



HORÁCIO BAMBO PACULE

**SELEÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS COM
AÇÃO NEMATICIDA SOBRE *Meloidogyne incognita***

**LAVRAS-MG
2020**

HORÁCIO BAMBO PACULE

**SELEÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS COM AÇÃO NEMATICIDA
SOBRE *Meloidogyne incognita***

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

Prof. Dr. Denilson Ferreira de Oliveira
Orientador

**LAVRAS-MG
2020**

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

Pacule, Horácio Bambo.

Seleção de compostos orgânicos voláteis com ação nematicida
sobre *Meloidogyne incognita* / Horácio Bambo Pacule. - 2020.

83 p. : il.

Orientador(a): Denilson Ferreira de Oliveira.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. *Meloidogyne incognita*. 2. (R)-carvona. 3. acetilcolinesterase.
I. Oliveira, Denilson Ferreira de. II. Título.

HORÁCIO BAMBO PACULE

**SELEÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS COM AÇÃO NEMATICIDA
SOBRE *Meloidogyne incognita***

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

APROVADA em 20 de fevereiro de 2020.

Dra. Bárbara Sayuri Bellete UFLA

Dr. Ricardo Moreira de Sousa UFNF

Prof. Dr. Denilson Ferreira de Oliveira
Orientador

**LAVRAS-MG
2020**

*À minha esposa Cristina Cossa, pela paciência, apoio e consentimento;
À minha filha Lyandra Pacule. que por esta causa seguiu sem pai presente.
Aos meus pais Bambo e Elisa (em memória).*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, pela saúde, e pela força de trilhar mesmo diante de dificuldades.

Ao Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia (CNPq), através do Programa Estudantes-Convênios de Pós-Graduação (PEC-PG), pela concessão da bolsa.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Departamento de Química, pela oportunidade da minha formação.

Em especial, ao Professor Denilson Ferreira de Oliveira, pela orientação, dedicação e acompanhamento, pela disponibilidade e generosidade demonstradas ao longo destes anos de trabalho. Meus sinceros agradecimentos.

À Professora Adelir Aparecida Saczk (Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica-UFLA), pela carta de aceite para cursar mestrado na Universidade Federal de Lavras.

Ao Professor Vicente Paulo Campos, pela disponibilidade e contribuições dadas durante o trabalho.

Ao William César Terra (Pós-Doutorando/DFP), pela amizade, apoio e disponibilidade em ajudar e acompanhar passo a passo a realização do trabalho. Sua contribuição é imensurável. Vai o meu muito obrigado.

Aos meus familiares, em especial ao Mário J. Pacule, por acreditarem e apoiarem minhas escolhas, pela força e amor incondicional.

Em especial à minha esposa Cris, pelo amor, carinho, compressão e paciência. A vida sem você não seria igual. Amo muito você!

À minha filha Lya, que a dedicação e empenho por este trabalho sirvam de estímulo para sempre fazer e fazer melhor.

Meus agradecimentos se estendem a todos os professores do DQI, por proporcionarem ambiente de trabalho de tranquilidade. Aprendi muito com vocês.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Produtos Naturais: Abraão José Silva Viana e Javier Andres Vanegas Garcias, Paula Alves, Dayane T. Lopes, Aline F. Silva, Jessica Fonseca, pelo tempo de amizade e diversão, apoio e conforto em momentos difíceis. Vai a minha maior gratidão.

Uma menção especial ao Sarmento Mazivila, pelo apoio e incentivo durante a redação do projeto para candidatura à bolsa. É sempre bom ter pessoas como você por perto. Muito grato amigo!

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

A todos que, embora não mencionados, de alguma forma contribuíram para o êxito deste trabalho.

MUITO OBRIGADO!

“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo.” (Martin Luther King Jr.)

RESUMO

Os nematoides parasitas de plantas estão entre os fitopatógenos que mais danos causam a diversas culturas de importância econômica. Dentre esses fitopatógenos se destaca *Meloidogyne incognita*, que apresenta ampla distribuição e elevada capacidade de adaptação a diferentes agroecossistemas. Esta espécie causa prejuízos, por exemplo, para a produção de tomate, que é uma das culturas de grande importância econômica e das mais consumidas. O principal método de controle de *M. incognita* diz respeito ao uso de nematicidas químicos, que podem apresentar elevadas toxicidades contra organismos não alvos. Em decorrência, observa-se crescente demanda por novos produtos, o que talvez possa ser satisfeito com o uso de compostos orgânicos voláteis (COVs), que podem ser empregados diretamente como nematicidas ou como modelos para o desenvolvimento de novas moléculas mais ativas contra os nematoides. Conseqüentemente, neste trabalho se objetivou investigar, através de testes *in vitro* e *in vivo*, os efeitos nematicidas de 31 COVs sobre *M. incognita*. Além disso, também se buscou identificar através de estudo *in silico*, o alvo enzimático do COV mais ativo contra o nematoide. Dentre os COVs estudados, selecionou-se a (*R*)-carvona, que apresentou concentração letal para 50 % (CL₅₀) dos juvenis do segundo estágio (J2) de *M. incognita*, *in vitro*, igual a 525 ± 20 µg/mL. Nas mesmas condições, os nematicidas comerciais carbofurano e fluensulfona apresentaram CL₅₀ iguais a 171,5 ± 3,8 µg/mL e 34,3 ± 6,6 µg/mL, respectivamente. A (*R*)-carvona também foi ativa contra ovos do nematoide *in vitro* e, quando utilizada como fumigante em experimento com substrato inoculado com ovos do nematoide, reduziu em 100% o número de galhas e de ovos do nematoide em tomateiros cultivados em tal substrato. Segundo estudo *in silico*, a (*R*)-carvona atua contra *M. incognita* através de inibição da acetilcolinesterase (AChE), que é uma enzima vital para o nematoide, atuando na hidrólise da acetilcolina. Como pré-estudo visando a obtenção de estruturas químicas mais ativas do que a (*R*)-carvona, identificou-se três substâncias com mais afinidades pela enzima, e que, em decorrência, deverão ser mais ativas contra o nematoide do que a (*R*)-carvona. Concluindo, a (*R*)-carvona se mostrou potencialmente útil para uso como nematicida fumigante e para emprego como modelo no desenvolvimento de estruturas químicas mais ativas contra o nematoide, principalmente pelo emprego da acetilcolinesterase para as modelagens de tais estruturas químicas.

Palavras-chave: *Meloidogyne incognita*. Nematicidas. (*R*)-carvona. Acetilcolinesterase.

ABSTRACT

Plant parasitic nematodes are among the phytopathogens that cause the great damage to several economically important crops. Among these phytopathogens, *Meloidogyne incognita* stands out for being found all over the world and have a broad adaptation capacity to different agroecosystems. This species causes losses in many crops such as tomatoes, which is one of the economically important and most consumed crops. The main method of controlling *M. incognita* concerns the use of chemical nematicides which can present high toxicities to non-target organisms. Hence, there is an increasing demand for new products which may be satisfied with the use of volatile organic compounds (VOCs), which can be used as nematicides or as models for the development of new molecules more active against nematodes. Consequently, this work aimed to investigate *in vitro* and *in vivo* the nematicidal activity of 31 VOCs on *M. incognita*. In addition, was investigated *in silico* the most active VOC enzyme target in nematode. Among the studied VOCs (*R*)-carvone was most active, and was found that the lethal concentration for 50% (LC₅₀) on second stage juveniles (J2) of *M. incognita in vitro* was 525 ± 20 µg/mL. Under the same conditions, the commercial nematicides carbofuran and fluensulfone showed LC₅₀ equal to 171.5 ± 3.8 µg/mL and 34.3 ± 6.6 µg/mL, respectively. Moreover, the (*R*)-carvone was active against nematode eggs *in vitro*. When was used as a fumigant in experiment with substrate inoculated with nematode eggs, reduced by 100% the number of galls and eggs of nematodes in tomato plants grown on such substrate. Therefore, the *in silico* study resulted in acetylcholinesterase (AChE) as the target enzyme of (*R*)-carvone, which is an important enzyme to the nematode, acting on the hydrolysis of acetylcholine. Furthermore, was searched some chemical structures that should be more active in inhibiting the AChE enzyme than (*R*)-carvone, therefore three substances showed more affinities for the enzyme than (*R*)-carvone. In conclusion, (*R*)-carvone proved to be potentially useful for use as a fumigant nematicide and for use as a model in the development of chemical structures more active against the nematode, mainly by the use of acetylcholinesterase for the modeling of such chemical structures.

Keywords: *Meloidogyne incognita*. Nematicides. (*R*)-carvona. Acetylcholinesterase.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

- Figura 1 - Estruturas químicas dos nematocidas comerciais carbofurano, aldicarbe e fostiazato.
.....22

SEGUNDA PARTE

- Figura 1 - Estruturas químicas, nomes, fabricantes e purezas dos compostos orgânicos voláteis (COVs) empregados no presente estudo.....33
- Figura 2 - Estruturas químicas de inibidores de acetilcolinesterases utilizados no presente estudo in silico.....44
- Figura 3 - Estruturas análogas a (R)-carvona, selecionadas através de busca farmacofórica no banco de dados ZINC 15 (STERLING; IRWIN, 2015). Nome e código (entre parênteses).....46
- Figura 4 - A) Estruturas tridimensionais das acetilcolinesterases 1C2O, 1C2B e 1EEA, alinhadas pelo programa Lovoalign 18.320 (MARTÍNEZ; ANDREANI; MARTÍNEZ, 2007), e contendo a (R)-carvona (em azul) em cavidade na qual foi ancorada as cegas pelo programa QuickVina-W (HASSAN; ALHOSSARY; MU; KWOH, 2017). Imagem gerada pelo programa UCSF Chimera 1.13.1 (PETTERSEN; GODDARD; HUANG; COUCH et al., 2004). B) Representação bidimensional da (R)-carvona ancorada as cegas na acetilcolinesterase1C2O, pelo programa QuickVina-W. Imagem gerada pelo programa LigProt+ 2.1 (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 1995).....59
- Figura 5 - Afinidades da (R)-carvona (R-car), (R)-mentofurano (R-ment), (S)-mentofurano (S-ment), (R)-piperitona (R-pip), (S)-piperitona (S-pip), Fosfato de 2-metilfenol (4OJ), *N*-etil-*N*-(3-hidroxifenil)-*N,N*-dimetilamônio (EDR) e (2Z)-*N*-hidroxi-*N*-(vinil-2-ciclohex-3,5-die)-1-metilamônio (FP1) pelas acetilcolinesterases: A) 1C2O e 1C2B de *Electrophorus electricus* mais 4BC0 enzima produzida por outros organismos, com sequências de aminoácidos apresentando 95% de similaridade ou mais em relação a 1C2O e 1C2B; B) 1EEA de *E. electricus* mais 1AX9 e 2VQ6 enzimas produzidos por outros organismos, com sequências de aminoácidos apresentando 95% ou mais de similaridade em relação a 1EEA. Os valores foram calculados com o uso do programa QuickVina 2.1 (HANDOKO; OUYANG; SU; KWOH et al., 2012). As barras de erro correspondem ao desvio

- padrão. Colunas com as mesmas letras, em cada gráfico e com a mesma cor, não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$). 60
- Figura 6 - Estrutura tridimensional do inibidor N-etil-N-(3-hidroxifenil)-N,N-dimetilamônio (EDR) ancorada (amarelo) pelo programa QuickVina 2.1 (HANDOKO; OUYANG; SU; KWOH et al., 2012) na acetilcolinesterase 1AX9 (RAVELLI; RAVES; REN; BOURGEOIS et al., 1998) e experimentalmente complexada (vermelho) com a mesma enzima. Imagem gerada pelo programa UCSF Chimera 1.13.1 (PETTERSEN; GODDARD; HUANG; COUCH et al., 2004)..... 61
- Figura 7 - Afinidades da (R)-carvona (R-car), 5-etil-ciclohexan-1,3-diona (ADAA-e), 5-(propan-2-il)-ciclohexan-1,3-diona (ADAA-i), 5-propil-ciclohexan-1,3-diona (ADAA-p), (1Z,5Z) 1,5-dimetilciclooctan-1,5-dieno (AGAA), (5R)-5-metil-2-(propan-2-il)-ciclohexa-1,3-dien-1-ol (AGAB-r), (5S)-5-metil-2-(propan-2-il)-ciclohexa-1,3-dien-1-ol (AGAB-s), (4aS,5R)-8-metil-2-oxo-5-(propan-2-il)-3,4,5,6-tetraidronaftalen-4a(2H)-carbonitrilo (BGAA), (2E)-2-(2-metil-5-(peop-1-en-2il) ciclohex-2-en-1-ilideno) diidrazinocarboxilato de metila (BFAA) e (2E)-2-(2-metil-5-(propan-2-il)-ciclohexen-2-en-1-ilideno) hidrazinocarbotiamida (BEEA), pelas acetilcolinesterases: A) 1C2O e 1C2B de *Electrophorus electricus* mais 4BC0, enzima produzida por outros organismos, com sequências de aminoácidos apresentando 95% de similaridade ou mais em relação a 1C2O e 1C2B; B) 1EEA de *E. electricus* mais 1AX9 e 2VQ6 enzimas produzidos por outros organismos, com sequências de aminoácidos apresentando 95% ou mais de similaridade em relação a 1EEA. Os valores foram calculados com o uso do programa QuickVina 2.1 (HANDOKO; OUYANG; SU; KWOH et al., 2012). As barras de erro correspondem ao desvio padrão. Colunas com as mesmas letras, em cada gráfico, não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$). 63
- Figura 8 - Estruturas tridimensionais das conformações mais estáveis da (R)-carvona calculadas pelo programa MOPAC 2016 (STEWART, 2016). Imagens geradas pelo programa VMD 1.9.3 (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996)..... 69

| | |
|--|----|
| Figuras 9a e 9b - Estruturas bidimensionais (2D) da (a) (R)-carvona ancorada na enzima 1C2B e (b) (R)-carvona ancorada na enzima 1C2O. O ancoramento foi feito usando o programa QuickVina 2.1 (HANDOKO; OUYANG; SU; KWOH et al., 2012). As imagens foram geradas pelo programa LigPlot+ 2.1 (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 1995)..... | 72 |
| Figura 10 - Estrutura bidimensional (2D) do (R)-mentofurano ancorado na enzima 1C2O. O ancoramento foi feito usando o programa QuickVina 2.1 (HANDOKO; OUYANG; SU; KWOH <i>et al.</i> , 2012). As imagens foram geradas pelo programa LigPlot+ 2.1 (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 1995)..... | 72 |

LISTA DE TABELAS

PRIMEIRA PARTE

| | | |
|------------|---|----|
| Tabela 1 - | Óleos essenciais estudados e seus componentes majoritários ativos contra nematoides. | 24 |
|------------|---|----|

SEGUNDA PARTE

| | | |
|------------|---|----|
| Tabela 1 - | Efeito in vitro de soluções de compostos orgânicos voláteis (500 µg/mL) sobre a mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne incognita</i> . Carbofurano e fluensulfona a 170 e 42,2 µg/mL, respectivamente, foram usados como controles positivos, enquanto Tween 80® a 0,02 g /mL, contendo DMSO a 1,5% (v/v), foi usado como controle negativo..... | 48 |
| Tabela 2 - | Efeito da combinação de compostos orgânicos voláteis sobre a mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne incognita</i> . Carbofurano e fluensulfona a 170 e 42,2 µg/mL, respectivamente, foram usados como controles positivos, enquanto Tween 80® a 0,02 g /mL, contendo DMSO a 1,5% (v/v) foi usado como controle negativo..... | 49 |
| Tabela 3 - | Efeito de combinação da fluensulfona à (R)-carvona e decan-2-ona sobre a mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne incognita</i> . Carbofurano foi usado como controle positivo, enquanto Tween 80® foi usado como controle negativo..... | 51 |
| Tabela 4 - | Efeito in vitro de soluções da (R)-carvona (750 e 1000 µg/mL) sobre a eclosão de juvenis de segundo estágio de <i>Meloidogyne incognita</i> , após 48 horas de exposição dos ovos do nematoide..... | 51 |
| Tabela 5 - | Efeito de soluções da (R)-carvona (1250 e 2500 µg/mL) sobre o parasitismo de <i>Meloidogyne incognita</i> em tomateiros inoculados com juvenis do segundo estágio do nematoide. Carbofurano e fluensulfona foram usados como controles positivos, enquanto água e solução de Tween 80 foram empregados como controles negativos..... | 53 |
| Tabela 6 - | Efeito da exposição de ovos de <i>Meloidogyne incognita</i> à soluções da (R)-carvona (750 e 100 µg/mL) sobre o parasitismo de <i>M. incognita</i> em tomateiro, mediante tratamento prévio dos ovos com a substância. Carbofurano e fluensulfona foram usados como controles positivos, enquanto água e solução de Tween 80 foram empregados como controles negativos..... | 54 |

| | | |
|-------------|--|----|
| Tabela 7 - | Efeito da (R)-carvona aplicada ao substrato (fumigação) sobre o parasitismo de <i>Meloidogyne incognita</i> em tomateiro inoculado com ovos do nematoide. | 55 |
| Tabela 8 - | Distribuição de Boltzman e energias das conformações da (R)-carvona, calculadas usando o programa Mopac 2016. | 55 |
| Tabela 9 - | Resultados da busca farmacofórica feita com as conformações mais estáveis da (R)-carvona no banco de dados do Ligand Expo. | 56 |
| Tabela 10 - | Sissimilaridade (%), calculada pelo Ugene 1.32.0, que considerou os gaps, após alinhamento com o Clustal Omega 1.2.1. | 57 |
| Tabela 11 - | Similaridade (%), calculada pelo Ugene 1.32.0, que considerou os Gaps. O cálculo feito após alinhamento com o Clustal Omega 1.2.1, através de 10 iterações. | 58 |

SUMÁRIO

| | |
|-----------------------|--|
| PRIMEIRA PARTE | |
| 1 | INTRODUÇÃO 18 |
| 1.1 | Objetivos..... 19 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO 20 |
| 2.1 | <i>Meloidogyne</i> spp..... 20 |
| 2.2 | Métodos de controle de <i>M. incognita</i> 21 |
| 2.3 | Compostos orgânicos voláteis (COVs)..... 22 |
| | REFERÊNCIAS 25 |
| | SEGUNDA PARTE – ARTIGO* 27 |
| | ARTIGO 1 - SELEÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS COM AÇÃO NEMATICIDA SOBRE <i>Meloidogyne incognita</i> 28 |
| 1 | INTRODUÇÃO 30 |
| 1.1 | Objetivos..... 31 |
| 2 | MATERIAL E METÓDOS 32 |
| 2.1 | Compostos orgânicos voláteis (COVs) estudados..... 32 |
| 2.2 | Obtenção do inóculo de <i>M. incognita</i>..... 33 |
| 2.3 | Efeito <i>in vitro</i> de soluções dos COVs sobre a mortalidade de J2 de <i>M. incognita</i>..... 34 |
| 2.4 | Efeito sinérgico dos COVs sobre a mortalidade de J2 de <i>M. incognita</i> 35 |
| 2.5 | Efeito sinérgico dos COVs com a fluensulfona sobre a mortalidade de J2 de <i>M. incognita</i> 36 |
| 2.6 | Efeito <i>in vitro</i> de solução da (<i>R</i>)-carvona sobre a eclosão de J2 de <i>M. incognita</i> 36 |
| 2.7 | Efeito de solução da (<i>R</i>)-carvona sobre o parasitismo de <i>M. incognita</i> em tomateiros, mediante tratamento prévio do inóculo (J2) com a substância..... 37 |
| 2.8 | Efeito da (<i>R</i>)-carvona sobre o parasitismo de <i>M. incognita</i> em tomateiros, mediante tratamento prévio do inóculo (ovos) com a substância 38 |
| 2.9 | Efeito da (<i>R</i>)-carvona aplicada em substrato sobre o parasitismo de <i>M. incognita</i> em tomateiros..... 39 |
| 2.10 | Análise estatística 39 |
| 2.11 | Estudo <i>in silico</i> 40 |
| 2.11.1 | Conformações mais estáveis da (<i>R</i>)-carvona..... 40 |
| 2.11.2 | Seleção de enzimas potencialmente inibidas pela (<i>R</i>)-carvona através de busca farmacofórica no Ligand Expo 41 |

| | | |
|--------|---|----|
| 2.11.3 | Seleção de enzimas potencialmente inibidas pela (R)-carvona através de busca no BRENDA | 41 |
| 2.11.4 | Comparação das acetilcolinesterases produzidas por <i>M. incognita</i> com aquelas produzidas por <i>E. electricus</i> | 42 |
| 2.11.5 | Identificação do sítio de ligação das acetilcolinesterases de <i>E. electricus</i> | 42 |
| 2.11.6 | Ancoramento (<i>docking</i>) no sítio de ligação..... | 43 |
| 2.11.7 | Seleção de análogos da (R)-carvona com maiores afinidades pelas acetilcolinesterases..... | 45 |
| 3 | RESULTADOS | 47 |
| 3.1 | Efeito <i>in vitro</i> de soluções dos COVs sobre a mortalidade de J2 de <i>M. incognita</i> | 47 |
| 3.2 | Efeito sinérgico dos COVs sobre a mortalidade de J2 de <i>M. incognita</i> | 49 |
| 3.3 | Efeito sinérgico dos COVs com a fluensulfona sobre a mortalidade de J2 de <i>M. incognita</i> | 50 |
| 3.4 | Efeito <i>in vitro</i> de solução da (R)-carvona sobre a eclosão de J2 de <i>M. incognita</i> | 51 |
| 3.5 | Efeito de solução da (R)-carvona sobre o parasitismo de <i>M. incognita</i> em tomateiros, mediante tratamento prévio do inóculo (J2) com a substância..... | 52 |
| 3.6 | Efeito da (R)-carvona sobre o parasitismo de <i>M. incognita</i> em tomateiros, mediante tratamento prévio do inóculo (ovos) com a substância | 53 |
| 3.7 | Efeito da (R)-carvona aplicada em substrato sobre o parasitismo de <i>M. incognita</i> em tomateiros..... | 54 |
| 3.8 | Estudo <i>in silico</i> | 55 |
| 3.8.1 | Conformações mais estáveis da (R)-carvona | 55 |
| 3.8.2 | Seleção de enzimas potencialmente inibidas pela (R)-carvona através de busca farmacofórica no Ligand Expo | 55 |
| 3.8.3 | Seleção de enzimas potencialmente inibidas pela (R)-carvona através de busca no BRENDA | 56 |
| 3.8.4 | Comparação das acetilcolinesterases produzidas por <i>M. incognita</i> com aquelas produzidas por <i>E. electricus</i> | 57 |
| 3.8.5 | Identificação do sítio de ligação das acetilcolinesterases de <i>E. electricus</i> | 58 |
| 3.8.6 | Ancoramento (<i>docking</i>) no sítio de ligação..... | 60 |
| 3.8.7 | Seleção de análogos da (R)-carvona com maiores afinidades pelas acetilcolinesterases..... | 61 |

| | | |
|----------|--------------------------|-----------|
| 4 | DISCUSSÃO | 64 |
| 5 | CONCLUSÃO | 75 |
| | REFERÊNCIAS | 76 |

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Estima-se que a população mundial alcançará 9 bilhões e 11 bilhões de pessoas em 2050 e 2100, respectivamente (CALICIOGLU; FLAMMINI; BRACCO; BELLU et al., 2019; UNITED, 2019). Tal estimativa constitui enorme desafio para a agricultura, que precisa produzir alimentos suficientes e de qualidade para fazer face à demanda (JESCHKE, 2016). Um dos maiores problemas na produção agrícola atual está relacionado com as perdas de vastas áreas de cultivo devido ao ataque pelos fitoparasitas, como é o caso dos nematoides parasitas de plantas - NPPs (KIM et al., 2018). No mundo, estes animais são responsáveis por perdas em torno de US\$ 150 bilhões/ano, o que corresponde a 12% da produção agrícola mundial (FERRAZ; BROWN, 2016; JIANG et al., 2018; LI; JI; LI, 2015; NASIOU; GIANNAKOU, 2017). Dentre os vários NPPs se encontram aqueles do gênero *Meloidogyne*, que são responsáveis por aproximadamente 50% das perdas atribuídas aos nematoides (NICOL et al., 2011).

Alguns métodos usados para o controle de NPPs apresentam baixa eficiência, enquanto outros apresentam elevada toxicidade para organismos não alvo. Este é o caso, por exemplo, de nematicidas como o carbofurano (*N*-metilcarbamato de 2,2-dimetil-2,3-diidro-1-benzofuran-7-ila), aldicarbe (*O*-(*N*-metilcarbamoil)oxima do 2-(metiltio)propanal) e fostiazato (3-[butan-2-ilsulfanil(etoxi)fosforil]-1,3-tiazolidin-2-ona) (FERRAZ; BROWN, 2016), que foram banidos do mercado devido a seus efeitos indesejados prejudiciais ao homem e ao ambiente de modo geral. Portanto, há uma elevada demanda por novos produtos e/ou métodos de controle de NPPs que sejam eficientes, menos onerosos e com menos efeitos colaterais para o homem e o meio ambiente (ROCHA et al., 2017).

Dentre as culturas mais afetadas pelos NPPs se encontram o tomate (*Solanum lycopersicum* L.), a batata (*Solanum tuberosum* L.), a soja (*Glycine max* (L.) Merr.), o café (*Coffea arabica* L.), a cenoura (*Daucus carota* L.), o algodão (*Gossypium hirsutum* L.), o amendoim (*Arachis hypogaea* L.), dentre outras (ABDEL-RAHMAN; ALANIZ; SALEH, 2013; FERRAZ; FREITAS; LOPES; DIAS-ARIEIRA, 2010).

No caso específico da cultura do tomate, os nematoides do gênero *Meloidogyne* são responsáveis por perdas em torno de 42-45% (NONO-WOMDIM et al., 2002; OZDEMIR; GOZEL, 2018). Grande parte de tais perdas são causadas por nematoides do gênero

Meloidogyne, dentre os quais se destacam *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood e *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood (BELAN et al., 2009).

Dentre as possibilidades para o desenvolvimento de novos produtos para o controle de *M. incognita* em tomateiros, se encontram os compostos orgânicos voláteis (COVs), que têm atraído os interesses de pesquisadores de diversas áreas e diferentes linhas de pesquisa. Há vários trabalhos científicos relatando resultados promissores para o uso de COVs no desenvolvimento de produtos para o controle de fitonematoides (AISSANI; URGEGHE; OPLOS; SABA et al., 2015; CAMPOS; DE PINHO; FREIRE, 2010; JARDIM et al., 2018; KIM; SEO; PARK, 2011; NTALLI et al., 2010). Para exemplificar, no trabalho realizado por Ntalli et al. (2010) se observou que o carvacrol aumentou a mortalidade e diminuiu a eclosão de juvenis do segundo estágio (J2) de *M. incognita*. De acordo com Echeverrigaray et al. (2010), também se observa potencial para o uso de limoneno, α -pineno e mirceno, que causaram diminuição na eclosão e aumento na mortalidade de J2 de *M. incognita*.

1.1 Objetivos

Considerando-se as perdas causadas por *M. incognita* para a produção de tomate, e a necessidade de desenvolvimento de novos produtos para o controle de NPPs em geral, o presente trabalho tem como objetivo geral selecionar composto orgânico voláteis para o desenvolvimento de produtos para o controle de *M. incognita* em tomateiros.

Os objetivos específicos são: (i) avaliar as influências *in vitro* dos COVs selecionados sobre a mortalidade de J2 de *M. incognita*; (ii) averiguar a existência de efeitos sinérgicos entre COVs ativos contra *M. incognita* e entre COVs e fluensulfona; (iii) verificar os efeitos dos COVs selecionados em “i” e “ii” sobre o parasitismo de *M. incognita* em tomateiros cultivados em substrato contendo ovos e J2 do nematoide; (iv) identificar *in silico* o alvo proteico do COV mais ativo contra *M. incognita* de acordo com os testes realizados e; (v) propor, através de estudo *in silico*, análogos do COV selecionado, mais ativos contra o nematoide.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Meloidogyne* spp.

Os nematoides constituem cerca de 26.546 espécies descritas (HUGOT; BAUJARD; MORAND, 2001) e há estimativas de que o número total possa chegar à casa dos milhões (DE LEY, 2000). Dentre tais organismos se encontram aquelas espécies que atacam as plantas e são chamadas de nematoides parasitas de plantas-NPPs ou fitonematoides (FERRAZ; BROWN, 2016). Os NPPs têm distribuição mundial, com maior destaque para as regiões tropicais e subtropicais (KIM et al., 2018). Dentre estes fitopatógenos se destacam os nematoides formadores das galhas radiculares, que são aqueles pertencentes ao gênero *Meloidogyne*.

Os desenvolvimentos dos nematoides das galhas compreendem quatro etapas, que começam com o desenvolvimento embrionário no ovo, o que resulta na formação do juvenil do primeiro estágio (J1). Este, passa por uma ecdise, que origina o juvenil do segundo estágio (J2), que eclode do ovo e migra pelo solo a procura da raiz da planta hospedeira, na qual penetra e inicia a sua atividade parasitária. O J2 passa por mais duas ecdises, formando os juvenis de terceiro e quarto estádios (J3 e J4, respectivamente). Adicionalmente, o J4 sofre a última ecdise, dando origem à forma adulta. Este ciclo demora entre de duas a quatro semanas (FERRAZ; BROWN, 2016).

Os nematoides das galhas são, em geral, os de maior importância econômica e mais prejudiciais para a agricultura, pois possuem vasto número de plantas hospedeiras e grande capacidade de adaptação aos diversos agroecossistemas. Além disso, quando em condições favoráveis de temperatura e umidade, reproduzem-se durante o ano todo. Quando o clima é desfavorável (frio intenso ou seca) para a sua reprodução, entram em estado de vida latente (BARKER; PEDERSON; WINDHAM, 1998; KHAN, 2012). Consequentemente, *Meloidogyne* spp. apresentam ampla distribuição geográfica e é difícil o estabelecimento de métodos eficientes para o controle desses parasitas.

2.2 Métodos de controle de *M. incognita*

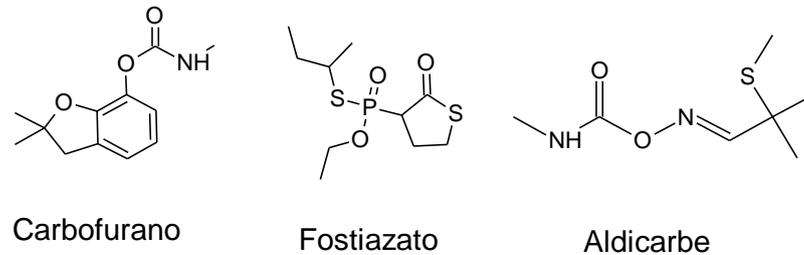
A adoção de medidas fitossanitárias que incluem limpeza de equipamentos, uso de material de plantio sadio (isento de nematoides) e procedimentos quarentenários, constituem o princípio mais importante e a melhor linha de defesa para o controle de nematoides. No caso em que tenha ocorrido a infestação, outros métodos de controle de nematoides deverão ser usados, dentre os quais se pode citar o controle cultural, que engloba o plantio de espécies vegetais antagônicas ao nematoide (plantas armadilhas). Estas podem atuar, por exemplo, produzindo metabólitos tóxicos aos nematoides e liberando-os no solo. O plantio de cultivares tolerantes (culturas capazes de superar ou sobrepor aos danos causados pelo ataque por nematoide) e o plantio de cultivares resistentes, estão entre as técnicas que podem ser usadas. Também é possível utilizar espécies vegetais não hospedeiras do nematoide para a realização de rotação de culturas, o que pode interromper o ciclo de multiplicação do nematoide (FERRAZ; BROWN, 2016).

Outra possibilidade para o controle de fitonematoides diz respeito ao emprego de agentes biológicos, como é o caso de microrganismos. De modo geral, são usados fungos e bactérias predadores de ovos e de juvenis de nematoides. Os fungos podem usar seus micélios como armadilhas para os nematoides ou produzir metabólitos com atividade nematicida. Para exemplificar, pode-se citar o trabalho realizado por Hahn (HAHN et al., 2019), que observaram inibição da eclosão e 88% de mortalidade de J2 de *M. javanica* exposto ao filtrado do cogumelo (fungo) *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. Há também, o trabalho realizado por Oliveira (OLIVEIRA et al., 2014) que relatam o uso das bactérias *Bacillus cereus* Frankland & Frankland e *Bacillus subtilis* (Ehrensberg) Cohn para o controle de *Meloidogyne exigua* Goeldi.

Apesar dos métodos acima mencionados (neste item) apresentarem baixo impacto ambiental e, de modo geral, terem baixo efeito sobre organismos não alvo, a tendência mundial ainda continua sendo pelo emprego de nematicidas a base de produtos químicos que, em geral, se mostram mais eficientes para o controle de NPPs (JONES et al., 2017). Na sua grande maioria, são produtos que constituem perigo para o homem e para o ambiente devido as suas elevadas toxicidades para organismos não alvo. Em decorrência disto, vários produtos estão sendo retirados do mercado de agrotóxicos. Para exemplificar é possível citar os seguintes: carbofurano, aldicarbe e fostiazato (FIGURA 1), dentre outros (FERRAZ;

BROWN, 2016). Em decorrência da eliminação de vários nematicidas químicos do mercado, tem-se observado o aumento da demanda por novos produtos para o controle eficiente de NPPs.

Figura 1 - Estruturas químicas dos nematicidas comerciais carbofurano, aldicarbe e fostiazato.



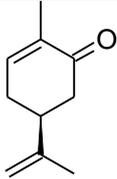
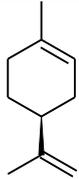
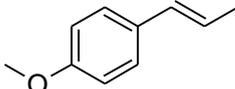
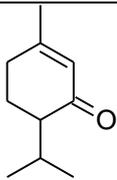
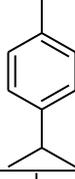
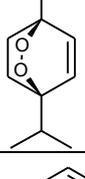
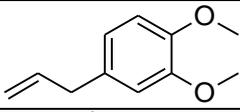
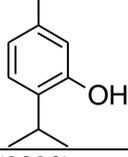
Fonte: Do autor (2020).

2.3 Compostos orgânicos voláteis (COVs)

Uma das possibilidades para atender a demanda por novos produtos para o controle de NPPs diz respeito ao uso de compostos orgânicos voláteis (COVs), que podem ser de origem natural (plantas, fungos etc.) ou sintética (CAMPOS; DE PINHO; FREIRE, 2010). Os COVs produzidos por plantas são geralmente componentes de óleos essenciais, com até 20 átomos de carbono e característica lipofílica. Além disto, possuem alta pressão de vapor. Nos últimos anos cresceu significativamente o estudo sobre COVs para o controle de fitopatógenos, dentre vários estudos realizados, pode-se citar o trabalho realizado por Terra et al. (2018), que observaram aumento da mortalidade e redução da eclosão de J2 de *M. incognita* quando se empregaram o acetato de etila, acetato de *iso*-butila, acetato de *iso*-pentila e acetato de 2-metilbutila, que se tratam de COVs produzidos por *Fusarium oxysporum* Schlechtend. Outro exemplo consiste no trabalho de Echeverrigaray et al. (2010), que empregaram limoneno, α -pineno e mirceno, para a redução da eclosão e aumento da mortalidade de J2 de *M. incognita*. Também se pode citar o trabalho de Bai et al. (2011), que observaram o aumento da mortalidade do J2 de *M. incognita*, quando tratado com o óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* L. a 49,55 $\mu\text{g/mL}$. Trabalhos similares foram realizados por Oka et al. (2000), com óleos essenciais de várias espécies vegetais, dentre as quais cabe citar *Carum carvi* L., *Foeniculum vulgare* (Mill.) Batt. & Trab. e *Mentha rotundifolia* L., que aumentaram a

mortalidade de J2 de *M. javanica* e reduziram a sua eclosão. Também vale mencionar o aumento da mortalidade de J2 de *M. incognita* e redução da sua eclosão, quando os óleos essenciais de *Ocimum sanctum* L. e *Thymus vulgaris* L. (ELOH et al., 2019) foram utilizados (TABELA 1). Para além disso, há relataos de atividades nematocidas resultantes da combinação entre compostos orgânicos voláteis (OKA et al., 2000).

Tabela 1 - Óleos essenciais estudados e seus componentes majoritários ativos contra nematoides.

| Espécie vegetal | Componente majoritário do óleo essencial | Estruturas químicas | Referências |
|--|--|--|------------------------------|
| <i>Carum carvi</i> L. (Hortelã) | (S)-carvona |  | OKA et al. (2000) |
| | (S)-limoneno |  | ECHEVERRIGARAY et al. (2010) |
| <i>Foeniculum vulgare</i> (Mill.) Batt. & Trab. (Funcho) | Trans-anetol |  | OKA et al. (2000) |
| <i>Mentha rotundifolia</i> L. (Hortelã-verde) | Piperitona |  | OKA et al. (2000) |
| <i>Chenopodium ambrosioides</i> L. (Erva de Santa Maria) | p-cimeno |  | BAI et al. (2011) |
| | Ascaridol |  | BAI et al. (2011) |
| <i>Ocimum sanctum</i> L. (Manjeriçao santo) | Eugenol metil éter |  | ELOH et al. (2019) |
| <i>Thymus vulgaris</i> L. (Tomilho) | Timol |  | ELOH et al. (2019) |

Fonte: Do autor (2020).

REFERÊNCIAS

ABDEL-RAHMAN, F. H.; ALANIZ, N. M.; SALEH, M. A. Nematicidal activity of terpenoids. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 48, n. 1, p. 16-22, 2013.

AISSANI, N.; URGEGHE, P. P.; OPLOS, C.; SABA, M. *et al.* Nematicidal Activity of the Volatilome of *Eruca sativa* on *Meloidogyne incognita*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 27, p. 6120-6125, 2015.

BARKER, K. R.; PEDERSON, G. A.; WINDHAM, G. L. **Plant and nematode interactions**. ASA, CSSA. SSA Publishers, Madison, WI 1998.

BELAN, L. L.; FONSECA, S. O.; JESUS, J.; MATTA, F. D. P. *et al.* Screening of cherry tomato genotypes for resistance to *Meloidogyne incognita* and *M. javanica*. **Nematologia Brasileira**, v. 33, n. 3, p. 256-259, 2009.

CALICIOGLU, O.; FLAMMINI, A.; BRACCO, S.; BELLU, L. *et al.* The Future Challenges of Food and Agriculture: An Integrated Analysis of Trends and Solutions. **Sustainability**, v. 11, n. 1, jan. 2019.

CAMPOS, V. P.; DE PINHO, R. S. C.; FREIRE, E. S. VOLATILES PRODUCED BY INTERACTING MICROORGANISMS POTENTIALLY USEFUL FOR THE CONTROL OF PLANT PATHOGENS. **Ciencia E Agrotecnologia**, v. 34, n. 3, p. 525-535, may-jun. 2010.

DE LEY, P. Lost in worm space: phylogeny and morphology as road maps to nematode diversity. **Nematology**, v. 2, p. 9-16, 2000.

FERRAZ, L. C. C. B.; BROWN, D. J. F. **Nematologia de plantas: fundamentos e importância**. Manaus: Norma, 2016. 251 p.

FERRAZ, S.; FREITAS, L. G. D.; LOPES, E. A.; DIAS-ARIEIRA, C. R. **Manejo sustentável de fitonematoides**. Viçosa: UFV, 2010. 245 p.

HUGOT, J. P.; BAUJARD, P.; MORAND, S. Biodiversity in helminths and nematodes as a field of study: an overview. **Nematology**, v. 3, p. 199-208, 2001.

JARDIM, I. N.; OLIVEIRA, D. F.; SILVA, G. H.; CAMPOS, V. P. *et al.* (E)-cinnamaldehyde from the essential oil of *Cinnamomum cassia* controls *Meloidogyne incognita* in soybean plants. **Journal of Pest Science**, v. 91, n. 1, p. 479-487, 2018.

JESCHKE, P. Progress of modern agricultural chemistry and future prospects. **Pest Management Science**, v. 72, n. 3, p. 433-455, mar. 2016.

JIANG, C.; XIE, P.; XIE, Y.; CHEN, L. *et al.* Evaluation of root-knot nematode disease control and plant growth promotion potential biofertilizer Ning shield on *Trichosanthes kirilowii* in the field. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 232-239, 2018.

JONES, J. G.; KLECZEWSKI, N. M.; DESAEGER, J.; MEYER, S. L. F. et al. Evaluation of nematicides for southern root-knot nematode management in lima bean. **Crop Protection**, v. 96, p. 151-157, jun. 2017.

KHAN, M. W. **Nematode interactions**. Springer Science & Business Media, 2012. 9401114889.

KIM, J.; SEO, S. M.; PARK, I. K. Nematicidal activity of plant essential oils and components from *Gaultheria fragrantissima* and *Zanthoxylum alatum* against the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. **Nematology**, v. 13, n. 1, p. 87-93, 2011.

KIM, T. Y.; JANG, J. Y.; YU, N. H.; CHI, W. J. et al. Nematicidal activity of grammicin produced by *Xylaria grammica* KCTC 13121BP against *Meloidogyne incognita*. **Pest Management Science**, v. 74, n. 2, p. 384-391, 2018.

LI, Y. C.; JI, H.; LI, H. T. Gas chromatography-mass spectrometric analysis of nematicidal essential oil of *Valeriana amurensis* P Smirn ex Kom (Valerianaceae) roots and its activity against *Heterodera avenae*. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 9, p. 1673-1678, 2015.

NASIOU, E.; GIANNAKOU, I. O. The potential use of carvacrol for the control of *Meloidogyne javanica*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 149, n. 2, p. 415-424, 2017.

NICOL, J. M.; TURNER, S. J.; COYNE, D. L.; DEN NIJS, L. et al. Current nematode threats to world agriculture. In: **Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions**. Springer, 2011. p. 21-43.

NONO-WOMDIM, R.; SWAI, I. S.; MROSSO, L. K.; CHADHA, M. L. *et al.* Identification of root-knot nematode species occurring on tomatoes in Tanzania and resistant lines for their control. **Plant disease**, v. 86, n. 2, p. 127-130, 2002.

NTALLI, N. G.; FERRARI, F.; GIANNAKOU, I.; MENKISSOGLU-SPIROUDI, U. Phytochemistry and Nematicidal Activity of the Essential Oils from 8 Greek Lamiaceae Aromatic Plants and 13 Terpene Components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 13, p. 7856-7863, jul. 2010.

OZDEMIR, E.; GOZEL, U. Nematicidal activities of essential oils against *Meloidogyne incognita* on tomato plant. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 27, n. 6, p. 4511-4517, 2018.

ROCHA, T. L.; SOLL, C. B.; BOUGHTON, B. A.; SILVA, T. S. et al. Prospection and identification of nematotoxic compounds from *Canavalia ensiformis* seeds effective in the control of the root knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Biotechnology Research and Innovation**, 1, n. 1, p. 87-100, 2017.

UNITED, N. **World population prospects**. 2019.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO*

ARTIGO 1 SELEÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS COM AÇÃO NEMATICIDA SOBRE *Meloidogyne incognita*

RESUMO

Os nematoides parasitas de plantas estão entre os fitopatógenos que mais danos causam a diversas culturas de importância econômica. Dentre esses fitopatógenos se destaca o *Meloidogyne incognita*, que apresenta ampla distribuição e elevada capacidade de adaptação a diferentes agroecossistemas. O principal método de controle de *M. incognita* diz respeito ao uso de nematicidas químicos, que podem apresentar elevadas toxicidades contra organismos não alvos. Em decorrência, observa-se crescente demanda por novos produtos, o que talvez possa ser satisfeito com o uso de compostos orgânicos voláteis (COVs), que podem ser empregados diretamente como nematicidas ou como modelos para o desenvolvimento de novas moléculas mais ativas contra os nematoides. Consequentemente, neste trabalho se objetivou investigar, através de testes *in vitro* e *in vivo*, os efeitos nematicidas de 31 COVs sobre *M. incognita*. Além disso, também se buscou identificar através de estudo *in silico*, o alvo enzimático do COV mais ativo contra o nematoide. Dentre os COVs estudados, selecionou-se a (*R*)-carvona, que apresentou concentração letal para 50 % (CL₅₀) dos juvenis do segundo estágio (J2) de *M. incognita*, *in vitro*, igual a 525 ± 20 µg/mL. Nas mesmas condições, os nematicidas comerciais carbofurano e fluensulfona apresentaram CL₅₀ iguais a $171,5 \pm 3,8$ µg/mL e $34,3 \pm 6,6$ µg/mL, respectivamente. A (*R*)-carvona também foi ativa contra ovos do nematoide *in vitro* e, quando utilizada como fumigante em experimento com substrato inoculado com ovos do nematoide, reduziu em 100% o número de galhas e de ovos do nematoide em tomateiros cultivados em tal substrato. Segundo estudo *in silico*, a (*R*)-carvona atua contra *M. incognita* através de inibição da acetilcolinesterase (AChE), que é uma enzima vital para o nematoide, atuando na hidrólise da acetilcolina. Como pré-estudo visando à obtenção de estruturas químicas mais ativas do que a (*R*)-carvona, identificaram-se três substâncias com mais afinidades pela enzima e que, em decorrência, deverão ser mais ativas contra o nematoide do que a (*R*)-carvona. Concluindo, a (*R*)-carvona se mostrou potencialmente útil para uso como nematicida fumigante e para emprego como modelo no desenvolvimento de estruturas químicas mais ativas contra o nematoide, principalmente pelo emprego da acetilcolinesterase para as modelagens de tais estruturas químicas.

Palavras-chave: *Meloidogyne incognita*. Nematicidas. (*R*)-carvona. Acetilcolinesterase.

ABSTRACT

Plant parasitic nematodes are among the phytopathogens that cause the great damage to several economically important crops. Among these phytopathogens, *Meloidogyne incognita* stands out for being found all over the world and have a broad adaptation capacity to different agroecosystems. The main method of controlling *M. incognita* concerns the use of chemical nematicides that can present high toxicities to non-target organisms. Hence, there is an increasing demand for new products which may be satisfied with the use of volatile organic compounds (VOCs), which can be used as nematicides or as models for the development of new molecules more active against nematodes. Consequently, this work aimed to investigate *in vitro* and *in vivo* the nematicidal activity of 31 VOCs on *M. incognita*. In addition, was investigated *in silico* the most active VOC enzyme target in nematode. Among the studied VOCs (*R*)-carvone was most active, and was found that the lethal concentration for 50% (LC₅₀) on second stage juveniles (J2) of *M. incognita in vitro* was $525 \pm 20 \mu\text{g/mL}$. Under the same conditions, the commercial nematicides carbofuran and fluensulfone showed LC₅₀ equal to $171.5 \pm 3.8 \mu\text{g/mL}$ and $34.3 \pm 6.6 \mu\text{g/mL}$, respectively. Moreover, the (*R*)-carvone was active against nematode eggs *in vitro*. When was used as a fumigant in experiment with substrate inoculated with nematode eggs, reduced by 100% the number of galls and eggs of nematodes in tomato plants grown on such substrate. Therefore, the *in silico* study resulted in acetylcholinesterase (AChE) as the target enzyme of (*R*)-carvone, which is an important enzyme to the nematode, acting on the hydrolysis of acetylcholine. Furthermore, was searched some chemical structures that should be more active in inhibiting the AChE enzyme than (*R*)-carvone, therefore three substances showed more affinities for the enzyme than (*R*)-carvone. In conclusion, (*R*)-carvone proved to be potentially useful for use as a fumigant nematicide and for use as a model in the development of chemical structures more active against the nematode, mainly by the use of acetylcholinesterase for the modeling of such chemical structures.

Keywords: *Meloidogyne incognita*. Nematicides. (*R*)-carvona. Acetylcholinesterase.

1 INTRODUÇÃO

Os nematoides parasitas de plantas (NPPs) constituem uma classe de fitopatógenos de importância econômica destacável. Mais de 4100 espécies de NNPs são descritas (KYNDT; FERNANDEZ; GHEYSEN, 2014), dentre as quais as do gênero *Meloidogyne* lideram a lista dos NPPs de maior importância econômica (FERRAZ; BROWN, 2016; JONES et al., 2014; KIM et al., 2018; LI; JI; LI, 2015). Segundo dados da literatura, os NPPs causam perdas na economia mundial em torno de US\$ 150 bilhões/ano, o que corresponde a aproximadamente 12 % da produção agrícola. Acredita-se que mais da metade destas perdas é devido aos nematoides do gênero *Meloidogyne* (JANG et al., 2015), dentre os quais cabe destacar aqui *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood. Este nematoide está entre os mais destrutivos para várias culturas, pois apresenta mais de 2000 espécies de plantas como hospedeiros, curto período para a reprodução e a capacidade de favorecer o desenvolvimento de doenças nas plantas, causadas, por exemplo, por fungos (VOS et al., 2013; ZHAI et al., 2018).

O tomate está entre os vegetais mais importantes para o ser humano. A sua produção mundial representa 14% de todos os vegetais, o que corresponde a cerca US\$ 1,6 bilhão/ano (HANDOKO; OUYANG; SU; KWON et al., 2012; SEID et al., 2015). Este vegetal é um dos mais consumidos no mundo, tanto *in natura* quanto na forma industrializada (COSTA; DE OLIVEIRA; SENÔ, 2016; MARTÍ et al., 2018). No entanto, a sua produção é bastante afetada por pragas e doenças. Dentre os fitopatógenos, os mais associados à cultura de tomate são os nematoides do gênero *Meloidogyne* (NONO-WOMDIM et al., 2002), dentre os quais *M. incognita* e *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood são os mais danosos (BELAN et al., 2009), causando perdas em áreas infestadas em torno de 42-45% (OZDEMIR; GOZEL, 2018).

Dentre os métodos de controle de NPPs se destaca o uso de nematicidas químicos que, em decorrência de toxicidades a organismos não alvos, têm sido banidos do mercado (NASIOU; GIANNAKOU, 2017). Por decorrência disso, a busca por alternativas eficientes, menos onerosos e com menos efeitos colaterais sobre o homem e ambiente, tem sido foco de várias pesquisas. Dentre as possíveis alternativas se encontram os compostos orgânicos voláteis (COVs), que são moléculas com até 20 átomos de carbono, principalmente monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅) e diterpenos (C₂₀), sintetizados por plantas e outros

organismos, com potencial para uso direto ou como modelos, para o desenvolvimento de novos produtos para o controle de fitonematoides, que sejam menos agressivos ao homem e ao ambiente (CAMPOS; DE PINHO; FREIRE, 2010; OKA; SHUKER; TKACHI, 2012). Na literatura científica há várias publicações relatando as atividades nematicidas destas moléculas, porém tais estudos são mais limitados às condições de laboratório, ou seja, *in vitro*. Ensaio *in vitro* constituem um passo muito importante para a pesquisa, mas são necessários mais estudos *in vivo*. Além disto, muitos estudos são conduzidos com juvenis do segundo estágio (J2) do nematoide (FREIRE et al., 2012; JARDIM et al., 2018; TERRA et al., 2017; XU et al., 2015), enquanto a maior parte da população do nematoide no campo se encontra na forma de ovos (KARSSSEN; WESEMAEL; MOENS, 2013).

1.1 Objetivos

Considerando-se as perdas causadas por *M. incognita* para a produção de tomate e a necessidade de desenvolvimento de novos produtos para o controle de NPPs em geral, o presente trabalho teve como objetivo geral selecionar composto orgânico volátil para o desenvolvimento de produtos para o controle de *M. incognita* em tomateiros.

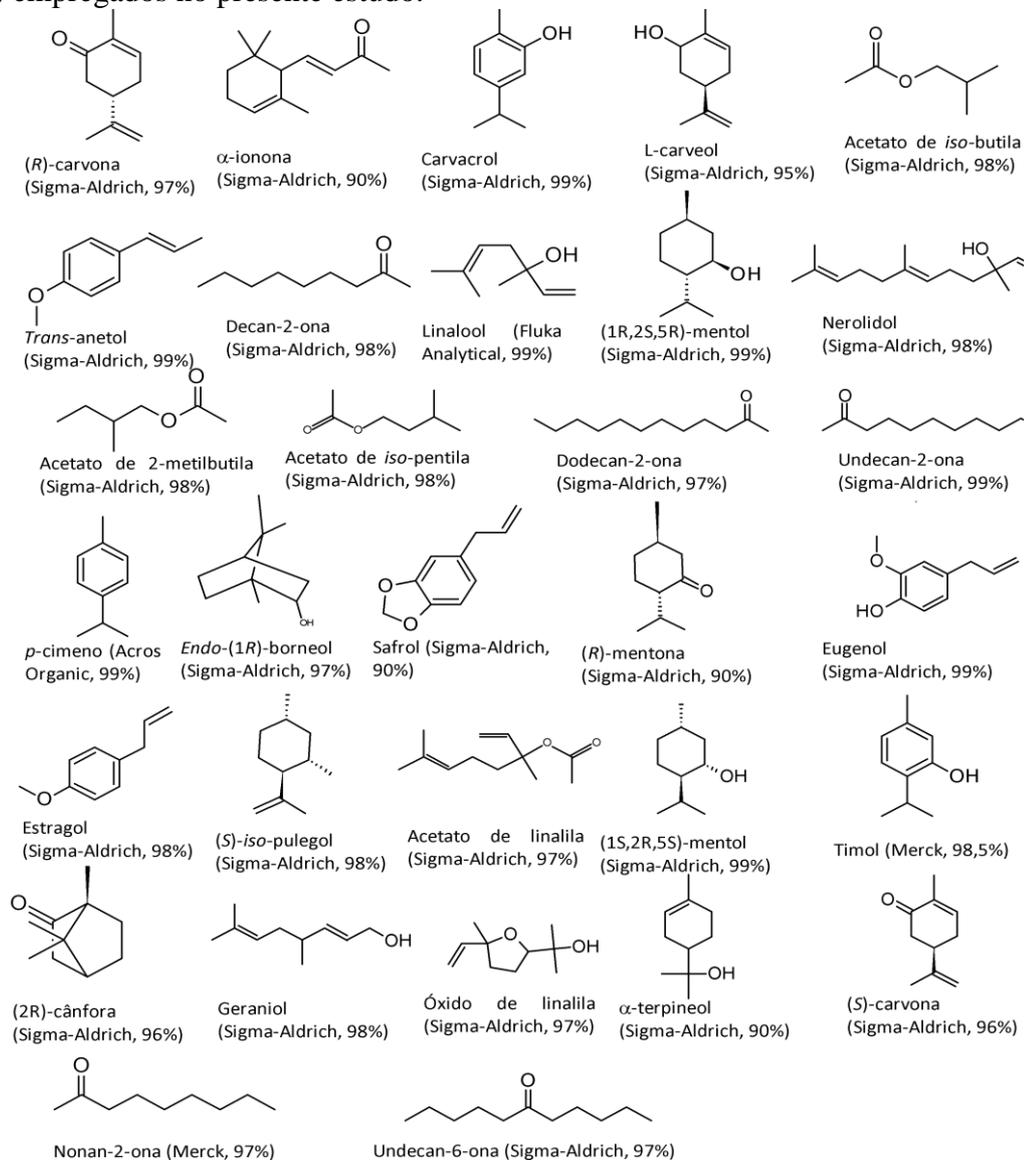
Os objetivos específicos foram: (i) avaliar as influências *in vitro* dos COVs selecionados sobre a mortalidade de J2 de *M. incognita*; (ii) averiguar a existência de efeitos sinérgicos entre COVs ativos contra *M. incognita* e entre COVs e fluensulfona; (iii) verificar os efeitos dos COVs selecionados em “i” e “ii” sobre o parasitismo de *M. incognita* em tomateiros cultivados em substrato contendo ovos e J2 do nematoide; (iv) identificar *in silico* o alvo proteico do COV mais ativo contra *M. incognita* de acordo com os testes realizados; (v) propor, através de estudo *in silico*, análogos do COV selecionado, mais ativos contra o nematoide.

2 MATERIAL E METÓDOS

2.1 Compostos orgânicos voláteis (COVs) estudados

Tendo como base uma série de artigos científicos (ABDEL-RAHMAN; ALANIZ; SALEH, 2013; ECHEVERRIGARAY; ZACARIA; BELTRAO, 2010; ELOH et al., 2019; GU et al., 2007; IBRAHIM; TRABOULSI; EL-HAJ, 2006; NASIOU; GIANNAKOU, 2017; NTALLI et al., 2011; OKA et al., 2000; TERRA et al., 2018), foram selecionadas 31 COVs (FIGURA 1), os quais foram escolhidos considerando estudos prévios sobre atividade nematicida, seus baixos índices de toxicidades e o seus custos no mercado. Todas as substâncias foram utilizadas conforme recebidas, sem qualquer tratamento adicional para purificação das mesmas.

Figura 1 - Estruturas químicas, nomes, fabricantes e purezas dos compostos orgânicos voláteis (COVs) empregados no presente estudo.



Fonte: Do autor (2020).

2.2 Obtenção do inóculo de *M. incognita*

Plantas de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. 'Santa Clara'), previamente infestadas com *M. incognita* e mantidas em vasos na casa de vegetação durante 60 dias, foram removidas do substrato e suas raízes foram lavadas em água da torneira. A extração dos ovos foi feita de acordo com o método descrito por Hussey e Barker (1973) que, de forma resumida, consistiu em cortar as raízes em pedaços de 2-3 cm, para que as mesmas fossem

trituras em liquidificador com 300 mL de solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 0,5% (g/mL) durante 1 min. Os ovos foram retidos em uma peneira de 500 mesh (25 µm de abertura segundo a American Society for Testing and Materials, ASTM) e imediatamente lavados com água. Parte dos ovos obtidos foi usada nos ensaios de eclosão *in vitro* e outra parte foi empregada na montagem de câmara de eclosão de J2. Apenas os J2 eclodidos após 48h foram usados para os ensaios.

2.3 Efeito *in vitro* de soluções dos COVs sobre a mortalidade de J2 de *M. incognita*

Os 31 COVs foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO), e as soluções obtidas (33333,3 µg/mL) foram diluídas com solução aquosa de Tween® 80 a 0,02 g/mL, até a concentração de 600 µg/mL. Parte (100 µL) de cada solução obtida foi colocada em microtubo com 20 µL de suspensão aquosa contendo aproximadamente 20 J2 de *M. incognita*. As concentrações finais de cada COV e do DMSO no microtubo foram iguais a 500 µg/mL e 1,5% (v/v), respectivamente. Os microtubos foram fechados, selados com rolopack e mantidos em BOD a 28 °C durante 48 h. O ensaio foi realizado com cinco repetições, em delineamento inteiramente casualizado (DIC), empregando os nematocidas carbofurano (*N*-metilcarbamato de 2,2-dimetil-2,3-diidro-1-benzofuran-7-ila, 98%, Sigma-Aldrich) a 170 µg/mL (concentração final no microtubo) e fluensulfona (Nimitz®, ADAMA) a 41,4 µg/mL (concentração final no microtubo) como controles positivos. Uma solução de Tween 80 a 0,02 g/mL, contendo DMSO a 1,5% (v/v; concentração final no microtubo; solução inerte ao nematoide, de acordo com os pré-testes realizados para conferir suas influências sobre o nematoide), foi empregada como controle negativo. Após 48 horas, os microtubos foram abertos e as suspensões foram transferidas para uma placa de polipropileno com 96 cavidades de aproximadamente 300 µL, com fundos chatos. Logo em seguida, 5 µL de solução de NaOH 1,0 mol/L, recém preparada, foi adicionada ao conteúdo de cada cavidade e se contaram os J2 durante período de até 1 min após a referida adição. Os J2 que não reagiram à solução de NaOH, permanecendo estendidos, foram considerados mortos, de acordo com o método descrito por Chen e Dickson (CHEN; DICKSON, 2000), que foi adaptado por Amaral et al. (2003).

Para determinar a concentração letal da (*R*)-carvona, carbofurano e fluensulfona, para 50% (CL₅₀) dos J2, foram testadas cinco concentrações para cada substância, que foram

escolhidas com base em pré-testes realizados. Para a (*R*)-carvona: 900, 700, 500, 300 e 100 µg/mL (concentrações finais nos microtubos). De igual maneira, para o carbofurano e fluensulfona foram as seguintes concentrações: 200, 175, 150, 125 e 100 µg/mL e 192, 144, 96, 48 e 24 µg/mL, respectivamente (concentrações finais nos microtubos). O ensaio foi realizado com cinco repetições, em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Como controle negativo foi empregada uma solução de Tween 80 a 0,02 g/mL, contendo DMSO a 1,5% (v/v; concentração final no microtubo).

2.4 Efeito sinérgico dos COVs sobre a mortalidade de J2 de *M. incognita*

Soluções (720 µg/mL) dos cinco COVs selecionados com base nos resultados das mortalidades do J2 de *M. incognita* (item 2.3), nomeadamente acetato de *iso*-butila, (*R*)-carvona, decan-2-ona, α -ionona e *trans*-anetol (FIGURA 1), em Tween 80 a 0,02 g/mL contendo DMSO a 1,5% (v/v), foram combinadas duas a duas, em volumes iguais (2mL), de forma que a concentração final de cada substância fosse sempre igual a 360 µg/mL. Igualmente, 2 mL de cada solução (720 µg/mL) foram combinadas com igual volume de solução aquosa de Tween 80 a 0,02 g/mL contendo DMSO a 1,5% (v/v). Em seguida, 100 µL de cada solução obtida foram colocados em microtubos, aos quais logo em seguida se adicionaram 20 µL de suspensão aquosa com cerca de 20 J2, conforme descrito no item 2.3, de modo que a concentração final de cada COV no microtubo fosse de 300 µg/mL. Foram feitas combinações binárias em uma relação de 1:1 por tratar-se de teste de *screening*. O ensaio foi realizado uma vez, com cinco repetições, em delineamento inteiramente casualizado (DIC), empregando os nematicidas carbofurano a 170 µg/mL (concentração final no microtubo) e fluensulfona (Nimitz®, ADAMA) a 41,4 µg/mL (concentração final no microtubo) como controles positivos. Uma solução de Tween 80 a 0,02 g/mL, contendo DMSO a 1,5% (v/v; concentração final no microtubo), foi empregada como controle negativo. Após 48 horas, os microtubos foram abertos e as suspensões foram transferidas para uma placa de polipropileno com 96 cavidades de aproximadamente 300 µL, com fundos chatos. Logo em seguida, 5 µL de solução de NaOH 1,0 mol/L, recém preparada, foi adicionada ao conteúdo de cada cavidade e se contaram os J2 durante período de até 1 min após a referida adição. Os J2 que não reagiram à solução de NaOH, permanecendo estendidos, foram

considerados mortos, de acordo com o método descrito por Chen e Dickson (2000), que foi adaptado por Amaral et al. (2003).

2.5 Efeito sinérgico dos COVs com a fluensulfona sobre a mortalidade de J2 de *M. incognita*

Soluções (2 mL; 600 µg/mL) de decan-2-ona e (*R*)-carvona foram adicionadas a igual volume de solução de fluensulfona a 60 µg/mL, de modo que as concentrações finais dos COVs e da fluensulfona fossem de 300 e 30 µg/mL, respectivamente. Foram igualmente adicionados 2 mL de cada solução dos COVs e fluensulfona (600 e 60 µg/mL, respectivamente) a igual volume de solução aquosa de Tween 80 contendo DMSO a 1,5% (v/v). Uma alíquota (100 µL) de cada solução resultante foi colocada em microtubo, ao qual foram adicionados 20 µL de suspensão contendo cerca de 20 J2, conforme descrito no item 2.3. Foram empregados COVs que se mostraram efeitos sinérgicos promissores, de acordo com dados da literatura, assim como do teste de sinérgismos dos COVs. O ensaio foi realizado uma vez, com cinco repetições, em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Carbofurano a 170 µg/mL (concentração final no microtubo) foi empregado como controle positivo, enquanto uma solução de Tween 80 a 0,02 g/mL, contendo DMSO a 1,5% (v/v; concentração final no microtubo), foi empregada como controle negativo. Ao final de 48 horas foi feita a avaliação, de acordo com o procedimento descrito no item 2.4.

2.6 Efeito *in vitro* de solução da (*R*)-carvona sobre a eclosão de J2 de *M. incognita*

Uma suspensão aquosa (5 mL) contendo aproximadamente 7500 ovos de *M. incognita* foi colocada em uma câmara de eclosão que consistia em placa de Petri de 4 cm de diâmetro, contendo uma tela de policloreto de vinila (PVC) de 500 mesh de abertura, suportada por um anel rígido também de PVC. Logo em seguida, adicionaram-se 5 mL de solução da (*R*)-carvona a 1500 ou 2000 µg/mL em cada placa, fazendo com que as concentrações finais da (*R*)-carvona fossem de 750 e 1000 µg/mL. Para o preparo da solução de (*R*)-carvona, a mesma foi dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO), e a solução obtida foi diluída com solução aquosa de Tween 80 a 0,02 g/mL até a concentração desejada (1500 ou 2000 µg/mL). Como controles positivos, foram usados o carbofurano a 510 µg/mL (concentração final: 255 µg/mL) e a fluensulfona (Nimitz®, ADAMA) a 124,5 µg/mL (concentração final: 62,2

$\mu\text{g/mL}$), enquanto água e uma solução aquosa de Tween 80 a 0,02 g/mL contendo DMSO a 1,5% (v/v) foram empregados como controles negativos. As concentrações finais da (*R*)-carvona e dos controles positivos foram iguais a seus valores de $\text{CL}_{50} \times 1,5$. No caso específico da (*R*)-carvona também foi utilizada concentração final igual a $\text{CL}_{50} \times 2$. As placas de Petri foram fechadas, seladas com papel filme e mantidas em BOD a 28 °C. Após 48 horas de exposição dos ovos aos tratamentos, as placas foram retiradas e as soluções foram trocadas por água. Com o uso de um microscópio, contaram-se os J2 eclodidos em uma câmara de Peter passados os seguintes períodos de tempo após a troca do meio líquido por água: 0, 48, 96, 144, 192, 240 e 288 h. O ensaio seguiu um delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento. Este experimento foi realizado duas vezes.

2.7 Efeito de solução da (*R*)-carvona sobre o parasitismo de *M. incognita* em tomateiros, mediante tratamento prévio do inóculo (J2) com a substância

Soluções (25 mL) da (*R*)-carvona a 2500 e 5000 $\mu\text{g/mL}$ em Tween 80 a 0,02 g/mL foram adicionadas a 25 mL de suspensão aquosa contendo aproximadamente 3600 J2 de *M. incognita*. Isto fez com que as concentrações da (*R*)-carvona nas suspensões finais fossem de 1250 e 2500 $\mu\text{g/mL}$. Imediatamente em seguida, cada suspensão (5mL) foi colocada em quatro furos (0,5 cm de diâmetro x 2,5 cm de profundidade) no substrato, ao redor do caule de plantas de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. 'Santa Clara'), de 45 dias de idade, contidas em bandeja de isopor com 72 cavidades (121,2 mL/cavidade) contendo o substrato comercial Carolina Soil (substrato para plantas CSC, Indústria Brasileira). Durante a noite, a bandeja foi mantida em quarto climatizado a 28 °C, com 60% de umidade relativa. Durante o dia, foi mantida em casa de vegetação. Após 30 dias, com rega e adubação de acordo com as necessidades das plantas, as raízes foram removidas do substrato, lavadas em água da torneira, secas em guardanapos e submetidas à contagem de galhas do nematoide. Adicionalmente, os ovos do nematoide foram extraídos usando uma solução 0,5% (g/mL) de NaOCl, de acordo com o método de Hussey e Barker (1973) descrito no item 2.2. As suspensões obtidas foram submetidas à contagem de ovos com o uso de um microscópio. Foram usados como controles positivos o carbofurano a 850 $\mu\text{g/mL}$ (concentração final na suspensão: 425 $\mu\text{g/mL}$) e fluensulfona (Nimitz®, ADAMA) a 435 $\mu\text{g/mL}$ (concentração final na suspensão: 217,5 $\mu\text{g/mL}$). Os controles negativos foram a água e solução de Tween 80 a

0,02 g/mL. O ensaio foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento. O experimento foi realizado duas vezes.

2.8 Efeito da (R)-carvona sobre o parasitismo de *M. incognita* em tomateiros, mediante tratamento prévio do inóculo (ovos) com a substância

Soluções (25 mL) da (R)-carvona a 1500 e 2000 µg/mL, em Tween 80 a 0,02 g/mL, foram adicionadas a 25 mL de suspensão aquosa contendo aproximadamente 15000 ovos de *M. incognita*. Isto fez com que as concentrações finais de (R)-carvona fossem de 750 e 1000 µg/mL. As suspensões resultantes foram imediatamente adicionadas, através de quatro furos (0,5 cm de diâmetro x 2,5 cm de profundidade) ao redor de caules de plantas de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. 'Santa Clara'), de 45 dias de idade, mantidas em bandeja de isopor de 72 cavidades (121,2 mL/cavidade) contendo o substrato comercial Carolina Soil (substrato para plantas CSC, Indústria Brasileira). Foram empregados mais dois tratamentos com a (R)-carvona nas mesmas concentrações e com a mesma quantidade de ovos. Nestes dois tratamentos, os ovos ficaram em contato em a ®-carvona por 48 horas antes das suspensões serem adicionadas aos substratos das plantas. A bandeja foi mantida em quarto climatizado a 28 °C, com 60% de umidade relativa, durante 48 horas. Em seguida, a bandeja foi mantida na casa de vegetação durante o dia e na sala climatizada durante a noite (período frio), mantendo a rega e adubação de acordo com a necessidade das plantas. Após 35 dias, as raízes das plantas foram removidas, lavadas em água da torneira, secas em guardanapo e submetidas à contagem de galhas do nematoide. Em seguida, os ovos do nematoide foram extraídos com uma solução a 0,5% (g/mL) de NaOCl, de acordo com o método de Hussey e Barker (1973), descrito no item 2.2, para que os mesmos pudessem ser contados com o uso de microscópio e de uma placa de Peter. Foram usados como controles positivos o carbofurano a 510 µg/mL (concentração final na suspensão: 255 µg/mL) e fluensulfona (Nimitz®, ADAMA) a 124,4 µg/mL (concentração final na suspensão: 62,2 µg/mL). Os controles negativos foram a água e solução de Tween 80 a 0,02 g/mL. O ensaio foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento. O experimento foi realizado duas vezes.

2.9 Efeito da (*R*)-carvona aplicada em substrato sobre o parasitismo de *M. incognita* em tomateiros

Adaptando o método descrito por Jardim et al. (2018) para testar (*E*)-cinamaldeído em Soja (*Glycine max* (L.) Merr, 1000 mL de substrato comercial Carolina Soil (substrato para plantas CSC, Indústria Brasileira) e 4,1 mL da (*R*)-carvona foram colocados em garrafas de polietileno tereftalato (PET) de 2000 mL, de modo que a concentração final da (*R*)-carvona fosse de 0,0041% (v/v). Em seguida, foram adicionados 100 mL de suspensão aquosa contendo aproximadamente 60.000 ovos de *M. incognita*. As garrafas foram fechadas, seladas com papel filme, agitadas para homogeneizar a mistura resultante e mantidas em BOD a 28 °C por 3 dias (com agitação no segundo dia). Ao final de três dias, as garrafas foram cortadas e a mistura resultante foi colocada em sacos plásticos abertos e mantidos em casa de vegetação. Passados mais cinco dias, 200 mL de substrato (mistura resultante) foram colocados em copos de polipropileno (PP) de 300 mL, para os quais foram transplantadas mudas de tomateiro (*Solanum lycopersicum* 'Santa Clara') de 30 dias de idade. As mudas foram mantidas em casa de vegetação. Ao final de 30 dias, as raízes das plantas foram removidas, lavadas com água, secas com papel e submetidas à contagem de galhas do nematoide. Em seguida, os ovos foram extraídos usando uma solução a 0,5% (g/mL) de NaOCl, segundo o método de Hussey e Barker (1973), descrito no item 2.2, para serem contados com o uso de microscópio e placa de Peter. O controle positivo e negativo foram, respectivamente, o nematicida fumigante comercial Basamid (3,5-dimetil-1,3,5-tiadiazinan-2-tiona; BASF AG – Carl Bosh Strasse, 38 – 67056 – Ludwigshafen – Alemanha) na concentração de 0,25 g/L de substrato, e água. O ensaio seguiu um delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento, sendo realizado duas vezes.

2.10 Análise estatística

No caso dos experimentos *in vitro*, os dados foram inicialmente convertidos em percentagens. Todos os dados (dos testes *in vitro* e *in vivo*) dos experimentos e de suas repetições foram submetidos, em conjunto, ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965) e de homocedasticidade de Bartlett (BARTLETT, 1937). Em seguida, procedeu-se à análise de variância - ANOVA (DUNN; CLARK, 1987) e à comparação das médias de acordo com o teste de Scott e Knott (SCOTT; KNOTT, 1974) ($P =$

0,05). Para os testes realizados duas vezes, quando não se observou normalidade ou/ e homocedasticidade para a análise em conjunto dos dados, procedeu-se à análise estatística dos dados de cada experimento separadamente. Tais cálculos foram feitos utilizando o programa estatístico SISVAR 5.6 (FERREIRA, 2011) e o programa R ® 3.6.1 (TEAM, 2013) com interface gráfica RStudio i386 3.6.1 (TEAM, 2015). Para determinar a CL_{50} , foi feita análise Logit (MCFADDEN, 1973), utilizando-se o pacote drc (Analyses of Dose Response Curve; (RITZ; STREIBIG, 2005) do programa R ® 3.6.1 (TEAM, 2013). Nos experimentos realizados com combinação de substâncias, para determinar o efeito das combinações, os valores foram somados e foi feita a estatística. Quando o efeito de combinação foi maior que a soma dos efeitos individuais, considerou-se sinergismo, no caso contrario, em que o efeito da combinação é menor que a soma dos efeitos individuais, considerou-se antagônico, e quando o efeito da combinação foi a soma dos efeitos individuais, foi considerado efeito aditivo.

2.11 Estudo *in silico*

2.11.1 Conformações mais estáveis da (*R*)-carvona

A estrutura tridimensional da (*R*)-carvona foi desenhada com o programa ACD ChemsSketch 12.01 (Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, Canada) e salva no formato mol, para ser convertida ao formado sdf com o programa OpenBabel 2.3.2 (O'BOYLE et al., 2011). Em seguida, foi feita busca conformacional com o programa Open3Dalign 2.282. (TOSCO; BALLE; SHIRI, 2011). Para tanto, fizeram-se 1000 simulações por dinâmica molecular, com 1000 etapas de 1 fs para cada. O cálculo foi feito utilizando o campo de força Merck Molecular Force Field 94 (MMFF94) e considerando a água implicitamente pelo emprego do modelo Generalized Born Surface Area (GBSA). Em seguida, a conformação mais estável, bem como todas aquelas até 10 kcal/mol distantes da mais estável, foram otimizadas usando o programa MOPAC 2016 (STEWART, 2016). Para tanto, foi empregado o Hamiltoniano PM7 e a água foi implicitamente considerada pelo emprego do modelo Conductor-Like Screening Model (COSMO). As conformações mais estáveis, correspondendo a 37% ou mais da população, de acordo com a distribuição de Boltzmann, foram extraídas usando o programa computacional Gabedit 2.4.8 (ALLOUCHE, 2011) e salvas nos formatos mol2 e pdb.

2.11.2 Seleção de enzimas potencialmente inibidas pela (*R*)-carvona através de busca farmacofórica no Ligand Expo

Com o uso do programa OpenBabel 2.3.2 (ISHIKAWA, 2013), adicionaram-se átomos de hidrogênio aos ligantes do banco de dados do Ligand Expo (<http://ligand-expo.rcsb.org/>) (FENG et al., 2004), que foram salvos no formato mol2, para que os mesmos pudessem ser utilizados pelo programa Lisica 1.0.1 (LEŠNIK et al., 2015) em uma busca farmacofórica para encontrar substâncias estruturalmente parecidas com as conformações mais estáveis da (*R*)-carvona após otimização com o programa Mopac 2016. Em seguida, foram selecionadas proteínas do RCSB protein data bank (<https://www.rcsb.org/>; (BERMAN et al., 2006) usando os seguintes critérios: (i) cujos ligantes apresentassem, na busca farmacofórica, escores de Tanimoto maiores ou iguais a 0,5; (ii) cujos ligantes selecionados na busca farmacofórica se encontrassem dentro da cavidade da proteína; e (iii) cujos ligantes selecionados na busca farmacofórica fossem inibidores da atividade da proteína.

As sequências de aminoácidos das proteínas selecionadas foram empregadas em buscas no National Center for Biotechnology Information-NCBI (COORDINATORS, 2016; WHEELER et al., 2006), usando o programa Blastp 2.10.0+ (ALTSCHUL et al., 1997; BORATYN et al., 2012) com o Delta-Blast (Domain Enhanced Lookup Time Accelerated Blast) (BORATYN et al., 2012) utilizando todos os parâmetros normais. A busca foi feita no banco de dados nr (não redundante) dos genomas de Nematoda (taxid:6231) e Meloidogynidae (taxid:315429). Todas as proteínas apresentaram escores abaixo de 200 quando as buscas foram feitas em genomas de em genomas de nematoides do gênero *Meloidogyne*.

2.11.3 Seleção de enzimas potencialmente inibidas pela (*R*)-carvona através de busca no BRENDA

No *site* do BRENDA (<https://www.brenda-enzymes.org>) (JESKE et al., 2018), procurou-se por "(*R*)-carvone" e, em seguida, por enzimas que pudessem ser inibidas pela (*R*)-carvona. Foram obtidas três enzimas: acetilcolinesterase-AChE, produzida por *Electrophorus electricus* L.; butirilcolinesterase-BChE, produzida por *Equus caballus* L. (ORHAN, 2008); e α -pineno óxido liase, produzida por *Nocardia* sp. (GRIFFITHS, 1987). As sequências de aminoácidos de tais enzimas foram utilizadas em buscas no NCBI conforme descrito no item

2.11.1. Apenas aquela enzima com escore acima de 200 na busca realizada, que de fato pudesse ser inibida pela (*R*)-carvona segundo os dados da literatura, foi selecionada para a próxima etapa do trabalho.

2.11.4 Comparação das acetilcolinesterases produzidas por *M. incognita* com aquelas produzidas por *E. electricus*

Do NCBI foram obtidas as sequências de aminoácidos das acetilcolinesterases de *M. incognita* (AFV15797, AFJ54351, AAD25921, AAD02835, AFJ54350, AAQ06662, ANH21152, ANH21150, ANH21151 e ALF04210), enquanto do RCSB protein data bank foram obtidas as sequências de aminoácidos das acetilcolinesterases produzidas por *E. electricus*: 1C2O, 1C2B (BOURNE, 1999) e 1EEA (RAVES et al., 1998). Usando o programa Ugene 1.32.0 (OKONECHNIKOV, 2012) com Clustal Omega 1.2.1 (SIEVERS; HIGGINS, 2018), alinharam-se as sequências com 10 iterações. Para todos os outros parâmetros do programa foram mantidos os valores padrões. A partir do alinhamento obtido, calculou-se a dissimilaridade de Hamming (%), considerando-se os *gaps*. Em seguida, calculou-se a similaridade (%), que foi igual a 100 - dissimilaridade de Hamming.

2.11.5 Identificação do sítio de ligação das acetilcolinesterases de *E. electricus*

Do RCSB protein data bank (BERMAN et al., 2000) foram obtidos os arquivos pdb contendo as estruturas tridimensionais das acetilcolinesterases produzidas por *E. electricus*: 1C2O, 1C2B (BOURNE, 1999) e 1EEA (RAVES et al., 1998). Em seguida, utilizando o *script* em Python MakeMultimer.py (<http://watcut.uwaterloo.ca/tools/makemultimer/>), geraram-se novos arquivos pdb de acordo com as unidades biológicas das referidas enzimas. A partir dos novos arquivos pdb gerados, as estruturas tridimensionais das cadeias foram manualmente separadas e alinhadas à cadeia mm1_A da enzima 1C2O com o programa Lovoalign 18.320 (MARTÍNEZ; ANDREANI; MARTÍNEZ, 2007), que também calculou o desvio da raiz quadrada média das posições atômicas (RMSD) para cada par de cadeias. As estruturas tridimensionais das cadeias alinhadas foram convertidas para o formato pdbqt usando o programa Autodock Tools 1.5.6rc3 (MORRIS et al., 2009), que também foi empregado para gerar os arquivos pdbqt das conformações mais estáveis da (*R*)-carvona, (*R*)-mentofurano, (*S*)-mentofurano, (*R*)-piperitona e (*S*)-piperitona. Para encontrar as

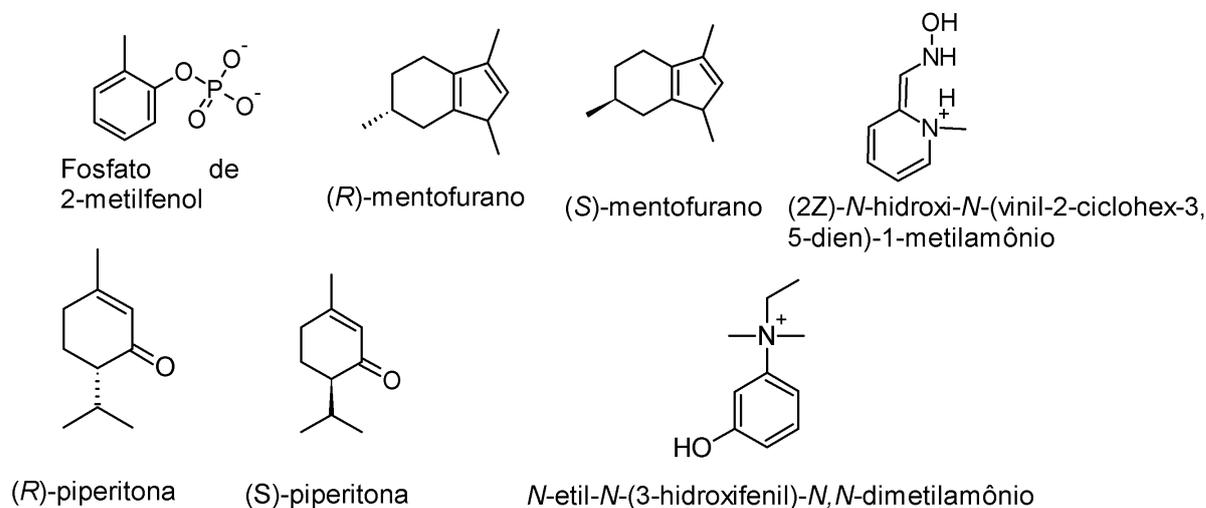
conformações mais estáveis destas quatro últimas substâncias, que são inibidoras das acetilcolinesterases produzidas por *E. electricus* (ORHAN, 2008), seguiu-se o mesmo procedimento descrito no item 2.11.1 para a (*R*)-carvona.

O programa VMD 1.9.3 (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996) foi utilizado para calcular as dimensões (70,875 x 64,77 x 51,765 Å³; x, y, z) e o centro de massa (34,49 x 65,02 x -78,28 Å; x, y, z) das cadeias, para que tais valores fossem utilizados em ancoramento às cegas das cinco substâncias mencionadas no item 2.11.3, com o uso do programa computacional QuickVina-W (HASSAN, 2017; TROTT; OLSON, 2010). Para tanto, o parâmetro exhaustiveness foi ajustado para 256, enquanto todos os outros permaneceram com os valores padrões do programa.

2.11.6 Ancoramento (*docking*) no sítio de ligação

Utilizando-se o mesmo procedimento descrito no item 2.11.1 para a (*R*)-carvona, obtiveram-se as conformações mais estáveis para os seguintes inibidores de acetilcolinesterases (FIGURA 2): 4OJ Fosfato de 2-metilfenol; (CARLETTI et al., 2013), EDR (*N*-etil-*N*-(3-hidroxifenil)-*N,N*-dimetilamônio; (RAVELLI et al., 1998), FP1 (2*Z*)-*N*-hidroxi-*N*-(vinil-2-ciclohex-3,5-dien)-1-metilamônio (HAREL et al., 2008). Vale mencionar que, para utilizar o estado de protonação correto, antes de iniciar as buscas conformacionais as substâncias foram submetidas a cálculos dos seus valores de pka com o uso do programa Marvin Sketch 19.25 (<http://www.chemaxon.com/marvin>) (CSIZMADIA, 1999). Todas as conformações mais estáveis destes ligantes foram convertidas para o formato pdbqt usando o programa Autodock Tools 1.5.6cr3 (MORRIS et al., 2009).

Figura 2 - Estruturas químicas de inibidores de acetilcolinesterases utilizados no presente estudo in silico.



Fonte: Do autor (2020).

Do RCSB protein data bank (BERMAN; BHAT; BOURNE; FENG *et al.*, 2000) foram obtidos os arquivos pdb de todas as acetilcolinesterases com similaridades de sequências de aminoácidos iguais a 100% em relação às enzimas 1C2O, 2C2B (BOURNE; GRASSI; BOUGIS; MARCHOT, 1999) e 1EEA (RAVES; GILES; SCHRAG; SCHMID *et al.*, 1998), que são produzidas por *E. electricus*. Tais arquivos pdb foram submetidos ao mesmo procedimento descrito no item 2.11.5 para as enzimas 1C2O, 1C2B (BOURNE *et al.*, 1999) e 1EEA (RAVES *et al.*, 1998), para a obtenção dos arquivos pdbqt de suas cadeias, que estavam alinhadas à cadeia mm1_A de 1C2O. Antes de dar prosseguimento ao trabalho, aquelas cadeias incompletas na região do sítio de ligação ou com mutações longe das extremidades das cadeias, foram descartadas, tendo restado três, nomeadamente: 1AX9, 2VQ6 e 4BC0.

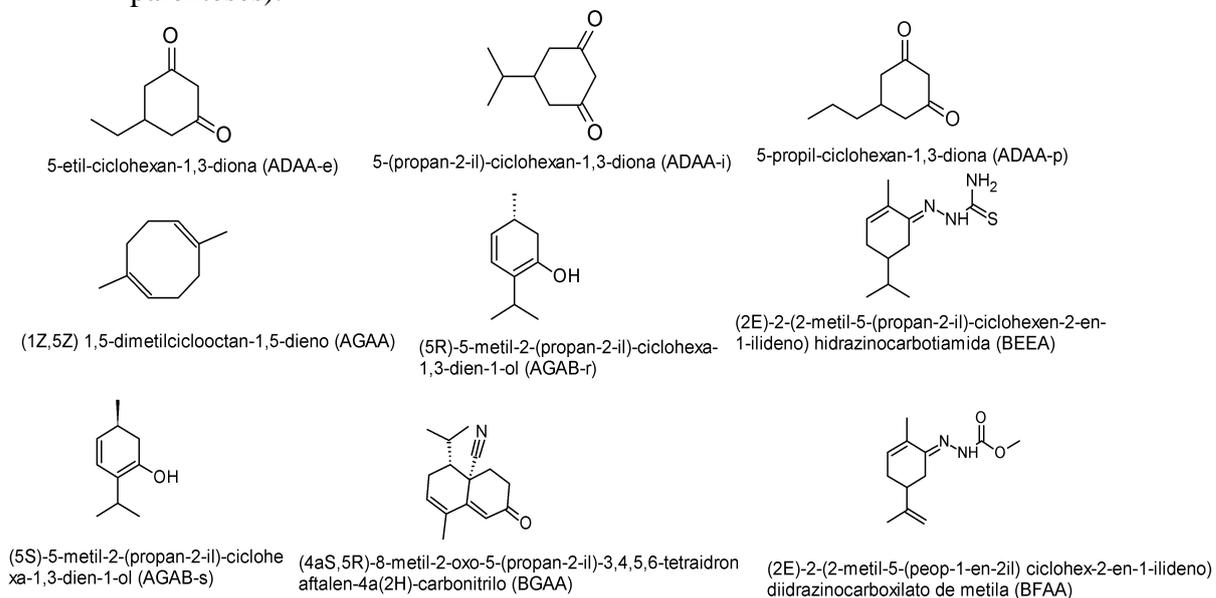
Utilizando-se o programa Autodock Tools 1.5.6rc3 (MORRIS *et al.*, 2009), escolheu-se a região para o ancoramento, que tinha dimensões de 13.5 x 26.25 x 20.25 Å³ (x, y, z) e centro em 36,5, 75,64, -87.359 Å (x, y, z). Tal região correspondia ao local de ancoramento às cegas no item 2.11.5, que era o mesmo no qual se encontravam as substâncias orgânicas acima descritas (neste item), no presente item, que foram utilizadas no presente ancoramento. Além disto, também foram utilizadas a (*R*)-carvona, (*R*)-mentofurano, (*S*)-mentofurano, (*R*)-piperitona e (*S*)-piperitona. O ancoramento foi realizado usando o programa QuickVina 2.1 (HANDOKO *et al.*, 2012; TROTT; OLSON, 2010). A exceção do parâmetro exhaustiveness, que foi ajustado para 256, todos os outros permaneceram com os valores padrões do

programa. Os valores das afinidades calculados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) (DUNN; CLARK, 1987) e à comparação das médias de acordo com o teste de Scott e Knott (1974) ($P = 0,05$).

2.11.7 Seleção de análogos da (R)-carvona com maiores afinidades pelas acetilcolinesterases

Utilizando as melhores conformações da (R)-carvona, foi feita busca farmacofórica no banco de dados do ZINC 15 (STERLING; IRWIN, 2015) por estruturas similares à (R)-carvona, com o uso do programa computacional Lisica 1.0.1 (LEŠNIK et al., 2015). Foram selecionados os dez melhores resultados, com escores de *Tanimoto* acima de 0,55. Utilizando-se os mesmos procedimentos descritos no item 2.11.1, obtiveram-se as conformações mais estáveis das substâncias selecionadas na busca farmacofórica. Usando o programa Autodock Tools 1.5.6rc3 (MORRIS et al., 2009), escolheu-se a região para o ancoramento, que tinha dimensões de 14.25 x 17.25 x 10.5 Å³ (x, y, z) e centro em 37.086 x 75.14 x -85.737 Å (x, y, z). A (R)-carvona e as substâncias selecionadas (FIGURA 3) foram ancoradas usando o programa QuickVina 2.1 (HANDOKO et al., 2012; TROTT; OLSON, 2010). À exceção do parâmetro exhaustiveness, que foi ajustado para 256, todos os outros permaneceram com os valores padrões do programa. Os valores das afinidades calculadas foram submetidos à análise de variância (DUNN; CLARK, 1987) e à comparação das médias de acordo com o teste de Scott e Knott (1974) ($P = 0,05$).

Figura 3 - Estruturas análogas a (R)-carvona, selecionadas através de busca farmacofórica no banco de dados ZINC 15 (STERLING; IRWIN, 2015). Nome e código (entre parênteses).



Fonte: Adaptado de Sterling e Irwin (2015).

3 RESULTADOS

3.1 Efeito *in vitro* de soluções dos COVs sobre a mortalidade de J2 de *M. incognita*

Dos 31 COVs estudados, 11 aumentaram as mortalidades de J2 de *M. incognita* após exposição por 48 horas. Os melhores resultados foram observados para acetato de 2-metilbutila, acetato de *iso*-butila, (*R*)-carvona, (*S*)-carvona, undecan-2-ona, α -ionona, decan-2-ona e dodecan-2-ona, cujas percentagens de J2 mortos foram estatisticamente iguais às observadas para os nematocidas comerciais carbofurano e fluensulfona (TABELA 1). Os valores da CL_{50} calculados para a (*R*)-carvona, carbofurano e fluensulfona foram, respectivamente, iguais a $525 \pm 20 \mu\text{g/mL}$, $171,5 \pm 3,8 \mu\text{g/mL}$ e $34,3 \pm 6,6 \mu\text{g/mL}$.

Tabela 1 - Efeito *in vitro* de soluções de compostos orgânicos voláteis (500 µg/mL) sobre a mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*. Carbofurano e fluensulfona a 170 e 42,2 µg/mL, respectivamente, foram usados como controles positivos, enquanto Tween 80® a 0,02 g /mL, contendo DMSO a 1,5% (v/v), foi usado como controle negativo.

| Tratamentos | J2 mortos (%) |
|--------------------------------|---------------|
| α -ionona | 55,4 a |
| (S)-carvona | 49,6 a |
| (R)-carvona | 48,4 a |
| Acetato de <i>iso</i> -butila | 44,6 a |
| Undecan-2-ona | 39,9 a |
| Decan-2-ona | 39,2 a |
| Dodecan-2-ona | 38,7 a |
| Nonan-2-ona | 31,7 b |
| Acetato de 2-metilbutila | 30,6 b |
| Acetato de <i>iso</i> -pentila | 28,0 b |
| <i>trans</i> -anetol | 22,1 b |
| L-carveol | 8,3 c |
| Undecan-6-ona | 8,2 c |
| (R)-mentona | 4,4 c |
| <i>endo</i> -(1R)-borneol | 3,7 c |
| Timol | 2,8 c |
| Linalool | 2,5 c |
| Acetato de linalila | 2,2 c |
| (1R,2S,5R)-mentol | 1,4 c |
| Safrol | 0,9 c |
| Eugenol | 0,8 c |
| (2R)-Cânfora | 0,8 c |
| Carvacrol | 0,6 c |
| Óxido de linalila | 0,0 c |
| α -terpineol | 0,0 c |
| (1S,2R,5S)-mentol | 0,0 c |
| Nerolidol | 0,0 c |
| Estragol | 0,0 c |
| (S)- <i>iso</i> -pulegol | 0,0 c |
| Geraniol | 0,0 c |
| <i>p</i> -cimeno | 0,0 c |
| Tween® 80 | 0,0 c |
| Carbofurano | 46,3 a |
| Fluensulfona | 53,7 a |

Médias seguidas da mesma letra são iguais entre si de acordo com o teste de Scott e Knott ($P \leq 0,05$).

Fonte: Do autor (2020).

3.2 Efeito sinérgico dos COVs sobre a mortalidade de J2 de *M. incognita*

As seguintes combinações de COVs reduziram os números de J2 mortos: acetato de *iso*-butila/(*R*)-carvona, acetato de *iso*-butila/decan-2-ona, acetato de *iso*-butila/ α -ionona, acetato de *iso*-butila/*trans*-anetol e (*R*)-carvona/ α -ionona (TABELA 2). O aumento de mortalidade de J2 foi observado ao empregar as seguintes combinações: α -ionona/*trans*-anetol, decan-2-ona/*trans*-anetol, decan-2-ona/ α -ionona e (*R*)-carvona/*trans*-anetol.

Tabela 2 - Efeito da combinação de compostos orgânicos voláteis sobre a mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*. Carbofurano e fluensulfona a 170 e 42,2 µg/mL, respectivamente, foram usados como controles positivos, enquanto Tween 80® a 0,02 g /mL, contendo DMSO a 1,5% (v/v) foi usado como controle negativo.

| Tratamentos | Concentração | | Efeito ^b |
|---|--------------|----------------------------|---------------------|
| | (µg/mL) | J2 mortos (%) ^a | |
| Acetato de <i>iso</i> -butila | 300 | 27 c | ----- |
| (<i>R</i>)-carvona | 300 | 18 d | ----- |
| Decan-2-ona | 300 | 11 e | ----- |
| α -ionona | 300 | 23 c | ----- |
| <i>trans</i> -anetol | 300 | 0 g | ----- |
| Acetato de <i>iso</i> -butila/(<i>R</i>) carvona | 300/300 | 9 d | Antagônico |
| Acetato de <i>iso</i> -butila/decan-2-ona | 300/300 | 33 b | Antagônico |
| Acetato de <i>iso</i> -butila/ α -ionona | 300/300 | 15 d | Antagônico |
| Acetato de <i>iso</i> -butila/ <i>trans</i> -anetol | 300/300 | 0 g | Antagônico |
| (<i>R</i>)-carvona/decan-2-ona | 300/300 | 34 b | Aditivo |
| (<i>R</i>)-carvona/ α -ionona | 300/300 | 13 e | Antagônico |
| (<i>R</i>)-carvona/ <i>trans</i> -anetol | 300/300 | 26 c | Sinergístico |
| Decan-2-ona/ α -ionona | 300/300 | 36 a | Sinergístico |
| Decan-2-ona/ <i>trans</i> -anetol | 300/300 | 33 b | Sinergístico |
| α -ionone/ <i>trans</i> -anetol | 300/300 | 28 c | Sinergístico |
| Tween 80 + DMSO 1,5% (v/v) | ----- | 2 f | ----- |
| Fluensulfona | 42,2 | 52 a | ----- |
| Carbofurano | 170 | 51 a | ----- |

^a Médias seguidas da mesma letra, são iguais entre si de acordo com o teste de Scott e Knott ($P \leq 0,05$). ^b É considerado efeito sinergístico quando a resposta da mistura é maior à esperada; quando é menor é antagonista e quando é igual é aditivo.

Fonte: Do autor (2020).

3.3 Efeito sinergístico dos COVs com a fluensulfona sobre a mortalidade de J2 de *M. incognita*

A exposição de J2 de *M. incognita* a combinações de fluensulfona e decan-2-ona ou (*R*)-carvona aumentou os números de J2 mortos (TABELA 3), quando se empregou a relação (250/25 µg/mL; COV e fluensulfona, respectivamente). Os valores de J2 mortos de tais combinações são estatisticamente iguais ao observado para o carbofurano (controle positivo).

Tabela 3 - Efeito de combinação da fluensulfona à (*R*)-carvona e decan-2-ona sobre a mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*. Carbofurano foi usado como controle positivo, enquanto Tween 80® foi usado como controle negativo.

| Tratamentos | J2 mortos (%) ^a | Efeito ^b |
|---|----------------------------|---------------------|
| (<i>R</i>)-Carvona 250 µg/mL | 28 b | - |
| Decan-2-ona 250 µg/mL | 34 b | - |
| Fluensulfona 25 µg/mL | 29 b | - |
| Fluensulfona 25 µg/mL + (<i>R</i>)- Carvona 250 µg/mL | 63 a | Aditivo |
| Fluensulfona 25 µg/mL + decan-2-ona 250 µg/mL | 55 a | Aditivo |
| Tween 80 a 0,02 g/mL + DMSO 1,5% (v/v) | 2 c | - |
| Carbofuran 170 µg/mL | 52 a | - |

^a Médias seguidas da mesma letra, são iguais entre si de acordo com o teste de Scott e Knott ($P \leq 0,05$).

^b É considerado efeito sinérgico quando a resposta da mistura é maior à esperada; quando é menor é antagonista equando é igual é aditivo.

Fonte: Do autor (2020).

3.4 Efeito *in vitro* de solução da (*R*)-carvona sobre a eclosão de J2 de *M. incognita*

A exposição dos ovos de *M. incognita* às soluções da (*R*)-carvona por 48 h, causou redução do número de J2 eclodidos em relação ao controle negativo (TABELA 4). Quando na concentração de 750 µg/mL, a (*R*)-carvona causou redução estatisticamente igual àquela verificada para o controle positivo fluensulfona no primeiro experimento. Em relação ao segundo experimento, quando a (*R*)-carvona foi empregada na concentração de 1000 µg/mL, foi mais efetivo ao causar redução de eclosão mais que o controle positivo fluensulfona. Em ambos os experimentos, o carbofurano não reduziu a eclosão do J2.

Tabela 4 - Efeito *in vitro* de soluções da (R)-carvona (750 e 1000 µg/mL) sobre a eclosão de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita*, após 48 horas de exposição dos ovos do nematoide.

| Tratamentos | Número de J2 eclodidos ^a | |
|--|-------------------------------------|----------------------------|
| | Experimento 1 ^b | Experimento 2 ^b |
| (R)-carvona 1000 µg/mL | 608 c | 724 f |
| (R)-carvona 750 µg/mL | 900 b | 1143 e |
| Carbofurano [®] 255 µg/mL | 5208 a | 4386 b |
| Fluensulfona 62,2 µg/mL | 814 b | 1585 d |
| Tween [®] 80 + DMSO 1,5 % (v/v) | 5286 a | 5126 a |
| Água | 4650 a | 3692 c |

^a Na análise estatística em conjunto dos dois experimentos não foi observada normalidade e homocedasticidade de acordo com os testes de Shapiro-Wilk e de Bartlett, respectivamente. Em decorrência, os valores foram separadamente submetidos à análise estatística.

^b Médias seguidas da mesma letra em cada coluna, são iguais entre si de acordo com o teste de Scott e Knott ($P \leq 0,05$).

Fonte: Do autor (2020).

3.5 Efeito de solução da (R)-carvona sobre o parasitismo de *M. incognita* em tomateiros, mediante tratamento prévio do inóculo (J2) com a substância

Ambas as soluções da (R)-carvona (1250 e 2500 µg/mL) reduziram os números de ovos e de galhas por sistema radicular do tomateiro quando os valores foram comparados com os controles negativos (água e solução de Tween 80 a 0,02 g/mL; TABELA 5). Os melhores resultados foram obtidos para a solução mais concentrada, que acarretou a obtenção de valores próximos daqueles obtidos para o carbofurano e para a fluensulfona (controles positivos).

Tabela 5 - Efeito de soluções da (R)-carvona (1250 e 2500 µg/mL) sobre o parasitismo de *Meloidogyne incognita* em tomateiros inoculados com juvenis do segundo estágio do nematoide. Carbofurano e fluensulfona foram usados como controles positivos, enquanto água e solução de Tween 80 foram empregados como controles negativos.

| Tratamentos | Galhas e ovos ^a | | | |
|-------------------------------------|----------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| | Experimento 1 ^b | | Experimento 2 ^b | |
| | Galhas/raiz | Ovos/raiz | Galhas/raiz | Ovos/raiz |
| (R)-carvona 2500 µg/mL | 1 e | 561 e | 1 d | 290 e |
| (R)-carvona 1250 µg/mL | 22 c | 1942 c | 59 c | 9280 c |
| Fluensulfona 104,4 µg/mL (controle) | 1 e | 127 f | 3 d | 156 f |
| Carbofurano 425 µg/mL (controle) | 5 d | 1186 d | 1 d | 459 d |
| Tween® 80 0,02 g/mL (controle) | 32 b | 5038 b | 345 a | 103287 b |
| Água (controle) | 66 a | 6663 a | 335 b | 120218 a |

^a Na análise estatística em conjunto dos dois experimentos não foi observada normalidade e homocedasticidade de acordo com os testes de Shapiro-Wilk e de Bartlett, respectivamente. Em decorrência, os valores foram separadamente submetidos à análise estatística.

^b Médias seguidas da mesma letra em cada coluna, são iguais entre si de acordo com o teste de Scott e Knott ($P \leq 0,05$).

Fonte: Do autor (2020).

3.6 Efeito da (R)-carvona sobre o parasitismo de *M. incognita* em tomateiros, mediante tratamento prévio do inóculo (ovos) com a substância

Na menor concentração (750 µg/mL) e com tempo de exposição dos ovos igual a zero, os valores obtidos de ovos/raiz e galhas/raiz para a (R)-carvona foram bem próximos daqueles observados para os controles negativos (TABELA 6). Quando a concentração foi elevada para 1000 µg/mL, houve um distanciamento dos controles negativos. Com tempo de exposição igual a 48 h, ambas as concentrações da (R)-carvona apresentaram valores bem próximos daqueles observados para os controles positivos (Carbofurano e fluensulfona).

Tabela 6 - Efeito da exposição de ovos de *Meloidogyne incognita* à soluções da (R)-carvona (750 e 100 µg/mL) sobre o parasitismo de *M. incognita* em tomateiro, mediante tratamento prévio dos ovos com a substância. Carbofurano e fluensulfona foram usados como controles positivos, enquanto água e solução de Tween 80 foram empregados como controles negativos.

| Tratamentos | Exposição (h) | Galhas e ovos ^a | | | |
|-------------------------|------------------|----------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| | | Experimento 1 ^b | | Experimento 2 ^b | |
| | | Galhas/raiz | Ovos/raiz | Galhas/raiz | Ovos/raiz |
| (R)-carvona 1000 µg/mL | 0 | 461 c | 66003 d | 242 d | 65558 d |
| (R)-carvona 1000 µg/mL | 48 | 0 g | 0 h | 2 h | 1258 h |
| (R)-carvona 750 µg/mL | 0 | 570 b | 112489 c | 442 c | 236922 b |
| (R)-carvona 750 µg/mL | 48 | 4 f | 1308 f | 8 g | 2169 g |
| Fluensulfona 62,6 µg/mL | 0 | 43 e | 1068 g | 112 f | 3884 f |
| Carbofurano 255 µg/mL | 0 | 102 d | 8060 e | 132 e | 19846 e |
| Tween® 80 0,02 g/mL | 0 | 572 b | 112684 b | 716 b | 227067 c |
| Água | 0 | 652 a | 154545 a | 840 a | 326607 a |

a Na análise estatística em conjunto dos dois experimentos não foi observada normalidade e homocedasticidade de acordo com o teste de Shapiro-Wilk e de Bartlett, respectivamente. Em decorrência, os valores foram separadamente submetidos à análise estatística.

b Médias seguidas da mesma letra em cada coluna, são iguais entre si de acordo com o teste de Scott e Knott ($P \leq 0,05$).

Fonte: Do autor (2020).

3.7 Efeito da (R)-carvona aplicada em substrato sobre o parasitismo de *M. incognita* em tomateiros

A aplicação da (R)-carvona na concentração de 0,41% (4,1 mL (L substrato)⁻¹) em tomateiros infestados com ovos de *M. incognita*, reduziu o número de galhas e ovos do nematoide por sistema radicular (TABELA 7). O número de galhas e ovos para a (R)-carvona diferem estatisticamente do controle negativo (água) e são estatisticamente iguais ao controle positivo (nematicida fumigante Basamid).

Tabela 7 - Efeito da (R)-carvona aplicada ao substrato (fumigação) sobre o parasitismo de *Meloidogyne incognita* em tomateiro inoculado com ovos do nematoide.

| Tratamentos | Massa de raiz (g) | Galhas/raiz | Galhas/massa de raiz (1/g) | Ovos/massa de raiz (1/g) |
|------------------------------|-------------------|-------------|----------------------------|--------------------------|
| (R)-Carvona (4,1 mL/L) | 0,40 b | 0 b | 0 b | 0 b |
| Basamid (0,25 g/L; controle) | 0,97 a | 0 b | 0 b | 0 b |
| Água (controle negativo) | 1,12 a | 52 a | 47 a | 1200 a |

Os dados são a média de dois experimentos (análise conjunta).

Médias seguidas da mesma letra em cada coluna, são iguais entre si de acordo com o teste de Scott e Knott ($P \leq 0,05$).

Fonte: Do autor (2020).

3.8 Estudo in silico

3.8.1 Conformações mais estáveis da (R)-carvona

A busca conformacional empregando a (R)-carvona resultou em seis estruturas com valores de energias próximos (TABELA 8). Para a etapa seguinte foram utilizadas as conformações 2 e 3 que, de acordo com a distribuição de Boltzmann, correspondiam a 37 e 24 % do total de conformações. Além disto, estas duas conformações selecionadas tinham RMSD menores ou iguais a 0,85 Å em relação às outras conformações.

Tabela 8 - Distribuição de Boltzman e energias das conformações da (R)-carvona, calculadas usando o programa Mopac 2016.

| Conformação | Energia (Kcal/mol) | Distribuição de Boltzmann (%) |
|-------------|--------------------|-------------------------------|
| 1 | 21,70 | 19 |
| 2 | 21,81 | 37 |
| 3 | 22,29 | 24 |
| 4 | 22,71 | 11 |
| 5 | 22,93 | 5 |
| 6 | 23,16 | 5 |

Fonte: Adaptado de Stewart (2016).

3.8.2 Seleção de enzimas potencialmente inibidas pela (R)-carvona através de busca farmacofórica no Ligand Expo

A busca farmacofórica no banco de dados do Ligand Expo (FENG; CHEN; MADDULA; AKCAN *et al.*, 2004) resultou na seleção de substâncias farmacoforicamente semelhantes à (R)-carvona, que estavam complexadas com as seguintes proteínas: 1GVQ

(KHAN et al., 2002), que é uma reductase; 1V7U (CHANG et al., 2004), que é uma sintase; 1X06 (GUO et al., 2005), que também é uma sintase; e 4S1F (STELLMACHER et al., 2015), que é uma aldolase (TABELA 9). Quando as sequências de aminoácidos de tais proteínas foram empregadas em buscas por sequências similares nos genomas de nematoides, obtiveram-se resultados com escores acima de 200 para todas elas. Entretanto, todos os resultados com escore acima de 200 foram no genoma geral de nematoda (taxid:6231), não sendo encontrado qualquer resultado no genoma de *Meloidogyne* spp.

Tabela 9 - Resultados da busca farmacofórica feita com as conformações mais estáveis da (R)-carvona no banco de dados do Ligand Expo.

| Ligante do Ligand Expo | Código do ligante | Enzima | Código da enzima | Escore de Tanimoto |
|--|-------------------|--|------------------|--------------------|
| Ciclohex-2-en-1-ona | A2Q | Pentaerithritol tetranitrato reductase | 1GVQ | 0,63636 |
| Pentan-2,4-diona | P2D | Fructose-6-fosfato aldolase 1 | 4S1F | 0,54546 |
| Difosfato de farnesil | FPP | Undecaprenil pirofosfato sintetase | 1V7U | 0,5 |
| (S)-[(2E,6E)-3,7,11-trimetildodecan-2,6,10-trienil] trihidrogen tiodifosfato | FPS | Undecaprenil pirofosfato sintetase | 1X06 | 0,5 |

Fonte: Do autor (2020).

3.8.3 Seleção de enzimas potencialmente inibidas pela (R)-carvona através de busca no BRENDA

A busca no *site* BRENDA (JESKE et al., 2018) resultou na seleção de três acetilcolinesterases: 1C2O, 1C2B (BOURNE et al., 1999) e 1EEA (RAVES et al., 1998), produzidas pelo *E. electricus*. Dentre as enzimas inicialmente selecionadas no BRENDA, estas são as únicas que podem ser inibidas pela (R)-carvona (ORHAN et al., 2008), e que possuem sequências de aminoácidos similares (escore > 200) no genoma de *Meloidogyne* spp. Quando as acetilcolinesterases selecionadas foram alinhadas, apresentaram diferenças de acordo com a 100-Dissimilaridade de Hamming (TABELA 10).

Tabela 10 - Sissimilaridade (%), calculada pelo Ugene 1.32.0, que considerou os gaps, após alinhamento com o Clustal Omega 1.2.1.

| | Número de resíduos de aminoácidos | 1C2O:A | 1C2O:B | 1C2O:C | 1C2O:D | 1EEA:A | 1C2B:A |
|---------------|---|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1C2O:A | 539 | 100 | 100 | 100 | 100 | 60 | 100 |
| 1C2O:B | 539 | 100 | 100 | 100 | 100 | 60 | 100 |
| 1C2O:C | 539 | 100 | 100 | 100 | 100 | 60 | 100 |
| 1C2O:D | 539 | 100 | 100 | 100 | 100 | 60 | 100 |
| 1EEA:A | 534 | 59 | 59 | 59 | 59 | 100 | 59 |
| 1C2B:A | 540 | 100 | 100 | 100 | 100 | 60 | 100 |

Inicialmente também foram selecionadas mais três enzimas no BRENDA: A0A0U2U334, que é uma liase; e Q9N1N9 e P81908, que são butirilcolinesterases. Entretanto, ao se buscar por dados na literatura sobre tais enzimas, observou-se que a ação inibitória da (*R*)-carvona sobre estas enzimas era muito fraca (ORHAN et al., 2008).

3.8.4 Comparação das acetilcolinesterases produzidas por *M. incognita* com aquelas produzidas por *E. electricus*

Especificamente no genoma de *M. incognita*, foram identificadas as seguintes acetilcolinesterases: ALF04210, AFV15797, AFJ54351, AFJ54350, AAQ06662, AAD25921, AAD02835, ANH21152 e ANH21151 (WHEELER; BARRETT; BENSON; BRYANT *et al.*, 2006). De acordo com cálculo realizado com o algoritmo Clustal Omega, no programa Ugene, estas sequências de aminoácidos apresentaram 42-54% de similaridade em relação às acetilcolinesterases produzidas pelo peixe elétrico (TABELA 11). Nenhuma estrutura tridimensional de acetilcolinesterase produzida por *Meloidogyne* spp. foi encontrada no RCSB Protein Data Bank.

Tabela 11 - Similaridade (%), calculada pelo Ugene 1.32.0, que considerou os Gaps. O cálculo feito após alinhamento com o Clustal Omega 1.2.1, através de 10 iterações.

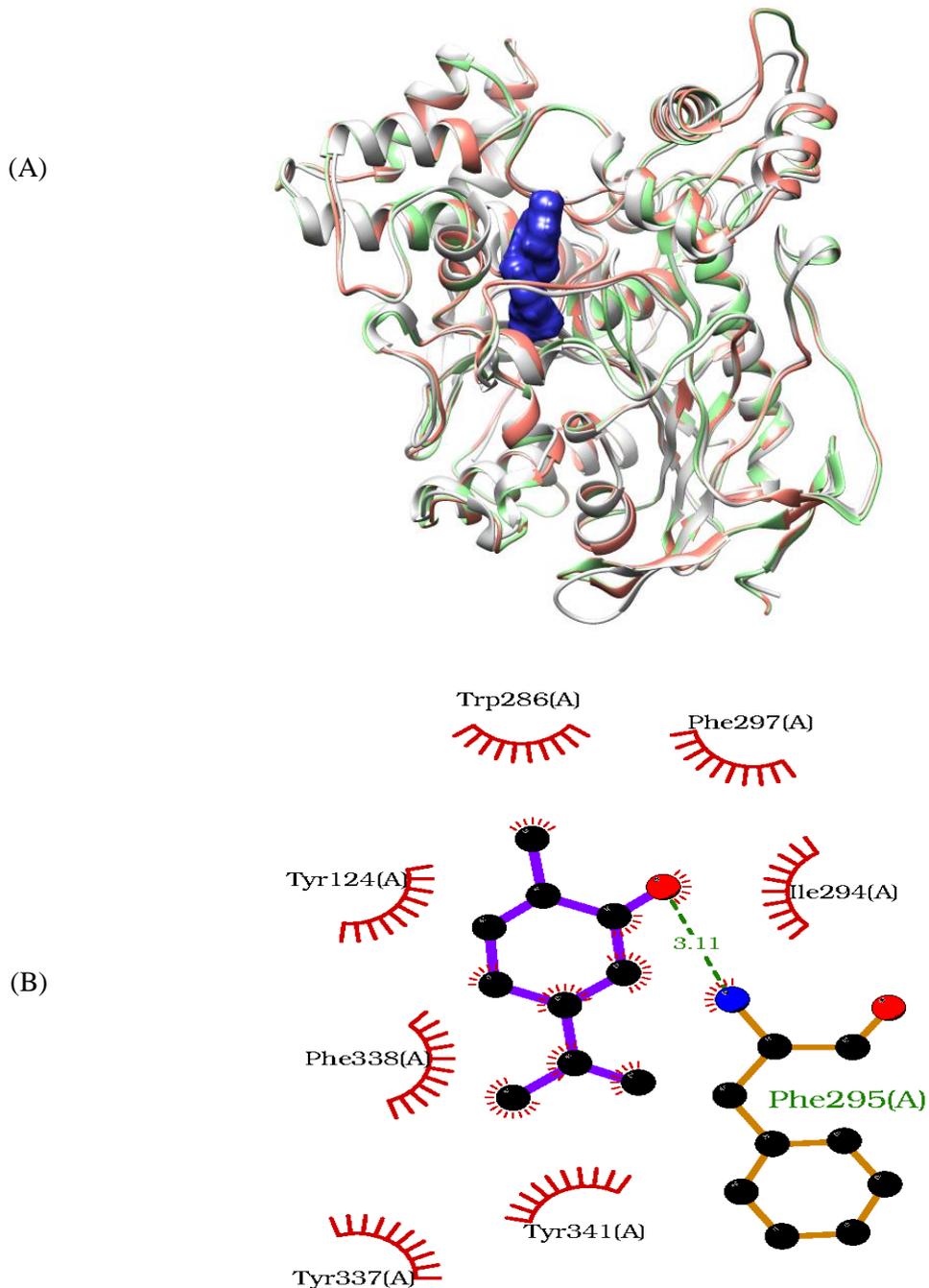
| | Resíduos de aminoácidos | 1C2O:A | 1C2O:B | 1C2O:C | 1C2O:D | 1EEA:A | 1C2B:A |
|-----------------|--------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 1C2O:A | 539 | 100 | 100 | 100 | 100 | 60 | 100 |
| 1C2O:B | 539 | 100 | 100 | 100 | 100 | 60 | 100 |
| 1C2O:C | 539 | 100 | 100 | 100 | 100 | 60 | 100 |
| 1C2O:D | 539 | 100 | 100 | 100 | 100 | 60 | 100 |
| 1EEA:A | 534 | 59 | 59 | 59 | 59 | 100 | 59 |
| 1C2B:A | 540 | 100 | 100 | 100 | 100 | 60 | 100 |
| ALF04210 | 624 | 42 | 42 | 42 | 42 | 43 | 42 |
| AFV15797 | 656 | 54 | 54 | 54 | 54 | 55 | 54 |
| AFJ54351 | 656 | 54 | 54 | 54 | 54 | 55 | 54 |
| AFJ54350 | 686 | 53 | 53 | 53 | 53 | 53 | 53 |
| AAQ06662 | 686 | 53 | 53 | 53 | 53 | 53 | 53 |
| AAD25921 | 656 | 54 | 54 | 54 | 54 | 55 | 54 |
| AAD02835 | 656 | 54 | 54 | 54 | 54 | 55 | 54 |
| ANH21152 | 686 | 53 | 53 | 53 | 53 | 53 | 53 |
| ANH21151 | 656 | 54 | 54 | 54 | 54 | 55 | 54 |
| ANH21150 | 686 | 52 | 52 | 52 | 52 | 52 | 52 |

Fonte: Do autor (2020).

3.8.5 Identificação do sítio de ligação das acetilcolinesterases de *E. electricus*

O ancoramento às cegas nas acetilcolinesterases 1C2O, 1C2B (BOURNE; GRASSI; BOUGIS; MARCHOT, 1999) e 1EEA (RAVES; GILES; SCHRAG; SCHMID et al., 1998), permitiu observar que a (R)-carvona, (S)-mentofurano, (R)-mentofurano, (S)-piperitona e (R)-piperitona, se complexavam a tais enzimas através da mesma cavidade (FIGURA 4).

Figura 4 - A) Estruturas tridimensionais das acetilcolinesterases 1C2O, 1C2B e 1EEA, alinhadas pelo programa Lovoalign 18.320 (MARTÍNEZ; ANDREANI; MARTÍNEZ, 2007), e contendo a (*R*)-carvona (em azul) em cavidade na qual foi ancorada as cegas pelo programa QuickVina-W (HASSAN; ALHOSSARY; MU; KWOH, 2017). Imagem gerada pelo programa UCSF Chimera 1.13.1 (PETTERSEN; GODDARD; HUANG; COUCH et al., 2004). B) Representação bidimensional da (*R*)-carvona ancorada as cegas na acetilcolinesterase1C2O, pelo programa QuickVina-W. Imagem gerada pelo programa LigProt+ 2.1 (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 1995).

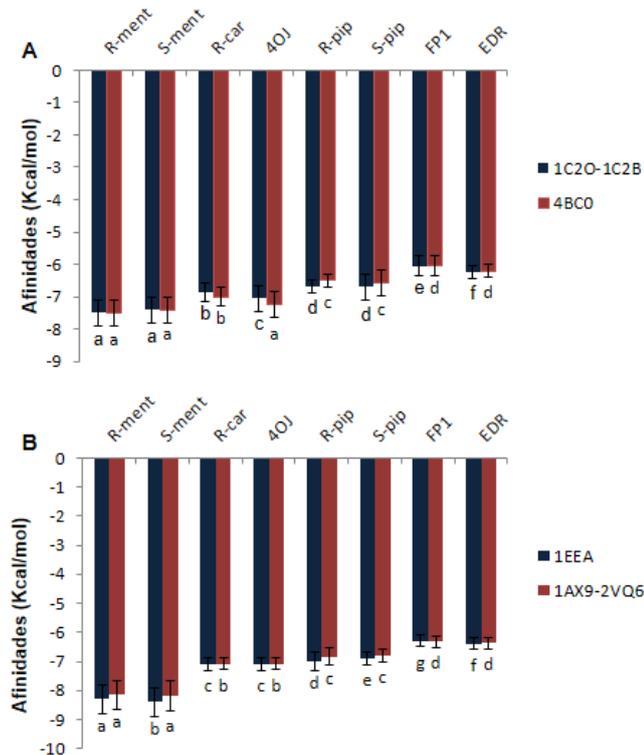


Fonte: Adaptações do autor (2020).

3.8.6 Ancoramento (*docking*) no sítio de ligação

Os ancoramentos feitos de forma refinada, nos sítios de ligação de várias acetilcolinesterases, permitiram observar que a (*R*)-carvona possui afinidade pelas acetilcolinesterases que é mais fraca do que as calculadas para (*R*)-mentofurano e (*S*)-mentofurano. Entretanto, a (*R*)-carvona se liga mais fortemente às enzimas do que (*R*)-piperitona, (*S*)-piperitona, EDR e FP1 para todas as enzimas ancoradas (FIGURA 5).

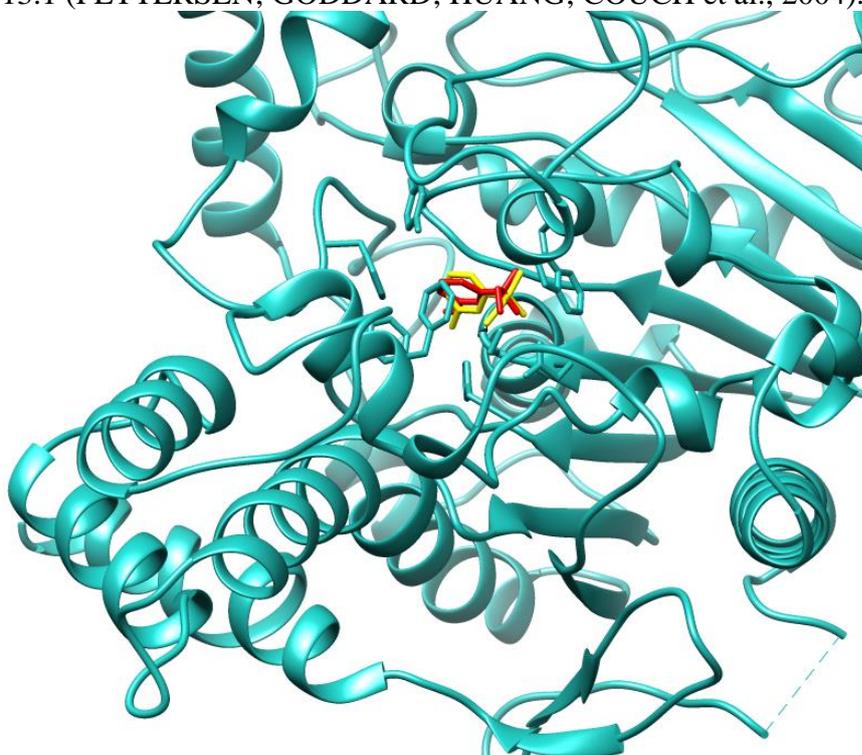
Figura 5 - Afinidades da (*R*)-carvona (R-car), (*R*)-mentofurano (R-ment), (*S*)-mentofurano (S-ment), (*R*)-piperitona (R-pip), (*S*)-piperitona (S-pip), Fosfato de 2-metilfenol (4OJ), *N*-etil-*N*-(3-hidroxifenil)-*N,N*-dimetilamônio (EDR) e (*ZZ*)-*N*-hidroxi-*N*-(vinil-2-ciclohex-3,5-die)-1-metilamônio (FP1) pelas acetilcolinesterases: A) 1C2O e 1C2B de *Electrophorus electricus* mais 4BC0 enzima produzida por outros organismos, com sequências de aminoácidos apresentando 95% de similaridade ou mais em relação a 1C2O e 1C2B; B) 1EEA de *E. electricus* mais 1AX9 e 2VQ6 enzimas produzidos por outros organismos, com sequências de aminoácidos apresentando 95% ou mais de similaridade em relação a 1EEA. Os valores foram calculados com o uso do programa QuickVina 2.1 (HANDOKO; OUYANG; SU; KWOH *et al.*, 2012). As barras de erro correspondem ao desvio padrão. Colunas com as mesmas letras, em cada gráfico e com a mesma cor, não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$).



Fonte: Do autor (2020).

Vale mencionar que os ancoramentos dos inibidores de acetilcolinesterases reproduziram os dados experimentais. Por exemplo, a estrutura do N-etil-N-(3-hidroxifenil)-N,N-dimetilamônio (EDR), ancorada na acetilcolinesterase 1XA9 (RAVELLI et al., 1998) pelo programa QuikVina 2.1 (HANDOKO et al., 2012), era coincidente com a mesma estrutura experimentalmente complexada à referida enzima (FIGURA 6).

Figura 6 - Estrutura tridimensional do inibidor N-etil-N-(3-hidroxifenil)-N,N-dimetilamônio (EDR) ancorada (amarelo) pelo programa QuikVina 2.1 (HANDOKO; OUYANG; SU; KWOH et al., 2012) na acetilcolinesterase 1XA9 (RAVELLI; RAVES; REN; BOURGEOIS et al., 1998) e experimentalmente complexada (vermelho) com a mesma enzima. Imagem gerada pelo programa UCSF Chimera 1.13.1 (PETTERSEN; GODDARD; HUANG; COUCH et al., 2004).



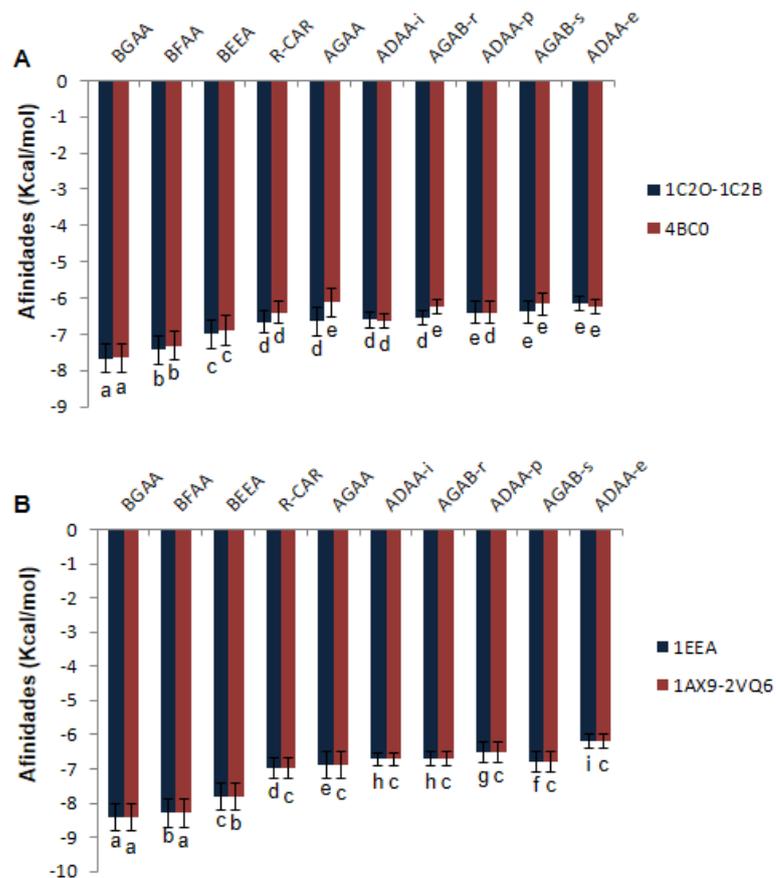
Fonte: Adaptações do autor (2020).

3.8.7 Seleção de análogos da (*R*)-carvona com maiores afinidades pelas acetilcolinesterases

As 10 substâncias farmacoforicamente mais parecidas com a (*R*)-carvona, no banco de dados do ZINC 15 (STERLING; IRWIN, 2015), tinham escores de Tanimoto entre 0,61-0,55. Várias apresentaram afinidades mais fracas pelas acetilcolinesterases do que a (*R*)-carvona

(FIGURA 7). Entretanto, para as substâncias BGAA, BFAA e BEEA, as afinidades foram mais fortes ao serem comparadas com a (*R*)-carvona.

Figura 7 - Afinidades da (*R*)-carvona (*R*-car), 5-etil-ciclohexan-1,3-diona (ADAA-e), 5-(propan-2-il)-ciclohexan-1,3-diona (ADAA-i), 5-propil-ciclohexan-1,3-diona (ADAA-p), (1*Z*,5*Z*) 1,5-dimetilciclooctan-1,5-dieno (AGAA), (5*R*)-5-metil-2-(propan-2-il)-ciclohexa-1,3-dien-1-ol (AGAB-r), (5*S*)-5-metil-2-(propan-2-il)-ciclohexa-1,3-dien-1-ol (AGAB-s), (4*aS*,5*R*)-8-metil-2-oxo-5-(propan-2-il)-3,4,5,6-tetraidronaftalen-4*a*(2*H*)-carbonitrilo (BGAA), (2*E*)-2-(2-metil-5-(peop-1-en-2il) ciclohex-2-en-1-ilideno) diidrazinocarboxilato de metila (BFAA) e (2*E*)-2-(2-metil-5-(propan-2-il)-ciclohexen-2-en-1-ilideno) hidrazinocarbotiamida (BEEA), pelas acetilcolinesterases: A) 1C2O e 1C2B de *Electrophorus electricus* mais 4BC0, enzima produzida por outros organismos, com seqüências de aminoácidos apresentando 95% de similaridade ou mais em relação a 1C2O e 1C2B; B) 1EEA de *E. electricus* mais 1AX9 e 2VQ6 enzimas produzidos por outros organismos, com seqüências de aminoácidos apresentando 95% ou mais de similaridade em relação a 1EEA. Os valores foram calculados com o uso do programa QuickVina 2.1 (HANDOKO; OUYANG; SU; KWOH *et al.*, 2012). As barras de erro correspondem ao desvio padrão. Colunas com as mesmas letras, em cada gráfico, não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$).



Fonte: Do autor (2020).

4 DISCUSSÃO

Dentre os melhores resultados no teste *in vitro* com J2 de *M. incognita*, em concentração única, encontram-se o acetato de *iso*-butila (TABELA 1), o que parece estar em consonância com os resultados descritos por Terra et al. (2018), segundo os quais tais substâncias são capazes de aumentar, *in vitro*, a mortalidade e reduzir a eclosão de J2 de *M. incognita*. Além disto, parece razoável que tais substâncias tenham atividades biológicas semelhantes por serem todas pertencentes à mesma função orgânica (no caso, éster) e terem estruturas químicas parecidas. Quanto à α -ionona, o resultado está de acordo com o trabalho realizado por Abdel-Rahman et al. (2012), que observou atividade *in vitro* desta substância contra *Caenorhabditis elegans* Maupas, que é um nematoide de vida livre geralmente usado como modelo em pesquisas. Em relação a undecan-2-ona, o resultado é coerente com a atividade *in vitro* desta substância contra *Bursaphelenchus xylophilus* Steiner & Buhner (GU et al., 2007), *M. javanica* e *M. incognita* (NTALLI et al., 2011).

Quanto aos resultados observados para *trans*-anetol e (*R*)-carvona, estão de acordo com os descritos por Ntalli et al. (2010), segundo os quais estes compostos são capazes de matar os J2 de *M. incognita* em experimentos *in vitro*. Todas as outras substâncias apresentaram resultados estatisticamente iguais aos controles negativos, o que foi surpreendente à luz dos relatos de atividade nematicida que podem ser encontrados na literatura para tais substâncias (ECHEVERRIGARAY; ZACARIA; BELTRAO, 2010; ELOH et al., 2019; NTALLI et al., 2010). Este é o caso, por exemplo, do eugenol que, segundo Eloh et al. (2019), foi ativo *in vitro* contra J2 de *M. incognita* em ensaios realizados na concentração de 600 $\mu\text{g/mL}$. Outro exemplo é o carveol, que é ativo *in vitro* contra J2 de *M. incognita* (ECHEVERRIGARAY; ZACARIA; BELTRAO, 2010). Também se pode citar o timol que, segundo Ntalli et al. (2010), apresentou atividade *in vitro* contra J2 de *M. incognita*, quando o nematoide foi exposto a solução a 500 $\mu\text{g/mL}$ durante 48 horas; e o carvacrol, que inibe *in vitro* a eclosão de J2 de *M. incognita*, quando expostos a soluções desta substância por entre uma a seis semanas (IBRAHIM; TRABOULSI; EL-HAJ, 2006), para além do trabalho de Nasiou et al. (2017) que também verificou atividade desta substância ao expor J2 de *M. javanica* a diferentes tempos e concentrações (12 a 96 horas e 62,4 a 1000 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). Da mesma maneira, substancias como timol, eugenol, nerolidol e geraniol, tem sua atividade descrita no trabalho de Abdel-Rahman et al. (2013), que

aumentaram as mortalidades de *C. elegans* (acima de 60%) quando empregaram soluções a 50 µg/mL. Em relação a estragol, apresentou CL₅₀ de 50 µg/mL quando J2 de *M. incognita* foram expostos por 96 horas (NTALLI et al., 2011), foram igualmente observadas no mesmo trabalho, atividades nematicidas de L-borneol e L-cânfora contra J2 de *M. incognita*, com CL₅₀ maior a 2000 µg/mL.

Talvez estas diferenças em relação a dados da literatura, no caso específico do trabalho de Abdel-Rahman et al. (2012), seja derivado do uso de espécies diferentes de nematoides das empregadas neste estudo, onde os autores empregaram *C. elegans*. O mesmo é observado no trabalho de GU et al. (2007), que empregou o *B. xylophilus* nos estudos. Já no trabalho de Ibrahim et al. (2006), acredita-se que o tempo de exposição dos nematoides pode ter de certa forma contribuído para tais diferenças. Por exemplo no trabalho de (NASIOU; GIANNAKOU, 2017), ao expor J2 e ovos de *M. javanica* em tempos entre 12 e 96 h e em concentrações entre 62,5 a 1000 µg/mL da solução do carvacrol, os autores observaram diferenciação dos resultados em função da concentração e do tempo de exposição. Também é observada redução na eclosão do J2 no trabalho de (IBRAHIM; TRABOULSI; EL-HAJ, 2006), ao expor ovos de *M. incognita* por um tempo de uma a seis semanas. Portanto, a padronização dos ensaios empregados estas substâncias pode ser que diminua tais diferenças observadas.

Com vistas a observar se as combinações de COVs poderiam acarretar em efeitos sinérgicos sobre o nematoide, de forma a resultar em composições eficientes como nematicidas, empregaram-se aqueles compostos mais ativos contra J2 de *M. incognita*, pertencentes a cada uma das classes de estruturas estudadas. Por exemplo, no caso das cetonas (nonan-2-ona, decan-2-ona, undecan-2-ona e dodecan-2-ona), que se diferenciavam apenas pelo número de átomos de carbono em suas estruturas (FIGURA 1), trabalhou-se apenas com a decan-2-ona, cuja atividade estava estatisticamente entre as melhores e apresentava custo de aquisição menor. De forma análoga, ao invés de trabalhar com a (*R*)- e (*S*)-carvona (FIGURA 1), optou-se por utilizar apenas a (*R*)-carvona, que tinha custo de aquisição menor. Dentre os ésteres testados, escolheu-se apenas o acetato de *iso*-butila (FIGURA 1), que tinha causado maior mortalidade de J2 no teste inicial do que os outros dois ésteres (TABELA 1).

Os incrementos na mortalidade de J2 do nematoide, obtidos para as combinações decan-2-ona/ α -ionona, decan-2-ona/*trans*-anetol, (*R*)-carvona/*trans*-anetol e α -ionona/*trans*-anetol (TABELA 2), parecem decorrentes de efeito sinérgico, o que sugere que tais

substâncias estejam agindo de formas diferentes sobre o nematoide, que possam impactar um ponto em comum no seu organismo. Talvez estejam agindo sobre diferentes rotas biosintéticas que levam à formação de um mesmo produto (CHOU; MARTIN, 2005). Entretanto, estes resultados não foram considerados para continuar com o trabalho, pois foram pouco expressivos os aumentos nas percentagens de J2 mortos. Vale mencionar que, segundo Ntalli et al. (2011), a combinação de (*R*)-carvona/*trans*-anetol, na concentração de 100/125 µg/mL, acarretou 53 % de imobilidade de J2 de *M. incognita*, após 48 h de exposição dos J2, quando o esperado com base apenas em efeito aditivo seria igual a 13% calculados. Talvez este efeito sinérgico mais pronunciado do que o observado no presente trabalho seja decorrente do fato de os autores terem avaliado a motilidade, enquanto no presente estudo o foco foi na mortalidade do J2. Quanto às outras combinações, não foram encontrados relatos sobre seus efeitos no nematoide.

A fluensulfona é um nematicida relativamente novo no mercado. No Brasil, por exemplo, passou a ser comercializado apenas a partir de 2013 (CORTE et al., 2014). Ela se mostra bastante eficiente contra, por exemplo, nematoides do gênero *Meloidogyne* (KEARN et al., 2014; SILVA et al., 2019). Entretanto, apresenta desvantagem como o custo elevado, e seus efeitos contra o homem (SILVA et al., 2019). Em decorrência, objetivou-se avaliar se seria possível elevar a eficiência deste nematicida e, conseqüentemente, minimizar algumas de suas desvantagens, pela combinação com decan-2-ona ou (*R*)-carvona. Embora não tenham sido encontrados dados dando conta dos efeitos de combinação da decan-2-ona com outras substâncias, para a escolha desta substância, foi tomado como referência o resultado do teste de combinação entre COVs realizado neste trabalho, que embora não tenha sido observado forte efeito sinérgico, parecia razoável esperar o incremento do efeito ao ser combinada com o nematicida fluensulfona. Já para a (*R*)-carvona e a fluensulfona, foram encontrados dados relatando combinação destas substâncias com outras diferentes, com incremento nas mortalidades do nematoide. Para exemplificar, a combinação de fluensulfona com fluoropirano aumentou a imobilidade e mortalidade *in vitro* de *M. incognita* e *M. javanica* (OKA; SAROYA, 2019). Já para a (*R*)-carvona é verificado no trabalho de Ntalli et al. (2011). Embora a percentagem de J2 de *M. incognita* mortos tenha sido aumentada (TABELA 3), todos os efeitos observados foram aditivos, o que sugeriu que não haveria ganho significativo no controle de *M. incognita* pela combinação da fluensulfona com estes COVs. A CL₅₀ observada neste trabalho para a (*R*)-carvona (525 ± 20 µg/mL) foi aproximadamente

duas vezes a relatada por Ntalli et al. (2010) em ensaios *in vitro* com J2 de *M. incognita* (120 µg/mL). Tal diferença não parece estranha se for levado em consideração que, no presente trabalho, o tempo de exposição do nematoide às soluções de (*R*)-carvona foi igual a 48h, enquanto no trabalho de Ntalli et al. (2010) o tempo foi de 96 h. Ainda vale observar que, apesar da CL₅₀ da (*R*)-carvona ser aproximadamente três e dez vezes maior do que as observadas para os nematicidas carbofurano e fluensulfona, respectivamente, o custo de aquisição da (*R*)-carvona é, em geral, 8 e 4 vezes menor do que o de aquisição do carbofurano e da fluensulfona, respectivamente. Além disto, a (*R*)-carvona apresenta baixíssima toxicidade para vários organismos (EPA, 2001), não constituindo perigo para o homem e ambiente, enquanto o carbofurano foi eliminado de vários mercados pela sua toxicidade contra organismos não alvos (EVERT; BRANCH, 2002; POHANKA, 2012). Quanto à fluensulfona, apesar de aparentemente ser menos tóxica para organismos não alvos do que o carbofurano, apresenta elevados índices de toxicidade para o homem (KEARN et al., 2014).

Embora a fase infectiva de *M. incognita* seja o J2, a maior parte da população do nematoide no campo se encontra na forma de ovos (KARSSEN; WESEMAEL; MOENS, 2013). Portanto, é de grande importância desenvolver produtos ativos contra o nematoide dentro do ovo. No caso específico da (*R*)-carvona, houve a redução da eclosão de J2 de *M. incognita* após exposição dos ovos às soluções desta substância (TABELA 4), o que sugere que a (*R*)-carvona pode ser utilizada para o desenvolvimento de produto ativo contra o nematoide ainda no ovo. Aparentemente, este resultado está coerente com o trabalho desenvolvido por Oka et al. (2000), que observaram 92% de redução na eclosão de J2 de *M. javanica* quando os ovos foram expostos ao óleo essencial de *Mentha spicata* L., cujo componente majoritário é a (*R*)-carvona. Vale mencionar que, no mesmo teste, o nematicida comercial carbofurano não reduziu a eclosão de J2 de *M. incognita* (TABELA 4). Apesar deste resultado ser inesperado para um nematicida comercial, ele está de acordo com o trabalho descrito por Terra et al. (2018), segundo os quais o carbofurano, na concentração de 500 µg/mL, não afetou a eclosão de J2 de *M. incognita*.

Como os testes *in vitro* tinham deixado evidente o potencial da (*R*)-carvona para o desenvolvimento de novos produtos comerciais para o controle de *M. incognita*, tal substância foi utilizada em testes *in vivo*, inicialmente com J2 do nematoide em tomateiros. Os resultados (TABELA 5) estão de acordo com os dados observados nos ensaios *in vitro* empregando a

(*R*)-carvona, como também para os controles positivos. Resultados similares, podem ser observados nos trabalhos de Oka et al. (2000), que verificaram redução do número de galhas em raízes de tomateiro inoculados com *M. javanica*, quando empregaram óleo essencial de *M. spicata* cujo componente majoritário é a (*R*)-carvona.

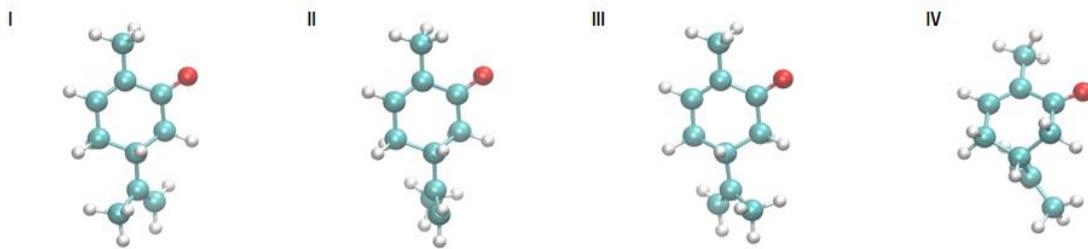
Como já dito anteriormente, a maior parte da população de *M. incognita* no campo se encontra na forma de ovos (KARSSSEN; WESEMAEL; MOENS, 2013). Logo, a (*R*)-carvona também foi utilizada em experimentos com ovos de *M. incognita* e tomateiros. As grandes diferenças observadas entre os números de ovos e de galhas de *M. incognita* em tomateiros inoculados com ovos do nematoide com pré-exposição ou não à solução da (*R*)-carvona (TABELA 6), sugerem que esta substância tenha ação de contato e talvez baixa persistência no solo, o que deve reduzir o seu tempo de contato com o nematoide e, conseqüentemente, a sua eficiência como nematicida. Este é um resultado totalmente indesejado para um nematicida não fumigante, que demanda persistência bem maior no solo (HUANG et al., 1983). Entretanto, tal comportamento permite o aproveitamento da substância para a formulação de nematicida fumigante. Afinal, quando os ovos do nematoide foram previamente expostos às soluções da (*R*)-carvona, os números de ovos e de galhas do nematoide nas raízes de tomateiro foram bem próximos dos observados para os nematicidas comerciais.

Conseqüentemente, avaliou-se o efeito *in vivo* dos vapores da (*R*)-carvona sobre os ovos do nematoide, o que permitiu observar redução nos números de ovos e de galhas do nematoide a valores estatisticamente iguais aos observados para o nematicida comercial (TABELA 7). Este resultado é similar ao observado por Oka et al. (2000), quando empregou vapores de óleos essenciais *M. spicata* e observou redução do índice de galhas e ovos de *M. incognita* em tomateiros. Para além disso, se observa a inibição no desenvolvimento dos ovos do mosquito *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae), quando foram empregados vapores da (*R*)-carvona, ao serem comparadas com as respectivas soluções (ZHRAN; ABDELGALEIL, 2011), o que sugere maior efetividade desta substância quando empregada na forma de fumigação. Conseqüentemente, a (*R*)-carvona apresenta potencial para ser utilizada no desenvolvimento de nematicida fumigante.

Uma vez observado que a (*R*)-carvona apresentava potencial para o desenvolvimento de novos produtos para o controle de *M. incognita*, buscou-se identificar *in silico*, o seu alvo proteico no nematoide, com vistas a utilizar tal informação futuramente, na obtenção de

análogos da (*R*)-carvona mais eficientes no controle de *M. incognita*. Para tanto, primeiro se buscou selecionar as conformações mais estáveis da (*R*)-carvona (TABELA 8). Vale mencionar que as diferenças entre elas se resumiam na rotação em torno do átomo de carbono cinco C5 (FIGURA 8).

Figura 8 - Estruturas tridimensionais das conformações mais estáveis da (*R*)-carvona calculadas pelo programa MOPAC 2016 (STEWART, 2016). Imagens geradas pelo programa VMD 1.9.3 (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996).



Fonte: Do autor (2020).

Em seguida, optou-se por buscar por estruturas químicas semelhantes à (*R*)-carvona no banco de dados do Ligand Expo (2015), o que permitiu selecionar substâncias que eram inibidoras de várias proteínas (TABELA 9). Logo, a (*R*)-carvona provavelmente seria capaz de inibir as mesmas proteínas. No entanto, como nenhuma de tais proteínas era produzida por nematoide e não se encontrou qualquer sequência de aminoácidos similar a estas proteínas nos genomas de *Meloidogyne*, pareceu provável que tais proteínas não poderiam ser produzidas por *M. incognita* e, conseqüentemente, não deveriam ser o alvo da (*R*)-carvona no nematoide.

Uma vez que a utilização do Ligand Expo não resultou em seleção do alvo proteico para a (*R*)-carvona em *M. incognita*, passou-se a utilizar o banco de dados do BRENDA (JESKE et al., 2018), no qual se buscou por enzimas capazes de serem inibidas pela (*R*)-carvona. Em seguida, as sequências de aminoácidos das enzimas selecionadas foram utilizadas em buscas no genoma de nematoides, no NCBI (WHEELER et al., 2006), o que permitiu identificar a acetilcolinesterase como a enzima alvo da (*R*)-carvona.

A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima geralmente encontrada entre as células nervosas e musculares, cuja ação fundamental é hidrolisar ou quebrar a acetilcolina (ACh) em acetato e colina logo após a transmissão neurológica, evitando aumento da concentração da ACh (HOUGHTON; REN; HOWES, 2006; KOSTELNIK; POHANKA, 2018). Nos

nematoides em geral, a acetilcolina (ACh) é o principal neurotransmissor que regula as funções motoras (KENNEDY; HARNETT, 2013; NONET et al., 1998). Em nematoides parasitas de plantas, a AChE assume um papel vital, atuando como quimiorreceptor e é responsável pelos movimentos, alimentação e resistência a nematicidas (DING; PENG; GAO, 2008; WU; PENG; HUANG, 2016).

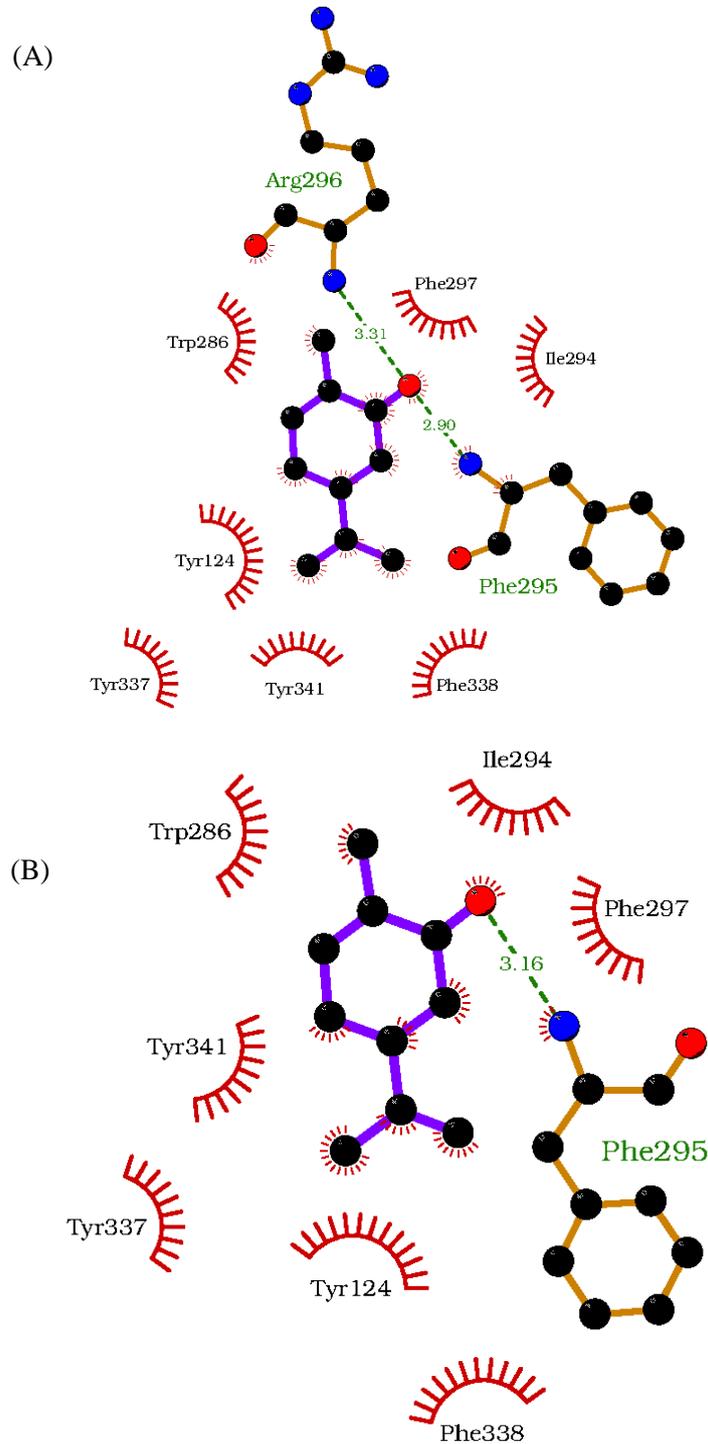
Embora não haja descrição das estruturas tridimensionais ou da ação inibitória da (*R*)-carvona para as acetilcolinesterases produzidas por nematoides, sabe-se que esta substância é capaz de inibir a acetilcolinesterase produzida por *E. electricus*, cuja estrutura tridimensional é conhecida: 1EEA (RAVES et al., 1998), 1C2O e 1C2B (BOURNE et al., 1999). Como tais enzimas apresentam sequências de aminoácidos similares àquelas produzidas por *M. incognita* (TABELA 11), parece justo utilizar as enzimas de *E. electricus* como modelos para estudar a ação da (*R*)-carvona sobre a acetilcolinesterase de *M. incognita*.

Como não havia qualquer descrição na literatura sobre o sítio de ligação da (*R*)-carvona às acetilcolinesterases de *E. electricus*, o mesmo foi identificado através de ancoramento (*docking*) as cegas. O resultado obtido está de acordo com os dados experimentais do trabalho de Carletti et al. (2013), que observaram que o ligante 4OJ se complexa à acetilcolinesterase 4BC0 através do mesmo sítio de ligação calculado para a (*R*)-carvona. De forma análoga, observou-se que o sítio de ligação calculado para a (*R*)-carvona era o mesmo experimentalmente descrito para os ligantes EDR (Ravelli et al. 1998) e FP1 (Harel et al. 2008) em outras acetilcolinesterases. Somando-se tais informações ao fato dos cálculos terem demonstrado que outros inibidores ((*S*)-mentofurano, (*R*)-mentofurano, (*S*)-piperitona e (*R*)-piperitona) da acetilcolinesterase de *E. electricus* (ORHAN et al., 2008) se ligam no mesmo sítio, tem-se como resultado a crença de que tal sítio (FIGURA 4) seja de fato o utilizado para a complexação da (*R*)-carvona.

Uma vez identificado o sítio de ligação das substâncias nas acetilcolinesterases produzidas por *E. electricus*, fizeram-se ancoramentos refinados de várias substâncias (*R*)-carvona e inibidores das acetilcolinesterases) em tal sítio, tanto nas enzimas produzidas por *E. electricus*, quanto em acetilcolinesterases estruturalmente similares a tais enzimas e produzidas por outros organismos. Observou-se que a afinidade da (*R*)-carvona pelas enzimas está entre os valores das afinidades dos inibidores das acetilcolinesterases, o que torna válida a hipótese de que a (*R*)-carvona pode agir no nematoide inibindo a acetilcolinesterase, que é vital para o seu organismo.

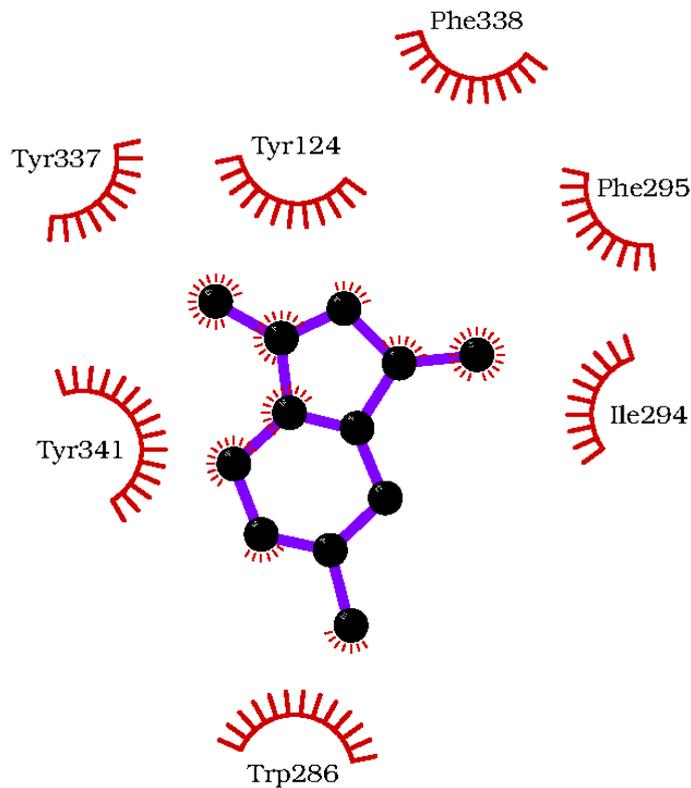
Embora a (*R*)-carvona ancorada na cavidade da enzima 1C2B forme duas ligações de hidrogênio com os resíduos Arg296 e Phe295 (FIGURAS 9a, 9b), que são interações intermoleculares mais fortes, a afinidade dela pela enzima é menor do que a observada para o (*R*)-mentofurano, que não forma ligações de hidrogênio com a enzima. Talvez esta fraca afinidade da (*R*)-carvona pela acetilcolinesterase seja devido ao tamanho da estrutura, que aparentemente não cria maiores interações hidrofóbicas com as regiões apolares dos resíduos de aminoácidos dentro da cavidade. Para exemplificar, na enzima 1C2O a (*R*)-carvona interage hidrofobicamente com quatro resíduos de aminoácidos (Figura 9b), nomeadamente: Tyr334, Phe330, His440 e Trp84, porém o (*R*)-mentofurano na mesma enzima e mesma cavidade (FIGURA 10), interage com sete resíduos de aminoácidos, nomeadamente: Trp286, Tyr341, Tyr337, Tyr124, Phe338, Phe295 e Ile294 e apresenta maior afinidade pela enzima em relação a (*R*)-carvona.

Figuras 9A e 9B - Estruturas bidimensionais (2D) da (A) (R)-carvona ancorada na enzima 1C2B e (B) (R)-carvona ancorada na enzima 1C2O. O ancoramento foi feito usando o programa QuickVina 2.1 (HANDOKO; OUYANG; SU; KWOH et al., 2012). As imagens foram geradas pelo programa LigPlot+ 2.1 (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 1995).



Fonte: Do autor (2020).

Figura 10 - Estrutura bidimensional (2D) do (*R*)-mentofurano ancorado na enzima 1C2O. O ancoramento foi feito usando o programa QuickVina 2.1 (HANDOKO; OUYANG; SU; KWOH *et al.*, 2012). As imagens foram geradas pelo programa LigPlot+ 2.1 (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 1995).



Fonte: Do autor (2020).

Uma vez que todos os dados indicavam que o alvo enzimático da (*R*)-carvona em *M. incognita* era a acetilcolinesterase, buscou-se averiguar *in silico* se tal informação poderia ser útil para selecionar substâncias mais ativas que a (*R*)-carvona contra o nematoide. Quando substâncias estruturalmente similares à (*R*)-carvona, presentes no banco de dados do ZINC 15 (STERLING; IRWIN, 2015), foram utilizadas em novos ancoramentos nas acetilcolinesterases, observou-se que as substâncias BGAA, BFAA e BEEA (Figura 3), apresentavam mais afinidades pelas enzimas (FIGURA 1) do que a (*R*)-carvona. Logo, a utilização do complexo (*R*)-carvona/acetilcolinesterase apresenta grande potencial para a geração de substâncias mais ativas contra *M. incognita* do que a (*R*)-carvona.

Isto parece fazer sentido para a (*R*)-carvona, que tem uma estrutura pequena em comparação com estes ligantes, assim como com o mentofurano. Para além do tamanho da estrutura, a presença de duplas ligações conjugadas nos ligantes BGAA, BFAA e BEEA (Figura 3), que apresentaram melhores afinidades que a (*R*)-carvona, (Figura 7) e a presença

de átomos com elevados valores de eletronegatividades podem estar contribuindo para o fenômeno de ressonância e conseqüentemente polarização da molécula, o que pode incrementar as interações moleculares. No caso específico do ligante BGAA, talvez a ressonância entre as ligação duplas C=C e o grupo C=O aumente a possibilidade de interações moleculares com os resíduos de aminoácidos dentro da cavidade da enzima.

5 CONCLUSÃO

Observou-se que a (*R*)-carvona tem atividade *in vitro* contra *M. incognita*, de forma a aumentar a mortalidade e inibir a eclosão de J2 dos nematoides. Verificou-se ainda, que a (*R*)-carvona pode reduzir o parasitismo e a reprodução do *M. incognita in vivo*, de forma a diminuir a formação de galhas e de ovos de nematide em tomateiros cultivados em substrato. De acordo com o estudo *in silico*, esta substância age sobre o nematoide através da inibição da sua acetilcolinesterase, que é uma enzima de grande importância para o nematoide. Utilizando a (*R*)-carvona e a acetilcolinesterase como modelos teóricos, foi possível chegar a análogos da (*R*)-carvona com mais afinidades pela enzima, o que sugere que tais substâncias terão maiores atividades nematicidas do que a (*R*)-carvona. Consequentemente, a (*R*)-carvona e a acetilcolinesterase apresentam potenciais para serem utilizadas no desenvolvimento de novos produtos nematicidas.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAHMAN, F. H.; ALANIZ, N. M.; SALEH, M. A. Nematicidal activity of terpenoids. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 48, n. 1, p. 16-22, 2013.
- ALLOUCHE, A. R. Gabedit—A graphical user interface for computational chemistry softwares. **Journal of computational chemistry**, v. 32, n. 1, p. 174-182, 2011.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- BARTLETT, M. S. Properties of sufficiency and statistical tests. **Proceedings of the Royal Society of London. Series A-Mathematical and Physical Sciences**, v. 160, n. 901, p. 268-282, 1937.
- BELAN, L. L.; FONSECA, S. O.; JESUS, J.; MATTA, F. D. P. *et al.* Screening of cherry tomato genotypes for resistance to *Meloidogyne incognita* and *M. javanica*. **Nematologia Brasileira**, v. 33, n. 3, p. 256-259, 2009.
- BERMAN, H.; HENRICK, K.; NAKAMURA, H.; MARKLEY, J. L. The worldwide Protein Data Bank (wwPDB): ensuring a single, uniform archive of PDB data. **Nucleic acids research**, v. 35, n. suppl.1, p. D301-D303, 2006.
- BERMAN, H. M.; BHAT, T. N.; BOURNE, P. E.; FENG, Z. *et al.* The Protein Data Bank and the challenge of structural genomics. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 7, n. 11s, p. 957, 2000.
- BORATYN, G. M.; SCHÄFFER, A. A.; AGARWALA, R.; ALTSCHUL, S. F. *et al.* Domain enhanced lookup time accelerated BLAST. **Biology direct**, v. 7, p. 12-12, 2012.
- BOURNE, Y.; GRASSI, J.; BOUGIS, P. E.; MARCHOT, P. Conformational flexibility of the acetylcholinesterase tetramer suggested by X-ray crystallography. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 43, p. 30370-30376, 1999.
- CAMPOS, V. P.; DE PINHO, R. S. C.; FREIRE, E. S. Volatiles Produced By Interacting Microorganisms Potentially Useful For The Control Of Plant Pathogens. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 3, p. 525-535, may-jun 2010.
- CARLETTI, E. N.; COLLETIER, J.-P.; SCHOPFER, L. M.; SANTONI, G. *et al.* Inhibition pathways of the potent organophosphate CBDP with cholinesterases revealed by X-ray crystallographic snapshots and mass spectrometry. **Chemical research in toxicology**, v. 26, n. 2, p. 280-289, 2013.
- CHANG, S. Y.; KO, T. P.; CHEN, A. P. C.; WANG, A. H. J. *et al.* Substrate binding mode and reaction mechanism of undecaprenyl pyrophosphate synthase deduced from crystallographic studies. **Protein Science**, v. 13, n. 4, p. 971-978, 2004.

CHEN, S. Y.; DICKSON, D. W. A technique for determining live second-stage juveniles of *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, v. 32, n. 1, p. 117-121, mar. 2000.

CHOU, T. C.; MARTIN, N. **CompuSyn for drug combinations**: PC software and user's guide: a computer program for quantitation of synergism and antagonism in drug combinations, and the determination of IC50 and ED50 and LD50 values. ComboSyn, Paramus, NJ, 2005.

COORDINATORS, N. R. Database resources of the national center for biotechnology information. **Nucleic acids research**, v. 44, n. Database issue, p. D7, 2016.

CORTE, G. D.; FARIA, D. S.; BENETTI, E.; BRITES, M. et al. **Eficiência do novo nematocida fluensulfone 480 EC (Nimitztm) no controle de *Meloidogyne exigua* em *Coffea arabica* L.** 2014.

COSTA, B. O. G.; DE OLIVEIRA, M. H.; SENÔ, K. C. A. Efeito do extrato aquoso de Hortelã e Camará no desenvolvimento do tomateiro infestado por *Meloidogyne javanica*. **Nucleus**, v. 13, n. 1, p. 15-24, 2016.

CSIZMADIA, P. **MarvinSketch and MarvinView**: molecule applets for the World Wide Web. 367a369.

DING, Z.; PENG, D.; GAO, B. Advances in studies on nematode acetylcholinesterases. **Zhiwu Baohu**, v. 34, n. 3, p. 18-21, 2008.

DUNN, O. J.; CLARK, V. A. **Applied statistics**: analysis of variance and regression. Wiley New York, 1987.

ECHEVERRIGARAY, S.; ZACARIA, J.; BELTRAO, R. Nematicidal Activity of Monoterpenoids Against the Root-Knot Nematode *Meloidogyne incognita*. **Phytopathology**, v. 100, n. 2, p. 199-203, feb 2010.

ELOH, K.; KPEGBA, K.; SASANELLI, N.; KOUMAGLO, H. K. et al. Nematicidal activity of some essential plant oils from tropical West Africa. **International Journal of Pest Management**, p. 1-11, 2019.

EPA, U. S. United States Environmental Protection Agency. **Quality Assurance Guidance Document-Model Quality Assurance Project Plan for the PM Ambient Air**, 2, 2001.

EVERT, S.; BRANCH, E. M. **Environmental fate of Carbofuran**. California Environmental Protection Agency, Department of Pesticide Regulation, Sacramento, 2002.

FENG, Z.; CHEN, L.; MADDULA, H.; AKCAN, O. *et al.* Ligand Depot: a data warehouse for ligands bound to macromolecules. **Bioinformatics**, v. 20, n. 13, p. 2153-2155, 2004.

FERRAZ, L. C. C. B.; BROWN, D. J. F. **Nematologia de plantas: fundamentos e importância**. Manaus: Norma, 2016. 251 p.

FERREIRA, D. F. SISVAR: A Computer Statistical Analysis System. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov-dec. 2011.

FREIRE, E. S.; CAMPOS, V. P.; PINHO, R. S. C.; OLIVEIRA, D. F. *et al.* Volatile Substances Produced by *Fusarium oxysporum* from Coffee Rhizosphere and Other Microbes affect *Meloidogyne incognita* and *Arthrobotrys conoides*. **Journal of Nematology**, v. 44, n. 4, p. 321-328, dec. 2012.

GRIFFITHS, E. T.; HARRIES, P. C.; JEFFCOAT, R.; TRUDGILL, P. W. Purification and properties of α -pinene oxide lyase from *Nocardia* sp. strain P18.3. **J. Bacteriol.**, v. 169, n. 11, p. 4980-4983, 1987.

GU, Y.-Q.; MO, M.-H.; ZHOU, J.-P.; ZOU, C.-S. *et al.* Evaluation and identification of potential organic nematicidal volatiles from soil bacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, n. 10, p. 2567-2575, 2007.

GUO, R.-T.; KO, T.-P.; CHEN, A. P. C.; KUO, C.-J. *et al.* Crystal Structures of Undecaprenyl Pyrophosphate Synthase in Complex with Magnesium, Isopentenyl Pyrophosphate, and Farnesyl Thiopyrophosphate ROLES OF THE METAL ION AND CONSERVED RESIDUES IN CATALYSIS. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 21, p. 20762-20774, 2005.

HANDOKO, S. D.; OUYANG, X.; SU, C. T. T.; KWOH, C. K. *et al.* QuickVina: accelerating AutoDock Vina using gradient-based heuristics for global optimization. **IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics (TCBB)**, v. 9, n. 5, p. 1266-1272, 2012.

HAREL, M.; SONODA, L. K.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. *et al.* Crystal structure of thioflavin T bound to the peripheral site of *Torpedo californica* acetylcholinesterase reveals how thioflavin T acts as a sensitive fluorescent reporter of ligand binding to the acylation site. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 25, p. 7856-7861, 2008.

HASSAN, N. M.; ALHOSSARY, A. A.; MU, Y.; KWOH, C.-K. Protein-ligand blind docking using QuickVina-W with inter-process spatio-temporal integration. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 15451, 2017.

HOUGHTON, P. J.; REN, Y.; HOWES, M.-J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. **Natural Product Reports**, v. 23, n. 2, p. 181-199, 2006.

HUANG, S. P.; RESENDE, I. C.; DE SOUZA, D. E.; CAMPOS, V. P. Effect of aldicarb, ethoprop, and carbofuran on control of coffee root-knot nematode, *Meloidogyne exigua*. **Journal of nematology**, v. 15, n. 4, p. 510, 1983.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: visual molecular dynamics. **Journal of molecular graphics**, v.14, n. 1, p. 33-38, 1996.

- IBRAHIM, S. K.; TRABOULSI, A. F.; EL-HAJ, S. Effect of essential oils and plant extracts on hatching, migration and mortality of *Meloidogyne incognita*. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 45, n. 3, p. 238-246, 2006.
- ISHIKAWA, Y. A script for automated 3-dimensional structure generation and conformer search from 2-dimensional chemical drawing. **Bioinformation**, v. 9, n. 19, p. 988, 2013.
- JANG, J. Y.; LE DANG, Q.; CHOI, Y. H.; CHOI, G. J. *et al.* Nematicidal activities of 4-quinolone alkaloids isolated from the aerial part of *Triumfetta grandidens* against *Meloidogyne incognita*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 1, p. 68-74, 2015.
- JARDIM, I. N.; OLIVEIRA, D. F.; SILVA, G. H.; CAMPOS, V. P. *et al.* (E)-cinnamaldehyde from the essential oil of *Cinnamomum cassia* controls *Meloidogyne incognita* in soybean plants. **Journal of Pest Science**, v. 91, n. 1, p. 479-487, 2018.
- JESKE, L.; PLACZEK, S.; SCHOMBURG, I.; CHANG, A. *et al.* BRENDA in 2019: a European ELIXIR core data resource. **Nucleic acids research**, v. 47, n. D1, p. D542-D549, 2018.
- JONES, J. T.; HAEGEMAN, A.; DANCHIN, E. G. J.; GAUR, H. S. *et al.* TOP 10 PLANT PARASITIC NEMATODES IN MOLECULAR PLANT PATHOLOGY. **Journal of Nematology**, v. 46, n. 2, p. 181-181, jun. 2014.
- KARSSSEN, G.; WESEMAEL, W.; MOENS, M. Root-knot nematodes. **Plant nematology**, n. 2, p. 73-108, 2013.
- KEARN, J.; LUDLOW, E.; DILLON, J.; O'CONNOR, V. *et al.* Fluensulfone is a nematicide with a mode of action distinct from anticholinesterases and macrocyclic lactones. **Pesticide biochemistry and physiology**, 109, p. 44-57, 2014.
- KENNEDY, M. W.; HARNETT, W. **Parasitic nematodes: molecular biology, biochemistry and immunology**. CABI, 2013.
- KHAN, H.; HARRIS, R. J.; BARNA, T.; CRAIG, D. H. *et al.* Kinetic and structural basis of reactivity of pentaerythritol tetranitrate reductase with NADPH, 2-cyclohexenone, nitroesters, and nitroaromatic explosives. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 24, p. 21906-21912, 2002.
- KIM, T. Y.; JANG, J. Y.; YU, N. H.; CHI, W. J. *et al.* Nematicidal activity of grammicin produced by *Xylaria grammica* KCTC 13121BP against *Meloidogyne incognita*. **Pest Management Science**, v. 74, n. 2, p. 384-391, 2018.
- KOSTELNIK, A.; POHANKA, M. **Inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase by a plant secondary metabolite boldine**. *BioMed research international*, 2018.

KYNDT, T.; FERNANDEZ, D.; GHEYSEN, G. Plant-Parasitic Nematode Infections in Rice: Molecular and Cellular Insights. **Annual Review of Phytopathology**, v. 52, 52, p. 135-153, 2014.

LEŠNIK, S.; ŠTULAR, T.; BRUS, B.; KNEZ, D. *et al.* LiSiCA: a software for ligand-based virtual screening and its application for the discovery of butyrylcholinesterase inhibitors. **Journal of chemical information and modeling**, v. 55, n. 8, p. 1521-1528, 2015.

LI, Y. C.; JI, H.; LI, H. T. Gas chromatography-mass spectrometric analysis of nematicidal essential oil of *Valeriana amurensis* P Smirn ex Kom (Valerianaceae) roots and its activity against *Heterodera avenae*. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 9, p. 1673-1678, 2015.

MARTÍ, R.; LEIVA-BRONDO, M.; LAHOZ, I.; CAMPILLO, C. *et al.* Polyphenol and L-ascorbic acid content in tomato as influenced by high lycopene genotypes and organic farming at different environments. **Food chemistry**, v. 239, p. 148-156, 2018.

MARTÍNEZ, L.; ANDREANI, R.; MARTÍNEZ, J. M. Convergent algorithms for protein structural alignment. **BMC bioinformatics**, v. 8, n. 1, p. 306, 2007.

MCFADDEN, D. **Conditional logit analysis of qualitative choice behavior**. 1973.

MORRIS, G. M.; HUEY, R.; LINDSTROM, W.; SANNER, M. F. *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of computational chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785-2791, 2009.

NASIOU, E.; GIANNAKOU, I. O. The potential use of carvacrol for the control of *Meloidogyne javanica*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 149, n. 2, p. 415-424, 2017.

NONET, M. L.; SAIFEE, O.; ZHAO, H.; RAND, J. B. *et al.* Synaptic transmission deficits in *Caenorhabditis elegans* synaptobrevin mutants. **Journal of Neuroscience**, v. 18, n. 1, p. 70-80, 1998.

NONO-WOMDIM, R.; SWAI, I. S.; MROSSO, L. K.; CHADHA, M. L. *et al.* Identification of root-knot nematode species occurring on tomatoes in Tanzania and resistant lines for their control. **Plant disease**, v. 86, n. 2, p. 127-130, 2002.

NTALLI, N. G.; FERRARI, F.; GIANNAKOU, I.; MENKISSOGLU-SPIROUDI, U. Phytochemistry and Nematicidal Activity of the Essential Oils from 8 Greek Lamiaceae Aromatic Plants and 13 Terpene Components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 13, p. 7856-7863, jul. 2010.

NTALLI, N. G.; FERRARI, F.; GIANNAKOU, I.; MENKISSOGLU-SPIROUDI, U. Synergistic and antagonistic interactions of terpenes against *Meloidogyne incognita* and the nematicidal activity of essential oils from seven plants indigenous to Greece. **Pest Management Science**, v. 67, n. 3, p. 341-351, mar. 2011.

O'BOYLE, N. M.; BANCK, M.; JAMES, C. A.; MORLEY, C. et al. Open Babel: An open chemical toolbox. **Journal of cheminformatics**, v. 3, n. 1, p. 33, 2011.

OKA, Y.; NACAR, S.; PUTIEVSKY, E.; RAVID, U. *et al.* Nematicidal activity of essential oils and their components against the root-knot nematode. **Phytopathology**, v. 90, n. 7, p. 710-715, 2000.

OKA, Y.; SAROYA, Y. Effect of fluensulfone and fluopyram on the mobility and infection of second-stage juveniles of *Meloidogyne incognita* and *M. javanica*. **Pest Management Science**, v. 75, n. 8, p. 2095-2106, aug. 2019.

OKA, Y.; SHUKER, S.; TKACHI, N. Systemic nematicidal activity of fluensulfone against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on pepper. **Pest Management Science**, v. 68, n. 2, p. 268-275, feb. 2012.

OKONECHNIKOV, K.; GOLOSOVA, O.; FURSOV, M.; UGENE, T. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. **Bioinformatics**, 28, n. 8, p. 1166-1167, 2012.

ORHAN, I.; KARTAL, M.; KAN, Y.; ŞENER, B. Activity of essential oils and individual components against acetyl and butyrylcholinesterase. **Zeitschrift fuer Naturforschung C**, v. 63, n. 7-8, p. 547-553, 2008.

OZDEMIR, E.; GOZEL, U. Nematicidal activities of essential oils against *Meloidogyne incognita* on tomato plant. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 27, n. 6, p. 4511-4517, 2018.

PETTERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; COUCH, G. S. *et al.* UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of computational chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605-1612, 2004.

POHANKA, M. Acetylcholinesterase inhibitors: a patent review (2008–present). **Expert opinion on therapeutic patents**, v. 22, n. 8, p. 871-886, 2012.

RAVELLI, R. B. G.; RAVES, M. L.; REN, Z.; BOURGEOIS, D. *et al.* Static Laue diffraction studies on acetylcholinesterase. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 54, n. 6, p. 1359-1366, 1998.

RAVES, M. L.; GILES, K.; SCHRAG, J. D.; SCHMID, M. F. *et al.* Quaternary structure of tetrameric acetylcholinesterase. In: **Structure and Function of Cholinesterases and Related Proteins**: Springer, 1998. p. 351-356.

RITZ, C.; STREIBIG, J. C. Bioassay analysis using R. **J Stat Softw**, v. 12, n. 5, p. 1-22, 2005.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, p. 507-512, 1974.

SEID, A.; FININSA, C.; MEKETE, T.; DECRAEMER, W. *et al.* Tomato (*Solanum lycopersicum*) and root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.)—a century-old battle. **Nematology**, v. 17, n. 9, p. 995-1009, 2015.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, v. 52, n. 3/4, p. 591-611, 1965.

SIEVERS, F.; HIGGINS, D. G. Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences. **Protein Science**, v. 27, n. 1, p. 135-145, 2018.

SILVA, J. D.; LOFFREDO, A.; DA ROCHA, M. R.; BECKER, J. O. Efficacy of new nematicides for managing *Meloidogyne incognita* in tomato crop. **Journal of Phytopathology**, v. 167, n. 5, p. 295-298, may. 2019.

STELLMACHER, L.; SANDALOVA, T.; LEPTIHN, S.; SCHNEIDER, G. *et al.* Acid–Base Catalyst Discriminates between a Fructose 6-Phosphate Aldolase and a Transaldolase. **ChemCatChem**, v. 7, n. 19, p. 3140-3151, 2015.

STERLING, T.; IRWIN, J. J. ZINC 15–ligand discovery for everyone. **Journal of chemical information and modeling**, v. 55, n. 11, p. 2324-2337, 2015.

STEWART, J. J. P. MOPAC2016; Stewart Computational Chemistry: Colorado Springs, CO, USA, 2016. **There is no corresponding record for this reference.**

TEAM, R. **R Studio**: integrated development for R. RStudio, Inc., Boston, MA, v. 42, p. 14, 2015.

TEAM, R. C. R: **A language and environment for statistical computing**. 2013.

TERRA, W. C.; CAMPOS, V. P.; MARTINS, S. J.; COSTA, L. *et al.* Volatile organic molecules from *Fusarium oxysporum* strain 21 with nematicidal activity against *Meloidogyne incognita*. **Crop Protection**, v. 106, p. 125-131, apr. 2018.

TERRA, W. C.; CAMPOS, V. P.; PEDROSO, M. P.; DA COSTA, A. L. *et al.* Volatile molecules of *Fusarium oxysporum* strain 21 are retained in water and control *Meloidogyne incognita*. **Biological Control**, v. 112, p. 34-40, sep. 2017.

TOSCO, P.; BALLE, T.; SHIRI, F. Open3DALIGN: an open-source software aimed at unsupervised ligand alignment. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 25, n. 8, p. 777-783, aug. 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, n. 2, p. 455-461, 2010.

VOS, C.; SCHOUTEDEN, N.; VAN TUINEN, D.; CHATAGNIER, O. *et al.* Mycorrhiza-induced resistance against the root e knot nematode *<i style="mso-bidi-font-style: normal">*

Meloidogyne incognita involves priming of defense gene responses in tomato. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 60, p. 45-54, 2013.

WALLACE, A. C.; LASKOWSKI, R. A.; THORNTON, J. M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. **Protein engineering, design and selection**, v. 8, n. 2, p. 127-134, 1995.

WHEELER, D. L.; BARRETT, T.; BENSON, D. A.; BRYANT, S. H. *et al.* Database resources of the national center for biotechnology information. **Nucleic acids research**, v. 35, n. suppl.1, p. D5-D12, 2006.

WU, Q.; PENG, D.; HUANG, W. Research progress on structure and function of acetylcholinesterase in plant parasitic nematodes. **Zhiwu Baohu**, v. 42, n. 3, p. 17-21, 80, 2016.

XU, Y. Y.; LU, H.; WANG, X.; ZHANG, K. Q. *et al.* Effect of Volatile Organic Compounds from Bacteria on Nematodes. **Chemistry & Biodiversity**, v.12, n. 9, p. 1415-1421, sep. 2015.

ZAHRAN, H. E.-D. M.; ABDELGALEIL, S. A. M. Insecticidal and developmental inhibitory properties of monoterpenes on Culex pipiens L.(Diptera: Culicidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 14, n. 1, p. 46-51, 2011.

ZHAI, Y. L.; SHAO, Z. Z.; CAI, M. M.; ZHENG, L. Y. *et al.* Multiple Modes of Nematode Control by Volatiles of Pseudomonas putida 1A00316 from Antarctic Soil against Meloidogyne incognita. **Frontiers in Microbiology**, v. 9. feb. 2018.