



VIVIANE APARECIDA COSTA CAMPOS

**PROSPECÇÃO E ESTUDO *IN SILICO* DE
METABÓLITOS PRODUZIDOS POR ESPÉCIES
VEGETAIS PARA O CONTROLE DE *Meloidogyne*
*spp.***

LAVRAS - MG

2014

VIVIANE APARECIDA COSTA CAMPOS

**PROSPECÇÃO E ESTUDO *IN SILICO* DE METABÓLITOS
PRODUZIDOS POR ESPÉCIES VEGETAIS PARA O CONTROLE DE
Meloidogyne spp.**

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

Orientador

Dr. Denilson Ferreira de Oliveira

LAVRAS - MG

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Campos, Viviane Aparecida Costa.

Prospecção e estudo in silico de metabólitos produzidos por espécies vegetais para o controle de *Meloidogyne* spp. / Viviane Aparecida Costa Campos. – Lavras : UFLA, 2014.

163 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Denilson Ferreira de Oliveira.

Bibliografia.

1. *Cryptocarya aschersoniana*. 2. Annonaceae. 3. *Guatteria australis*. 4. Lauraceae. 5. Nematóides de galhas. 6. Modelagem computacional. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 632.96

VIVIANE APARECIDA COSTA CAMPOS

**PROSPECÇÃO E ESTUDO *IN SILICO* DE METABÓLITOS
PRODUZIDOS POR ESPÉCIES VEGETAIS PARA O CONTROLE DE
*Meloidogyne spp.***

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

APROVADA em 4 de agosto de 2014.

Dr. Geraldo Humberto Silva	UFV
Dr. Itamar Ferreira de Souza	UFLA
Dra. Marcia Paranho Veloso	UNIFAL/Alfenas
Dr. Vicente Paulo Campos	UFLA

Dr. Denilson Ferreira de Oliveira
Orientador

LAVRAS - MG

2014

A meu pai (*in memoriam*), minha mãe, meu irmão e minha filha,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Química, pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Departamento de Fitopatologia, em especial ao Laboratório de Nematologia, pela realização dos testes biológicos.

Aos colegas do Laboratório de Nematologia.

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

À CAPES, pela concessão de bolsa.

Ao professor Denilson, pela convivência durante todos estes anos, pela orientação, amizade e confiança.

Aos funcionários do Departamento de Química.

Aos colegas do Laboratório de Produtos Naturais.

À amiga DeJane, por todos os momentos, principalmente porque sempre estive pronta a me ajudar.

À minha mãe, Sebastiana, pelo amor e dedicação, pois sem ela nada seria possível.

Ao meu irmão, Leandro, meu eterno amigo, pelo exemplo e apoio.

À minha filha, Júlia, pelo carinho, amor e alegria.

Aos meus familiares que sempre me apoiaram.

E a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para esta conquista.

A todos os meus mais sinceros agradecimentos.

RESUMO GERAL

Com vistas a contribuir para o desenvolvimento de novos produtos para o controle de nematoides parasitas de plantas do gênero *Meloidogyne*, buscou-se estudar plantas para identificar aquelas com capacidade de produzir substâncias potencialmente úteis nesta área. No primeiro artigo foram estudadas plantas da família Annonaceae, o que resultou na seleção da espécie *Guatteria australis* pelo fato de a mesma ter se mostrado capaz de produzir substâncias ativas contra o nematoide das galhas, *Meloidogyne incognita*. O fracionamento da fração solúvel em diclorometano do extrato metanólico das cascas desta espécie resultou na purificação de quatro substâncias que, segundo análises por ressonância magnética nuclear, trata-se de alcaloides. A três delas já foram atribuídas as estruturas de lisicamina, *trans*-N-feruloiltiramina e oxipseudopalmatina, enquanto a quarta substância se encontra em fase de identificação. No artigo 2, dando continuidade a trabalho previamente realizado de seleção de plantas ativas contra *Meloidogyne exigua*, buscou-se isolar e identificar as substâncias nematicidas presentes nas cascas de *Cryptocarya aschersoniana*. Após várias etapas de fracionamento por métodos cromatográficos, isolaram-se duas substâncias ativas contra o nematoide que, com base em análises espectroscópicas, foram identificadas como sendo a (*E*)-6-estirilpiran-2-ona e (*R*)-goniotalamina. Esta última também se mostrou ativa contra o nematoide *M. incognita*, tendo reduzido o número de ovos deste parasita em plantas de tomateiros. O estudo *in silico* das duas substâncias isoladas sugere que o mecanismo de ação contra os nematoides consiste na ligação das mesmas a uma cavidade próxima dos sítios ativos da enzima aspartato amônia liase, cuja sequência de aminoácidos computacionalmente extraída do genoma de *Meloidogyne hapla* é modelada no presente estudo.

Palavras-chave: *Cryptocarya aschersoniana*. Annonaceae. *Guatteria australis*. Lauraceae. Nematoide de galhas. Modelagem computacional.

GENERAL ABSTRACT

To contribute to the development of new products to control plant-parasitic nematodes in the genus *Meloidogyne*, the present study aimed to identify plants able to produce substances potentially useful in this area. In the first manuscript, plants in the family Annonaceae were studied, resulting in the selection of the *Guatteria australis* species, which was able to produce active substances against the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. Four substances were purified by fractionation of the fraction soluble in dichloromethane, which was obtained from the methanol extract from barks of *G. australis*. According to analyses by nuclear magnetic resonances they are all alkaloids. The structures of lisicamine, *trans*-N-feruloyltyramine and oxypseudopalmitine, were attributed to three of them, while the fourth substance is still in the process of identification. In the second manuscript, article 2, continuing a previous work on selection of plants active against *Meloidogyne exigua*, the present study aimed at isolating and identifying the nematicidal substances in the barks of *Cryptocarya aschersoniana*. After several steps of fractionation by chromatographic methods, two substances active against the nematode were isolated and identified by spectroscopic analyses as (*E*)-6-styrylpiran-2-one and (*R*)-goniotalamine. The last substance also reduced the number of *M. incognita* eggs on tomato plants. The *in silico* study of both isolated substances suggests that they act against nematodes by binding to a cavity close to the binding site of the enzyme aspartate ammonia lyase, the amino acid sequence of which was computationally extracted from the genome of *Meloidogyne hapla* and modeled in the present study.

Keywords: *Cryptocarya aschersoniana*. Annonaceae. *Guatteria australis*. Lauraceae. root-knot nematode. Computational modeling.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	9
1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVOS	10
3	REFERENCIAL TEÓRICO	12
3.1	Fitonematoides	12
3.2	Métodos para o controle de <i>Meloidogyne</i> spp.	14
3.3	Substâncias de origem natural com atividade nematicida	15
3.4	Família Annonaceae Juss.	18
3.4.1	Acetogeninas	22
3.4.2	Alcaloides	24
3.5	Família Lauraceae Juss.	26
3.6	Química computacional	28
3.6.1	Modelagem computacional de enzimas	29
3.6.2	Testes virtuais	30
3.6.3	Dinâmica molecular	33
	REFERÊNCIAS	35
	SEGUNDA PARTE- ARTIGOS	48
	ARTIGO 1 Bioprospecção de anonáceas ativas contra <i>Meloidogyne incognita</i> e purificação de metabólitos produzidos por <i>Guatteria australis</i>	48
	ARTIGO 2 SUBSTÂNCIAS ATIVAS CONTRA <i>Meloidogyne</i> spp. PRODUZIDAS POR <i>Cryptocarya aschersoniana</i> Mez. (Lauraceae Juss.)	99

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Dentre os inúmeros problemas fitossanitários mundialmente enfrentados pelos agricultores, os nematoides do gênero *Meloidogyne* merecem posição de destaque. Estes fitoparasitas são conhecidos como nematoides das galhas, por formarem nódulos (galhas) no sistema radicular das plantas hospedeiras. São amplamente disseminados em todo o mundo e atacam grande parte dos vegetais cultiváveis. É estimado que *Meloidogyne* spp. cause prejuízos mundiais que excedem a 100 bilhões de dólares por ano (SASSER; FRECKMAN, 1987).

Em países de clima tropical, algumas espécies, como *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood, encontram condições de umidade e temperatura ideais para a reprodução. Tais fatores dificultam o controle desses patógenos, os quais, após terem se estabelecido em determinada área, são de difícil erradicação, exigindo, assim, medidas que possibilitem a redução populacional dos mesmos para tornar viável o cultivo de determinadas culturas.

Dentre os métodos disponíveis para a redução populacional de nematoides fitoparasitas, o controle químico é aquele comumente empregado. Entretanto, os nematicidas comerciais têm seu uso cada vez mais limitado, devido às suas altas toxicidades ao ambiente e ao homem, ao alto custo para o agricultor em geral, à baixa disponibilidade em países em desenvolvimento e à baixa eficácia de controle, depois de repetidas aplicações (DONG; ZHANG, 2006).

Com a retirada do mercado de alguns dos principais nematicidas e a crescente busca por novas metodologias menos onerosas e que não contaminem o homem e o ambiente com substâncias de alta toxicidade, o uso de extratos vegetais com propriedades nematicidas no controle de fitonematoides representa mais uma alternativa para os produtores, pois eles são práticos, custam menos

que os nematicidas convencionais e apresentam baixo risco de contaminação para o meio ambiente e para o homem, com substâncias de elevadas periculosidades. Dessa forma, várias pesquisas têm sido realizadas nesta área, demonstrando os efeitos nematicidas dos extratos de diferentes plantas (CHITWOOD, 2002) e de substâncias de origem vegetal (OLIVEIRA et al., 2007), sendo, portanto, muito promissoras para o desenvolvimento de novos produtos economicamente viáveis, de baixa toxicidade ao ambiente e ao homem.

Em decorrência, o presente trabalho foi realizado com o objetivo geral de realizar a prospecção química de metabólitos produzidos por anonáceas e lauráceas, ativos para o controle de *Meloidogyne* spp. Em seguida, buscou-se fracionar os extratos das espécies vegetais mais promissoras, por meio de técnicas cromatográficas, para isolar e identificar as substâncias produzidas pelas plantas. Posteriormente, os metabólitos ativos isolados foram submetidos a uma abordagem computacional, com vistas a entender a forma de ação dos mesmos.

2 OBJETIVOS

- a) selecionar espécies da família Annonaceae produtoras de substâncias ativas contra *M. incognita*, já que tal família apresenta diversas atividades biológicas, segundo trabalhos preliminares.
- b) isolar e identificar a(s) substância(s) presente(s) no extrato orgânico da espécie vegetal com maior poder nematicida.
- c) isolar e identificar a(s) substância(s) ativa(s) contra *Meloidogyne exigua* Goeldi e *M. incognita*, produzida(s) por *Cryptocarya aschersoniana* Mez (Lauraceae), espécie vegetal escolhida por apresentar atividade nematicida de acordo com trabalhos anteriores.

- d) identificar, por meio de estudos *in silico*, os alvos enzimáticos da(s) substância(s) isolada(s) e ativa(s) contra os referidos nematoides.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Fitonematoides

Nematoides (do grego *nematos*, ‘filamento’ e *eidos*, ‘semelhante’) são animais que têm o corpo cilíndrico e alongado, sendo encontrados em todos os habitats terrestres, marinhos e de água doce. Tais animais podem ser de vida livre ou parasitas de outros organismos.

Dentre os nematoides parasitas, podem-se destacar os fitonematoides, ou seja, nematoides parasitas de plantas, que podem ser caracterizados como ecto ou endoparasitas (sedentários ou migradores), dentre os quais se destacam aqueles do gênero *Meloidogyne*. É interessante notar que a fase infectante dos nematoides deste gênero, juvenil do segundo estágio (J2), tem reservas energéticas, pois não se alimenta até chegar ao hospedeiro e formar seu sítio de alimentação (CAMPOS, 2003). Tais juvenis são atraídos pelas raízes das plantas devido à presença nos mesmos de órgãos sensoriais que funcionam como quimiorreceptores especializados para o parasitismo. Uma das características de *Meloidogyne* spp. é a presença de estilete na parte anterior do seu corpo, que tem duas funções básicas: a injeção de enzimas e de hormônios nas raízes da planta hospedeira e a ingestão de nutrientes e água. Com o desenvolvimento do nematoide do gênero *Meloidogyne* no interior das raízes da planta, ocorrem deformações em tais raízes, que são denominadas galhas. Em decorrência, os nematoides deste gênero são vulgarmente conhecidos como nematoides de galhas (PERRY; MOENS; STARR, 2009).

Os nematoides do gênero *Meloidogyne* são encontrados, principalmente, em regiões tropicais, nas quais parasitam grande parte das plantas cultiváveis, o que representa uma perda anual de, aproximadamente, 12%, na maioria das culturas (CARBONI; MAZZONETTO, 2013; SASSER; FRECKMAN, 1987).

Neste gênero estão incluídas, aproximadamente, 100 espécies (KARSSSEN; MOENS, 2006), dentre as quais se encontram *M. incognita* e *M. exigua*. Especificamente no Brasil, *M. incognita* ataca várias culturas de importância econômica, como, por exemplo, soja, algodão e café, causando sérios prejuízos aos agricultores (RANDIG; CARNEIRO; CASTAGNONE-SERENO, 2004). Já *M. exigua* ataca, principalmente, cafeeiros, sendo considerada uma das espécies mais prejudiciais para tal cultura (SOUZA, 2008).

Além da presença de galhas nas raízes, as plantas atacadas por estes fitonematoides apresentam sintomas como a redução e a deformação do sistema radicular, a ineficiência das raízes em absorver e transportar água e nutrientes, a clorose e o menor desenvolvimento da parte aérea (TIHOHOD, 1993).

M. incognita é considerada uma das espécies mais agressivas e apresenta algumas características que dificultam o seu controle, como ampla gama de hospedeiros (ROBERTS, 1995), alta persistência no solo na ausência de plantas (REBEL; JAEHN; VIANNA, 1976), existência de raças fisiológicas (HARTMAN; SASSER, 1985), ampla distribuição geográfica e associação a outros fitopatógenos, o que acarreta o surgimento de doenças complexas que aumentam os danos às plantas (LORDELLO, 1964). Quanto a *M. exigua*, apesar do número reduzido de culturas de importância econômica que tal nematoide pode atacar, o seu hospedeiro principal, o cafeeiro, é perene e, após a entrada deste fitonematoide no campo, o seu controle se torna bastante difícil (FERRAZ et al., 2010).

Quando adultas, as fêmeas de espécies do gênero *Meloidogyne* têm corpo em forma de pêra, enquanto nos machos o corpo tem formato vermiforme. Apresentam estiletos variando entre 15 a 24,5 μm de comprimento. A fase infectante corresponde ao juvenil de segundo estágio (J2) que mede, em média, 350 μm . Após penetrar na raiz da planta, o J2 migra até a zona de diferenciação celular, onde gera o seu sítio de alimentação. Em condições adequadas, os ciclos

de vida de nematoides do gênero *Meloidogyne* são de, aproximadamente, 30 dias, o que torna possível a ocorrência de várias gerações em uma única safra (WYSS; GRUNDLER; MUNCH, 1992).

3.2 Métodos para o controle de *Meloidogyne* spp.

Na tentativa de diminuir as populações de fitonematoides, vários métodos de controle têm sido empregados (NOVARETTI; MONTEIRO; FERRAZ, 1998), dentre os quais se podem citar o uso de cultivares resistentes, o controle biológico, a incorporação de matéria orgânica no solo, o emprego de plantas antagônicas, a rotação de cultura com plantas não hospedeiras e a aplicação de nematicidas sistêmicos (BARROS; MOURA; PEDROSA, 2000; BROWN; KERRY, 1987).

Embora o último método seja, em geral, o mais utilizado após o estabelecimento do nematoide, ele apresenta desvantagens, como o aumento do custo de produção. Em alguns casos se observa baixa eficiência e, em geral, há grande possibilidade de contaminação do ambiente e do homem, já que os princípios ativos dos nematicidas comerciais são de elevada toxicidade ao homem e a outros animais (OLIVEIRA et al., 2005). Em geral, tal toxicidade se deve à inibição da enzima acetilcolinesterase, causando o rápido acúmulo de acetilcolina nas sinapses. Com isso, ocorre hiperatividade nervosa e consequente colapso do sistema nervoso, podendo levar à morte do organismo.

Os nematicidas comerciais têm sido utilizados desde o final do século XIX, quando o dissulfeto de carbono foi introduzido. Ainda no início do século XX ocorreram o desenvolvimento e a consequente introdução no mercado de novos produtos voláteis, tais como cloropicrina, 1,3-dicloropropano (1,3-D), 1,2-dibromo-3-cloropropano (1,2-DBCP), mistura de 1,3-dicloropropano e 1,2-dicloropropano, formaldeído, metame de sódio (um ditiocarbamato), dazomete e

brometo de metila, que teve, em 2005, seu uso revogado nos países desenvolvidos através do Protocolo de Montreal. No início do século XX surgiram os nematicidas comerciais de uso sistêmico organofosforados (fenamifós, etoprofós e fostiazato), juntamente com os carbamatos (carbofurano, aldicarbe e oxamil). No final do século XX e no início do século XXI começou uma crescente busca por nematicidas mais eficientes, com menores impactos ambientais e de custos mais baixos para os produtores. Dessa forma, teve início um interesse crescente no desenvolvimento de nematicidas "naturais", derivados, principalmente, de extratos de plantas (PERRY; MOENS; STARR, 2009).

Vale ressaltar que algumas dessas substâncias, como aldicarbe e carbofurano, já foram banidas em muitos países, como Estados Unidos, Canadá e União Europeia. No Brasil, o aldicarbe está proibido desde 2012, mas, ainda assim, o mercado nematicida cresce a cada ano. Em 2011, este mercado movimentou cerca de 220 milhões de dólares, o que corresponde a um grande crescimento no uso de nematicidas, se comparado ao ano de 2007, quando as vendas de tais pesticidas ficaram em torno de 90 milhões de dólares. Este mercado é impulsionado, em grande parte, pelas culturas de soja, milho e café (MERCADO..., 2014; NEMATICIDAS..., 2014).

3.3 Substâncias de origem natural com atividade nematicida

Nos últimos anos, têm se intensificado os estudos empregando plantas que apresentam efeitos antagônicos a nematoides, para serem utilizadas em rotação de culturas, plantio intercalar, aplicação direta no solo como tortas ou extratos vegetais e, também, para o isolamento das substâncias ativas para emprego no desenvolvimento de novos nematicidas (OLIVEIRA et al., 2005). Um exemplo consiste nos estudos realizados com a espécie *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae), conhecida popularmente como nim, que apresenta

eficiência no controle de várias pragas e tem se mostrado muito promissora para o controle de fitonematoides (JAVED et al., 2006, 2008; MUSABYIMAN; SAXENA, 1999).

Outros exemplos de espécies vegetais com resultados bastante expressivos nesta área são erva-de-santa-maria [*Chenopodium ambrosioides* L. (Amaranthaceae)] (MELLO; MACHADO; INOMOTO, 2006) e mamona [*Ricinus communis* L. (Euphorbiaceae)] (MASHELA; NTHANGENI, 2002). Também pode ser mencionada aqui a revisão sobre o tema que foi organizada por Chitwood (2002), na qual se observam vários extratos vegetais com atividade nematicida. Dentre as várias substâncias oriundas de plantas, ativas contra nematoides fitoparasitas, alguns exemplos são mostrados na Figura 1.

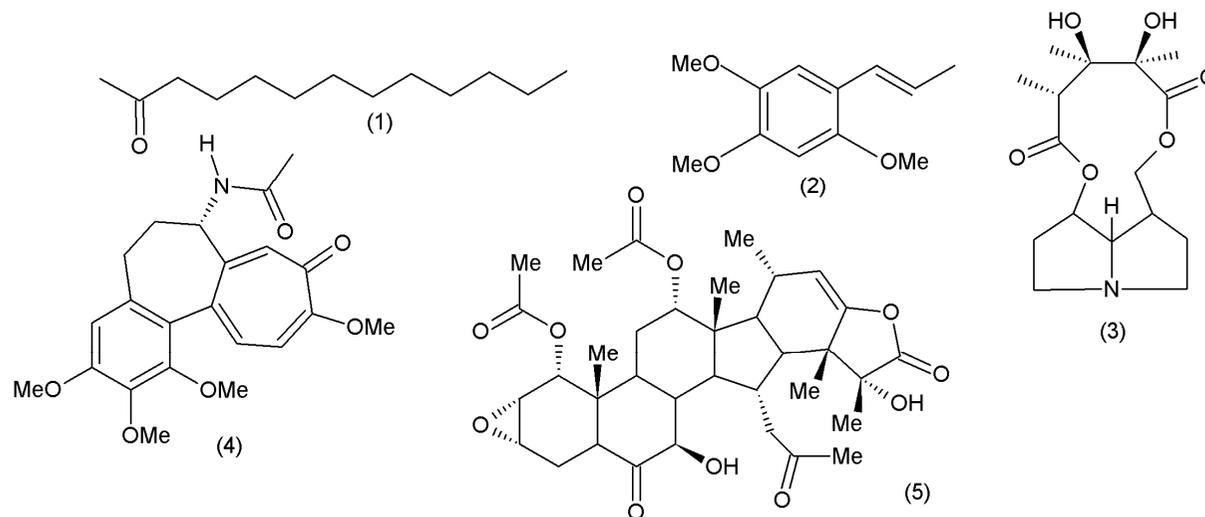


Figura 1 Estruturas de substâncias de origem vegetal com propriedades nematocidas e as espécies vegetais das quais foram isoladas: tridecan-2-ona, *Pilocarpus microphyllus* (1); 2,4,5-trimetilestireno, *Valeriana wallichii* D. C. (2); monocrotalina, *Crotalaria spectabilis* L. (3); colchicina, *Cathranthus roseus* G. Don. (4); taccalonolida E, *Tacca* spp. (5) (ADAMS; DILLMAN; FINLINSON, 2009; CHITWOOD, 2002; KIM et al., 2008; ROMERO et al., 2006)

3.4 Família Annonaceae Juss.

Annonaceae Juss. é uma família de plantas dicotiledôneas, de distribuição tropical em todo o mundo e que abrange mais de 130 gêneros, nos quais estão distribuídas, aproximadamente, 2.500 espécies (CRONQUIST, 1981). Por isso, é eleita a maior família da ordem Magnoliales. No Brasil ocorrem cerca de 250 espécies em 33 gêneros, sendo apenas cinco deles (*Annona*, *Rollinia*, *Uvaria*, *Melodorum* e *Asimina*) capazes de produzir frutos comestíveis. As anonáceas são encontradas em diversos ambientes, como matas primárias e secundárias de terra firme, matas alagadas (várzeas e igapós), restingas, regiões montanhosas, caatinga e savana, entre outros. De acordo com Miralha (1995), o grande centro de distribuição da família é, sem dúvida, a região amazônica, seguida do sudeste do Brasil.

Tal família é constituída, principalmente, por árvores de grande porte, que têm cascas aromáticas. As anonáceas são facilmente reconhecidas, pois apresentam folhas alternas, dísticas, simples, sem estípulas e com margem inteira. As flores são, geralmente, grandes e vistosas. Os frutos, de aparência excêntrica, na grande maioria são bagas. Apresentam uma ou muitas sementes, com camadas envoltórias carnudas e suculentas (Figura 2). Ademais, tais frutos são bem oleosos. Dentre as espécies mais estudadas no aspecto fitoquímico se encontram *Annona muricata* L. (graviola), *Annona coriacea* Mart. (fruta-do-conde), *Annona crassiflora* Mart. (marolo) e *Annona squamosa* L. (pinha). Entre as espécies com valor medicinal se destacam *Annona tenuiflora* Mart e *Xylopia* cf. *frutescens* Aubl., pois as infusões de suas folhas são utilizadas como anti-inflamatório e analgésico (HIRUMA-LIMA et al., 2002). As sementes de *Xylopia aethiopica* A. Rich. e *Xylopia aromatica* (Lam) Mart. são empregadas como condimentos, sendo boas substitutas da pimenta-do-reino [*Piper nigrum* L. (Piperaceae)] (DIAS, 1988).



Figura 2 Ilustrações de espécies de anonáceas (Annonaceae, 2014)

A partir da década de 1980, um novo estímulo surgiu para o estudo fitoquímico da referida família com o isolamento de uma nova classe de substâncias naturais bioativas, conhecidas como ‘acetogeninas de anonáceas’, que apresentam uma vasta gama de atividades biológicas, tais como citotóxica, antitumoral, pesticida, vermífida, abortiva, antimicrobiana, imunossupressora, antiemética, antimalárica e nematicida (CAVÉ et al., 1997; DANG et al., 2011; RUPRECHT; HUI; MCLAUGHLIN, 1990). Ademais, de acordo com Cave et al. (1986), Martins (1996) e Moreira (1999), os estudos químicos de espécies pertencentes à família Annonaceae demonstram que as mesmas acumulam diferentes metabólitos secundários com importantes atividades farmacológicas, tais como citotóxica (flavanonas), bactericida (alcaloides), antifúngica (terpenos) e antitumoral (diterpenos, alcaloides).

Além de alcaloides, constituintes como polifenóis, terpenos e substâncias aromáticas também são encontrados em espécies vegetais de anonáceas. Dentre os esteroides de ocorrência muito comum em Annonaceae, podem-se citar o β -sitosterol (6) e o estigmasterol (7) (Figura 3) (LEBOEUF et al., 1982). Quanto aos compostos fenólicos de maior ocorrência na referida família, podem-se destacar os flavonoides (SIMÕES et al., 2004), dentre os quais se podem citar os *O*-glicosídeos de apigenina (8), o kaempferol (9), a quercetina (10) e a luteolina (11) (Figura 3) (SANTOS; SALATINO, 2000).

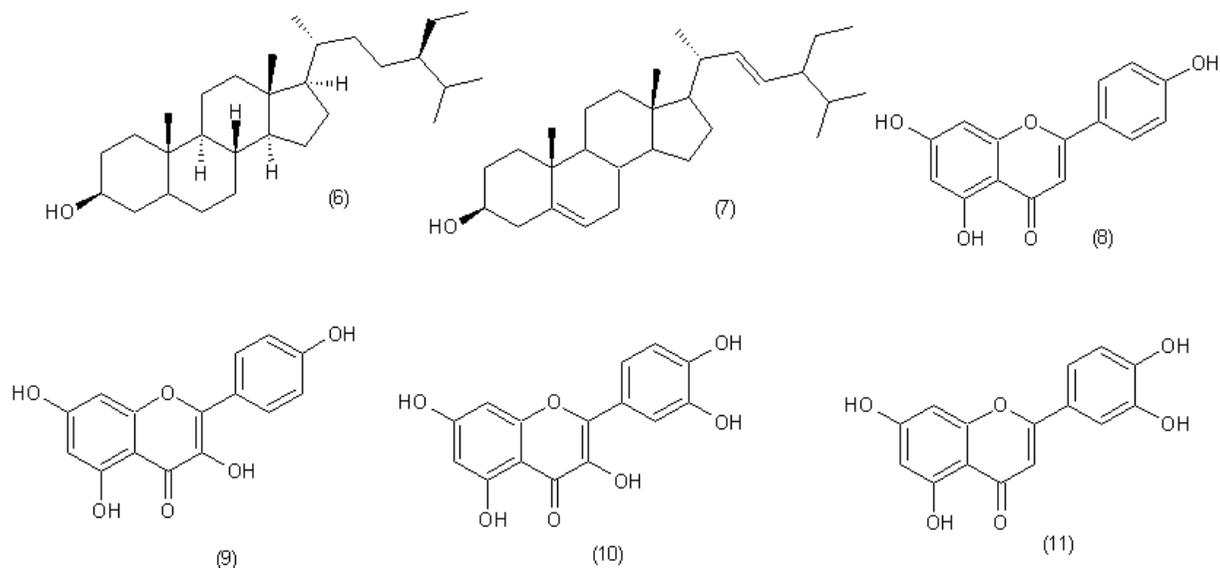


Figura 3 Estruturas de metabólitos secundários produzidos por anonáceas: β -sitosterol (6), estigmasterol (7), apigenina (8), kaempferol (9), quercetina (10) e luteolina (11)

3.4.1 Acetogeninas

As acetogeninas são metabólitos secundários produzidos apenas pela família Annonaceae, sendo essencialmente derivadas de ácidos graxos contendo ligações duplas e triplas, sem ramificações (RUPPRECHT; HUI; MCLAUGHLIN, 1990). Todas as acetogeninas já conhecidas têm de 32 (C₃₂) a 34 (C₃₄) átomos de carbono e contêm, em suas cadeias, uma lactona terminal. Alguns esqueletos apresentam grupos funcionais oxigenados, como hidroxilas, carbonilas cetônicas, anéis de epóxidos e anéis tetra-hidrofurânicos e tetra-hidropirânicos. Alguns tipos de acetogeninas são caracterizados com base nos grupos funcionais presentes. Essa funcionalidade confere uma grande gama de atividades biológicas (BERMEJO et al., 2005).

Segundo Bermejo et al. (2005), já foram isoladas 417 acetogeninas na família Annonaceae. Destas, 176 foram relatadas no período entre 1998 e 2004, sendo a maioria destes compostos descrita em espécies do gênero *Annona*. Vale destacar que uvaricina (12) (Figura 4) foi a primeira acetogenina isolada de anonácea (JOLAD et al., 1982). Tal substância é produzida pela espécie botânica *Uvaria acuminata* Oliv. Outras acetogeninas, como anonacina (13) e esquamocina (14) (Figura 4), merecem destaque devido às suas atividades biológicas, principalmente a antitumoral (YUAN et al., 2003, 2006).

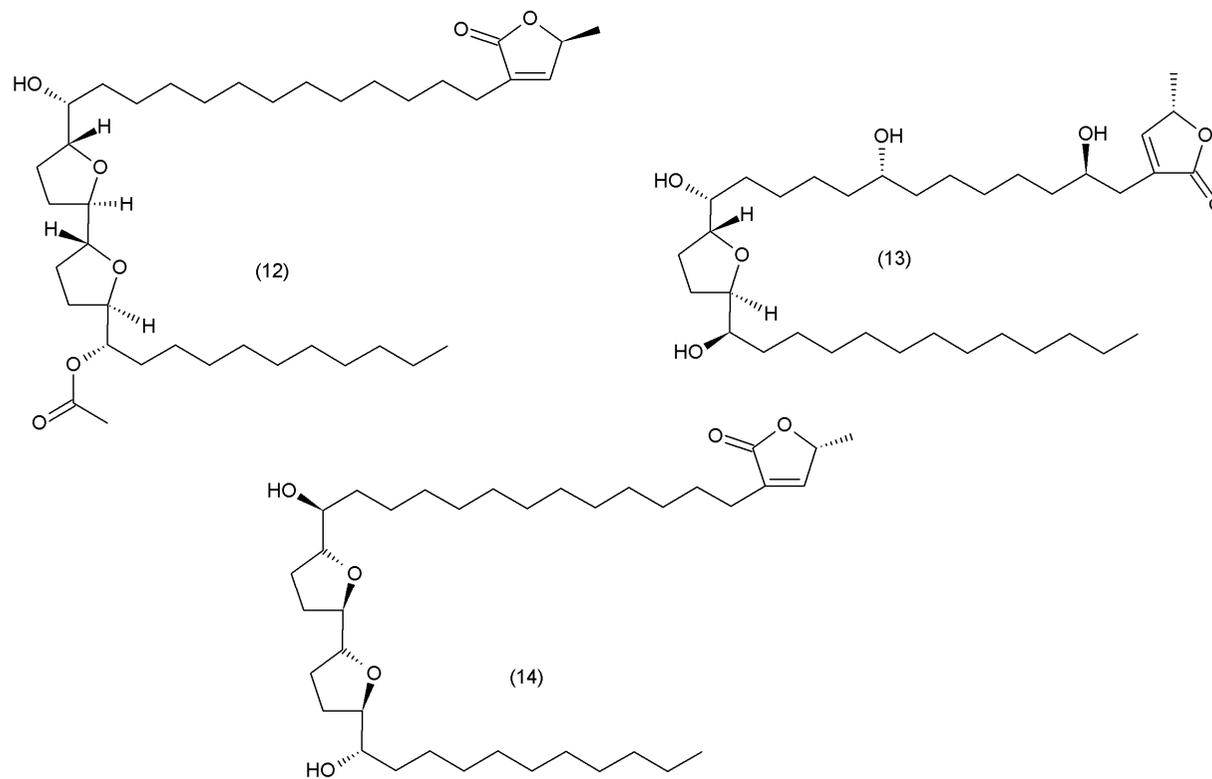


Figura 4 Estruturas de acetogeninas produzidas por anonáceas: uvaricina (12), anonacina (13) e esquamocina (14)

3.4.2 Alcaloides

Dentre as diversas classes de metabólitos secundários, podemos destacar os alcaloides, devido às suas múltiplas atividades farmacológicas, sendo amplamente distribuídos nas plantas pertencentes à família Annonaceae. Trata-se de substâncias de baixa massa molecular, caráter básico, produzidas, principalmente, por plantas, mas podendo ser também biossintetizadas por fungos, bactérias e, até mesmo, por animais (HARBORNE, 1984). Nas plantas são, geralmente, sintetizados a partir de aminoácidos, podendo existir no estado livre, como sais ou óxidos. No sistema nervoso central, os alcaloides podem apresentar diversos efeitos, dentre os quais se podem destacar aqueles que acarretam atividade depressiva (morfina, escopolamina), estimulante (estricnina, cafeína), anticolinérgica (atropina, hiosciamina) e ganglionares (nicotina). Os alcaloides também podem ter atividade anestésica (cocaína), antitumoral (vimblastina, vincristina), antimalárica (quinina) e antibacteriana (berberina), dentre muitas outras (BRUNETON, 1999).

Os alcaloides podem ser classificados quanto à atividade biológica, à estrutura química e à origem biossintética. De acordo com a origem biossintética, podem ser divididos em verdadeiros, protoalcaloides e pseudoalcaloides. Os alcaloides ditos verdadeiros são aqueles que têm anel heterocíclico com um ou mais átomos de nitrogênio, e que são biossintetizados a partir de um aminoácido, o que pode ser exemplificado pela nicotina. Os protoalcaloides são aqueles cujo(s) átomo(s) de nitrogênio se origina(m) de um aminoácido, mas não formam um anel heterocíclico, o que é característico da efedrina. Em se tratando dos pseudoalcaloides, são caracterizados por se tratarem de compostos nitrogenados derivados de terpenos ou esteroides. Como exemplo, tem-se a solasodina.

Dentre os alcaloides descritos na literatura, os isoquinolínicos merecem destaque devido às várias atividades farmacológicas (WARTHEN; GOODEN; JACOBSON, 1969). A origem biossintética dos referidos alcaloides se inicia na rota do ácido chiquímico, por meio da qual são formados os aminoácidos aromáticos como a L-fenilalanina e L-tirosina (DEWICK, 1997). Os alcaloides do tipo benzilisoquinolínico são encontrados com grande frequência na família Annonaceae. Em geral, estão distribuídos entre os seguintes grupos de alcaloides: berberinas, fenantrenos, cularinas, morfandienonas, isoquinolonas, bisbenzilisoquinolínicos, oxoaporfínicos e os aporfínicos, que são, de longe, os mais abundantes no gênero *Guatteria*. Em 1982, Leboeuf e colaboradores publicaram uma revisão sobre a fitoquímica da família Annonaceae, na qual é relatada a predominância de alcaloides aporfínicos e oxoaporfínicos dentre os metabólitos secundários isolados de espécies pertencentes à referida família.

Os alcaloides aporfínicos têm ampla representação dentro do grupo dos alcaloides isoquinolínicos, sendo amplamente encontrados em plantas das famílias Annonaceae, e ocasionalmente detectados em outras famílias, tais como Monimiaceae, Berberidaceae, Ranunculaceae e Lauraceae (GUINAUDEAU; LEBOEUF; CAVÉ, 1975). Em vários estudos tem sido relatada vasta atividade biológica de alcaloides aporfínicos e oxoaporfínicos (COSTA et al., 2011; RINALDI, 2007).

Dentre os alcaloides oxoaporfínicos, liriodenina (15) (Figura 5) é o mais encontrado em espécies da família Annonaceae (SANTOS; MORAIS; BRAZ-FILHO, 2003), sendo os alcaloides β -carbolínicos (16) (Figura 5) de ocorrência menos comum (WANG et al., 2012).

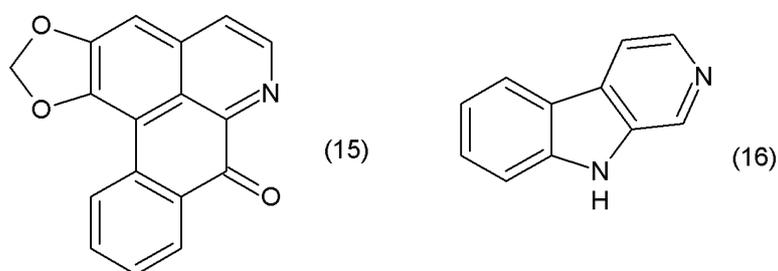


Figura 5 Estruturas de alcaloides produzidos por anonáceas: liriodenina (15) e estrutura fundamental dos alcaloides β -carbolínicos (16)

3.5 Família Lauraceae Juss.

A família Lauraceae é considerada uma das mais primitivas pertencentes à divisão Magnoliophyta. Tal fato se deve às suas características morfológicas e anatômicas, que as aproximam de outras famílias, como Calycanthaceae, Idiospermaceae e Hernandiaceae (CRONQUIST, 1988). As lauráceas se apresentam amplamente distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do planeta, sendo esta família formada por 49 gêneros e de 2.500 a 3.000 espécies (WERFF; RICHTER, 1996). No Brasil ocorrem 22 gêneros que habitam, em sua maior parte, as florestas pluviais, as restingas e os cerrados (BARROSO et al., 2002).

As lauráceas se destacam entre as demais famílias pela sua importância econômica, já que algumas espécies são comumente utilizadas na culinária, além de serem boas fornecedoras de madeiras de lei. A grande maioria destas espécies é de árvores e arbustos, porém, algumas são trepadeiras parasitas pertencentes ao gênero *Cassytha*. As folhas das lauráceas têm cheiro característico quando esmagadas, devido à presença de óleos essenciais. Suas folhas são simples, geralmente alternas, coriáceas e aromáticas; as flores são bissexuadas (hemafroditas), monoicas ou dioicas; os frutos são do

tipo baga ou drupa monospermática, enquanto as sementes se apresentam sem endosperma e com embrião desenvolvido (SAMPAIO; FERRAZ; CAMARGO, 2003).

As lauráceas são importantes produtoras de óleos essenciais que alcançam alto valor no mercado, pois são frequentemente utilizadas como fonte de matéria-prima em indústrias. *Cinnamomum canphora* (L.) Presl. e *Lindera benzoin* (L.) Blume são reconhecidas como algumas das principais espécies produtoras de óleos essenciais. *C. canphora*, popularmente conhecida como cânfora, é uma das espécies botânicas mais conhecidas desde a Grécia antiga, sendo utilizada nas indústrias de perfumaria e medicamentos, devido ao odor agradável produzido pelo monoterpeneo linalol (17) (Figura 6). Da espécie *L. benzoin* se extrai o óleo de benjoim (COE-TEIXEIRA, 1980), que é muito utilizado pelas indústrias de cosméticos.

Segundo dados encontrados na literatura, a família Lauraceae tem um número expressivo de espécies produtoras de compostos bioativos, responsáveis por uma gama de atividades biológicas, dentre as quais vale ressaltar as propriedades anti-hiperglicêmica (CHAKRABORTY; DAS, 2010), antidiarreica (RAO et al., 2008), anti-hiperlipidêmica (DHULASAVANT et al., 2010), anti-inflamatória (GAMBHIRE; JUVEKAR; WANKHEDE, 2009), acaricida (REDDY et al., 2009), hepatoprotetora (SELVAM et al., 2010), gastroprotetora (ESWARAN et al., 2010), antioxidante (DEVI; KANNAPPAN; ANURADHA, 2007), antibacteriana (PAREKH; CHANDA, 2007), inibidora de amilase- α (KAR; CHOUDHARY; BANDYOPADHYAY, 2003), imunomoduladora (CHAURASIA; PANDEY; TRIPATHI, 2010), inseticida (ALLAHVAISI et al., 2011), anti-HIV, anti-histamínica e antitumoral (KIMURA; BABA; OKUDA, 2000a, 2000b).

Além dos vários compostos voláteis produzidos pelas lauráceas, podem-se citar, ainda, os alcaloides, como aqueles do tipo oxoaporfínico [dicentrinona

(18)] e aporfínico, [talbaicalidina (19)] (ZANIN; LORDELLO, 2007). Tais plantas produzem, também, lactonas sesquiterpênicas, como o partenolídeo (20) (BEDOYA; ABAD; BERMEJO, 2008) (Figura 6).

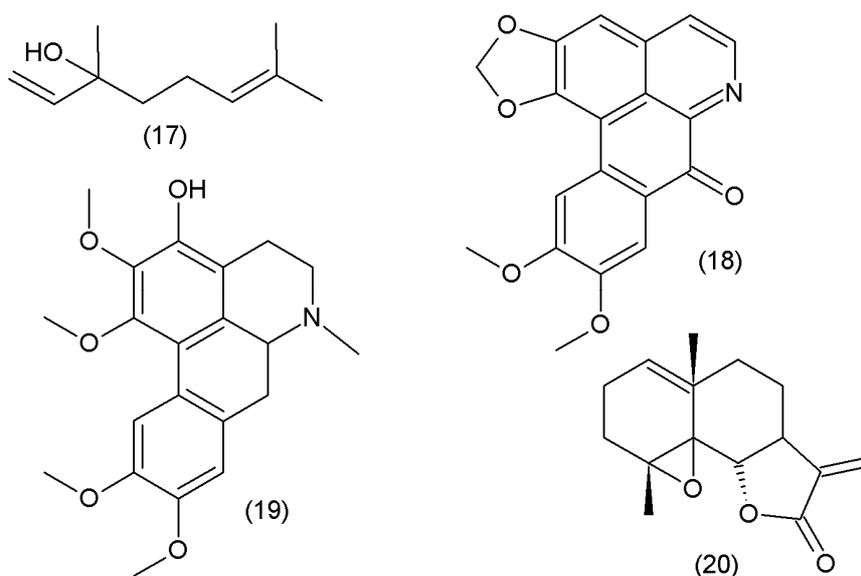


Figura 6 Estruturas de metabólitos produzidos por Lauráceas: linalol (17), alcaloides dicentrinona (18) e talbaicalidina (19) e partenolídeo (20)

3.6 Química computacional

A química computacional corresponde a uma área de pesquisa que emergiu rapidamente no final do século XX e início do século XXI. Ela desperta grande interesse, pois se trata de uma valiosa ferramenta para auxiliar nos estudos experimentais. Tal área utiliza técnicas computacionais capazes de calcular propriedades físicas e químicas de sistemas moleculares, o que pode ser de grande valia para o planejamento e a descoberta de novas moléculas bioativas. Os avanços na química computacional foram impulsionados pelo

grande e rápido desenvolvimento dos recursos computacionais, o que permitiu uma considerável redução do tempo de processamento de dados (BULTINCK; TOLLENAERE; WINTER, 2003).

3.6.1 Modelagem computacional de enzimas

As proteínas são encontradas em todas as células, sendo as suas funções diretamente relacionadas às suas organizações espaciais nativas, o que permite afirmar que, para compreender o seu funcionamento, é de grande importância conhecer as suas estruturas tridimensionais que, por sua vez, são totalmente dependentes das suas sequências de resíduos de aminoácidos (NOVAES; SCOTT, 2009). Logo, quando não há qualquer informação sobre a estrutura tridimensional de uma proteína de interesse, o primeiro passo para a modelagem computacional da mesma é a busca pela sua sequência de aminoácidos. Para tanto, existem os bancos primários e secundários de sequências de aminoácidos de proteínas, ou de sequências de genes que codificam a produção de proteínas. Os principais bancos de dados primários são o Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), o European Bioinformatics Institute em parceria com o European Molecular Biology Laboratory (EMBL-EBI) (<http://www.ebi.ac.uk/>), o DDBJ (para sequências de nucleotídeos) (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) e o Uniprot (para sequências de aminoácidos) (<http://www.uniprot.org/>).

No que diz respeito aos bancos de dados secundários, os mesmos são derivados dos primários. Vale destacar alguns exemplos, como o Blocks (sequências sem *gaps*, alinhadas de acordo com as regiões mais conservadas em proteínas do mesmo grupo) (<http://blocks.fhcrc.org/>), o GDB (o banco de dados oficial do projeto genoma humano) (<http://www.gdb.org/>), o PROSITE (um banco de dados de famílias e domínios de proteínas) (<http://prosite.expasy.org/>)

e o REBASE (banco de dados com informações sobre enzimas de restrição, metilases, de origem microbiana, sequências de reconhecimento, sítios de clivagem, especificidade de metilação, disponibilidade comercial e referências) (<http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>) (<http://eot.bu.edu/ccb/ProteinDatabases/index.htm>).

Uma vez selecionada a sequência de aminoácidos de interesse, faz-se necessário modelá-la. Para tanto, são utilizadas técnicas de predição das estruturas tridimensionais (3D) de proteínas por métodos computacionais, dentre as quais se podem citar a modelagem por homologia, a predição de enovelamento (*threading*) e a predição por primeiros princípios (*ab initio*) como sendo as principais (FLOUDAS et al., 2006).

3.6.2 Testes virtuais

Devido ao grande número de substâncias orgânicas conhecidas e ao elevado custo das etapas de seleção daquelas com as atividades biológicas desejadas, a pré-seleção de compostos antes da submissão dos mesmos a testes *in vitro* e *in vivo* se tornou uma necessidade em programas de desenvolvimento de novos produtos para emprego no controle de pragas e doenças em geral (BLEICHER et al., 2003; WALTERS; MURCKO, 2000). Para tanto, o computador se mostra uma importante ferramenta, pois ele permite a utilização de métodos cada vez mais sofisticados para a seleção ds substâncias. Por serem realizados no computador, tais testes são denominados *virtual screening* ou, simplesmente, testes virtuais. Em vários casos, apenas após a seleção virtual, os compostos são submetidos aos testes de atividade biológica experimental (SHOICHET, 2004). Dentre as vantagens da aplicação do *virtual screening* está a economia de recursos, uma vez que esta etapa do trabalho é realizada apenas no computador, sem o consumo de qualquer material (KLEBE, 2006).

De modo geral, os métodos empregados em *virtual screening* podem ser agrupados em três categorias: (a) filtros uni e bidimensionais (1D e 2D), que se baseiam nas propriedades físico-químicas e na conectividade dos compostos (filtros *drug-like*); (b) filtros tridimensionais (3D), que se baseiam na distribuição espacial de características específicas (filtros farmacofóricos) e (c) e filtros de interação molecular, que se baseiam em medidas de afinidade entre o composto e seu alvo biológico (filtros de *docking*).

Os filtros de compostos *drug-like* são baseados no conceito de que as substâncias ativas, em geral, apresentam determinadas propriedades que os distinguem dos demais compostos orgânicos. Estas propriedades podem ser de natureza físico-química, como a massa molecular ou o coeficiente de partição do composto, ou podem ser relativas à conectividade molecular, como a ausência de grupos funcionais sabidamente tóxicos ou a presença de um grupo funcional, que pode promover uma determinada atividade biológica (MORRIS; BRUNEU, 2000; OPREA, 2002; SADOWSKI, 2000). Uma das principais vantagens dos filtros *drug-like* é que estes podem ser calculados muito rapidamente, sendo possível o processamento de milhares de compostos por segundo, em um computador pessoal (CHARIFSON; WALTERS, 2002). Outra vantagem é que estes filtros são capazes de reduzir significativamente o número de compostos em bancos de dados comercialmente disponíveis. Estes dois aspectos tornam os filtros *drug-like* os primeiros a serem aplicados em bancos de dados para a eliminação precoce de compostos indesejados. Este procedimento pode ser em parte especulativo e subjetivo, uma vez que estes filtros são sabidamente imprecisos e os limites que separam compostos desejados de indesejados são definidos arbitrariamente. Assim, para reduzir o número de resultados falso-positivos ou falso-negativos, é importante examinar periodicamente os compostos eliminados pelo filtro.

Os filtros farmacofóricos são empregados para a seleção com base no arranjo espacial das propriedades estéricas e eletrônicas necessárias para garantir interações não covalentes ótimas entre um ligante e seu alvo biológico específico, para que a resposta biológica seja ativada ou inibida. Logo, um farmacóforo é um conceito abstrato que incorpora as habilidades de interação molecular comuns em uma série de compostos e o alvo biológico correspondente (GOOD; MASON; PICKETT, 2000; KLEBE et al., 2000; WERMUTH et al., 1998). Uma vez definido um farmacóforo, o mesmo deve ser capaz de explicar as atividades dos compostos ativos e a falta de atividade de análogos inativos. Adicionalmente, é desejável que ele possa ser empregado na previsão da atividade a ser observada para novas estruturas. Até que um farmacóforo tenha sido validado e apresente alta probabilidade de previsão, qualquer farmacóforo proposto é chamado de “hipótese” ou de “modelo farmacofórico”. Estes podem ser obtidos a partir das estruturas dos compostos ativos ou/e dos receptores (TRIBALLEAU; BERTRAND; ACHER, 2006).

Quanto aos filtros de *docking* (ancoragem), eles são baseados na estimativa da afinidade entre um ligante e seu receptor biológico, o que fornece uma previsão do modo de ligação mais favorável entre um composto e uma determinada proteína alvo, bem como apresenta a avaliação quantitativa desta interação. Esta metodologia pode ser dividida em duas etapas distintas, que podem ser executadas separadamente ou de forma concomitante. Na primeira delas, os possíveis modos de ligação entre o ligante e a proteína são gerados, variando-se tanto a conformação quanto a orientação do ligante em relação à proteína. Na segunda etapa, faz-se uma avaliação quantitativa de cada um destes possíveis modos de ligação, para a seleção da mais favorável. Existem diversos programas de docking disponíveis, que fazem uso de diferentes estratégias. Embora alguns apresentem melhores resultados que outros em situações específicas, no geral apresentam desempenhos similares (RESTER, 2006).

Dentre os programas existentes podem ser citados AUTODOCK (MORRIS et al., 1998) e GLIDE (PEROLA; WALTERS; CHARIFSON, 2005; SCHULZ-GASCH; STAHL, 2003).

3.6.3 Dinâmica molecular

Outro método empregado no estudo computacional de vários sistemas, inclusive os formados por proteínas, consiste na simulação por dinâmica molecular, que estuda os movimentos em um sistema de partículas por simulação da evolução temporal das conformações dos constituintes do sistema. Tal simulação permite uma compreensão das interações que acontecem em âmbito molecular, podendo ser usadas para responder a questões sobre as propriedades de um sistema biológico modelo, de maneira mais simples que nos sistemas experimentais disponíveis.

Este método pode ser empregado tanto em sistemas de elétrons, átomos ou moléculas, como em sistemas biológicos mais complexos, baseando-se no conhecimento do potencial de interação entre as partículas e nas equações de movimentos que governam a dinâmica dessas partículas (PASCUTTI, 2004), com o objetivo de se observar as propriedades termodinâmicas, estruturais, espectroscópicas, de transporte, estruturas de solvatação e agregações intermoleculares (BORIN, 1999).

As simulações por dinâmica molecular são amplamente utilizadas para se obter informações sobre as propriedades de proteínas em solução. Em tais simulações, o solvente (água), geralmente, é considerado explicitamente, enquanto a estrutura inicial da proteína pode ser oriunda de dados cristalográficos, de ressonância magnética nuclear ou de modelagem computacional. Em todos os casos, a proteína pode ser complexada a ligantes e/ou a cofatores, cujos posicionamentos iniciais nos complexos podem ser

especificados com base em dados cristalográficos ou em etapas de *docking* previamente realizadas. A proteína (complexada ou não com o ligante) passa por um estágio inicial de minimização de energia e posterior termalização (aquecimento), para seguir para a fase de produção, durante a qual são coletados os dados. Como resultado das simulações é possível observar as modificações estruturais ocorridas devido à interação do complexo proteína-ligante, bem como a descrição detalhada dos movimentos individuais das partículas em função do tempo. Devido ao elevado custo computacional, apenas os melhores complexos proteína-ligante obtidos após o *docking* são selecionados para etapas de simulação por dinâmica molecular (ROCHA, 2011).

REFERÊNCIAS

- ADAMS, B. J.; DILLMAN, A. R.; FINLINSON, C. Molecular taxonomy and phylogeny. In: PERRY, R. N.; MOENS, M.; STARR, J. L. (Ed.). **Root-knot nematodes**. Cambridge: CAB International, 2009. p. 118-138.
- ALLAHVAISI, S. et al. The effect of plant oils for reducing contamination of stored packaged-foodstuffs. **Journal of Plant Protection Research**, Poznan, v. 51, n. 1, p. 82-86, Jan. 2011.
- ANNONACEAE. Disponível em:
<https://www.google.com.br/search?q=annonaceae&biw=1366&bih=624&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ei=g6YoVJ61Bc-SgwS7-IGoDQ&ved=0CAYQ_AUoAQ/>. Acesso em: 15 jul. 2014.
- BARROS, A. C. B.; MOURA, R. M.; PEDROSA, E. M. R. Aplicação de terbufós no controle de *Meloidogyne incognita* raça 1 e *Pratylenchus zeae* em cinco variedades de cana-de-açúcar no Nordeste: parte 1, efeitos na cana planta. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 24, n. 1, p. 73-78, 2000.
- BARROSO, G. M. et al. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2002. v. 1, 255 p.
- BEDOYA, L. M.; ABAD, M. J.; BERMEJO, P. The role of parthenolide in intracellular signalling processes: review of current knowledge. **Current Signal Transduction Therapy**, Budapest, v. 3, n. 2, p. 82-87, May 2008.
- BERMEJO, A. et al. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. **Natural Product Reports**, London, v. 22, n. 2, p. 269-303, 2005.
- BLEICHER, K. H. et al. Hit and lead generation: beyond high-throughput screening. **Nature Reviews Drug Discovery**, London, v. 2, n. 2, p. 369-378, May 2003.

BORIN, I. A. **Propriedades estruturais e dinâmicas de misturas líquidas binárias associativas**. 1999. 83 p. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

BROWN, R. H.; KERRY, B. R. **Principles and practice of nematode control in crop**. Orlando: Academic, 1987. 421 p.

BRUNETON, J. **Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants**. 2nd ed. Paris: Lavoisier; Secaucus: Intercept, 1999. 799 p.

BULTINCK, P.; TOLLENAERE, J. P.; WINTER, H. **Computational medicinal chemistry for drug discovery**. New York: M. Dekker, 2003. 794 p.

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

CARBONI, R. Z.; MAZZONETTO, F. Efeito do extrato aquoso de diferentes espécies vegetais no manejo de *Meloidogyne incognita* em tomateiro em ambiente protegido. **Revista Agrogeoambiental**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 61-66, 2013.

CAVÉ, A. et al. Acetogenins from Annonaceae. In: HERZ, W. (Ed.). **Progress in the chemistry of organic natural products**. Wien: Springer-Verlag, 1997. p. 81-278.

CAVÉ, A. et al. Artavenustine, a Catecholic Berbine from *Artabotrys venustus*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 49, n. 4, p. 602-607, July 1986.

CHAKRABORTY, U.; DAS, H. Antidiabetic and antioxidant activities of cinnamomum tamala leaf extracts in stz-treated diabetic rats. **Global Journal of Biotechnology & Biochemistry**, Dubai, v. 5, n. 1, p. 12-18, 2010.

CHARIFSON, P. S.; WALTERS, W. P. Filtering databases and chemical libraries. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, Dordrecht, v. 16, n. 5/6, p. 311-323, May 2002.

CHAURASIA, J. K.; PANDEY, N.; TRIPATHI, Y. B. Effect of hexane fraction of leaves of *Cinnamomum tamala* Linn on macrophage functions. **Inflammopharmacology**, Berlin, v. 18, n. 3, p. 147-154, 2010.

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

COE-TEIXEIRA, B. *Lauraceas* do gênero *Ocotea* do Estado de São Paulo. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 52, p. 55-190, 1980.

COSTA, E. V. et al. Trypanocidal activity of oxoaporphine and pyrimidine- β -carboline alkaloids from the branches of *Annona foetida* Mart. (Annonaceae). **Molecules**, Basel, v. 16, n. 11, p. 9714-9720, 2011.

CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. 2nd ed. Bronx: The New York Botanical Garden, 1988. 555 p.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University, 1981. 1262 p.

DANG, Q. L. et al. Nematicidal and antifungal activities of annonaceous acetogenins from *Annona squamosa* against various plant pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 59, n. 20, p. 11160-11167, 2011.

DEVI, S. L.; KANNAPPAN, S.; ANURADHA, C. V. Evaluation of in vitro antioxidante activity of Indian bay leaf, *Cinnamomum tamala* (Buch, -Ham,) T, Nees & Eberm using rat brain synaptosomes as model system. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 45, n. 9, p. 778-784, 2007.

DEWICK, P. M. Alkaloids. In: _____. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. Chichester: J. Wiley, 1997. p. 270-371.

DHULASAVANT, V. et al. Antihyperlipidemic activity of *Cinnamomum tamala* leaves, on high cholesterol diet induced hyperlipidemia. **International Journal of PharmTech Research**, Mumbai, v. 2, n. 4, p. 2517-2521, 2010.

DIAS, M. C. **Estudos taxonômicos do gênero *Xylopi* L., (Annonaceae) no Brasil extra-amazônico**. 1988. 183 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1988.

DONG, L. Q.; ZHANG, K. Q. Microbial control of plant-parasitic nematodes: a five-party interaction. **Plant and Soil**, The Hague, v. 288, n. 1, p. 31-45, 2006.

ESWARAN, M. B. et al. Gastroprotective activity of *Cinnamomum tamala* leaves on experimental gastric ulcers in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 128, n. 2, p. 537-540, Mar. 2010.

FERRAZ, S. et al. **Manejo sustentável de fitonematoides**. Viçosa, MG: UFV, 2010. 306 p.

FLOUDAS, C. A. et al. Advances in protein structure prediction and de novo protein design: a review. **Chemical Engineering Science**, New York, v. 61, n. 3, p. 966-988, 2006.

GAMBHIRE, M. N.; JUVEKAR, A. R.; WANKHEDE, S. S. Anti-inflammatory activity of aqueous extract of *Cinnamomum tamala* leaves by *in vivo* and *in vitro* methods. **Journal of Pharmacy Research**, Mumbai, v. 2, n. 9, p. 1521-1524, 2009.

GOOD, A. C.; MASON, J. S.; PICKETT, S. D. Pharmacophore pattern application in virtual screening, library design and QSAR. In: BOHM, H. J.; SCHNEIDER, G. (Ed.). **Virtual screening for bioactive molecules**. Berlin: Wiley-VCH, 2000. p. 129-140.

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Aporphine alkaloids. **Lloydia**, London, v. 38, n. 4, p. 275, 1975.

HARBORNE, J. B. **Plant chemosystematics**. London: Academic, 1984. 163 p.

HARTMAN, K. M.; SASSER, J. N. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential hosts test and perineal pattern morphology. In: BARKER, K. R.; CARTER, C. C.; SASSER, J. N. (Ed.). **An advanced treatise on Meloidogyne: methodology**. Raleigh: North Carolina State, 1985. p. 69-77.

HIRUMA-LIMA, C. A. et al. Magnoliales medicinais. In: DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. (Ed.). **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. ed. São Paulo: UNESP, 2002. p. 89-102.

JAVED, N. et al. Effect of neem formulations applied as soil drenching on invasion and development of root-knot nematode, *Meloidogyne javanica*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUSTAINABLE CROP IMPROVEMENT AND INTEGRATED MANAGEMENT, 1., 2006, Faisalabad. **Proceedings...** Faisalabad: University of Agriculture, 2006. p. 244-247.

JAVED, N. et al. Efficacy of neem (*Azadirachta indica*) formulations on biology of root-knot nematodes (*Meloidogyne javanica*) on tomato. **Crop Protection**, Guildford, v. 27, n. 1, p. 36-43, Jan. 2008.

JOLAD, S. D. et al. Uvaricin, a new antitumor agent from *Uvaria accuminata* (Annonaceae). **Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 47, p. 3151-3153, 1982.

KAR, A.; CHOUDHARY, B. K.; BANDYOPADHYAY, N. G. Comparative evolution of hypoglycemic activity of some Indian medicinal plants in alloxan diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 84, n. 1, p. 105-108, Jan. 2003.

KARSSSEN, G.; MOENS, M. Root-knot nematodes. In: PERRY, R. N.; MOENS, M. (Ed.). **Plant nematology**. Wallingford: CABI, 2006. p. 59-88.

KIM, S. et al. A comparative biochemical and structural analysis of the intracellular chorismate mutase (Rv0948c) from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and the secreted chorismate mutase (y2828) from *Yersinia pestis*. **FEBS Journal**, Amsterdam, v. 275, n. 19, p. 4824-4835, Oct. 2008.

KIMURA, Y.; BABA, K.; OKUDA, H. Inhibitory effects of active substances isolated from *Cassia garrettiana* heartwood on tumor growth and lung metastasis in Lewis lung carcinoma-bearing mice: part 1. **Anticancer Research**, Oxford, v. 20, n. 5A, p. 2899-2906, Sept./Oct. 2000a.

KIMURA, Y.; BABA, K.; OKUDA, H. Inhibitory effects of active substances isolated from *Cassia garrettiana* heartwood on tumor growth and lung metastasis in Lewis lung carcinoma-bearing mice: part 2. **Anticancer Research**, Oxford, v. 20, n. 5A, p. 2923-2930, Sept./Oct. 2000b.

KLEBE, G. Virtual ligand screening: strategies, perspectives and limitations. **Drug Discovery Today**, Kidlington, v. 11, n. 7, p. 580-594, Aug. 2006.

KLEBE, G. et al. Understanding receptor-ligand interactions as a prerequisite for virtual screening. In: BOHM, H. J.; SCHNEIDER, G. (Ed.). **Virtual screening for bioactive molecules**. Berlin: Wiley-VCH, 2000. p. 206-227.

LEBOEUF, M. et al. The phytochemistry of the annonaceae. **Phytochemistry**, Saint Paul, v. 21, p. 2783-2813, 1982.

LORDELLO, L. G. E. Contribuição ao estudo dos nematóides que causam galhas em raízes de plantas no Estado de São Paulo e Estados vizinhos. **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, Piracicaba, v. 21, p. 181-218, 1964.

MARTINS, D. **Alcalóides, flavonóides e terpenóides de *Xylopi* *aromatica***. 1996. 134 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

MASHELA, P. W.; NTHANGENI, M. E. Efficacy of *Ricinus communis* fruit meal with and without *Bacillus* species on suppression of *Meloidogyne incognita* and growth of tomato. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 150, n. 7, p. 399-402, July 2002.

MELLO, A. F. S.; MACHADO, A. C. Z.; INOMOTO, M. M. Potencial de controle da erva-de-santa-maria sobre *Pratylenchus brachyurus*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 5, p. 513-516, set./out. 2006.

MERCADO global de nematicidas 2011: análise do mercado e suas oportunidades. Disponível em:
<http://factordesolucao.com.br/pdf/ExecutiveSummary_Nematicidas_2011.pdf>
. Acesso em: 28 fev. 2014.

MIRALHA, J. M. de S. **As Annonaceae da reserva florestal Ducke, Manaus, AM**. 1995. 165 f. Tese (Doutorado em Botânica) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 1995.

MOREIRA, I. C. **Estudo químico de *Xylopi* *emarginata* e *Xylopi* *brasiliensis***. 1999. 203 p. Tese (Doutorado em Química) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

MORRIS, G. M. et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **Journal of Computational Chemistry**, New York, v. 19, n. 6, p. 1639-1662, Jan. 1998.

MORRIS, J.; BRUNEAU, P. Prediction of physicochemical properties. In: BOHM, H. J.; SCHNEIDER, G. (Ed.). **Virtual screening for bioactive molecules**. Berlin: Wiley-VCH, 2000. p. 33-58.

MUSABYIMAN, T.; SAXENA, R. C. Efficacy of neem seed derivatives against nematodes affecting banana. **Phytoparasitica**, Berlin, v. 27, n. 1, p. 43-49, Jan. 1999.

NEMATOCIDAS no Brasil: um mercado com potencial para grandes negócios. Disponível em: <<http://factordesolucao.com.br/pdf/ArtigoNematicidasnoBrasil.pdf>>. Acesso em: 28 fev. 2014.

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

NOVARETTI, W. R. T.; MONTEIRO, A. R.; FERRAZ, L. C. C. B. Controle químico de *Meloidogyne incognita* e *Pratylenchus zeae* em cana-de-açúcar com carbofuram e terbufos. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 22, n. 1, p. 60-67, 1998.

OLIVEIRA, D. F. et al. Atividade de carboidrato purificado a partir da cebola (*Allium cepa* L.) e de carboidratos comerciais sobre juvenis de *Meloidogyne exigua* Goeldi. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 31, n. 3, p. 202-209, dez. 2007.

OLIVEIRA, F. S. et al. Efeito de produtos químicos e naturais sobre a população de nematóide *Pratylenchus brachyurus* na cultura da cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 3, p. 171-178, mar. 2005.

OPREA, T. I. Virtual screening in lead discovery: a viewpoint. **Molecules**, Lausanne, v. 7, n. 1, p. 51-62, Jan. 2002.

PAREKH, J.; CHANDA, S. In vitro screening of antibacterial activity of aqueous and alcoholic extracts of various Indian plant species against selected pathogens from Enterobacteriaceae. **African Journal of Microbiology Research**, Nairobi, v. 1, n. 6, p. 92-99, 2007.

PASCUTTI, P. G. **Introdução à modelagem e dinâmica molecular**. [S.l.: s.n.], 2002. v. 1, 38 p.

PEROLA, E.; WALTERS, P. W.; CHARIFSON, P. S. An analysis of critical factors affecting docking and scoring. In: ALVAREZ, J.; SHOICHET, B. (Ed.). **Virtual screening in drug discovery**. New Jersey: Taylor & Francis, 2005. p. 47-86.

PERRY, R. N.; MOENS, M.; STARR, J. L. **Root-knot nematodes**. Boca Raton: CAB International, 2009. 488 p.

RANDIG, O.; CARNEIRO, R. M. D. G.; CASTAGNONE-SERENO, P. Identificação das principais espécies de *Meloidogyne* parasitas do cafeeiro no Brasil com marcadores SCAR-café em Multiplex-PCR. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 28, n. 1, p. 1-10, 2004.

RAO, C. V. et al. Antidiarrhoeal activity of the standardised extract of *Cinnamomum tamala* in experimental rats. **Journal of Natural Medicines**, Berlin, v. 62, n. 4, p. 396-402, Oct. 2008.

REBEL, E. K.; JAEHN, A.; VIANNA, A. S. Testes de sobrevivência do nematóide *Meloidogyne incognita* em solo, na ausência de plantas hospedeiras. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 4., 1976, Caxambu. **Resumos...** Caxambu: SBC, 1976. p. 851-976.

REDDY, G. V. M. et al. Acaricidal activity of aqueous extracts from leaves and bark of cinnamomum and jatropa against two spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch, Karnataka. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 22, n. 3, p. 693-695, 2009.

RESTER, U. Dock around the clock: current status of small molecule docking and scoring. **Qsar & Combinatorial Science**, Weinheim, v. 25, n. 7, p. 605-615, July 2006.

RINALDI, M. V. N. **Avaliação da atividade antibacteriana e citotóxica dos alcalóides isoquinolínicos de *Annona hypoglauca* Mart.** 2007. 125 p. Dissertação (Mestrado em Insumos Farmacêuticos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

ROBERTS, P. A. Conceptual and practical aspects of variability in root-knot nematodes related to host plant resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 33, p. 199-221, 1995.

ROCHA, K. B. **Virtual screening e dinâmica molecular para identificação de inibidores da enzima corismato sintase de *Mycobacterium tuberculosis*.** 2011. 111 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

ROMERO, N. R. et al. Nematicidal activity of the essential oils from *Pilocarpus microphyllus* (Rutaceae) samples. **Natural Products Communications**, Ohio, v. 1, n. 8, p. 469-473, Jan. 2006.

RUPPRECHT, J. K.; HUI, Y. H.; MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: a review. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 53, n. 2, p. 237-278, 1990.

SADOWSKI, J. Database profiling by neural networks. In: BOHM, H. J.; SCHNEIDER, G. (Ed.). **Virtual screening for bioactive molecules**. Berlin: Wiley-VCH, 2000. p. 116-125.

SAMPAIO, P. T. B.; FERRAZ, I. D. K.; CAMARGO, J. L. **Pau-rosa Aniba rosaeodora Ducke Lauraceae**. Manaus: INPA, 2003. 6 p. (Manual de Sementes da Amazônia, 3).

SANTOS, D. Y. A. C.; SALATINO, M. L. F. Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. **Phytochemistry: Chemistry, Biochemistry, Molecular Biology**, New York, v. 55, n. 6, p. 567-573, Nov. 2000.

SANTOS, P. R. D.; MORAIS, A. A.; BRAZ-FILHO, R. Alkaloids from *Annona dióica*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 14, n. 3, p. 369-400, 2003.

SASSER, J. N.; FRECKMAN, D. W. A world perspective on nematology; the role of society. In: VEECH, J. A.; DICKERSON, D. W. (Ed.). **Vistas on nematology**. Hyattsville: Society of Nematologists, 1987. p. 7-14.

SCHULZ-GASCH, T.; STAHL, M. Binding site characteristics in structure-based virtual screening: evaluation of current docking tools. **Journal of Molecular Modeling**, Washington, v. 9, n. 1, p. 47-57, Feb. 2003.

SELVAM, N. T. et al. Hepatoprotective activity of methanolic extract of *Cinnamomum Tamala* (Nees) against paracetamol intoxicated swiss albino mice. **International Journal of Pharm World Research**, Samskruti, v. 1, n. 2, p. 1-13, 2010.

SHOICHET, B. K. Virtual screening of chemical libraries. **Nature**, London, v. 432, p. 862-865, Dec. 2004.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFSC, 2004. 1102 p.

SOUZA, R. M. (Ed.). **Plant-parasitic nematodes of coffee**. Berlin: Springer, 2008. 269 p.

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

TRIBALLEAU, N.; BERTRAND, H. O.; ACHER, F. Are you sure you have a good model? In: LANGER, T.; HOFFMANN, R. D. (Ed.). **Pharmacophores and pharmacophore searches**. Weinheim: Wiley-VCH, 2006. p. 325-326.

WALTERS, P. W.; MURCKO, M. A. Library filtering systems and prediction of drug-like properties. In: BOHM, H. J.; SCHNEIDER, G. (Ed.). **Virtual screening for bioactive molecules**. Berlin: Wiley-VCH, 2000. p. 15-32.

WANG, T. et al. Anticancer activities of constituents from the stem of *Polyalthia rumphii*. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, Lahore, v. 25, n. 2, p. 353-356, 2012.

WARTHEN, D.; GOODEN, E. L.; JACOBSON, M. Tumor inhibitors: liriodenine, a cytotoxic alkaloid from *Annona glabra*. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, New York, v. 58, n. 5, p. 637-638, 1969.

WERFF, H. van der; RICHTER, H. G. Toward an improved classification of Lauraceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, Saint Louis, v. 83, n. 3, p. 409-418, 1996.

WERMUTH, G. et al. Glossary of terms used in medicinal chemistry: IUPAC recommendations 1998. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 70, n. 5, p. 1129-1143, Jan. 1998.

WYSS, U.; GRUNDLER, F. M. W.; MUNCH, A. The parasitic behaviour of second stage juveniles of *Meloidogyne incognita* in roots of *Arabidopsis thaliana*. **Nematologica**, Leiden, v. 38, n. 1, p. 98-111, 1992.

YUAN, S. S. et al. Annonacin, a mono-tetrahydrofuran acetogenin, arrests cancer cells at the G1 phase and causes cytotoxicity in a Bax- and caspase-3-related pathway. **Life Science**, Elmsford, v. 9, n. 72, p. 2853-2861, 2003.

YUAN, S. S. F. et al. Selective cytotoxicity of squamocin on T24 bladder cancer cells at the S-phase via a Bax-, Bad-, and caspase-3-related pathways. **Life Science**, Elmsford, v. 78, n. 8, p. 869-874, Jan. 2006.

ZANIN, S. M. W.; LORDELLO, A. L. L. Alcalóides aporfinóides do gênero *Ocotea* (Lauraceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 92-98, jan./fev. 2007.

SEGUNDA PARTE- ARTIGOS

ARTIGO 1

**Bioprospecção de anonáceas ativas contra *Meloidogyne incognita* e
purificação de metabólitos produzidos por *Gutteria australis***

Artigo normalizado de acordo com a NBR 6022 (ABNT, 2003).

**Bioprospecção de anonáceas ativas contra *Meloidogyne incognita* e
purificação de metabólitos produzidos por *Guatteria australis***

**Viviane Aparecida Costa Campos⁽¹⁾, DeJane Santos Alves⁽²⁾, Denilson
Ferreira Oliveira⁽¹⁾, Vicente Paulo Campos⁽³⁾ e Geraldo Andrade Carvalho⁽²⁾**

⁽¹⁾Universidade Federal de Lavras, Departamento de Química, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000 Lavras, MG, Brasil. E-mail: costavivis@gmail.com, denilson@dqi.ufla.br ⁽²⁾Universidade Federal de Lavras, Departamento de Entomologia, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000 Lavras, MG, Brasil. E-mail: dejane_bio@yahoo.com.br, gacarval@den.ufla.br ⁽³⁾Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000 Lavras, MG, Brasil. E-mail: vpcampos@dfp.ufla.br

Resumo – Frações solúveis em diclorometano, provenientes dos extratos metanólicos de plantas da família Annonaceae, foram submetidas a testes *in vitro* contra o nematoide de galhas, *Meloidogyne incognita*. O melhor resultado foi observado para a espécie vegetal *Guatteria australis*, cujo extrato aumentou a mortalidade dos juvenis do segundo estágio (J2) do nematoide para de 34,9%, o que foi estatisticamente igual à mortalidade causada pelo nematicida comercial Carbofuran (31,1%). Dessa forma, objetivou-se isolar e identificar as substâncias produzidas por tal espécie, com vistas a contribuir para o desenvolvimento de novos métodos de controle de nematoides fitoparasitas. Para tanto, a fração solúvel em diclorometano das cascas de *G. australis* foi submetida a fracionamento empregando-se técnicas cromatográficas. Tal procedimento resultou na purificação de quatro substâncias identificadas como alcalóides, por meio de análises espectrométricas de ressonância magnética nuclear (RMN), sendo três delas caracterizadas como lisicamina, *trans*-N-feruloiltiramina e 8-oxopseudopalmatina.

Termos para indexação: Produtos naturais, atividade biológica, alcaloide, nematoide.

Bioprospecting of Annonaceae active against *M. incognita* and purification of metabolites produced by *Guatteria australis*

Abstract Dichloromethane soluble fractions from the methanol extracts of plants in the family Annonaceae have been assayed *in vitro* for activity against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. The best result was observed for the plant species *Guatteria australis*, which increased the mortality of second-stage juveniles (J2) of the nematode to 34.9%, which was statistically equal to that observed for the commercial nematicide carbofuran (31.1%). Thus, we aimed to isolate and identify substances produced by this plant species in order to contribute to the development of new methods for controlling plant-parasite nematodes. Therefore, the dichloromethane fraction of the bark of *G. australis* was subjected to fractionation employing chromatographic techniques. This procedure resulted in the purification of four alkaloids according to NMR spectroscopic analysis. Three of them correspond to lysicamine, *trans*-N-feruloyltyramine and 8-oxopseudopalmatine.

Index terms: Natural products, biological activity, alkaloid, nematode.

Introdução

Dentre os inúmeros problemas fitossanitários mundialmente enfrentados pelos agricultores, os nematoides do gênero *Meloidogyne* merecem posição de destaque. Estes fitoparasitas são conhecidos como nematoides de galhas por formarem engrossamentos localizados no sistema radicular das plantas hospedeiras. São amplamente disseminados em todo o mundo e atacam praticamente todos os vegetais cultiváveis. É estimado que *Meloidogyne* spp. cause prejuízos, em todo o mundo, que excedem os 100 bilhões de dólares por ano (Sasser et al., 1987).

Em países de clima tropical, algumas espécies como *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood encontram condições de umidade e temperatura ideais para a reprodução. Tais fatores, aliados à alta capacidade reprodutiva, dificultam o controle desses patógenos, os quais, após terem se estabelecido, são de difícil erradicação da área contaminada, exigindo, assim, medidas que possibilitem a redução populacional para tornar viável o cultivo de determinadas culturas (Dias-Arieira et al., 2003).

Dentre os métodos disponíveis para a redução populacional de nematoides fitoparasitas, o controle químico é a opção comumente empregada. Entretanto, o mesmo, muitas vezes, não se apresenta eficiente. Ademais, os produtos comerciais utilizados apresentam alta toxicidade ao ambiente e ao homem e, ainda, elevado custo para o agricultor em geral. Desse modo, algumas possibilidades para contornar tal problema têm sido investigadas, dentre as quais cabe mencionar o emprego de produtos de origem vegetal, já que as plantas são capazes de produzir substâncias com atividade nematicida (Oliveira et al., 2007), sendo, portanto, muito promissoras para o desenvolvimento de novos produtos de baixa toxicidade e menos onerosos.

Vale ressaltar que, dentre as várias famílias botânicas conhecidas por produzirem metabólitos tóxicos a diversos organismos, Annonaceae tem-se destacado. De acordo com dados encontrados na literatura, estudos fitoquímicos da referida família são cada vez mais crescentes, já que as anonáceas acumulam diferentes metabólitos secundários com vasta gama de atividades biológicas, dentre as quais se podem citar a citotóxica, a antitumoral, a abortiva, a imunossupressora, a antiemética, a pesticida, a vermícida, a antimicrobiana, a antimalárica e a nematicida (Rupprecht et al., 1990; Cavé, et al., 1997; Dang, et al., 2011).

Inicialmente, buscou-se, no presente trabalho, selecionar plantas da família Annonaceae que fossem ativas contra *M. incognita*. A seguir, o objetivo foi isolar e identificar a(s) substância(s) produzida(s) pela espécie vegetal que demonstrasse(m) maior(es) toxicidade(s) ao referido nematoide.

Material e Métodos

Diferentes partes de plantas pertencentes à família Annonaceae (Tabela 1) foram coletadas nos dias 21 de março de 2011 e 12 abril de 2011, entre 11h e 12h30min, e das 8h às 12h, respectivamente, sob a supervisão de um mateiro do Departamento de Ciências Florestais (UFLA). Os materiais vegetais frescos foram secos em estufa com ventilação forçada, a 40 °C, por 48, 72 e 96 horas, para folhas, cascas e frutos (bagas), respectivamente. Todos os materiais secos foram moídos em moinho do tipo Willey. Partes dos materiais coletados também foram empregadas na confecção de exsiccatas, que foram depositadas no Herbário Esal da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG, Brasil (Tabela 1).

Uma alíquota dos materiais vegetais secos e moídos (50 g) foi submetida a sete extrações estáticas com metanol (MeOH), sendo cada uma delas realizada

por 24 horas. Para a primeira extração se utilizaram 300 mL do referido solvente, enquanto para as demais o volume foi de 200 mL. As fases líquidas, que foram separadas dos materiais insolúveis por filtração em algodão hidrófilo, foram reunidas e concentradas em evaporador rotatório até *secura*. Os extratos obtidos após a remoção do solvente foram submetidos à partição líquido/líquido, sendo o procedimento conduzido de acordo com Alvarez et al. (2009). Para tanto, misturas de 20 mL de água com 20 mL de diclorometano (CH_2Cl_2) foram adicionadas às alíquotas de 5,0 g de cada extrato vegetal. Após agitação (10 minutos), as misturas foram mantidas em repouso (10 minutos) e, em seguida, as fases solúveis em CH_2Cl_2 foram removidas. O procedimento de extração das fases aquosas foi realizado por mais duas vezes. As fases solúveis em CH_2Cl_2 oriundas do mesmo material vegetal foram reunidas e tratadas com pequena quantidade de sulfato de sódio anidro para a remoção de água residual. Após filtração em algodão hidrófilo, as soluções foram concentradas em evaporador rotatório até a *secura* e liofilizadas por 24 horas.

Para a realização dos testes *in vitro* com juvenis do segundo estágio (J2) de *M. incognita*, uma alíquota de cada fração solúvel em CH_2Cl_2 (2 mg) das partes vegetais das espécies selecionadas (Tabela 1) foi dissolvida em 2,0 mL de Tween 80[®] a $0,01 \text{ g mL}^{-1}$, o que resultou em soluções com concentrações iguais a $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para a obtenção dos J2 de *M. incognita*, raça 3, a serem utilizados nos experimentos, raízes de tomateiros infectados, mantidos em casa de vegetação, foram removidas dos substratos, lavadas, cortadas e trituradas em liquidificador, por 20 segundos, com solução de hipoclorito de sódio a 0,5 % (m/v), seguindo a técnica de Hussey e Barkey (1973), modificada por Boneti e Ferraz (1981). Os ovos retidos em peneira de 0,025 mm de abertura (500 mesh ASTM) foram recolhidos e mantidos em câmara de eclosão formada por uma tela fina de 0,025 mm de abertura e funil de vidro. Os J2 eclodidos até 96 horas após a montagem da câmara foram

descartados. Recolheram-se, para emprego nos testes, somente os J2 que eclodiram 120 horas após a montagem da câmara.

Para o teste de mortalidade de J2 de *M. incognita*, utilizaram-se placas de polipropileno contendo 96 cavidades de 350 μL . Para tanto, em cada cavidade se depositaram 20 μL de uma suspensão aquosa contendo de 20 a 30 J2 de *M. incognita* e, em seguida, adicionaram-se 100 μL de cada solução das frações solúveis em diclorometano na concentração de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, empregando-se cinco repetições por amostra. Como testemunhas foram utilizados Tween 80[®] a 0,01 g mL^{-1} e carbofuran (300 $\mu\text{g mL}^{-1}$), o qual também foi solubilizado em Tween 80[®] a 0,01 g mL^{-1} . As placas foram mantidas em câmara incubadora tipo BOD, a 25,0 °C, por 48 horas. Em seguida, contaram-se os J2 móveis e imóveis, e se adicionou uma gota de solução recém-preparada de hidróxido de sódio (NaOH) 1,0 mol L^{-1} a cada cavidade. Os J2 retos e imóveis foram considerados mortos, enquanto os retorcidos e móveis foram considerados vivos. Os valores obtidos foram transformados em percentagem de J2 mortos e submetidos à análise de variância (ANOVA), empregando-se o programa computacional SISVAR. As médias foram comparadas segundo o teste de Scott e Knott (1974), a 5% de probabilidade. Dessa forma, definiram-se quatro categorias de toxicidade ou atividades nematicidas (AN) das frações, solúveis em diclorometano, testadas, a saber: categorias I = sem atividade, intervalo $0 \leq \text{AN} \leq 2,2$; II = baixa atividade, intervalo $4,5 \leq \text{AN} \leq 7,7$; III = atividade moderada, intervalo $10,5 \leq \text{AN} \leq 13,3$ e IV = alta atividade, equivalente ao nematicida comercial Carbofuran, AN = 34,8 (Tabela 3).

Após a análise dos resultados dos biotestes, a fração solúvel em CH_2Cl_2 (FR-1), proveniente do extrato das cascas de *G. australis*, foi selecionada para dar continuidade ao trabalho, já que tal fração se apresentou ativa contra *M. incognita*. Para tanto, a referida fração foi submetida a sucessivos

fracionamentos por cromatografia em coluna do tipo *flash* (4x17 cm), empregando-se sílica gel 60 (230-400 mesh, Merck) como fase estacionária e combinações de hexano/acetato de etila (Hex/AcOEt) (97:03; 95:5; 80:20; 40:60; 600 mL de cada), AcOEt (600 mL), AcOEt/MeOH (95:5) e MeOH (730 mL), como eluentes. As frações obtidas foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD) e combinadas de acordo com as similaridades cromatográficas, para serem concentradas até a secura em evaporador rotatório e liofilizadas, o que resultou em 25 subfrações: FR-1-1 a FR-1-25. A subfração FR-1-17 (40 mg), dissolvida em 6,0 mL de Hex/AcOEt (20:80), foi submetida a fracionamento por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), realizada em cromatógrafo Shimadzu equipado com detector UV/VIS em arranjo de diodos (DAD), modelo SPD-M20A, e coluna analítica de sílica Gemini (5µm, 250 x 4,6 mm, Phenomenex), à qual foi acoplada pré-coluna contendo a mesma fase estacionária. Empregou-se Hex/AcOEt (20:80) como eluente. Tal processo resultou na obtenção da nova subfração FR-1-17-4. A amostra FR-1-17-4 também foi fracionada por CLAE, utilizando-se Hex/AcOEt (20:80) como eluente. Para tanto, aproximadamente 2 mg da amostra foram solubilizados em 0,7 mL de Hex/AcOEt (20:80). As frações geradas (FR-1-17-4-1 e FR-1-17-4-2) foram concentradas em evaporador rotatório e analisadas em CLAE-DAD.

As frações FR-1-2 e FR-1-3 foram combinadas (massa total igual a 40 mg) e se fracionou o material resultante por cromatografia em coluna do tipo *flash* (1x15 cm), utilizando-se Hex/AcOEt (97:03, 100 mL), AcOEt (50 mL) e MeOH (100 mL) como eluentes. Este procedimento resultou na obtenção das frações FR-1-3-1 a FR-1-3-7.

De forma análoga, a amostra FR-1-11 (58 mg) foi fracionada por cromatografia em coluna (1x15 cm), empregando-se Hex/AcOEt (85:15, 100 mL), AcOEt (100 mL) e MeOH (100 mL) como eluentes. As frações coletadas, após análises por CCD, foram combinadas de acordo com as similaridades

cromatográficas. Em seguida, foram concentradas até a secura, em evaporador rotatório e liofilizadas, dando origem às subfrações FR-1-11-1 a FR-1-11-9.

A fração FR-1-21 (48,2 mg) também foi fracionada por cromatografia em coluna (1x16 cm) com o emprego de Hex/AcOEt (30:70, 100 mL), AcOEt (100 mL), AcOEt/MeOH (1:1, 100 mL) e MeOH (100 mL) como eluentes. Todos os referidos eluentes continham 1 % (v/v) de trietilamina. Coletaram-se frações que, após análises por CCD, foram combinadas de acordo com as similaridades cromatográficas, concentradas até a secura em evaporador rotatório e liofilizadas. Isto resultou na obtenção das frações FR-1-21-1 a FR-1-21-11.

Com vistas a obter mais material vegetal (cascas) de *G. australis*, foi realizada uma nova coleta do material botânico no dia 16 de julho de 2012, entre 16 e 17 horas. Da mesma forma que descrito anteriormente, a nova fração solúvel em diclorometano (FR-2) foi submetida a teste com J2 de *M. incognita* e fracionada por cromatografia em coluna (3x17cm), utilizando-se Hex/AcOEt (3:1), AcOEt (100%), AcOEt/MeOH (9:1), MeOH (100%) e H₂O como eluentes. Coletaram-se frações que foram combinadas, concentradas até a secura em evaporador rotatório e liofilizadas, resultando nas amostras FR-2-1 a FR-2-7.

A amostra FR-2-3 (116 mg) foi fracionada em coluna de sílica-gel (1x17 cm) com o emprego de CH₂Cl₂/AcOEt (4:6, 100 mL) e MeOH (100 mL) como eluentes. Em seguida, as frações coletadas foram analisadas por CCD, combinadas de acordo com as similaridades cromatográficas, concentradas até a secura em evaporador rotatório e liofilizadas, resultando nas amostras FR-2-3-1 a FR-2-3-9. Após o ajuste das condições em CLAE-DAD, a amostra Fr-2-3-6 (23 mg) foi dissolvida em 0,4 mL de Hex/AcOEt (10:40) e fracionada por CLAE, utilizando-se Hex/AcOEt (10:40) como eluente. As frações geradas foram, em seguida, concentradas em evaporador rotatório, resultando nas frações Fr-2-3-6-1 a Fr-2-3-6-6.

A fração Fr-2-3-6-2 (2 mg) também foi fracionada por CLAE-DAD, empregando-se Hex/AcOEt (10:40) como eluente. Tal procedimento gerou frações que foram concentradas em evaporador rotatório: Fr-2-3-6-2-1 e Fr-2-3-6-2-2.

A amostra Fr-2-3-6-4 (2 mg) também foi fracionada por CLAE-DAD, empregando-se Hex/AcOEt (10:40) como eluente. As frações coletadas foram concentradas em evaporador rotatório: Fr-2-3-6-4-1 a Fr-2-3-6-4-2. De forma análoga, a fração Fr-2-3-6-6 (2 mg) foi fracionada por CLAE-DAD, empregando-se Hex/AcOEt (10:40) como eluente. Obtiveram-se as seguintes frações: Fr-2-3-6-6-1 e Fr-2-3-6-6-2.

Após o processo de purificação, as identificações estruturais das substâncias isoladas foram feitas por meio de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), em aparelho Varian Inova 600 equipado com *cryoprobe* (^1H : 600 MHz; ^{13}C : 151 MHz) e *software* VnmrJ 3.0. Para tanto, empregou-se clorofórmio deuterado (CDCl_3 , Aldrich) como solvente. Realizaram-se experimentos uni e bidimensionais de ^1H e ^{13}C , empregando-se os picos dos solventes ou do tetrametilsilano (TMS) como referência.

Resultados e discussão

Das dez espécies de plantas da família Annonaceae empregadas neste trabalho, foram obtidos 20 extratos metanólicos e as correspondentes frações orgânicas (solúveis em diclorometano) (Tabela 2), que apresentaram variadas toxicidades para os J2 de *M. incognita*. As frações provenientes das espécies *Annona cacans* (folhas), *Annona coriacea* (cascas), *Annona sylvatica* (cascas e folhas), *Duguetia lanceolata* (frutos), *Xylopiya brasiliensis* (cascas) e *Xylopiya sericea* (folhas e frutos) demonstraram atividade nematicida baixa (categoria II). Já os extratos de *Annona coriacea* (folhas) e *Duguetia lanceolata* (cascas)

apresentaram atividade nematicida moderada (categoria III), enquanto os extatos de *Guatteria australis* (cascas) apresentaram atividade nematicida alta (categoria IV), com percentagem de J2 mortos (34,9%) estatisticamente igual à observada para o carbofuran (31,1%), que se trata de um nematicida comercializado com o nome de Furadan (Tabela 3).

Como as concentrações finais nas células da placa eram de 833 e 250 µg/mL, para as frações testadas e para o carbofuran, respectivamente, acredita-se que haja grande potencial para o uso de *G. australis* no desenvolvimento de novos nematicidas. Afinal, provavelmente, a concentração da substância ativa na fração da referida planta deve ser de tal modo a acarretar concentração final inferior a 250 µg/mL na célula. Logo, esta espécie vegetal foi selecionada para dar continuidade ao trabalho. Para tanto, foram realizadas várias etapas de fracionamento por cromatografia em coluna, sempre monitoradas por análises por CCD, de forma a se dar preferência para a continuidade do processo de fracionamento às frações com menores complexidades cromatográficas e maiores massas. Para tornar tal processo mais eficiente, também foram feitas várias análises e purificações por CLAE-DAD que, em geral, apresentaram resultados melhores que a cromatografia em coluna e CCD. As massas das frações obtidas em cada etapa do processo podem ser observadas nas Tabelas 4, 5, 6 e 7.

Vale mencionar que, para dar prosseguimento ao trabalho, foi necessário obter maior quantidade da fração solúvel em diclorometano (FR-2) do extrato das cascas de *G. australis*, que também apresentou atividade nematicida (Tabela 8), o que confirmou os resultados anteriores, embora a percentagem de J2 mortos tenha sido menor que a do material anteriormente estudado. Tal variação parece normal, já que dados da literatura revelam que a produção de metabólitos secundários e a conseqüente atividade biológica são bastante influenciadas por fatores ambientais, tais como clima, tipo de solo, além do local, época e horário

da coleta (Cechinel Filho, 1998). Também vale mencionar que a atividade observada para o carbofuran neste teste foi bem mais elevada que a descrita anteriormente, o que também parece um resultado razoável, se for levado em consideração o fato de que a concentração do referido nematocida também foi maior. No teste anterior (Tabela 3) era de 250 µg/mL, enquanto a concentração utilizada no novo teste (Tabela 8) foi de 350 µg/mL.

O procedimento adotado para o fracionamento da amostra FR-2 foi similar ao empregado para a FR-1 (Tabelas 9 e 10). Em decorrência, a purificação da fração solúvel em CH₂Cl₂ das cascas de *G. australis* permitiu isolar quatro substâncias: FR-1-21-4 (substância 1), FR-1-17-4-2 (substância 2), FR-2-3-6-2-2 (substância 3) e FR-2-3-6-6-2 (substância 4), como pode ser observado nos esquemas gerais (Figuras 1 e 2).

Os dados de RMN extraídos dos espectros de ¹H e ¹³C, bem como das correlações homo e heteronucleares, permitiram atribuir a estrutura do alcaloide lisicamina à substância 1. Tal atribuição foi confirmada pela comparação dos dados de RMN com aqueles disponíveis na literatura para a mencionada substância (Tabela 11). Dentre os sinais observados, cabe destacar, inicialmente, aqueles acima de 7,20 ppm no espectro de ¹H, que são característicos de sistemas aromáticos, enquanto os singletos em 4,08 e 4,00 ppm, no mesmo espectro, sugerem a presença de grupos metóxi. O sinal em 182,9 ppm no espectro de ¹³C é condizente com a presença de uma carbonila na estrutura, enquanto o alto valor de deslocamento químico do duplete em 8,88 ppm no espectro de ¹H é bastante comum em sistemas aporfínicos (Figura 3).

A partir dos dados de RMN extraídos dos espectros de ¹H e ¹³C, e das correlações homo e heteronucleares, foi possível atribuir a estrutura da *trans*-N-feruloiltiramina à substância 2. Tal elucidação foi confirmada por meio de comparação dos dados de RMN da substância purificada com aqueles disponíveis na literatura (Tabela 12). Dentre os dados obtidos, vale mencionar

que no espectro de ^1H se podem observar sinais acima de 6,6 ppm, o que indicava a presença de sistemas aromáticos. Os sinais em 6,16 e 7,53 ppm, com constantes de acoplamento iguais a 15,4 Hz, pareciam característicos de hidrogênios olefínicos vicinais, acoplados entre si em configuração *trans*. E ainda, o sinal em, aproximadamente, 3,9 ppm sugeria a presença de grupo metóxi na estrutura. O sinal em 166,11 ppm no espectro de ^{13}C indicava a presença de ácido carboxílico, éster carboxílico ou amida na estrutura (Figura 3).

Os dados de RMN extraídos dos espectros de ^1H e ^{13}C , bem como das correlações homo e heteronucleares, também permitiram atribuir a estrutura do alcaloide 8-oxopseudopalmatina à substância 4. Tal atribuição foi confirmada pela comparação dos dados de RMN com aqueles disponíveis na literatura para a referida substância (Tabela 13). Dentre os sinais observados, cabe destacar, inicialmente, aqueles entre 3,95 e 4,30 ppm no espectro de ^1H , que são característicos de prótons pertencentes a grupos metóxi aromáticos, enquanto os singletos entre 6,75 e 7,81 ppm correspondem a prótons aromáticos. O sinal em 161,5 ppm no espectro de ^{13}C é condizente com a presença de uma carbonila de um grupo amida na estrutura, enquanto os valores de deslocamentos químicos para os carbonos em 28,2 e 39,7 ppm sugerem a presença de grupos metil em sistemas cíclicos contendo átomos de nitrogênio, corroborando a estrutura de um alcaloide (Figura 3).

Quanto à substância 3, aparentemente se trata de um alcaloide com estrutura química inédita, o que implicará no emprego de outras técnicas de identificação para complementar os dados de RMN.

Conclusões

Dentre as frações solúveis em CH_2Cl_2 de extratos de anonáceas testadas contra *M. incognita*, aquelas provenientes das espécies *A. cacans* (folhas), *A.*

coriacea (cascas e folhas), *A. sylvatica* (cascas e folhas), *D. lanceolata* (cascas e frutos), *X. brasiliensis* (cascas), *X. sericea* (folhas e frutos) e *G. australis* (cascas) apresentaram atividade nematicida. No entanto, foi possível selecionar *G. australis* (cascas), já que tal espécie se mostrou bastante promissora para o desenvolvimento de novos produtos para o controle do referido nematoide. O fracionamento da referida fração resultou no isolamento de quatro alcaloides, sendo identificados três até o presente momento: lisicamina, *trans*-N-feruloiltiramina e 8-oxopseudopalmatina. O quarto alcaloide isolado ainda se encontra em fase de identificação. Estudos posteriores deverão ser realizados para avaliar a atividade nematicida das substâncias isoladas contra *M. incognita*.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudos; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão de recursos e ao Laboratório Nacional de Biosciências (LNBio), pelo acesso ao equipamento de RMN.

Referências

ALVAREZ COLOM, O.; NESKE, A.; CHAHBOUNE, N.; ZAFRA-POLO, M. C.; BARDÓN, A. Tucupentol, a Novel mono-tetrahydrofuranic acetogenin from *Annona montana*, as a potent inhibitor of mitochondrial complex I. **Chemistry & Biodiversity**, v. 6, n.3, p. 335-340, 2009.

BONETI, J.I.S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 6, n. 3, p. 553, 1981.

CAVALCANTE, J.M.S.; NOGUEIRA, T.B.S. S.; TOMAZ, A. C.A.; ANTAS, S.D.; AGRA, M.F.; SOUZA, M.F.V.; CARVALHO, P.R.C.; RAMOS, S.R.; NASCIMENTO, S.C.; GONÇALVES-SILVA, T. Steroidal and phenolic compounds from *Sidastrum paniculatum* (L.) Fryxell and evaluation of cytotoxic and anti-inflammatory activities. **Química Nova**, v. 33. n. 4, p. 846-849, 2010.

CAVÉ, A.; CORTES, D.; FIGADÈRE, A.; LAURENS, A.; PETTIT, G. R. **Acetogenins from Annonaceae**, p. 81; In progress in the Chemistry of Organic Natural Products; Herz, W.; Kirby, G.W.; Moore, R.E.; Steglich, W.; Tamm, Ch, eds.; Springer-Verlag: Wien, 1997.

CECHINEL FILHO, V. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativo a partir de plantas medicinais, Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

COSTA, E.V.X.; PINHEIRO, M.L.; BARISON, A.; CAMPOS, F.R.; SALVADOR, M.J.; MAIA, B.H.L.N.S.; CABRAL, E.C.; EBERLIN, M.N. Alkaloids from the bark of *Guatteria hispida* and their evaluation as antioxidant and antimicrobial agents. **Journal of Natural Products**, v. 73, p. 1180-1183, 2010.

DANG, Q.L.; KIM, W.K.; NGUYEN, C.M.; CHOI, Y.H.; CHOI, G.J.; JANG, K.S.; PARK, M.S.; LIM, C.H.; LUU, N.H.; KIM, J.C. Nematicidal and antifungal activities of annonaceous acetogenins from *Annona squamosa* against various plant pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 20, p. 11160–11167, 2011.

DIAS-ARIEIRA, C.R.; FERRAZ, S.; DE FREITAS, L.G.; MIZOBUTSI, E.H. Avaliação de gramíneas forrageiras para o controle de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* (Nematoda). **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 25, n. 2, p. 473-477, 2003.

HUSSEY, R.S.; BARKER, K.R. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. **Plant Diseases e Reporter**, v. 57, p. 1025 -1028, 1973.

KHAIRANA, H.; JAMAL, J.A.; JALIL, J. Phytochemical study of *Cananga odorata* (Lam) Hook. F. & Thomson & Thoms (Annonaceae). **International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 4, p. 465-467, 2012.

OLIVEIRA, D.F.; CARVALHO, H. W.P.; NUNES, A.S.; SILVA, G.H.; CAVALHEIRO, A.J.; CAMPOS, V.P. Atividade de carboidrato purificado a partir da cebola (*Allium cepa* L.) e de carboidratos comerciais sobre juvenis de *Meloidogyne exigua* Goeldi. **Nematologia Brasileira**, v. 31, p. 202-209, 2007.

Rupprecht, J.K., Hui, Y.-H. McLaughlin, J.L. Annonaceous acetogenins: A review. *Journal. Natural. Products.* v. 53: p. 237-278. 1990.

SASSER, J.N.; FRECKMAN, D.W. **A world perspective on nematology: the role of society.** In: VEECH, J. A., DICKERSON, D. W. *Vistas on nematology.*

Hyattsville, USA: Society of Nematologists, p. 7-14, 1987.

SCOTT, A.; KNOTT, M. Cluster-analysis method for grouping means in analysis of variance. **Biometrics**, v. 30, n. 3, p. 507-512, 1974.

SIQUEIRA, J.M.; BOMM, M.D.; PEREIRA, N.F. G.; SILVA GARCEZ, W.; BOAVENTURA, M.A.D. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* - Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* leach. **Química Nova**, v. 21. n. 5, p. 557-559, 1998.

WANG, T; YUAN, Y.; WANG, J.; HAN, C.; CHEN, G. Anticancer activities of constituents from the stem of *Polyalthia rumphii*. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 25. n. 2, p. 353-356, 2012.

Tabela 1 Espécies de plantas da família Annonaceae e suas partes vegetais utilizadas para a prospecção de moléculas ativas contra *Meloidogyne incognita*

Nome científico	Parte coletada	Número de exsicata ^a
<i>Annona cacans</i> Warm.	Folhas	27639
<i>Annona coriacea</i> Mart.	Cascas e folhas	27640
<i>Annona neolaurifolia</i> H. Rainer	Cascas e folhas	27638
<i>Annona sylvatica</i> A.St.-Hil.	Cascas Folhas	27647
<i>Duguetia arenicola</i> Maas	Folhas	27637
<i>Duguetia lanceolata</i> A. St.-Hil.	Folhas, frutos e cascas	27629
<i>Gutteria australis</i> A.St.-Hil.	Cascas e folhas	27645
<i>Xylopia brasiliensis</i> Spreng.	Cascas e folhas	27636
<i>Xylopia emarginata</i> Mart.	Cascas e folhas	-
<i>Xylopia sericea</i> A.St.-Hil.	Folhas, cascas e frutos	27646

^a As exsicatas foram depositadas no Herbário Esal, da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil.

Tabela 2 Espécies vegetais empregadas no presente estudo e massas (fresca e seca) das partes empregadas no processo, dos extratos metanólicos obtidos e das frações solúveis em diclorometano dos mesmos

Espécies	A ^a	B ^b	C ^c	D ^d	E ^e	F ^f	G ^g	H ^h
<i>Annona cacans</i> Warm.	Folhas	669	242	50,1	9,4	5,14	1,13	21,9
<i>Annona coriacea</i> Mart.	Folhas	952	354	50,6	6,0	5,00	1,09	2,9
	Cascas	730	174	50,3	3,1	2,03	0,12	5,7
<i>Annona neolaurifolia</i> H. Rainer	Folhas	590	175	50,5	6,9	5,02	1,54	30,6
	Cascas	818	266	49,8	6,4	5,01	1,29	25,8
<i>Annona sylvatica</i> A.St.-Hil.	Folhas	1.023	437	50,5	11,4	5,05	0,97	19,2
	Cascas	1.381	415	52,2	6,35	5,00	0,42	8,4
<i>Duguetia arenicola</i> Maas	Folhas	553	277	50,2	8,9	5,05	0,81	16,1
<i>Duguetia lanceolata</i> A. St.-Hil.	Folhas	606	263	50,4	9,0	5,03	1,61	32,0
	Cascas	964	290	53,9	7,3	5,02	0,42	8,3
	Frutos	1.354	367	50,6	6,8	4,99	0,96	19,4
<i>Guatteria australis</i> A.St.-Hil.	Folhas	519	215	50,1	6,1	5,09	1,02	19,9
	Cascas	1247	311	49,5	3,4	2,50	0,16	6,3
<i>Xylopia brasiliensis</i> Spreng.	Folhas	697	275	50,3	9,4	5,07	2,13	41,9
	Cascas	1.116	377	50,0	5,4	2,49	0,90	36,1
<i>Xylopia emarginata</i> Mart.	Folhas	916	450	50,5	13,0	5,07	0,92	18,1
	Cascas	905	329	50,4	7,5	5,03	1,78	35,3
<i>Xylopia sericea</i> A.St.-Hil.	Folhas	669	873	50,3	10,9	4,95	0,78	15,8
	Cascas	952	454	51,1	12,6	5,28	1,12	21,1
	Frutos	730	233	52,5	14,0	5,22	2,40	46,0

^a Parte da planta empregada no presente estudo; ^b massa (g) fresca da parte coletada; ^c massa (g) da parte coletada, após secagem em estufa, a 40 °C; ^d massa (g) da parte coletada, após secagem em estufa, que foi empregada no preparo do extrato metanólico; ^e massa (g) do extrato metanólico; ^f massa (g) do extrato metanólico que foi empregada na partição entre água e diclorometano; ^g massa (g) da fração solúvel em diclorometano do extrato metanólico da planta; ^h rendimento (%) da fração solúvel em diclorometano, em relação à massa de extrato metanólico empregado na partição entre água e diclorometano

Tabela 3 Mortalidade *in vitro* de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* expostos às frações solúveis em diclorometano dos extratos metanólicos de anonáceas

Tratamentos	Partes coletadas	J2 mortos (%)*
<i>Annona cacans</i>	folhas	5,4 II
<i>Annona coriacea</i>	cascas	4,5 II
<i>Annona neolaurifolia</i>	folhas	10,5 III
	cascas	0,00 I
<i>Annona sylvatica</i>	cascas	2,2 I
	folhas	5,8 II
<i>Duguetia arenicola</i>	folhas	7,6 II
	folhas	1,6 I
<i>Duguetia lanceolata</i>	cascas	13,3 III
	folhas	0,0 I
	frutos	5,5 II
<i>Guatteria australis</i>	cascas	34,8 IV
	folhas	2,1 I
<i>Xylopia brasiliensis</i>	cascas	6,1 II
	folhas	1,9 I
<i>Xylopia emarginata</i>	folhas	0,0 I
	cascas	0,0 I
<i>Xylopia sericea</i>	cascas	0,0 I
	folhas	4,7 II
	frutos	7,7 II
Tween 80 (controle)		0,0 I
Carbofuran (controle)		31,11IV

* Médias seguidas pelos mesmos números não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Scott e Knott ($P \leq 0,05$)

Categoria relacionada à atividade nematocida: I = sem atividade, II = baixa atividade, III = atividade moderada, IV = alta atividade

Tabela 4 Códigos e massas das frações obtidas após fracionamento, em coluna de sílica, da fração solúvel em CH₂Cl₂ do extrato metanólico das cascas de *Guateria australis*

Eluente	Código	Massa(mg)
Hex/AcOEt (97:03)	FR1-1	1,0
	FR1-2	35,2
	FR1-3	6,4
	FR1-4	3,4
Hex/AcOEt (97:03) e Hex/AcOEt (95:05)	FR1-5	6,7
Hex/AcOEt (95:05)	FR1-6	22,7
	FR1-7	8,4
	FR1-8	19,1
Hex/AcOEt (80:20)	FR1-9	24,1
	FR1-10	15,1
	FR1-11	58,4
	FR1-12	27,7
	FR1-13	40,8
Hex/AcOEt (80:20) e Hex/AcOEt (40:60)	FR1-14	22,4
Hex/AcOEt (40:60)	FR1-15	57,6
	FR1-16	22,8
Hex/AcOEt (40:60) e AcOEt (100%)	FR1-17	45,8
AcOEt (100%)	FR1-18	15,4
	FR1-19	17,9
AcOEt (100%) e AcOEt/MeOH (95:05)	FR1-20	37
AcOEt/MeOH (95:05)	FR1-21	48,2
	FR1-22	13,8
AcOEt/MeOH (95:05) e MeOH (100%)	FR1-23	150,9
MeOH (100%)	FR1-24	20,1
	FR1-25	46,2
H ₂ O	FR1-26	8,3

Tabela 5 Códigos e massas das frações obtidas após fracionamento das amostras FR-1-2 e FR-1 3

Eluente	Código	Massa (mg)
Hex/AcOEt (97:03)	FR-1-3-1	19,4
	FR-1-3-2	14,0
Hex/AcOEt (97:03) e AcOEt 100%	FR-1-3-3	0,8
AcOEt 100%	FR-1-3-4	1,2
AcOEt 100%	FR-1-3-5	0,5
MeOH 100%	FR-1-3-6	5,8

Tabela 6 Códigos e massas das frações obtidas após fracionamento da amostra FR-1-11

Eluente	Frações agrupadas	Código	Massa (mg)
Hex/AcOEt (85:15)	1-5	FR-1-11-1	3,1
	6-8	FR-1-11-2	6,0
	9 e 10	FR-1-11-3	11,0
	11-15	FR-1-11-4	23,7
Hex/AcOEt (85:15) e AcOEt 100%	16-18	FR-1-11-5	1,3
	19-22	FR-1-11-6	1,0
AcOEt 100%	23 e 24	FR-1-11-7	7,2
	25-31	FR-1-11-8	7,0
AcOEt 100% e MeOH 100 %	MeOH	FR-1-11-9	3,6

Tabela 6 Códigos e massas das frações obtidas após fracionamento da amostra FR-1-11

Eluente	Frações agrupadas	Código	Massa (mg)
Hex/AcOEt (85:15)	1-5	FR-1-11-1	3,1
	6-8	FR-1-11-2	6,0
	9 e 10	FR-1-11-3	11,0
	11-15	FR-1-11-4	23,7
Hex/AcOEt (85:15) e AcOEt 100%	16-18	FR-1-11-5	1,3
	19-22	FR-1-11-6	1,0
AcOEt 100%	23 e 24	FR-1-11-7	7,2
	25-31	FR-1-11-8	7,0
AcOEt 100% e MeOH 100 %	MeOH	FR-1-11-9	3,6

Tabela 7 Códigos, massas e aspectos das frações obtidas após fracionamento da amostra FR-1-21

Eluente	Código	Massa (mg)
Hex/AcOEt (30:70) /1% de trietilamina	FR-1-21-1	1,4
	FR-1-21-2	1,5
Hex/AcOEt (30:70) /1% de trietilamina e AcOEt/1% de trietilamina	FR-1-21-3	4,2
	FR-1-21-4	1,0
AcOEt/1% de trietilamina	FR-1-21-5	1,3
	FR-1-21-6	30,5
	FR-1-21-7	2,8
	FR-1-21-8	2,9
	FR-1-21-9	2,4
AcOEt/MeOH (1:1) /1% de trietilamina	FR-1-21-10	2,0
	FR-1-21-11	5,4
MeOH 100%		

Tabela 8 Mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* expostos às frações provenientes do particionamento do extrato metanólico entre água e diclorometano (CH₂Cl₂)

Tratamento	J2 mortos (%)
Carbofuran (controle)	91,7 c
Fração aquosa	7,7 a
Fração insolúvel	8,4 a
Fração CH ₂ Cl ₂	21,4 b

*Médias seguidas com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Scott e Knott, a 5% de significância

Tabela 9 Códigos, massas e características das frações obtidas após fracionamento da amostra FR2 por cromatografia em coluna de sílica do tipo *flash*

Eluente	Código	Massa (mg)
Hex/AcOEt (3:1)	-----	-----
Hex/AcOEt (3:1)	FR2-1	213,6
Hex/AcOEt (3:1) e AcOEt (100%)	FR2-2	33,1
AcOEt (100%)	FR2-3	116,1
AcOEt/MeOH (9:1)	FR2-4	73,3
AcOEt/MeOH(9:1)	FR2-5	147,3
MeOH (100%)	FR2-6	55,5
H ₂ O	FR2-7	23,2

Tabela 10 Códigos e massas das frações obtidas após fracionamento da amostra Vi-02-105-03 por cromatografia em coluna de sílica do tipo *flash*

Eluente	Código	Massa (mg)
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (4:6)	FR2-3-1	1x10 ⁻⁴
	FR2-3-2	4x10 ⁻⁴
	FR2-3-3	16,9
	FR2-3-4	15,8
	FR2-3-5	12,8
	FR2-3-6	23,2
	FR2-3-7	3,0
	FR2-3-8	9,3
	FR2-3-9	36,1
MeOH (100%)		

Tabela 11 Dados de RMN de ^1H (600 MHz) e de ^{13}C (151 MHz) obtidos para a amostra substância 1 (lisicamina isolada no presente trabalho) e dados da literatura para o alcaloide lisicamina. Em todos os casos, CDCl_3 foi utilizado como solvente

Posição do átomo de carbono	Dados espectrais da lisicamina				
	Substância 1		Literatura (300 MHz) ¹		Literatura (500 MHz) ²
	^1H	^{13}C	^1H	^1H	^{13}C
1	---	156,9	---	---	157,5
1-OCH ₃	4,11 (3 H, s)	56,2	4,08 (3 H, s, OCH ₃)	4,10 (3H, s, OCH ₃)	56,3
2-OCH ₃	4,03 (3H, s)	60,7	4,00 (3 H, s, O CH ₃)	4,02 (3H, s, OCH ₃)	60,2
2	---	152,1	---	---	152,8
3a	---	135,6	---	---	135,5
3	7,24 (1 H, s)	106,4	7,20 (1H, sl)	7,24 (1H, s)	106,6
4	7,82 (1 H, d, J= 5,3 Hz)	123,6	7,78 (1H, dl, J=5,2 Hz)	7,84 (1H, d, J=5,0 Hz)	123,8
5	8,92 (1 H, d, J=5,2 Hz)		8,88 (1H, d, J=5,2 Hz)	8,92 (1H, d, J=5,0Hz)	144,9
6a	---	145,1	---	---	145,4
7a	---	132,1	---	---	132,2
7	---	182,7	---	---	182,9
8	8,60 (1 H, ddd, J ₁ =0,4 Hz, J ₂ = 1,6 Hz, J ₃ = 7,9 Hz)	128,9	8,56 (1H, dd, J=7,9 e 1,2 Hz)	8,61 (1H, dd, J=5,6 e 0,7 Hz)	129,0
9	7,59 (1 H, ddd, J ₁ = 1,1, J ₂ = 7,2 Hz, J ₃ = 7,8 Hz)	128,8	7,56 (1H, td, J=7,9 e 1,2 Hz)	7,60 (1H, ddd, J=8,4, 8,4, 1,4 Hz)	128,6
10	7,78 (1 H, ddd, J ₁ = 1,6, J ₂ = 7,2 Hz, J ₃ = 8,3 Hz)	134,3	7,76 (1H, td, J=7,9 e 1,2 Hz)	7,78 (1H, ddd, J=8,4, 8,4 e 1,4 Hz)	134,2
11	9,19 (1 H, ddd, J ₁ =0,6 Hz, J ₂ = 1,1 Hz, J ₃ =8,3 Hz)	128,5	9,16 (1H, dl, J=7,9 Hz)	9,19 (1H, dd, J=5,5 e 0,7 Hz)	128,4
11a	---	134,4	---	---	134,4
1a	---	120,0	---	---	120,0
1b	---	122,3	---	---	122,3

¹ Siqueira, et al. (1998)

² Khairana, et al. (2012)

Tabela 12 Dados de RMN de ^1H (600 MHz) e de ^{13}C (151 MHz) obtidos para a amostra substância 2 (*trans*- N-feruloiltiramina isolada no presente trabalho) e dados da literatura para o alcaloide *trans*-N-feruloiltiramina. Todos foram obtidos em CDCl_3

Posição do átomo de carbono	Dados espectrais para a <i>trans</i> -N-feruloiltiramina					
	Substância 2		Literatura (200 MHz, CDCl_3) ¹		Literatura (400 MHz, CDCl_3) ²	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1 (C)	166,11	---	167,04	---	169,5	---
2 (CH)	118,03	6,16 (1H, d, J=15,4 Hz)	117,47	6,16 (d, J=15,8 Hz)	118,8	6,40 (d, J=15,6 Hz)
3 (CH)	142,05	7,53 (1H, d, J=15,4 Hz)	140,89	7,37 (d, J=15,8 Hz)	142,0	7,90 (d, J=15,6 Hz)
4 (C)	127,26	---	126,82	---	128,2	---
5 (CH)	109,48	6,97 (1H, d, J=1,8 Hz)	109,70	6,90 (d, J=2,1 Hz)	111,6	7,06 (d, J=2,0 Hz)
6 (C)	146,57	---	147,2	---	144,2	---
7 (C)	147,37	5,79 (1H, s)	147,69	---	149,7	---
8 (CH)	114,60	6,89 (1H, d, J=8,2 Hz)	115,17	6,68 (d, J=8,3 Hz)	116,5	6,78 (d, J=8,0 Hz)
9 (CH)	122,09	7,04 (1H, dd, J=1,6 e 8,2 Hz)	121,89	6,93 (brd, J=8,3 Hz)	123,2	7,00 (dd, J=8,0 e 1,6 Hz)
1' (CH ₂)	40,83	3,62 (1H, d, J=6,8 Hz)	40,89	3,43 (t, J=7,2 Hz)	42,5	3,45 (t, J=7,2 Hz)
		3,60 (1H, d, J=6,8 Hz)		---		---
2' (CH ₂)	34,72	2,81 (1H, t, J=6,8 Hz)	34,41	2,67 (t, J=7,2 Hz)	35,8	2,73 (t, J=7,6 Hz)
3' (C)	130,89	---	129,68	---	131,5	---
4'/8' (CH)	129,87	7,09 (1H, m)	129,53	6,96 (d, J=8,3 Hz)	131,3	7,03 (d, J=8,2 Hz)
		7,08 (1H, m)		---		---
5'/7' (CH ₂)	115,48	6,80 (1H, m)	114,91	6,68 (d, J=8,3 Hz)	116,5	6,71 (d, J=8,6 Hz)
		6,79 (1H, m)		---		---
6' (C)	154,28	---	155,17	---	156,8	---
OCH ₃	55,89	3,91 (1H, s)	55,56	3,79 (s)	56,4	3,84 (s)
NH	---	5,52 (1H, t, J=5,6 Hz)	---	---	---	---

¹Cavalcante et al. (2010)

²Wang et al. (2012)

Tabela 13 Dados de RMN de ^1H (600 MHz) e de ^{13}C (151 MHz) obtidos para a substância 4 (8-oxopseudopalmatina) isolada no presente trabalho e dados da literatura para o referido alcaloide. Todos foram obtidos em CDCl_3

Posição do átomo de carbono	Substância 4		Literatura (400 MHz, CDCl_3) ¹	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
14	161,5		161,5	
10	153,5		153,3	
16	150,2		149,9	
11	149,0		148,9	
17	148,4		148,3	
6	136,2		136,1	
13	132,1		132,1	
4	128,4		128,3	
5	122,4		122,4	
8	118,6		118,4	
15	110,5	6,75 (s, 1H)	110,6	6,75 s
12	107,8	7,81 (s, 1H)	108,0	7,84 s
18	107,6	7,25 (s, 1H)	107,9	7,26 s
9	105,9	6,95 (s, 1H)	105,7	6,95 s
7	101,1	6,84 (s, 1H)	101,1	6,86 s
OCH ₃	56,2	4,03 (s, 3H)	56,2	4,03 s
OCH ₃	56,2	4,02 (s, 3H)	56,1	4,02 s
OCH ₃	56,2	3,99 (s, 3H)	56,3	3,99 s
OCH ₃	56,2	3,95 (s, 3H)	56,2	3,95 s
2	39,7	4,37 (t, J=6,2 Hz, 2H)	39,8	4,38 m
3	28,2	2,95 (t, J=6,2 Hz, 2H)	28,1	2,95 m

¹ Costa, et al., 2010

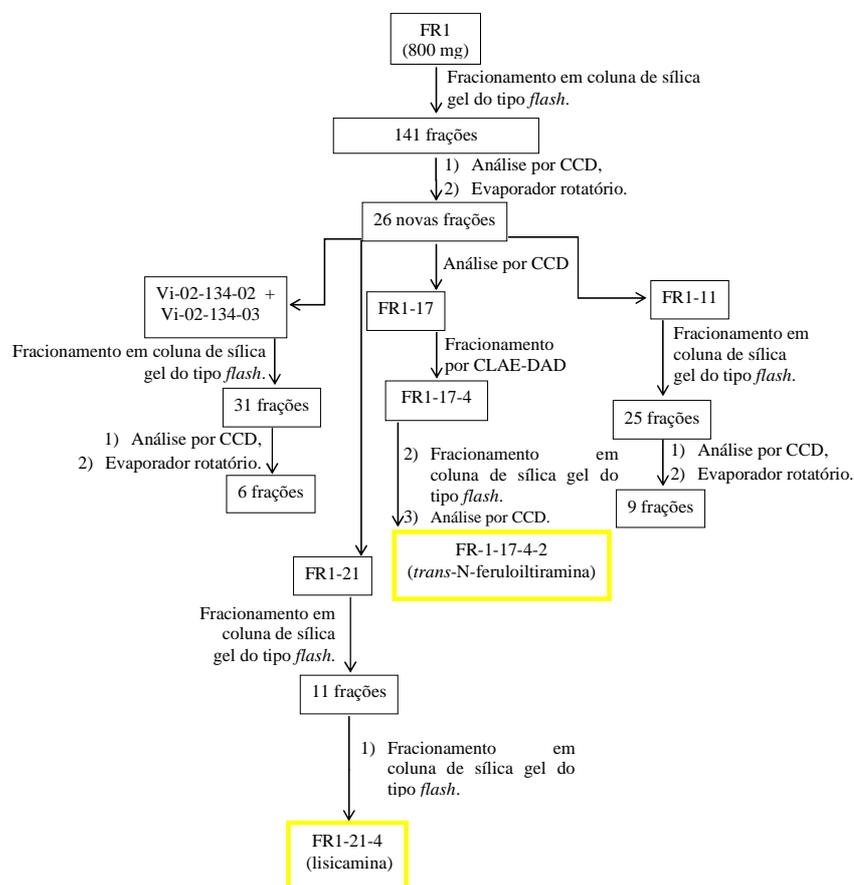


Figura 1 Esquema geral do processo de purificação da fração solúvel em CH_2Cl_2 (FR1) das cascas de *Guateria australis* (primeira coleta)

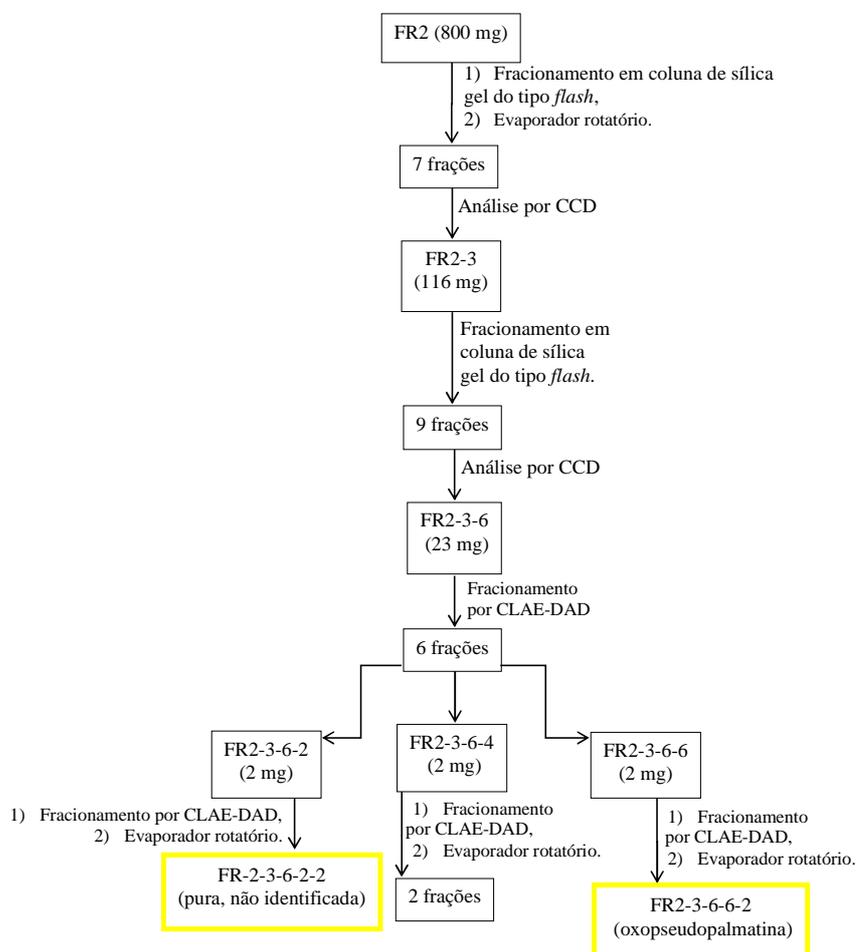


Figura 2 Esquema geral do processo de purificação da fração solúvel em CH_2Cl_2 (FR2) das cascas de *Guateria australis* (segunda coleta)

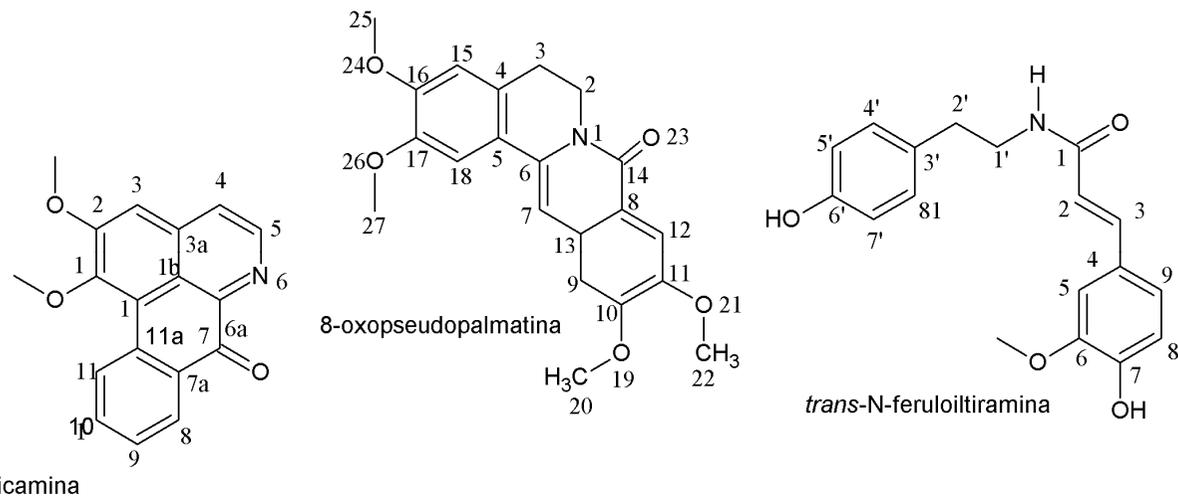


Figura 3 Estruturas dos alcaloides, liscamina (substância 1), *trans*-N-feruloiltiramina (substância 2) e 8-oxopseudopalmatina (substância 4) presentes na fração solúvel em CH₂Cl₂ do extrato bruto das cascas de *Guateria australis*

ANEXOS

Anexo	Título	Página
FIGURA 1A	Espectro de RMN ^1H da substância 2 (<i>trans</i> -N-feruloiltiramina) em CDCl_3 , 600 MHz	77
FIGURA 1B	Espectro de RMN ^{13}C de substância 2 (<i>trans</i> -N-feruloiltiramina) em CDCl_3 , 151 MHz	78
FIGURA 1C	Mapa da correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) da substância 2 (<i>trans</i> -N-feruloiltiramina) em CDCl_3 , 600 MHz	79
FIGURA 1C'	Ampliação do mapa da correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) da substância 2 (<i>trans</i> -N-feruloiltiramina) em CDCl_3 , 600 MHz	
FIGURA 1D	Mapa da correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da substância 2 (<i>trans</i> -N-feruloiltiramina) em CDCl_3 , 600x151 MHz	80
FIGURA 1D'	Ampliação do mapa da correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) da substância 2 (<i>trans</i> -N-feruloiltiramina) em CDCl_3 , 600x151 MHz	
FIGURA 1E	Mapa da correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HSQC) da substância 2 (<i>trans</i> -N-feruloiltiramina) em CDCl_3 , 600x151 MHz	81
FIGURA 1E'	Ampliação do mapa da correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HSQC) da substância 2 (<i>trans</i> -N-feruloiltiramina) em CDCl_3 , 600x151 MHz	
FIGURA 2A	Espectro de RMN ^1H da substância 1 (lisicamina) em CDCl_3 , 600 MHz	82
FIGURA 2B	Mapa da correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) da substância 1 (lisicamina) em CDCl_3 , 600 MHz	83
FIGURA 2B'	Ampliação do mapa da correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) da substância 1 (lisicamina) em CDCl_3 , 600 MHz	
FIGURA 2C	Mapa da correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) de 1-21-4 (lisicamina) em CDCl_3 , 600x151 MHz	84
FIGURA 2C'	Ampliação do mapa da correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) de 1-21-4 (lisicamina) em CDCl_3 , 600x151 MHz	
FIGURA 2D	Mapa da correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HSQC) da substância 1 (lisicamina) em CDCl_3 , 600x151 MHz	85
FIGURA 3A	Espectro de RMN ^1H da substância 4 (8-oxopseudopalmatina) em CDCl_3 , 600 MHz	86
FIGURA 3A'	Primeira ampliação do espectro de RMN ^1H da substância 4 (8-oxopseudopalmatina) em CDCl_3 , 600 MHz	87
FIGURA 3A''	Segunda ampliação do espectro de RMN ^1H de substância 4 (8-oxopseudopalmatina) em CDCl_3 , 600 MHz	88
FIGURA 3B	Mapa da correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) de substância 4 (8-oxopseudopalmatina) em CDCl_3 , 600 MHz	89
FIGURA 3B'	Ampliação do mapa da correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) de substância 4 (8-oxopseudopalmatina) em CDCl_3 , 600 MHz	90
FIGURA 3C	Mapa da correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a longa distância (HMBC) de substância 4 (8-oxopseudopalmatina) em CDCl_3 , 600x151 MHz	91
FIGURA 3C'	Ampliação do mapa da correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a longa distância (HMBC) de substância 4 (8-oxopseudopalmatina) em CDCl_3 , 600x151 MHz	92
FIGURA 3D	Mapa da correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HSQC) de substância 4 (8-oxopseudopalmatina) em CDCl_3 , 600x151 MHz	93
FIGURA 3D'	Ampliação do mapa da correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HSQC) de substância 4 (8-oxopseudopalmatina) em CDCl_3 , 600x151 MHz	94

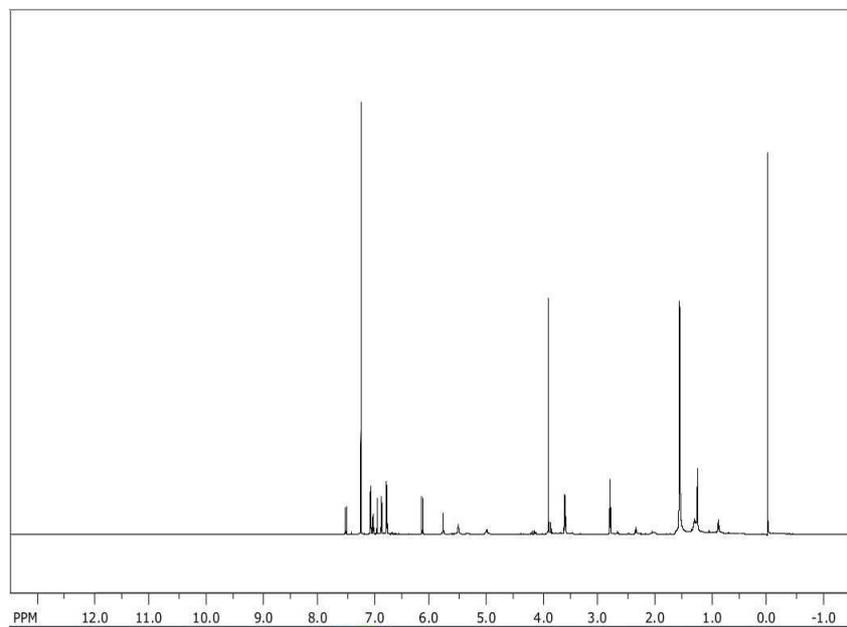


Figura 1A Espectro de RMN ^1H de substância 2 (*trans*-N-feruloiltiramina) em CDCl_3 , 600 MHz

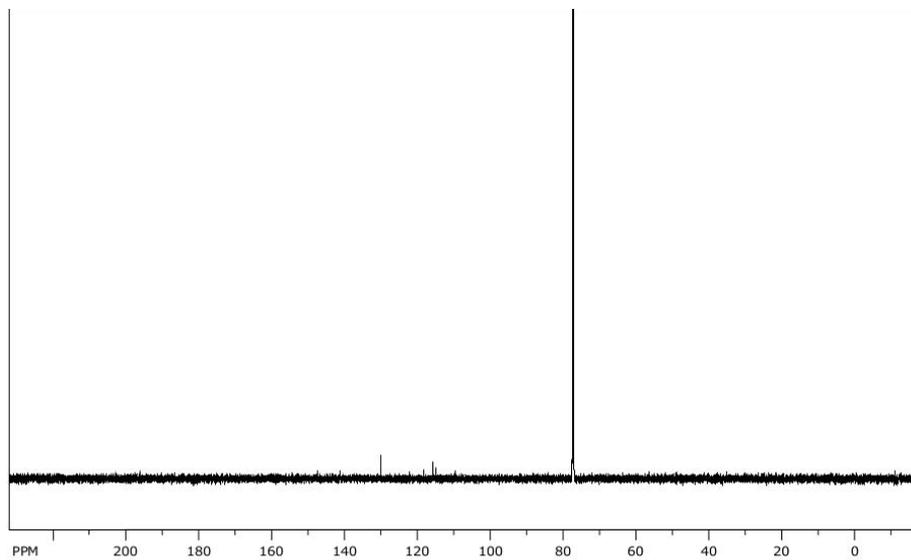


Figura 1B Espectro de RMN ^{13}C de substância 2 (*trans*-N-feruloiltiramina) em CDCl_3 , 151 MHz

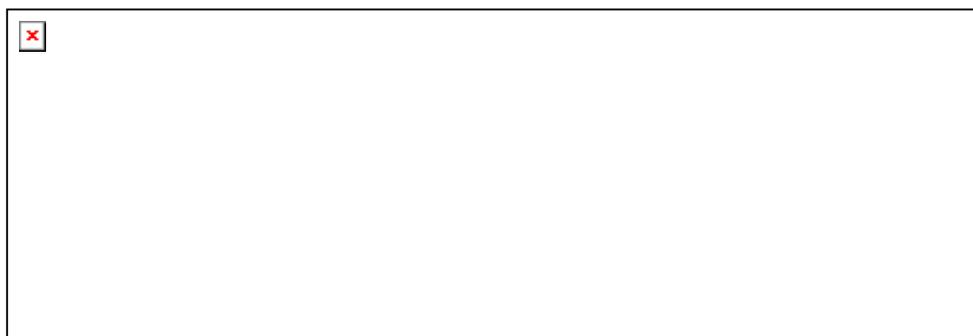


Figura 1C Mapa da correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) de substância 2 (*trans*-N-feruloiltiramina) em CDCl_3 , 600 MHz

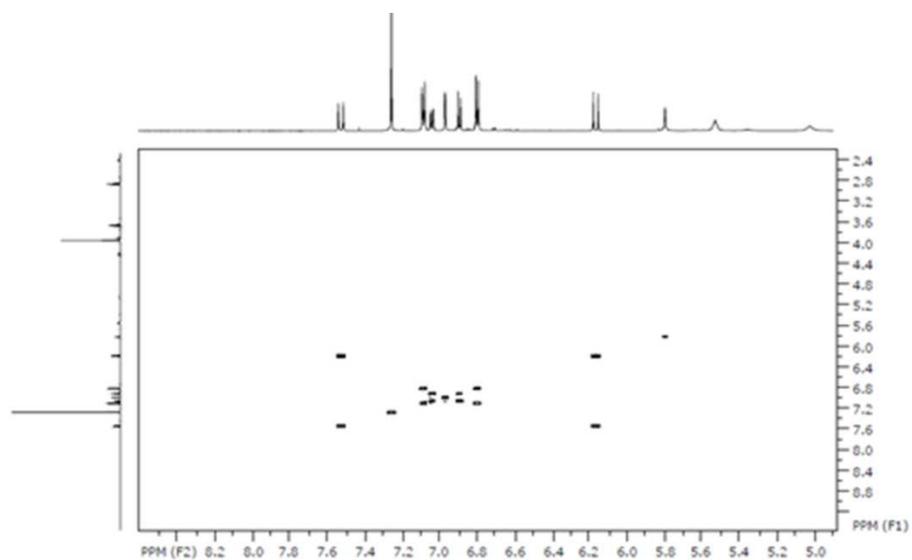


Figura 1C' Ampliação do mapa da correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) de substância 2 (*trans*-N-feruloiltiramina) em CDCl_3 , 600 MHz

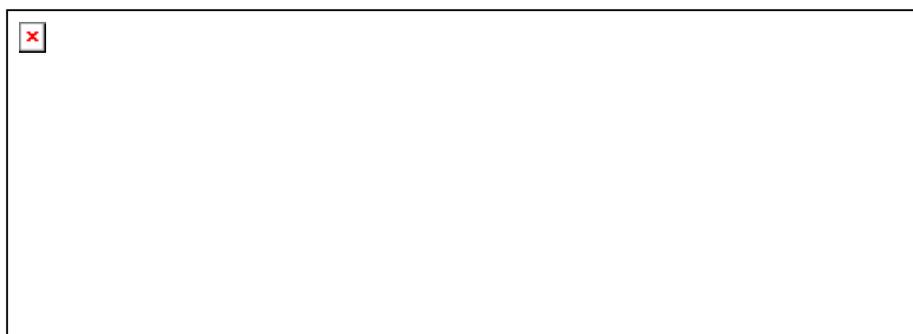


Figura 1D Mapa da correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) de substância 2 (*trans*-N-feruloiltiramina) em CDCl_3 , 600x151 MHz

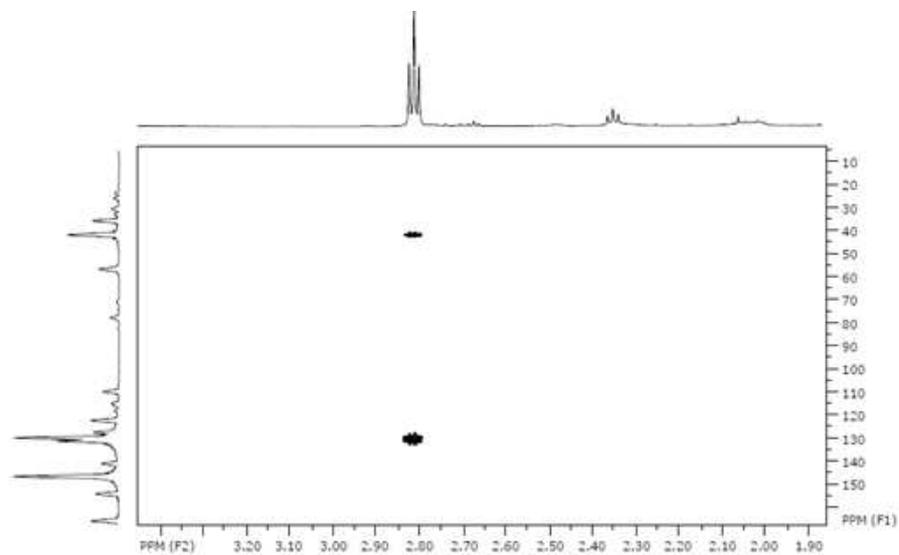


Figura 1D' Ampliação do mapa da correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) de substância 2 (*trans*-N-feruloiltiramina) em CDCl_3 , 600x151 MHz

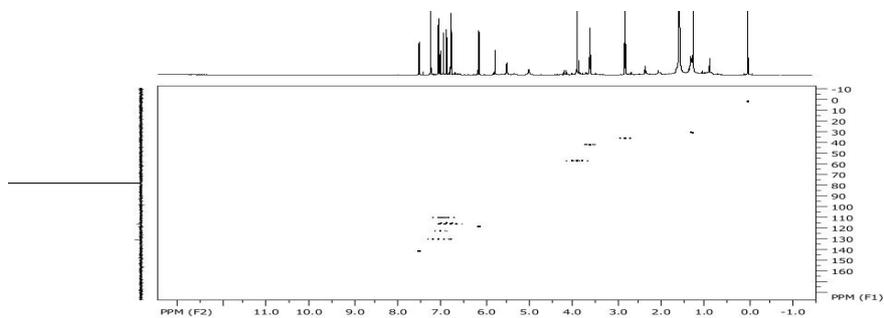


Figura 1E Mapa da correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HSQC) de substância 2 (*trans*-N-feruloiltiramina) em CDCl_3 , 600x151 MHz

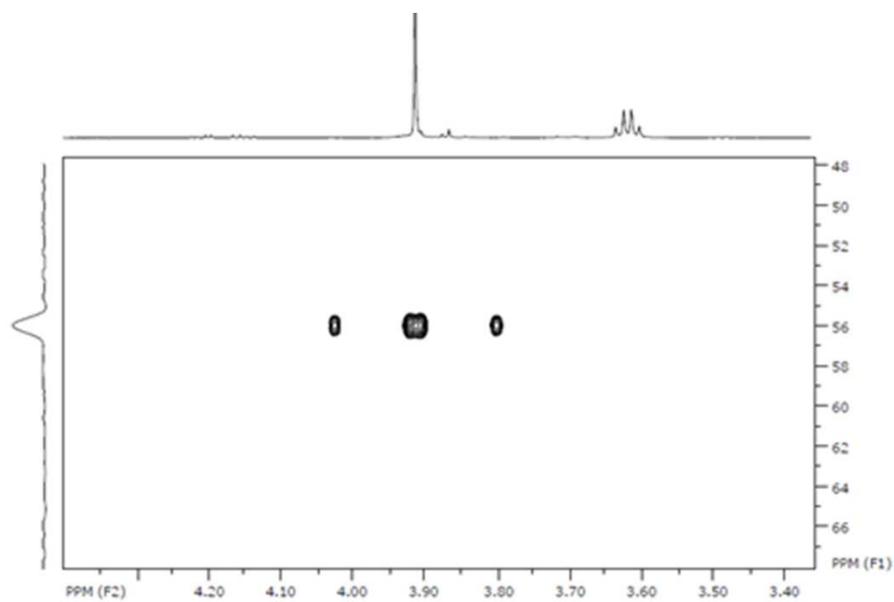


Figura 1E' Ampliação do mapa da correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HSQC) de substância 2 (*trans*-N-feruloiltiramina) em CDCl_3 , 600x151 MHz

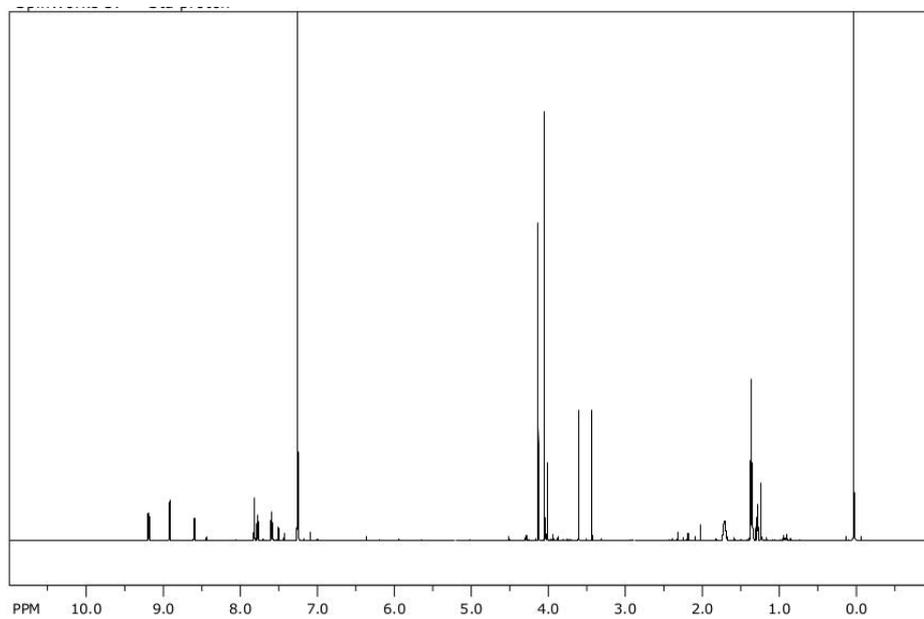


Figura 2A Espectro de RMN ^1H de substância 1 (lisicamina) em CDCl_3 , 600 MHz

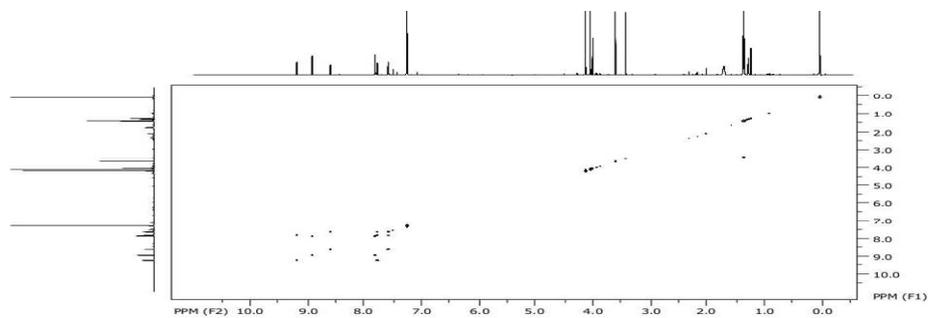


Figura 2B Mapa da correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) de substância 1 (lisicamina) em CDCl_3 , 600 MHz

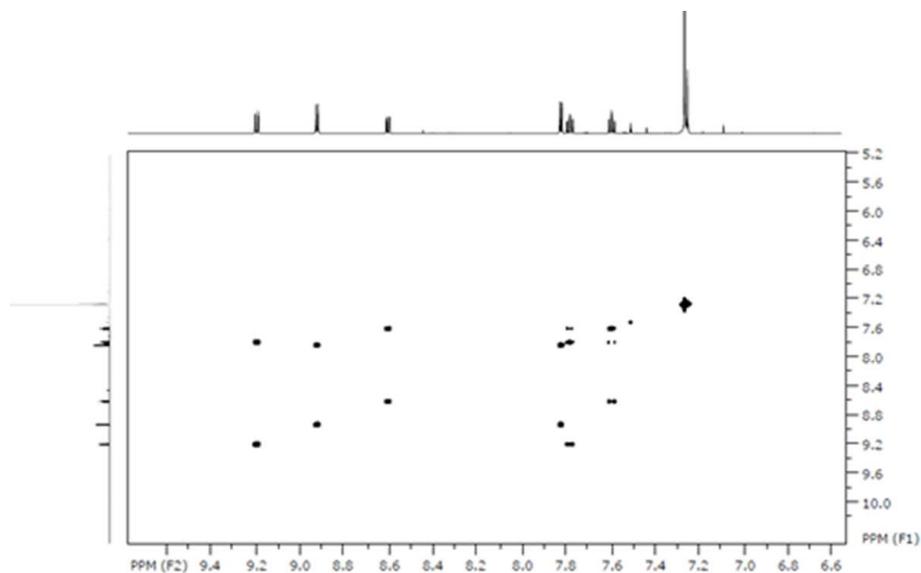


Figura 2B' Ampliação do mapa da correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) de substância 1 (liscamina) em CDCl_3 , 600 MHz



Figura 2C Mapa da correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) de substância 1 (liscamina) em CDCl_3 , 600x151 MHz

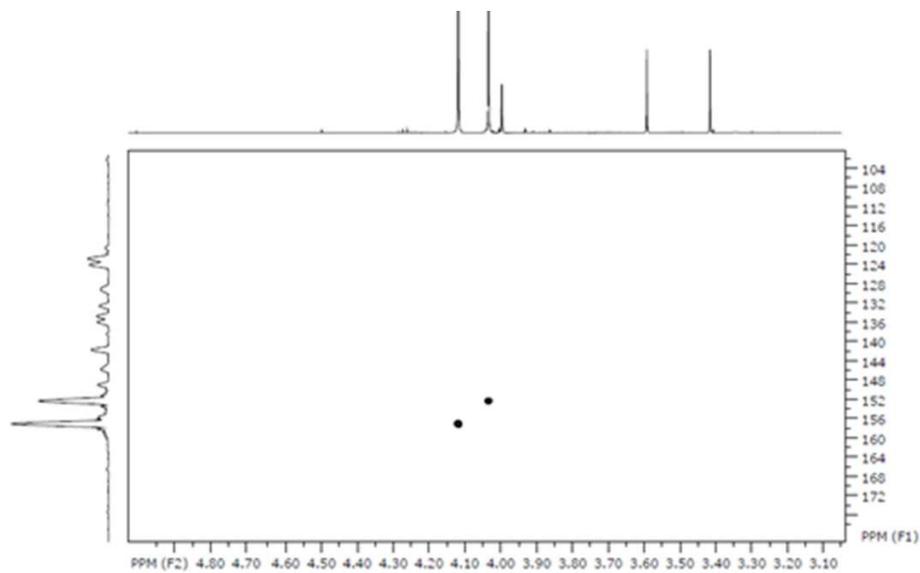


Figura 2C' Ampliação do mapa da correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) de substância 1 (lisicamina) em CDCl_3 , 600x151 MHz



Figura 2D Mapa da correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HSQC) de substância 1 (lisicamina) em CDCl_3 , 600x151 MHz

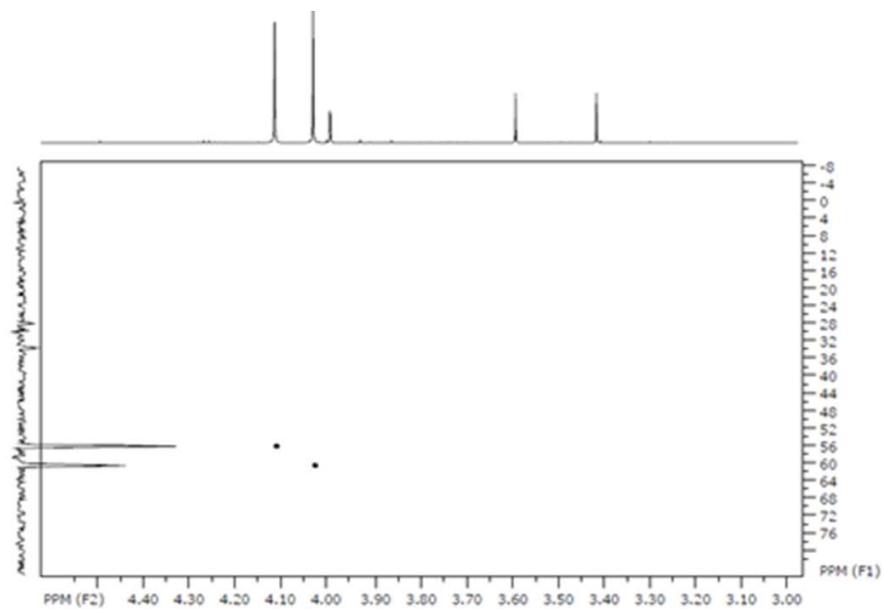


Figura 2D' Ampliação do mapa da correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HSQC) de substância 1 (liscamina) em CDCl_3 , 600x151 MHz

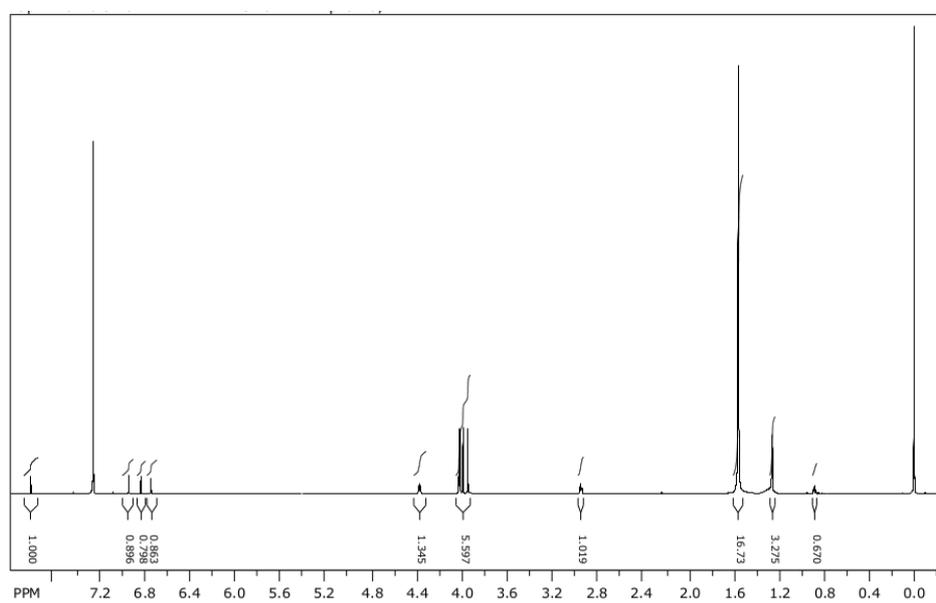


Figura 3A Espectro de RMN ^1H da substância 4 (8-oxopseudopalmitina) em CDCl_3 , 600 MHz

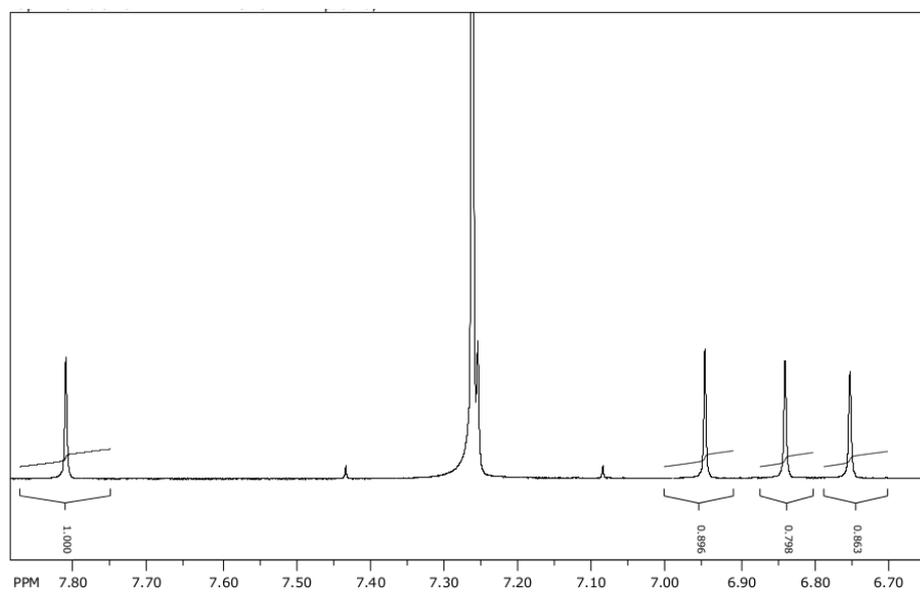


Figura 3' Ampliação do espectro de RMN ^1H da substância 4 (8-oxopseudopalmatina) em CDCl_3 , 600 MHz

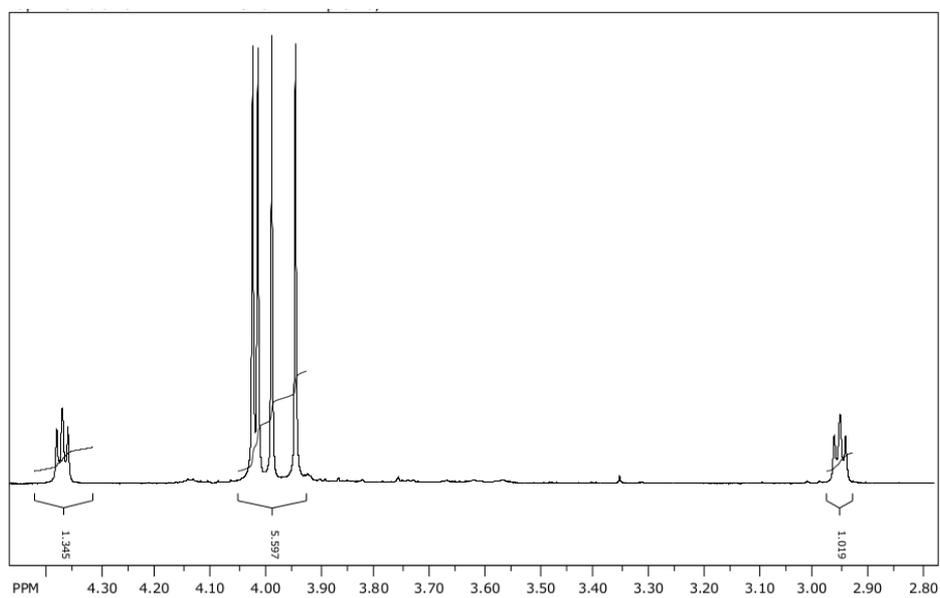


Figura 3A'' Ampliação do espectro de RMN ^1H da substância 4 (8-oxopseudopalmatina) em CDCl_3 , 600 MHz

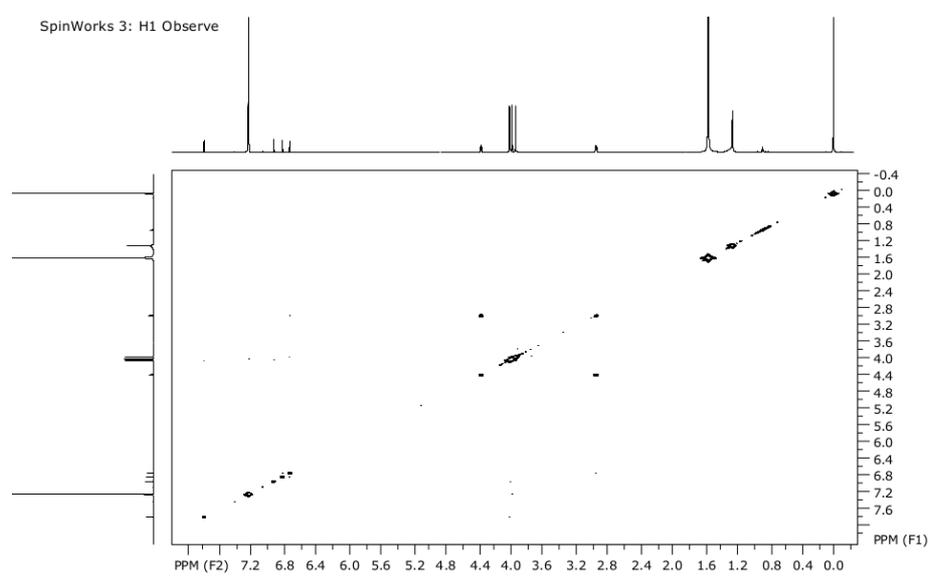


Figura 3B Mapa da correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) da substância 4 (8-oxopseudopalmitina) em CDCl_3 , 600 MHz

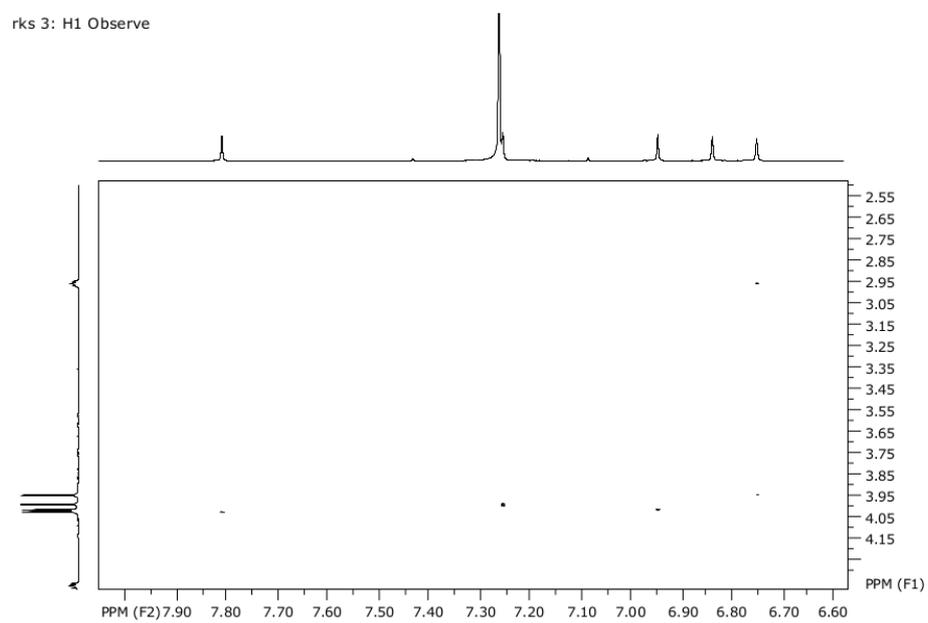


Figura 3B' Ampliação do mapa da correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) da substância 4 (8-oxopseudopalmitina) em CDCl_3 , 600 MHz

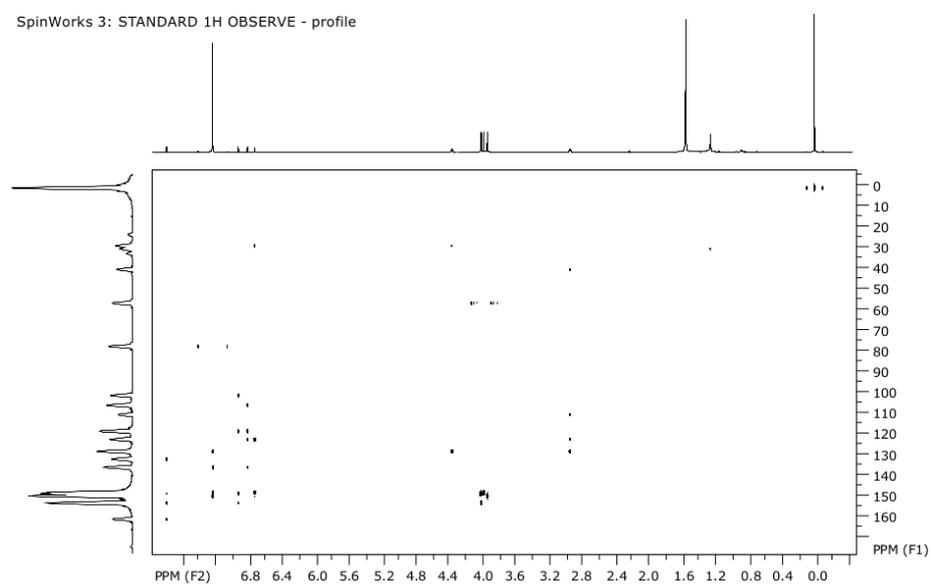


Figura 3C Mapa da correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a longa distância (HMBC) da substância 4 (8-oxopseudopalmitina) em CDCl_3 , 600x151 MHz

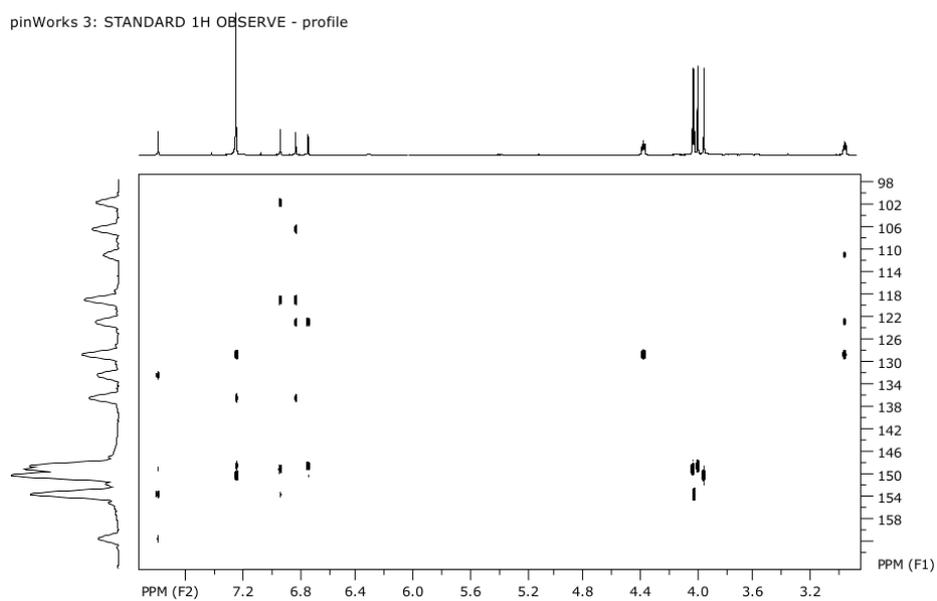


Figura 3C' Ampliação do mapa da correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ a longa distância (HMBC) da substância 4 (8-oxopseudopalmitina) em CDCl_3 , 600x151 MHz

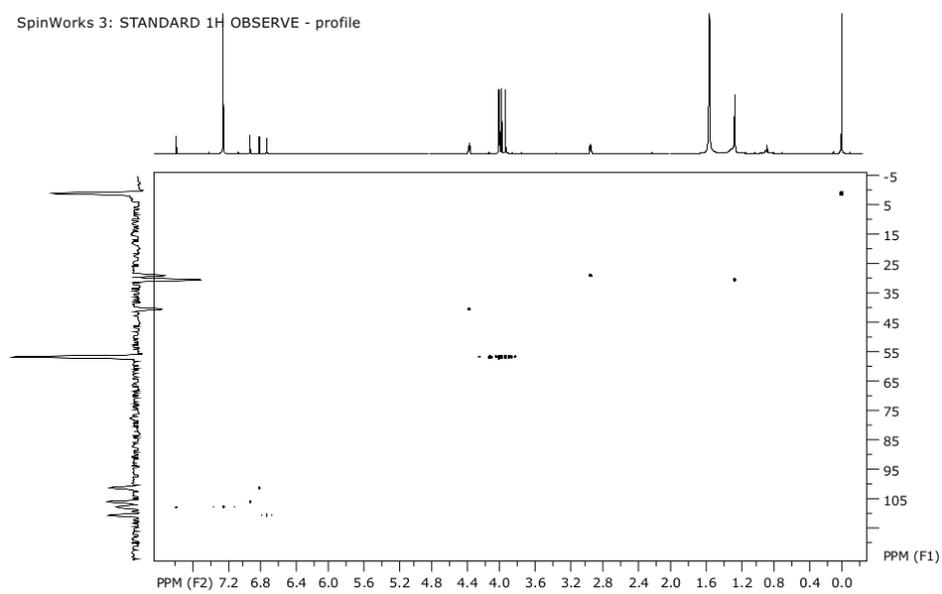


Figura 3D Mapa da correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HSQC) da substância 4 (8-oxopseudopalmitina) em CDCl_3 , 600x151 MHz

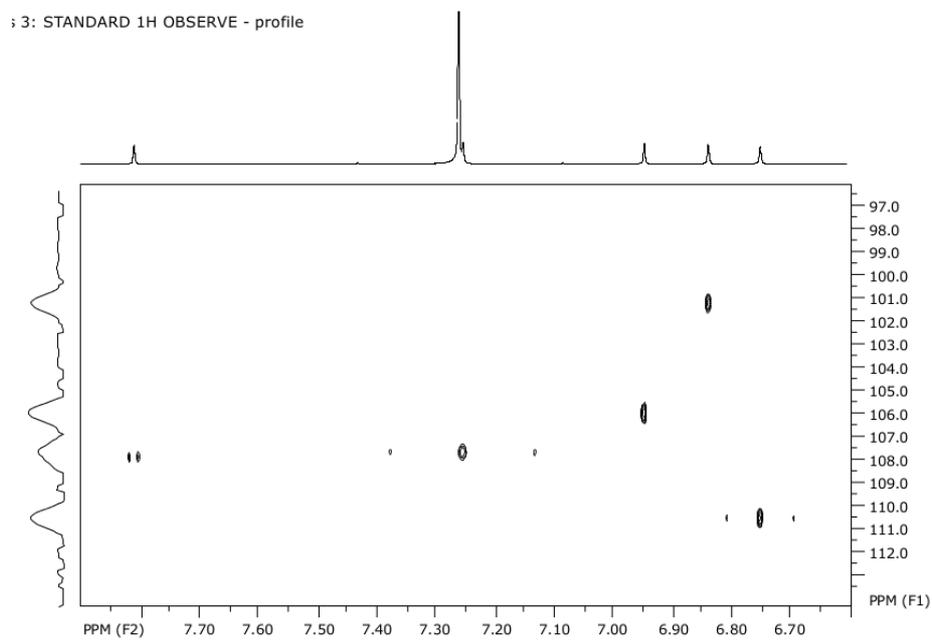


Figura 3D' Ampliação do mapa da correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HSQC) da substância 4 (8-oxopseudopalmitina) em CDCl_3 , 600x151 MHz

ARTIGO 2

**SUBSTÂNCIAS ATIVAS CONTRA *Meloidogyne* spp. PRODUZIDAS POR
Cryptocarya aschersoniana Mez. (Lauraceae Juss.)**

Artigo normalizado de acordo com a Revista Química Nova

**SUBSTÂNCIAS ATIVAS CONTRA *Meloidogyne* spp. PRODUZIDAS POR
Cryptocarya aschersoniana Mez. (Lauraceae Juss.)**

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

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

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

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

SUBSTANCES ACTIVE AGAINST *Meloidogyne* SPP. PRODUCED BY
Cryptocarya aschersoniana Mez. (Lauraceae Juss.)

Abstract

In a previous study, substances with nematicidal properties were detected in the bark of *Cryptocarya aschersoniana*. Continuing such study, the methanol extract from this plant underwent fractionation guided by *in vitro* assays with the plant-parasitic nematode *Meloidogyne exigua*. Two active compounds were isolated and identified by spectroscopic methods as (E)-6-estirilpiran-2-one and (R)-goniothalamina. The latter compound was also active against *Meloidogyne incognita*, reducing the number of eggs of this nematode in tomato plants. *In silico* studies carried out with both substances and the enzyme aspartate ammonia lyase, which was extracted from the genome of *Meloidogyne hapla* and modeled using computational methods, suggested that these substances act against nematodes by binding to a cavity close to the active site of this enzyme.

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

INTRODUÇÃO

Um dos grandes problemas enfrentados pela agricultura mundial diz respeito aos nematoides parasitas de plantas, principalmente aqueles do gênero *Meloidogyne*, que estão distribuídos pelo mundo todo e atacam praticamente todas as plantas cultiváveis, acarretando prejuízos que excedem os 10 bilhões de dólares por ano, em todo o mundo (WILLIAMSON e KUMAR, 2006). No caso específico do Brasil, as espécies *Meloidogyne exigua* Goeldi e *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood são responsáveis por elevadas perdas para culturas de grande importância econômica e social, como café e soja (RANDIG et al., 2004; DIAS et al., 2010).

Para controlar os referidos nematoides, geralmente se faz uso de nematicidas comerciais que, além de aumentarem os custos de produção, podem contaminar o ambiente e o homem com substâncias de elevada toxicidade. Uma das possibilidades para contornar tal problema diz respeito ao emprego de produtos de origem vegetal, já que algumas plantas são capazes de produzir metabólitos com ação nematicida (OLIVEIRA et al., 2007). Dessa forma, as plantas representam um grande potencial para o desenvolvimento de novos produtos de baixa toxicidade e menos onerosos para o controle de fitonematoides. Em decorrência, o Grupo de Pesquisas em Produtos Naturais da UFLA realizou uma série de testes para identificar espécies vegetais produtoras de substâncias ativas contra *M. exigua*. Com isso, foi possível selecionar *Cryptocarya aschersoniana* Mez (Lauraceae Juss.), cujos extratos apresentaram ação nematicida sobre o referido nematoide.

Estudos fitoquímicos têm demonstrado que o gênero *Cryptocarya* é reconhecido por produzir vasta gama de compostos bioativos, dentre os quais se destacam flavonoides, piranos, alcaloides aporfínicos e benzilisoquinolínicos e lignanas. Tais compostos têm atividades citotóxicas, antioxidantes,

antituberculose (CHOU et al., 2010; 2011) e antitumoral (MERAGELMAN et al., 2009; GIOCONDO et al., 2009), dentre outras. Apesar disso, nenhum relato foi encontrado, na literatura, sobre a produção de substâncias com atividade nematicida por parte de espécies do referido gênero. Conseqüentemente, o objetivo inicial do presente trabalho foi isolar e identificar as substâncias ativas contra *Meloidogyne* spp. produzidas por *C. aschersoniana*. Em seguida, com o uso de técnicas computacionais, buscou-se identificar o alvo enzimático de tais substâncias nos nematoides.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiais e equipamentos utilizados

Foram empregados como solventes Hex, AcOEt, MeOH, Tween 80 e CHCl_3 de grau analítico (P.A.), EtOH UV/HPLC espectroscópico (Vetec), CDCl_3 (Aldrich) e água destilada.

Para as análises por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizaram-se placas de alumínio recobertas com sílica gel (Merck) impregnada com indicador de fluorescência UV 254 nm. As substâncias foram reveladas nas placas de CCD com luz UV, vapor de iodo e solução de ácido fosfomolibdico a $0,05 \text{ g mL}^{-1}$ em etanol. Empregou-se sílica gel do tipo *flash* (230-400 mesh, Merck) nos fracionamentos por cromatografia em coluna (CC). As análises por espectroscopia no UV-Vis foram realizadas em espectrofotômetro SP-22, Biospectro. Para a realização dos testes *in vitro*, utilizou-se o nematicida comercial carbofuran (2,2-dimetil-2,3-di-hidro-1-benzofuran-7-ilcarbamato de metila, Aldrich 98 %), como testemunha positiva.

Preparo do extrato vegetal

Cascas do caule de *C. aschersoniana* foram coletadas no *campus* da Universidade Federal de Lavras (UFLA), no dia 1º de junho de 2009, de um único indivíduo com, aproximadamente, 20 m de altura, que não apresentava doenças nem frutos. As cascas coletadas foram secas em estufa com ventilação e renovação de ar, por 48 horas, na temperatura de 40 °C. Em seguida, foram moídas, originando 1 kg de material que, em seguida, foi submetido à extração exaustiva com MeOH por maceração estática. Para a primeira extração foram utilizados 2.700 mL de MeOH, enquanto para as cinco seguintes foram utilizados, aproximadamente, 1.300 mL de MeOH. Os filtrados obtidos foram reunidos e a solução resultante foi concentrada até a secura em evaporador rotatório e, em seguida, liofilizada, dando origem a 63,92 g de extrato bruto seco. Uma alíquota (2 mg) do extrato seco foi dissolvida em 1,0 mL de Tween 80® a 0,01 g mL⁻¹, para ser submetida a testes *in vitro* com juvenis do segundo estágio (J2) de *M. exigua*.

Fracionamento do extrato bruto

Inicialmente, o extrato bruto das cascas de *C. archersoniana* (60 g) foi, subsequentemente, submetido a extrações com Hex (4 x 300 mL), AcOEt (4 x 300 mL) e MeOH (4 x 300 mL). As três frações líquidas obtidas foram concentradas em evaporador rotatório e liofilizadas, dando origem a resíduos dos quais foram removidas alíquotas de 2 mg para serem dissolvidas em 1,0 mL de Tween 80® a 0,01 g mL⁻¹ e serem submetidas a testes *in vitro* com J2 de *M. exigua*.

Uma parte (9,80 g) da fração solúvel em AcOEt foi misturada com 20 g de sílica gel e adicionada ao topo de uma coluna com aproximadamente 7 x 15

cm de sílica gel, por meio da qual se eluíram sucessivamente 500 mL de cada uma das seguintes combinações de eluentes: Hex/AcOEt (95:5), Hex/AcOEt (65:35), AcOEt (puro), AcOEt/MeOH (90:10), MeOH (puro) e água. Coletaram-se frações de 500 mL (F1-F4) e de 250 mL (F5-F8), que foram combinadas de acordo com os perfis observados por análise por CCD, o que resultou em oito novas frações após remoção dos solventes em evaporador rotatório e liofilização. Alíquotas de 1 mg de todas as oito frações (F1-F8) foram dissolvidas em 1,0 mL de Tween 80® a $0,01 \text{ g mL}^{-1}$, para serem submetidas a teste *in vitro* com J2 de *M. exigua*.

Parte (1 g) da terceira fração (F3) foi fracionada em coluna com 5x15 cm de sílica, empregando-se os seguintes eluentes: Hex/AcOEt (80:20, 1000 mL), Hex/AcOEt (70:30, 1000 mL), AcOEt (255 mL), MeOH (255 mL) e água. As frações obtidas foram combinadas de acordo com os seus perfis cromatográficos e concentradas conforme descrito anteriormente. Alíquotas de cada uma das 17 frações resultantes (F3-1 a F3-17) foram dissolvidas em Tween 80® a $0,01 \text{ g mL}^{-1}$, até a concentração de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$, para serem submetidas a teste *in vitro* com J2 de *M. exigua*. Especificamente no caso das frações F3-5 e F3-7, os testes foram repetidos com concentrações de 125, 250 e $500 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Teste *in vitro* com J2 de *Meloidogyne exigua*

Raízes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.), infestadas com *M. exigua*, foram coletadas no campo, lavadas com água, cortadas e trituradas em liquidificador, por 40 segundos, com solução de hipoclorito de sódio a 0,5 % (m/v), seguindo a técnica de Hussey e Barkey (1973), modificada por Boneti e Ferraz (1981). Os ovos retidos em peneira de 0,025 mm de abertura (500 mesh ASTM) foram recolhidos e mantidos em câmara de eclosão formada por uma tela fina de 0,025 mm de abertura e funil de vidro. Os J2 eclodidos até 24 horas após a montagem

da câmara foram descartados. Recolheram-se, para emprego nos testes, somente aqueles que eclodiram 48 horas após a montagem da câmara.

Para o teste foram empregadas placas de polipropileno contendo 96 cavidades de 350 μL . Para tanto, em cada cavidade se depositaram 20 μL de uma suspensão aquosa contendo de 20 a 30 J2 e, em seguida, adicionaram-se 100 μL de cada uma das amostras a serem testadas. Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado, empregando-se quatro repetições por amostra. Como testemunhas foram utilizados Tween 80® a 0,01 g mL^{-1} e água. As placas foram mantidas em BOD, a 25,5 °C, por 48 horas. Em seguida, contaram-se os J2 móveis e imóveis, e se adicionou uma gota de solução recém-preparada de NaOH 1,0 mol L^{-1} a cada cavidade. Os J2 retos e imóveis foram considerados mortos, enquanto os retorcidos e móveis foram considerados vivos. Os valores obtidos foram transformados em percentagem de J2 mortos e submetidos à análise de variância (ANAVA), empregando-se o programa computacional SISVAR (Ferreira, 2011). As médias foram comparadas segundo o teste de Scott e Knott (1974), a 5% de probabilidade (Tabela 1).

Identificação das substâncias isoladas (F3-5 e F3-7)

Alíquotas das frações F3-5 (1,2 mg) e F3-7 (1,7 mg), que se mostraram ativas contra J2 de *M. exigua* e estavam homogêneas segundo análises por CCD, foram dissolvidas em EtOH UV/HPLC, até as concentrações de 5,0 e 7,08 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, para serem analisadas por espectroscopia no UV-Vis (200 a 800 nm), empregando-se cubetas de quartzo, com 1 cm de caminho ótico. Posteriormente, uma alíquota de cada uma das duas frações também foi depositada em janela de ATR, para serem analisadas por espectroscopia no IV

(4000 a 400 cm^{-1}), em espectrofotômetro Digilab Excalibur, modelo Series FTS 3000. Foram realizadas 16 varreduras, com resolução de 4 cm^{-1} .

Aproximadamente 30 mg de cada amostra foram dissolvidos em 0,7 mL de CDCl_3 , para serem analisadas por espectroscopia de RMN ^1H e ^{13}C , em espectrômetro AVII 400, Bruker, de 400 MHz. Realizaram-se experimentos uni e bidimensionais, empregando-se o pico do solvente ou TMS como referência.

Para medir o desvio do plano da luz polarizada (α), na raia D do sódio, a $25\text{ }^\circ\text{C}$, foi utilizado um polarímetro Perkin Elmer 341, com caminho ótico de 1 dm. Para tanto, a substância foi solubilizada em CHCl_3 até a concentração de $1,7\text{ g }100\text{ mL}^{-1}$.

Teste *in vitro* das substâncias F3-5 e F3-7 contra J2 de *M. incognita*

Raízes de tomates cultivados em casa de vegetação infestada com *M. incognita* raça 3 foram submetidas à extração e eclosão de ovos conforme o procedimento adotado para *M. exigua*, mencionado anteriormente. Para a realização do teste *in vitro* com J2 de *M. incognita*, foram solubilizados 0,7 e 0,6 mg das frações F3-5 e F3-7, em 1,12 e 0,96 mL de Tween 80® a $0,01\text{ g mL}^{-1}$, respectivamente, o que resultou em soluções com concentrações iguais a $625\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$, para ambas as amostras. Como testemunhas foram utilizados Tween 80® a $0,01\text{ g mL}^{-1}$, água e carbofuran nas concentrações de 200 e $250\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$. Empregaram-se cinco repetições para cada um dos seis tratamentos. A montagem e a avaliação do teste, bem como as análises estatísticas, também foram conduzidas segundo procedimentos adotados para *M. exigua*.

Efeito das frações F3-5 e F3-7 sobre a população de *M. incognita* em tomateiros

Sementes de tomateiro (*Solanum lycopersicum* cv. Santa Clara) foram semeadas em substrato orgânico Tropstrato[®] (substrato para plantas à base de casca de pinus, turfa e vermiculita expandida, enriquecido com macro e micronutrientes, desenvolvido pela pesquisa e aprovado para a produção de hortaliças; Vida Verde Indústria e Comércio de Insumos Orgânicos Ltda., Mogi Mirim, SP), contido em células de bandejas de isopor de 72 cavidades côncavas, com 5 x 5 cm de abertura e 11 cm de profundidade. O desbaste foi feito dez dias após a germinação, de forma que só houvesse uma planta por célula. Passados 30 dias após o semeio, quando as plantas se apresentavam com, aproximadamente, 20 cm de altura e sem qualquer patologia aparente, deu-se início ao experimento. Para tanto, inicialmente, suspendeu-se a substância F3-5 e dissolveu-se a substância F3-7 em solução aquosa de Tween 80 a 0,01 g/mL até a concentração de 998,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para ambas as substâncias. Em seguida, adicionaram-se, ao substrato de cada planta, 5,6 mL de suspensão aquosa contendo, aproximadamente, 500 J2 de *M. incognita* (obtidos conforme descrito anteriormente), por meio de quatro furos de 0,4 cm de largura por 1,5 cm de profundidade, ao redor do caule da planta. Logo em seguida, adicionaram-se, através dos mesmos furos, 2,0 mL das soluções, sendo 0,5 mL por cada furo. As testemunhas empregadas foram água, Tween 80 a 0,01 g/mL e solução aquosa de carbofuran a 416 $\mu\text{g/mL}$ (Furadan 350 SC; FMC, Campinas, SP). As plantas foram mantidas, por 48 horas, em sala sem incidência direta de luz solar e, em seguida, foram transferidas para casa de vegetação. As mudas foram regadas diariamente, de acordo com a necessidade das mesmas. Sempre que necessário, as plantas foram adubadas com o fertilizante Biofert Universal (Terral, Inhaúma, MG), contendo micro e macronutrientes, e tratadas com produtos Ampligo

(Singenta, São Paulo, SP) ou/e Actara Plus (Singenta, São Paulo, SP), para o controle de pragas como a traça-do-tomateiro e a mosca branca. Para o controle de doenças fúngicas como o oídeo, empregou-se o fungicida Folicur (Bayer, Socorro – SP). No trigésimo segundo dia após a inoculação do nematoide, removeram-se as partes aéreas das plantas e as raízes foram lavadas com água, tomando-se o cuidado de evitar a perda de massas de ovos. Após remoção do excedente de água, pesaram-se as massas frescas das raízes e se contaram as galhas. Em seguida, as raízes foram submetidas a processo de extração de ovos, conforme já descrito, para que os ovos pudessem ser contados nas suspensões finais com o uso de um microscópio de lentes invertidas. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições por tratamento. Os valores obtidos foram submetidos à análise estatística, conforme já citado.

Identificação *in silico* de alvos enzimáticos da substância F3-7

Com o software ChemSketch 12.01 (Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, Canadá) desenhou-se a estrutura da substância F3-7, a mais ativa contra os nematoides. A sua estrutura tridimensional foi salva no formato mol que, em seguida, foi convertido para o formato sdf, com a utilização do programa OpenBabel 2.3.0 (O'BOYLE et al., 2011). Em seguida, a estrutura foi submetida a uma busca conformacional usando o software Open3Dalign 2.23 (TOSCO et al., 2011). Para tanto, realizaram-se 1.000 simulações por dinâmica molecular, usando o campo de força MMFF94, a 1.000 °C, com 1.000 etapas de 1 fs em cada simulação e considerando o solvente (água) implicitamente pelo emprego do modelo GBSA. Para tanto, a constante dielétrica da água ($\epsilon = 80,4$) foi utilizada. A conformação mais estável em cada simulação foi otimizada usando o campo de força MMFF94s e classificada de acordo com energia final.

A conformação mais estável da F3-7 foi submetida à busca por ligantes de enzimas similares por meio do programa ReverseScreen3D (KINNINGS & JACKSON, 2011).

Dentre os resultados obtidos, selecionou-se a enzima aspartato amônia liase, cujas sequências de aminoácidos de estruturas conhecidas foram, em seguida, obtidas do RCSB Protein Data Bank (<http://www.pdb.org>) e EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/>). Tais sequências foram alinhadas com o programa SeaView 4.4.1 (GOUY et al., 2010) e, após remoção daquelas que eram similares entre si, as resultantes foram utilizadas na busca por sequências de aminoácidos similares nos bancos de dados do INRA-*Meloidogyne incognita* (http://www6.inra.fr/meloidogyne_incognita) e do Nematode.net v 3.0 (http://nematode.net/NN3_frontpage.cgi). A maior similaridade foi observada para uma sequência de aminoácidos oriunda do genoma de *Meloidogyne hapla* Chitwood, que foi selecionada para a etapa posterior do trabalho.

Modelagem molecular da aspartato amônia liase de *M. hapla*

A sequência de aminoácidos do genoma de *M. hapla*, selecionada conforme descrito anteriormente, foi automaticamente modelada por homologia com o sistema Swiss-Model (ARNOLD et al., 2006). Também se fez modelagem por *threading* com o programa I-TASSER (ZHANG, 2008), mas, neste caso, foram utilizadas as estruturas tridimensionais das enzimas aspartato amônia liase 3E04 (KAVANAGH, et al.) e 1YFM (Weaver, et al., 1998), para refinar a modelagem. Todos os modelos gerados pelo sistema I-TASSER foram alinhados com as quatro cadeias das enzimas homotetraméricas 3E04 e 1YFM, utilizando-se o programa Swiss PDB Viewer 4.0.4 (GUEX & PEITSCH, 1997), o que permitiu gerar nove homotetrâmeros diferentes para a aspartato amônia liase de *M. hapla*.

Os nove homotetrâmeros obtidos tiveram as disposições espaciais de suas cadeias laterais refinadas pelo emprego do programa computacional SCWRL4 (KRIVOV et al., 2009) e, em seguida, foram adicionados os átomos de hidrogênio com o plugin autoPSF do programa VMD v 1.9.1 (HUMPHREY et al., 1996), que empregou o arquivo de topologia (top_all27_prot_lipid.rtf, VANOMMESLAEGHE et al., 2010) com o campo de força do Charmm. Em seguida, os homotetrâmeros tiveram suas estruturas otimizadas pelo emprego do programa NAMD 2.9, utilizando-se o arquivo de parâmetros para o campo de força do Charmm (par_all27_prot_lipid.prm, VANOMMESLAEGHE et al., 2010). O solvente (água) foi implicitamente considerado pelo emprego do modelo Generalized Born Implicit Solvent (GBIS). As estruturas resultantes foram submetidas a mais duas rodadas de otimização das cadeias com o programa SCWRL4 e otimização de toda a estrutura com o programa NAMD 2.9. As estruturas finais obtidas foram avaliadas quanto às características estereoquímicas e energéticas, bem como quanto ao ambiente de cada resíduo de aminoácido. Para tanto, utilizaram-se os programas FoldX 2.5.2 (SCHYMKOWITZ et al., 2005) e Goap (ZHOU & SKOLNICK, 2011). A melhor estrutura (ita2-1YFM), segundo ambos os programas, foi selecionada para as etapas seguintes do trabalho.

Dinâmica molecular com a aspartato amônia liase de *M. hapla*

A estrutura tridimensional da aspartato amônia liase de *M. hapla* (ita2-1YFM), modelada e selecionada, conforme descrito acima, foi colocada em caixa de água e teve a carga total neutralizada com a adição de oito cátions Na⁺. Para tanto, empregou-se o programa VMD v 1.9.1, com o qual se fez com que a distância mínima entre os limites da caixa e a enzima fosse de 15 Å. O sistema resultante foi otimizado (5.000 interações) com o programa computacional

NAMD 2.9 (campo de força do Charmm) e, em seguida, submetido à simulação por dinâmica molecular por 4 ns com o mesmo programa, sob condições periódicas de fronteira. Para tanto, foi considerado o *ensemble* isobárico-isotérmico (NPT), temperatura de 300 K controlada com a dinâmica de Langevin e etapas de 2 fs. O algoritmo Particle Mesh Ewald (PME) foi empregado para calcular as interações eletrostáticas, enquanto a pressão foi controlada com o pistão de Nosé-Hoover Langevin.

Docking para identificar os sítios de ligação da enzima

As estruturas da enzima aspartato amônia liase de *M. hapla* (ita2-1YFM), presentes nos últimos 1.000 quadros (1 ns) do processo de simulação por dinâmica molecular (item anterior), foram alinhadas com o programa VMD 1.9.1 e convertidas ao formato pdbqt pelo *script* em Python `prepare_receptor4.py`, do programa computacional AutodockTools 1.5.6rc2 (SASSER, 1991). Utilizando-se o mesmo programa computacional, prepararam-se os arquivos pdbqt para o fumarato e para F3-7. Em seguida, cada uma destas duas substâncias foi submetida a ancoramentos às cegas, em todas as estruturas da enzima no formato pdbqt, utilizando o programa computacional Autodock Vina 1.1.2 (Trott and Olson, 2010). Para ambas as substâncias, cada ancoramento foi feito em região correspondente a uma caixa com as seguintes dimensões: 28,539 (x), 24,329 (y) e 26,329 (z) Å. As mudanças de regiões foram sempre feitas por meio das movimentações de valores correspondentes a metade das dimensões da caixa, de forma a cobrir todas as possibilidades na enzima, que tinha dimensão aproximada de 142 (x), 97 (y) e 158 (z) Å. Logo, para cada quadro, foram feitos 693 ancoramentos da substância F3-7 e mais 693 do fumarato. À exceção do parâmetro *exhaustiveness* do programa Autodock Vina, que foi ajustado para 4, todos os outros foram utilizados com os valores

normais do programa. Dentre todos os ancoramentos, para cada uma das duas substâncias (fumarato e F3-7) foram selecionados os 1.000 ancoramentos com as maiores afinidades da substância pela enzima, o que permitiu observar que estes ancoramentos estavam localizados em 10 regiões da enzima para a F3-7 e 16 para o fumarato. Fizeram-se, então, novos ancoramentos das substâncias em tais regiões, utilizando todas as 1.000 estruturas da enzima. Para tanto, empregou-se o programa Autodock Vina com o parâmetro *exhaustiveness* igual a 64. Para cada uma das duas substâncias, selecionaram-se as quatro regiões na enzima, para as quais se observavam as maiores afinidades.

Docking para comparar as afinidades de F3-5 e F3-7 com as de ligantes de aspartato amônia liases

As estruturas da substância F3-5, bem como do citrato, (S)-malato, (R)-3-nitro-2-hidroxiopropanoato, (S)-3-nitro-2-hidroxiopropanoato, oxalatoacetato, (S,S)-2,3-dicarboxilatoaziridina, *meso*-tartarato e 1,2,4,5-benzenotetracarboxilato, foram preparadas e submetidas a buscas conformacionais, seguidas de conversão das conformações mais estáveis ao formato pdbqt, conforme já mencionado para a F3-7 e fumarato. Em seguida, todas estas substâncias, inclusive F3-7 e fumarato, foram ancoradas com o programa Autodock Vina 1.1.2, nas regiões da enzima, anteriormente, selecionadas. Para tal ancoramento, que foi realizado com todas as estruturas da enzima presentes nos últimos 1.00 quadros da simulação por dinâmica molecular, utilizou-se o valor de 32 para o parâmetro *exhaustiveness* do programa Autodock Vina. Em seguida, todos os ancoramentos feitos pelo programa foram submetidos a ranqueamentos com os programas Plants 1.2 (Korb et al., 2009), AutoDock 4.2.3 (Morris et al., 2009) e Paradocks 1.0.1

(Muegge, 2006). Empregaram-se sempre os valores normais para os diversos parâmetros de tais programas.

Resultados e Discussão

Preparo do extrato vegetal

Ao se submeter 1.000 g de cascas secas e moídas de *C. aschersoniana* à extração com metanol, obtiveram-se 63,92 g de extrato bruto, com rendimento de, aproximadamente, 6,39%. De acordo com os dados da literatura, o referido valor está condizente com aqueles obtidos para processos similares, cujos rendimentos estão em torno de 10% a 15% (Castilho & Kaplan, 2008). Pode-se observar, na Tabela 1, que o extrato bruto das cascas de *C. aschersoniana*, na concentração de 2.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, causou a mortalidade de todos os J2 de *M. exigua*. Tal resultado confirma a ação nematicida do referido extrato e, conseqüentemente, o grande potencial da espécie botânica em estudo para o desenvolvimento de produtos ativos para o controle de nematoides fitoparasitas.

Tabela 1 Mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne exigua* expostos ao extrato metanólico das cascas de *Cryptocarya aschersoniana* e às suas frações solúveis em Hex, AcOEt e MeOH

Tratamentos	J2 mortos (%)*
Extrato bruto	100,0 a
Fração solúvel em AcOEt	100,0 a
Fração solúvel em Hex	100,0 a
Fração solúvel em MeOH	0,0 b
Tween 80 a 0,01 g mL ⁻¹	0,7 b
Água	0,0 b

*Médias seguidas com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Scott e Knott ($P \leq 0,05$)

Fracionamento do extrato bruto

O fracionamento do extrato bruto de *C. aschersoniana* por extração com solventes de diferentes polaridades resultou em três frações (Figura 1), dentre as quais aquela solúvel em MeOH era a de maior massa, correspondendo a cerca de 57,7% do extrato bruto. Entretanto, de acordo com o teste *in vitro* com J2 de *M. exigua*, apenas as frações solúveis em Hex e AcOEt apresentavam ação nematicida. Os valores de J2 mortos foram iguais a 100%, para ambas as frações em concentração de 2.000 µg mL⁻¹. Optou-se por dar continuidade ao processo de purificação da substância ativa com a fração solúvel em AcOEt, pelo fato de a mesma ter apresentado maior massa (20,66 g; 32,3%).

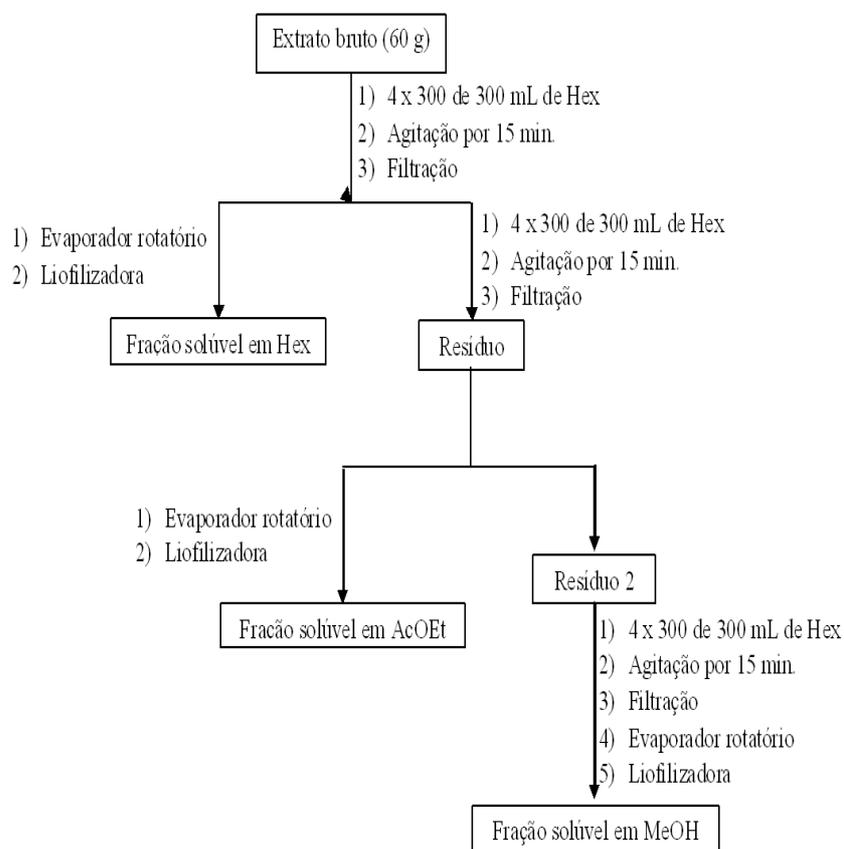


Figura 1 Fluxograma do fracionamento por extração com solventes do extrato bruto das cascas de *Cryptocarya aschersoniana*

O fracionamento da fração solúvel em AcOEt gerou oito frações, que foram nomeadas de F1 a F8. Embora tanto a fração F3 quanto a F4 tenham causado elevada mortalidade de J2 de *M. exigua* (Tabela 2), optou-se por dar continuidade ao trabalho apenas com F3, pois a mesma apresentava um perfil cromatográfico pouco complexo e massa suficiente (6,88 g) para as próximas etapas do trabalho. Dela foram obtidas 17 novas frações (F3-1 a F3-17), dentre as quais as denominadas F3-5 e F3-7 se apresentavam cromatograficamente

puras, com massas de 298 e 163 mg, que correspondiam a rendimentos de 29,8% e 16,3%, respectivamente, em relação à massa empregada de F3.

Tabela 2 Percentual de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne exigua* mortos após contato com as frações provenientes do fracionamento fração solúvel em AcOEt

Tratamentos	J2 mortos (%)*
F1	6,7 b
F2	5,7 b
F3	100,0 a
F4	97,0 a
F5	6,0 b
F6	6,0 b
F7	1,0 b
F8	10,5 b
Tween 80 a 1%, (v/v)	3,2 b
Água	3,2 b

*Médias seguidas com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Scott e Knott ($P \leq 0,05$)

O teste *in vitro* com J2 de *M. exigua*, empregando F3-5 e F3-7 em diferentes concentrações (125, 250 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$; Tabela 3), permitiu observar que ambas interferem fortemente na motilidade do nematoide. Ademais, os resultados confirmaram que as substâncias isoladas de *C. aschersoniana* são as responsáveis pela atividade nematicida da referida planta, sendo F3-7 mais ativa que F3-5. No caso específico da F3-7, vale mencionar que a mesma se mostrou mais ativa que o carbofuran, que é um nematicida comercial, pois, nas mesmas condições e na concentração de 260 $\mu\text{g mL}^{-1}$, tal nematicida causava mortalidade

de 50% dos J2 de *M. exigua*, enquanto a F3-7, na concentração de 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, causava mortalidade 69,7% dos J2.

Tabela 3 Mortalidade e motilidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne exigua*, após contato com as frações F3-7 e F3-5, oriundas do fracionamento da amostra F3

Tratamentos	J2 imóveis (%)*	J2 mortos (%)*
F3-5 (125 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	41,8 d	11,5 e
F3-5 (250 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	82,5 c	31,3 d
F3-5 (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) [#]	91,0 b	36,6 c
F3-7 (125 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	8,5 e	8,0 e
F3-7 (250 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	97,5 a	69,5 b
F3-7 (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	97,9 a	94,3 a
Água	5,6 e	0,0 f
Tween 80 a 1% (v/v)	3,9 e	0,0 f

*Médias seguidas com a mesma letra, em cada coluna, não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Scott e Knott ($P \leq 0,05$)

[#] Observou-se dificuldade para solubilizar a substância, o que pode ter interferido nos resultados obtidos

Identificação das substâncias isoladas

A substância F3-5 se apresentou como um composto amorfo amarelo. A análise por espectroscopia no UV-Vis demonstrou a presença de cromóforos absorvendo acima de 200 nm, em regiões que indicavam a presença de anel aromático no sistema. Isto foi corroborado pelo espectro de infravermelho obtido, que também indicava a presença de uma carboxila, provavelmente na forma de um éster. Quanto às análises por RMN, observaram-se 13 sinais de carbono no espectro de RMN ^{13}C , sendo todos acima de 100 ppm (105,03 -

161,81 ppm), o que sugeria a presença de vários carbonos sp^2 . Havia, nitidamente, um sinal em 161,81 ppm, o que era indicativo de carbonila ligada a átomo de oxigênio (função éster ou ácido carboxílico) ou nitrogênio (função amida). Os sinais no espectro de RMN 1H em 7,35 e 7,50 ppm sugeriam presença de prótons pertencentes a sistemas aromáticos, enquanto a presença dos picos entre 6,63 e 7,50 ppm, com constante de acoplamento 16,0 Hz, indicava a presença de 1H olefínicos vicinais, em configuração *trans*. Somando-se os dados dos espectros unidimensionais aos obtidos com os mapas de contorno de HSQC e HMBC, que correspondem à correlação bidimensional ($^{13}C \times ^1H$) a curta e a longa distância, respectivamente, e de COSY (correlação bidimensional $^1H \times ^1H$), obteve-se como resultado a conclusão de que F3-5 se tratava da pirona natural (*E*)-6-estirilpiran-2-ona (Figura 2, Tabela 4), o que está em pleno acordo com os dados espectroscópicos descritos na literatura para esta substância (Thibonnet et al., 2002)

O anel pirânico pertencente a (*E*)-6-estiril-piran-2-ona (F3-5) consiste em intermediário-chave na biossíntese de vários metabólitos, sendo encontrado em animais, insetos, bactérias e plantas (McGlacken; Fairlamb, 2005). Várias atividades biológicas estão associadas a compostos que têm o referido anel em sua estrutura, dentre as quais se podem citar a antibiótica, a antifúngica, a neurotóxica, a citotóxica, a anti-HIV e a antioxidante (Mora et al., 2005; Rosa, et al., 2007; Li et al., 2009; GUO, et al., 2009; Valente, 2010). Segundo estudo realizado por Chaves (2012), a substância (*E*)-6-estiril-piran-2-ona (F3-5), produzida pelos frutos de *Aniba panurensis* (Meisn.) Mez (Fabaceae), apresenta atividade anseolítica e anticonvulsão. Entretanto, nenhum relato foi observado, na literatura, sobre a atividade nematocida desta substância.

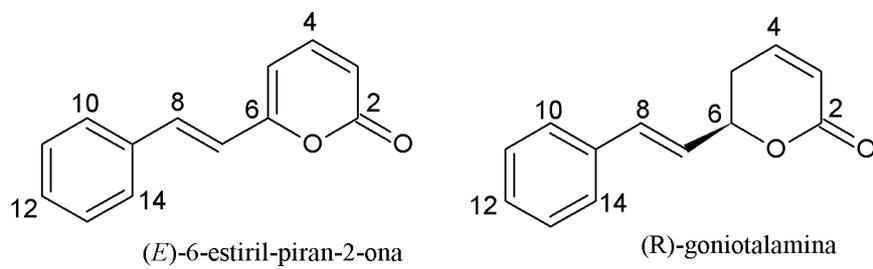


Figura 2 Estruturas químicas da (*E*)-6-estiril-piran-2-ona (F3-5) e da (*R*)-goniotalamina (F3-7), isoladas da fração solúvel em AcOEt, do extrato metanólico das cascas de *Cryptocarya aschersoniana*

Tabela 4 Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e de ^{13}C (100 MHz) para a (*E*)-6-estiril-piran-2-ona (F3-5) obtidos no presente trabalho e oriundos da literatura

Posição do átomo de carbono	(F3-5), 400 MHz, (CDCl_3),		Referência ¹ , 200 MHz, (CDCl_3)	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
5	105,03	6,15 (d, J=6,68 Hz, 1H)	104,90	6,10 (d, J=6,7 Hz, 1 H)
7	114,30	6,63 (d, J=16 Hz, 1H)	114,10	6,57 (d, J=16,0 Hz, 1H)
3	118,77	6,22 (dd, J=9,2 Hz, J=0,5 Hz, 1H)	118,60	6,16 (d, J=9,3 Hz, 1H)
12	127,44 (2C)	7,50 (dd, J=7,1 Hz, J=8,8 Hz, 2H)	127,30 (2C)	7,38-7,47 (m, 2H)
11 e 13	128,93 (2C)	7,35 (m, 2H)	128,80 (2C)	7,23-7,35 (m, 2H)
10 e 14	129,45	7,35 (m, 1H)	---	7,23-7,35 (m, 1H)
8	135,30	7,50 (dd, J=10Hz, J=16,0 Hz, 1H)	135,10	7,38-7,47 (m, 1H)
9	135,32	---	135,20	---
4	143,70	7,35 (m, 1H)	143,60	7,23-7,35 (m, 1H)
6	159,66	---	159,50	---
2	161,81	---	161,70	---

¹Thibonnet et al., 2002

Assim como a substância F3-5 [(*E*)-6-estiril-piran-2-ona], a substância F3-7 se apresentou como um composto amorfo amarelo, cujo espectro no UV-Vis também sugeria a presença de anel aromático. Conseqüentemente, a interpretação dos dados de infravermelho também apontava nesta direção e ainda sugeriam a presença de carboxila na estrutura, provavelmente na forma de um éster. No espectro de RMN ^1H da substância F3-7 (Tabela 5) se observaram sinais na região entre δ_{H} 7,26 e 7,40, com característica de multipeto e totalizando 5H, sugerindo a presença de ^1H aromáticos. A presença dos picos entre 6,24 e 6,70 ppm, com constantes de acoplamentos iguais a 15,8 Hz, indicava a presença de ^1H olefínicos vicinais, em configuração *trans*.

Ademais, o sinal em 163,90 ppm no espectro de ^{13}C indicava a presença de um grupo éster na estrutura (Figura 2), o que foi corroborado pelo deslocamento químico de ^{13}C em 77,9, que é característico de carbono sp^3 ligado ao átomo de oxigênio de grupo éster. Tais dados, bem como outros que puderam ser obtidos dos espectros uni e bidimensionais de RMN, permitiram atribuir a F3-7 a estrutura de uma estiril-lactona conhecida como goniotalamina (Figura 2), o que está em perfeita consonância com os dados espectroscópicos da literatura para esta substância (Tabela 5). Quanto à estereoquímica absoluta da estrutura, comparou-se o valor de $[\alpha]_{\text{D}}$ obtido no presente trabalho (+107,4) com aquele descrito para a (*R*)-goniotalamina, por de Fátima, et al. (2003), o que permitiu observar que F3-7 também tinha configuração *R*.

Tabela 5 Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e de ^{13}C (100 MHz) para a (R)-goniotalamina (F3-7), obtidos no presente trabalho e oriundos da literatura

Posição do átomo de carbono	F3-7, 400 MHz (CDCl_3)		Literatura ¹ , 200 MHz (CDCl_3)		Literatura ² , 300 MHz ² (CDCl_3)	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
5	29,80	2,52-2,55 (m, 2H)	29,80	2,54 (m)	29,90	2,57 (m, 2H)
6	77,90	5,07-5,12 (m, 1H)	77,9	5,10 (qd, J=7,1 Hz)	77,80	5,12 (m, 1H)
3	121,60	6,07-6,10 (dt, J=1,9 Hz, J=9,8 Hz, 1H)	121,50	6,09 (dt, J=10,4 Hz)	121,40	6,10 (dt, J=1,6 Hz, J=9,8 Hz, 1H)
7	125,70	6,24-6,3 (dd, J=6,5 Hz, J=15,8 Hz, 1H)	125,60	6,27 (dd, J=16,6 Hz)	125,50	6,29 (dd, J=6,3 Hz, J=16 Hz, 1H)
12	126,70	7,26-7,35 (m, 1H)	126,60		126,50	
10 e 14	128,30 (2C)	7,39-7,40 (m, 2H)	128,50 (2C)	7,3 (m)	128,20 (2C)	7,31(m, 5H)
11 e 13	128,70 (2C)	7,39-7,4 (m, 2H)	128,60 (2C)		128,40 (2C)	
8	133,10	6,7 (d, J=15,8 Hz, 1H)	133,10	6,73 (d, J=16 Hz)	132,80	6,75 (d, J=16 Hz 1H)
9	135,80	---	135,70	---	135,50	---
4	144,70	6,9-6,94 (dt, J=9,8 Hz, J=4,3 Hz, 1H)	144,70	6,93 (dt, J=10,4 Hz)	144,40	6,94 (dt, J=9,8 Hz, J=4,3 Hz, 1H)
2	163,90	---	163,90	---	163,50	---

¹ Cavalheiro & Yoshida, 2000

² Wattanapiromsakul et al., 2005

A (R)-goniotalamina foi a primeira estiril-lactona isolada de fonte natural. Embora Hlubcek e Robertson, em 1967, tenham reportado a identificação da (R)-goniotalamina, produzida pela espécie vegetal *Cryptocarya caloneura* (Lauraceae), como tal substância também foi obtida de quatro espécies do gênero *Goniothalamus* (Annonaceae), segundo trabalho publicado em 1972, foi denominada goniotalamina (Cunha Júnior, 2002). Assim como a (E)-6-estirilpiran-2-ona (F3-5), a (R)-goniotalamina (F3-7) pertence a um grupo de substâncias naturais com vasta atividade biológica (Cunha Júnior, 2002), dentre as quais vale destacar a antimicrobiana, a larvicida, a anti-inflamatória e a antifúngica (Dumitrescu *et al*, 2010). Ademais, (R)-goniotalamina apresenta atividade antiproliferativa contra diversas linhagens tumorais, incluindo uterina cervical (HeLa), gástrica (HGC-27) e renal (786-0), além de carcinomas mamários (MCF-7, T47D e MDA-MB-231), leucemias (HL-60, Jurkat e CEM-SS) e carcinoma hepatocelular (Pihie *et al* 1998; Inayat-Hussain *et al*, 1999 e 2003; de Fátima *et al*, 2005 e 2008; Rajab *et al*, 2005; Chen *et al*, 2005). Entretanto, nenhum relato de atividade nematicida foi encontrado na literatura para a (R)-goniotalamina (F3-7).

Avaliação do efeito de (E)-6-estirilpiran-2-ona (F3-5) e (R)-goniotalamina (F3-7) sobre *M. incognita*

Buscou-se averiguar a atividade nematicida das substâncias isoladas de *C. aschersoniana*, (E)-6-estirilpiran-2-ona (F3-5) e (R)-goniotalamina (F3-7), contra *M. incognita*, porque este nematoide tem distribuição mais vasta e uma gama de hospedeiros muito maior do que *M. exigua*. Apesar de a atividade *in vitro* da (R)-goniotalamina (F3-7) contra J2 de *M. incognita* (Tabela 6) ter sido menor que a observada para *M. exigua* (Tabela 3), a substância ainda se mostrou

promissora para o desenvolvimento de novos nematicidas comerciais, com resultados estatisticamente iguais ao observado para o carbofuran.

Tabela 6 Mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* expostos a (*E*)-6-estirilpiran-2-ona (F3-5) e (*R*)-goniotalamina (F3-7)

Tratamentos	J2 mortos (%)*
(<i>R</i>)-goniotalamina (624 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	85,3 a
(<i>E</i>)-6-estirilpiran-2-ona (624 $\mu\text{g mL}^{-1}$) [#]	1,5 c
Carbofuran (200 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	56,37 b
Carbofuran (250 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	88,52 a
Água	1,6 c
Tween 80 a 1% (v/v)	3,2 c

*Médias seguidas com a mesma letra, não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Scott e Knott ($P \leq 0,05$)

[#] Observou-se dificuldade para solubilizar a substância, o que pode ter interferido nos resultados obtidos

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 7, (*R*)-goniotalamina (F3-7) foi capaz de reduzir o número de ovos, enquanto a (*E*)-6-estiril-piran-2-ona (F3-5) apresentou número de galhas por massa de raiz estatisticamente menor que o observado para a (*R*)-goniotalamina (F3-7).

Tabela 7 Efeito das substâncias (*E*)-6-estirilpiran-2-ona (F3-5) e (R)-goniotalamina (F3-7) sobre a população de *Meloidogyne incognita* em tomateiros

Tratamentos	Número de galhas	Número de ovos totais	Número de ovos por massa (1/g)
(R)-goniotalamina	182 b	8450 b	2996 b
(<i>E</i>)-6-estirilpiran-2-ona	210 b	17758 d	3924 c
Tartarato	190 b	12566 c	2918 b
Carbofuran	51 a	997 a	355 a
Água	209 b	19550 d	5974 d
Tween 80 a 1% (v/v)	212 b	17591 d	5075 d

*Médias seguidas com a mesma letra, não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Scott e Knott ($P \leq 0,05$)

Identificação *in silico* de alvos enzimáticos da (R)-goniotalamina (F3-7) e da (E)-6-estiril-piran-2-ona (F3-5)

Uma vez comprovada a atividade nematicida das substâncias isoladas e, conseqüentemente, o potencial das mesmas para serem empregadas no desenvolvimento de novos produtos para o controle de nematoides fitoparasitas, buscou-se identificar os possíveis alvos enzimáticos das mesmas em *Meloidogyne* spp. Para tanto, inicialmente, buscaram-se ligantes de enzimas com semelhanças estruturais em relação à (R)-goniotalamina (F3-7), que se mostrou a mais ativa contra os nematoides. Obtiveram-se vários resultados, sendo a aspartato amônia liase aquela com maior valor de 3D score (KINNINGS & JACKSON, 2011). Isto sugeria que, dentre as possibilidades existentes, tal enzima era aquela com o maior potencial para corresponder ao alvo biológico da (R)-goniotalamina (F3-7).

Como não havia, na literatura, qualquer informação sobre a produção da aspartato amônia liase por parte de nematoides, utilizaram-se as sequências de aminoácidos de tal enzima, produzida por outros organismos, como é o caso da 1J3U (FUJII, et al., 2003) e 1JSW (SHI, et al., 1997), que são, respectivamente, produzidas por *Bacillus* spp. e *Escherichia coli*, para a procura por sequências similares nos genomas de *Meloidogyne* spp. Os melhores resultados foram obtidos para as buscas realizadas no genoma de *M. hapla*, no qual se encontrou uma sequência com 476 resíduos de aminoácidos, enquanto as enzimas aspartato amônia liase produzidas por outros organismos tinham entre 402 e 492 resíduos de aminoácidos. Logo, o valor obtido parecia bastante razoável. Além disso, segundo alinhamentos das sequências feitos com o algoritmo Clustal W 2 (LARKIN, et al., 2007), no programa SeaView 4.3.3 (GOUY, et al., 2010), a sequência oriunda do genoma de *M. hapla* apresentava similaridades entre 46% e 77%, em relação às aspartato amônia liase conhecidas.

Como a sequência de aminoácidos oriunda do genoma de *M. hapla* era bastante longa, foi impossível modelá-la por métodos *ab initio*, já que estes só apresentam resultados satisfatórios com sequências mais curtas (UNGER, et al., 1989). A modelagem por homologia também apresentou problema, pois não foi possível encontrar um molde que permitisse a modelagem de todos os resíduos de aminoácidos da sequência. Logo, o trabalho teve de ser realizado especificamente com a modelagem por *threading*. Como as aspartato amônia liases conhecidas eram homotetraméricas, construíram-se homotetrâmeros a partir de todos os modelos obtidos e, em seguida, as estruturas foram várias vezes otimizadas antes dos seus ranqueamentos. A melhor estrutura, segundo ambos os métodos utilizados, foi submetida à simulação por dinâmica molecular para relaxamento da estrutura e para a geração de conformações a serem empregadas na etapa de identificação dos sítios de ligação da enzima.

No *docking* às cegas, com as 1.000 conformações da enzima, correspondentes ao último 1 ns do processo de dinâmica molecular, observou-se que a (R)-goniotalamina (F3-7) se ligava preferencialmente em uma cavidade próxima a cada sítio de ligação da enzima que, segundo dados da literatura (VEETIL, et al., 2012) para a enzima aspartato amônia liase, eram formados nas junções de três das quatro cadeias do homotetrâmero (Figura 3).

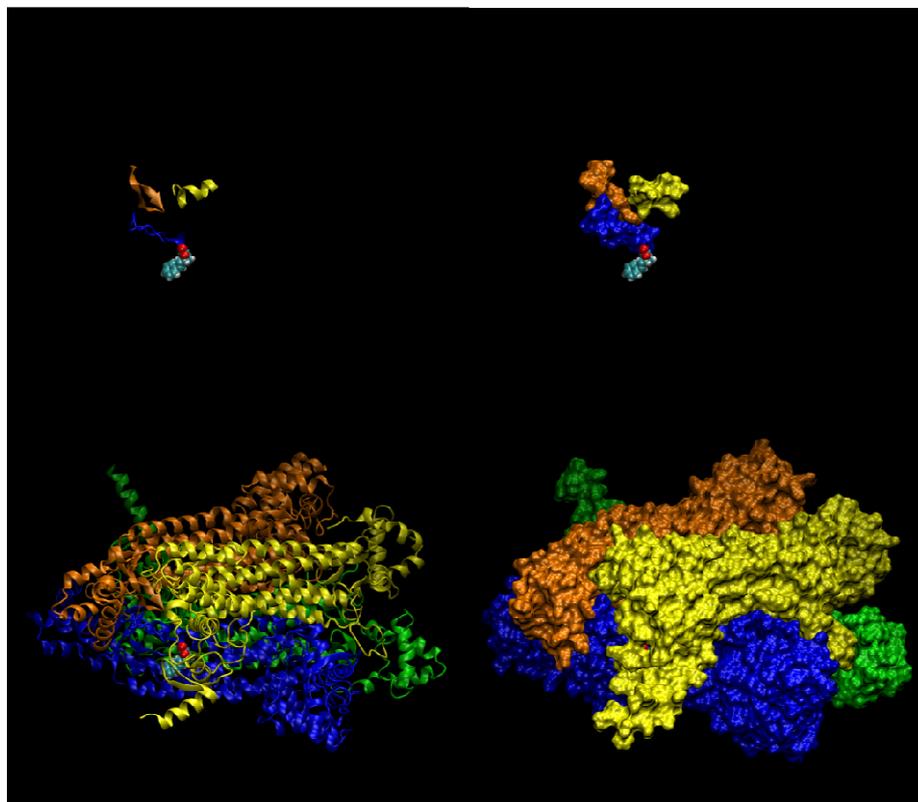


Figura 3 Estrutura da (R)-goniotalamina (F3-7) ancorada na proximidade de um dos sítios ativos da enzima homotetramérica aspartato amônia liase, modelada a partir de sequência de aminoácidos extraída computacionalmente do genoma de *Meloidogyne hapla*. Na parte de cima estão apresentados apenas a (R)-goniotalamina, na representação VDW e os resíduos de aminoácidos que fazem parte do sítio ativo (representação New Cartoon à esquerda e MSMS à direita). Na parte de baixo são utilizadas as mesmas representações, mas todos os resíduos de aminoácidos da enzima são mostrados. As figuras foram preparadas com o programa computacional VMD 1.9.1

As afinidades da (R)-goniotalamina (F3-7) e da (*E*)-6-estiril-piran-2-ona (F3-5), que foram ancoradas nas cavidades próximas aos sítios ativos da enzima (Figura 4), foram comparadas com as afinidades de substâncias inibidoras de aspartato amônia liase (REYNS & LÉONIS, 1975; BEECKMANS & DRIESSCHE,

1998; GREENHUT, et al., 1985), que foram ancoradas nos sítios da enzima ou em regiões próximas aos mesmos. Observou-se, claramente, que, em geral, tanto a (R)-goniotalamina quanto a (*E*)-6-estiril-piran-2-ona têm elevada afinidade pela enzima, quando comparadas às outras substâncias, o que sugere que as substâncias isoladas de *C. arshersoniana* apresentem potencial para o desenvolvimento de potentes inibidores da aspartato amônia liase de *Meloidogyne* spp.

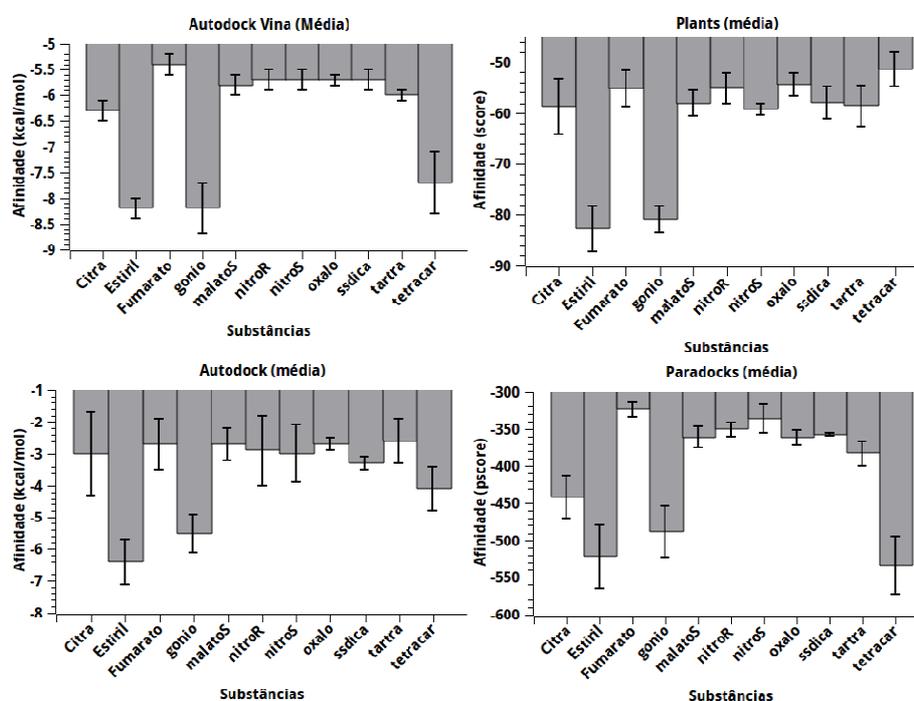


Figura 4 Afinidades das substâncias pela enzima aspartato amônia liase, de acordo com os cálculos realizados com os programas computacionais Autodock Vina 1.1.2, Autodock 4.2.3, Plants 2.1 e Paradocks 1.0.1. Citra: citrato; Estiril: (*E*)-6-estirilpiran-2-ona (F3-5); Fumarato: fumarato; gonio: (R)-goniotalamina (F3-7); malatoS: (S)-malato; nitroR: (R)-3-nitro-2-hidroxiopropanoato; nitroS: (S)-3-nitro-2-hidroxiopropanoato; oxalo: oxalato; ssdica: (S,S)-2,3-dicarboxilatoaziridina; tartra: *meso*-tartarato; tetracar: 1,2,4,5-benzenotetracarboxilato

Assim como previsto computacionalmente, a (R)-goniotalamina (F3-7) se mostrou muito mais ativa contra *M. incognita* que o fumarato, que foi utilizado como modelo nos testes *in vitro* e *in vivo* realizados com o nematoide. Entretanto, para a (E)-6-estirilpiran-2-ona (F3-5) não foi observada tal correlação, o que pode ser decorrência da baixa solubilidade de tal substância ou da interação com outro alvo.

Conclusões

No presente trabalho, a espécie vegetal *Cryptocarya aschersoniana* se mostrou promissora para o desenvolvimento de novos produtos para o controle de *Meloidogyne* spp., uma vez que apresentou ação nematicida *in vitro* contra *M. exigua*. O fracionamento do extrato bruto das cascas da referida planta por métodos cromatográficos resultou no isolamento de duas substâncias, sendo identificadas, por meio de análises espectrométricas, como sendo (E)-6-estirilpiran-2-ona e (R)-goniotalamina. Os testes *in vitro* confirmaram ação nematicida para ambas as substâncias, ressaltando (R)-goniotalamina como a mais ativa. As referidas substâncias foram submetidas a teste, para averiguar seus efeitos sobre J2 de *M. incognita* em plantas de tomateiro. Os resultados demonstram que (R)-goniotalamina é capaz de reduzir o número de ovos de tal nematoide. O estudo *in silico* de (E)-6-estirilpiran-2-ona e (R)-goniotalamina, com o objetivo de compreender seu mecanismo de ação, permitiu selecionar a enzima aspartato amônia liase de *M. hapla* como o melhor alvo. Ademais, tal estudo demonstrou que (R)-goniotalamina e (E)-6-estirilpiran-2-ona têm melhor afinidade pela enzima, quando comparadas às outras substâncias, sugerindo que tais substâncias produzidas por *C. arshersoniana* apresentam grande potencial para o desenvolvimento de inibidores eficientes da enzima aspartato amônia liase de *Meloidogyne* spp.

Referências

- Arnold, K.; Bordoli, L.; Kopp, J.; Schwede, T.; *Bioinformatics* **2006**, 22, 195.
- Beeckmans, S. Driessche, E. V.; *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 31661.
- Boneti, J.I.S.; Ferraz, S.; *Fitopatologia Brasileira* **1981**, 6, 553.
- Castilho, R. O. and, Kaplan, M. A. C.; *Quim. Nova* **2008**, 31, 66.
- Cavalheiro, A. J. & Yoshida, M.; *Phytochemistry* **2000**. 53, 819.
- Chaves, E. M. C. Ação ansiolítica e anticonvulsante da 6-[(E)-estiril-piran-2-ona] de *Aniba panurensis* em camundongos: possível mecanismo de ação. Tese de doutorado da Universidade Federal do Ceará, 2012.
- Chen, W. Y., Wu, C. C., Lan, Y. H., Chang, F. R., Teng, C. M., Wu, Y. C.; *Eur. J. Pharmacol.* **2005**, 522, 20.
- Chou, T. H.; Chen, J.J.; Peng, C.F.; Cheng, M.J.; Chen, I.S.; *Chem. Biodivers.* **2011**, 8, 2015.
- Chou, T.; Chen, J.; Peng, C; Chen, I.; *Planta Medica* **2010**, 76, 493.
- Cunha Junior, A. Constituintes químicos da espécie vegetal *Polygala Sabulosa* A. W. Bennett (Polygalaceae). Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, 2002.

de Fátima, A.; Pilli, R. A.; Tetrahedron Lett. **2003**, 44, 8721.

de Fátima, A., Kohn, L.K., Antônio, M.A., de Carvalho, J.E. and Pilli, R.A.; Bioorg. Med. Chem. **2005**, 13, 2927.

de Fátima, A.; Zambuzzi, W. F.; Modolo, L. V.; Tarsitano, C. A. B.; Gadelha, F. R. Chem. Biol. Interact. **2008**, 176, 143.

Dias, W.P.; Garcia, A.; Silva, J.F.V; Carneiro, G.E.S. Nematoides em soja: Identificação e controle. Circular Técnica: EMBRAPA, Londrina, 2010.

Dumitrescu, L., Mai Huong, D. T, Van Hung, N., Crousse, B., Bonnet-Delpon, D.; Eur. J. Med. **2010**, 45, 3213.

EMBL-EBI. Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/>. Acesso em: 20 de junho de 2014.

Ferreira, D. F.; Ciênc. Agrotec. (UFLA) **2011**, 35, 1039.

Fujii, T.; Sakai, H.; Kawata, Y.; Hata, Y.; J. Mol. Biol. **2003**, 328, 635.

Giocondo, M. P.; Bassi, C. L.; Telascra, M.; Cavalheiro, A. J., Guo, L. I.; J. Chem. Inf. Model. **2009**, 49, 120.

Greenhut, J.; Umezawav, H.; Rudolph, F. B.; J. Biol. Chem. **1985**, 260, 6684.

Gouy, M.; Guindon, S.; Gascuel, O.; Mol. Biol. Evol. **2010**, 27, 221.

Guex, N.; Peitsch, M.C.; Electrophoresis **1997**, 18, 2714.

Hlubucek, J. R., Robertson, A.V. Aust J Chem **1967**; 20, 2199.

Humphrey, W.; Dalke, A; Schulten, K.; J. Mol. Graphics Modell. **1996**, 14, 33.

Hussey, R. S.; Baker, K. R.; Plant Dis. Rep. **1973**, 57, 1025.

Inayat-Hussain, S. H, Osman, A. B, Din, L. B, Ali, A. M.; FEBS Lett. **1999**, 456, 379.

Inayat-Hussain, S. H., Annuar, B. O., Din, L. B., Ali, A. M., Ross, D.; Toxicol. In vitro **2003**, 17, 433.

INRA-Meloidogyne incognita. Disponível em:
http://www6.inra.fr/meloidogyne_incognita. Acesso em 15 de fevereiro de 2014.

Kavanagh, K. L.; Picaud, S.; Pilka, E. S.; Yue, W. W.; Roos, A. K.; Filippakoulos, P.; Von Delf, F.; Arrowsmith, C. H.; Wikstrom, M.; Edwards, A. M. Bountra, C.; Oppermann, U. Structural Genomics Consortium. Crystal structure of human fumarate hydratase. DOI: 10.2210/pdb3e04/pdb.

Kinnings, S. L.; Jackson, R. M.; J.; Chem. Inf. Model. **2011**, 28, 624.

Korb, O.; Stutzle, T.; Exner, T.E. J.; Chem. Inf. Model. **2009**, 49, 84.

Krivov, G. G.; Shapovalov, M. V.; Dunbrack, R. L. Jr.; Proteins **2009**, 77, 778.

Larkin, M.A.; Blackshields, G.; Brown, N.P.; Chenna, R.; Mcgettigan, P.A.; Mcwilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I.M.; Wilm, A.; Lopez, R.; Thompson, J.D.; Gibson, T.J.; Higgins, D.G.; *Bioinformatics* **2007**, *23*, 2947.

Li, G.; Haney, K. H.; Kellogg, G. E.; Zhang, Y. J. *Chem. Inf. Model.* **2009**, *49*, 120.

McGlacken, G. P.; Ian, J. S.; Fairlamb, I. J. S.; *Nat. Prod. Rep.* **2005**, *22*, 369.

Meragelman, T. L.; Scudiero, D. A.; Davis, R. E.; Staudt, L. M.; Mccloud, T. G.; Cardellina, J. H.; Shoemaker, R. H. J. *Nat. Prod.* **2009**, *72*, 336.

Mora, S.; Díaz-Véliz, G.; Millán, R.; Lungenstrass, H, Quirós, S.; Coto-Morales, T.; Hellión-Ibarrola, M.C. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2005**, *82*, 373.

Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J.; *J. Comput. Chem.* **2009**, *16*, 2785.

Muegge, I.; *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5895.

Nematode.net v 3.0. Disponível em: http://nematode.net/NN3_frontpage.cgi.
Acesso em: 20 de 15 de fevereiro de 2014

O'boyle, N. M.; Banck, M.; James, C. A.; Morley, C.; Vandermeersch, T.; Hutchison, G.R.; *J. Cheminform.* **2011**, *3*, 33.

Oliveira, D. F.; Carvalho, H. W. P.; Nunes, A. S.; Silva, G. H.; Cavalheiro, A. J.; Campos, V. P.; *Nematologia Brasileira* **2007**, *31*, 202.

Pihie, A. H., Stanslas, J., Din, L. B.; *Anticancer Res.* **1998**, 18, 1739.

Rajab, N. F., Hamid, Z. A., Hassan, H., Ali, A. M, Din, L.B., Inayat-Hussain, S. H.; *Environ Mutagen Res.* **2005**, 27, 161.

Randig, O.; Carneiro, R. M. D. G; Castagnone-Sereno, P; *Nematologia Brasileira* **2004**, 28, 1.

RCSB Protein Data Bank. Disponível em: <http://www.pdb.org>. Acesso em 10 de maio de 2014.

Reyns, C.; Léonis, J.; *BIOCHIMIE* **1975**, 57, 131.

Rosa, L. S.; Silveira, E. L.; dos Santos, M. M.; Modesto, R. S.; Perote, J. R. S.; Vieira, T. A.; *Rev. Bras. Agroecol.* **2007**, 2, 337.

Schymkowitz, J.; Borg, J.; Stricher, F.; Nys, R.; Rousseau, F.; Serrano, L. *Nucleic Acids Res.* **2005**, 33, 382.

Scott, A.J.; Knott, M.A. *Biometrics* **1974**, 30, 502.

Thibonnet, J.; Abarbri, M.; Parrain, J. L.; Duchêne, A. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3941.

Tosco, P.; Balle, T.; Shiri, F.; *Comput. Aided Mater. Des. Mol.* **2011**, 25, 777.

Trott, O.; Olson, A. J. J.; *Comput. Chem.* **2010**, 31, 455.

Unger, R.; Harel, D.; Wherland, S.; Sussman, J. L.; *Struct. Funct. Genet.* **1989**, *5*, 355.

Vanommeslaeghe, K.; Hatcher, E.; Acharya, C.; Kundu, S.; Zhong, S.; Shim, J.; Darian, E.; Guvench, O.; Lopes, P.; Vorobyov, I.; Mackerell Jr., A. D.; *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 671-690.

Valente, V. M. M. Síntese e atividade biológica de pironas e piridinonas derivadas do ácido desidroacético. 230 f. 2010. Tese (Doutorado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2010.

Veetil, V. P.; Fibriansah, G.; Raj, H.; Thunnissen, A. M.; Poelarends, G. J. *Biochemistry.* **2012**, *51*, 4237. doi: 10.1021/bi300430j. Epub 2012 May 15.

Wattanapiromsakul, C., Wangsintaweekul, B., Sangprapan, P., Itharat, A., Keawpradub, N. *J. Sci. Technol.* **2005**, *27*, 479.

Weaver, T.; Lees, M.; Zaitsev, V.; Zaitseva, I.; Duke, E.; Lindley, P.; McSweeney, S.; Svensson, A.; Keruchenko, J.; Keruchenko, I.; Gladilin, K.; Banaszak, L. *J. Mol. Biol.* **1998**, *280*, 431. DOI no: 10.1006/jmbi.1998.1862

Williamson, V.M., and Kumar, A.; *Trends Genet.* **2006**, *22* 396.

Zhang, Y.; *Bioinformatics* **2008**, *9*, 40.

Zhou, H.; Skolnick, J.; *Biophys. J.* **2011**, *101*, 2043.

ANEXOS

Anexo	Título	Página
FIGURA 1A	Espectro de RMN ^1H de F3-5 (<i>E</i>)-6-estiril-piran-2-ona) em CDCl_3 , 400 MHz	134
FIGURA 1A'	Primeira ampliação do espectro de RMN ^1H de F3-5 (<i>E</i>)-6-estiril-piran-2-ona) em CDCl_3 , 400 MHz	135
FIGURA 1A''	Segunda ampliação do espectro de RMN ^1H de F3-5 (<i>E</i>)-6-estiril-piran-2-ona) em CDCl_3 , 400 MHz	136
FIGURA 1B'	Espectro de RMN ^{13}C de F3-5 (<i>E</i>)-6-estiril-piran-2-ona) em CDCl_3 , 100 MHz	137
FIGURA 1B'	Ampliação do espectro de RMN ^{13}C de F3-5 (<i>E</i>)-6-estiril-piran-2-ona) em CDCl_3 , 100 MHz	138
FIGURA 1C	Mapa da correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) de F3-5 (<i>E</i>)-6-estiril-piran-2-ona) em CDCl_3 , 400 MHz	139
FIGURA 1C'	Ampliação do mapa da correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) de F3-5 (<i>E</i>)-6-estiril-piran-2-ona) em CDCl_3 , 400 MHz	140
FIGURA 1D'	Espectro de RMN DEPT 135 de F3-5 (<i>E</i>)-6-estiril-piran-2-ona) em CDCl_3 , 100 MHz	141
FIGURA 1D''	Ampliação do espectro de RMN DEPT 135 de F3-5 (<i>E</i>)-6-estiril-piran-2-ona) em CDCl_3 , 100 MHz	142
FIGURA 1E	Mapa da correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) de F3-5 (<i>E</i>)-6-estiril-piran-2-ona) em CDCl_3 , 400x100 MHz	143
FIGURA 1E'	Ampliação do mapa da correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) de F3-5 (<i>E</i>)-6-estiril-piran-2-ona) em CDCl_3 , 400x100 MHz	144
FIGURA 1F	Mapa da correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HSQC) de F3-5 (<i>E</i>)-6-estiril-piran-2-ona) em CDCl_3 , 400x100 MHz	145
FIGURA 1F'	Ampliação do mapa da correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HSQC) de F3-5 (<i>E</i>)-6-estiril-piran-2-ona) em CDCl_3 , 400x100 MHz	146
FIGURA 2A	Espectro de RMN ^1H de F3-7 (R)-goniotalamina) em CDCl_3 , 400 MHz	147
FIGURA 2A'	Primeira ampliação do espectro de RMN ^1H de F3-7 (R)-goniotalamina) em CDCl_3 , 400 MHz	148
FIGURA 2A''	Segunda ampliação do espectro de RMN ^1H de 1-21-4 (R)-goniotalamina) em CDCl_3 , 400 MHz	149
FIGURA 2B	Espectro de RMN ^{13}C de F3-5 (<i>E</i>)-6-estiril-piran-2-ona) em CDCl_3 , 100 MHz	150
FIGURA 2B'	Primeira ampliação do espectro de RMN ^{13}C de F3-5 (<i>E</i>)-6-estiril-piran-2-ona) em CDCl_3 , 100 MHz	151
FIGURA 2B''	Segunda ampliação do espectro de RMN ^{13}C de F3-5 (<i>E</i>)-6-estiril-piran-2-ona) em CDCl_3 , 100 MHz	152
FIGURA 2C	Mapa da correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) de F3-7 (R)-goniotalamina em CDCl_3 , 400 MHz	153
FIGURA 2C'	Ampliação do mapa da correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) de F3-7 (R)-goniotalamina em CDCl_3 , 400 MHz	154
FIGURA 2D	Espectro de RMN DEPT 135 de F3-7 (R)-goniotalamina em CDCl_3 , 100 MHz	155
FIGURA 2D'	Ampliação do espectro de RMN DEPT 135 de F3-7 (R)-goniotalamina em CDCl_3 , 100 MHz	156
FIGURA 2E	Mapa da correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) de F3-7 (R)-goniotalamina) em CDCl_3 , 400x100 MHz	157
FIGURA 2E'	Ampliação do mapa da correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) de F3-7 (R)-goniotalamina) em CDCl_3 , 400x100 MHz	158
FIGURA 2F	Mapa da correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HSQC) de F3-7 (R)-goniotalamina) em CDCl_3 , 400x100 MHz	159
FIGURA 2F'	Ampliação do mapa da correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HSQC) de F3-7 (R)-goniotalamina) em CDCl_3 , 400x100 MHz	160

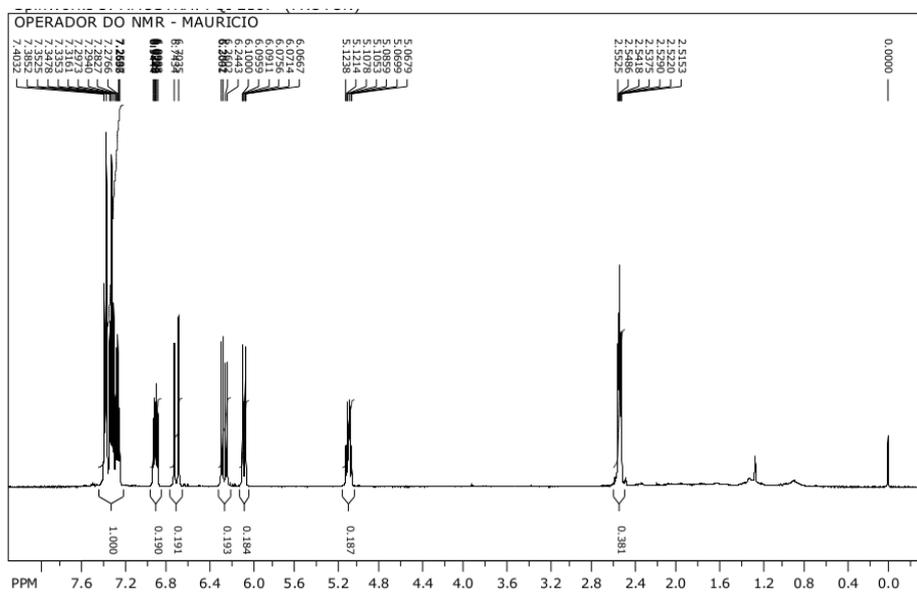


Figura 1A Espectro de RMN ^1H de F3-5 [(E)-6-estirilpiran-2-ona] em CDCl_3 , 400 MHz

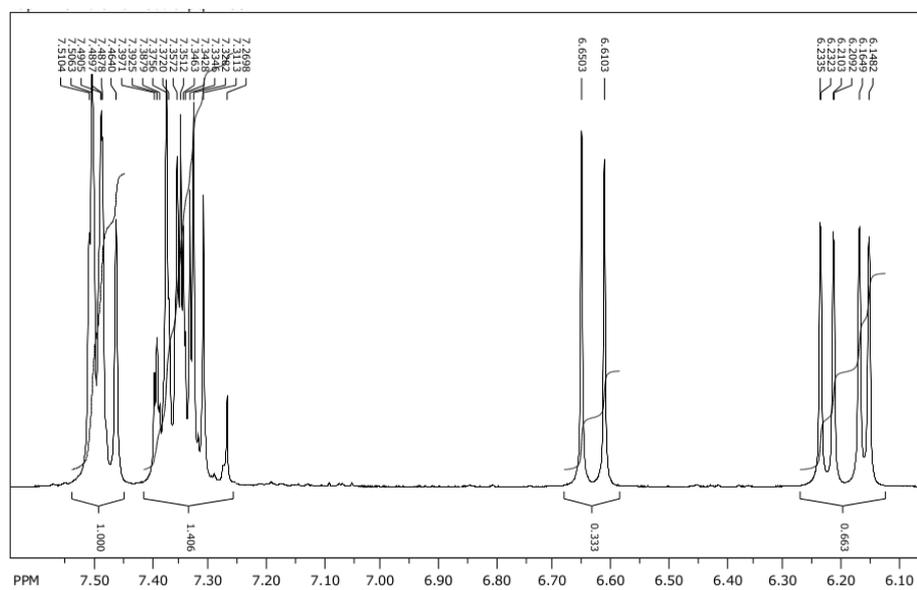


Figura 1A' Primeira ampliação do espectro de RMN ^1H de F3-5 [(E)-6-estirilpiran-2-ona] em CDCl_3 , 400 MHz

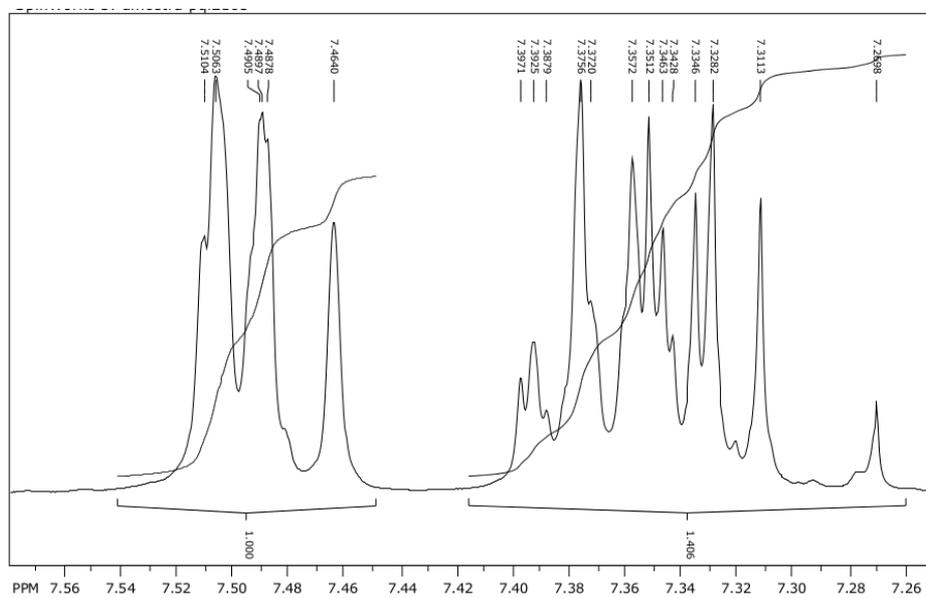


Figura 1A'' Segunda ampliação do espectro de RMN ¹H de F3-5 [(E)-6-estirilpiran-2-ona] em CDCl₃, 400 MHz

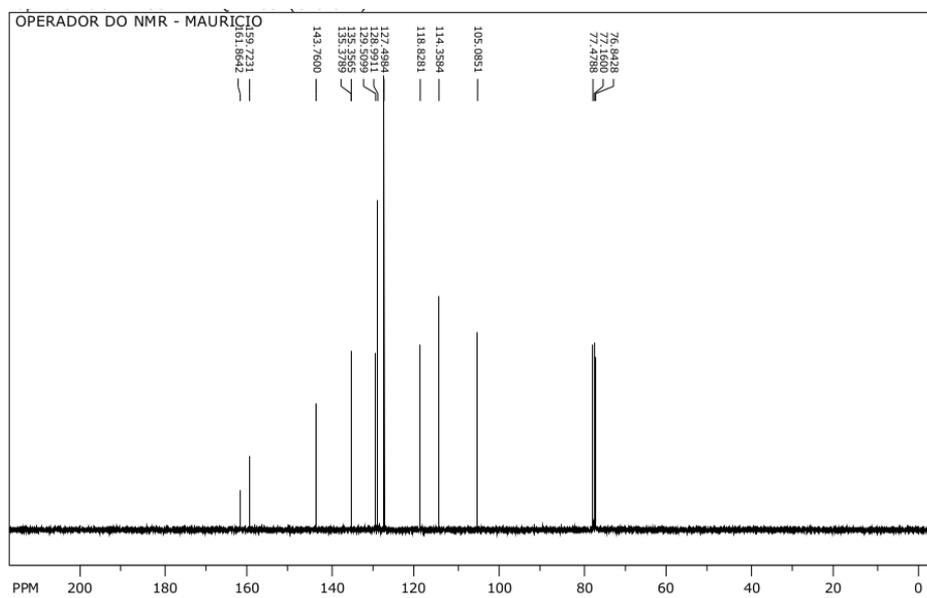


Figura 1B Espectro de RMN ^{13}C de F3-5 [(E)-6-estirilpiran-2-ona] em CDCl_3 , 100 MHz

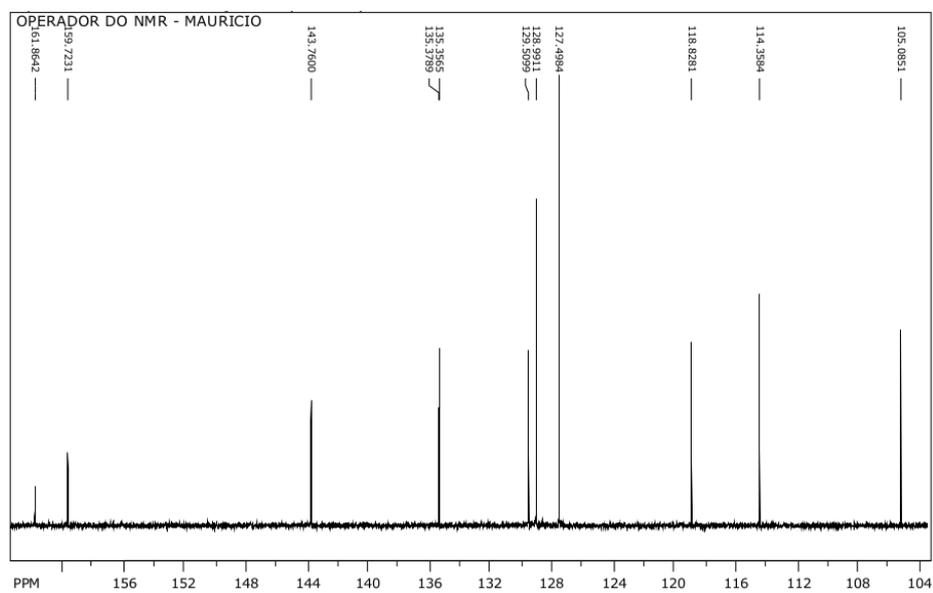


Figura 1B' Ampliação do espectro de RMN ^{13}C de F3-5 [(E)-6-estirilpiran-2-ona] em CDCl_3 , 100 MHz

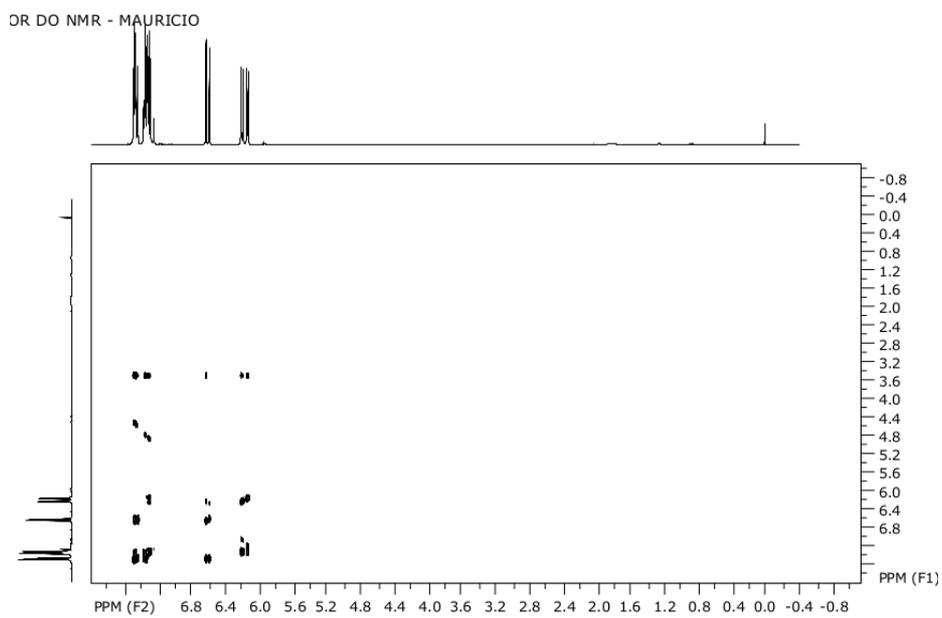


Figura 1C Mapa da correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) de F3-5 [(E)-6-estirilpiran-2-ona] em CDCl_3 , 400 MHz

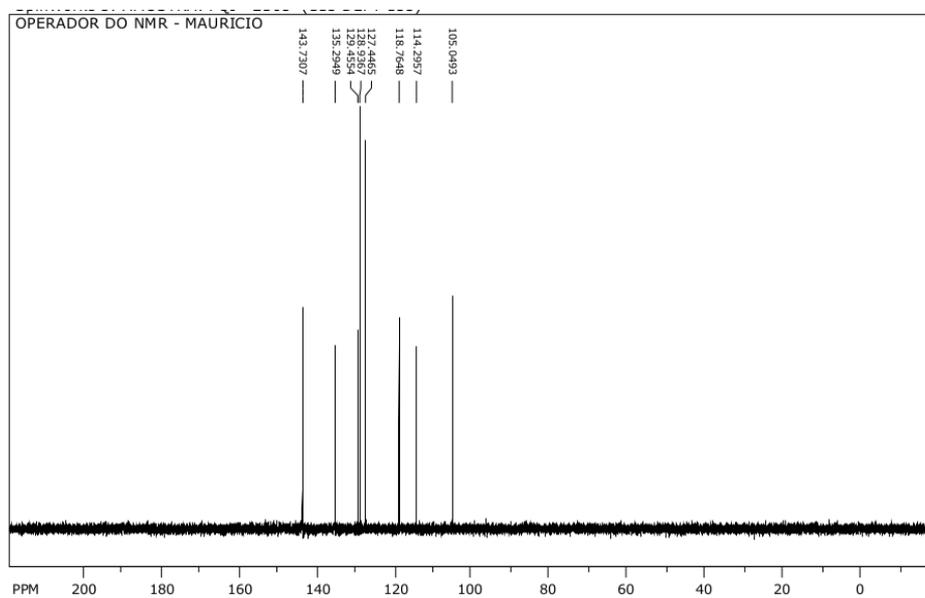


Figura 1D DEPT 135 de F3-5 [(E)-6-estirilpiran-2-ona] em CDCl_3 , 100 MHz

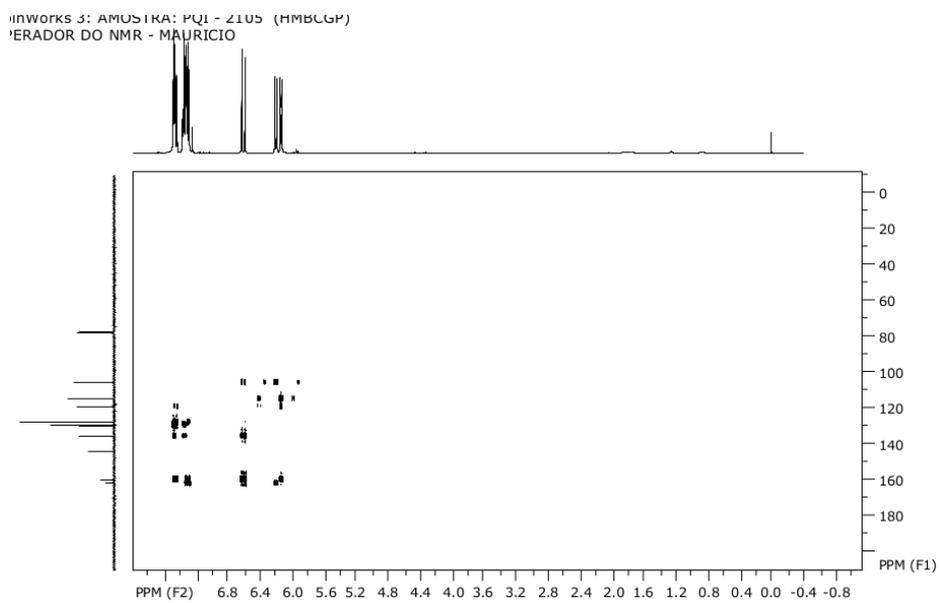


Figura E Mapa da correlação heteronuclear a longa distância $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) de F3-5 [(E)-6-estirilpiran-2-ona] em CDCl_3 , 400x100 MHz

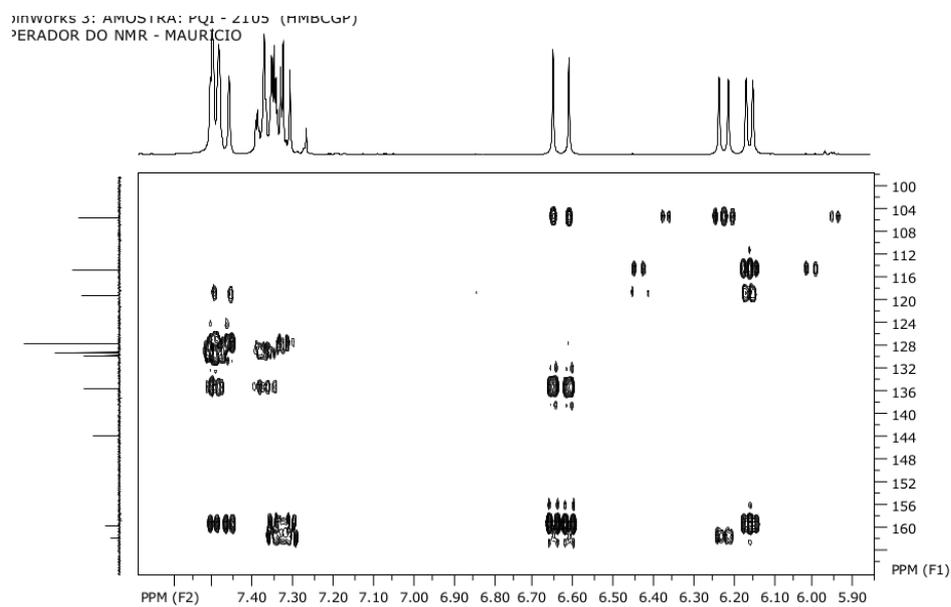


Figura E' Ampliação do mapa da correlação heteronuclear a longa distância $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) de F3-5 [(E)-6-estirilpiran-2-ona] em CDCl_3 , 400x100 MHz

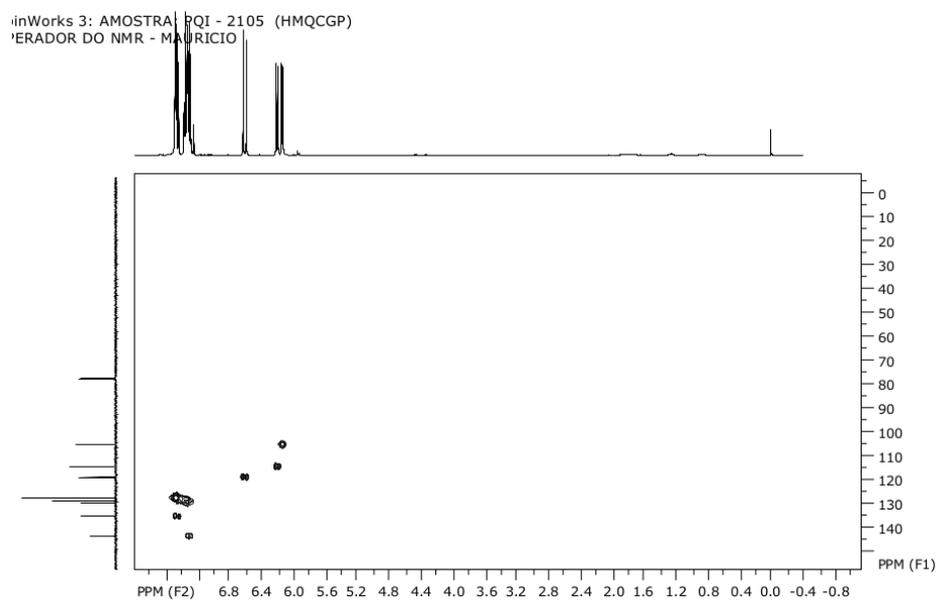


Figura 1F Mapa da correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) de F3-5 [(E)-6-estirilpiran-2-ona] em CDCl_3 , 400x100 MHz

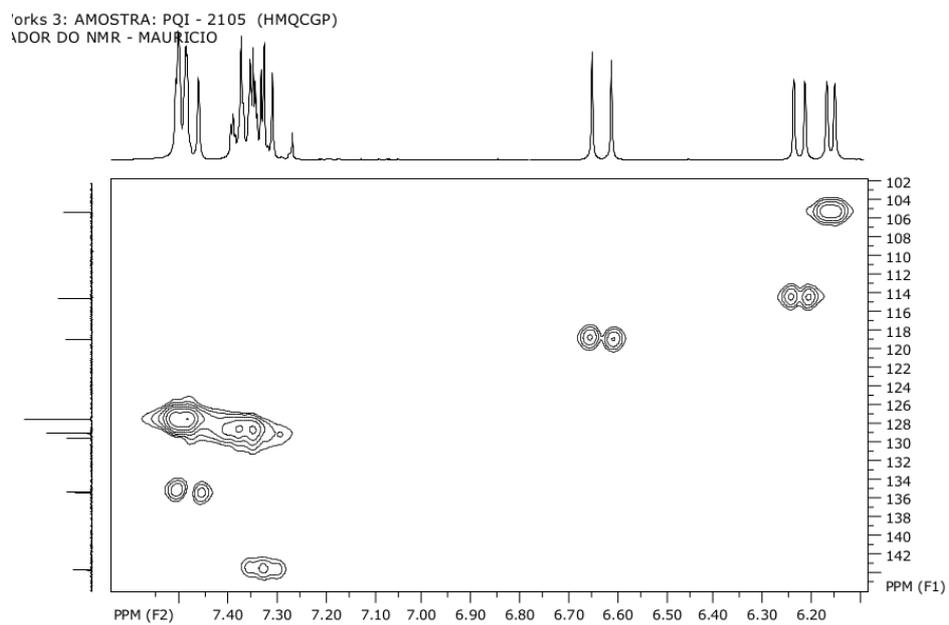


Figura 1F' Ampliação do mapa da correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMQC) de F3-5 [(E)-6-estirilpiran-2-ona] em CDCl_3 , 400x100 MHz

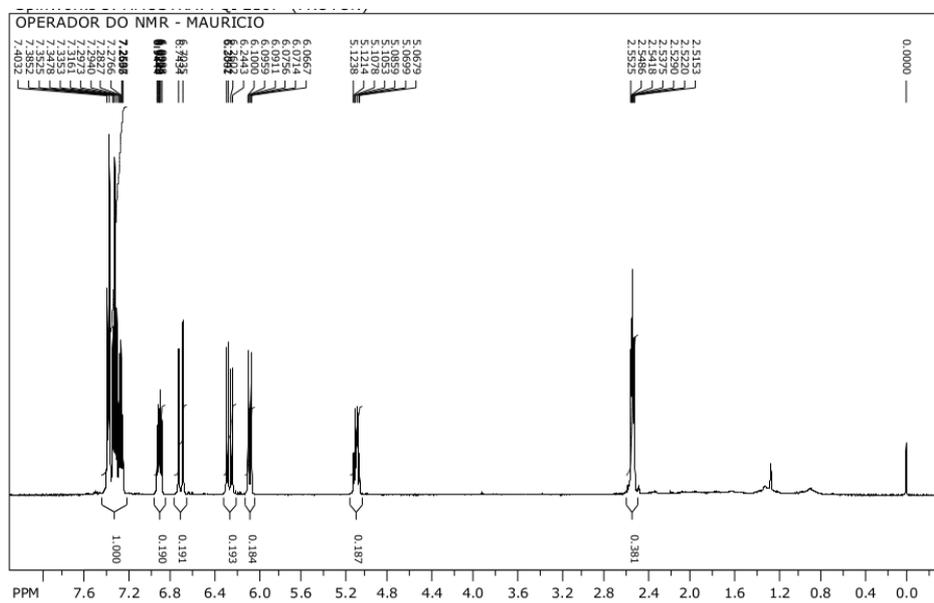


Figura 2A Espectro de RMN ^1H de F3-7 [(R)-goniotalamina] em CDCl_3 , 400 MHz

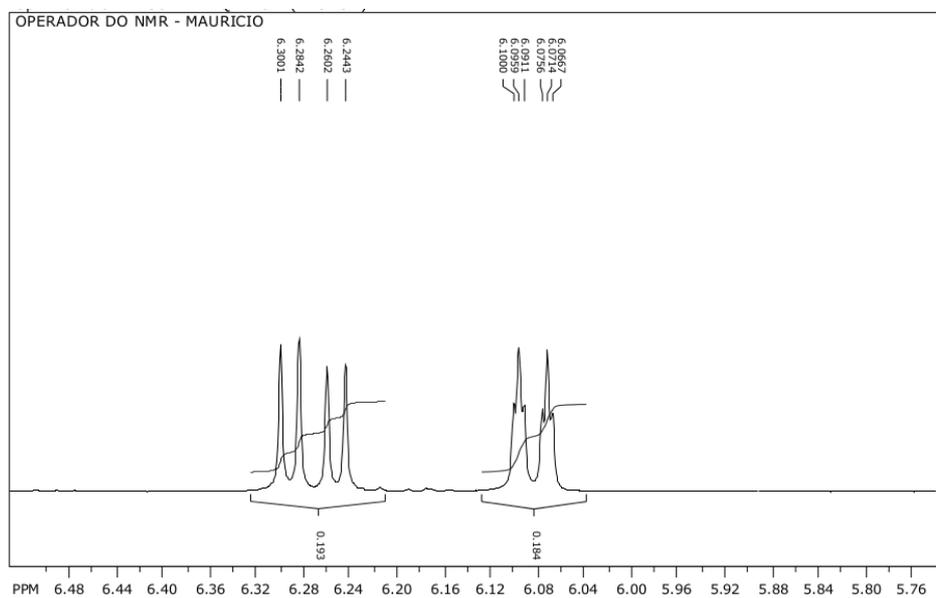


Figura 2A'' Segunda ampliação do espectro de RMN ^1H de F3-7 [(R)-goniotalamina] em CDCl_3 , 400 MHz

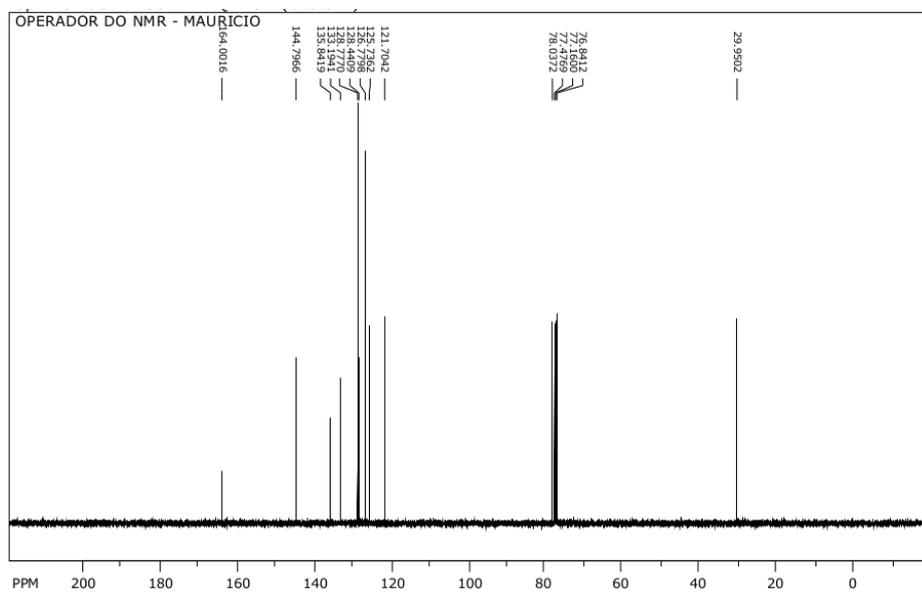


Figura 2B Espectro de RMN ^{13}C de F3-7 [(R)-goniotalamina] em CDCl_3 , 100 MHz

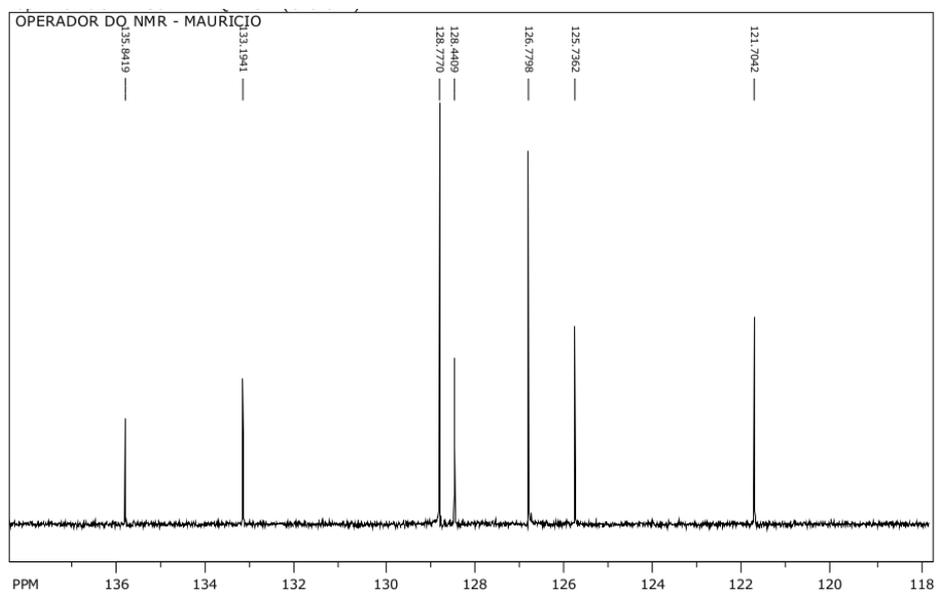


Figura 2B' Primeira ampliação do espectro de RMN ^{13}C de F3-7 [(R)-goniotalamina] em CDCl_3 , 100 MHz

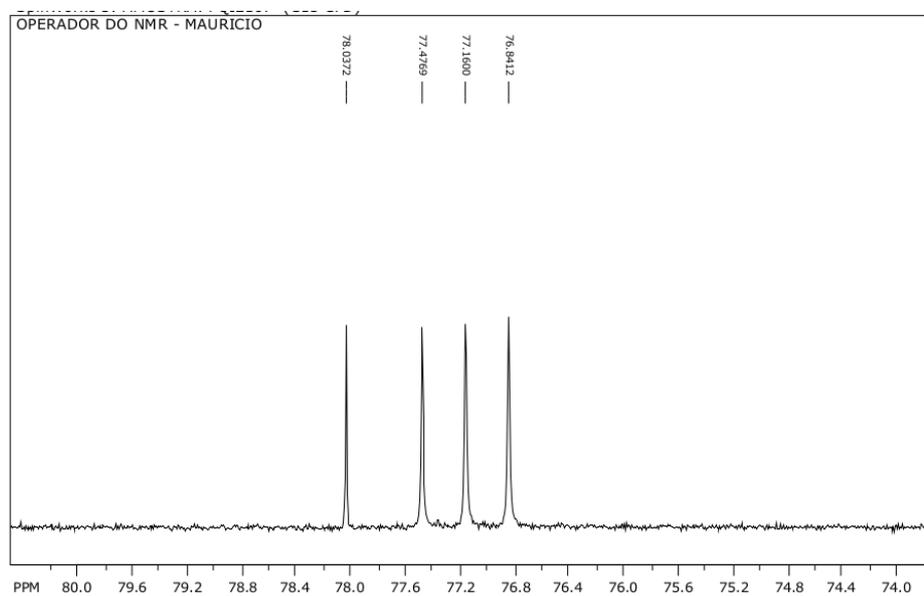


Figura 2B'' Segunda ampliação do espectro de RMN ^{13}C de F3-7 [(R)-goniotalamina] em CDCl_3 , 100 MHz

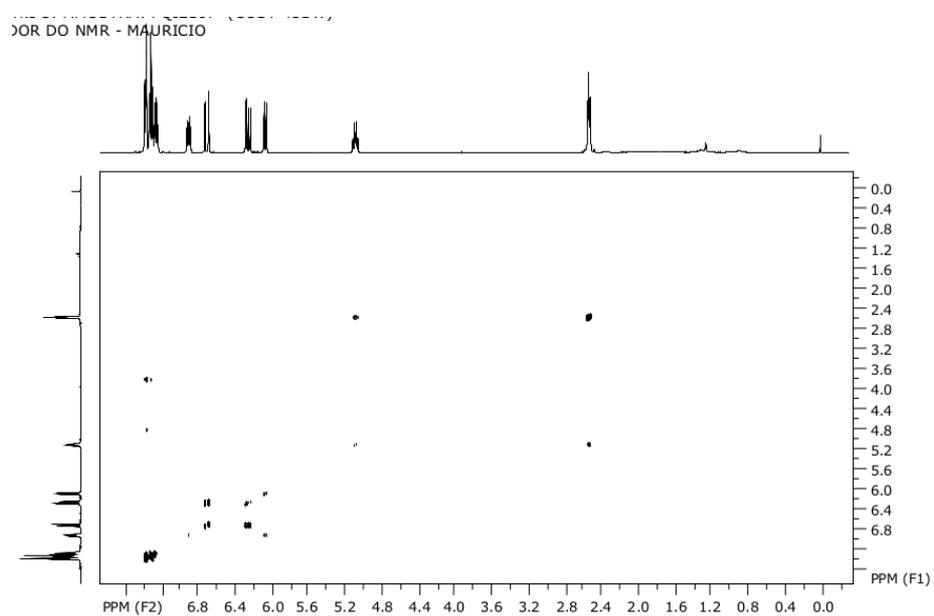


Figura 2C Mapa da correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) de F3-7 [(R)-goniotalamina] em CDCl_3 , 400 MHz

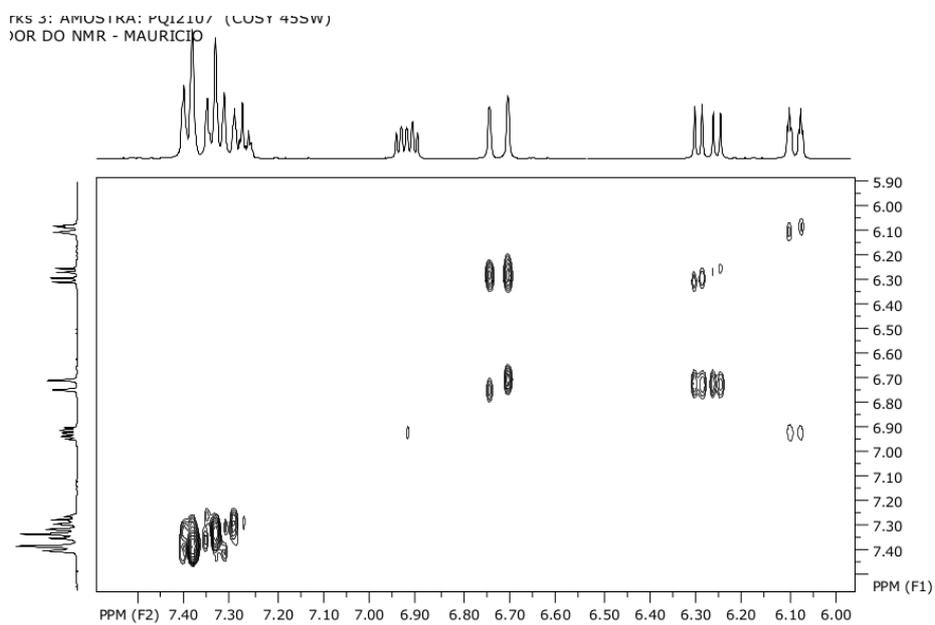


Figura 2C' Ampliação do mapa da correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) de F3-7 [(R)-goniotalamina] em CDCl_3 , 400 MHz

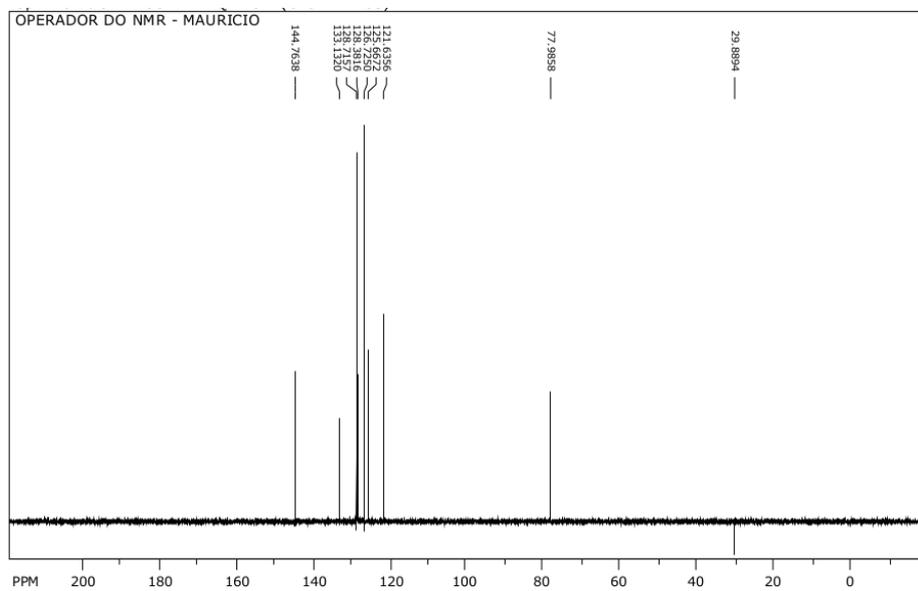


Figura 2D DEPT 135 de F3-7 [(R)-goniotalamina] em CDCl_3 , 100 MHz

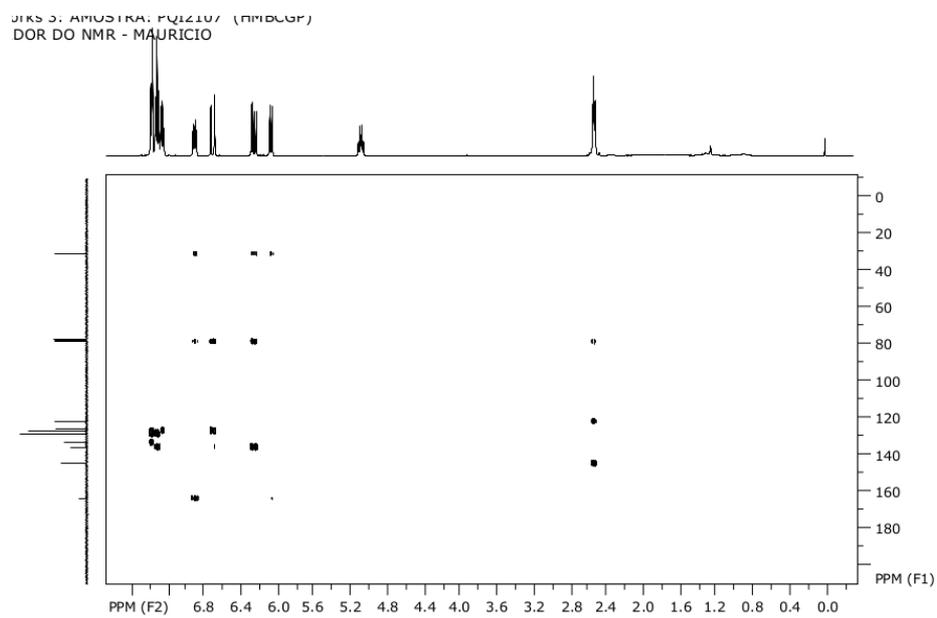


Figura 2E Mapa da correlação heteronuclear a longa distância $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC) de F3-7 [(R)-goniotalamina] em CDCl_3 , 400x100 MHz

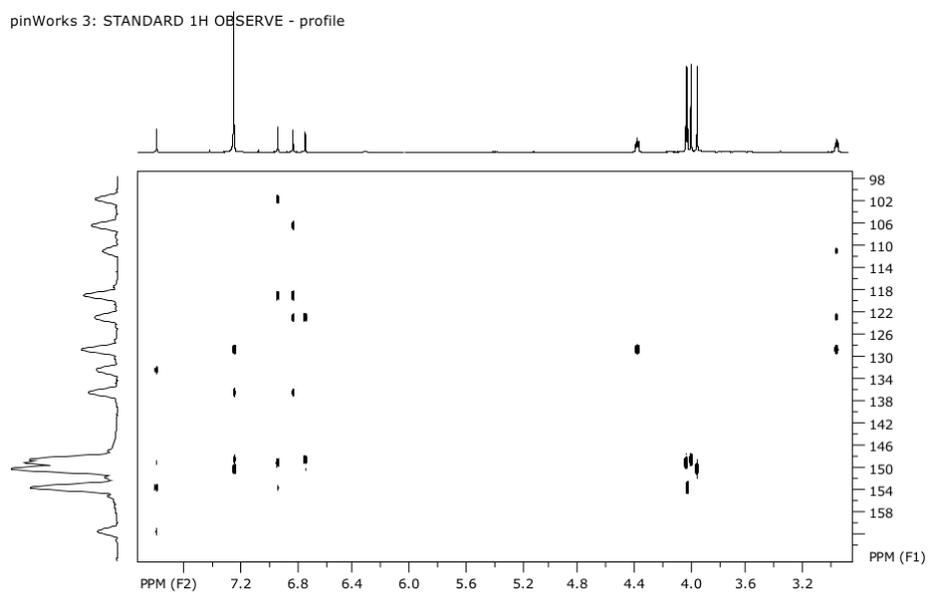


Figura 2E' Ampliação do mapa da correlação heteronuclear a longa distância ^1H x ^{13}C (HMBC) de F3-7 [(R)-goniotalamina] em CDCl_3 , 400x100 MHz

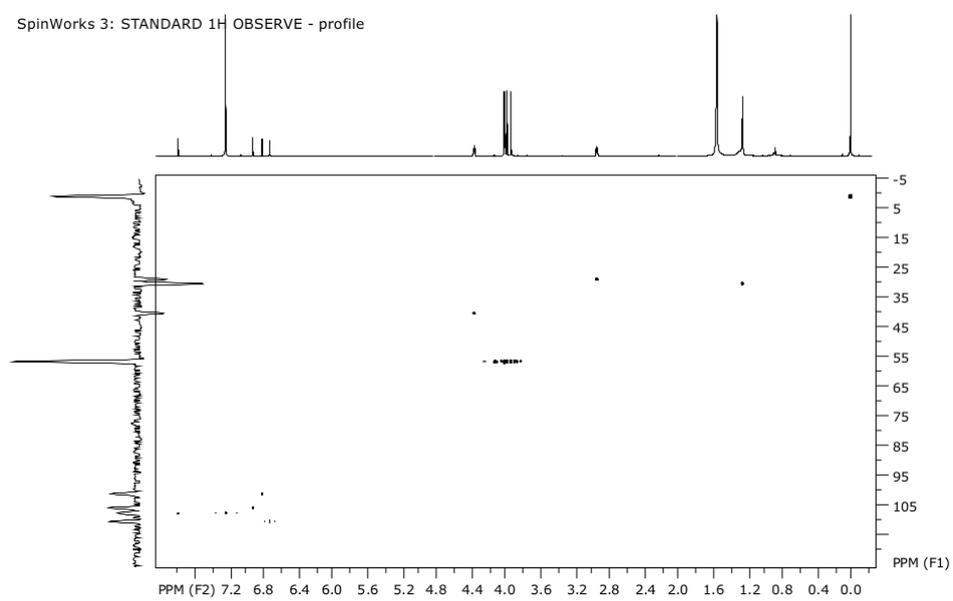


Figura 2F Mapa da correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HSQC) de F3-7 [(R)-goniotalamina] em CDCl_3 , 400x100 MHz

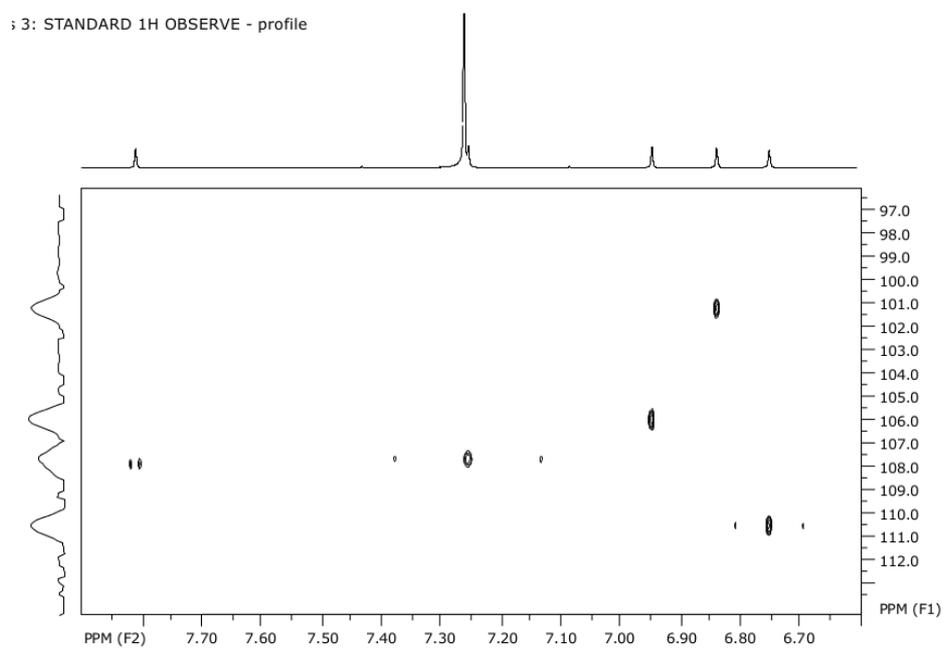


Figura 2F' Ampliação do mapa da correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HSQC) de F3-7 [(R)-goniotalamina] em CDCl_3 , 400x100 MHz