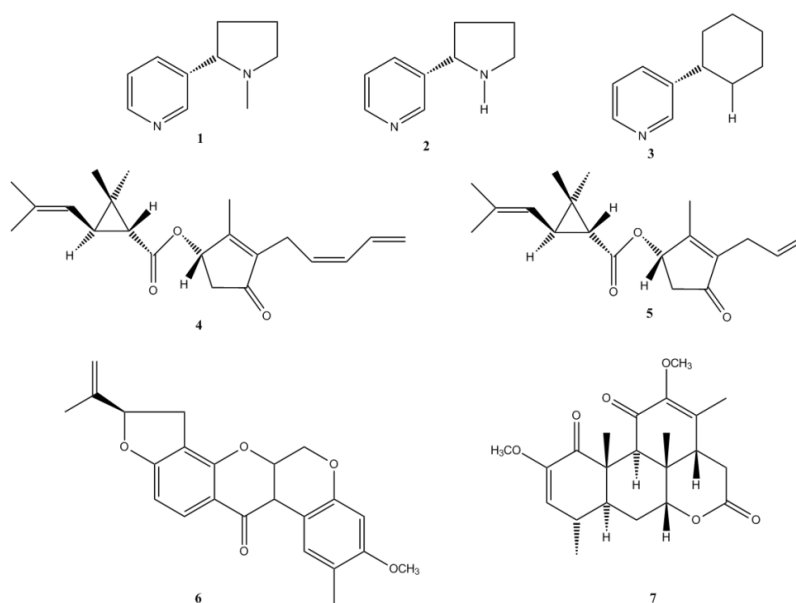


Figura 1 Estruturas de substâncias de origem vegetal com atividade contra insetos

Os produtos químicos empregados no controle de insetos e doenças de plantas, como a infestação de nematoides, podem matar, atrair e repelir, sendo suas descobertas, isolamentos, sínteses, avaliações toxicológicas e de impactos ambientais, vastos tópicos de pesquisas no mundo inteiro. Os primeiros inseticidas de origem natural foram muito utilizados até a década de 40, quando os produtos sintéticos passaram a ganhar espaço, principalmente após a II Guerra Mundial, devido às pesquisas com produtos biocidas. Estes se mostraram muito mais potentes e menos específicos que os naturais, até então utilizados no controle de pragas agrícolas. Em decorrência, os pesticidas de origem natural foram quase totalmente substituídos pelos de origem sintética (VIEGAS Jr., 2003).

Um marco importante nesta área foi a descoberta em 1939 da atividade inseticida do 1,1,1-tricloro-2,2-di(*p*-clorofenil)etano (**8**, Figura 2), conhecido como DDT. Esse inseticida foi utilizado pela primeira vez em 1943, durante a II Guerra Mundial, para combater piolhos que infestavam tropas norte-americanas na Europa e que transmitiam uma doença chamada tifo exantemático (BRANCO, 2003). O DDT é classificado como um organoclorado. Outros exemplos de pesticidas organoclorados são aldrin (**9**), dieldrin (**10**), heptacloro (**11**), toxafeno (**12**) e o nematicida/fungicida clorotalonil (**13**) (Figura 2). As principais características dos organoclorados são: insolubilidade em água; solubilidade em líquidos apolares como éter, clorofórmio e, conseqüentemente, em óleos e gorduras, o que ocasiona o acúmulo dos mesmos no tecido adiposo dos organismos vivos; e alta estabilidade, pois são necessários muitos anos para que possam ser degradados em condições ambientais (BRAIBANTE; ZAPPE, 2012).

Os primeiros nematicidas utilizados em escala comercial também apresentavam como base hidrocarbonetos halogenados (contendo cloro ou bromo). No geral, esses nematicidas eram subprodutos ou descartes de processos

industriais diversos e, por isso, seus custos eram relativamente baixos. Assim, nos anos 30 os produtores de abacaxi do Havai usaram a cloropicrina (**14**) (Figura 2), que nada mais é que o princípio ativo do gás lacrimogêneo, como um fumigante de solo em tratamentos de rotina para o controle de nematoides de galhas (*Meloidogyne* spp.) e da espécie *Rotylenchulus reniformis* (LINFORD; OLIVEIRA 1940). Na época havia grande excedente desse produto, o que o tornava muito barato e atraente aos agricultores. Quando tais estoques terminaram, o uso da cloropicrina para o controle de fitonematoides praticamente cessou. Anos após, a Shell Chemical Company acumulou enorme quantidade de glicerol (**15**) (Figura 2), outro subproduto da indústria bélica, usado como nematicida (WEISCHER; BROWN, 2001).

No final dos anos 40, os abacaxicultores havaianos testaram uma mistura de dicloropropano e dicloropropeno como potencial nematicida. Tal composição, denominada DD, levou a uma explosão no mercado agrícola, pois se revelou muito eficiente no controle de nematoides e proporcionava um aumento de nitrogênio no solo em que era aplicado. Porém, foi considerado um verdadeiro biocida por causar as mortes de vários organismos do solo e serem tóxicos até para as plantas (WEISCHER; BROWN, 2001).

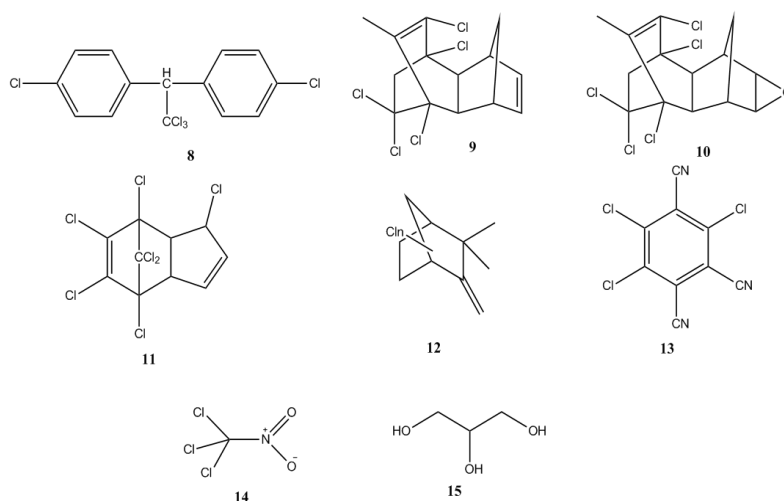


Figura 2 Estruturas de agrotóxicos organoclorados (substâncias 8-14) e do glicerol (substância 15)

Em razão das características nocivas ao homem e ambiente dos compostos organoclorados, houve a necessidade de desenvolver novos compostos para o controle de pragas e doenças, o que resultou na síntese de vários organofosforados e carbamatos (OLIVEIRA, 2006). Os organofosforados foram desenvolvidos nas décadas de 1930 e 1940 para serem utilizados como armas químicas durante a II Guerra Mundial (MORAGAS; SCHNEIDER, 2003). São compostos derivados do ácido fosfórico, que podem conter em suas estruturas átomos de carbono (C), hidrogênio (H), oxigênio (O), enxofre (S), nitrogênio (N) e fósforo (P). A toxicidade aguda dos inseticidas organofosforados é maior que a dos organoclorados, porém são menos persistentes no meio ambiente. Como eles sofrem rápida degradação, é necessário um número maior de aplicações dos organofosforados para se alcançar a mesma eficácia dos organoclorados (ARRUDA, 2005). O herbicida glifosato (**16**), os inseticidas malation (**17**), paration (**18**) e dissulfoton (**19**), e os nematicidas terbufós (**20**) e fenamifós (**21**), são alguns exemplos de compostos organofosforados (Figura 3).

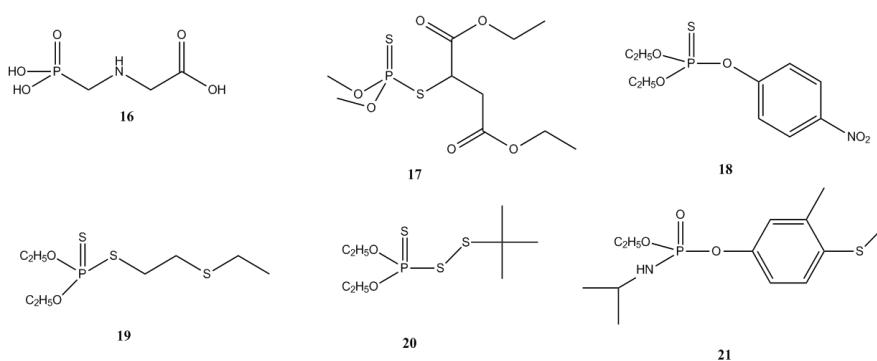


Figura 3 Estruturas de pesticidas organofosforados

Os carbamatos tiveram seu desenvolvimento associado ao uso da planta *Physostigma venenosum* Balf., natural do oeste da Ásia e conhecida como feijão-de-calabar. Seu extrato aquoso era utilizado em julgamentos de crimes de feitiçaria. Se o acusado de tal crime sobrevivesse após a ingestão do referido extrato aquoso, seria considerado inocente. Em caso contrário, seria considerado culpado. Ao se isolar o composto responsável pelos efeitos medicinais e tóxicos dessa planta, observou-se que o mesmo apresentava o grupo carbamato em sua estrutura (BRANCO, 2003). Os compostos dessa classe química mais utilizados são o carbaril (**22**), um inseticida de amplo espectro; o carbofuran (**23**), que apresenta propriedades inseticida e nematicida; e o aldicarb (**24**), que pode ser empregado como inseticida e nematicida (Figura 4).

Os principais nematicidas vendidos no Brasil são à base de carbamatos e, apenas no ano de 2011, o mercado dessas substâncias atingiu cerca de US\$ 224 milhões, o que corresponde a 2,7% do mercado de defensivos agrícolas no Brasil (GERCHON,2012).

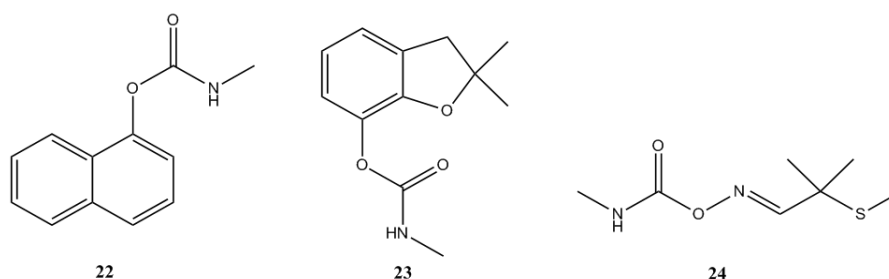


Figura 4 Estruturas de carbamatos utilizados como pesticidas

Apesar do grande benefício que o uso de pesticidas sintéticos em geral trouxe para a nossa sociedade, não se pode deixar de levar em consideração que eles correspondem a gastos da ordem de bilhões de dólares por ano. Além disso, são tóxicos ao homem e ao ambiente em geral. Logo, existe uma demanda

crescente por agentes eficientes para o controle de insetos e de nematoides, que sejam menos nocivos ao homem e ao meio ambiente, e de custos mais baixos. (SÃO PAULO, 2001).

Uma ferramenta que pode ser útil no desenvolvimento de novos produtos para o controle de pragas e doenças de plantas é a química computacional. Com esta ferramenta é possível diminuir o tempo e o custo financeiro para o desenvolvimento de novas substâncias. Exemplos de sucesso no uso desta ferramenta podem ser facilmente observados no planejamento racional de fármacos (AMARAL et al., 2003; GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010). <http://pt.wikipedia.org/wiki/Fenômeno>

Outra ferramenta de grande utilidade para o desenvolvimento de novos produtos para o controle de pragas e doenças de plantas diz respeito à identificação de produtos naturais biologicamente ativos contra tais pragas e doenças. Talvez o melhor exemplo de sucesso nesta área seja o das piretrinas, que correspondem a um grupo de inseticidas naturais que gerou vários análogos sintéticos disponíveis no mercado atual (KLOCKE et al., 1991; VIEGAS Jr. 2003).

Em decorrência da grande necessidade de novos produtos para o controle de pragas e doenças de plantas, com menores efeitos nocivos ao homem e ao ambiente em geral, buscou-se, no presente trabalho, contribuir para o desenvolvimento de novas substâncias para o controle da formiga cortadeira *Atta sexdens*, que se trata de um inseto-praga que ataca várias culturas, dentre as quais se destacam aqui as espécies de pinus e eucalipto; e para o controle de *Meloidogyne incognita*, que se trata de um nematoide parasita de plantas de ampla ocorrência mundial. Para tanto, no caso da formiga, o trabalho foi focado na identificação de plantas ativas e na purificação e elucidação estrutural da substância produzida pela planta, a qual pudesse ser atribuída à atividade observada. Quanto ao nematoide, empregou-se a química computacional para

selecionar substâncias que pudessem inibir uma das enzimas do nematoide envolvida no parasitismo do mesmo.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, P. A. et al. Química combinatória: moderna ferramenta para a obtenção de candidatos a protótipos de novos fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 4, p. 351-363, out./dez. 2003.
- ARRUDA, T. L. **Uso de processos oxidativos avançados e ferro elementar na remediação de água subterrânea contendo compostos organoclorados**. 2005. 171 p. Dissertação (Mestrado em Química)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.
- BARBOSA, L. C. A. **Os pesticidas, o homem e o meio ambiente**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2004.
- BRAIBANTE, M. E. F.; ZAPPE, J. A. A Química dos agrotóxicos. **Química Nova na Escola**, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 10-15, 2012.
- BRANCO, S. M. **Natureza e agroquímicos**. 2. ed. São Paulo: Moderna, 2003.
- GERCHON, E. **Nematicidas no Brasil**: um mercado com potencial para grandes negócios. Disponível em:
<<http://www.factordesolucao.com.br/pdf/ArtigoNematicidasnoBrasil.pdf>>.
Acesso em: 18 fev. 2012.
- GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 24, n. 70, 2010.
- KLOCKE, J. A. et al. Grayanoid diterpene insect antifeedants and insecticides from rhododendron-molle. **Phytochemistry**, v. 30, p. 1797-1800, 1991.
- LINFORD, M. B.; OLIVEIRA, J. M. *Rotylenchulus reniformis*, nov. gen., sp., a nematode parasite of roots. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, Washington, v. 7, n. 1, p. 35-42, 1940.
- MORAGAS, W. M.; SCHNEIDER, M. O. Biocidas: suas propriedades e seu histórico no Brasil. **Caminhos de Geografia**, v. 3, n. 10, p. 26-40, 2003.

OLIVEIRA, L. A. G. **Determinação de resíduos de agrotóxicos organoclorados em laranja por dispersão de matriz em fase sólida (MSPD)**. 2006. 103 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Produção Sustentável)-Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2006.

SÃO PAULO. Superintendência de Controle de Endemias. **Segurança em controle químico de vetores**. 2001. Disponível em: <<http://www.bvsde.paho.org/bvsapud/p/fulltext/plagui/plagui.pdf>>. Acesso em: 8 fev. 2013.

VIEGAS Jr., C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 390-400, 2003.

WEISCHER, B.; BROWN, D. J. F. **Conhecendo os nematóides nematologia geral**: livro-texto para estudantes e não especialistas. Sofia: Pensoft, 2001. 230 p.

ZAPPE, J. A. **Agrotóxicos no contexto químico e social**. 2011. 135 p. Dissertação (Mestrado em Educação em Ciências)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

CAPÍTULO 2 **Estudo fitoquímico e avaliação da toxicidade de *Croton floribundus* para a formiga cortadeira *Atta sexdens***

RESUMO

Avaliou-se em condições de laboratório a toxicidade contra *Atta sexdens* do extrato vegetal de *Croton floribundus* solúvel em metanol e das suas frações. Em todos os testes se utilizaram duas testemunhas, sendo uma com o inseticida sulfluramida a 0,3mg/g e outra sem qualquer ingrediente ativo. Para cada tratamento se empregaram seis repetições, sendo cada uma composta por uma placa de Petri contendo 20 formigas. Avaliaram-se três concentrações de cada amostra utilizada para impregnar a polpa cítrica oferecida às formigas durante 24h (200, 400 e 600mg/g de polpa cítrica). As mortalidades das formigas foram avaliadas do primeiro ao vigésimo dia após a troca da polpa cítrica por dieta livre de substâncias ativas contra as formigas. Os dados foram submetidos à análise de sobrevivência, usando a distribuição de Weibull. Confirmou-se a atividade formicida do extrato metanólico bruto de *C. floribundus* e se observou que as frações de tal extrato, solúveis em acetato de etila e metanol também apresentaram atividade formicida. A fração solúvel em acetato de etila causou 64,0% de mortalidade após 21 dias de avaliação, em duas concentrações testadas (400 e 600mg/g de polpa cítrica) e tempo para causar a morte de 50% dos indivíduos (TL₅₀) de 17,5 dias. A fração metanólica apresentou 80,5% de mortalidade depois de 21 dias de avaliação, em duas concentrações avaliadas (200 e 600mg/g) e TL₅₀ de 11 dias. Já para a aquosa, proveniente da partição-líquido da fração solúvel em metanol, o comportamento da curva de mortalidade nas maiores concentrações foi semelhante ao observado para a testemunha com sulfluramida (87,7% após 21 dias, TL₅₀=7,9 dias). Da fração acetato se isolou o componente majoritário, ao qual foi atribuída a estrutura do ácido caurenóico com base em análises por ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono treze. Entretanto, tal substância não apresentou atividade formicida.

Palavras-chave: Formigas cortadeiras. Extrato botânico. Controle de insetos. Manejo integrado de pragas florestais.

**CHAPTER 2 Phytochemical study and evaluation of the toxic activity of
Croton floribundus against the leaf-cutting ant *Atta sexdens***

ABSTRACT

We evaluated, in laboratory conditions, the toxicity of methanol extract of the plant *Croton floribundus* and its fractions, against *Atta sexdens*. In all the tests, two controls were used: one with the insecticide sulfluramid 0.3 mg/g, and the other without any active ingredient. Six replicates were used for each treatment, each one comprising a Petri dish containing 20 ants. Three concentrations of each sample were used to impregnate citric pulp (200, 400 and 600mg/g of citric pulp) which was offered to the ants during 24 h. Ant mortality was evaluated from the first to the twentieth day after changing the citric pulp for a diet free of active substances against ants. Data were submitted to survival analysis, using the Weibull distribution. We confirmed the formicide activity of the methanolic crude extract of *C. floribundus* and observed that fractions of such extract, soluble in ethyl acetate and methanol, also presented formicide activity. The fraction soluble in ethyl acetate caused 64.0% mortality after 21 days of evaluation, in two concentrations tested (400 and 600 mg/g of citric pulp) and caused the death of 50% of the individuals (TL₅₀) in 17.5 days. The methanolic fraction caused 80.5% mortality after 21 days of evaluation, in two concentrations evaluated (200 and 600 mg/g of citric pulp) and TL₅₀ of 11 days. For the aqueous fraction, obtained after the liquid partition of the fraction soluble in methanol, the mortality curve of the highest concentration was similar to that observed for the control with sulfluramid (87.7% after 21 days, TL₅₀=7.9 days). Fractionation of the acetate fraction resulted in the isolation of a major component, to which was attributed the structure of kaurenoic acid after hydrogen and carbon thirteen nuclear magnetic analysis. However, such substance did not present formicide activity.

Keywords: Leaf-cutting ants. Botanical extract. Insect control. Forest pests integrated management.

1 INTRODUÇÃO

As formigas cortadeiras (*Atta* Fabricius e *Acromyrmex* Mayr) são as principais pragas de reflorestamento no Brasil (ANJOS; MOREIRA; DELLA LUCIA, 1993; SILVA; PAZINI, 2012), pois atacam as plantas em qualquer fase de seu desenvolvimento, provocando perdas diretas (morte de mudas e a redução do crescimento de árvores) e indiretas (diminuição da resistência das árvores a outros insetos e a agentes patogênicos) (ANJOS; MOREIRA; DELLA LUCIA, 1993). Os vegetais frescos obtidos nas atividades de forrageamento das formigas são utilizados para a alimentação das mesmas e para o desenvolvimento do fungo simbiote, *Leucoagaricus gongylophorus* (Möller) Singer (Agaricales: Agaricaceae) (BASS; CHERRETT, 1995).

O controle destes insetos tem sido realizado, quase exclusivamente, com a aplicação de inseticidas convencionais, entre eles, cyfluthrin (piretróide), imidacloprid (neonicotinoide), furathiocarb (carbamato), fipronil (fenilpirazol) e sulfluramida (sulfonamida fluoroalifática) (BRASIL, 2010). As estratégias de controle químico diferem principalmente em função do tipo de formulação, que ocorre na forma de pó, líquido ou granulado. Dentre as formulações disponíveis, vale mencionar as iscas granuladas, que têm a vantagem de representar menos perigo para os trabalhadores que utilizam os inseticidas. Ademais, elas permitem que os ninhos sejam tratados em locais de difícil acesso. Os inseticidas comumente empregados em iscas formicidas incluem sulfluramida, clorpirifós, e uma mistura de sulfluramida e fipronil. A sulfluramida foi introduzida no mercado brasileiro pela primeira vez em 1993 para substituir o organoclorado mirex (= dechlorane), o qual foi banido do mercado brasileiro (ISENRING; NEUMEISTER, 2009).

A sulfluramida permite o controle de formigas cortadeiras de forma eficaz, chegando a causar 100% de mortalidade destes insetos. Trata-se de um

inseticida de ação lenta, que afeta o processo de fosforilação oxidativa (respiração aeróbia), agindo sobre as mitocôndrias. Ele interrompe a produção de ATP (adenosina trifosfato), o que é letal para insetos. Um dos grandes problemas em sua utilização é a persistência extremamente alta no meio ambiente. Nos termos da Convenção de Estocolmo, o uso como formicida do sulfonato de perfluorooctano (principal precursor da sulfluramida) será restrito, podendo, eventualmente, ser proibido (UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME, UNEP, 2007).

Florestas certificadas pelo FSC (Forest Stewardship Council) no Brasil derrogaram o uso de inseticidas considerados altamente perigosos (*highly hazardous*), entre os quais se encontram deltametrina, fipronil, fenitrotiom, e sulfluramida. Isto significa que até 2014 o uso da sulfluramida terá de ser interrompido em tais florestas. Para tanto, os órgãos certificadores aconselham a reduzir gradualmente a quantidade de sulfluramida utilizada e a substituí-la com outros inseticidas e/ou formas de controle (ISENRING; NEUMEISTER, 2009).

Novas moléculas químicas extraídas de plantas têm sido estudadas visando à substituição da sulfluramida como principal ingrediente ativo nas iscas formicidas. Alguns exemplos são: sesamin (1) e sesamol (2) (Pedaliaceae; *Sesamum indicum* L.) (MORINI et al., 2005); astilbin (3) (Fabaceae; *Dimorphandra mollis* Benth.) (CINTRA et al., 2005); ácido limonéxico (Rutaceae; *Raulinoa echinata* R.S.Cowan) (BIAVATTI et al., 2005); kokusagina (4), ácido antranílico e dictamnina (5) (Rutaceae; *Helietta puberula* RE Fr.) (ALMEIDA et al., 2007); elemol (6) e β -eudesmol (Myrtaceae; *Corymbia maculata* (syn. *Eucalyptus maculata*) (Hook.) K.D. Hill e L.A.S. Johnson; 6 α -acetoxigedunin (Meliaceae; *Carapa guianensis* Aubl.) (AMBROZIN et al., 2006); fluroquinolinas, ariquinolin-4-ona, ácido limonéxico, limonin (Rutaceae; *Spiranthera odoratissima* St. Hil) (TEREZAN et al., 2010). Também vale mencionar que o ácido palmítico, presente na fração metanólica de extratos

hexânicos de folhas de *Ricinus communis* L., inibiu o crescimento do fungo simbiote *L. gongylophorus* em 81%. Além disso, a ricinina, obtida da fração metanólica do extrato em diclorometano da mesma planta, reduziu a sobrevivência média das operárias de *A. sexdens* (S_{50} =5,21 dias; 0,40 mg/mL) se comparado ao controle (S_{50} =10,82 dias), quando oferecida via ingestão (BIGI et al., 2004). (Figura 1).

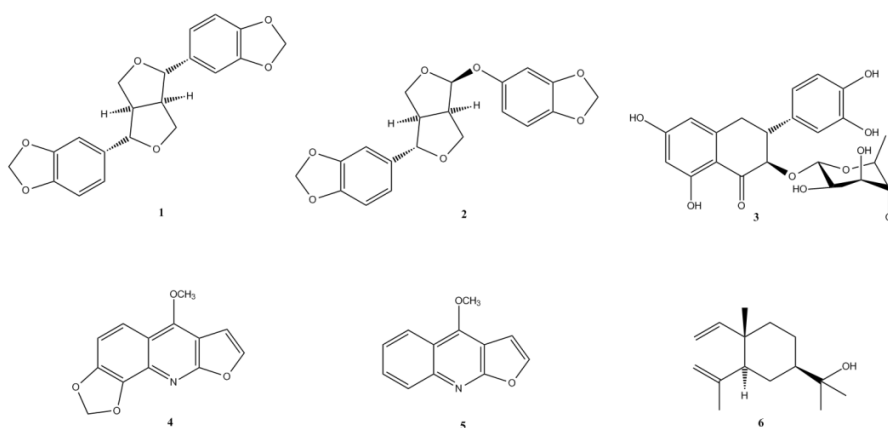


Figura 1 Exemplos de substâncias com propriedades formicidas extraídas de plantas

Em decorrência do potencial das plantas para a produção de substâncias ativas contra formigas cortadeiras, e da demanda por novas substâncias para uso no controle destes insetos, em trabalho preliminar os extratos de diversas plantas foram preparados e submetidos a testes com formigas cortadeiras *A. sexdens*, o que permitiu observar que *Croton floribundus* Spreng (Euphorbiaceae) produzia substâncias ativas contra o referido inseto-praga. Também se observou no referido trabalho preliminar que a fração solúvel em acetato de etila do extrato metanólico de tal planta continha as mencionadas substâncias ativas. Para dar continuidade a tal estudo, objetivou-se no presente trabalho purificar e

identificar as substâncias ativas contra *A. sexdens* presentes na fração solúvel em acetato de etila do extrato de *C. floribundus*.

2 REVISÃO LITERÁRIA

2.1 Família Euphorbiaceae

A família Euphorbiaceae é uma das maiores na divisão Angiospermae, com cerca de 300 gêneros e aproximadamente 7.500 espécies distribuídas em todo o mundo (Cronquist, 1981). Seus principais gêneros em número de espécies são: *Euphorbia* L. (1.500), *Croton* L. (700), *Phyllanthus* L. (400), *Acalypha* L. (400), *Macaranga* Du Petit Thouars (400), *Antidesma* Burman (150), *Drypetes* Vahl (150), *Jatropha* L. (150), *Manihot* Miller (150) e *Tragia* Plumier (150) (Webster, 1994). De acordo com Barroso et al. (1991), no Brasil ocorrem 72 gêneros e cerca de 1.100 espécies desta família, difundidas em todos os tipos de vegetação.

Apesar do elevado número de espécies, os seus representantes podem ser reconhecidos por um conjunto de características como porte arbóreo, arbustivo, subarbustivo ou herbáceo, com folhas alternas, simples ou compostas, estipuladas, flores unissexuadas, em geral monoperiantadas, em plantas monóicas ou dióicas, com ou sem vestígio do sexo atrofiado e dispostas em inflorescências racemosas ou cimosas, com flores masculinas apresentando número de estames variável e flores femininas tipicamente tricarpelares, triloculares. Apresentam frutos secos deiscentes ou indeiscentes, comumente do tipo cápsula esquizocárpica (tricoca), ou ainda cápsulas septífragas, loculíidas e circundante, drupóides (filotrimídios, drupas e nukulânios) e bacóides (BARROSO et al., 1999).

2.2 Gênero *Croton*

O gênero *Croton* é subdividido em 40 seções e possui mais de 1.300 espécies de distribuição principalmente pantropical. No Brasil, é o gênero com maior número de espécies da família Euphorbiaceae, com um total de 350 espécies distribuídas em 29 seções (BERRY, 2006). Para a Região Nordeste se estima um total de 52 espécies distribuídas em 18 seções (CORDEIRO; CARNEIRO-TORRES, 2006).

Trata-se de um grupo taxonomicamente complexo e pouco estudado. Segundo a revisão de Müller (1873) para a Flora Brasiliensis de Martius, foi posicionada na subfamília Crotonoideae, tribo Crotonae. As espécies deste grupo se tratam de árvores, arbustos, ervas e, raramente, lianas. São geralmente monóicas, algumas vezes dióicas, com tricomas simples (glandulares ou não), ou tricomas ramificados (estrelados, lepidotos, fasciculados, multirradiados, dentrícos e escamiformes). Em geral, as inflorescências apresentam flores pistiladas na base e estaminadas no ápice, estames dobrados no botão floral, sendo as pétalas das flores pistiladas reduzidas ou ausentes (BENTHAM, 1880; BARROSO, 1991; LUCENA, 2000; CARNEIRO et al., 2002; SECCO, 2005; GUIMARÃES, 2006).

2.3 Espécie *Croton floribundus*

Croton floribundus Spreng, popularmente conhecida como capixingui, é uma planta pioneira, de ocorrência nos Estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Mato Grosso, Minas Gerais e Paraná, principalmente na floresta latifoliada semidecídua (LORENZI, 1992). Apresenta crescimento muito rápido e ciclo de vida curto, sendo muito abundante em formações secundárias. Por repovoar

clareiras e proliferar em bordas de mata, é muito empregada em reflorestamentos mistos, protetivos ou comerciais, com sombreamento de espécies de estágios mais avançados de sucessão (DURIGAN et al., 2002). O mel produzido a partir de suas flores é de coloração quase branca, de aroma muito diferenciado, saborosíssimo e de excelente qualidade. Inicia a frutificação precocemente, cerca de três anos após o plantio. Os frutos são do tipo cápsula tricoca, contendo três sementes, as quais são arredondadas, de cor preta, e que, de acordo com Lorenzi (1992), apresentam viabilidade que não ultrapassa os quatro meses. Quanto às suas atividades biológicas, na literatura se observa apenas que possui propriedades medicinais (LORENZI, 1992; CARVALHO, 2003) e que apresenta elevada atividade moluscicida contra o caramujo *Biomphalaria glabrata* (Planorbidae) (MEDINA et al., (2009).

2.4 A formiga *Atta* spp.

Desde os tempos coloniais, a formiga saúva (*Atta* spp.) tem sido uma das piores pragas da agricultura Brasileira. O gênero *Atta* é de ampla distribuição geográfica, ocorrendo nas Américas desde o sul dos Estados Unidos até o centro da Argentina, inexistindo apenas no Chile, no Canadá e em algumas ilhas das Antilhas (MARICONI, 1970). Caracterizam-se por possuírem três pares de espinhos no dorso do tórax e apresentarem a superfície dorsal do gáster lisa, sem tubérculos. Os indivíduos que compõem a colônia apresentam elevado grau polimórfico (ANJOS et al., 1998). Além disso, Loureiro e Queiroz (1990) ainda as caracterizam pelas carenas frontais muito separadas.

Os prejuízos que causam são simplesmente devastadores. Segundo Amante (1967a), dez saúveiros adultos/ha, de *Atta capiguara* Gonçalves, 1944, cortam 21kg de forragem/dia, reduzindo em mais de 50% a capacidade da pastagem, além de proporcionar maior desenvolvimento de plantas daninhas e

ainda, facilitarem o processo de erosão. Em *Eucalyptus grandis*, uma desfolha de 100% das árvores acarreta uma redução no incremento anual de madeira de aproximadamente 80% (FREITAS, 1988). Um saueiro adulto pode consumir 1 tonelada de folhas de *Eucaliptus* sp. por ano, ou 86 árvores (AMANTE, 1967b; MENDES FILHO, 1979). Segundo Precetti et al. (1988), um saueiro adulto de saúva mata-pasto (*Atta bisphaerica* Forel, 1908) ocasiona uma perda de 3,2 toneladas de cana/ha, para um canavial com produtividade de 60 toneladas de cana/ano.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta do material botânico e preparo do extrato bruto

O material vegetal de *C. floribundus*, Família Euphorbiaceae foi coletado no dia 29/04/2011 no Viveiro Florestal da UFLA/Lavras, Minas Gerais. Esta planta foi identificada e a exsicata correspondente se encontra depositada no Herbário Esal/UFLA com o número de registro 26941. As características físicas da planta: diâmetro de aproximadamente 70cm e uma altura de 7m. Não apresentava flores, frutos e nenhum sintoma de doenças, insetos e plantas parasitas.

As cascas do caule de *C. floribundus* foram secas em estufa de ventilação forçada, a 40°C, durante 48 horas. Em seguida, foram moídas em moinho de martelos elétricos com motor monofásico até a consistência de pó, que foi armazenado em freezer (aproximadamente -14 °C). Para a etapa de extração, utilizaram-se 1322 g de cascas secas e moídas de *C. floribundus*, divididos em 26 porções de aproximadamente 50g, que foram colocadas em frascos de vidro com metanol (150 mL). Após 24 horas, o conteúdo de cada frasco foi filtrado em algodão hidrófilo e os resíduos obtidos foram submetidos ao mesmo processo por mais sete vezes para a extração do máximo possível de substâncias dos tecidos vegetais. Em seguida, as fases líquidas foram combinadas e concentradas até *secura* em evaporador rotatório. A seguir, para a total remoção da umidade, o resíduo obtido após a concentração do solvente foi liofilizado durante 24 horas, obtendo-se assim o extrato bruto metanólico, na forma de um sólido granuloso, de coloração vinho (EBMeOH), com massa de 290g (21,94% de rendimento em relação à massa da casca seca empregada).

3.2 Fracionamento do extrato bruto metanólico

Adicionaram-se 900 mL de hexano a parte (240,04g) do extrato bruto metanólico (EBMeOH) de *C. floribundus*, que foi obtido conforme descrito no item 3.1. A mistura resultante foi agitada por 20 minutos e, após repouso por 10 minutos, filtrou-se a referida mistura em algodão hidrófilo. O resíduo de tal filtração foi submetido ao mesmo processo mais oito vezes. As fases solúveis em hexano foram combinadas e filtradas, pois se formou um precipitado nas mesmas. A seguir, a solução resultante foi concentrada em evaporador rotatório e seca em liofilizador para resultar na obtenção de um sólido pastoso de cor caramelo, com massa de 23,91 g (código G-09-1, rendimento 9,96% em relação à massa do EBMeOH). O material precipitado também foi submetido à remoção do solvente em evaporador rotatório e posteriormente liofilizado para resultar em um pó de coloração rosa, com massa de 6,47 g (código G-09-2, rendimento 2,69% em relação à massa do EBMeOH). O resíduo insolúvel em hexano foi submetido ao mesmo processo de extração, empregando-se acetato de etila no lugar do hexano. Neste caso se realizou um total de sete lavagens. Também se observou a formação de um precipitado na fase líquida, que foi separado por filtração e submetido à remoção do solvente em evaporador rotatório e liofilizador para resultar em 15,96 g de um sólido pastoso de cor marrom esverdeada (código G-09-3, rendimento 6,64% em relação à massa do EBMeOH). Após remoção (evaporador rotatório e liofilizador) do solvente da fase solúvel em acetato de etila se obteve um resíduo (pó) de coloração rosa claro, com massa de 2,55 g (código G-09-4, rendimento 1,06% em relação à massa do EBMeOH). O resíduo insolúvel em acetato de etila foi submetido a processo similar, empregando-se metanol no lugar de acetato de etila. O processo de lavagem com este solvente foi realizado por nove vezes. Com isto, obteve-se um resíduo final (solúvel em metanol) na forma de um pó de

coloração vinho, com massa de 166,60 g (código G-09-5, rendimento de 69,40% em relação à massa do EBMeOH). Todas as frações obtidas foram armazenadas em freezer a -15 °C até o momento de serem utilizadas.

3.3 Partição líquido-líquido da fração solúvel em metanol do extrato bruto metanólico de *C. floribundus*

Parte da fração metanólica (G-09-5, 8 g,) obtida do extrato bruto de *C. floribundus*, foi adicionada ao solvente diclorometano (60 mL), resultando em solução que foi transferida para um funil de decantação (500 mL), no qual também se colocou água destilada (180 mL). O funil de decantação foi agitado vigorosamente por 20 minutos e, após 10 minutos em repouso, removeu-se a fase inferior (diclorometano) e se colocaram mais 60 mL de diclorometano no funil para que o processo fosse repetido. Todo o procedimento de partição foi repetido até que a cor da fração inferior ficasse estabilizada (bem clara), o que correspondeu a um total de cinco etapas de partição. As fases coletadas (diclorometano) foram centrifugadas para separá-las de uma fase intermediária, com o aspecto de uma “gosma”, que se formou durante o processo de partição. Em seguida, combinaram-se as fases de diclorometano e se removeu o solvente em evaporador rotatório e liofilizador para a obtenção de um pó de coloração vinho, com massa de 0,82 g [G-20-2, rendimento de 10,25% em relação à massa da fração solúvel em metanol (G-09-5)]. A fase intermediária e a fase superior (aquosa) também foram submetidas a processo de concentração em evaporador rotatório e liofilizador para resultarem, respectivamente, na obtenção de um pó de coloração rosa, com massa de 1,39 g (G-20-3, com rendimento de 17,37% em relação a G-09-5) e de um sólido cristalino de coloração marrom avermelhado, com massa de 4,90 g (G-20-1, rendimento de 61,25% em relação a G-09-5).

3.4 Fracionamento por cromatografia em coluna da fração solúvel em acetato de etila (G-09-3) do extrato bruto metanólico (EBMeOH)

A fração solúvel em acetato de etila (G-09-3, 4,9 g) foi submetida ao fracionamento por cromatografia em coluna de sílica gel do tipo *flash* (7 x 15cm) (Still et al., 1978), utilizando-se os gradientes de hexano/acetato de etila (9:1, 2L; 8:2, 1L; 1:1, 1L; 0:100, 1L) e metanol (100%, 1L). Coletaram-se 64 frações (G-38-1 a G-38-64) de 100 mL, que foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD). Para tanto, empregaram-se placas de alumínio recobertas com sílica gel 60F₂₅₄. Para revelar as substâncias foi empregada luz ultravioleta (254nm), vapor de iodo e solução de ácido fosfomolibdico a 5% (g.mL⁻¹) em etanol. As frações apresentando o mesmo perfil cromatográfico foram combinadas, originando nove novas frações (G-38-01 a G-38-09). Dentre tais frações, as de número 02 (G-38-02) e 03 (G-38-03) foram combinadas (massa=2,09 g) para serem submetidas a novo fracionamento.

3.5 Fracionamento das amostras G-38-02 e G-38-03, provenientes da fração solúvel em acetato de etila (G-09-3)

Parte (600 mg) da massa total obtida pela combinação das frações G-38-02 e G-38-03 foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel do tipo *flash* (4 x 15 cm) (Still et al., 1978), utilizando-se uma combinação isocrática de hexano/acetato de etila (9:1, 800 mL). As frações coletadas (24 frações de 30 mL) foram também analisadas por CCD e combinadas de acordo com a similaridade cromatográfica, originando três novas sub-frações (G-79-01 a G-79-03).

3.6 Fracionamento da amostra G-79-02 proveniente da fração solúvel em acetato de etila (G-09-3)

A fração G-79-02 (384 mg) foi submetida a novo fracionamento por cromatografia em coluna de sílica gel do tipo *flash* (4 x 15 cm) (Still et al., 1978), utilizando-se como fase móvel combinações de hexano/acetato de etila (20:1, 600 mL; 9:1, 600 mL). As frações coletadas (43 frações de 30 mL) foram também analisadas por CCD e combinadas de acordo com a similaridade cromatográfica, originando seis novas sub-frações (G-82-01 a G-82-06), dentre as quais as de código G-82-02 (4,4 mg), G-82-04 (318,2 mg) e G-82-06 (1,2 mg) se apresentaram cromatograficamente puras. A fração G-82-04 é o componente majoritário da fração G-79-02.

3.7 Identificação da substância purificada

As análises por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio (^1H) e carbono treze (^{13}C) foram realizadas em um equipamento Bruker Avance DRX-400 (400 MHz), no Laboratório de Ressonância Magnética Multi-Usuário (Laremar), Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas (ICEx), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e em um equipamento VARIAN INOVA (600 MHz), no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio). Obtiveram-se espectros unidimensionais (^1H , ^{13}C , DEPT 135) e bidimensionais (NOESY, HSQC, HMBC, HSQC-TOCSY, COSY) da amostra dissolvida em clorofórmio deuterado (CDCl_3 , Sigma-Aldrich) contendo tetrametilsilano (TMS), que foi utilizado como referência interna.

3.8 Experimentos com formigas realizados em condições de laboratório

Os testes foram conduzidos em parceria com Departamento de Entomologia da Universidade Federal de Lavras e executados segundo a metodologia adaptada de Nagamoto et al. (2004). Utilizaram-se operárias de *A. sexdens*, retiradas de ninhos adultos mantidos em sala climatizada ($21 \pm 2^\circ\text{C}$), com 24 horas de escotofase e umidade relativa (U.R.) de 70%, no Laboratório de MIP Florestal/Universidade Federal de Lavras. Nos experimentos foram utilizadas operárias de tamanho médio, cujas massas variaram entre 10 e 20 mg, e cápsulas cefálicas estavam entre 2,0 e 2,8 mm. A atribuição de massa e de tamanho cefálico foi visual, com base em comparação com amostras pré-coletadas.

Nestes experimentos se avaliou o extrato bruto metanólico (EBMeOH) de *C. floribundus* e suas frações solúveis em hexano (G-09-1), acetato de etila (G-09-3) e metanol (G-09-5). Também se avaliaram os precipitados das frações solúveis em acetato de etila (G-09-4) e hexano (G-09-2), bem como as frações obtidas durante o processo de partição líquido-líquido da fração solúvel em metanol do extrato da mencionada planta: fase aquosa (G-20-1), fase orgânica (G-20-2) e a fase intermediária obtida durante a partição (G-20-3). Empregaram-se duas testemunhas: uma sem ingrediente ativo e a outra com o formicida sulfluramida (sulfluramida técnica a 93%) com concentração final de 0,3% (mg/g). Para cada tratamento foram utilizadas seis repetições, sendo cada uma composta por 20 formigas em uma placa de Petri de 10 cm de diâmetro, forrada com papel-filtro.

Para a condução do experimento se utilizou bagaço de laranja (polpa cítrica), o qual foi desidratado em estufa por três dias a 40°C e, em seguida, foi triturado em liquidificador por várias vezes e passado em uma malha fina (0,50 mm) até apresentar o aspecto visual de pó homogêneo.

Cada amostra a ser estudada foi dissolvida em metanol (+/-30 mL), resultando em uma solução a qual foi adicionado o pó da polpa cítrica (1g). No caso da sulfluramida se utilizaram 16 mL de acetona no lugar do metanol. As misturas resultantes foram homogeneizadas com frequente agitação manual (10 minutos) e ultrassom (5 minutos, potência 1400A). A seguir, o solvente foi removido de cada mistura em evaporador rotatório e, imediatamente antes do início do experimento, adicionou-se uma solução (\pm 20 mL) de sacarose a 10% (g/mL) até que fosse obtida uma pasta homogênea.

Utilizaram-se três concentrações para cada uma das amostras, empregando-se como referência para os cálculos as massas do extrato bruto de *C. floribundus* (200, 400 e 600 mg). Quanto às massas das frações (MFR) G-09-1, G-09-2, G-09-3, G-09-4, G-09-5, G-20-1, G-20-2 e G-20-3, que foram obtidas durante os processos de lavagens com solventes (hexano, acetato de etila e metanol), foram calculadas de acordo com a seguinte fórmula (1):

$$\text{MFR} = [(\text{CEB} \cdot 6) \cdot \text{MF}] / \text{MTEB} \cdot 1,2; \quad (1)$$

Onde CEB é a concentração do Extrato Bruto em polpa cítrica ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$); MF é a massa da fração obtida durante o fracionamento (g); MTEB é a massa total do extrato bruto (240 g) e 6 é o numero de repetições utilizadas em cada tratamento.

Com relação às massas das frações obtidas durante a partição líquido-líquido da fração solúvel em metanol (MFA), foram calculadas de acordo com a seguinte fórmula (2):

$$\text{MFA} = \{ [(\text{CEB} \cdot 6) \cdot \text{MFMeOH}] / \text{MTEB} \cdot 1,2 \} \cdot \text{MFase} / \text{MTFMeOH} \quad (2)$$

Onde CEB é a concentração do extrato bruto em polpa cítrica ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$); MFMeOH é a massa da fração metanólica (G-09-5); MTEB é a massa total do extrato bruto (240 g); MFase é a massa obtida após a partição líquido-líquido da fração metanólica (G-09-5) resultando nas fases orgânica (G-20-2), aquosa (G-20-1) e resíduo (G-20-3) e MTFMeOH é a massa da fração metanólica (G-09-5) utilizada para a partição líquido-líquido. As massas de cada uma das amostras na dieta final são apresentadas na Tabela 1. Para testar a substância isolada, utilizou-se cálculo proporcional de massa da substância isolada (MUSI) dentro de cada etapa do fracionamento, de acordo com a seguinte fórmula (3):

$$\text{MUSI} = \{[(\text{MTF} \cdot \text{MSI} / \text{MFC}) \cdot \text{MTFA} / \text{MTUC}] \cdot \text{MTCB} / \text{MTFA}\} \cdot \text{FC} \quad (3)$$

Onde MTF é a massa total da fração a partir da substância isolada (G-82) foi obtida (G-38-02 + G-38-03=2,09 g), MSI é a massa da substância (G-82-04) isolada (318,2 mg), MFC é a massa parcial da fração (G-38-02 + G-38-03) utilizada na coluna (600 mg), MTFA é a massa da fração solúvel em acetato (G-82-04; 15,96 g), MTUC é a massa total da fração (G-09-3) utilizada no primeiro fracionamento por cromatografia em coluna (4,9 g); MTCB é a massa total equivalente a concentração de 400 mg/g da fração (G-09-3; 0,191 g) a qual foi efetiva contra formigas cortadeiras e FC é o fator de correção utilizado (2,32).

Tabela 1 Frações obtidas durante o fracionamento do extrato bruto metanólico de *Croton floribundus*, massa total de cada fração (MF), rendimento de cada fração em relação à massa total do extrato bruto ou à massa total da fração solúvel em metanol do extrato bruto, e massas das frações que foram utilizadas nas concentrações equivalentes a 200, 400 e 600 mg/g no experimento (MUE) com *Atta sexdens*

Frações	MF(g)	Rendimento (%)	MUE (g)
Fração solúvel em hexano (G-09-1)	23,92	9,96*	0,1435
			0,2870
			0,4305
Resíduo da fração solúvel em hexano (G-09-2)	6,48	2,69*	0,0388
			0,0777
			0,0971
Fração solúvel em acetato de etila (G-09-3)	15,97	6,65*	0,0957
			0,1915
			0,2873
Resíduo da fração solúvel em acetato de etila (G-09-4)	2,55	1,06*	0,0153
			0,0306
			0,0459
Fração solúvel em metanol (G-09-5)	166,60	69,41*	0,9996
			1,9992
			2,9988
Fase aquosa (G-20-1)	4,90	61,27**	0,6124
			1,2249
			1,8374
Fase orgânica (G-20-2)	0,83	10,32**	0,1028
			0,2057
			0,3097
Fase intermediária (G-20-3)	1,39	17,37**	0,1737
			0,3474
			0,5211

*Em relação à massa total do extrato bruto, que era de 240 g; ** em relação à massa total da fração solúvel em metanol (G-09-5) do extrato bruto, que era de 8 g.

As polpas cítricas impregnadas com as amostras a serem testadas (2,0 g), foram colocadas em placas de Petri e oferecidas às formigas por um período de 24 horas. Após esse período tais dietas foram trocadas por dieta artificial, composta de glicose, bacto-peptona, extrato de levedura, Ágar e água destilada

(BUENO et al., 1997). Para o preparo desta dieta artificial, após a adição da água aos outros componentes, a mesma foi esterilizada em autoclave a 121 °C por 20 minutos. Ao final, foi vertida em placa de Petri. Pedacos de $\pm 1 \text{ cm}^2$ desta dieta foram oferecidos às formigas durante todo o período de avaliação.

A mortalidade das operárias foi avaliada no 1º, 2º, 3º, 5º, 7º, 9º, 11º, 13º, 15º, 17º, 19º e 21º dia depois do oferecimento das dietas impregnadas com o extrato bruto de *C. floribundus*, com suas frações ou com a substância purificada a partir do mesmo. Todo o experimento foi conduzido em câmara climatizada com temperatura de $21 \pm 2 \text{ °C}$, com 24 horas de escotofase e umidade relativa (U.R.) de 70%. Os dados foram submetidos à análise de sobrevivência, usando a distribuição de Weibull. Realizou-se ainda o teste de contraste para verificar semelhança entre os tratamentos, criando-se grupos de efeitos semelhantes (χ^2 ; $p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas com o programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2005) do pacote estatístico Survival (THERNEAU, 2011).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme relatado por Santos (2013), o extrato metanólico bruto (EBMeOH) de cascas de *C. floribundus* apresentou diferença entre as três concentrações avaliadas. A melhor atividade formicida foi observada na menor concentração de 200 mg/g de polpa cítrica, a qual apresentou ação retardada nas primeiras 24 horas e mortalidade maior que 96% após 21 dias, sendo o tempo letal para 50 % da população (TL₅₀) igual a 6,3 dias. Já para a concentração de 400 mg/g de polpa cítrica, a mortalidade foi mais baixa tanto após 24 horas (2,42%) quanto após 21 dias (71,28%). O valor de TL₅₀ (13,4 dias) também deixou evidente que o aumento na concentração do extrato diminuiu a eficiência do mesmo. A maior concentração deste extrato vegetal (600mg/g de polpa cítrica) apresentou elevada mortalidade após 24 horas (30,94%) e após 21 dias (100%), bem como reduzido valor de TL₅₀ (1,65 dias). As testemunhas sem e com a sulfluramida apresentaram curvas de mortalidade distintas, sendo as mortalidades respectivamente de 1,74% e 14,95% após 24 horas, e 59,13% e 99,97% após 21 dias. Os valores de TL₅₀ foram respectivamente de 22,89 dias e 4,1 dias.

No experimento com a fração solúvel em hexano (G-09-1) do extrato metanólico bruto das cascas de *C. floribundus*, observou-se o resultado conforme descrito por Santos (2013), pois em todas as concentrações equivalentes às do extrato bruto estudadas (200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica), a referida fração tinha um comportamento estatisticamente igual ao observado para a testemunha sem ingrediente ativo (mortalidade de 0,82% após 24h e de 37,75% após 21 dias), enquanto para a testemunha com ingrediente ativo (sulfluramida) a 0,3 mg/g se observava mortalidade de 2,24% após 24 h e de 72,77% após 21 dias. Quanto ao TL₅₀, era de 13,1 para tal testemunha. Um

resultado similar foi obtido para o material precipitado (G-09-2) a partir da fração solúvel em hexano (G-09-1).

O experimento com a fração solúvel em acetato de etila (G-09-3) do extrato metanólico bruto de *C. floribundus* também apresentou resultado conforme descrito por Santos, (2013). Para a sulfluramida a 0,3 mg/g foi observada maior mortalidade ao longo do tempo: 0,21% após 24 horas e 82,18% após 21 dias. O TL₅₀ foi de 13 dias. Para as concentrações mais elevadas de G-09-3 (400 e 600 mg/g de polpa cítrica), observaram-se mortalidades de 0,12% após 24 horas e 64,72% após 21 dias. O TL₅₀ foi de 17,5 dias. Quanto à menor concentração de G-09-3 (200 mg/g de polpa cítrica), o TL₅₀ observado foi de 20,6 dias, enquanto para a testemunha negativa foi maior do que 21 dias.

Quanto ao material precipitado (G-09-4) a partir da fração solúvel em acetato de etila (G-09-5), também apresentou comportamento semelhante ao descrito por Santos (2013). Apesar de todas as concentrações estudadas (200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica) terem diferido da testemunha sem ingrediente ativo (26,23% de mortalidade após 21 dias), o referido material precipitado apresentou baixa atividade formicida, pois a mortalidade correspondente foi de apenas 40,29% após 21 dias, enquanto o TL₅₀ era maior do que 21 dias (Figura 4).

A fração solúvel em metanol (G-09-5) do extrato bruto metanólico de *C. floribundus* apresentou, quando na concentração mais baixa e mais elevada (200 e 600 mg/g de polpa cítrica, respectivamente), mortalidade de 80,54% das formigas após 21 dias de avaliação, sendo o TL₅₀ correspondente de 11 dias. Quando na concentração intermediária, a referida fração apresentou valores menores de mortalidade (1,80% após 24 horas e 63,63% após 21 dias) e maior valor de TL₅₀ (16 dias), embora tais valores ainda tenham sido diferentes dos observados para a testemunha sem ingrediente ativo (1,23% após 24 horas e 50,01% após 21 dias; TL₅₀>21 dias).

Os resultados obtidos com o extrato metanólico bruto das cascas de *C. floribundus* permitiram confirmar a capacidade desta planta para a produção de substâncias potencialmente úteis para o controle de formigas cortadeiras. Durante o fracionamento inicial por lavagens com solventes, tais substâncias se concentraram nas frações solúveis em acetato de etila (G-09-3) e em metanol (G-09-5), já que tais frações foram as que causaram as maiores mortalidades para as formigas cortadeiras. Tais resultados sugerem que a planta produza mais de uma substância ativa contra as formigas, o que parece razoável, pois há relatos na literatura de outras espécies vegetais para as quais mais de uma fração se mostrou ativa contra insetos. Para exemplificar é possível mencionar as frações metanólicas solúveis em diclorometano e hexano, de folhas e ramos de *Helietta puberula* RE Fr. (Rutaceae), frações metanólicas dos extratos solúveis em diclorometano e acetato de etila de folhas de *R. communis* (Euphorbiaceae) (BIGI et al., 2004), fração metanólica de extrato hexânico de *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae) (BUENO et al., 2005), e a fração solúvel em acetato de etila de extratos metanólicos de *Virola sebifera* Aubl. (Myristicaceae) (BICALHO et al., 2012). O fato de substâncias polares ou com polaridade intermediária apresentarem ação formicida não se caracteriza como uma regra, já que há relatos de frações ou substâncias isoladas de natureza apolar que apresentaram atividade formicida e/ou fungicida (BIAVATTI et al., 2002; ARAÚJO et al., 2008; PEÑAFLORES et al., 2009).

O processo de fracionamento da fração solúvel em metanol (G-09-5) por partição líquido-líquido resultou em três novas frações: orgânica (G-20-2), aquosa (G-20-1) e um resíduo insolúvel (G-20-3). O comportamento da curva de mortalidade nas maiores concentrações (400 e 600 mg/g de polpa cítrica) da fração aquosa (G-20-1) foi semelhante ao observado para a testemunha com sulfluramida a 0,3 mg/g (87,69% após 21 dias; $TL_{50}=7,9$ dias). A curva de mortalidade para a menor concentração da fração aquosa (200 mg/g de polpa

cítrica) foi estatisticamente diferente daquela obtida com as maiores concentrações, mas ainda diferiu da testemunha sem ingrediente ativo (Figura 2).

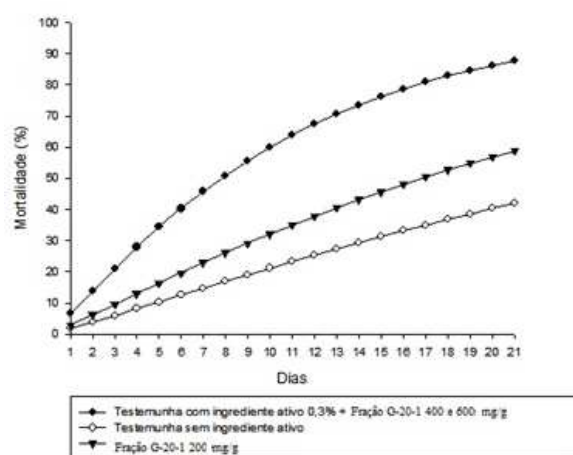


Figura 2 Mortalidade de operárias de *Atta sexdens* após a ingestão de polpa cítrica impregnada com a fração aquosa (G-20-1) proveniente da fração solúvel em metanol (G-09-5) do extrato metanólico bruto de *Croton floribundus*. Foram empregadas três concentrações da fração aquosa: 200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica

A fase aquosa de *C. floribundus* apresentou ação formicida e comportamento semelhante ao inseticida comercial sulfluramida 0,3 mg/g. O aumento da mortalidade observado nos experimentos e a persistência dos sintomas de intoxicação (movimento lento, paralisia e distendimento das pernas traseiras, e sintomas de diarreia), são características estreitamente ligadas à ação retardada de um ingrediente ativo, que é expresso principalmente após 24 horas (NAGAMOTO et al., 2004). A ação retardada de ingredientes ativos para a formulação de formicidas é uma característica essencial, já que as colônias de formigas cortadeiras são muito populosas e o seu controle depende da

contaminação da rainha. Caso as formigas detectem que o substrato utilizado não é adequado, elas deixam de carregá-lo, podendo inclusive retirar partes do fungo simbiote contaminado com esse substrato, isolando-as nas câmaras de lixo (BRUGGER et al., 2008).

Em nossos experimentos (teste da fração solúvel em metanol G-09-5 e teste da fração aquosa G-20-1), foi possível observar formigas multiladas, apesar destas não terem sido quantificadas. Tal fato, já havia sido observado em experimentos anteriores com o extrato bruto de *C. floribundus*. O terpenoide β -eudemol é capaz de modificar a composição química da cutícula das operárias, interferindo no reconhecimento das companheiras de ninho e provocando comportamento de alarme e agressão (MARINHO et al., 2005; 2008). Esse comportamento já havia sido observado por North, House e Jackson (2000) quando as operárias de *A. sexdens* foram expostas ao composto cariofileno, o qual pode funcionar como feromônio de alarme. Além disso, já foi detectado que alguns terpenoides (eugenol e α -terpineol) podem causar sinais de toxicidade, como mudanças no batimento cardíaco e no nível de AMPc (Adenosina Monofosfato Cíclico) no sistema nervoso, além do bloqueio da atividade dos receptores octomapínicos em baratas (ENAN, 2001).

A fase orgânica (G-20-2) e o material insolúvel (G-20-3) não apresentaram resultados expressivos contras às formigas cortadeiras *A. sexdens* (Figura 3 e 4). Em ambos os experimentos se observaram três curvas de mortalidade distintas. A primeira curva é referente à testemunha com ingrediente ativo (sulfluramida), a qual apresentou elevada mortalidade após 21 dias de avaliação (>89%) e $TL_{50}=10,3$ dias. Na menor concentração (200 mg/g de polpa cítrica), ambas as frações formaram um grupo congênere com a testemunha sem ingrediente ativo, que apresentou mortalidade menor que 45% após 21 dias de avaliação, e $TL_{50}>21$ dias. A terceira curva de mortalidade é representada pelas concentrações de 400 e 600 mg/g de polpa cítrica, as quais formaram grupos

congêneres, com mortalidade um pouco maior que 53% após 21 dias de avaliação e $TL_{50}=19,1$ dias (Figura 3 e 4).

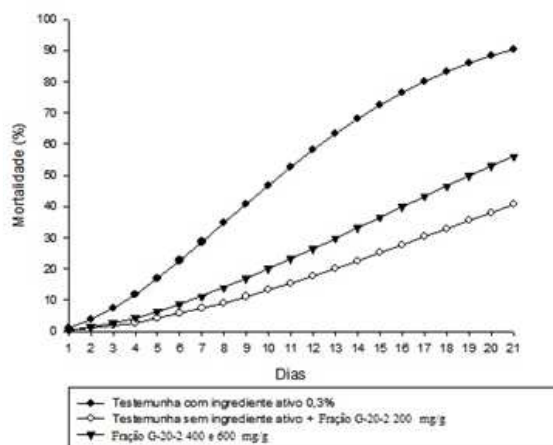


Figura 3 Mortalidade de operárias de *Atta sexdens* após a ingestão de polpa cítrica impregnada com a fração orgânica (G-20-2) proveniente da fração solúvel em metanol (G-09-5) do extrato metanólico bruto de *Croton floribundus*. Foram empregadas três concentrações da fração orgânica: 200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica

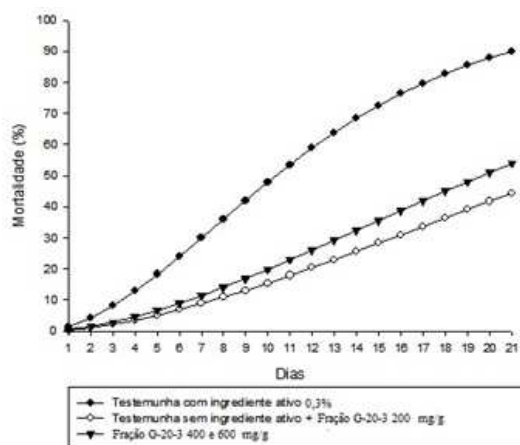


Figura 4 Mortalidade de operárias de *Atta sexdens* após a ingestão de polpa cítrica impregnada com a fração residual (G-20-3) proveniente do processo de partição líquido-líquido da fração solúvel em metanol (G-09-5) do extrato metanólico bruto de *Croton floribundus*. Foram empregadas três concentrações da fração: 200, 400 e 600 mg/g de polpa cítrica

Uma vez realizados os testes biológicos para identificar as frações ativas contra *A. sexdens*, submeteu-se a fração solúvel em acetato de etila (G-09-3) do extrato bruto metanólico de *C. floribundus* a vários fracionamentos por métodos cromatográficos, o que resultou na obtenção de um sólido cristalino e incolor (G-82-04), que se apresentava puro segundo análises realizadas por CCD. O espectro de RMN ^{13}C deste sólido em solução de CDCl_3 apresentou 20 linhas espectrais (Tabela 2, Figura 1 do Anexo1), dentre as quais se destacavam dois sinais na região de carbonos olefínicos (δ_{C} 102,9 e 155,88 ppm) e um sinal referente a um carbono carbonílico em δ_{C} 184,6 ppm (Figura 1 do Anexo1)

No espectro de RMN ^1H (Figura 2 do Anexo1) foi possível observar vários sinais na faixa de 0,8 a 4,8 ppm, dentre os quais se podem mencionar dois grupos metil em δ_{H} 1,24 (3H,s) e 0,95 (3H,s) ppm. Também vale destacar os sinais em δ_{H} 4,79 (1H,s) e 4,73 (1H,s) ppm, que foram atribuídos a dois hidrogênios olefínicos (Tabela 2, Figura 5).

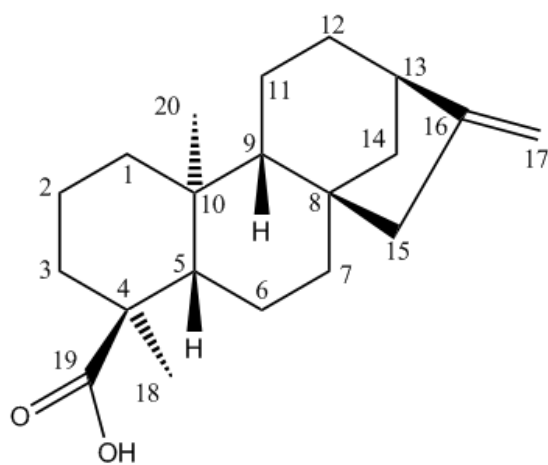


Figura 5 Estrutura química de G-82-04 (ácido caurenico)

Tabela 2 Comparação entre os dados de RMN ^{13}C e ^1H de G-82-04 com os dados da literatura para o ácido caurenóico (MONTE et al., 1988)

Ácido caurenóico		G-82-04		
Posição	δ_{C} (ppm)/multiplicidade	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)/multiplicidade	δ_{H} (ppm)
1	40,7 / CH ₂		41,24 / CH ₂	1,91-1,89 (m, 2H)
2	19,1 / CH ₂		19,05 / CH ₂	1,44 (m, 2H)
3	37,8 / CH ₂		37,74 / CH ₂	1,00 (dt, J ₁ =4Hz, J ₂ =13Hz, 2H)
4	43,8 / C		43,71 / C	-
5	57,1 / CH		57,01 / CH	1,02 (m, 1H)
6	21,8 / CH ₂		21,79 / CH ₂	1,8 (m, 2H)
7	41,3 / CH ₂		40,66 / CH ₂	1,51-1,49 (t, J=3,4Hz, 2H)
8	44,2 / C		44,19 / C	-
9	55,1 / CH		55,05 / CH	1,06 (d, J=7Hz, 1H)
10	39,7 / C		39,66 / C	-
11	18,4 / CH ₂		18,40 / CH ₂	1,61-1,53 (m, 2H)
12	33,1 / CH ₂		33,08 / CH ₂	1,51-1,49 (t, J=3,4Hz, 2H)
13	43,9 / CH	2,65(s, 1H)	43,81 / CH	2,63 (t, J=3,8Hz, 1H)
14	39,7 / CH ₂		39,63 / CH ₂	1,47-1,40 (m, 2H)
15	49,0 / CH ₂		48,81 / CH ₂	2,07-2,03 (q, J=2,6Hz, 2H)
16	155,9 / C		155,9 / C	-
17	103,0 / CH ₂	4,77(s, 2H)	102,9 / CH ₂	4,79 (s, 1H) e 4,73 (s, 1H)
18	29,0 / CH ₃	1,25 (s, 3H)	28,94 / CH ₃	1,24 (s, 3H)
19	184,6 / C		184,6 / C	-
20	15,6 / CH ₃	0,97 (s, 3H)	15,56 / CH ₃	0,95 (s, 3H)

* m = multiplete e s= simpleto

O mapa de contorno da correlação $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) (Figura 3 do Anexo1) permitiu identificar vários acoplamentos entre os átomos de

hidrogênio. Para exemplificar, é possível mencionar um acoplamento alílico entre os átomos de ^1H com sinais em δ_{H} 4,79 (1H,s) e 4,73 ppm (1H,s) com os átomos de ^1H metilênicos com sinais em δ_{H} 2,06 ppm.

No mapa de contorno da correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$) a curta distância (HSQC) (Figura 4 do Anexo1) se observaram os acoplamentos entre os átomos de ^{13}C e os átomos de ^1H a eles diretamente ligados. Este foi o caso, por exemplo, dos átomos de ^1H com sinais em δ_{H} 4,79 (1H,s) e 4,73 (1H,s) ppm, que acoplavam com o átomo de ^{13}C com o sinal em δ_{C} 102,9 ppm (CH_2).

No mapa de contorno da correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$) a duas e três ligações (HMBC; Figura 5 do Anexo1), observaram-se várias correlações. Havia, por exemplo, a correlação de hidrogênio em δ_{H} 2,63 ppm com os átomos de ^{13}C com sinais em δ_{C} 48,81 e 44,19ppm; do hidrogênio em δ_{H} 2,06 ppm com os átomos de ^{13}C com sinais em δ_{C} 155,9, 55,0 e 43,81 ppm. Também foi possível observar os acoplamentos dos hidrogênios vinílicos em δ_{H} 4,79 e 4,73 ppm com os carbonos em δ_{C} 155,9, 48,81 e 43,81 ppm; dos hidrogênios metílicos em δ_{H} 0,95 com os carbonos em δ_{C} 39,66, 41,24, 55,05 e 57,01 ppm; e do hidrogênio em δ_{H} 1,0 ppm com os carbonos em δ_{C} 15,56, 28,94, 43,71 e 55,05 ppm. Em adição, o acoplamento dos hidrogênios metílicos em δ_{H} 1,24 ppm com os carbonos em δ_{C} 37,7, 43,8 e 57,0 ppm, os acoplamentos entre os átomos de ^1H com sinais em δ_{H} 1,24, 1,09 e 1,00 ppm e o átomo de ^{13}C com sinal em δ_{C} 184,6 ppm.

Por meio das análises dos dados obtidos por espectroscopia de ressonância magnética nuclear, foi possível construir subestruturas para a identificação da substância G-82-04. Há, por exemplo, os sinais do COSY que mostraram um acoplamento alílico entre os átomos de ^1H com sinais em δ_{H} 4,79 (1H,s) e 4,73(1H,s) ppm com os átomos de ^1H metilênicos com sinais em δ_{H} 2,06 ppm, prevendo a subestrutura **A** da Figura 6.

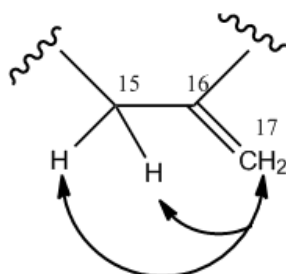


Figura 6 Subestrutura A presente na estrutura da substância G-82-04 segundo a interpretação dos dados de RMN ^1H e COSY. Os átomos de ^1H da posição 17 acoplam com aqueles da posição 15

Por meio das correlações do HMBC foi possível visualizar os acoplamentos entre o átomo de hidrogênio em δ_{H} 2,63 ppm e os átomos de ^{13}C com sinais em δ_{C} 48,81 e 44,19 ppm conforme a subestrutura **B** (Figura 7). As correlações entre o hidrogênio em δ_{H} 2,06 ppm e os átomos de ^{13}C em δ_{C} 155,9, 55,0 e 43,81 ppm sugeriram a subestrutura **C** (Figura 7). Foi possível também, visualizar a subestrutura **D** (Figura 7) por meio dos acoplamentos dos hidrogênios vinílicos em δ_{H} 4,79 e 4,73 ppm com os carbonos em δ_{C} 155,9, 48,81 e 43,81 ppm.

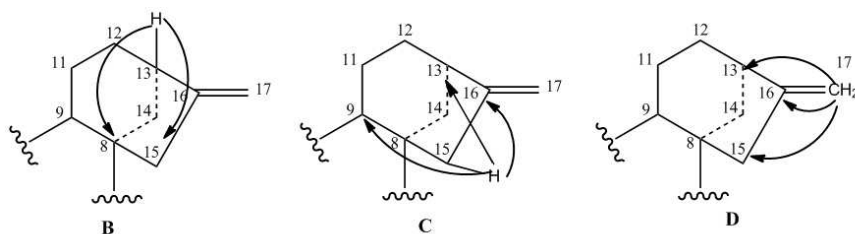


Figura 7 Subestrutura presente na estrutura da substância G-82-04 segundo a interpretação dos dados de HMBC

As correlações entre os átomos de hidrogênios metílicos em δ_H 0,95 ppm e os átomos de carbono com sinais em δ_C 39,66, 41,24, 55,05 e 57,01 ppm permitiram propor a subestrutura **E** (Figura 8). Tal proposta foi corroborada pela correlação entre o átomo de hidrogênio em δ_H 1,0 ppm e os átomos de carbono em δ_C 15,56, 28,94, 43,71 e 55,05 ppm (subestrutura **F**, Figura 8). De forma análoga, observou-se também a correlação entre os átomos de hidrogênio metílicos em δ_H 1,24 ppm e os átomos de carbono com sinais em δ_C 37,7, 43,8 e 57,0 ppm (subestrutura **G**, Figura 8).

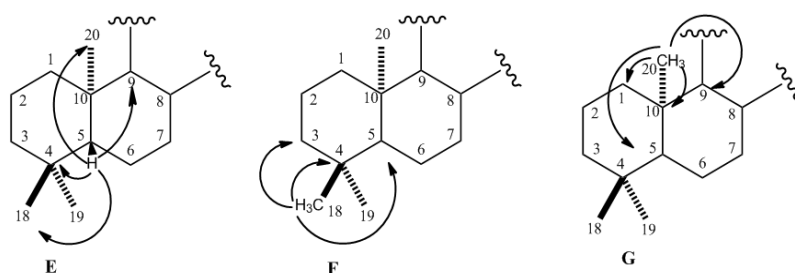


Figura 8 Subestrutura presente na estrutura da substância G-82-04 segundo a interpretação dos dados de HMBC, sugerindo a presença de um sistema derivado da decalina

Os acoplamentos entre os átomos de ^1H com sinais em δ_{H} 1,24, 1,09 e 1,00 ppm e o átomo de ^{13}C com sinal em δ_{C} 184,6ppm indicaram que o grupo carboxila se encontrava ligado à C-4, conforme apresentado na subestrutura **H** (Figura 9).

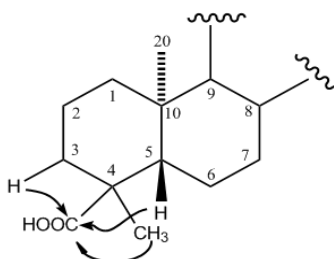


Figura 9 Subestrutura presente na estrutura da substância G-82-04 segundo a interpretação dos dados de HMBC, sugerindo que o grupo carboxila se ligue ao carbono 4

De acordo com dados de RMN ^{13}C da literatura de derivados do ácido caurenóico, pode-se observar que, quando o grupo carboxila se encontra na posição axial e o grupo metil na posição equatorial, os valores de deslocamentos químicos para o grupo metil se apresentam em torno de δ_{C} 29,0 ppm. Por outro lado, quando o grupo carboxila está na posição equatorial e o grupo metil na axial, este passa a absorver em aproximadamente δ_{C} 18,0 ppm (ATTA-UR-RAHMAN; AHMAD, 1992). Desta forma, o valor de deslocamento químico do metil em δ_{C} 28,9 ppm observado no espectro de RMN ^{13}C de G-82-04 (Figura 1 do anexo) foi condizente com a estereoquímica do grupo carboxila na posição axial. Todas as análises realizadas (Figuras 1, 2, 3, 4 e 5 do anexo) corroboraram para a atribuição da estrutura do ácido *ent*-caur-16-en-19-oico à substância G-82-04.

A substância isolada (G-82-04, ácido caurenóico) não apresentou atividade formicida contra operárias de *A. sexdens*. Seu comportamento foi

semelhante ao da testemunha sem ingrediente ativo, cuja mortalidade foi de 0,62% após 24 horas e de 20,93% após 21 dias. Já a testemunha com ingrediente ativo apresentou elevada mortalidade após 21 dias de avaliação (85,19%) e $TL_{50}=9$ dias.

Este composto (G-82-04) é um diterpeno caurânico, já isolado a partir de *Croton argyrophylloides* Muell. Arg. (MONTE et al., 1988), que apresenta um amplo espectro de bioatividades como anti-inflamatória, antifúngica e antiulcerogênica (GHISALBERT et al., 1997), além de atividade moluscida e cercaricida (MEDINA et al., 2009). Também há relatos de atividade *in vitro* contra formas tripomastigotas do *Tripanossoma cruzi* (VIEIRA et al., 2002) e inibição de larvas de Lepidoptera (*Heliothis virescens* Fabricius, *Heliothis zea* Boddie e *Pectinophora gossypiella* Saunders), que se tratam de pragas da cultura de algodão (ELLIGER et al., 1976). Além disto, é relatado que tal ácido apresenta moderada atividade inseticida contra o coleóptero *Cylas formicarius* Fabricius, que é uma praga da cultura de batata doce (PADMAJA et al., 1995).

Apesar de haver relatos na literatura da atividade do ácido caurenico contra insetos, e do fato de ele ter sido o componente principal da fração solúvel em acetato de etila (G-09-3), que se mostrou ativa contra formigas cortadeiras, quando utilizado na forma pura para impregnar a polpa cítrica oferecida a formigas cortadeiras, nenhum efeito pôde ser observado sobre tais insetos. Talvez este resultado indique que a atividade formicida pode ser atribuída à ação conjunta de compostos, ao invés da ação de uma única substância (BUENO et al., 2005; MORINI et al., 2005). No estudo realizado por Morini et al. (2005) em que os autores avaliam a toxicidade de sementes de gergelim em formiga cortadeira *Atta sexdens*, a fração acetato de etila apresentou elevada toxicidade, porém o seu componente majoritário sesamin só tem ação efetiva quando está em sinergia com o composto sesamolin.

5 CONCLUSÃO

O extrato metanólico bruto das cascas de *C. floribundus* contém substâncias ativas para *A. sexdens*. Ao se fracionar tal extrato por lavagens com solventes, observa-se que as substâncias ativas se encontram principalmente nas frações solúveis em acetato de etila e em metanol. O componente principal da fração solúvel em acetato de etila é a substância identificada como ácido caurenoico, embora este isoladamente não tenha mostrado-se ativo. Mais pesquisas devem ser realizadas visando o isolamento e identificação de moléculas com atividade formicida para futuro uso em iscas tóxicas a formigas cortadeiras.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, R. N. A. et al. Toxicity of substances isolated from *Helietta puberula* RE Fr. (Rutaceae) to the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller. **BioAssay**, v. 2, n. 2, p. 1-8, 2007.
- AMANTE, E. A formiga saúva *Atta capiguara*, praga das pastagens. **O Biológico**, v. 33, n. 6, p. 113-120, 1967a.
- AMANTE, E. Prejuízos causados pela formiga saúva em plantações de Eucaliptus e Pinus no Estado de São Paulo. **Silvicultura em São Paulo**, v. 6, p. 335-363, 1967b.
- AMBROZIN, A. R. P. et al. Limonoids from andiroba oil and *Cedrela fissilis* and their insecticidal activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 3, p. 542-547, 2006.
- ANJOS, N.; MOREIRA, D. D. O.; DELLA LUCIA, T. M. C. Manejo integrado de formigas cortadeiras em reflorestamentos. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). **As formigas cortadeiras**. Viçosa, MG: Editora UFV, 1993. p. 212-241.
- ANJOS, N.; DELLA LUCIA, T. M. C.; MAYHÉ-NUNES, A. J. **Guia prático sobre formigas cortadeiras em reflorestamento**. Viçosa, MG, 1998. 100 p.
- ARAÚJO, M. da S. et al. Toxicidade de extratos hexânicos de plantas às operárias de *Atta laevigata* e *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Formicidae: Attini). **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 14, n. 3-4, p. 106-114, 2008.
- ATTA-UR-RAHMAN; AHMAD, V. -U. **¹³C NMR of natural products-diterpenes**. New York: Plenum, 1992. v. 2.
- BARROSO, G. M. et al. Hydrophyllaceae. In: _____. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa, MG: Editora UFV, 991. p. 80. v. 3.

BASS, M.; CHERRETT, J. M. Fungal hyphae as a source of nutrients for the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. **Physiological Entomology**, v. 20, n. 1, p. 1-6, 1995.

BENTHAM, G. Notes on Euphorbiaceae. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 17, p. 185-267, 1880.

BERRY, P. **Croton research network**. Madison: University of Wisconsin Board of Regents, 2006. Disponível em: <<http://www.botany.wisc.edu/croton>>. Acesso em: 19 jul. 2012.

BIAVATTI, M. W. et al. Biological activity of quinoline alkaloids from *Raulinoa echinata* and x-ray structure of flindersiamine. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v. 13, n. 1, p. 66-70, 2002.

BIAVATTI, M. W. et al. Leaf-cutting ants toxicity of limonexic acid and degraded limonoids from *Raulinoa echinata* x-ray structure of epoxy-fraxinellone. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6B, p. 1443-1447, 2005.

BICALHO, K. U. et al. Evaluation of the toxicity of *Virola sebifera* crude extracts, fractions and isolated compounds on the nest of leaf-cutting ants. **Psyche: a journal of entomology**, 2012.

BIGI, M. F. M. A. et al. Activity of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) and ricinine against the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus*. **Pest Management Science**, v. 60, n. 9, p. 933-938, 2004.

BUENO, O. C. et al. Sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) isoladas do formigueiro e alimentadas com dietas artificiais. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 26, n. 1, p. 107-113, 1997.

BUENO, F. C. et al. Toxicity of *Cedrela fissilis* to *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) and its symbiotic fungus. **Sociobiology**, v. 45, n. 2, p. 389-399, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 7 nov. 2010.

BRUGGER, M. S. et al. Avaliação dos efeitos tóxicos de extratos hexânicos de *Azadirachta indica* (A. Juss) em colônias de *Acromyrmex rugosus* (Smith, 1958) (Formicidae, Attini). **Zoociências**, v. 10, n. 3, p. 233-238, 2008.

CARNEIRO, D. S.; CORDEIRO, I.; FRANÇA, F. A família Euphorbiaceae na flora de *inselbergs* da região de Milagres, Bahia, Brasil. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 20, p. 31-47, 2002.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p. 335-341, v. 1.

CINTRA, P. et al. Astilbin toxicity to leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v. 45, n. 2, p. 347-353, 2005.

CORDEIRO, I.; CARNEIRO-TORRES, D. Euphorbiaceae. In: BRASIL. Ministério de Ciência e Tecnologia. **Checklist das plantas do nordeste brasileiro**: Angiospermas e Gymnospermas. Brasília, 2006. p.71-74.

DURIGAN, G. et al. Semente e mudas de árvores tropicais, 2. ed. São Paulo: Páginas e Letras, 2002. p. 22.

ELLIGER, C. A. et al. Diterpene acids as larval growth inhibitors. **Experientia**, v. 32, p. 1364-1366, 1976.

ENAN, E. Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v. 130, p. 325-337, 2001.

FREITAS, S. **Efeito do desfolhamento na produção de *Eucalyptus grandis* Hillex Maiden (Myrtaciae) visando avaliar os danos causados por insetos desfolhadores**. 1988. 99 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia)- Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 1988.

GHISALBERTI, E. L. et al. The biological activity of naturally occurring kaurane diterpenes. **Fitoterapia**, v. 68, n. 4, p. 303-325, 1997.

GUIMARÃES, L. A. C. O gênero *Croton* L. seção *Cyclostigma* Griseb. E seção *Luntia* (Raf.) G. L. Webster (Euphorbiaceae) ocorrentes na Amazônia Brasileira. 2006. 70 p. Dissertação (Mestrado em Botânica Tropical)-Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2006.

ISENRING, R.; NEUMEISTER, R. Insecticides for control of pest insects in FSC certified forests in Brazil - recommendations by technical advisors. Disponível em: <http://www.ipef.br/pccf/arquivos/TA_Rec_alpha-Cypermethrin-Deltamethrin-Fenitrothion-FipronilSulfluramid_BR_2010.pdf>. Acesso em: 19 jul. 2011.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. São Paulo: Plantarum, 1992. 352 p.

LOUREIRO, M. C.; QUEIROZ, M. V. B. **Insetos de Viçosa**: formicidae. Viçosa: UFV, 1990. 106 p.

LUCENA, M. F. A. **Estudos taxonômicos do gênero *Croton* L. (Crotonoideae- Euphorbiaceae) nas zonas do litoral e da mata do estado de Pernambuco- Brasil**. 2000. 131 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia Vegetal e Meio Ambiente)-Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2000.

MARICONI, F. A. M. **As saúvas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1970. 167 p.

MARINHO, C. G. S. et al. β -eudesmol-induced aggression in the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 117, n. 1, p. 89-93, 2005.

MARINHO, C. G. S. et al. Interference of β -eudesmol in nestmate recognition in *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 98, n. 5, p. 467-473, 2008.

MEDINA, J. M. et al. Evaluation of the molluscicidal and *Shistosoma mansoni* cercariae activity of *Croton floribundus* extracts and kaurenoic acid. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1B, p. 207-211, 2009.

MENDES FILHO, J. M. A. **Técnicas de combate a formigas cortadeiras**. Piracicaba: IPEF, 1979. p. 1-19. (Circular Técnica IPEF, 75).

MONTE, F. J. Q. et al. New diterpenoids from *C. argyrophyloides*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 10, p. 3209-3212, 1988.

MORINI, M. S. C. et al. Toxicity of sesame seed to leaf-cutting Ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v. 45, n. 1, p. 195-204, 2005.

MÜLLER, J. A. Croton. In: MARTIUS, C. F. P. von; EICHLER, A. G. (Ed.). **Flora brasiliensis**, v. 11, p. 81-274, 1873.

NAGAMOTO, N. S. et al. Method for the evaluation of insecticidal activity over time in *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v. 44, n. 2, p. 413-431, 2004.

NORTH, R. D.; HOUSE, P. E.; JACKSON, C. W. Agonistic behavior of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* elicited by caryophyllene. **Journal of Insects Behavior**, v. 13, p. 1-13, 2000.

PADMAJA, V. et al. A biological activities of *Annona glabra*. **Journal os Ethnopharmacology**, v. 48, p. 21-24, 1995.

PEÑAFLORES, M. F. G. V. et al. Toxicity of substances isolated from *Simarouba versicolor* St. Hil. (Simaroubaceae) to the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller. **Biossay**, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2009.

PRECETTI, A. C. M. et al. Perdas de produção em cana de açúcar, causadas pela saúva mata pasto, *Atta bisphaerica*. Parte I. **Boletim Técnico COPERSUCAR**, n. 42, p. 25-30, 1988.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna, 2005. 2576 p.

SANTOS, J. C. **Desenvolvimento de produtos vegetais para o controle de *Atta sexdens rubropilosa* e inibição do fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus***. 2013. Tese (Doutorado em Entomologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

SECCO, R. S. Flora da reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Euphorbiaceae: Parte I. **Rodriguesia**, Rio de Janeiro, v. 56, n. 86, p. 143-168, 2005.

SILVA, F. F.; PAZINI, J. B. Combatendo as formigas cortadeiras em cultivos florestais. **Campo & Negócios: florestas**, n. 1, p. 30-32, 2012.

TEREZAN, A. P. et al. Activities of extracts and compounds from *Spiranthera odoratissima* St. Hil. (Rutaceae) in leaf-cutting ants and their symbiotic fungus. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 5, p. 882-886, 2010.

THERNEAU, T. **Survival**: survival analysis, including penalised likelihood. R package version 2.35-8. 2010. Disponível em: <<http://r-forge.r-project.org>>. Acesso em: 15 out. 2011.

UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME. **Persistent organic pollutants review committee**: risk management evaluation on perfluorooctane sulfonate. Disponível em: <http://chm.pops.int/Portals/0/docs/from_old_website/documents/meetings/poprc/chem_review/PFOS/PFOS_RME_e.pdf>. Acesso em: 7 nov. 2011.

VIEIRA, H. S. Novel derivatives of kaurenoic acid preparation and evaluation of their trypanocidal activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 2, n. 13, p. 151-157, 2002.

WEBSTER, G. L. Synopsis of the genera and supragenic taxa of Euphorbiaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, n. 81, v. 1, p. 33-144, 1994.

CAPÍTULO 3 Seleção virtual de substâncias inibidoras da corismato mutase de *Meloidogyne incognita* Kofoid e White

RESUMO

Estudos da relação entre nematoides do gênero *Meloidogyne* e plantas demonstram que a enzima corismato mutase é responsável pela indução do sítio de alimentação dos nematoides nas plantas. Como esta enzima não está presente em outros animais, é um possível alvo para o desenvolvimento de novos produtos para o controle de nematoides que, na presença de inibidores da corismato mutase, não poderão induzir a formação de células gigantes nas raízes das plantas e, em decorrência, morrerão pela falta de alimento. Os inibidores dessa enzima poderão, no futuro, iniciar uma geração de moléculas tóxicas somente aos fitonematoides para o mercado, além de adicionar conhecimento sobre novo modo de ação de moléculas no controle desses patógenos de plantas. Consequentemente, buscou-se no presente trabalho utilizar a química computacional para modelar a sequência de aminoácidos da enzima corismato mutase de *Meloidogyne incognita*. Uma vez com o modelo tridimensional da enzima, passou-se à realização de um *screening* virtual a partir de 21 milhões de substâncias, para encontrar aquelas com as maiores afinidades pelo sítio ativo da enzima. As substâncias selecionadas foram virtualmente ranqueadas, o que permitiu escolher 245 substâncias com afinidades maiores que as observadas para o corismato e para o (1R,3S,5S,8R)-8-hidroxi-2-oxabicyclo [3.3.1] non-6-eno-3,5-dicarboxilato, que são considerados ligantes de enzimas desta classe. Com isto, direcionaram-se futuros testes *in vitro* e em casa de vegetação para o desenvolvimento de novos produtos para o controle de *M. incognita*.

Palavras chave: Dinâmica molecular. Ancoramento. Nematóide.

CHAPTER 3 Virtual selection of inhibitors of chorismate mutase produced by *Meloidogyne incognita* Kofoid and White

ABSTRACT

Studies regarding the relation between nematodes of the *Meloidogyne* genus and plants demonstrate that the enzyme chorismate mutase is responsible for the induction of the nematode's feeding site on plants. As this enzyme is not present in other animals, it is a possible target for the development of products for controlling nematodes which, in the presence of chorismate mutase inhibitors, will not be able to induce the formation of giant cells on plant roots and, as a result, will die for lack of food. The inhibitors of this enzyme might, in the future, initiate a generation of molecules toxic only to the phytonematodes, in addition to adding knowledge on a new form of action of the molecules in the control of these plant pathogens. Consequently, the present work sought to use computational chemistry to model a sequence of amino acids of the enzyme chorismate mutase produced by *Meloidogyne incognita*. Once with the three-dimensional model of the enzyme, we performed a virtual screening with 21 million substances in order to find those with the highest affinities to the enzyme's active site. The selected substances were virtually ranked, allowing us to choose 245 substances with higher affinities to the enzyme than those observed for chorismate and for (1R,3S,5S,8R)-8hydroxi-2-oxibicyclo[3.3.1]non-6-eno-3,5-dicarboxylate, which are considered binders of enzymes from this class. Consequently, we set up the basis for future *in vitro* and greenhouse tests aiming at the development of new products to control *M. incognita*.

Keywords: Molecular dynamic. Docking. Nematode.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Meloidogyne* possui mais de 90 espécies de nematoides parasitas de plantas (HUNT; HANDOO, 2009), dentre as quais se destacam *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White), *Meloidogyne javanica* (Treub), *Meloidogyne arenaria* (Neal) e *Meloidogyne hapla* (Chitwood), que são responsáveis por 95% dos prejuízos causados por espécies desse gênero à agricultura mundial (SASSER; FRECKMAN, 1987; MOURA, 1996). Devido à ampla distribuição geográfica dos nematoides deste gênero e ao difícil controle dos mesmos, esses fitoparasitas podem ser categorizados dentre os mais importantes fitopatógenos e principais obstáculos à produção de fibras e alimentos no mundo (MOURA, 1996; MOENS, PERRY; STARR, 2009).

As práticas agrícolas para o controle de nematoides fitoparasitas não são efetivas (ATKINSON; URWIN; MCPHERSON, 2003; WILLIAMSON; GLEASON, 2003). Além disto, a aplicação de nematicidas pode ser excessivamente cara (SHOMAKER; BEEN, 1999; DINARDO-MIRANDA; PIVETTA; FRACASSO, 2008) e representa sérios riscos de contaminação do meio ambiente e de intoxicação do agricultor e consumidor com substâncias de elevada toxicidade (JEYARATNAM, 1990). Em alguns países europeus a restrição para o uso de vários destes pesticidas tem aumentado, o que obriga o produtor a buscar novos métodos de controle de nematoides (WESEMAEL; VIAENE; MOENS, 2011). Somando-se isto ao fato de os estudos holandeses em fazendas experimentais demonstrarem que o custo do controle de nematoides pode equivaler a três vezes a soma dos gastos para o controle de insetos, fungos e plantas daninhas para culturas em geral (BIRD; KALOSHIAN, 2003), tem-se como resultado uma demanda cada vez maior por novas tecnologias para o controle de fitonematoides (FERRAZ; FREITAS, 2004).

Os fitonematoides endoparasitas sedentários, dentre os quais se encontram aqueles do gênero *Meloidogyne*, formam uma interação muito íntima e sofisticada com a planta hospedeira (ABAD et al., 2003), promovendo a invasão do tecido vegetal, a evasão dos mecanismos de defesa da planta e a formação dos sítios de alimentação permanentes (DAVIS; HUSSEY; BAUM, 2004). Sabe-se que uma das enzimas que participam desse processo é a corismato mutase, que tem a função de induzir a formação do sítio de alimentação nas raízes do hospedeiro. Se o sítio se torna não funcional, o nematoide morre, e vice-versa, indicando que o mencionado sítio necessita de estímulos contínuos do nematoide para permanecer ativo (GOVERSE; DE ENGLER, 2000). Logo, substâncias capazes de inibir a corismato mutase produzida pelos nematoides apresentam grande potencial para serem utilizadas no desenvolvimento de novos produtos para o controle de tais fitoparasitas, com atuação somente na interação planta nematoide, sem riscos de toxicidade para o homem e animais. Assim poderão surgir novos nematicidas “*environmental friendly*”. Em decorrência, iniciou-se o presente trabalho com o objetivo de modelar as sequências de aminoácidos dessa enzima, pois ainda não está descrita a estrutura tridimensional da corismato mutase de *Meloidogyne incognita*. A seguir, buscou-se utilizar o modelo gerado em processo de ancoramento (*docking*) de diversas substâncias para selecionar virtualmente aquelas que possam inibir a corismato mutase produzida por *M. incognita*, para que as mesmas sejam utilizadas no desenvolvimento de novos produtos para o controle de nematoides parasitas de plantas.

2 REVISÃO LITERÁRIA

2.1 Fitonematoides

Os nematoides, comumente chamados de vermes arredondados, são extremamente abundantes, representando 80% dos indivíduos do reino Animalia (PLATT, 1999). São extensivamente diversificados, com estimativas de que 100 mil a um milhão de espécies (DE LEY; BLAXTER, 2002) compõem o filo Nematoda. Apesar da estrutura relativamente simples, tubo dentro de tubo, eles exibem perfeita adaptação aos mais diferentes nichos ecológicos. A grande maioria das espécies de nematoides é de vida-livre, já que se alimentam de bactérias, algas, fungos ou outros nematoides. O número de espécies que parasitam hospedeiros de diferentes filos e reinos é bem menor, o que sugere certa predisposição adaptativa para a evolução do parasitismo (BALDWIN; NADLER; ADAMS, 2004), seja em animais (vertebrados ou invertebrados) ou em plantas (PARKINSON et al., 2003; SCHOLL; BIRD, 2005).

Dentre os nematoides parasitas de plantas se encontram aqueles que podem ser classificados como endoparasitas sedentários, destacando-se três gêneros: *Globodera*, *Heterodera* (ambos nematoides formadores de cisto) e *Meloidogyne* (nematoides formadores de galhas, NFG). Estes patógenos são altamente danosos para várias culturas pelo mundo afora (SASSER, 1980; FRAGOSO et al., 2007), acarretando perdas na agricultura mundial de US\$ 157 bilhões anualmente (REIS Jr.; FRAGOSO, 2008).

2.2 Gênero *Meloidogyne*

A palavra *Meloidogyne* vem do grego *melon*, que significa melão ou cabaco (o fruto do cabaceiro); mais *oeides* (ou *oid*), que quer dizer semelhante; e *gyne*, que significa mulher ou fêmea. Logo, a palavra *Meloidogyne* significa fêmea semelhante a uma cabaca. Entretanto, esses parasitas são vulgarmente conhecidos como nematoides das galhas. Pertencente à classe Secernentea, ordem Tylenchida, super-família Tylenchoidea e família Meloidogynidae (TIHOHOD, 1993), o gênero *Meloidogyne* passou quase despercebido por muito tempo, sendo revalidado e amplamente aceito apenas a partir de 1949, após a publicação do artigo clássico de B. G. Chitwood, que foi intitulado “Root-knot nematodes: Part I. A revision of the genus *Meloidogyne*” (LORDELLO, 1988). Atualmente, mais de 90 espécies de *Meloidogyne* já foram descritas, sendo *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* e *M. hapla* as mais difundidas e as que ocasionam maiores prejuízos para a agricultura mundial (DE WAELE; ELSEN, 2007).

Os nematoides desse gênero podem ser disseminados por meio de mudas ou sementes infestadas, que são distribuídas por produtores e serviços de fomento. Também podem ser transportados dentro da propriedade ou entre propriedades vizinhas por meio de solos aderentes a implementos agrícolas, bota de trabalhadores, água de irrigação etc. (MOURA; FREITAS, 1983; CAMPOS, 1985; SANTOS; RUANO, 1997). Estes parasitas são generalistas, pois infectam mais de 1700 espécies de plantas, sendo responsáveis por 95% de todas as infestações que levam a perdas agrícolas (HUANG et al., 2006). Causam prejuízos que podem ultrapassar 125 bilhões de dólares anuais na agricultura mundial (CHITWOOD, 2002). Apenas na agricultura internacional de soja as perdas anuais causadas por *Meloidogyne* sp. são da ordem de US\$ 2,7 bilhões (TIHOHOD, 2000).

2.3 *Meloidogyne incognita*

Esta é a espécie de nematoide fitoparasita de mais ampla distribuição geográfica, sendo encontrada em todas as áreas temperadas e tropicais, até o limite mínimo de temperatura de 3 °C (TRUDGILL; BLOK, 2001). O ciclo de vida deste nematoide consiste de seis estágios fenológicos: ovo, quatro larvais (juvenis) e adulto. O juvenil do segundo estágio (J2), fase infectiva do nematoide, penetra na raiz da planta hospedeira e migra pelo cilindro vascular, via força mecânica do estilete e degradação enzimática da parede celular e lamela média, até a zona de diferenciação das células, para a formação do sítio de alimentação, que resulta da modificação de células vegetais para que funcionem como dreno de nutrientes para o fitopatógeno (GHEYSEN; FENOLL, 2002). Após a primeira ecdise, o J2 se diferencia em macho quando em condições de parasitismo desfavoráveis. Por outro lado, quando a interação molecular planta-nematoide é favorável, ocorre diferenciação do J2 em fêmea. Após sucessivas ecdises o J2 se diferencia em J3 e J4, assumindo uma forma “salsichoide”. O J4 macho adulto apresenta forma vermiforme e abandona o hospedeiro. O J4 fêmea apresenta uma forma de pêra, e completa seu ciclo de vida, geralmente em menos de um mês, ao depositar seus ovos. Em 1957 Saigusa contou 700-800 ovos para cada fêmea de *M. incognita*. Nas condições atuais sabemos que esse número pode chegar a algo em torno de 2.000 ovos (WILLIAMSON; GLEASON, 2003).

O J2 traz consigo 30% de seu peso corporal em lipídios, que constituem a principal fonte energética para os gastos no processo de penetração e parasitismo do hospedeiro (LEE; ATKINSON, 1977). A perda dessas reservas reduz a infectividade e a reprodução do nematoide (CHRISTOPHERS et al., 1997; CAMPOS, 2003), o que pode levá-lo à morte. Gundy, Bird e Wallace (1967) verificaram que o armazenamento de J2 de *M. incognita* a 25 °C, por 16

dias, causou perda de 94,67% no teor de lipídios neutros, o que resultou na perda de 72,53 e 62,07% da mobilidade e infectividade, respectivamente.

O *M. incognita* provoca grande destruição do sistema radicular, eliminando praticamente todas as raízes laterais e causando fendas no córtex. A planta entra em declínio, podendo facilmente sucumbir após um quadro sintomatológico que inclui desfolhação, clorose e sintomas de deficiência nutricional. Como esta espécie é altamente polífaga, o seu controle é mais difícil que o observado para qualquer outra espécie de nematoide citada (BRASS et al., 2008). Só no México, *M. incognita* é responsável por mais de 20% das perdas hortícolas (TRUDGILL; BLOCK, 2001). No Brasil as culturas mais afetadas por esse parasita são a soja, algodão, feijão (perdas de 40 a 90%), batata e cenoura (BORGES et al., 2009).

2.4 Corismato mutase

Estudos realizados por Lambert, Allen e Sussex (1999) mostram que a corismato mutase de *M. javanica* é a enzima responsável por induzir a formação do sítio de alimentação, etapa fundamental para a concretização do parasitismo. A análise do parasitoma de *Heterodera glycines*, realizada por Gao et al. (2003), revelou a presença de sequências de mRNA que codificam a sequência de aminoácidos da corismato mutase na glândula dorsal do nematoide. Como se acredita que os produtos desta glândula são utilizados pelo nematoide para o controle dos processos celulares da planta hospedeira, esta pode ser considerada mais uma evidência da importância da corismato mutase para a criação e manutenção do sítio de alimentação do nematoide. Uma evidência mais forte do papel desta proteína na regulação dos processos celulares do hospedeiro durante a indução e manutenção dos sítios de alimentação é a expressão da corismato mutase de *M. javanica* (Mj CM-1) em raízes de soja, o que produziu um

fenótipo caracterizado por baixos níveis de auxinas devido ao fato da corismato mutase do nematoide degradar o corismato, que é o principal substrato para a formação de auxinas (DOYLE; LAMBERT, 2003). Genes que codificam a corismato mutase também foram identificados em nematoides de cisto da batata e da soja (BEKAL; NIBLACK; LAMBERT, 2003; JONES et al., 2003), e em *M. incognita* (HUANG et al., 2005).

A existência de homólogos da corismato mutase em diferentes nematoides endoparasitas sedentários sugere que esta enzima tenha um papel-chave na interação planta-nematoide, o que a torna um alvo em potencial para o desenvolvimento de novos produtos para o controle destes fitoparasitas. Ademais, como não se observa a sua utilização em seres humanos, ou em outros animais (CARUSO, 2007), também existe potencial para que tais produtos apresentem toxicidades muito inferiores às observadas para os nematicidas atualmente em uso.

A via metabólica do chiquimato (Figura 1) é composta de sete enzimas que catalisam a conversão sequencial de eritrose-4-fosfato e fosfoenolpiruvato ao corismato (KITZING et al., 2004).

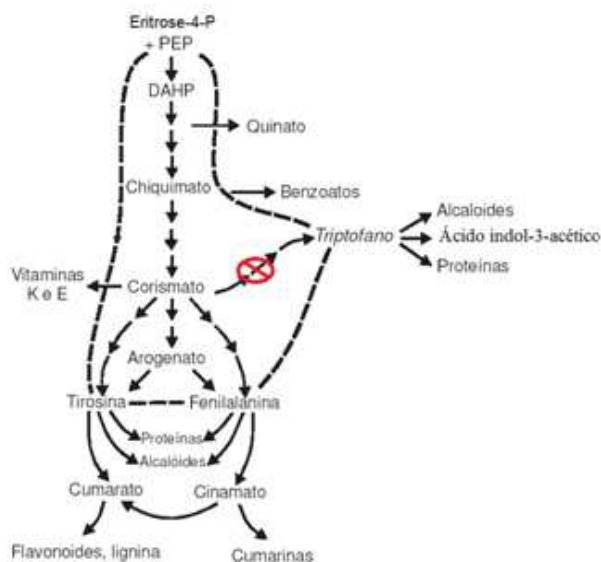


Figura 1 Representação simplificada da via do Chiquimato modificada de Yamada e Castro (2004), demonstrando a atuação da enzima corismato mutase, que reduz a formação do triptofano

O corismato é um precursor na síntese de metabólitos de plantas, incluindo fitormônios, compostos de defesa da planta e três aminoácidos aromáticos: fenilalanina, triptofano e tirosina. Esses compostos desempenham papéis críticos no desenvolvimento e defesa da planta (DOYLE; LAMBERT, 2003). Um exemplo é o ácido indol-3-acético (IAA), que se trata de uma auxina que pode ser sintetizada diretamente do corismato ou indiretamente por meio do aminoácido triptofano (BARTEL, 1997). Outras substâncias utilizadas pelo sistema de defesa da planta, cujas biossínteses dependem do corismato, são as fitoalexinas e o ácido salicílico (DOYLE; LAMBERT, 2003), que derivam do aminoácido aromático fenilalanina.

Atualmente (fevereiro de 2013), o Protein Data Bank apresenta 34 estruturas tridimensionais de corismato mutases produzidas por bactérias, fungos

e plantas, que podem ser caracterizadas como monoméricas, homodiméricas, homotriméricas, etc. Como não se conhecem as estruturas tridimensionais de corismato mutases produzidas por nematoides, ferramentas que permitam modelar tais enzimas, como é o caso da química computacional, podem ser de grande valia para estudos nesta área.

2.5 A Química Computacional

As proteínas são as moléculas orgânicas encontradas em todas as células, pois realizam tarefas fundamentais tanto na parte estrutural quanto em outras funções celulares. A função de uma proteína está diretamente relacionada à sua organização espacial nativa (NOVAES; SCOTT, 2009), que é dependente da sua sequência de aminoácidos. Apesar de haver um grande número de possibilidades conformacionais para uma sequência de aminoácidos, as interações entre os resíduos de aminoácidos de uma proteína e destes com o meio tornam a busca pela conformação nativa um processo espontâneo e não aleatório (Paradoxo de Levinthal). Portanto, conhecer a estrutura tridimensional de uma proteína é fundamental para compreender o seu funcionamento (NOVAES; SCOTT, 2009).

Supondo-se que não se tenha qualquer informação sobre a estrutura de uma proteína a ser modelada, a primeira etapa a ser realizada é a busca pela sua sequência de aminoácidos. Para tanto, existem os bancos primários e secundários de sequências de aminoácidos de proteínas ou de sequências de genes que codificam a produção de proteínas. Os bancos primários são aqueles derivados diretamente dos dados obtidos a partir do sequenciamento de ácidos nucleicos ou proteínas. Eles podem conter, além da sequência em si, outros dados como uma tradução de uma sequência de um clone de DNA, sequências padrão (como sítios de fosforilação), promotores e outras anotações

semelhantes. Os principais bancos de dados primários são o Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), o European Bioinformatics Institute em parceria com o European Molecular Biology Laboratory (EMBL-EBI) e o DDBJ (para sequências de nucleotídeos) e Uniprot (para sequências de aminoácidos). Normalmente, as sequências identificadas pelos laboratórios são submetidas aos bancos de dados primários antes da publicação do respectivo artigo. Os autores utilizam recursos como o Bankit, o Webin ou o Sakura para a submissão de pequenas sequências diretamente pela web, ou o Sequin, um programa para editar sequências a serem enviadas diretamente pela rede ou por e-mail (em casos de sequências muito extensas, as mesmas são enviadas por FTP, a fim de obter um endereço ftp temporário para a submissão). Para submissões no Uniprot, utiliza-se a ferramenta baseada em Web denominada Spin. Uma vez submetida, cada sequência ganha um número de acesso que deve ser citado no manuscrito do artigo e que servirá como um sinal de liberação dessa informação para consulta pública. Esses bancos de dados são fundamentais para as ferramentas de comparação de sequências.

Os bancos de dados secundários são derivados dos primários. Alguns exemplos são: o Blocks (sequências sem *gaps*, alinhadas de acordo com as regiões mais conservadas em proteínas do mesmo grupo), GDB (o banco de dados oficial do projeto genoma humano), PROSITE (um banco de dados de famílias e domínios de proteínas), REBASE (banco de dados com informações sobre enzimas de restrição, metilases, de origem microbiana, sequências de reconhecimento, sítios de clivagem, especificidade de metilação, disponibilidade comercial e referências) (InterPro Ensembl, 2004).

Uma vez selecionada a sequência de aminoácidos de interesse, é necessário modelá-la. Para tanto, faz-se uso da manipulação e representação virtual de estruturas moleculares e cálculo das propriedades físico-químicas associadas, por meio de uma vasta gama de ferramentas e métodos

computacionais e teóricos (SILVA, 2006). As principais técnicas de predição das estruturas tridimensionais (3D) de proteínas (PSP) por métodos computacionais são: modelagem por homologia, predição de enovelamento (*threading*) e predição por primeiros princípios (*ab initio*).

O método mais frequentemente usado é o da modelagem por homologia, que se baseia no princípio de que a proteína de interesse (proteína alvo) terá sua estrutura 3D predita usando como referência (proteína molde) a estrutura 3D de outra proteína similar (na maioria das vezes evolutivamente relacionada), que tenha sido resolvida experimentalmente e cujas coordenadas cartesianas de seus átomos estejam disponíveis em algum banco de dados como o Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>). Valores mínimos de 25-30% de identidade obtida por meio do alinhamento das estruturas primárias (sequências de aminoácidos) da proteína alvo e da proteína molde são essenciais para que o processo possa funcionar de forma adequada. Um dos programas mais utilizados para tal finalidade é o Swiss-Model (GUEX; PEITSH, 1997; ARNOLD et al., 2006).

Para a predição de enovelamento (*threading*) também são usadas informações sobre proteínas com estruturas 3D conhecidas e depositadas em bibliotecas de enovelamentos como o CATH (Class, Architecture, Topology, Homology) (ORENGO et al., 1997) e o SCOP (Structural Classification of Proteins) (ANDREEVA et al., 2008). Baseia-se na tentativa de ajustar a estrutura da proteína de interesse aos tipos de enovelamentos de proteínas conhecidas (atualmente mais de 1000 tipos já foram registrados) e depositados em bibliotecas de enovelamentos. Geralmente, é utilizado quando o alinhamento entre a estrutura primária (sequência de aminoácidos) de uma proteína de interesse e de uma ou mais proteínas de referência apresenta uma identidade inferior a aproximadamente 30%. Um dos programas que vem apresentando bons resultados com este método é o I-TASSER (WU et al., 2007; ROY et al., 2010).

Para a predição por primeiros princípios (*ab initio*) não se faz uso de estruturas de referência experimentalmente resolvidas para predizer a estrutura de uma proteína. Tal método se baseia no uso de funções de energia semi-empíricas simplificadas, que capturam algumas das forças essencialmente conhecidas por estabilizar o enovelamento de uma proteína. Estas funções são minimizadas por algoritmos que realizam buscas no espaço de conformações que a proteína de interesse possa assumir. Dentre os programas mais promissores nesta área se encontram o ROSETTA (ROHL et al., 2004; MISURA et al., 2006) e QUARK (XU; ZHANG, 2012).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Modelagem molecular

Nesta parte do trabalho foram empregadas as sequências de aminoácidos da corismato mutase de *Meloidogyne incognita*, descrita por Huang et al. (2005). As quatro sequências, duas sem o peptídeo sinalizador e duas completas, foram submetidas aos seguintes sistemas de modelagem por homologia: EsysPred3D (LAMBERT et al., 2002), SwissModel (ARNOLD et al., 2006) e FoldPro (CHENG; BALDI, 2006). Para a modelagem por método *ab initio* se empregaram Quark (XU; ZHANG, 2012), ChuncKtasser (ZHOU; SKOLNICK, 2007) e Robetta (KIM; CHIVIAN; BAKER, 2004). Também se fez uso da modelagem por *threading* pelo emprego do I-Tasser (ZHANG, 2008), MetaTasser (ZHOU; PANDIT; SKOLNICK, 2009) e Phyre 2 (KELLEY; STERNBERG, 2009). Em todos os casos se empregou os parâmetros padrões dos sistemas de modelagem, o que gerou 127 modelos para avaliação.

3.2 Avaliação dos modelos gerados

Inicialmente, eliminaram-se todos os modelos com número de aminoácidos menor que o existente na sequência da corismato mutase de *M. incognita*. A seguir o RMSD (desvio da raiz quadrada média) entre os modelos remanescentes foi medido no programa Swiss PDB Viewer (SPDBV) v4.0.4 (GUEX; PEITSH, 1997). Descartou-se um dos modelos em cada par com valor de RMSD igual ou abaixo de 0,4 Å. Após tal procedimento, restaram 24 modelos que, a seguir, foram avaliados quanto às características estereoquímicas, como comprimento de ligações, ângulos das ligações,

quiralidade e ângulos de torção das cadeias principais e laterais. Também se levou em consideração o ambiente de cada resíduo de aminoácido no modelo em função do ambiente encontrado nas estruturas que serviram como molde. Para tanto, se utilizaram: Qmean 6 Score-Swiss Expansy (BENKERT; KÜNZLI; SCHWEDE, 2009), Vadar 1.5 (WILLARD et al., 2003), Dfire2 (YANG; ZHOU, 2008), ProQ (WALLNER; ELOFSSON, 2003) e FoldX 2.5.2 (SCHYMKOWITZ et al., 2005). Selecionaram-se apenas dois modelos de menor energia segundo cada programa utilizado, restando assim nove modelos.

3.3 Construção dos dímeros da corismato mutase de *M. incognita*

Utilizando o programa SPDBV 4.0.4, alinharam-se duas cadeias de cada um dos nove modelos restantes (item 3.2) com as duas cadeias (A e B) das proteínas homodiméricas 1ECM (LEE et al., 1995) e 2F6L (KIM et al., 2006), que se tratam de corismato mutases produzidas por *Escherichia coli* e *Mycobacterium tuberculosis*, respectivamente. As estruturas de ambas foram obtidas do Protein Data Bank (BERMAN et al., 2000) na forma de arquivos pdb. As duas cadeias de um mesmo modelo, alinhadas com as duas cadeias de uma das proteínas (1ECM ou 2F6L) foram unidas em um único arquivo pdb para formar as prováveis estruturas homodiméricas da corismato mutase de *M. incognita*.

3.4 Avaliação e otimização dos dímeros

Para avaliação visual e cálculo de RMSD (Å) entre os modelos homodiméricos gerados (item 3.3) foi empregado o programa Visual Molecular Dynamics (VMD) v1.9.1 (HUMPHREY et al., 1996). Os modelos com sérias

interações estéricas (sobreposição de átomos) segundo análise visual foram descartados, restando assim, quatro modelos para dar continuidade ao trabalho. Os modelos resultantes foram submetidos ao programa SCWRL4 (KRIVOV; SHAPOVALOV; DUNBRACK, 2009) para otimização das cadeias laterais. Posteriormente, adicionaram-se os átomos de hidrogênio a tais modelos pelo emprego do *plugin* auto PSF disponível no software VMD v1.9.1, que empregou os arquivos de topologia (top_all27_prot_lipid.rtf; VANOMMESLAEGHE et al., 2010) com o campo de força do Charmm para esta operação. Em seguida, aperfeiçoaram-se as estruturas com o programa NAMD 2.8 (PHILLIPS et al., 2005), utilizando o arquivo de parâmetros para o campo de força do Charmm (par_all27_prot_lipid.prm; VANOMMESLAEGHE et al., 2010). Considerou-se o solvente implicitamente em tal etapa pelo emprego do modelo Generalized Born Implicit Solvent (GBIS). Foram utilizadas 1000 iterações nesta etapa.

3.5 Dinâmica Molecular

Os quatro homodímeros minimizados (item 3.4) foram solvatados (água) com o *plugin* Solvate no VMD 1.9.1, resultando em sistemas retangulares, nos quais a distância mínima entre a proteína e os lados do retângulo era de 16 Å. Tais sistemas foram neutralizados pelo *plugin* Autoionize do mesmo software, que acrescentou dois íons de sódio (Na^+) para cada sistema. Os sistemas finais foram submetidos à minimização no programa NAMD 2.8 com o campo de força Charmm (10.000 iterações). Em seguida, iniciaram-se as simulações por dinâmica molecular, que foram divididas em ciclos de 2 ns para a realização de análises dos modelos conforme descrito no item 3.6. Quando o processo de dinâmica molecular atingiu 6 ns, eliminaram-se dois dímeros e prosseguiu-se com os dois restantes até 12 ns. Para tal processo de dinâmica molecular se empregou: temperatura de 300 K; tempo de 2 fs (fentossegundos) para cada

etapa; algoritmo Particle Mesh Ewald (PME) para considerar as interações eletrostáticas; o método de Langevin para o controle de temperatura; controle da pressão pelo método do pistão de Nosé-Hoover e Langevin; e condições periódicas de fronteira. NAMDPlot (um *plugin* do VMD) foi usado para extrair dados de energia, temperatura e pressão a partir dos arquivos de saída gerados pelo NAMD, enquanto a trajetória foi analisada pelo emprego do RMSD Trajectory Tool (outro *plugin* do VMD), que alinhou todos os quadros à estrutura de partida antes de calcular o deslocamento quadrático médio (RMSD) em relação à estrutura inicial.

3.6 Avaliação dos modelos após a simulação por dinâmica molecular

As conformações dos últimos 1000 ps foram novamente avaliadas quanto às características estereoquímicas a cada etapa de 2 ns do processo de dinâmica molecular (item 3.5) para a seleção daqueles de melhor estabilidade conformacional. Para tanto, utilizou-se o programa FoldX 2.5.2 (SCHYMKOWITZ et al., 2005) até a etapa de 6 ns, quando os dois modelos de maiores energias foram eliminados. A avaliação final (12 ns) foi feita para os últimos 2000 ps do processo, com o software FoldX, o que resultou na escolha do modelo robb2 como sendo o de menor energia.

3.7 Seleção da conformação da corismato mutase de *M. incognita* mais apropriada para a seleção de ligantes

Para esta parte do trabalho foram empregadas as conformações da enzima robb2 (foi selecionada no item anterior) correspondentes aos últimos 1000 ps do processo de dinâmica molecular realizado por 12 ns. Todas foram

alinhas com a primeira conformação pelo emprego do programa VMD 1.9.1 e, em seguida, utilizando-se o programa MGLTools 1.5.6-rc2 (MORRIS et al., 2009), converteram-se todas as mencionadas conformações do formato pdb para o formato pdbqt.

Os ligantes (1R,3S,5S,8R)-8-hidroxi-2-oxabicyclo [3.3.1] non-6-eno-3,5-dicarboxilato, aqui chamado apenas de TSA, e o corismato, bem como as estruturas monoprotonadas correspondentes de ambos os ligantes, foram submetidos a uma busca conformacional pelo emprego do programa Open3Dalign versão 2.105 (TOSCO; BALLE; SHIRI, 2011). Para tanto, utilizou-se a constante dielétrica da água ($\epsilon= 80,4$) e executaram-se 1000 simulações por dinâmica molecular usando o campo de força MMFF94s, a 1000 °C, com 1000 etapas de 1fs em cada simulação. A estrutura mais estável em cada processo foi minimizada com o campo de força MMFF94s para ser ranqueada de acordo com a energia total. A conformação mais estável de cada substância foi então, convertida ao formato pdbqt com o programa MGLTools 1.5.6rc2 (MORRIS et al., 2009).

A seguir, foi realizado um processo de ancoramento para cada uma das cadeias da enzima robb2. No primeiro deles, escolheu-se uma região com 18 x 18 x 18 Angstroms, que englobava os aminoácidos Arg 19, Val 26, Lys 30, Asp 39, Arg 42, Glu 43, Leu 47, Gln 69, Ile72, Ser 75 e Lys 76, da cadeia P1 da enzima. Em tal região, as estruturas não protonadas e parcialmente protonadas do TSA e do corismato, convertidos ao formato pdbqt conforme descritos acima foram ancoradas com o uso do programa Autodock Vina versão 1.1.2 (TROTT; OLSON, 2010), utilizando-se os parâmetros padrões do programa. Vale deixar evidente que tal ancoramento foi realizado para todas as conformações da cadeia P1 da enzima robb2 nos últimos 1000 ps do processo de dinâmica molecular. O mesmo procedimento foi realizado para a cadeia P2 da enzima robb2, tendo neste caso a região escolhida para o ancoramento dimensões de 18 x 21 x 18

Angstroms. Tal tamanho da região de ancoramento foi suficiente para englobar os resíduos de aminoácidos Arg 19, Val 26, Lys 30, Asp 39, Arg 42, Glu 43, Leu 47, Gln 69, Ile72, Ser 75 e Lys 76, da cadeia P2. Dentre os ancoramentos com as maiores afinidades dos ligantes pela enzima robb2, aquele correspondente à conformação de número 835 apresentou valores mais favoráveis no geral, sendo por este motivo escolhido para dar prosseguimento ao trabalho.

3.8 Seleção de inibidores para a corismato mutase de *M. incognita*

Foram utilizados dois *softwares* distintos na seleção inicial de inibidores para garantir que apenas as substâncias com maiores potenciais para a inibição da corismato mutase pudessem ser selecionadas.

3.8.1 Utilizando o programa Autodock Vina

Utilizando-se o Zincpharmer (KOES; CAMACHO, 2011), buscaram-se, no banco de dados do Zinc (IRWIN; SHOICHET, 2005), substâncias topologicamente parecidas com as estruturas do corismato e do TSA nas formas totalmente desprotonadas e monoprotonadas. Obtiveram-se 7.764 substâncias, as quais foram adicionados átomos de hidrogênio com o programa OpenBabel 2.3.0 (O'BOYLE et al., 2011), considerando-se o pH 7.5 para o meio. Em seguida, ainda utilizando o OpenBabel (obminimize, campo de força: MMFF94s), minimizaram-se todas as substâncias que, a seguir, foram convertidas para o formato pdbqt com o programa MGLTools 1.5.6-rc2 (MORRIS et al., 2009). Em seguida, todas foram separadamente ancoradas em ambas as cadeias da conformação da corismato mutase de *M. incognita* que foi selecionada no item anterior (conformação 835). Para tanto, utilizou-se o

programa Autodock Vina versão 1.1.2 (TROTT; OLSON, 2010) com o valor de 2 para o parâmetro exhaustiveness. As mil substâncias melhor ranqueadas para cada uma das cadeias foram então, novamente ancoradas, sendo o valor do parâmetro exhaustiveness elevado para 8 desta vez.

3.8.2 Utilizando o programa Igemdock

Após adição de hidrogênio e otimização, as 7.764 substâncias selecionadas no banco de dados ZINC, conforme mencionado em 3.8.1, foram convertidas ao formato mol com o uso do OpenBabel 2.3.0 (O'BOYLE et al., 2011). Quanto à enzima, utilizou-se a conformação selecionada no item 3.7 (conformação 835). Para cada uma das cadeias, selecionou-se apenas a região até 10 Å de distância do ligante (item 3.7) e salvou-se tal seleção no formato pdb. Para tanto, utilizou-se o programa SPDBV 4.0.4. Em seguida, as substâncias no formato mol foram ancoradas pelo programa Igemdock 2.1 (YANG; CHEN, 2004) nos sítios ativos das duas cadeias da enzima. Para tanto, utilizou-se a opção *quick docking* do programa. As mil substâncias melhor ranqueadas para cada cadeia, foram novamente ancoradas com o mesmo programa, mas desta vez se utilizou a opção *stable docking* do programa.

3.9 Ranqueamento dos ligantes

O ranqueamento foi realizado para os 200 primeiros ligantes ranqueados por cada programa (Autodock Vina 1.1.2 e Igemdock 2.1) para cada cadeia (P1 e P2) da enzima robb2. Logo, foram ranqueadas 800 possibilidades para a enzima corismato mutase de *M. incognita*.

3.9.1 Utilizando o programa DSX 0.8.9

Inicialmente, tanto a enzima robb2 (conformação 835) quanto os ligantes (com as coordenadas após os ancoramentos com o programa Autodock Vina ou Igemdock) foram convertidos para o formato mol2 com o uso do

programa OpenBabel 2.3.0 (O'BOYLE et al., 2011). No caso dos ligantes, utilizou-se a opção de adicionar átomos de hidrogênio com pH igual a 7.5. Em seguida utilizou-se o programa DSX 0.8.9 (NEUDERT; KLEBE, 2011) para calcular a afinidade de cada ligante pelos sítios das cadeias da enzima.

3.9.2 Utilizando o programa MGLTools 1.5.6-rc2

Inicialmente, os ligantes ancorados pelo programa Igemdock tiveram átomos de hidrogênio adicionados pelo programa OpenBabel 2.3.0 e, em seguida, foram convertidos ao formato pdbqt pelo programa MGLTools 1.5.6-rc2 (MORRIS et al., 2009). A seguir, foram ranqueados, juntamente com os ligantes ancorados pelo programa Autodock Vina, que já estavam no formato pdbqt, utilizando-se o script autodock4.py do programa MGLTools 1.5.6-rc2.

3.9.3 Utilizando o programa NNscore 1.0

Fazendo uso dos ligantes já no formato pdbqt (item 3.9.2), empregou-se o programa NNscore 1.0 (DURRANT; MCCAMMON, 2010) com todas as suas 24 bibliotecas de dados para avaliação da afinidade do ligante.

3.9.4 Utilizando o programa Dock 6.6

Todas as estruturas dos ligantes no formato mol2 (item 3.9.1) foram reconvertidas ao formato mol2 com o uso do programa Chimera 1.6.2 (PETTERSEN et al., 2004), que empregou o campo de força GAFF (General Amber Force Field, WANG et al., 2004). As cargas foram atribuídas aos ligantes pelo método AM1-BCC, usando o módulo Antechamber (WANG et al., 2006) do Chimera. Em seguida, utilizou-se o script prepare_amber.pl do programa

Dock 6.6 (BROZELL et al., 2012) para preparar os ligantes e a enzima para o cálculo. Uma vez feito isto, empregou-se o módulo Amber-score (GRAVES, 2008) do mesmo programa para calcular as afinidades dos ligantes pela enzima. Para tanto, adotou-se livre mobilidade para todo o sistema que, antes do cálculo da afinidade do ligante, foi minimizado (100 iterações), submetido a 1000 etapas de dinâmica molecular e mais uma vez minimizado (500 iterações).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo Huang et al. (2005), *M. incognita* pode produzir duas enzimas corismato mutase, tendo ambas 191 resíduos em suas sequências. Ainda segundo os autores, os vinte primeiros resíduos de ambas as cadeias podem corresponder a peptídeos sinalizadores, que teriam de ser removidos para que as enzimas pudessem tornar-se ativas. Considerando-se tais questões, iniciamos o trabalho com quatro possibilidades (Figura 2): duas cadeias de 191 resíduos de aminoácidos e duas cadeias com 170 resíduos de aminoácidos (sem os peptídeos sinalizadores).

```

MI-CM-2-Q -----SDTDTNPDIDRFVEIADDRRLTSDYVALYKVVNNQSITD 39
MI-CM-2  MSFNWLYCNLFIAILFFNIVKSDTDTNPDIDRFVEIADDRRLTSDYVALYKVVNNQSITD 60
MI-CM-1-Q -----SDTDTNADIDRFVEIADDRRLTSDYVALYKIVNKSITD 39
MI-CM-1  MSLNWLKCNLFIVILLFNIVKSDTDTNADIDRFVEIADDRRLTSDYVALYKIVNKSITD 60
          * * * * *
MI-CM-2-Q PKREEKLLNDRSKGKNSLNEDYVTLIFQDQINASKYFQNYLVNLWNQSGIPLIKVRNL 99
MI-CM-2  PKREEKLLNDRSKGKNSLNEDYVTLIFQDQINASKYFQNYLVNLWNQSGIPLIKVRNL 120
MI-CM-1-Q PKREEKLLNDRSKGKNSLNEDYVTLIFQDQINASKYFQNYLVNLWNQSGIPPIKVRDL 99
MI-CM-1  PKREEKLLNDRSKGKNSLNEDYVTLIFQDQINASKYFQNYLVNLWNQSGIPPIKVRDL 120
          * * * * *
MI-CM-2-Q TTDLRPAIDQINTEMLQLLVKIQKLPKDKLKKVDKSVNMFIMIVNQIDEQNDALKMAVK 159
MI-CM-2  TTDLRPAIDQINTEMLQLLVKIQKLPKDKLKKVDKSVNMFIMIVNQIDEQNDALKMAVK 180
MI-CM-1-Q NTDLRPAIDQINTEMLQLLVKIQKLPKDKLKKVDKSVNMFIMRVNQIDEQNDALKMAVK 159
MI-CM-1  NTDLRPAIDQINTEMLQLLVKIQKLPKDKLKKVDKSVNMFIMRVNQIDEQNDALKMAVK 180
          * * * * *
MI-CM-2-Q GKDLCPACKHN 170
MI-CM-2  GKDLCPACKHN 191
MI-CM-1-Q GKDLCPACKHN 170
MI-CM-1  GKDLCPACKHN 191
          * * * * *

```

Figura 2 Sequências de aminoácidos de corismato mutases produzidas por *Meloidogyne incognita* (HUANG et al., 2005)

Nota: Cores iguais equivalem a resíduos iguais. Os 21 resíduos iniciais de aminoácidos das sequências MI-CM-2 e MI-CM-1 correspondem aos peptídeos sinalizadores.

Inicialmente, as quatro sequências foram submetidas aos programas para modelagem por homologia, por método *ab initio* e por *threading*. Dentre os 127

modelos obtidos, aqueles gerados por homologia (16) foram descartados, pois os números de resíduos de aminoácidos em tais estruturas eram inferiores aos números de resíduos nas sequências iniciais. Os 111 modelos restantes foram submetidos à análise do desvio da raiz quadrada média (RMSD) entre eles. Observou-se nesta etapa que não havia diferença entre os modelos gerados para as duas sequências (MI-CM-1 e MI-CM-2) com ou sem o peptídeo sinalizador. Assim, o trabalho teve prosseguimento apenas com a sequência MI-CM-2 sem o peptídeo sinalizador, visto que na literatura este sinalizador indica a quebra da sequência para que esta se torne ativa e exerça as suas funções. Desta maneira, eliminaram-se 87 modelos, restando 24 para dar prosseguimento ao trabalho.

Os modelos remanescentes foram submetidos à avaliação quanto às características estereoquímicas e energéticas. Como não houve unanimidade entre os resultados obtidos para cada software (Tabela 1), selecionaram-se os dois melhores modelos segundo cada *software* para continuar o trabalho, o que resultou em nove modelos para a etapa seguinte.

Tabela 1 Resultados da avaliação dos modelos resultantes após a eliminação por RMSD, pelo emprego dos programas Qmean 6 Score-Swiss Expansy, Vadar 1.5, Dfire2, ProQ e FoldX 2.5.2. Os valores mais favoráveis segundo cada método empregado estão marcados em destaque

Modelo	Qmean 6 Z-Score	Vadar 1.5 ΔG Folding	DFire 2 Energy	ProQ LG Score	FoldX 2.5.2 Total Energy
Chunk1	-1,33	-134,61	-399,12	3,40	69,75
Chunk2	-1,05	-135,05	-394,69	3,48	79,11
Chunk3	-1,91	-126,16	-374,15	2,66	102,28
Chunk4	-2,25	-126,18	-365,06	3,01	94,65
Chunk5	-1,87	-137,29	-395,2	3,62	83,50
Quark1	-0,79	-139,46	-439,65	4,16	68,83
Quark2	-1,8	-141,6	-451,28	3,68	-6,98
Quark3	1,39	-136,47	-430,17	4,03	38,01
Quark4	-2,01	-134,62	-443,25	4,09	92,77
Quark5	-1,61	-135,09	-438,99	3,45	18,01
Quark6	-1,09	-138,78	-441,52	4,03	10,19
Quark7	-2,03	-136,81	-425,12	3,31	28,62
Quark8	-1,17	-134,46	-445,69	3,36	-10,59
Quark9	-0,541	-141,83	-442,73	3,95	20,12
Quark10	-1,73	-130,7	-431,71	3,87	15,26
Robb1	-1,64	-154,83	-443,09	3,41	35,58
Robb2	-1,54	-154,46	-448,3	3,83	26,46
Robb3	-0,771	-157,68	-446,71	3,56	13,33
Robb4	-0,99	-162,77	-439,5	4,05	27,27
Robb5	-1,49	-158,25	-432,06	4,09	-24,67
Meta1	-1,83	-138,61	-384,27	3,62	-33,43
ITasser1	-2,22	-119,44	-414,7	4,62	-28,98
ITasser2	-2,44	-121,08	-391,54	4,55	-14,75
Fold	-1,84	-107,49	-326,15	1,97	-18,99

Os dímeros foram construídos com base nas duas proteínas cujas sequências de resíduos de aminoácidos se mostravam com maior similaridade à sequência de aminoácidos da MI-CM-2 (Figura 3). Como se pode observar (Figura 4), as sequências de aminoácidos das enzimas IECM (corismato mutase de *Escherichia coli*) e a 2F6L (corismato mutase de *Mycobacterium tuberculosis*) são, respectivamente, 21 e 18 % similares a MI-CM-2. Estes

valores parecem bastante razoáveis se considerarmos que entre as enzimas 1ECM e 2F6L a similaridade é de 17 %.

```

MI-CM-2      MSFNWLYCNLFIAILFFNIVKSDTDNPDIDRFVEIADDRLLTSDYVALYKVVNNQSI TD 60
2F6L        -----DGTSQLAELVDAAERLEVADPVAAFKWRRAQLPIED 36
1ECM        -----MTSENPLLALREKISALDEKLLALLAERRELAVEVGKALLSHRPV RD 48
              . . . . . : : : : * : : * . * : : : *

MI-CM-2      PKREEKLLNDMRSKGKNFSLNEDYVTLIFQDQINASKYFQNYLVNLWNQSGIPLIKVRNL 120
2F6L        SGRVEQQAKLGEDARSQHIDPDYVTRVFDQIRATEAIEYSRFSWKLNPASAPPEPPD 96
1ECM        IDREDDLLERLITLGAHHLDAHYITRFLQLIEDSVLTQQALLQQH----- 95
              * . . * : . : : : . * : * : : . : .

MI-CM-2      TTDLRPAIDQINTEML-QLLVKIQLPSKDCCLKKVDKSVNMFIMIVNQIDEQNDALKMAV 179
2F6L        LSASRSAIDSLNRMLSQIWSHWSLLSAPSCAAQLDRAKRDIVRSRHLDLSYQRALT TAT 156
1ECM        -----LNKINPHSARIAFL----- 109
              : : : * .

MI-CM-2      KGKDLCPACKHN 191
2F6L        QS--YCALPPA 166
1ECM        -----

```

Figura 3 Alinhamento das seqüências de aminoácidos de MI-CM-2, 1ECM e 2F6L

Como as enzimas 1ECM e 2F6L eram homodiméricas, assumiu-se que a corismato mutase de *M. incognita* também deveria ser homodimérica. Em decorrência, alinharam-se duas cadeias de cada um dos nove modelos remanescentes com as duas cadeias (A e B) das proteínas similares (1ECM e 2F6L). Após a eliminação daqueles dímeros que visualmente apresentavam sobreposição de átomos que causavam interações estéricas irreparáveis, restaram quatro modelos, denominados itasser1, itasser2, robb2 e robb4. Tais modelos apresentavam valores de RMSD entre eles que variavam de 2,66 a 5,88 Angstroms (Tabela 2). Ou seja, segundo tais valores nenhum destes quatro modelos podia ser eliminado por similaridade.

Tabela 2 Valores de RMSD (Å) entre os modelos homodiméricos da corismato mutase de *M. incognita*: itasser1, itasser2, robb2 e robb4

	Itasser1	Itasser2	Robb2	Robb4
Itasser1	-	4,36	3,79	3,72
Itasser2	4,36	-	5,85	5,88
Robb2	3,79	5,85	-	2,66
Robb4	3,72	5,88	2,66	-

Os quatro modelos remanescentes (itasser1, itasser2, robb2 e robb4) foram submetidos a refinamento de suas estruturas. Para tanto, fez-se uso da otimização das cadeias laterais dos modelos, seguida de minimização de todas as estruturas, considerando-se o solvente (água) implicitamente. Como não se observaram diferenças significativas entre as qualidades das estruturas dos quatro homodímeros após o processo de refinamento de suas estruturas, por análise realizada por meio do FoldX, todos eles foram submetidos ao processo de dinâmica molecular, considerando o solvente (água) explicitamente. Durante os primeiros 6 ns se observou que os modelos robb2 e robb4 eram mais favoráveis que os modelos itasser1 e itasser2 (Figura 4). Logo, estes dois últimos foram descartados.

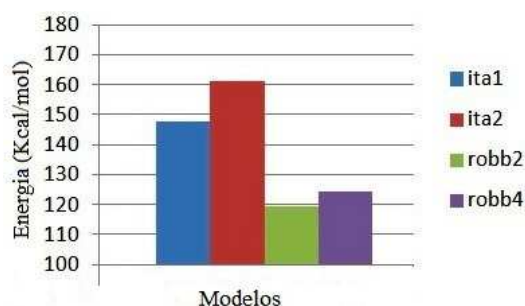


Figura 4 Energias totais (kcal/mol) dos modelos homodiméricos da enzima corismato mutase de *M. incognita*, até 6 ns de simulação por dinâmica molecular, calculados com o programa FoldX

O processo de dinâmica molecular teve prosseguimento até 12 ns para os modelos robb2 e robb4. Observou-se neste ponto que o modelo robb2 era termodinamicamente mais estável, já que o valor calculado de energia pelo programa FoldX para robb4 era 163,4Kcal/mol, enquanto para robb2 era 134,23 Kcal/mol. Como a diferença de RMSD em relação à estrutura utilizada para começar o processo de dinâmica molecular do modelo robb2 parecia ter estabilizado (Figura 5), julgou-se que não seria necessário dar continuidade a tal processo.

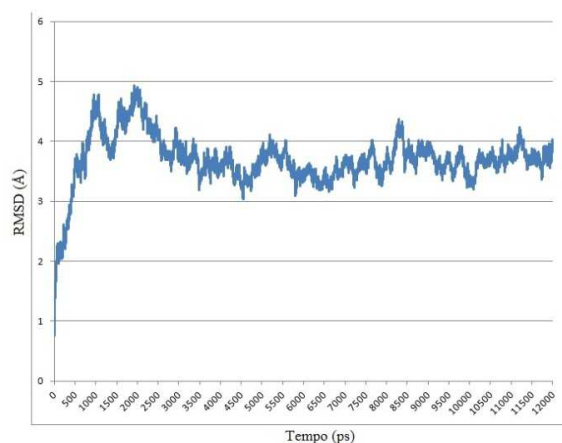


Figura 5 RMSD x tempo de simulação por dinâmica molecular para o modelo robb2 da enzima corismato mutase de *M. incognita*

Na conformação de menor energia segundo os cálculos feitos com o Namd 2.8, para o modelo robb2 durante os últimos 200 ps do processo de dinâmica molecular, que foi realizado por 12 ns, observa-se a similaridade entre o modelo e a proteína 2F6L (Figura 6).

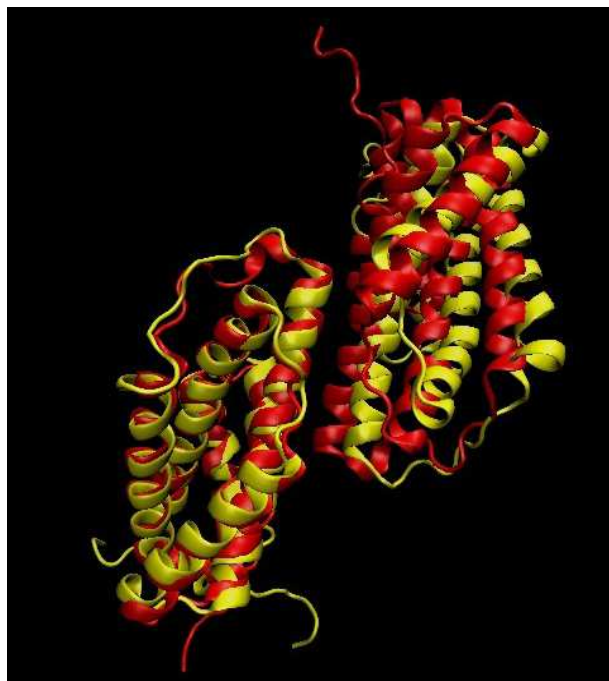


Figura 6 Similaridade estrutural entre Robb2 em amarelo e 2F6L em vermelho

Como não se sabia qual das conformações da robb2 seria a mais apropriada para a etapa de seleção dos ligantes, todas aquelas nos últimos 2 ns do processo de dinâmica molecular foram utilizadas em ancoramento do corismato e do TSA que, segundo dados da literatura (LEE et al., 1995), são ligantes de corismato mutases. Para tanto, considerou-se que os sítios ativos das cadeias P1 e P2 de robb2 deveriam ser formados pelos resíduos de aminoácidos Arg 19, Val 26, Lys 30, Asp 39, Arg 42, Glu 43, Leu 47, Gln 69, Ile72, Ser 75 e Lys 76. Assim se procedeu com base no fato de o sítio ativo de corismato mutases ser conservado (LEE et al., 1995; KIM et al., 2006). Observou-se que as cadeias P1 e P2 apresentavam o sítio ativo com formatos diferentes (Figura 7), o que justificava a realização de ancoramentos para ambas as cadeias. A cadeia P2 apresentava uma abertura a mais que a P1 e, por esse motivo, foram usadas

dimensões diferentes da região de ancoramento dos ligantes. Para os sítios ativos da cadeia P1 se englobou uma região com 18 x 18 x 18Å, enquanto para cadeia P2 as dimensões eram de 18 x 21 x 18Å.

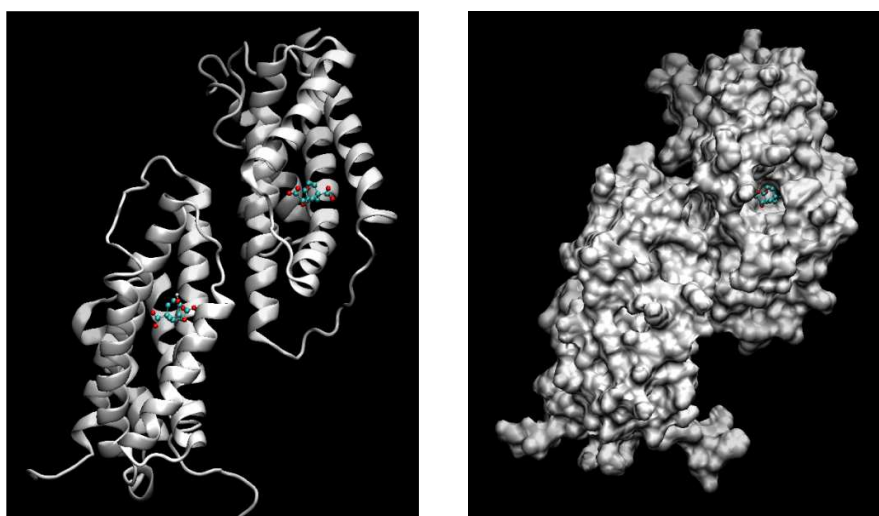


Figura 7 Uma molécula de TSA ancorada no sítio ativo de cada cadeia de Robb2

Nota: A primeira imagem a enzima está representada por meio da ferramenta New Cartoon, e na segunda imagem por meio da ferramenta MSMS que simula a densidade estrutural. O ligante (TSA) está representado com a ferramenta CPK. Ambas as imagens foram geradas com o programa VMD 1.9.1

O banco de dados de substâncias orgânicas empregado para a seleção dos ligantes foi o Zinc (<http://zinc.docking.org/>), que é hoje (fevereiro de 2013) composto por aproximadamente 21 milhões de substâncias. A busca inicialmente realizada por substâncias topologicamente parecidas com o corismato e com o TSA resultou em 7.764 substâncias para a etapa de ancoramento das mesmas nos sítios ativos da conformação de número 835 de robb2. Para tanto, utilizaram-se dois programas de ancoramento diferentes com vistas a garantir o sucesso desta etapa. Visando a reduzir o tempo de utilização

da infraestrutura computacional, para ambos os programas se iniciou o processo com parâmetros menos eficientes, que diminuiriam o tempo de ancoramento. Em seguida, os 1000 ligantes melhor ranqueados por cada programa, para cada cadeia, foram novamente ancorados com o uso de parâmetros mais eficientes.

Observou-se para ambos os programas de ancoramento que os compostos selecionados para a cadeia P1 de roob2 eram, na quase totalidade dos casos, diferentes daqueles selecionados para a cadeia P2. Em princípio, este é um resultado razoável se considerarmos que durante o processo de dinâmica molecular se observou que as duas cadeias não assumem a mesma conformação ao mesmo tempo. Além disto, observou-se também, que as substâncias selecionadas pelos dois programas eram, em sua grande maioria, diferentes, o que justifica a utilização de mais de um programa de ancoramento para a seleção virtual de inibidores de uma determinada enzima.

O ranqueamento dos 200 melhores ligantes de cada cadeia, segundo cada software empregado (totalizando 800 ligantes) foi realizado por meio do uso de quatro programas distintos para eliminar o número de resultados falso positivos. Os programas utilizados foram DSX 0.8.9 (utiliza o formalismo da DrugScore, considerando o potencial do meio), NNScore 1.0 (calcula as energias livres de ligação utilizando uma abordagem de rede neural), Amber-Score (utiliza um modelo de solvatação mais rigoroso (GB/SA), além da opção de considerar o centro ativo e o receptor flexíveis) e o autodock.py. A Tabela 2 com os melhores resultados de cada método pode ser vista no Anexo. As substâncias selecionadas serão submetidas a futuros testes *in vivo* visando à inibição da enzima corismato mutase de *M. incognita*.

5 CONCLUSÃO

A modelagem *in silico* da enzima corismato mutase produzida por *Meloidogyne incognita* permitiu observar que a mesma é homodimérica, com a estrutura secundária em alfa hélice para a maior parte dos resíduos de aminoácidos. Ao se fazer os ancoramentos de várias substâncias aos sítios ativos de ambas as cadeias da enzima, que eram compostos pelos aminoácidos Arg19, Val 26, Lys 30, Asp 39, Arg 42, Glu 43, Leu 47, Gln 69, Ile72, Ser 75 e Lys 76 (HUANG et al., 2005), selecionaram-se vários ligantes com afinidades pela enzima superiores às observadas para o corismato e para o TSA, que são ligantes naturais de corismato mutases em geral. Logo, as substâncias selecionadas apresentam elevado potencial de inibição da corismato mutase de *M. incognita*, o que significa que são potencialmente úteis para o desenvolvimento de novos métodos de controle do referido nematoide.

REFERÊNCIAS

ABAD, P. et al. Invasion, feeding and development. In: PERRY, R.; MOENS, M.; STARR J. L. **Root-knot Nematodes**. Cambridge: CABI International, 2003. p. 163-181.

ANDREEVA, A. et al. Data growth and its impact on the scop database: new developments. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 36, p. D419–D425, 2008.

ARNOLD, K. et al. The swiss-model workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. **Bioinformatics**, v. 22, n. 2, p.195–201, 2006.

ATKINSON, H. J.; URWIN, P. E.; MCPHERSON, M. J. Engineering plants for nematode resistance. **Annual Review Phytopathology**, v. 41, p. 615-39, 2003.

BALDWIN, J. G.; NADLER, S. A.; ADAMS, B. J. Evolution of plant parasitism among nematodes. **Annual Review Phytopathology**, v. 42, p. 83-105, 2004.

BARTEL, B. Auxin biosynthesis. **Annual Review Plant Physiology**, v. 48, p. 51-66, 1997.

BEKAL, S.; NIBLACK, T. L.; LAMBERT, K. N. A chorismate mutase from the soybean cyst nematode *Heterodera glycines* shows polymorphisms that correlate with virulence. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 16, p. 439–446, 2003.

BENKERT, P.; KÜNZLI, M.; SCHWEDE, T. QMEAN server for protein model quality estimation. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. W510-4, 2009.

BERMAN, H. M. et al. The protein data bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, p. 235-242, 2000.

BIRD, D. M.; KALOSHIAN, I. Are roots special? Nematodes have their say. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 62, n. 2, FEB, p. 115-123, 2003.

BORGES, D. C. et al. Reação de genótipos de *Avena* spp. a *Meloidogyne incognita* raça 4. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, n. 1, p. 24-28, 2009.

BRASS, F. E. B. et al. Aspectos biológicos do *Meloidogyne* spp. relevantes a cultura do café. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, v.7, n.14, p. 1-7, 2008.

BROZELL, S. R. et al. Evaluation of DOCK 6 as a pose generation and database enrichment tool. **The Journal of Computer-aided molecular design**, v. 26, p. 749-773, 2012.

CAMPOS, V. P. Doenças causadas por nematoides. **Informe Agropecuário**, v. 11, n. 122, p. 21-28, 1985.

CAMPOS, H. D. **Aspectos do parasitismo e da privação alimentar do nematóide de galhas (*Meloidogyne javanica*) e do cisto (*Heterodera glycines*) em soja**. 2003. 203 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

CARUSO, C. S. **Clonagem, expressão e caracterização de proteínas recombinantes de *Xylella fastidiosa***. 2007. Tese (Doutorado em Ciências)-Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

CHENG, J.; BALDI, P. A Machine learning information retrieval approach to protein fold recognition. **Bioinformatics**, v. 22, n. 12, p. 1456-1463, 2006.

CHITWOOD, D. J. Phytochemical based strategies for nematode control. **Annual Review of Phytopathology**, v. 40, p. 221-249, 2002.

CHRISTOPHERS, A. E. P. et al. A rapid field-laboratory bioassay to assess the infectivity of *Meloidogyne* spp. second stage juveniles. **Nematologica**, Leiden, v. 43, n. 1, p. 117-120, Jan. 1997.

DAVIS, E. L.; HUSSEY, R. S.; BAUM, T. J. Getting to the roots of parasitism by nematodes. **Trends Parasitology**, v. 20, n. 3, p.134-41, 2004.

DE LEY, P.; BLAXTER, M. L. Systematic position and phylogeny. In: LEE, D. L. **The biology of nematodes**. London: Taylor and Francis, 2002. p. 1-30.

DE WAELE, D.; ELSEN, A. Challenges in tropical plant nematology. **Annual Review Phytopathology**, v. 45, p. 457-485, 2007.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; PIVETTA, J. P.; FRACASSO, J. V. Influência de época de aplicação de nematicidas em soqueiras sobre as populações de nematoides e a produtividade da cana-de-açúcar. **Bragantia**, v. 6, n. 1, 2008

DOYLE, E. A.; LAMBERT, K. N. *Meloidogyne javanica* chorismate mutase 1 alters plant cell development. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 16, n. 2, p. 123-131, 2003.

DURRANT, J. D.; MCCAMMON J. A. NNScore: A Neural-Network-based Scoring function for the characterization of Protein-Ligand complexes. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 50, n. 10, p. 1865-1871, 2010.

FERRAZ, S.; FREITAS, L. G. Use of antagonistic plants and natural products. In: CHEN, Z.; CHEN, S.; DICKSON, D. W. **Nematology, advances and perspectives**. [S.l.: s. n.], 2004. v. 2.

FRAGOSO, R. R. et al. **Interação molecular planta-nematoide**. Brasília: Embrapa, 2007. v. 198, p. 9-11.

GAO, B. et al. The parasitome of the phytonematode *Heterodera glycines*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 16, p. 720-726, 2003.

GHEYSEN, G.; FENOLL, C. Gene expression in nematode feeding sites. **Annual Review of Phytopathology**, v. 40, p. 191-219, 2002.

GOVERSE, A.; DE ENGLER, J. A. de. Cell cycle activation by plant parasitic nematodes. **Plant Molecular Biology**, v. 43, n. 5, p.747-761, 2000.

GRAVES, A. P. et al. Rescoring docking hit lists for model cavity sites: predictions and experimental testing. **Journal Molecular Biology**, v. 377, p. 914-934, 2008.

GUEX, N.; PEITSH, M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modelling. **Electrophoresis**, n. 18, p. 2714-2723, 1997.

GUNDY, S. D. van; BIRD, A. F.; WALLACE, H. R. Aging and starvation in juvenile of *Meloidogyne javanica* and *Tylenchulus semipenetrans*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 57, n. 6, p. 559-571, 1967.

HUANG, G. et al. Engineering broad root-knot resistance ins transgenic plants by RNAi silencing of a conservator and essential root-knot nematode parasitism gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 103, n. 39, p. 14302-14306, 2006.

HUANG, G. et al. Two chorismate mutase genes from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Molecular Plant Pathology**, v. 6, n. 1, p. 23-30, 2005.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: visual molecular dynamics. **Journal of Molecular Graphics**, v. 14, p. 33-38, 1996.

HUNT, D. J.; HANDOO, Z. A. Taxonomy, identification and principal species. In: PERRY, R. N.; MOENS, N.; STARR, J. L. **Root-Knot nematodes**. Cambridge: CABI North America Office, 2009. p. 55-97.

INTERPRO Ensembl. Protein Families and Domains. 2004. Disponível em: <<http://eot.bu.edu/ccb/ProteinDatabases/index.htm>> Acesso em: 5 fev. 2013.

IRWIN, J. J.; SHOICHET, B. K. ZINC - a free database of commercially available compounds for virtual screening. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 45, p. 177-182, 2005.

JEYARATNAM, J. Acute pesticide poisoning: a major global health problem. **World Health Stat Q**, v. 43, n. 3, p. 139-144, 1990.

JONES, J. T. et al. Characterization of a chorismate mutase from the potato cyst nematode *Globodera pallida*. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, p. 43-50, 2003.

KELLEY, L. A.; STERNBERG, M. J. E. Protein structure prediction on the web: a case study using the Phyre Server. **Nature**, v. 4, p. 363 - 371, 2009.

KIM, D. E.; CHIVIAN, D.; BAKER, D. Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 32, p. W526-31, 2004.

KIM, S. K. et al. Biochemical and Structural Characterization of the Secreted Chorismate Mutase (Rv1885c) from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: an AroQ Enzyme Not Regulated by the Aromatic Amino Acids. **Journal Bacteriology**, v. 188, n. 24, p. 8638-8648, 2006.

KITZING, K. et al. Mechanism of chorismate synthase. **Journal of biological Chemistry**, v. 279, n. 10, p. 9451-9461, 2004.

KOES, D. V.; CAMACHO, C. J. Pharmer: efficient and exact pharmacophore search. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, n. 6, p. 1307-1314, 2011.

KRIVOV, G. G.; SHAPOVALOV, M. V.; DUNBRACK, R. L. Jr. Improved prediction of protein side-chain conformations with SCWRL4. **Proteins**, v. 77, n. 4, p. 778-795, 2009.

LAMBERT, C. et al. ESyPred3D: prediction of proteins 3D structures. **Bioinformatics**, v. 18, n. 9, p.1250-1256, 2002.

LAMBERT, K. N.; ALLEN, K. D.; SUSSEX, I. M. Cloning and characterization of an esophageal gand-specific chorismate mutase from the phytoparasitic nematode *Meloidogyne javanica*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 12, n. 4, p. 328-336, 1999.

LEE, A. Y. et al. Atomic structure of the buried catalytic pocket of *Escherichia coli* chorismate mutase. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, n. 12, p. 3627-3628, 1995.

LEE, D. L.; ATKINSON, H. J. **Physiology of nematodes**. New York: Columbia University, 1977. 215 p.

LORDELLO, L. G. E. **Nematóides das plantas cultivadas**. 8. ed. São Paulo: Nobel, 1988.

MISURA, K. M. S. et al. Physically realistic homology models built with ROSETTA can be more accurate than their templates. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.103, n.14, p. 5361-5366, 2006.

MOENS, M.; PERRY, R. N.; STARR, J. L. **Meloidogyne species** – a diverse group of novel and important plant parasite. Wallingford: Root-Knot Nematodes, 2009.

MORRIS, G. M. et al. Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v. 16, p. 2785-2791, 2009.

MOURA, R. M. de. O gênero *Meloidogyne* e a meloidoginose. Parte I. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 4, p. 209-244, 1996.

MOURA, R. M. de.; FEITAS, O. M. L. de. Observações sintomatológicas sobre a *Meloidogynose* do inhame (*Dioscorea cayennensis*). **Fitopatologia Brasileira**, Recife, v. 8, p. 243-249, 1983.

NEUDERT, G.; KLEBE, G. DSX: a knowledge-based scoring function for the assessment of protein-ligand complexes. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, n. 10, p. 2731-45, 2011.

NOVAES, B. C. S.; SCOTT, L. P. B. **Modelagem molecular e docking de proteína-ligante**. Universidade Federal do ABC. 2009. Disponível em: <http://ic.ufabc.edu.br/II_SIC_UFABC/resumos/paper_5_286.pdf>. Acesso em: 7 fev. 2013.

O'BOYLE, N. M. et al. Open Babel: an open chemical toolbox. **Journal of Cheminformatics**, v. 3, p. 33, 2011.

ORENGO, C. A. et al. Cath - a hierarchic classification of protein domain structures. **Structure**, v. 5, n. 8, p. 1093-1108, 1997.

PARKINSON, J. et al. 400,000 nematode ESTs on the Net. **Trends Parasitology**, v. 19, n. 7, p. 283-286, 2003.

PETTERSEN, E. F. Et al. UCSF Chimera – a visualization system for exploratory and analysis. **J. Comput. Chem.**, v. 25, n. 13, p. 1605-1612, 2004.

PHILLIPS, J. C. et al. Scalable molecular dynamics with NAMD. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, n. 16, p. 1781-1802, 2005.

PLATT, H. M. The phylogenetic systematics of free-living nematodes. In: LORENZEN, S. (Ed.). **Foreward**. London: The Ray Society, 1999.

REIS Jr., F. B.; FRAGOSO, R. R. Quais segredos rizóbios, agrobactérias e fitonematóides têm em comum? 2008. Disponível em: <<http://www.paginarural.com.br/artigo/1767/quais-segredos-rizobios-agrobacterias-e-fitonematoides-tem-em-comum>>. Acesso em: 5 dez. 2012.

ROHL, C. A. et al. Protein structure prediction using Rosetta. **Methods in Enzymology**, v. 383, p. 66-93, 2004.

ROY, A.; KUCUKURAL, A.; ZHANG, Y. I-TASSER: unified platform for automated protein structure and function prediction. **Nature Protocols**, v. 5, n. 4, p. 725-738, 2010.

SANTOS, M. A. dos; RUANO, O. Reação de plantas usadas como adubos verdes a *Meloidogyne incógnita* raça 3 e *M. javanica*. **Nematologia Brasileira**, v. 11, p. 185-196, 1997.

SASSER, J. N.; FRECKMAN, D. W. A world perspective on nematology: the role of the society. In: VEECH, J. A.; DICKSON, D. A. (Ed.). **Vistas on nematology: a commemoration of the twenty-fifth anniversary of the Society of Nematologists** [Hardcover]. Maryland: Society of Nematologists, 1987. p. 7-14.

SASSER, J. N. Root-knot nematodes: a global menace to crop production. **Plant Disease**, v. 64, p. 36-41, 1980.

SCHOLL, E. H.; BIRD, D. M. Resolving tylenchid evolutionary relationships through multiple gene analysis derived from EST data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 2, 2005.

SCHYMKOWITZ, J. et al. The FoldX web server: an online force field. **Nucleic Acids Research**, v. 33, p. W382-8, 2005.

SHOMAKER, C. H.; BEEN, T. H. A model for infestation foci of potato cyst nematodes, *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. **Phytopathology**, v. 89, p. 583-90, 1999.

SILVA, T. H. A. **Modelagem molecular com o auxílio do computador**. 2006. Disponível em: <http://old.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry/Practica-III-3.pdf>. Acesso em: 7 fev. 2013.

TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola aplicada**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 473 p.

TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola aplicada**. Jaboticabal: FUNEP, 1993. 372 p.

TOSCO, P.; BALLE, T.; SHIRI, F. Open3DALIGN: an open-source software aimed at unsupervised ligand alignment. **Journal of Computer-aided design molecular**, v. 25, p. 777-783, 2011.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, p. 455-461, 2010.

TRUDGILL, D. L.; BLOCK, V. C. Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 39, p. 53-77, 2001.

VANOMMESLAEGHE, K. et al. CHARMM General force field: a force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force field. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, p. 671-690, 2010.

WALLNER, B.; ELOFSSON, A. Can correct protein models be identified? **Protein Science**, v. 12, n. 5, p. 1073-1086, 2003.

WANG, J. et al. Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanics calculations. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 25, p. 247-260, 2006.

WANG, J. et al. Development and testing of a general AMBER force field. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 9, p. 1157-1174, 2004.

WESEMAEL, W. M. L.; VIAENE, N.; MOENS, M. Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in Europe. **Nematology**, v. 13, n. 1, p. 3-16, 2011.

WILLARD, L. et al. VADAR: a web server for quantitative evaluation of protein structure quality. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3316-3319, 2003.

WILLIAMSON, V. M.; GLEASON, C. A. Plant-nematode interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, n. 4, p. 327-333, 2003.

WU, S.; SKOLNICK, J.; ZHANG, Y. Ab initio modeling of small proteins by iterative TASSER simulations. **BMC Biology**, v. 5, n. 17, 2007.

XU, D.; ZHANG, Y. *Ab initio* protein structure assembly using continuous structure fragments and optimized knowledge-based force field. **Proteins**, v. 80, p. 1715-1735, 2012.

YAMADA, T.; CASTRO, P. R. C. **Glifosato, herbicida com singular modo de ação**: efeitos secundários e implicações fisiológicas e agronômicas. 2004. Disponível em: <<http://www.inpi.org>>. Acesso em: 8 fev. 2013.

YANG, J. M.; CHEN, C. C. GEMDOCK: A generic evolutionary method for molecular docking, **Proteins: structure, function and bioinformatics**, v. 55, p. 288-304, 2004.

YANG, Y.; ZHOU, Y. *Ab initio* folding of terminal segments with secondary structures reveals the fine difference between two closely related all-atom statistical energy functions. **Protein Science**, v. 17, p. 1212-1219, 2008.

ZHANG, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. **Bioinformatics**, v. 9, p. 40, 2008.

ZHOU, H.; PANDIT, S. B.; SKOLNICK, J. Performance of the Pro-sp3-TASSER Server in CASP8. **Proteins**, v. 77, p. 123-127, 2009.

ZHOU, H.; SKOLNICK, J. *Ab initio* protein structure prediction using chunk-TASSER. **Biophysical Journal**, v. 93, p. 1510-1518, 2007.

ANEXOS

Tabela 1 Concentração das amostras na pasta oferecida ([]), tempo letal mediano (TL₅₀)*, valores de parâmetros de forma (α) e parâmetros de escala (β), a probabilidade (P) e mortalidade acumulada (%) de formigas cortadeiras submetidas a bioensaios de ingestão de polpa cítrica impregnada com o extrato bruto metanólico de *C. floribundus*, com as suas frações e com a substância purificada a partir do mesmo

Tratamento	[] mg/g	TL ₅₀ (dia)	α	β	P-valor	Mortalidade Acumulada	
						24 horas	21dias
Sulfloramida	0,3	3,1	1,29	4,1	2,49e-88	14,95	99,97
Testemunha	-	17,3	1,29	22,89	3,60e-48	1,74	59,13
Extrato Bruto Metanólico (EBMeOH)	200	6,3	1,29	8,33	5,50e-12	6,28	96,29
	400	13,4	1,29	17,69	1,29e-40	2,42	71,28
	600	1,65	1,29	2,16	1,66e-10	30,94	100,0
Sulfloramida	0,3	14,1	1,69	18,67	0,01e-01	0,70	70,47
Testemunha	-	>21	1,69	38,28	3,65e-16	0,21	30,40
Fração solúvel em hexano (G-09-1)	200	>21	1,69	38,28	3,65e-16	0,21	30,40
	400	>21	1,69	38,28	3,65e-16	0,21	30,40
	600	>21	1,69	38,28	3,65e-16	0,21	30,40
Sulfloramida	0,3	13,1	1,33	17,23	2,89e-30	2,24	72,77
Testemunha	-	>21	1,33	36,81	4,34e-14	0,82	37,75
Resíduo da fração solúvel em hexano (G-09-2)	200	>21	1,33	36,81	4,34e-14	0,82	37,75
	400	>21	1,33	36,81	4,34e-14	0,82	37,75
	600	>21	1,33	36,81	4,34e-14	0,82	37,75

“Tabela 1, continuação”

Sulfloramida	0,3%	13	2,20	16,39	0,01e-01	0,21	82,18
Testemunha	-	>21	2,20	29,25	1,29e-11	0,05	38,26
Fração solúvel em acetato de etila (G-09-3)	200	20,6	2,20	24,23	1,39e-07	0,08	51,80
	400	17,5	2,20	20,61	8,96e-05	0,12	64,72
	600	17,5	2,20	20,62	8,96e-05	0,12	64,72
Sulfloramida	0,3	12,7	1,18	17,27	2,89 e-30	3,40	71,62
Testemunha	-	>21	1,18	57,56	4,34 e-14	0,83	26,23
Resíduo da fração solúvel em acetato de etila (G-09-4)	200	>21	1,18	36,81	4,34 e-14	1,40	40,29
	400	>21	1,18	36,81	4,34 e-14	1,40	40,29
	600	>21	1,18	36,81	4,34 e-14	1,40	40,29
Sulfloramida	0,3	6,7	1,32	8,74	2,87e-20	5,55	95,84
Testemunha	-	>21	1,32	27,71	1,17e-19	1,23	50,01
Fração solúvel em metanol (G-09-5)	200	11	1,32	14,42	3,37e-08	2,90	80,54
	400	16	1,32	20,82	7,04e-14	1,80	63,63
	600	11	1,32	14,42	3,37e-08	2,90	80,54
Sulfloramida	0,3	7,9	1,22	10,85	0,01e-08	6,68	87,69
Testemunha	-	>21	1,22	36,05	1,29e-20	2,89	42,07
Fração solúvel em água (G-20-1)	200	>21	1,22	23,33	2,06e-12	1,78	58,88
	400	7,9	1,22	10,85	0,01e-08	6,68	87,69
	600	7,9	1,22	10,85	0,01e-08	6,68	87,69

“Tabela 1, conclusão”

Sulfloramida	0,3	10,6	1,76	13,00	1,00 e-10	1,08	90,22
Testemunha	-	>21	1,76	30,38	5,43e-24	0,24	40,67
Fração solúvel em diclorometano (G-20-2)	200	>21	1,76	30,38	5,43e-24	0,24	40,67
	400	19,1	1,76	23,49	1,94e-15	0,38	56,00
	600	19,1	1,76	23,49	1,94e-15	0,38	56,00
Sulfloramida	0,3	10,4	1,69	12,89	1,00e-11	1,32	89,78
Testemunha	-	>21	1,69	28,81	1,48e-21	0,34	44,34
Resíduo da partição líquido-líquido (G-20-3)	200	>21	1,69	28,81	1,48e-21	0,34	44,34
	400	19,7	1,69	24,41	6,63e-16	0,45	53,95
	600	19,7	1,69	24,41	6,63e-16	0,45	53,95
Sulfloramida	0,3	9	1,19	12,19	6,63e-21	4,97	85,19
Testemunha	-	>21	1,19	70,95	7,47e-24	0,62	20,93
Ácido caurenico G-82-04	16,6	>21	1,19	70,95	1,14e-02	0,62	20,93

* Tempo Letal Mediano (TL₅₀) é o tempo necessário para uma dada substância matar 50% da população em teste.

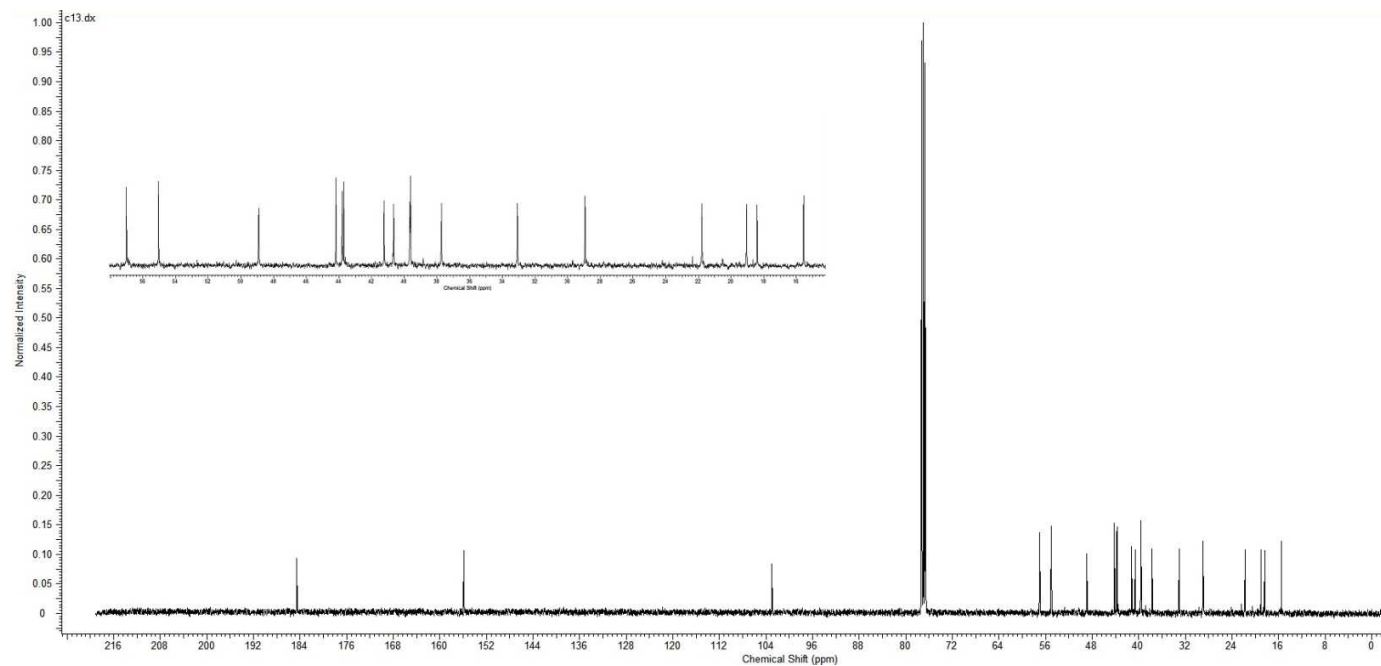


Figura 1 Espectro de RMN ^{13}C de G-82-04(ácido caurenoico) em CDCl_3 , 150 MHz

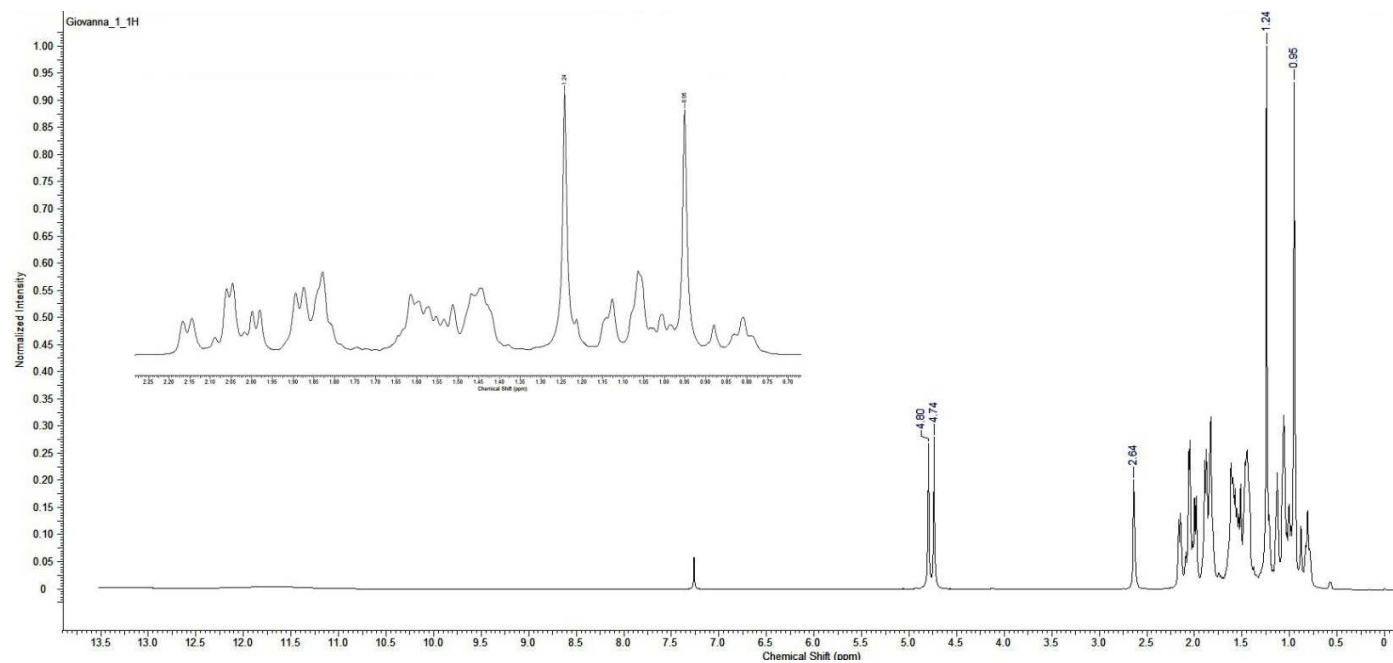


Figura 2 Espectro de RMN ¹H de G-82-04(ácido caurenoico) em CDCl₃, 600 MHz

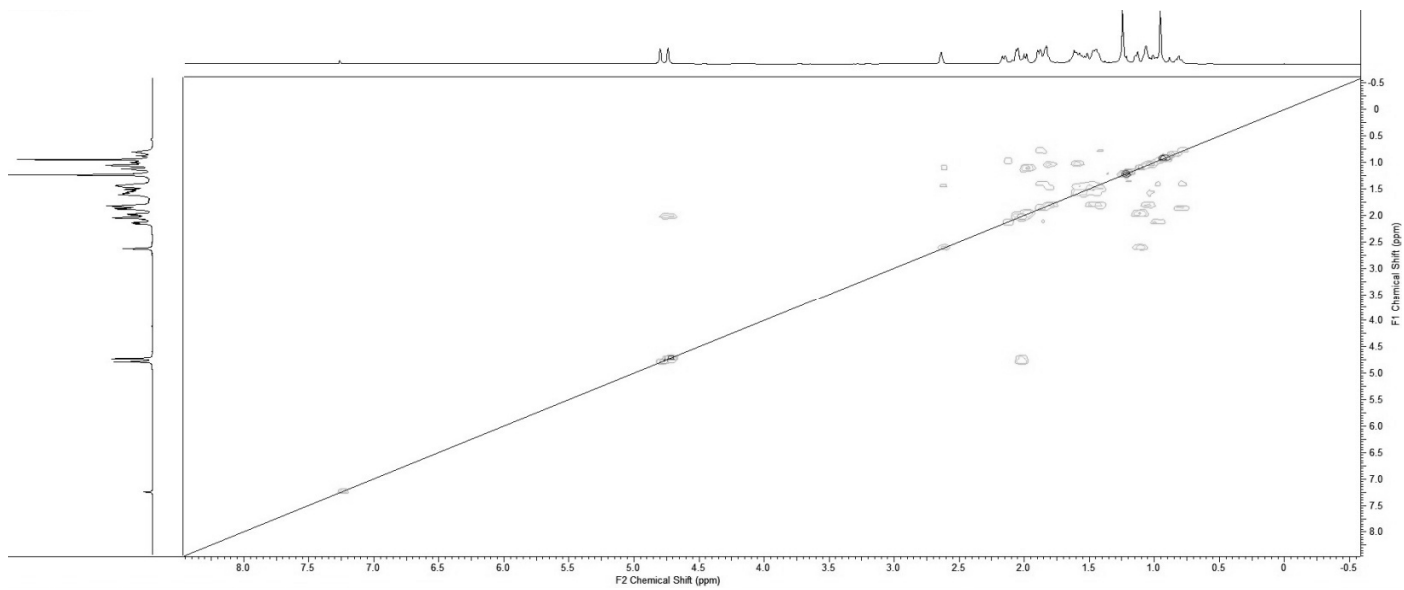


Figura 3 Mapa da correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) de G-82-04 em CDCl_3 , 600 MHz

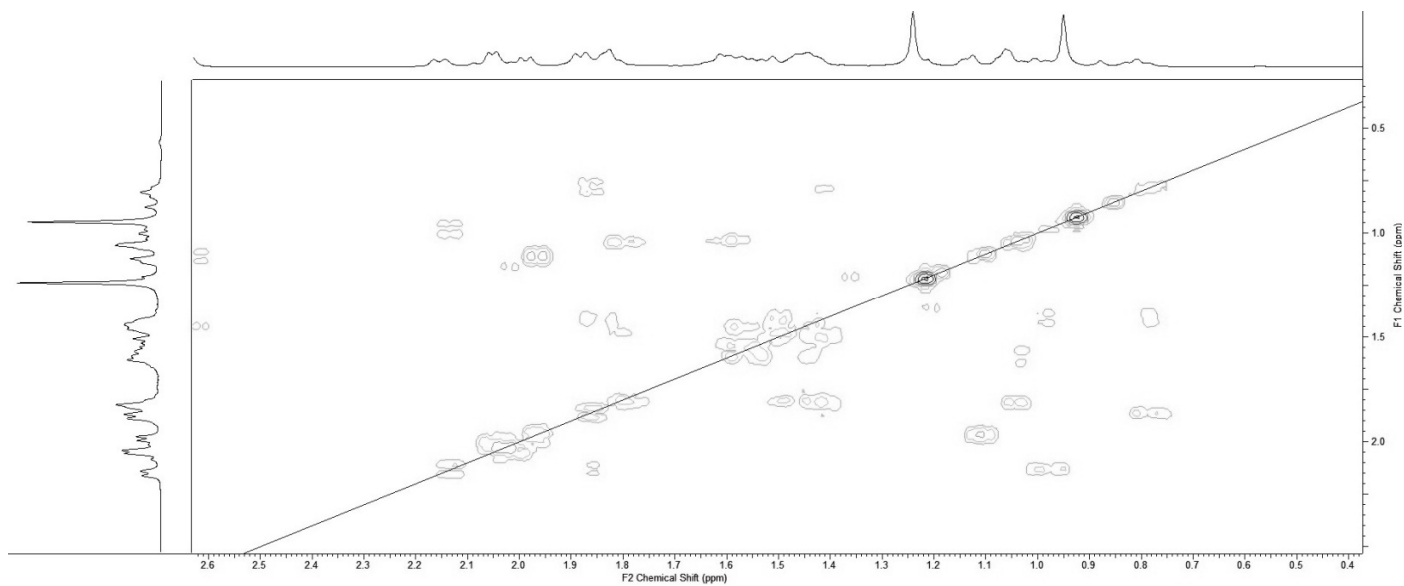


Figura 4 A Ampliação do mapa da correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) de G-82-04 em CDCl_3 , 600 MHz

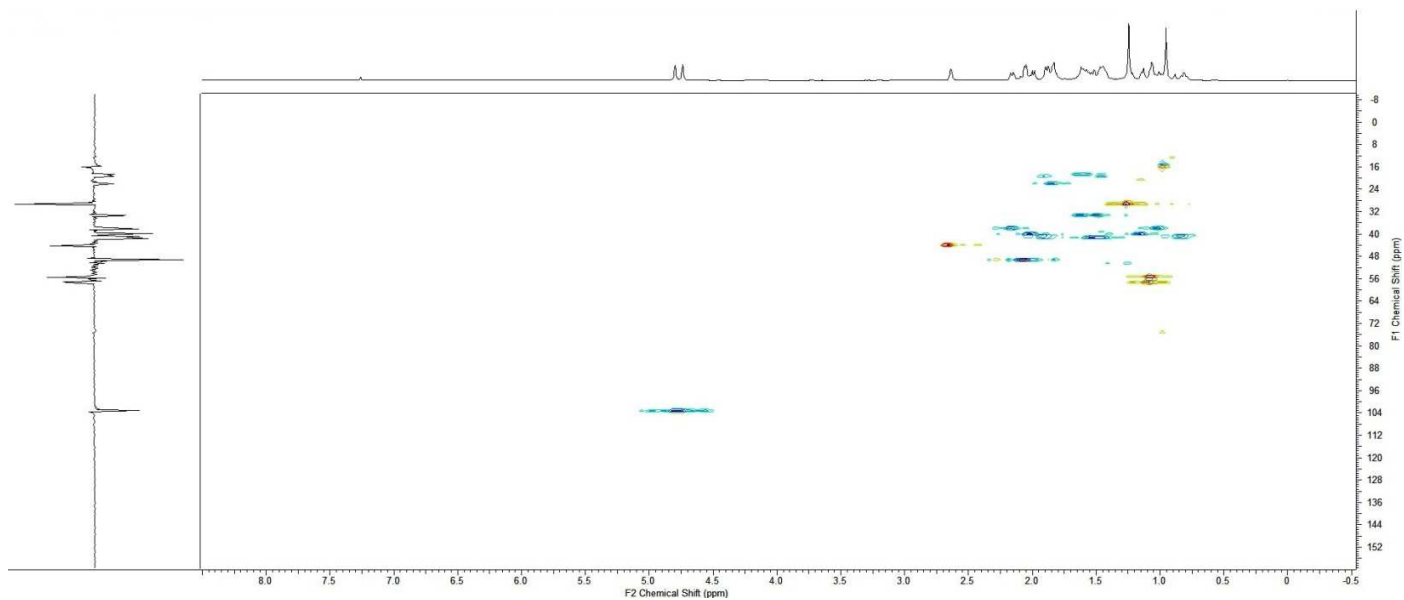


Figura 5 Mapa da correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (600 MHz x 150 MHz) a curta distância (HSQC) de G-82-04 em CDCl_3 . Onde os pontos em azul representam CH_2 , os pontos em vermelho CH e CH_3

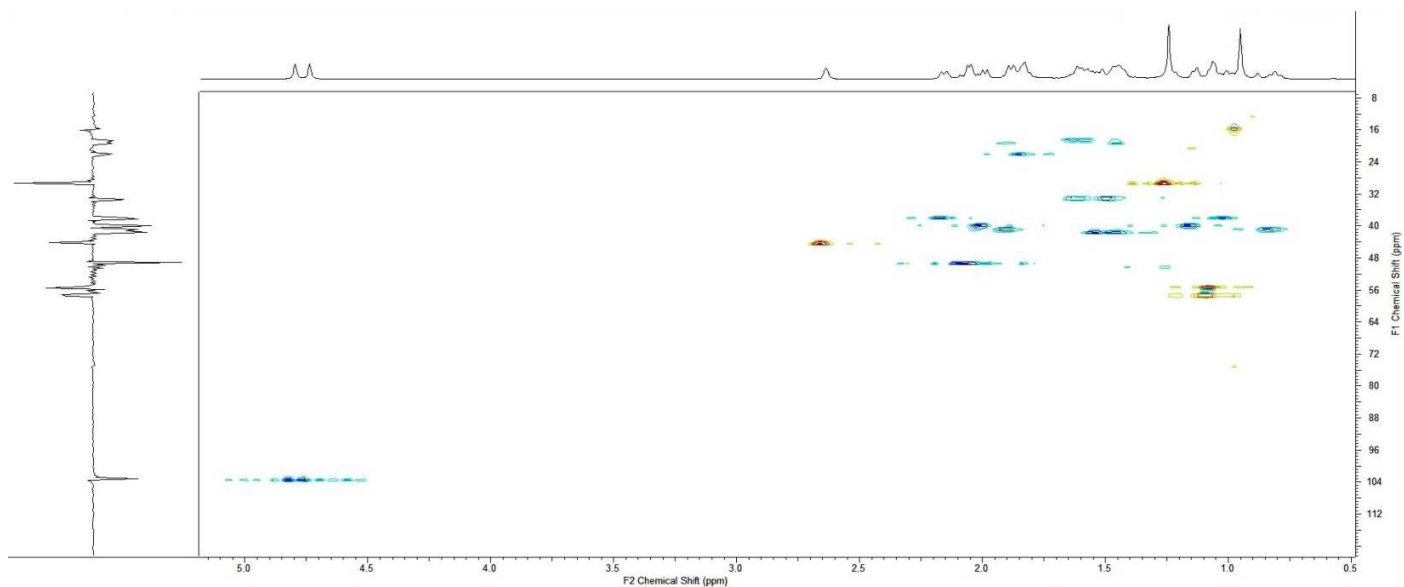


Figura 6 A Ampliação do mapa da correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (600 MHz x 150 MHz) a curta distância (HSQC) de G-82-04 em CDCl_3 . Onde os pontos em azul representam CH_2 , os pontos em vermelho CH e CH_3

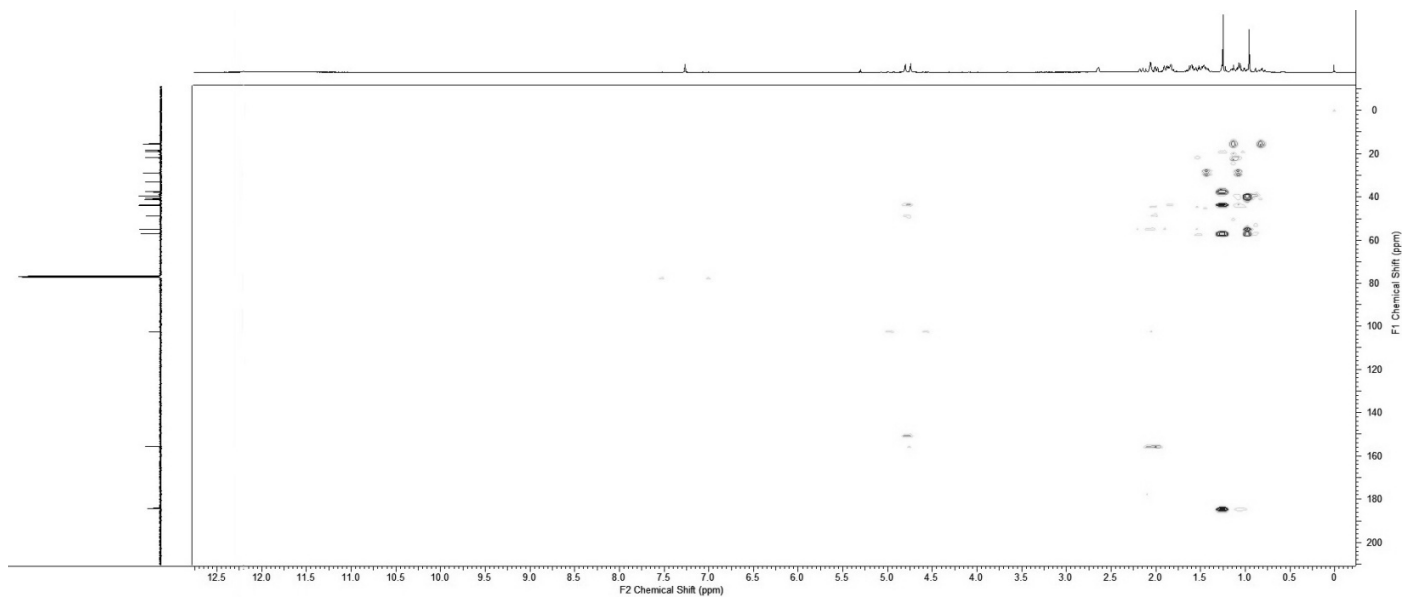


Figura 7 Mapa da correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 MHz x 100 MHz) a longa distância (HMBC) de G-82-04 em CDCl_3

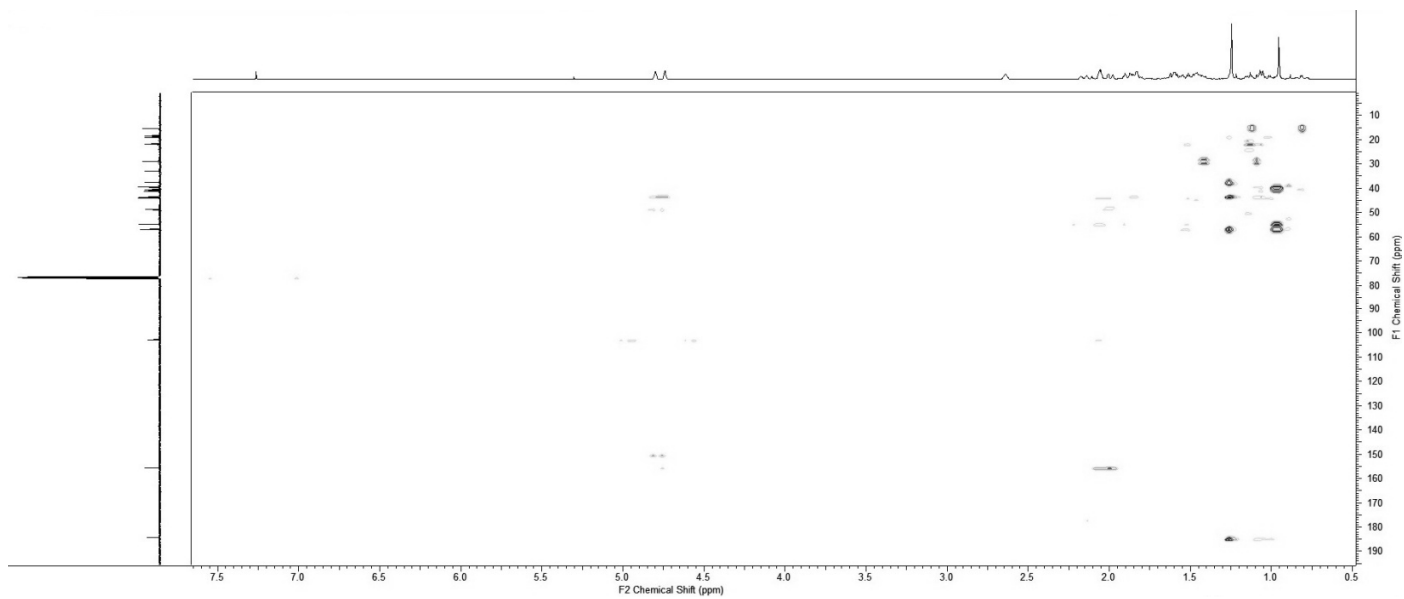


Figura 8 A Ampliação do mapa da correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (400 MHz x 100 MHz) a longa distância (HMBC) de G-82-04 em CDCl_3

CAPÍTULO 2

Tabela 2 Ranqueamento dos melhores ligantes. Os melhores de cada método estão em destaque

Número do ligante	Cadeia e programa de ancoramento	DSX 0.8.9 (Score)	Autodock-py Energia livre (kcal/mol)	Nnscore 1.0 Score	Dock 6.6 Afinidade (Kcal/mol)
Corismato -1		-66,597	-3,5216	-0,653021991	-25,825451
Corismato -2		-72,779	-4,0204	-0,796786149	-41,244305
Corismato -3		-58,995	-3,7036	-0,638284924	-37,40369
TSA -1		-61,395	-3,2882	-0,842784758	-25,199183
TSA -2		-60,204	-3,315	-1,134228768	-26,530336
TSA -3		-60,291	-3,7889	-0,98808163	-41,16544
4208	P1 - Igem	-60,42	28,61	-1,06	-230,785376
7730	P1 - Igem	-50,44	15,84	-0,13	-126,107887
4216	P1 - Igem	-67,09	-3,44	-0,41	-111,254478
4217	P1 - Igem	-51,19	-0,23	-0,85	-102,682816
6921	P1 - Igem	-79,89	130,86	-999999,90	-101,545883
5022	P1 - Igem	-45,71	14,48	-999999,90	-94,108452
5660	P1 - Igem	-57,64	3,79	-999999,90	-89,619301
4218	P1 - Igem	-70,42	-3,31	-0,53	-88,750504
6920	P1 - Igem	-37,88	23,77	-999999,90	-88,499008
5024	P1 - Igem	-70,96	29,43	-999999,90	-85,001328
4220	P1 - Igem	-78,17	-5,18	-999999,90	-82,703644
5567	P1 - Igem	-73,28	-9,34	-1,02	-30,03319
2906	P1 - Igem	-100,97	-9,04	-0,63	-22,065886

“Tabela 2, continuação”

6182	P1 - Igem	-93,77	-9,30	-0,80	ERROR
6120	P1 - Igem	-81,51	-9,12	-0,77	
4094	P1 - Igem	-88,69	-9,58	-0,89	
5751	P1 - Igem	-78,66	-9,11	-0,98	
2978	P1- vina	-101,136	-9,3749	0,06	-54,574287
2388	P1- vina	-91,03	-9,1079	-0,07	-52,473
5995	P1- vina	-80,005	-7,8249	0,85	-47,556152
4340	P1- vina	-73,488	-6,3708	0,85	-27,867256
5994	P1- vina	-90,834	-7,4125	0,79	-25,170322
1268	P1- vina	-119,993	-10,1493	-0,94	-12,707058
6186	P1- vina	-98,24	-9,012	-0,74	
7227	P1- vina	-87,128	-9,099	-0,83	
7336	P2 - Igem	138,79	124823,66	-999999,90	-106,009384
7484	P2 - Igem	-126,71	-10,82	-0,76	-104,00412
7749	P2 - Igem	-63,97	-7,94	0,65	-100,276901
4898	P2 - Igem	-66,04	-3,98	-0,46	-96,578308
5545	P2 - Igem	-57,44	-7,26	-0,33	-92,080574
6920	P2 - Igem	-67,60	-3,71	-0,77	-91,732025
7731	P2 - Igem	-71,31	-1,93	-0,16	-90,981956
5660	P2 - Igem	-51,63	-7,81	-0,24	-90,598473
4220	P2 - Igem	-56,64	-3,55	-0,76	-88,498169
2401	P2 - Igem	-78,06	-1,84	0,22	-83,608971
5025	P2 - Igem	-48,03	-4,24	-0,05	-83,592911

“Tabela 2, continuação”

3074	P2 - Igem	-63,43	-5,16	-0,39	-79,695755
5337	P2 - Igem	-68,94	-6,14	-0,85	-79,197044
5736	P2 - Igem	-49,13	-5,64	0,61	-78,110146
2776	P2 - Igem	-91,61	-7,06	0,90	-71,266144
3445	P2 - Igem	-105,46	-9,02	0,88	-63,026909
2815	P2 - Igem	-97,97	-10,89	0,71	-58,428188
5553	P2 - Igem	-104,69	0,54	0,90	-46,354465
5487	P2 - Igem	-129,27	-7,83	0,02	-43,35038
7546	P2 - Igem	-70,59	-4,55	0,92	-37,146542
7476	P2 - Igem	-132,40	-6,34	-0,83	-21,687544
7660	P2 - Igem	-94,08	-5,27	0,91	-21,685865
7481	P2 - Igem	-127,24	-7,70	-0,75	2,800836
7741	P2 - Igem	-81,69	-1,54	0,17	
52	P2 - Igem	-114,31	-9,84	-0,95	
4246	P2 - vina	-63,63	1,54	-0,93	-12568384
7758	P2 - vina	-123,57	-6,95	-0,37	-108,251396
1550	P2 - vina	-81,08	-8,22	0,54	-90,208496
7757	P2 - vina	-111,07	-7,46	-0,04	-89,266273
1862	P2 - vina	-87,63	-6,55	-0,36	-80,602097
4384	P2 - vina	-90,92	-5,15	0,80	-75,259712
1540	P2 - vina	-90,14	-9,44	0,56	-69,528969
1633	P2 - vina	-96,06	-9,68	0,52	-69,339897
2815	P2 - vina	-85,26	-10,13	0,45	-64,909142

“Tabela 2, continuação”

3251	P2 - vina	-125,20	-10,55	0,03	-63,675049
6305	P2 - vina	-120,12	-6,84	0,04	-60,23777
1065	P2 - vina	-99,59	-9,10	0,20	-59,095596
4221	P2 - vina	-88,52	-9,38	0,44	-59,0056
2530	P2 - vina	-131,77	-8,21	0,81	-57,014771
3931	P2 - vina	-101,57	-9,87	0,77	-53,306843
3978	P2 - vina	-105,18	-5,38	0,89	-49,940796
7356	P2 - vina	-127,77	-5,70	0,60	-46,739052
3551	P2 - vina	-100,16	-9,61	0,91	-46,122875
3065	P2 - vina	-121,24	-8,09	0,57	-42,514442
3982	P2 - vina	-100,94	-5,25	0,85	-42,167515
3171	P2 - vina	-99,77	-5,01	0,86	-41,774338
516	P2 - vina	-94,20	-7,18	0,83	-40,335476
7506	P2 - vina	-88,00	-6,09	0,85	-38,660942
61	P2 - vina	-132,85	-7,66	0,72	-37,114876
3981	P2 - vina	-105,14	-5,43	0,82	-35,008904
5745	P2 - vina	-79,89	-10,25	0,79	-34,353458
58	P2 - vina	-115,39	-6,39	0,81	-32,651161
7546	P2 - vina	-82,07	-5,28	0,81	-26,882185
7648	P2 - vina	-88,75	-9,77	0,74	-22,920155
3125	P2 - vina	-84,97	-9,55	0,42	-20,484526
4845	P2 - vina	-90,21	-9,05	-0,47	-20,019211
7547	P2 - vina	-84,91	-5,46	0,86	-16,248516

“Tabela 2, continuação”

6850	P2 - vina	-54,73	1,39	-1,08
4652	P2 - vina	-122,97	-8,21	-0,70
6378	P2 - vina	-106,09	-7,99	0,97
5492	P2 - vina	-105,88	-8,10	0,96
6397	P2 - vina	-122,69	-7,79	0,95
6394	P2 - vina	-117,96	-6,94	0,95
3445	P2 - vina	-116,91	-8,55	0,94
5512	P2 - vina	-126,83	-8,59	0,90
5506	P2 - vina	-123,15	-7,55	0,87
5625	P2 - vina	-118,04	-7,11	0,82
6368	P2 - vina	-118,12	-8,36	0,82
6369	P2 - vina	-123,20	-7,36	0,60
6386	P2 - vina	-131,59	-7,99	0,53
6401	P2 - vina	-123,32	-6,49	0,32
6385	P2 - vina	-126,57	-7,09	0,18
7662	P2 - vina	-84,51	-10,64	0,17
7742	P2 - vina	-114,78	-9,30	0,11
5785	P2 - vina	-125,96	-7,32	0,05
5509	P2 - vina	-125,53	-6,48	-0,01
6404	P2 - vina	-126,70	-7,56	-0,56
5504	P2 - vina	-118,37	-7,06	-0,59
6373	P2 - vina	-125,06	-7,61	-0,68
6365	P2 - vina	-126,46	-9,15	-0,80

“Tabela 2, conclusão”

5486	P2 - vina	-125,52	-8,94	-0,87
5489	P2 - vina	-126,99	-7,83	-0,96
6366	P2 - vina	-133,28	-8,34	-1,01

Onde P1-Igem representa os ligantes ancorados pelo programa Igemdock a cadeia P1; P1-vina representa os ligantes ancorados pelo programa AutodockVina a cadeia P1; P2-Igem representa os ligantes ancorados pelo programa Igemdock a cadeia P2; P2-vina representa os ligantes ancorados pelo programa AutodockVina a cadeia P2.