



**JAVIER ANDRÉS GARCÍA VANEGAS**

**SELEÇÃO DE ÉSTERES DO ÁCIDO (*E*)-CINÂMICO ATIVOS  
CONTRA *Meloidogyne incognita***

**LAVRAS-MG  
2020**

**JAVIER ANDRÉS GARCÍA VANEGAS**

**SELEÇÃO DE ÉSTERES DO ÁCIDO (*E*)-CINÂMICO ATIVOS CONTRA  
*MELOIDOGYNE INCOGNITA***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em bioquímica, tecnologia de cachaça, produtos naturais e sintéticos, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Denilson Ferreira de Oliveira  
Orientador

**LAVRAS-MG  
2020**

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

Vanegas, Javier Andrés Garcia.

Seleção de ésteres do ácido (*E*)-cinâmico ativos contra *Meloidogyne incognita* / Javier Andrés García Vanegas. - 2020.  
110 p. : il.

Orientador(a): Denilson Ferreira De Oliveira.

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

Bibliografia.

1. *M incógnita*. 2. *In silico*. 3. Análogos do ácido (*E*)-cinâmico. I. De Oliveira, Denilson Ferreira II. Título.

**JAVIER ANDRÉS GARCÍA VANEGAS**

**SELEÇÃO DE ÉSTERES DO ÁCIDO (*E*)-CINÂMICO ATIVOS CONTRA  
*MELOIDOGYNE INCOGNITA***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em bioquímica, tecnologia de cachaça, produtos naturais e sintéticos, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 20 de fevereiro de 2020.

Dra. Bárbara Sayuri Bellete                      UFLA

Dr. Ricardo Moreira de Sousa                      UFNF

Prof. Dr. Denilson Ferreira de Oliveira  
Orientador

**LAVRAS-MG  
2020**

*A Deus, pelas suas bênçãos.  
Aos meus pais Isabel e Eliecer, à  
minha irmã Costansa e à minha  
noiva, pela força, apoio, carinho,  
orações e confiança em mim.*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas oportunidades que sempre me tem dado.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Química pela oportunidade e confiança na realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À Organização dos Estados Americanos (OEA), por garantir oportunidades de desenvolvimento acadêmico aos países da América Latina.

Ao presidente Francisco Bejarano e ao gerente Jaime Bravo da Organização Pajonales, pelo apoio e concessão da licença de estudos.

Aos professores do Departamento de Química e ao Professor Dr. Vicente Paulo Campos do Laboratório de Nematologia, pelos ensinamentos transmitidos e concessão dos espaços para o desenvolvimento dos trabalhos.

Ao Professor Dr. Denilson Ferreira de Oliveira, pela orientação, paciência e lições profissionais oferecidas constantemente para a conclusão do trabalho de mestrado.

Ao Dr. Willian César Terra, pela confiança, conselhos, experiência e conhecimentos compartilhados durante o percurso do mestrado.

Aos meus pais, Isabel Vanegas, Eliecer García, e à minha irmã, Costansa García pelas orações e o apoio incondicional na conquista deste objetivo. À minha noiva, Jeimy Vasquez, pelo apoio, conselhos, carinho, compreensão e confiança em mim.

Ao meu colega e amigo Álvaro Montilla, pelas palavras de apoio que sempre soube me dizer. Ao meu parceiro de laboratório e amigo Horácio Bambo Pacule, pela amizade e confiança durante os dois anos de trabalho duro.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

**MUITO OBRIGADO!**

## RESUMO

Os nematoides fitoparasitas geram grandes perdas para a produção agrícola mundial. Dentre tais organismos se encontra *Meloidogyne incognita*, que pode parasitar aproximadamente 2000 espécies de plantas, causando grandes prejuízos econômicos para os agricultores. Este é o caso, por exemplo, da cultura do tomate, que tem produções mundiais de 170 milhões de toneladas por ano e pode ter perdas de até 10% somente por causa de fitonematoídes. Como os métodos mais utilizados para o controle de tais parasitas consistem no emprego de nematicidas químicos, com elevada toxicidade contra organismos não alvos, tem-se a necessidade de desenvolver alternativas eficientes e de menor impacto ambiental, para uso como nematicidas. Um exemplo disto é o trabalho previamente feito com o (*E*)-cinamaldeído, que se mostrou bastante ativo contra *M. incognita* em testes *in vitro* e em tomateiros. Entretanto, este aldeído apresentou baixa persistência no solo, o que pode ser atribuído a sua elevada susceptibilidade à oxidação. Conseqüentemente, com vistas a contribuir para resolver este problema de baixa persistência, este trabalho teve como objetivo selecionar, através de testes *in vitro* e *in vivo*, ésteres do ácido (*E*)-cinâmico ativos contra *M. incognita*. Além disto, também se objetivou identificar o alvo enzimático dos ésteres mais ativos através de estudo *in silico*. Os melhores resultados foram obtidos para o (*E*)-*p*-fluorocinamato de metila (13), (*E*)-*p*-clorocinamato de metila (14) e (*E*)-*p*-bromocinamato de metila (15), que apresentaram concentrações letais para 50% (CL<sub>50</sub>) dos juvenis do segundo estágio (J2) de *M. incognita*, *in vitro*, iguais a 168, 95 e 216 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Nas mesmas condições os valores de CL<sub>50</sub> para os nematicidas comerciais carbofuran e fluensulfona foram iguais a 160 e 34 µg mL<sup>-1</sup>. As substâncias 13-15 também foram ativas contra ovos do nematoíde e, quando utilizadas na concentração de 200 µg mL<sup>-1</sup> em experimentos com tomateiros inoculados com J2, reduziram em aproximadamente 23% o número de galhas do nematoíde nas plantas. Através do estudo *in silico*, observou-se que o provável alvo enzimático das substâncias 13-15 em *M. incognita* era a histona deacetilase, que se trata de uma enzima responsável pela expressão epigenética e pode intervir na formação embrional dos nematoides. Como um pré-estudo visando ao desenvolvimento de moléculas mais ativas contra o nematoíde, estruturas químicas análogas, com mais afinidades pela histona deacetilase, foram selecionadas e propostas como potenciais nematicidas. Concluindo, os ésteres 13-15 são potencialmente úteis para o desenvolvimento de novos nematicidas para o controle de *M. incognita*, principalmente porque a histona deacetilase, que é o alvo enzimático destas substâncias no nematoíde, segundo o estudo *in silico*, pode ser empregada para se encontrar substâncias análogas com mais atividade nematicida.

**Palavras-chave:** *M. incognita*. *In silico*. Análogos do ácido (*E*)-cinâmico. Histona deacetilase.

## ABSTRACT

Phytoparasitic nematodes generate large losses for world agricultural production. Among these organisms is *Meloidogyne incognita*, which can parasitize approximately 2000 species of plants, causing great economic damage to farmers. This is the case, for example, of the tomato crop, which has world productions of 170 million tons per year and can lose up to 10% only due to phytonematodes. As the most used methods for the control of such parasites are the use of chemical nematicides, with high toxicity against non-target organisms, there is a need to develop efficient alternatives with less environmental impact, for use as nematicides. An example of this is the work previously done with (*E*)-cinamaldehyde, which was shown to be very active against *M. incognita* in *in vitro* tests and in tomato plants. However, this aldehyde showed low persistence in the soil, which can be attributed to its high susceptibility to oxidation. Consequently, in order to contribute to solve this problem of low persistence, this study aimed to select, through *in vitro* and *in vivo* tests, esters of (*E*)-cinnamic acid active against *M. incognita*. In addition, it also aimed to identify the enzymatic target of the most active esters through *in silico* study. The best results were obtained for methyl (*E*)-*p*-fluorocinamate (13), methyl (*E*)-*p*-chlorocinamate (14) and methyl (*E*)-*p*-bromocinamate (15), which showed lethal concentrations for 50% (LC<sub>50</sub>) of nematodes of the second stage (J2) of *M. incognita*, *in vitro*, equal to 168, 95 and 216 µg mL<sup>-1</sup>, respectively. Under the same conditions, the LC<sub>50</sub> values for the commercial nematicides carbofuran and fluensulfone were equal to 160 and 34 µg mL<sup>-1</sup>. Substances 13-15 were also active against nematode eggs and, when used at a concentration of 200 µg mL<sup>-1</sup> in experiments with tomato plants inoculated with J2, reduced the number of galls of the nematode in plants by about 23% the number of galls of the nematode in the plants. Through the *in silico* study, it was observed that the probable enzymatic target of substances 13-15 in *M. incognita* was histone deacetylase, which is an enzyme responsible for epigenetic expression and can intervene in the embryonic formation of nematodes. As a pre-study aimed at the development of more active molecules against the nematode, analogous chemical structures, with more affinities for histone deacetylase, were selected and proposed as potential nematicides. In conclusion, esters 13-15 are potentially useful for the development of new nematicides for the control of *M. incognita*, mainly because histone deacetylase, which is the enzymatic target of these substances in the nematode, according to the *in silico* study, can be used to if you find similar substances with more nematicidal activity.

**Keywords:** *M. incognita*. *In silico*. (*E*)-Cinnamic Acid Analogs. Histone deacetylase.



## LISTA DE FIGURAS

### PRIMEIRA PARTE

- Figura 1 - Estruturas químicas de aldeídos com propriedades nematicidas. ....21
- Figura 2 - Estruturas químicas de análogos do (*E*)-cinamaldeído com atividade contra o nematoide *Bursaphelenchus xylophilus*. ....21
- Figura 3 - Publicações na base de dados Web of Science com o termo ‘cinnamaldehyde’. 1985-2018. ....23
- Figura 4 - Síntese do (*E*)-cinamaldeído a partir do ácido (*E*)-cinâmico. ....24
- Figura 5 - Reação de esterificação reversível. ....24
- Figura 6 - Cinamatos com atividade nematicida. ....25

### SEGUNDA PARTE

- Figura 1 - Estruturas químicas do A. (*E*)-cinamaldeído e de B. ésteres do ácido (*E*)-cinâmico. ....39
- Figura 2 - Ésteres do ácido (*E*)-cinâmico que foram sintetizados e utilizados no presente trabalho. ....42
- Figura 3 - Análogos das substâncias 13, 14 e 15, com atividades enzimáticas, obtidos no BRENDA. ....49
- Figura 4 - Estruturas químicas de inibidores da histona deacetilase utilizados no presente estudo para o ancoramento ao sítio ativo da enzima. ....52
- Figura 5 - Estruturas químicas de análogos das substâncias 13, 14 e 15, selecionadas por terem os maiores valores de escore de Tanimoto em buscas farmacofóricas feitas no banco de dados ZINC15. ....54
- Figura 6 - Estruturas químicas de análogos das substâncias 13, 14 e 15, selecionadas por terem os maiores valores de escore de Tanimoto em buscas farmacofóricas feitas no banco de dados ZINC15. ....55
- Figura 7 - Efeitos dos ésteres do ácido (*E*)-cinâmico sobre a motilidade e mortalidade de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*. Médias seguidas da mesma letra em barra com a mesma cor, não diferem entre si pelo teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade. As barras de erro correspondem ao desvio padrão. ....56
- Figura 8 - Eclosão de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* acumulada, após exposição dos ovos por 48 h aos compostos 13, 14 e 15. Médias seguidas da mesma letra em barras referentes ao mesmo período de tempo, e no mesmo gráfico, não diferem entre si pelo teste de Scott e Knott a

5% de probabilidade. Os resultados dos dois experimentos (A e B) são apresentados separadamente porque não foi possível atender aos princípios de normalidade e de homocedasticidade para a análise estatística dos dois experimentos em conjunto. As barras de erro correspondem ao desvio padrão.

- .....59
- Figura 9 - Efeito dos ésteres do ácido (*E*)-cinâmico (compostos 13, 14 e 15) sobre a formação de galhas em mudas de tomateiro após 20 dias de inoculação com juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne incognita*. Barras com a mesma letra, no gráfico, não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott e Knott ( $P < 0,05$ ). As barras de erro correspondem ao desvio padrão. ....61
- Figura 10 - Estruturas tridimensionais das conformações com maiores e menores valores de energias para as substâncias A. 13 (melhor conformação azul); B. 14 (melhor conformação verde claro) e C. 15 (melhor conformação verde escuro). .....63
- Figura 11 - Número de estruturas tridimensionais para as proteínas escolhidas (TABELAS 12 e 14), de acordo com busca feita no site do RCSB Protein Data Bank. ....74
- Figura 12 - Estruturas de histonas deacetilases alinhadas à estrutura da 1T64 com valores de RMSD abaixo de 4 Å. ....82
- Figura 13 - Histona deacetilase 1T64 (SOMOZA; SKENE; KATZ; MOL et al., 2004) contendo o inibidor TSN (amarelo) no seu sítio ativo, conforme dados experimentais disponíveis no RCSB Protein Data Bank, e as substâncias 13, 14 e 15 (verde) ancoradas às cegas no mesmo sítio da enzima, através do uso do programa computacional QuickVina-W (HASSAN; ALHOSSARY; MU; KWOH, 2017; TROTT; OLSON, 2010). O íon  $Zn^{2+}$  é mostrado como uma esfera de cor vermelha. ....83
- Figura 14 - Valores de afinidades (Kcal/mol) das substâncias 13, 14 e 15, bem como dos inibidores da histona deacetilase: 7-(4-(dimetilamino)-fenil)-*N*-hidroxi-4,6-dimetil-7-oxo-2,4-heptadienamida (TSN), 4-(dimetilamino)-*N*-(7-(hidroxiamino)-7-oxo-heptil)-benzamida (B3N), *N*-hidroxi-4-(metil-(5-(piridin-2-il)-tien-2-il)-sulfoni)-amino-benzamida (NHB), 3-ciclopentil-*N*-hidroxipropanamida (3YP), 9,9,9-trifluoro-8-oxo-*N*-fenilnonamida (CF3), *N*-fenil-*N'*-hidroxioctanodiamida (SHH), (*E*)-3-(4-(benzilcarbonil)-1-metil-1*H*-pirrol-2-il)-*N*-hidroxipropenamida (AGE), (*E*)-cinamato (ACINA). As afinidades das substâncias pelo sítio ativo das histonas deacetilases foram

calculadas pelo programa computacional QuickVina 2.1 (HANDOKO; OUYANG; SU; KWOH *et al.*, 2012; TROTT; OLSON, 2010). Barras com a mesma letra, no gráfico, não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott e Knott ( $P < 0,05$ ). As barras de erro correspondem ao desvio padrão.... 84

- Figura 15 - Estruturas do inibidor AGE experimentalmente complexado (amarelo) à enzima 3F07 (DOWLING; GANTT; GATTIS; FIERKE *et al.*, 2008) e ancorado (azul) pelo programa computacional na mesma enzima. .... 85
- Figura 16 - Interações do inibidor NHB com o sítio ativo da histona deacetilase 1w22 de acordo com ancoramento feito pelo programa computacional QuickVina 2.1 85
- Figura 17 - Interações da substância 13 com o sítio ativo da histona deacetilase 1w22 de acordo com ancoramento feito pelo programa computacional QuickVina 2.1. 86
- Figura 18 - Interações da substância 14 com o sítio ativo da histona deacetilase 1w22 de acordo com ancoramento feito pelo programa computacional QuickVina 2.1 87
- Figura 19 - Interações da substância 15 com o sítio ativo da histona deacetilase 1w22 de acordo com ancoramento feito pelo programa computacional QuickVina 2.1. 88
- Figura 20 - Valores de afinidades (Kcal/mol) das substâncias 13, 14 e 15, e das seguintes substâncias selecionadas a partir do banco de dados do ZINC15: (A) 6-fluoro-N,3-dimetil-1-benzotiofeno-2-carboxamida, (B) 1-benzotiofeno-2-carboxilato de 2-hidroxietila, (C) (2S)-2-amino-3-oxo-3-fenilpropanoato de metila, (D) (E)-2-(4-clorofenil)etenilsulfonato, (E) (((2E)-3-(4-fluorofenil)but-2-enil)oxi)acetato, (F) (2R)-4-(((2E)-3-(4-clorofenil)prop-2-enil)-oxi)butan-2-ol, (G) 7-cloro-8-metil-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato de metila, (H) (2S)-2-(((2E)-3-(4-clorofenil)prop-2-enil)oxi)propanoato, (I) (2Z)-3-amino-3-fenilprop-2-enoato de etila, (J) N-(3-(((2E)-3-(4-clorofenil)prop-2-enil)oxi)propil)-N,N-dimetilamônio, (K) (2E)-3-(1-oxidopiridina-3-il)prop-2-enoato de metila, (L) (2E)-3-(4-fluorofenil)but-2-enamida, (M) (2E)-(4-metil-2,3-diidro-1H-inden-1-il-iden)etanoato de metila, (N) (2S)-2-((4-bromofenil)carbonil)-3-oxobutanoato de metila, (O) (2E)-3-(clorofenil)-1-(pirrolidin-1-il)prop-2-en-ona, (P) 1H-indol-3-il(oxo)acetato de etila, (Q) 6,8-dicloro-2H-cromeno-3-carboxilato de metila, (R) (1-(4-clorofenil)-3-metoxi-1,3-dioxopropan-2-ilideno]diazénium, (S) (3R)-4-oxo-3,4-diidro-2H-tiocromeno-3-carboxilato de etila, (T) 5-amino-2,3-diidro-1-benzotiofeno-2-carboxilato de etila, (U) 3-(4-(dimetilamino)fenil)propanoato de metila. Tais valores foram calculados pelo programa computacional QuickVina 2.1 para

ancoramentos nos sítios ativos das histonas deacetilases. Barras com a mesma letra, no gráfico, não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott e Knott ( $P < 0,05$ ). As barras de erro correspondem aos desvios padrões. .... 90

Figura 21 - Interações feitas pelos análogos das substâncias 13, 14 e 15 obtidos do banco de dados ZINC15, sobre a enzima histona deacetilase. A. Análogo E; B. Análogo M.  
..... 91

## LISTA DE TABELAS

### SEGUNDA PARTE

- Tabela 1 - Concentrações letais para 50 % (CL50) dos juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*, calculadas para as substâncias 13, 14 e 15, bem como para (*E*)-cinamaldeído, carbofurano e fluensulfona.....57
- Tabela 2 - Valores de energia das conformações obtidas para a substância 13 após busca conformacional por dinâmica molecular (mecânica molecular empregando MMFF94) e subsequente otimização das melhores conformações usando a mecânica quântica (método semi-empírico com o Hamiltoniano PM7)..... 62
- Tabela 3 - Valores de energia das conformações obtidas para a substância 14 após busca conformacional por dinâmica molecular (mecânica molecular empregando MMFF94) e subsequente otimização das melhores conformações usando a mecânica quântica (método semi-empírico com o Hamiltoniano PM7).....62
- Tabela 4 - Valores de energia das conformações obtidas para a substância 15 após busca conformacional por dinâmica molecular (mecânica molecular empregando MMFF94) e subsequente otimização das melhores conformações usando a mecânica quântica (método semi-empírico com o Hamiltoniano PM7)..... 63
- Tabela 5 - Resultados busca farmacofórica no banco de dados do Ligand-Expo, para a substância 13. .... 65
- Tabela 6 - Resultados busca farmacofórica no banco de dados do Ligand-Expo, para a substância 14. .... 66
- Tabela 7 - Resultados busca farmacofórica no banco de dados do Ligand-Expo, para a substância 15. .... 67
- Tabela 8 - Proteínas selecionadas na busca farmacofórica com as conformações das substâncias 13, 14 e 15, cujos ligantes estavam em cavidades da proteína e inibiam a ação da mesma. .... 69
- Tabela 9 - Resultados da busca por sequências de aminoácidos similares às das proteínas selecionadas (TABELA 8), com escores acima de 200, que foi feita pelo emprego dos programas computacionais Blastp 2.10.0+ e Tblastn 2.10.0, no banco de genomas de Nematode (Tax id 6231) do National Center for Biotechnology Information – NCBI..... 70
- Tabela 10 - Enzimas escolhidas após busca no site especializado BRENDA, que eram inibidas por análogos das substâncias 13, 14 e 15. O número de estruturas

	tridimensionais identificadas no RCSB Protein Data Bank, bem como o organismo de origem de cada uma delas, também são apresentados. ....	71
Tabela 11 -	Resultados da busca por sequências de aminoácidos similares às das proteínas selecionadas (TABELA 10), com escores acima de 200, que foi feita pelo emprego dos programas computacionais Blastp 2.10.0+ e Tblastn 2.10.0, no banco de genomas de Nematode (Taxid 6231) do National Center for Biotechnology Information – NCBI.....	72
Tabela 12 -	Substâncias selecionadas na busca farmacofórica com a substância 13, na base de dados ChEMBL do PUBCHEM, com escores de Tanimoto 0,84, que inibem alguma enzima.....	73
Tabela 13 -	Substâncias selecionadas na busca farmacofórica com a substância 14, na base de dados ChEMBL do PUBCHEM, com escores de Tanimoto 0,84, que inibem alguma enzima.....	73
Tabela 14 -	Substâncias selecionadas na busca farmacofórica com a substância 15, na base de dados ChEMBL do PUBCHEM, com escores de Tanimoto 0,84, que inibem alguma enzima.....	74
Tabela 15 -	Resultados da busca por sequências de aminoácidos similares às das proteínas selecionadas, com escores acima de 200, que foi feita pelo emprego dos programas computacionais Blastp 2.10.0+ e Tblastn 2.10.0, no banco de genomas de nematoides (Taxid 6231) do National Center for Biotechnology Information – NCBI. (continua).....	75
Tabela 16 -	Resultados da busca por sequências de aminoácidos similares às das proteínas selecionadas, com escores acima de 200, que foi feita pelo emprego dos programas computacionais Blastp 2.10.0+ e Tblastn 2.10.0+, no banco de genomas de Nematode (Taxid 6231) do National Center for Biotechnology Information – NCBI. (conclusão).....	76
Tabela 17 -	Proteínas com escores, coberturas e identidades acima de 200, 60 % e 28 %, respectivamente, para <i>Caenorhabditis elegans</i> ou para um nematoide fitoparasita. (continua) .....	77
Tabela 18-	Histonas deacetilase semelhantes a 1T64 escolhidas para alinhamento e ancoramento com as substâncias 13, 14, 15 e inibidores testados experimentalmente. ....	81

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE</b>	
1	<b>INTRODUÇÃO</b> ..... 17
2	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> ..... 19
2.1	<i>Meloidogyne spp.</i> ..... 19
2.2	Métodos de controle de <i>Meloidogyne spp.</i> ..... 20
2.3	Atividade nematicida do ( <i>E</i> )-cinamaldeído ..... 20
2.4	Atividade biológica do ( <i>E</i> )-cinamaldeído..... 22
2.5	Síntese do cinamaldeído e de ésteres do ácido ( <i>E</i> )-cinâmico..... 23
2.6	Bioinformática..... 25
2.7	<i>Docking</i> ..... 27
	<b>REFERÊNCIAS</b> ..... 28
	<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGO*</b> ..... 35
	<b>ARTIGO 1 ÉSTERES DO ÁCIDO (<i>E</i>)-CINÂMICO E HISTONA DEACETILASE PARA O DESENVOLVIMENTO DE NOVOS PRODUTOS PARA O CONTROLE DE <i>Meloidogyne incognita</i></b> ..... 36
1	<b>INTRODUÇÃO</b> ..... 38
2	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b> ..... 41
2.1	Síntese de ésteres do ácido ( <i>E</i> )-cinâmico..... 41
2.2	Inóculo de <i>M. incognita</i> ..... 43
2.3	Motilidade e mortalidade <i>in vitro</i> de J2 de <i>M. incognita</i> expostos a ésteres do ácido ( <i>E</i> )-cinâmico ..... 43
2.4	Concentração letal de ésteres do ácido ( <i>E</i> )-cinâmico para 50 %(CL <sub>50</sub> ) dos J2 de <i>M. incognita</i> . ..... 44
2.5	Influência de ésteres do ácido ( <i>E</i> )-cinâmico sobre a eclosão de J2 de <i>M. incognita</i> . ..... 44
2.6	Efeito de ésteres do ácido ( <i>E</i> )-cinâmico sobre <i>M. incognita</i> em tomateiros inoculados com J2 do nematoide. .... 45
2.7	Análise estatística para experimentos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> . ..... 46
2.8	Estudo <i>in silico</i> : buscas conformacionais para as substâncias 13, 14 e 15..... 47
2.9	Seleção de potenciais alvos proteicos a partir de busca farmacofórica no banco de dados do ligand Expo..... 47

2.10	Seleção de potenciais alvos proteicos a partir de busca farmacofórica no banco de dados do BRENDA para as substâncias 13, 14 e 15 e seus análogos.....	48
2.11	Seleção de potenciais alvos proteicos a partir de busca farmacofórica no banco de dados do ChEMBL para a seleção de potenciais alvos enzimáticos.....	49
2.12	Seleção de estruturas tridimensionais da histona deacetilase (HDAC) .....	50
2.13	Identificação do sítio de ligação das substâncias 13, 14 e 15 na histona deacetilase. ....	51
2.14	Ancoramentos ( <i>docking</i> ) no sítio da histona deacetilase. ....	51
2.15	Busca por análogos das substâncias 13, 14 e 15 que possam ligar-se mais fortemente à enzima histona deacetilase.....	53
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	56
3.1	Motilidade e mortalidade <i>in vitro</i> de J2 de <i>M. incognita</i> expostos a ésteres do ácido ( <i>E</i> )-cinâmico. ....	56
3.2	Concentração letal de ésteres do ácido ( <i>E</i> )-cinâmico para 50 % (CL <sub>50</sub> ) dos J2 de <i>M. incognita</i> .....	57
3.3	Influência de ésteres do ácido ( <i>E</i> )-cinâmico sobre a eclosão de J2 de <i>M. incognita</i> .....	58
3.4	Efeito de ésteres do ácido ( <i>E</i> )-cinâmico sobre <i>M. incognita</i> em tomateiros inoculados com J2 do nematoide. ....	60
3.5	Estudo <i>in silico</i> : busca conformacional para as substâncias 13, 14 e 15.....	61
3.6	Busca farmacofórica no banco de dados do Ligand Expo para a seleção de potenciais alvos enzimáticos.....	64
3.7	Busca de atividades biológicas para as substâncias 13, 14 e 15 e seus análogos no BRENDA. ....	70
3.8	Busca farmacofórica no banco de dados do ChEMBL para a seleção de potenciais alvos enzimáticos.....	72
3.9	Seleção de estruturas tridimensionais da histona deacetilase (HDAC) .....	80
3.10	Ancoramentos ( <i>docking</i> ) nos sítios da histona deacetilase. ....	83
3.11	Análogos das substâncias 13, 14 e 15 que possam ligar-se mais fortemente à enzima histona deacetilase.....	89
4	CONCLUSÕES .....	93
	REFERÊNCIAS .....	94



## **PRIMEIRA PARTE**

## 1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), a produção de alimentos é uma constante preocupação, pois a população mundial deverá chegar a mais de 10 bilhões de pessoas no ano de 2050 (BRUINSMA, 2017). Em decorrência disto, é de grande importância maximizar a produtividade agrícola em geral. Para tanto, uma das abordagens a serem empregadas diz respeito ao controle mais eficiente de pragas e doenças de plantas, evitando, por exemplo, a contaminação do ambiente com substâncias de elevada toxicidade, como é o caso de vários nematicidas químicos (NGALA et al., 2016). Este é um grande desafio para os pesquisadores e para as multinacionais responsáveis pelo desenvolvimento de novos agroquímicos de alta eficácia e de baixo impacto ambiental. Para se alcançar sucesso em tal desenvolvimento, faz-se necessário o emprego de diversas ferramentas, dentre as quais se pode mencionar os estudos fitoquímicos, que permitem isolar e identificar substâncias bioativas de origem vegetal (TOLEDO et al., 2003), que podem servir como base para o desenho e síntese racional de novos compostos com características químicas e atividades biológicas melhoradas (DU VIVANT, 2016).

Outro exemplo de ferramenta útil para o desenvolvimento de novos produtos é a bioinformática, através da qual é possível, por exemplo, identificar os alvos enzimáticos de diferentes moléculas orgânicas, o que é de grande valia para os aperfeiçoamentos das estruturas químicas das moléculas com vistas a maximizar seus efeitos biológicos desejados e minimizar os indesejados (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010).

Dentre os agentes fitopatogênicos que causam perdas na produção agrícola mundial se encontram os nematoides parasitas de plantas, que são organismos do filo Nematoda. São caracterizados como parasitas alongados, dentre os quais se encontram aqueles do gênero *Meloidogyne*, que causam grandes perdas na qualidade e produtividade de diversas culturas (TOCCO et al., 2017). Em grande parte, isto se deve ao fato destes fitoparasitas possuírem vários hospedeiros na natureza. No mencionado gênero se encontra a espécie *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood, que pode parasitar grande diversidade de plantas (DE MOURA, 2018).

O principal método de controle destes fitoparasitas consiste no uso de nematicidas químicos, que tendem a apresentar alta toxicidade para o homem e ambiente em geral (ARAUJO; BRAGANTE; BRAGANTE, 2012). Logo, faz-se necessário o desenvolvimento de novos produtos e/ou métodos para o controle de fitonematoídeos. Para tanto, uma das

possibilidades consiste em utilizar os metabólitos de plantas como modelos para a obtenção de substâncias mais eficientes (SILVA, 2011). Para exemplificar, é possível citar a espécie vegetal *Cinnamomum cassia* (L.) J. Presl., cujo óleo essencial é composto principalmente por (*E*)-cinamaldeído. Em testes realizados *in vitro* e *in vivo*, observou-se que tal substância é tão ativa contra *M. incognita* quanto nematicidas comerciais como o carbofuran (metilcarbamato de 2,2-dimetil-2,3-diidro-1-benzofuran-7-ila) (JARDIM et al., 2018). Entretanto, esta substância apresenta problemas de baixa persistência no ambiente, o que é atribuído a sua susceptibilidade à oxidação, o que resulta na formação do ácido (*E*)-cinâmico (LOPEZ-SERNA; ERNST; WU, 2016).

Em decorrência do exposto acima, o presente trabalho teve como objetivo geral selecionar ésteres do ácido (*E*)-cinâmico para o desenvolvimento de novos produtos ativos contra *M. incognita* em tomateiros. Para tanto, os objetivos específicos foram: a) selecionar ésteres do ácido (*E*)-cinâmico ativos *in vitro* contra juvenis do segundo estágio (J2) de *M. incognita*; b) averiguar o efeito dos ésteres selecionados sobre a eclosão do J2 do nematoide anteriormente mencionado; c) avaliar o efeito dos ésteres selecionados sobre o nematoide em mudas de tomateiro; d) identificar *in silico* o alvo proteico dos ésteres do ácido (*E*)-cinâmico ativos contra *M. incognita* em mudas de tomateiro.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Meloidogyne* spp.

Os nematoides são animais do filo Nematoda, com formatos cilíndricos e alongados, sendo vários deles de grande impacto econômico na agricultura moderna. Dentre tais animais se encontram os nematoides de galhas (*Meloidogyne* spp.), que estão entre os mais danosos para as plantas cultivadas. Vários autores atribuem diferentes percentagens de perdas na produção agrícola mundial a tais fitoparasitas que podem variar de acordo com a cultura. (TOCCO et al., 2017).

Mais de 100 espécies são conhecidas no gênero *Meloidogyne*, sendo as de maior impacto econômico: *M. javanica*, *M. incognita*, *M. arenaria* e *Meloidogyne hapla* Chitwood (MUNIF; HALLMANN; SIKORA, 2013). A arquitetura genômica plástica de *Meloidogyne* spp., bem como a reprodução assexuada, contribuem para que estes organismos se adaptem a diferentes agroecossistemas (CASTAGNONE-SERENO; DANCHIN, 2014).

Especificamente no caso de *M. incognita*, observa-se aproximadamente 2000 espécies de plantas hospedeiras (CHITWOOD, 1951; TERRA et al., 2018). Dos seus ovos eclodem os juvenis do segundo estágio (J2), que penetram nas raízes da planta hospedeira, para modificarem as células vegetais. Graças a vários ciclos de divisão nuclear da célula vegetal sem citocinese, formam-se células gigantes multinucleadas e hipertróficas, com até 100 vezes o tamanho normal das células da raiz. Tais células fornecem os nutrientes necessários para o desenvolvimento do parasita (KYNDT et al., 2013).

As culturas afetadas por *Meloidogyne* spp. apresentam diminuição no crescimento vegetal, pois têm deficiências de absorção de nutrientes, afetando diretamente a produtividade (JONES et al., 2017). Além disso, estes fitoparasitas podem quebrar a resistência da planta a pragas e outros patógenos, o que aumenta ainda mais a perda na produção (MUKHTAR; KAYANI; HUSSAIN, 2013).

Para exemplificar a importância do gênero *Meloidogyne* spp., pode-se mencionar diferentes pesquisas contendo dados interessantes destes fitonematoides (BRIDGE; STARR, 2007; KHAN, 2008; PERRY; MOENS; STARR, 2009; SIKORA, 2018).

## 2.2 Métodos de controle de *Meloidogyne* spp.

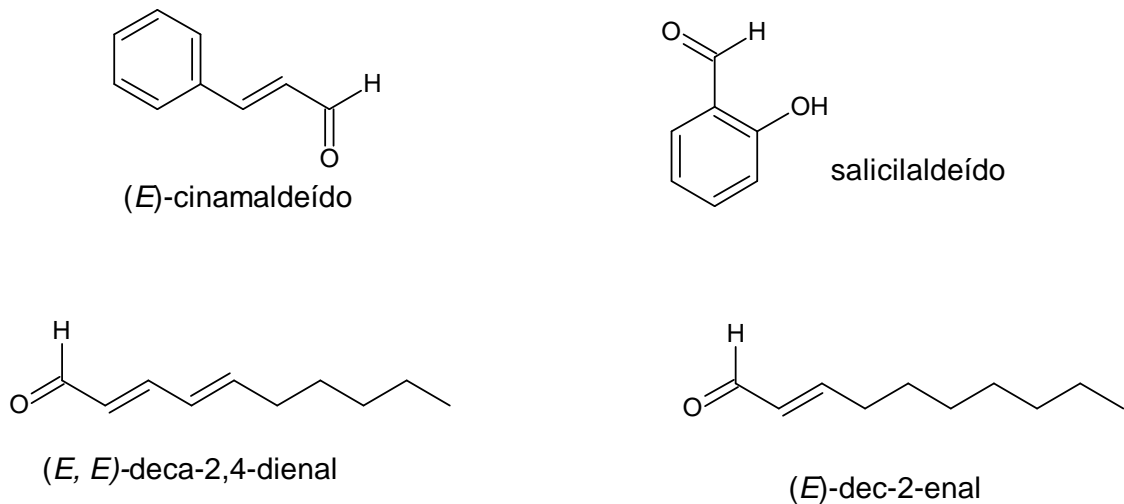
Atualmente, existem diferentes métodos de controle de fitonematoides, tais como: rotação de culturas, uso de cultivares resistentes a nematoides e controle biológico com microrganismos. Há também os nematicidas químicos que, apesar dos indesejáveis impactos ambientais, são os mais empregados em diversas culturas (NILE et al., 2017). Consequentemente, há uma demanda por novos produtos para o controle de *Meloidogyne* spp., com menores impactos ambientais indesejados. Para atender a esta demanda, vários pesquisadores têm trabalhado no desenvolvimento de novos nematicidas. Em decorrência, nos últimos anos surgiram diferentes propostas de controle ambientalmente amigável: micorrizas arbusculares (VOS et al., 2013); extratos de plantas como *Terminalia nigrovenulosa* (Pierre) Laness (NGUYEN et al., 2013) e *Piper nigrum* L. (NILE et al., 2017); componentes voláteis de espécies vegetais como *Brassica juncea* (L) Czern., *Azadirachta indica* (A). Juss., *Canavalia ensiformis* (L) DC., *Mucuna pruriens* (L) DC. e *Cajanus cajan* (L) Millsp. (BARROS et al., 2014); algas como *Ecklonia maxima* (Osbeck) Papenfuss. e *Ascophyllum nodosum* L. (NGALA et al., 2016); e microrganismos biocontroladores como *Verticillium clamydosporium* Nees (ZAKARIA et al., 2013), *Lecanicillium muscarium* (Petch) Zare & W. Gams (HUSSAIN; ZOUHAR; RYŠÁNEK, 2018) e *Bacillus* sp.(COLAGIERO; ROSSO; CIANCIO, 2018).

## 2.3 Atividade nematicida do (*E*)-cinamaldeído

A grande diversidade de plantas no nosso planeta fornece um banco incalculável de recursos químicos (NAZ et al., 2016), sendo vários deles com propriedades biocidas (ROCHA et al., 2017). É possível encontrar vários trabalhos inovadores com moléculas orgânicas de origens vegetais como as chalconas, haloacetofenonas, derivados de ligustrazina, flavonoides e protopinium (CUNNINGHAM; EDWARDS, 2008; KROHN; STEINGRÖVER; SRINIVASA RAO, 2002; NAZ et al., 2016; NGUYEN et al., 2013; TOCCO et al., 2017; ZOU et al., 2018), dentre as quais cabe mencionar aquelas com carbonilas aldeídicas. Este é o caso, por exemplo, do (*E,E*)-deca-2,4-dienal e (*E*)-dec-2-enal (FIGURA 1), que apresentaram alta efetividade no controle de nematoides de galhas. Embora o modo exato de ação destas substâncias ainda não esteja determinado, acredita-se que atuem na glicação da cutícula externa do nematoide. Além disso, é possível que inibam a enzima V-ATPase, fazendo com

que o nematoide fique paralisado e, eventualmente, morra (CABONI et al., 2013). Neste mesmo trabalho observou-se a atividade do salicilaldeído e (*E*)-cinamaldeído (FIGURA 1) contra *M. incognita*.

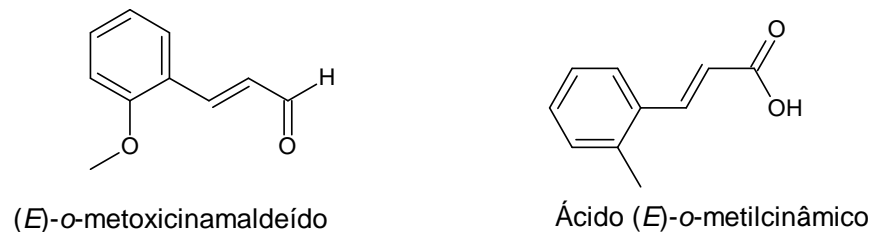
Figura 1 - Estruturas químicas de aldeídos com propriedades nematocidas.



Fonte: Do autor (2020).

No caso específico do (*E*)-cinamaldeído e derivados, observou-se também, que havia atividade contra o nematoide parasita de plantas *B. xylophilus*. Dentre as substâncias estudadas a mais ativa era o próprio (*E*)-cinamaldeído (FIGURA 1), seguido pelo (*E*)-*o*-metoxicinamaldeído e o ácido (*E*)-cinâmico (FIGURA 2) (HAMIDPOUR et al., 2015).

Figura 2 - Estruturas químicas de análogos do (*E*)-cinamaldeído com atividade contra o nematoide *Bursaphelenchus xylophilus*.



Fonte: Do autor (2020).

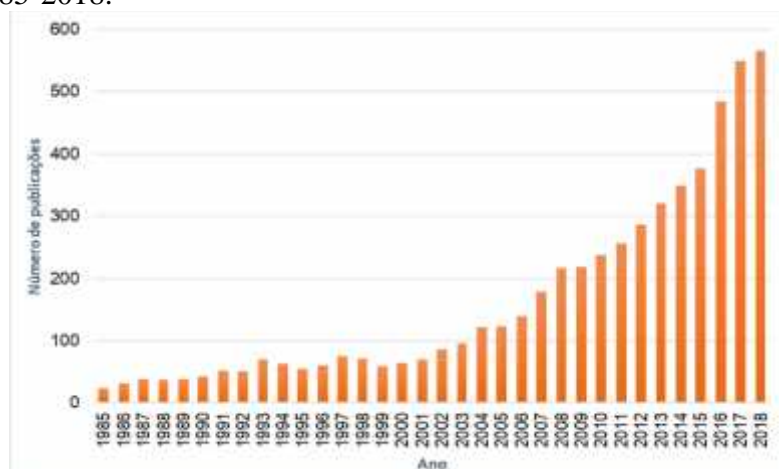
Recentemente, observou-se que o óleo essencial de *Cinnamomum cassia* (L.) J. Presl era altamente ativo contra *M. incognita*, já que na concentração de  $62 \mu\text{g mL}^{-1}$  causou 100% de mortalidade dos J2 do nematoide, enquanto o nematocida comercial carbofuran, nas

mesmas condições, causou mortalidade de 63% na concentração de 173  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . O principal componente do referido óleo era o (*E*)-cinamaldeído, que acarretou mortalidade de 97% na concentração de 52  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Em experimentos com tomateiros infectados com *M. incognita*, este aldeído se mostrou tão eficiente no controle do nematoide quanto o carbofuran ou o fumigante comercial dazomet (3,5-dimetil-1,3,5-tiadiazinano-2-tiona), que se decompõe em isotiocianato de metila quando em contato com a umidade do solo (JARDIM et al., 2018). Embora este trabalho tenha permitido observar que o (*E*)-cinamaldeído tem grande potencial para uso como nematicida fumigante, não foi possível resolver o problema da sua baixa persistência no solo.

#### 2.4 Atividade biológica do (*E*)-cinamaldeído

Há vários relatos de atividades biológicas para o (*E*)-cinamaldeído e análogos. Por exemplo, a capacidade de inibir bactérias e fungos (SHREAZ et al., 2016). Também se observou que compostos cinâmicos podem participar nas sínteses de inibidores angiogênicos, o que pode contribuir para evitar a formação de novos vasos sanguíneos e, conseqüentemente, de tumores. Aparentemente, a função aldeído desempenha um papel crítico para esta atividade. Além disso, verificou-se que o (*E*)-2'-hidroxicinamaldeído inibe a farnesil transferase, que é uma das principais enzimas para desencadear a formação de tumores (KWON et al., 1997). Também é possível mencionar que o (*E*)-cinamaldeído pode interromper a cascata oxidativa e inflamatória em células cerebrais, contribuindo para minimizar os efeitos da doença de Alzheimer (MOMTAZ et al., 2018). Em decorrência, houve um grande incremento no número de investigações sobre este aldeído e seus derivados desde o ano de 2008. Em pesquisas na base de dados Web of Science ([www.webofknowledge.com](http://www.webofknowledge.com)), utilizando-se o termo 'cinnamaldehyde', tal incremento fica evidente, principalmente nos últimos 18 anos (ANALYTICS, 2019) (FIGURA 3).

Figura 3 - Publicações na base de dados Web of Science com o termo 'cinnamaldehyde'. 1985-2018.



Fonte: Do autor (2020).

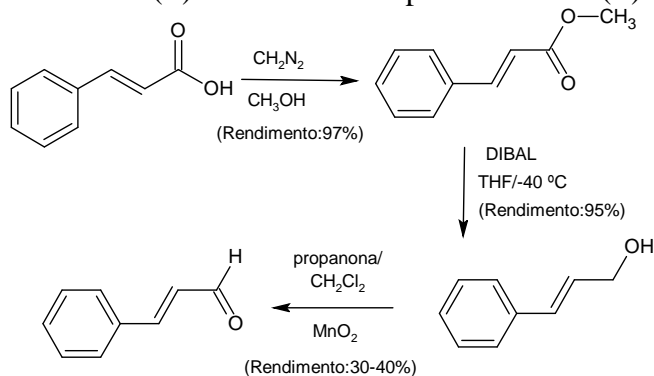
Consequentemente, foram desenvolvidos vários métodos para a síntese de substâncias análogas do (*E*)-cinamaldeído, cujas atividades nematocidas ainda não foram estudadas. Como várias delas são bem mais estáveis que o referido aldeído, é possível que possam apresentar maiores persistências no solo, resolvendo o principal empecilho para a utilização comercial do (*E*)-cinamaldeído como nematocida.

## 2.5 Síntese do cinamaldeído e de ésteres do ácido (*E*)-cinâmico

Diferentes autores concordam que o melhor precursor para a obtenção do cinamaldeído propriamente dito é o ácido cinâmico, o qual permite reações de alquilação e esterificação para a introdução de possíveis farmacóforos. Uma possibilidade diz respeito à metilação do ácido (*E*)-cinâmico com diazometano ( $\text{CH}_2\text{N}_2$ ), seguida de redução com hidreto de diisobutilalumínio (DIBAL). O álcool formado é, então, oxidado ao aldeído com dióxido de manganês ( $\text{MnO}_2$ ) (KWON; LEE; CHO; BOK *et al.*, 1997) (FIGURA 4).



Figura 4 - Síntese do (*E*)-cinamaldeído a partir do ácido (*E*)-cinâmico.

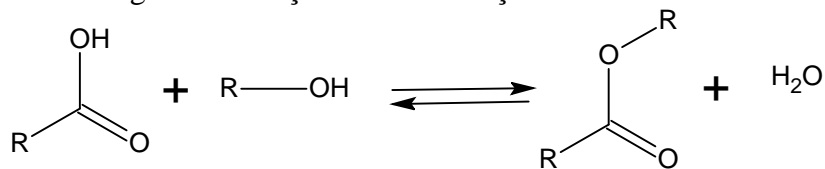


Fonte: Do autor (2020).

Existe um importante uso do ácido cinâmico como precursor de compostos anticancerígenos, porém, seus ésteres e amidas ainda são subutilizados, mesmo sendo compostos citotóxicos, antiproliferativos, antileucêmicos, inibidores de diferentes enzimas como a transglutaminase, aminopeptinase N, histona deacetilase, entre outras. A maioria dos ácidos cinâmicos, seus ésteres, amidas, aldeídos e álcoois, mostraram forte inibição do crescimento de várias espécies de fungos e bactérias. Acredita-se que tais atividades sejam decorrentes de: *i*) substituição no anel aromático, *ii*) adição à insaturação na posição em relação à carboxila *iii*) ou reação com a carboxila (DE; BALTAS; BEDOS-BELVAL, 2011; GUZMAN, 2014).

Os ésteres do ácido cinâmico são referenciados genericamente como cinamatos e podem ser obtidos facilmente pela reação do ácido carboxílico com álcoois em meio ácido (FIGURA 5), o que é genericamente conhecido como esterificação de Fischer (FISCHER; SPEIER, 1895).

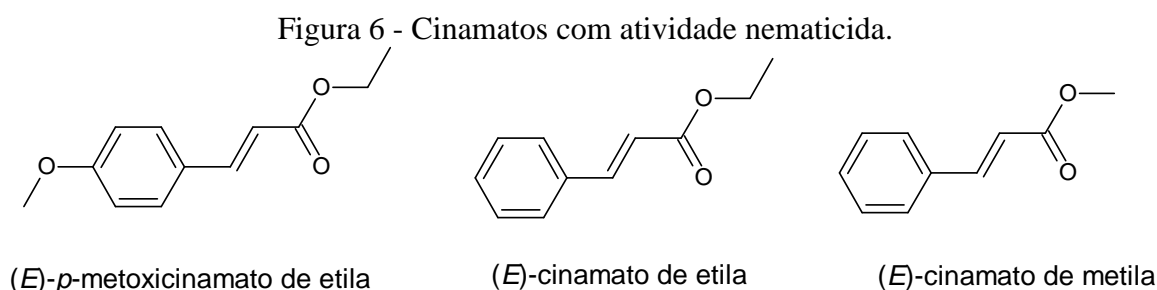
Figura 5 - Reação de esterificação reversível.



Fonte: Do autor (2020).

Alguns autores reportaram a síntese de ésteres do ácido cinâmico com potencial alelopático (ESPINDOLA et al., 2012), antimicrobiano (GOMES et al., 2015), antioxidante, antiviral e nutracêutico (CHAVES-ULATE; ESQUIVEL-RODRIGUEZ, 2019). Além disso, há relatos de ésteres do ácido cinâmico com atividade contra doenças mortais como a tuberculose, malária e doenças cardiovasculares (DE BEDOS-BELVAL et al., 2012).

No que diz respeito à atividade nematicida, cabe mencionar as atividades do (*E*)-*p*-metoxicinamato de etila e (*E*)-cinamato de etila (FIGURA 6), contidos no óleo essencial da planta *Kaempferia galanga* L., contra o nematoide *Heterodera avenae* Wollenweber, com concentrações letais para 50 % da população do nematoide (CL<sub>50</sub>) iguais a 83,0 e 100,6 µg/mL, respetivamente (LI; JI; LI; ZHANG *et al.*, 2017). Tais ésteres também foram ativos contra o nematoide *B. xylophilus*, causando 100% de mortalidade do nematoide na concentração de 60 µg/mL (JU-YONG *et al.*, 2006). De forma análoga, foi reportada a atividade nematicida do (*E*)-cinamato de metila (Figura 6), contido no óleo da planta *Alpinia galanga* (L.) Willd., sobre *M. hapla* (JEON; KO; KIM; LEE, 2016).



Fonte: Do autor (2020).

## 2.6 Bioinformática

O rápido desenvolvimento das ciências computacionais durante os últimos anos tem favorecido o surgimento de novas áreas de estudos, o que promoveu avanços importantes na descoberta de novos medicamentos, aumento da produtividade agrícola e na otimização de processos industriais. Graças aos avanços computacionais foi possível, por exemplo, aumentar a geração de dados através da biologia molecular que, para o uso adequado de tecnologias genômicas, demanda métodos de armazenamento, organização, indexação, visualização e análise dos dados gerados. Em decorrência, nasceu a bioinformática, que hoje é uma ciência interdisciplinar, que inclui outras ciências como a química, matemática e a estatística (PAL; BANDYOPADHYAY; RAY, 2005).

São várias as ferramentas desenvolvidas pela bioinformática. Elas permitem, por exemplo, alinhar e comparar sequências de DNA, RNA e proteínas; construir árvores filogenéticas; prever as estruturas de DNA e RNA; classificar e prever as estruturas de proteínas; estudar as interações entre moléculas orgânicas pequenas e macromoléculas como as proteínas, DNA e RNA (PAL; BANDYOPADHYAY; RAY, 2005). Em grande parte, tais

ferramentas têm sido utilizadas com o objetivo principal de desenvolver produtos biologicamente ativos, principalmente para uso medicinal. Em outras palavras, observa-se que é comum a indústria farmacêutica utilizar a modelagem molecular como estratégia de planejamento racional de novos medicamentos (PATRICK, 2013).

Para o desenvolvimento de produtos biologicamente ativos, é de grande importância entender a especificidade na formação de complexos entre biomacromoléculas e compostos bioativos endógenos ou exógenos, pois isso permite explicar as finas interações droga-receptor e suas relações estruturais (ELIEL; WILEN, 2008). Além disso, é possível realizar simulações teóricas de dinâmica molecular, que permitem avaliar várias características das macromoléculas (SOTOMAYOR; SCHULTEN, 2007).

Os cálculos das interações entre átomos e moléculas podem ser realizados com o emprego de várias teorias. É possível, por exemplo, empregar a mecânica molecular (BURKERT, 1982), da qual fazem uso vários programas computacionais, como é o caso do AMBER (CASE *et al.*, 2005), CHARM (ZAKI; HSIAO, 2002), GROMACS (LINDAHL; HESS; VAN DER SPOEL, 2001), NAMD (PHILLIPS *et al.*, 2005) etc. Em todos estes casos a base é a equação de Hooke para osciladores harmônicos, que sofre várias modificações parametrizadas com o objetivo de refletir os dados experimentais (COELHO *et al.*, 1999).

Há também a mecânica quântica, que tem sua base na equação de Schrödinger (KOSLOFF; KOSLOFF, 1983). Em linhas gerais, os cálculos de mecânica quântica podem ser feitos de duas formas: método *ab initio*, que resolve a equação, sem substituir qualquer um dos seus membros por dados experimentais; e o semi-empírico, que substitui membros da equação por dados experimentalmente obtidos, fazendo com o que o tempo de cálculo seja drasticamente reduzido (SZABO; OSTLUND, 2012). Para exemplificar os programas que fazem uso do método *ab initio*, é possível citar: GAMESS (BODE; GORDON, 1998), GAUSSIAN (SCHLEGEL *et al.*, 2001) e ORCA (NEESE, 2008). Dentre aqueles que fazem uso do método semi-empírico, pode-se citar o AMPAC (LUZHKOV; WARSHEL, 1992) e MOPAC (STEWART, 1989).

Os estudos *in silico*, utilizando a bioinformática, revolucionaram a maneira de ver a experimentação, já que forneceram mais uma potente ferramenta para avaliar e desenhar novas estruturas químicas bioativas (LIU *et al.*, 2013) (RODRIGUES, 2001), construir e propor rotas biosintéticas que ainda não eram conhecidas pelos métodos experimentais tradicionais (SATO; SAITO; YAMAZAKI, 2019), desenhar testes toxicológicos (RAUNIO, 2011), planejar a remediação ambiental (LIU *et al.*, 2018) etc.

## 2.7 Docking

Dentre as várias técnicas disponíveis na bioinformática, cabe destacar o *docking* ou ancoramento molecular que, em linhas gerais, consiste em calcular como duas moléculas interagem para a formação de um complexo estável (KITCHEN, 2004). Exemplos de programas computacionais disponíveis para a realização de *docking* são: Autodock (GOODSELL; MORRIS; OLSON, 1996), Plants (KORB; STUTZLE; EXNER, 2009) e Paradocks (MEIER et al., 2010).

O *docking* é de grande valia para estudar as interações entre ligantes e proteínas, predizendo a orientação conformacional mais favorável do ligante e o valor da energia do complexo. Este método teórico pode ser muito útil para a síntese racional de substâncias mais ativas do que a estrutura química inicial (HUANG et al., 2015). Também pode ser empregado na avaliação de milhares de moléculas com potencial eficácia, a baixos custos e em pouco tempo (FESTING, 1994), sendo altamente valorado no descobrimento e desenvolvimento de drogas na indústria farmacêutica (SLIWOSKI et al., 2014).

Durante as últimas décadas, o número de artigos utilizando a técnica de *docking* tem aumentado drasticamente, embora existam algumas preocupações sobre o nível de confiabilidade do ancoramento final, já que muitos compostos podem mostrar grandes afinidades no ancoramento, mas falhas na simulação da dinâmica molecular; sendo motivos de cuidado durante a realização do ancoramento (GUPTA; SHARMA; KUMAR, 2018).

Alguns exemplos de sucesso do uso do *docking* no desenvolvimento de medicamentos são: Captopril (capoten®), Dorzolamide (Trusopt®), Saquinavir (invirase®), Zanamivir (Relenza®), Aliskiren (Tekturna®), Boceprevir (Schering®) e Nilotrexed diidrochloride (Thymitaq®) (TALELE; KHEDKAR; RIGBY, 2010).

## REFERÊNCIAS

- ANALYTICS, C. **Web of science**. Disponível em: <www.webofknowledge.com>. Acesso em: 11 nov. 2019.
- ARAÚJO, F. F. D.; BRAGANTE, R. J.; BRAGANTE, C. E. Controle genético, químico e biológico de meloidoginose na cultura da soja. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 42, n. 2, p. 220-224, jun. 2012.
- BALDIN, E. L. L.; WILCKEN, S. R. S.; PANNUTI, L. E. D. R.; SCHLICK-SOUZA, E. C. *et al.* Use of botanical extracts, cassava wastewater and nematicide for the control of root-knot nematode on carrot. **Summa Phytopathologica**, v. 38, n. 1, p. 36-41, mar. 2012.
- BARROS, A. F.; CAMPOS, V. P.; DA SILVA, J. C. P.; PEDROSO, M. P. *et al.* Nematicidal activity of volatile organic compounds emitted by Brassica juncea, Azadirachta indica, Canavalia ensiformis, Mucuna pruriens and Cajanus cajan against Meloidogyne incognita. **Applied Soil Ecology**, v. 80, p. 34-43, 2014.
- BODE, B. M.; GORDON, M. S. Macmolplt: a graphical user interface for GAMESS. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 16, n. 3, p. 133-138, 1998.
- BRUINSMA, J. **World agriculture: towards 2015/2030 an FAO study**. Routledge, 2017.
- BURKERT, U. **Molecular mechanics**. ACS monograph 177, 1982.
- CABONI, P.; SABA, M.; TOCCO, G.; CASU, L. *et al.* Nematicidal activity of mint aqueous extracts against the root-knot nematode Meloidogyne incognita. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 41, p. 9784-9788, 2013.
- CASE, D. A.; CHEATHAM III, T. E.; DARDEN, T.; GOHLKE, H. *et al.* The Amber biomolecular simulation programs. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, n. 16, p. 1668-1688, jan. 2005.
- CASTAGNONE-SERENO, P.; DANCHIN, E. G. J. Parasitic success without sex - the nematode experience. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 27, n. 7, p. 1323-1333, 2014.
- CHAVES-ULATE, E. C.; ESQUIVEL-RODRIGUEZ, P. Chlorogenic acids present in coffee: antioxidant and antimicrobial capacity. **Agronomia Mesoamericana**, v. 30, n. 1, p. 299-311, jan./apr. 2019.
- CHITWOOD, B. G. ROOT-KNOT NEMATODES .2. QUANTITATIVE RELATIONS OF THE ROOT-KNOT NEMATODE - MELOIDOGYNE-HAPLA CHITWOOD, 1949 WITH TOMATOES, ONIONS AND LIMA BEANS. **Plant and Soil**, v. 3, n. 1, p. 47-50, 1951.
- COELHO, L. W.; JUNQUEIRA, G. M. A.; HERRERA, J. O. M.; MACHADO, S. D. P. *et al.* Aplicação de mecânica molecular em química inorgânica. **Química Nova**, v. 22, n. 3, p. 396-404, 1999.

COLAGIERO, M.; ROSSO, L. C.; CIANCIO, A. Diversity and biocontrol potential of bacterial consortia associated to root-knot nematodes. **Biological Control**, v. 120, p. 11-16, jan. 2018.

CUNNINGHAM, O. D.; EDWARDS, R. Modifying the acylation of flavonols in *Petunia hybrida*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 10, p. 2016-2021, 2008.

DE MOURA, R. M. O gênero meloidogyne e a meloidoginose parte iii-resenha histórica. In: ACADEMIA PERNAMBUCANA DE CIÊNCIA AGRONÔMICA, **Anais...** v.13, p. 93-144, 2018.

DE, P.; BALTAS, M.; BEDOS-BELVAL, F. Cinnamic acid derivatives as anticancer agents-a review. **Current medicinal chemistry**, v. 18, n. 11, p. 1672-1703, 2011.

DE, P.; BEDOS-BELVAL, F.; VANUCCI-BACQUE, C.; BALTAS, M. Cinnamic acid derivatives in tuberculosis, malaria and cardiovascular diseases-a review. **Current Organic Chemistry**, v. 16, n. 6, p. 747-768, 2012.

DU VIVANT, E. D. C. **Avaliação estrutural e funcional de novos peptídeos antimicrobianos obtidos a partir de desenho racional**. 2016.

ELIEL, E. L.; WILEN, S. H. **Stereochemistry of organic compounds**. John Wiley & Sons, 2008.

ESPINDOLA, J. A. A.; CARVALHO, G. J. A. D.; RODRIGUES, E. P.; CARVALHO, M. G. D. *et al.* Potencial alelopático de ésteres derivados do ácido cinâmico. **Floresta e Ambiente**, v. 13, n. 1, p. 53-60, 2012.

FESTING, M. F. W. Reduction of animal use: experimental design and quality of experiments. **Laboratory Animals**, v. 28, n. 3, p. 212-221, 1994.

GOMES, P. H.; SÁ, C. R.; DE ARAÚJO, M. F. Ésteres Derivados dos Ácidos Cinâmico e p-Cumárico Candidatos a Agentes Antimicrobianos. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA, 20., 2015, Rio de Janeiro. Anais...Rio de Janeiro, 08 a 10 jun. 2015.

GOODSELL, D. S.; MORRIS, G. M.; OLSON, A. J. Automated docking of flexible ligands: applications of AutoDock. **Journal of Molecular Recognition**, v. 9, n. 1, p. 1-5, 1996.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos avançados**, v. 24, n. 70, p. 81-98, 2010.

GUPTA, M.; SHARMA, R.; KUMAR, A. Docking techniques in pharmacology: How much promising? **Computational biology and chemistry**, v. 76, p. 210-217, 2018.

GUZMAN, J. D. Natural cinnamic acids, synthetic derivatives and hybrids with antimicrobial activity. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 19292-19349, 2014.

HAMIDPOUR, R.; HAMIDPOUR, M.; HAMIDPOUR, S.; SHAHLARI, M. Cinnamon from the selection of traditional applications to its novel effects on the inhibition of angiogenesis in cancer cells and prevention of Alzheimer's disease, and a series of functions such as antioxidant, anticholesterol, antidiabetes, antibacterial, antifungal, nematicidal, acaracidal, and repellent activities. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 5, n. 2, p. 66-70, jan. 2015.

HUANG, S.-Y.; LI, M.; WANG, J.; PAN, Y. HybridDock: a hybrid protein–ligand docking protocol integrating protein-and ligand-based approaches. **Journal of chemical information and modeling**, v. 56, n. 6, p. 1078-1087, 2015.

HUSSAIN, M.; ZOUHAR, M.; RYŠÁNEK, P. Suppression of meloidogyne incognita by the entomopathogenic fungus lecanicillium muscarium. **Plant Disease**, v. 102, n. 5, p. 977-982, 2018.

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

JEON, J.-H.; KO, H.-R.; KIM, S.-J.; LEE, J.-K. Chemical compositions and nematicidal activities of essential oils on Meloidogyne hapla (Nematoda: Tylenchida) under laboratory conditions. **The Korean Journal of Pesticide Science**, v. 20, n. 1, p. 30-34, 2016.

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

JU-YONG, P.; IN-HO, C.; IL-KWON, P.; SANG-CHUL, S. Nematicidal activity of medicinal plant extracts and two cinnamates isolated from Kaempferia galanga L. (Proh Hom) against the pine wood nematode, Bursaphelenchus xylophilus. **Nematology**, v. 8, n. 3, p. 359-365, 2006.

KITCHEN, D. B.; DECORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature reviews Drug discovery**, v. 3, n. 11, p. 935, 2004.

KORB, O.; STUTZLE, T.; EXNER, T. E. Empirical scoring functions for advanced protein–ligand docking with PLANTS. **Journal of chemical information and modeling**, v. 49, n. 1, p. 84-96, 2009.

KOSLOFF, D.; KOSLOFF, R. A Fourier method solution for the time dependent Schrödinger equation as a tool in molecular dynamics. **Journal of Computational Physics**, v. 52, n. 1, p. 35-53, 1983.

KROHN, K.; STEINGRÖVER, K.; SRINIVASA RAO, M. Isolation and synthesis of chalcones with different degrees of saturation. **Phytochemistry**, v. 61, n. 8, p. 931-936, jan. 2002.

KWON, B.-M.; LEE, S.-H.; CHO, Y.-K.; BOK, S.-H. *et al.* Synthesis and biological activity of cinnamaldehydes as angiogenesis inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 7, n. 19, p. 2473-2476, jul. 1997.

KYNDT, T.; VIEIRA, P.; GHEYSEN, G.; DE ALMEIDA-ENGLER, J. Nematode feeding sites: Unique organs in plant roots. **Planta**, v. 238, n. 5, p. 807-818, 2013.

LI, Y. C.; JI, H.; LI, X. H.; ZHANG, H. X. *et al.* Isolation of nematicidal constituents from essential oil of *Kaempferia galanga* L rhizome and their activity against *Heterodera avenae* Wollenweber. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 16, n. 1, p. 59-65, 2017.

LINDAHL, E.; HESS, B.; VAN DER SPOEL, D. GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. **Molecular modeling annual**, v. 7, n. 8, p. 306-317, 2001.

LIU, Z.; FANG, H.; REAGAN, K.; XU, X. *et al.* In silico drug repositioning—what we need to know. **Drug discovery today**, v. 18, n. 3-4, p. 110-115, 2013.

LIU, Z.; LIU, Y.; ZENG, G.; SHAO, B. *et al.* Application of molecular docking for the degradation of organic pollutants in the environmental remediation: A review. **Chemosphere**, v. 203, p. 139-150, 2018.

LOPEZ-SERNA, R.; ERNST, F.; WU, L. S. Analysis of cinnamaldehyde and diallyl disulfide as eco-pesticides in soils of different textures—a laboratory-scale mobility study. **Journal of Soils and Sediments**, v. 16, n. 2, p. 566-580, feb. 2016.

LUZHKOV, V.; WARSHEL, A. Microscopic models for quantum mechanical calculations of chemical processes in solutions: LD/AMPAC and SCAAS/AMPAC calculations of solvation energies. **Journal of Computational Chemistry**, v. 13, n. 2, p. 199-213, 1992.

MEIER, R.; PIPPEL, M.; BRANDT, F.; SIPPL, W. *et al.* ParaDockS: a framework for molecular docking with population-based metaheuristics. **Journal of chemical information and modeling**, v. 50, n. 5, p. 879-889, 2010.

MOMTAZ, S.; HASSANI, S.; KHAN, F.; ZIAEE, M. *et al.* Cinnamon, a promising prospect towards Alzheimer's disease. **Pharmacological Research**, v. 130, p. 241-258, abr. 2018.

MUKHTAR, T.; KAYANI, M. Z.; HUSSAIN, M. A. Nematicidal activities of *Cannabis sativa* L. and *Zanthoxylum alatum* Roxb. against *Meloidogyne incognita*. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 447-453, mar. 2013.

MUNIF, A.; HALLMANN, J.; SIKORA, R. A. The influence of endophytic bacteria on *Meloidogyne incognita* infection and tomato plant growth. **Journal of the International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences**, v. 19, n. 2, p. 68-74, 2013.

NAZ, I.; ABDULKAFI, S.; MUNIR, I.; AHMAD, M. *et al.* Cis- and trans-protopinium, a novel nematicide, for the eco-friendly management of root-knot nematodes. **Crop Protection**, v. 81, p. 138-144, 2016.



NAZ, I.; ABDULKAFI, S.; MUNIR, I.; AHMAD, M. *et al.* Cis- and trans-protopinium, a novel nematicide, for the eco-friendly management of root-knot nematodes. **Crop Protection**, v. 81, p. 138-144, mar. 2016.

NEESE, F. **ORCA-an ab initio**. Density Functional and Semiempirical program package, version 2.9, 2008.

NGALA, B. M.; VALDES, Y.; DOS SANTOS, G.; PERRY, R. N. *et al.* Seaweed-based products from *Ecklonia maxima* and *Ascophyllum nodosum* as control agents for the root-knot nematodes *Meloidogyne chitwoodi* and *Meloidogyne hapla* on tomato plants. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 3, p. 2073-2082, 2016.

NGUYEN, D. M. C.; SEO, D. J.; KIM, K. Y.; PARK, R. D. *et al.* Nematicidal activity of 3,4-dihydroxybenzoic acid purified from *Terminalia nigrovenulosa* bark against *Meloidogyne incognita*. **Microbial Pathogenesis**, v. 59-60, p. 52-59, 2013.

NILE, S. H.; NILE, A. S.; KEUM, Y. S.; BASKAR, V. *et al.* In vitro and in planta nematicidal activity of black pepper (*Piper nigrum* L.) leaf extracts. **Crop Protection**, v. 100, p. 1-7, 2017.

PAL, S.; BANDYOPADHYAY, S.; RAY, S. **Evolutionary Computation in Bioinformatics: A Review**. IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics, Part-C, 2005.

PATRICK, G. L. **An introduction to medicinal chemistry**. Oxford University Press, 2013.

PHILLIPS, J. C.; BRAUN, R.; WANG, W.; GUMBART, J. *et al.* Scalable molecular dynamics with NAMD. **Journal of computational chemistry**, v. 26, n. 16, p. 1781-1802, 2005.

RAUNIO, H. In silico toxicology–non-testing methods. **Frontiers in pharmacology**, v. 2, p. 33, 2011.

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

RODRIGUES, C. R. Processos Modernos no desenvolvimento de Fármacos: Modelagem molecular. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, 2001.

SATO, H.; SAITO, K.; YAMAZAKI, M. Acceleration of Mechanistic Investigation of Plant Secondary Metabolism Based on Computational Chemistry. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, 2019.

SCHLEGEL, H. B.; MILLAM, J. M.; IYENGAR, S. S.; VOTH, G. A. *et al.* Ab initio molecular dynamics: Propagating the density matrix with Gaussian orbitals. **The Journal of Chemical Physics**, v. 114, n. 22, p. 9758-9763, 2001.

SHREAZ, S.; WANI, W. A.; BEHBEHANI, J. M.; RAJA, V. *et al.* Cinnamaldehyde and its derivatives, a novel class of antifungal agents. **Fitoterapia**, v. 112, p. 116-131, jul. 2016.

SILVA, F. A. M. D. **Síntese de derivados de ácidos cinâmicos**: Determinação da actividade anti-radicalar e antioxidante, 1998.

SLIWOSKI, G.; KOTHIWALE, S.; MEILER, J.; LOWE, E. W. Computational methods in drug discovery. **Pharmacological reviews**, v. 66, n. 1, p. 334-395, 2014.

SOTOMAYOR, M.; SCHULTEN, K. Single-Molecule Experiments in Vitro and in Silico. **Science**, v. 316, n. 5828, p. 1144, 2007.

SOVA, M. Antioxidant and antimicrobial activities of cinnamic acid derivatives. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 12, n. 8, p. 749-767, 2012.

STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods II. Applications. **Journal of computational chemistry**, v. 10, n. 2, p. 221-264, 1989.

SZABO, A.; OSTLUND, N. S. **Modern quantum chemistry**: introduction to advanced electronic structure theory. Courier Corporation, 2012.

TALELE, T. T.; KHEDKAR, S. A.; RIGBY, A. C. Successful applications of computer aided drug discovery: moving drugs from concept to the clinic. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 10, n. 1, p. 127-141, 2010.

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

TOCCO, G.; ELOH, K.; ONNIS, V.; SASANELLI, N. *et al.* Haloacetophenones as newly potent nematicides against *Meloidogyne incognita*. **Industrial Crops and Products**, v. 110, p. 94-102, 2017.

TOLEDO, A. C. O.; HIRATA, L. L.; BUFFON, M. D. C. M.; MIGUEL, M. D. *et al.* Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, v. 21, n. 1/2, p. 7-13, 2003.

VOS, C.; SCHOUTEDEN, N.; VAN TUINEN, D.; CHATAGNIER, O. *et al.* Mycorrhiza-induced resistance against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* involves priming of defense gene responses in tomato. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 60, p. 45-54, 2013.

ZAKARIA, H. M.; KASSAB, A. S.; SHAMSELDEAN, M. M.; ORABY, M. M. *et al.* Controlling the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* in cucumber plants using some soil bioagents and some amendments under simulated field conditions. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 58, n. 1, p. 77-82, 2013.

ZAKI, M. J.; HSIAO, C.-J. **CHARM**: An efficient algorithm for closed itemset mining. **SIAM**, p. 457-473, 2002. Disponível em: <<https://pdfs.semanticscholar.org/fc59/bb528815efc84c2a08a3ad09f9ced8cc7508.pdf>>. Acesso em: 11 nov. 2019.

ZOU, J.; GAO, P.; HAO, X.; XU, H. *et al.* Recent progress in the structural modification and pharmacological activities of ligustrazine derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 147, p. 150-162, 2018/03/10/ 2018.

**SEGUNDA PARTE – ARTIGO\***

## ARTIGO 1 ÉSTERES DO ÁCIDO (*E*)-CINÂMICO E HISTONA DEACETILASE PARA O DESENVOLVIMENTO DE NOVOS PRODUTOS PARA O CONTROLE DE *Meloidogyne incognita*

### RESUMO

Os nematoides parasitas de plantas (NPPs) são animais que causam grandes perdas para a agricultura em geral. Dentre tais parasitas se encontra *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood, que é capaz de parasitar aproximadamente 2000 espécies de plantas, como é o caso do tomateiro, uma cultura de grande importância no mundo e na qual pode gerar perdas de mais de 10 milhões de toneladas anualmente. Uma das principais formas de controle de NPPs diz respeito ao uso de nematicidas químicos, que têm apresentado a desvantagem de serem altamente tóxicos para organismos não alvos. Na busca por novos nematicidas observou-se, em trabalho recente, que o (*E*)-cinamaldeído era muito ativo contra *M. incognita*, mas possuía baixa persistência no solo, provavelmente em decorrência da sua fácil oxidação em condição ambiente. Com vistas a contribuir para resolver este problema de baixa resistência, objetivou-se no presente trabalho estudar a ação *in vitro* e *in vivo* de ésteres do ácido (*E*)-cinâmico contra *M. incognita*, bem como identificar *in silico* o alvo proteico dos ésteres com as atividades nematicidas mais intensas. Os melhores resultados foram obtidos para o (*E*)-*p*-fluorocinamato de metila (13), (*E*)-*p*-clorocinamato de metila (14) e (*E*)-bromocinamato de metila (15), que apresentaram concentrações letais para 50% (CL<sub>50</sub>) dos juvenis do segundo estágio (J2) de *M. incognita*, *in vitro*, iguais a 168, 95 e 216 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Nas mesmas condições os valores de CL<sub>50</sub> para os nematicidas comerciais carbofuran e fluensulfona foram iguais a 160 e 34 µg mL<sup>-1</sup>. As substâncias 13-15 também foram ativas contra ovos do nematoide e, quando utilizadas na concentração de 200 µg mL<sup>-1</sup> em experimentos com tomateiros inoculados com J2, reduziram em aproximadamente 23% o número de galhas do nematoide nas plantas. Através do estudo *in silico*, observou-se que o provável alvo enzimático das substâncias 13-15 em *M. incognita* era a histona deacetilase, que se trata de uma enzima responsável pela expressão epigenética em organismo e pode intervir na formação embrional dos nematoides. Como um pré-estudo visando ao desenvolvimento de moléculas mais ativas contra o nematoide, estruturas químicas análogas, com mais afinidades pela histona deacetilase, foram selecionadas e propostas como potenciais nematicidas. Concluindo, os ésteres 13-15 são potencialmente úteis para o desenvolvimento de novos nematicidas para o controle de *M. incognita*, principalmente porque a histona deacetilase, que é o alvo enzimático destas substâncias no nematoide, segundo o estudo *in silico*, pode ser empregada para se encontrar substâncias análogas com mais atividade nematicida.

**Palavras-chave:** *M. incognita*. Histona deacetilase. Ácido (*E*)-cinâmico. *Docking*.

## ABSTRACT

Plant parasitic nematodes (NPPs) are animals that cause large losses to agriculture in general. Among such parasites is *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood, which is able to parasitize approximately 2000 species of plants, as is the case with tomatoes, a crop of great importance in the world and in which it can generate losses of more than 10 million tons annually. One of the main ways of controlling NPPs concerns the use of chemical nematicides, which have presented the disadvantage of being highly toxic to non-target organisms. In the search for new nematicides, it was observed, in a recent work, that (*E*)-cinamaldehyde was very active against *M. incognita*, but had low persistence in the soil, probably due to its easy oxidation in ambient conditions. One of the main ways of controlling NPPs concerns the use of chemical nematicides, which have presented the disadvantage of being highly toxic to non-target organisms. In the search for new nematicides, it was observed, in a recent work, that (*E*)-cinamaldehyde was very active against *M. incognita*, but had low persistence in the soil, probably due to its easy oxidation in ambient conditions. In order to contribute to solve this problem of low resistance, the objective of this work was to study the *in vitro* and *in vivo* action of esters of (*E*)-cinnamic acid against *M. incognita*, as well as to identify *in silico* the protein target of the esters with the most intense nematicidal activities. The best results were obtained for methyl (*E*)-*p*-fluorocinamate (13), methyl (*E*)-*p*-chlorocinamate (14) and methyl (*E*)-bromocinamate (15), which showed lethal concentrations for 50 % (LC<sub>50</sub>) of juveniles of the second stage (J2) of *M. incognita*, *in vitro*, equal to 168, 95 and 216 µg mL<sup>-1</sup>, respectively. Under the same conditions, the LC<sub>50</sub> values for the commercial nematicides carbofuran and fluensulfone were equal to 160 and 34 µg mL<sup>-1</sup>. Substances **13-15** were also active against nematode eggs and, when used at a concentration of 200 µg mL<sup>-1</sup> in experiments with tomato plants inoculated with J2, reduced the number of galls of the nematode in plants by approximately 23%. Through the *in silico* study, it was observed that the probable enzymatic target of substances **13-15** in *M. incognita* was histone deacetylase, which is an enzyme responsible for epigenetic expression in the organism and can intervene in the embryonic formation of nematodes. As a pre-study aimed at the development of more active molecules against the nematode, analogous chemical structures, with more affinities for histone deacetylase, were selected and proposed as potential nematicides. In conclusion, esters **13-15** are potentially useful for the development of new nematicides for the control of *M. incognita*, mainly because histone deacetylase, which is the enzymatic target of these substances in the nematode, according to the *in silico* study, can be used to if you find similar substances with more nematicidal activity.

**Keywords:** *M. incognita*. Histone deacetylase. (*E*)-cinnamic acid. Docking.

## 1 INTRODUÇÃO

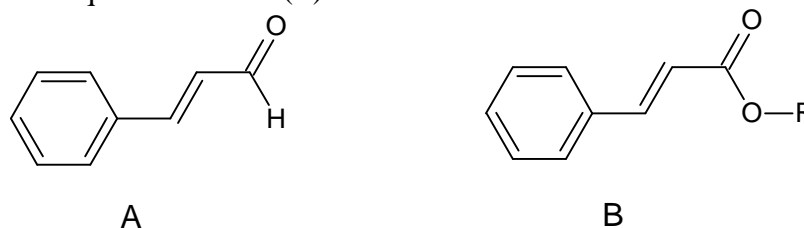
Os fitonematoides são considerados parasitas de difícil controle em culturas de alto valor como a soja, feijão, café, milho e batata, com destaques para aqueles do gênero *Meloidogyne*, que são conhecidos como nematoides de galhas. Vale destacar aqui a espécie *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood, que é uma das mais representativas deste gênero. Ela pode parasitar mais de 2000 espécies de plantas e gerar grandes perdas na produção agrícola mundial (HASSAN et al., 2013; SASSER; CARTER, 1985). Dentre as plantas afetadas cabe destacar o tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), que é uma das mais cultivadas no mundo, resultando na produção anual de mais de 171 milhões de toneladas de tomate (HEUVELINK, 2018; JONES et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2019). Estima-se que a média mundial das perdas de rendimento anual de frutas e hortaliças, causada por nematoides, seja de 12% e 11%, respectivamente (RAO et al., 2016; RAVICHANDRA, 2014).

Diferentes estratégias de controle têm sido utilizadas no manejo de *M. incognita*, sendo mais empregadas aquelas que fazem uso de nematicidas químicos que afetam o meio ambiente, geram resíduos nos alimentos e são altamente tóxicos para o ser humano (SILVA; OLIVEIRA; CAMPOS, 2002). Uma das alternativas para contornar este problema diz respeito ao uso de substâncias de origem natural, como é o caso dos metabólitos de origem microbiana (MEYER; ROBERTS, 2002) e vegetal, para o desenvolvimento de novos nematicidas (OLIVEIRA et al., 2007). Afinal, acredita-se que o número de metabólitos produzidos por tais organismos possa chegar a casa dos milhões (WANG et al., 2019), dentre os quais vários apresentam propriedades biocidas (NAZ et al., 2016; SILVA et al., 2017).

Dentre as várias substâncias de origem natural, cabe destacar aquelas que apresentam carbonilas aldeídicas, como o (*E,E*)-deca-2,4-dienal, (*E*)-dec-2-enal, salicilaldeído e (*E*)-cinamaldeído, os quais mostraram atividade contra *M. incognita* (CABONI et al., 2013; JARDIM et al., 2018). No caso específico do (*E*)-cinamaldeído, que está contido no óleo essencial de *Cinnamomum cassia* (L.) J. Presl, observou-se 97% de mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *M. incognita* expostos a tal aldeído na concentração de 52  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Nas mesmas condições, o nematicida comercial carbofuran (*N*-metilcarbamato de 2,2-dimetil-2,3-diidro-1-benzofuran-7-ila) causou apenas 63% de mortalidade dos J2 na concentração de 173  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , o que deixa evidente o poder nematicida do (*E*)-cinamaldeído (JARDIM et al., 2018). Entretanto, os autores relatam que tal aldeído apresenta baixa persistência no solo, o

que pode ser um grande problema para a sua utilização no desenvolvimento de um produto comercial para o controle de fitonematoides.

Figura 1 - Estruturas químicas do A. (*E*)-cinamaldeído e de B. ésteres do ácido (*E*)-cinâmico.



Fonte: Do autor (2020).

Talvez o mencionado problema de baixa persistência do (*E*)-cinamaldeído possa ser resolvido com a sua substituição por substâncias análogas, para as quais se podem encontrar relatos de atividades bactericidas, fungicidas (SHREAZ et al., 2016), nematicidas (HAMIDPOUR et al., 2015), antitumorais (KWON et al., 1997), e com efeitos sobre a doença de Alzheimer (MOMTAZ et al., 2018). Dentre tais análogos cabe destacar os ésteres do ácido (*E*)-cinâmico (FIGURA 2), que são genericamente conhecidos como cinamatos. Em princípio, eles podem ser obtidos facilmente pela reação do ácido carboxílico com álcoois, na presença de um catalisador fortemente ácido. Esta reação é genericamente conhecida como esterificação de Fischer (SILVA, 1998).

Sabe-se que os ésteres do ácido (*E*)-cinâmico podem apresentar grande diversidade de atividades biológicas. Para exemplificar, pode-se mencionar as seguintes: alelopáticas, antimicrobianas, antivirais, antioxidantes, e outras atividades sobre doenças cardiovasculares (CHAVES-ULATE; ESQUIVEL-RODRIGUEZ, 2019; DE; BEDOS-BELVAL et al., 2012; DOS SANTOS et al., 2012; ESPINDOLA et al., 2012; GOMES; SÁ; DE ARAÚJO, 2015). No caso específico da atividade nematicida, pode-se mencionar a ação do (*E*)-*p*-metoxicinamato de etila e (*E*)-cinamato de etila contra *Heterodera avenae* Wollenweber (LI et al., 2017). Tais substâncias também foram ativas contra o fitonematoide *Bursaphelenchus xylophilus* Steiner & Buhner, cuja mortalidade foi de 100% após a sua exposição a qualquer um dos dois cinamatos (JU-YONG et al., 2006).

Embora seja um nematoide de vida livre, *Caenorhabditis elegans* Maupas tem sido de grande importância para o desenvolvimento de novos produtos com atividade nematicida. Em grande parte, isto se deve ao fato do seu genoma ter sido sequenciado há mais de 30 anos, o



que permitiu o desenho e desenvolvimento de testes biológicos com diferentes substâncias, dentre as quais estão os nematicidas. Por exemplo, estudos *in vivo* e *in vitro* da atividade nematicida de carbamatos e organofosforados sobre *C. elegans* têm ajudado a elucidar os alvos enzimáticos dessas substâncias (HOLDEN-DYE; WALKER, 2014).

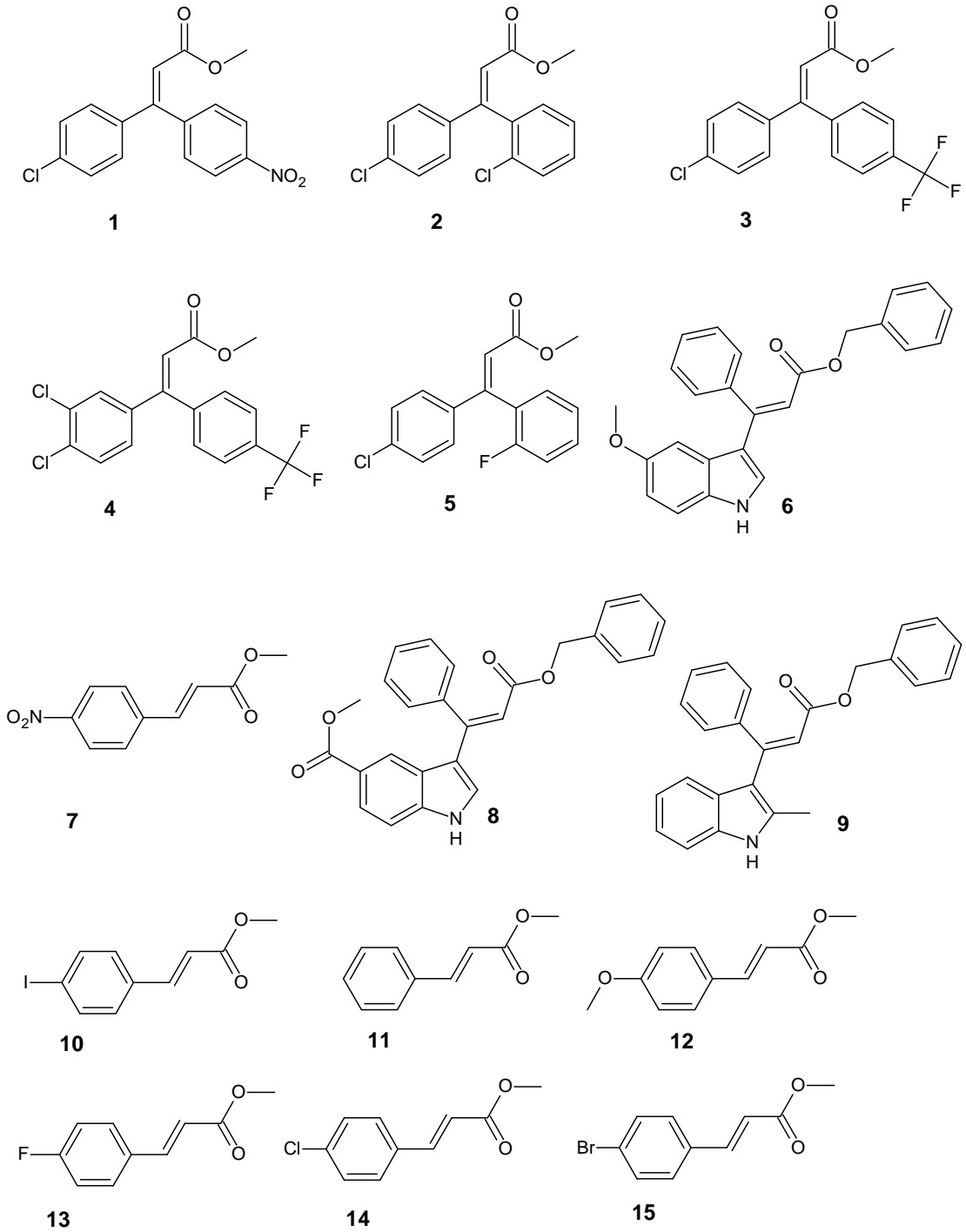
Ante o exposto, buscou-se, no presente trabalho, *i*) selecionar através de testes *in vivo* e *in vitro*, ésteres do ácido (*E*)-cinâmico potencialmente úteis para o desenvolvimento de novos nematicidas para o controle de *M. incognita* em tomateiros; *ii*) e, através de estudos *in silico* utilizando o genoma de *C. elegans*, identificar a proteína alvo dos ésteres do ácido (*E*)-cinâmico mais ativos contra nematoides.

## 2 PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1 Síntese de ésteres do ácido (*E*)-cinâmico

As substâncias foram sintetizadas por pesquisadores do Laboratório de Química Orgânica Sintética – UNICAMP. As estruturas **7**, 10-15 (FIGURA 2) foram obtidas a partir da reação do acrilato de metila com tetrafluoroborato de arenodiazônio e acetado de paládio, em metanol, sob agitação, na temperatura ambiente. Posteriormente, as misturas foram filtradas e fracionadas por cromatografia em coluna de sílica *flash* (CURY et al., 2019). As substâncias 1-5 (FIGURA 3) foram obtidas a partir de ésteres do ácido (*E*)-cinâmico com o tetrafluoroborato de arenodiazônio e acetato de paládio, seguida de fracionamento por cromatografia em coluna de sílica *flash* (ALMEIDA, 2017). Para as substâncias 6, 8 e 9 (FIGURA 4), misturaram-se o acetato de paládio e o indol, sob agitação magnética. Em seguida, foram adicionados o (*E*)-cinamato e o ácido acético. Após 48 h sob temperatura controlada, os meios reacionais foram diluídos com acetato de etila e extraídos com Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> saturado e NaHCO<sub>3</sub>. A fase orgânica foi seca e concentrada sob pressão reduzida. Finalmente, os produtos foram purificados por cromatografia em coluna de sílica *flash*, adicionando trietilamina ao eluente para evitar a isomerização (AZAMBUJA, 2015).

Figura 2 - Ésteres do ácido (*E*)-cinâmico que foram sintetizados e utilizados no presente trabalho.



Fonte: Do autor (2020).

## 2.2 Inóculo de *M. incognita*

Mudas de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. 'Santa Clara') com 25 dias de idade foram inoculadas com *M. incognita* e mantidas em casa de vegetação por 45-60 dias. Em seguida, as raízes foram removidas do substrato, lavadas cuidadosamente com água, cortadas em pedaços de aproximadamente 1 cm e trituradas em liquidificador com solução de hipoclorito de sódio a 0,5 % (g mL<sup>-1</sup>) por no máximo 40 segundos (HUSSEY, 1973). A mistura resultante foi imediatamente filtrada em peneiras de 200 e 500 mesh (ASTM-American Society for Testing and Materials), de forma que os ovos retidos na peneira de 500 mesh foram lavados com água abundante para a remoção de todo o hipoclorito de sódio. Parte dos ovos foram empregados nos testes biológicos, enquanto outra parte foi colocada em câmara de eclosão, que era formada por um funil de Baermann (WHITEHEAD; HEMMING, 1965). Os J2 eclodidos nas primeiras 24h foram descartados. Somente foram utilizados para a montagem dos experimentos aqueles J2 que tinham eclodido após 48h.

## 2.3 Motilidade e mortalidade *in vitro* de J2 de *M. incognita* expostos a ésteres do ácido (*E*)-cinâmico

Cada uma das substâncias 1-15 (FIGURA 3) foi dissolvida em solução aquosa de Tween 80® (Sigma-Aldrich, MO, USA) a 0,02 g mL<sup>-1</sup> até a concentração de 600 µg mL<sup>-1</sup>. Em cada cavidade de uma placa de polipropileno com 96 cavidades de 300 µL, foram colocados 100 µL de cada solução e 20µL de suspensão aquosa contendo aproximadamente 25 J2 de *M. incognita*. A concentração final de cada substância na cavidade foi de 500 µg mL<sup>-1</sup>. Uma solução aquosa de Tween 80® a 0,02 g mL<sup>-1</sup> e uma solução de carbofurano (Aldrich, 98%) a 600 µg mL<sup>-1</sup> (concentração final na cavidade: 500 µg mL<sup>-1</sup>) foram empregadas como controle negativo e positivo, respectivamente. As placas foram vedadas com filme plástico e armazenadas em BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio) por 48 horas, a 25 °C. Em seguida, os J2 móveis e imóveis foram contados com o uso de um microscópio de objetiva invertida. Para a contagem de J2 vivos e mortos, utilizou-se o método descrito por Chen e Dickson (CHEN; DICKSON, 2000), que foi adaptado por Amaral e Rocha (AMARAL; ROCHA, 2003). Fundamentalmente, adicionou-se uma gota (5µL) de solução de NaOH a 1 mol L<sup>-1</sup>, recém preparada, ao conteúdo de cada cavidade da placa. Os J2 que se

movimentaram até 1 min após a adição foram considerados vivos, enquanto os outros foram considerados mortos. Este teste foi realizado sob delineamento inteiramente casualizado (DIC), com cinco repetições. Os resultados foram transformados em porcentagem antes de serem submetidos à análise estatística.

#### **2.4 Concentração letal de ésteres do ácido (*E*)-cinâmico para 50 % (CL<sub>50</sub>) dos J2 de *M. incognita*.**

As substâncias que se mostraram mais ativas contra J2 no teste *in vitro* em concentração única (13, 14 e 15; FIGURA 4), foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) até a concentração de 27.777 µg mL<sup>-1</sup>. Em seguida, foram diluídas em Tween 80® a 0,02 g mL<sup>-1</sup>, até as concentrações de 60, 120, 240, 360 e 480 µg mL<sup>-1</sup>. (*E*)-cinamaldeído (3.333 µg mL<sup>-1</sup> em DMSO) e os nematicidas comerciais (27.777 µg mL<sup>-1</sup> em DMSO) carbofurano e fluensulfona (Nimitz®, ADAMA), foram empregados como controles positivos. Para tanto, as soluções em DMSO foram diluídas com a solução aquosa de Tween 80 até as concentrações de 18, 36, 72, 144 e 180 µg mL<sup>-1</sup> para o (*E*)-cinamaldeído; 60, 120, 240, 360 e 480 µg mL<sup>-1</sup> para o carbofurano; e de 28,8; 57,6; 115,2; 172,8 e 230,4 µg mL<sup>-1</sup> para a fluensulfona. 100 µL de cada uma das soluções preparadas foram colocados em cavidades de placas de polipropileno conforme descrito no teste anterior, nas quais também foram colocados 20µL de suspensão aquosa contendo aproximadamente 25 J2 de *M. incognita*. As concentrações finais das substâncias 13, 14 e 15, bem como do carbofuran, após a adição da suspensão aquosa de J2, foram de 50, 100, 200, 300 e 400 µg mL<sup>-1</sup>. Para o (*E*)-cinamaldeído foram de 15, 30, 60, 120 e 150 µg mL<sup>-1</sup>. E para a fluensulfona foram de 24, 48, 96, 144 e 192 µg mL<sup>-1</sup>. Para todos os tratamentos a concentração 0,0 µg mL<sup>-1</sup> correspondeu a uma solução de Tween 80 a 0,02 g mL<sup>-1</sup> contendo 1,5 % (v/v) de DMSO. Este experimento foi conduzido e avaliado conforme descrito acima, empregando cinco repetições para cada tratamento. Este experimento foi realizado duas vezes.

#### **2.5 Influência de ésteres do ácido (*E*)-cinâmico sobre a eclosão de J2 de *M. incognita*.**

As substâncias 13, 14 e 15 (FIGURA 5), que foram as mais ativas no teste de motilidade e mortalidade de J2 de *M. incognita*, foram dissolvidas em DMSO até a

concentração de  $22.222 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Em seguida, as soluções obtidas foram diluídas com solução aquosa de Tween 80® a  $0,02 \text{ g mL}^{-1}$  até a concentração de  $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Parte (5,0 mL) de cada solução final foi adicionada a 5,0 mL (isto fez a concentração final de cada substância cair para  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) de uma suspensão aquosa contendo aproximadamente 7600 ovos de *M. incognita*, dentre os quais 50% continham juvenis do primeiro estágio (J1) e os outros 50% se encontravam no estágio de multiplicação celular. As suspensões obtidas foram colocadas em câmaras de eclosões formadas por uma tela de PVC de 500 mesh, suportada por um anel do mesmo material, que manteve os ovos retidos, mas garantia a livre movimentação dos J2. Utilizou-se Tween 80 a  $0,02 \text{ g mL}^{-1}$  contendo DMSO a 1,5% (v/v) e água como controle negativo, enquanto carbofurano e fluensulfona (Nimitz®, ADAMA) foram empregados como controles positivos, na concentração de  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  após a adição da suspensão de J2. As suspensões finais foram colocadas em placas de Petri de 6,0 cm de diâmetro, que foram seladas com Parafilm® e mantidas em estufa incubadora BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio) a  $28^\circ\text{C}$ , no escuro, por 48 h. Após este período de tempo, as telas foram removidas e os ovos nelas contidos foram lavados com água. Em seguida, as telas contendo os ovos foram mergulhadas em Placas de Petri contendo 10 mL de água, que foram novamente mantidas em BOD, nas mesmas condições, para que os J2 eclodidos pudessem ser contados em câmara de Peter, utilizando um microscópio, em períodos de 48h, a partir do momento em que foram colocados os ovos em contato com as soluções, até um total de 288 h (12 dias). Este experimento foi realizado duas vezes, em delineamento completamente casualizado, com cinco repetições para cada tratamento.

## **2.6 Efeito de ésteres do ácido (*E*)-cinâmico sobre *M. incognita* em tomateiros inoculados com J2 do nematoide.**

As substâncias 13, 14 e 15 foram dissolvidas em solução aquosa de Tween 80 a  $0,02 \text{ g mL}^{-1}$ , utilizando-se agitação magnética (Mod. 752A, Fisaton) durante 2 h e ultrassom (Ultracleaner USC-1400A, Unique) durante 2 h, para a obtenção de soluções a  $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Parte de cada solução (18 mL) foi adicionada a 18 mL de uma suspensão aquosa contendo aproximadamente 2700 J2 de *M. incognita*, fazendo com que a concentração de cada substância na suspensão final fosse de  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Imediatamente a seguir, cada suspensão (6 mL; 450 J2) foi colocada em dois furos (2,5 cm de profundidade x 0,5 cm de diâmetro) ao

redor do caule (1,0 cm de distância do caule) de uma muda de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. 'Santa Clara') com 25 dias de idade, contida em bandeja de poliestireno com 128 cavidades de 23 mL, que continha o substrato orgânico Tropstrato® (Vida Verde Indústria e Comércio de Insumos Orgânicos Ltda., Mogi Mirim-SP, Brasil). Como controles positivos foram utilizados os nematicidas carbofurano, fluensulfona e o (*E*)-cinamaldeído nas concentrações finais (após adição à suspensão de J2) iguais a 200, 96 e 200 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Tween 80® a 0,02 g mL<sup>-1</sup> e água foram empregados como controles negativos. O experimento foi feito duas vezes, sob delineamento inteiramente ao acaso, com cinco repetições para cada tratamento.

## 2.7 Análise estatística para experimentos *in vitro* e *in vivo*.

Exceto para o teste inicial de motilidade e mortalidade *in vitro* de J2, que foi realizado uma única vez, procedeu-se à análise conjunta de ambos os experimentos realizados para cada teste biológico. Para tanto, fez-se o teste de normalidade (SHAPIRO; WILK, 1965) e de homocedasticidade (BARTLETT, 1937). Em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância - ANOVA (DUNN; CLARK, 1987) e as médias foram comparadas de acordo com o teste de Scott-Knott (SCOTT; KNOTT, 1974) a 5 % de significância.

Para o teste de efeito de ésteres do ácido (*E*)-cinâmico sobre *M. incognita* em tomateiros inoculados com J2 do nematoide, não se observou normalidade e homocedasticidade com P maior do que 0,05 na análise conjunta. Em decorrência, os dados foram transformados utilizando Box-Cox, com a função  $(x - 1)/x$  para  $\lambda = 2,53$  (BOX; COX, 1964). Os resultados dos testes de influência de ésteres do ácido (*E*)-cinâmico sobre a eclosão de J2 de *M. incognita*, cada 48 h foram apresentados por separado.

Para realizar tais cálculos foi utilizado o programa computacional SISVAR 5,6 (FERREIRA, 2011) e o software R® 3.6.1 com a interface gráfica RStudio i386 3.6.1 (R TEAM, 2015). Para o cálculo da CL<sub>50</sub>, foi feita análise de Logit (MCFADDEN, 1973), utilizando-se o pacote drc (Analysis of Dose-Response Curves) (RITZ; STREIBIG, 2005) do software R® (R CORE TEAM, 2013).

## 2.8 **Estudo *in silico*: buscas conformacionais para as substâncias 13, 14 e 15.**

As estruturas químicas tridimensionais das substâncias 13, 14 e 15 foram desenhadas com o programa Chemsketch 12.01 (Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, Canada) e salvas no formato mol, para serem posteriormente convertidas ao formato sdf através do uso do programa computacional OpenBabel 2.3.2 (O'BOYLE et al., 2011). A partir do formato sdf, realizaram-se buscas conformacionais utilizando o programa Open3Dalign 2.282 (TOSCO; BALLE; SHIRI, 2011). Para isto, foram feitas 1.000 simulações por dinâmica molecular usando o Merck Molecular Force Field 94 (MMFF94), com uma temperatura de 1.000 °C e 1.000 etapas de 1 fs em cada simulação. O solvente (água) foi implicitamente considerado pelo emprego do modelo Generalized Born Surface Area (GBSA). Em seguida, a conformação mais estável de cada substância, bem como todas aquelas até 10 kcal mol<sup>-1</sup> distantes das mais estáveis, foram otimizadas utilizando o programa MOPAC 2016 (Stewart Computational Chemistry, <http://OpenMOPAC.net>) (MOPAC, 2016), empregando o Hamiltoniano PM7 (STEWART, 1990). Neste caso, a água foi implicitamente considerada através do Conductor-Like Screening Model-COSMO (KLAMT; SCHÜÜRMAN, 1993). Para cada substância, selecionaram-se apenas aquelas conformações com populações iguais ou superiores a 5 % do total, de acordo com a distribuição de Boltzmann (CERCIGNANI, 1988), que foram salvas no formato pdb com o uso do programa computacional GABEDIT 2.4.8 (ALLOUCHE, 2011).

## 2.9 **Seleção de potenciais alvos proteicos a partir de busca farmacofórica no banco de dados do ligand Expo.**

As conformações mais estáveis das **substâncias 13, 14 e 15, obtidas** conforme descrito acima, foram submetidas à busca farmacofórica na base de dados Ligand Expo (<http://ligand-expo.rcsb.org/>) (FENG et al., 2004), versão 05/2019. Todas as estruturas químicas de tal base foram submetidas ao programa OpenBabel 2.3.2 para a adição de átomos de H e conversão para o formato sdf, para posterior realização da busca farmacofórica com o programa Lisica 1.0.1 (LESNIK et al., 2015), para selecionar estruturas químicas similares aquelas conformações mais estáveis das substâncias 13, 14 e 15. Para a etapa seguinte deste trabalho, selecionaram-se apenas aquelas proteínas que: *i*) estavam complexadas a ligantes

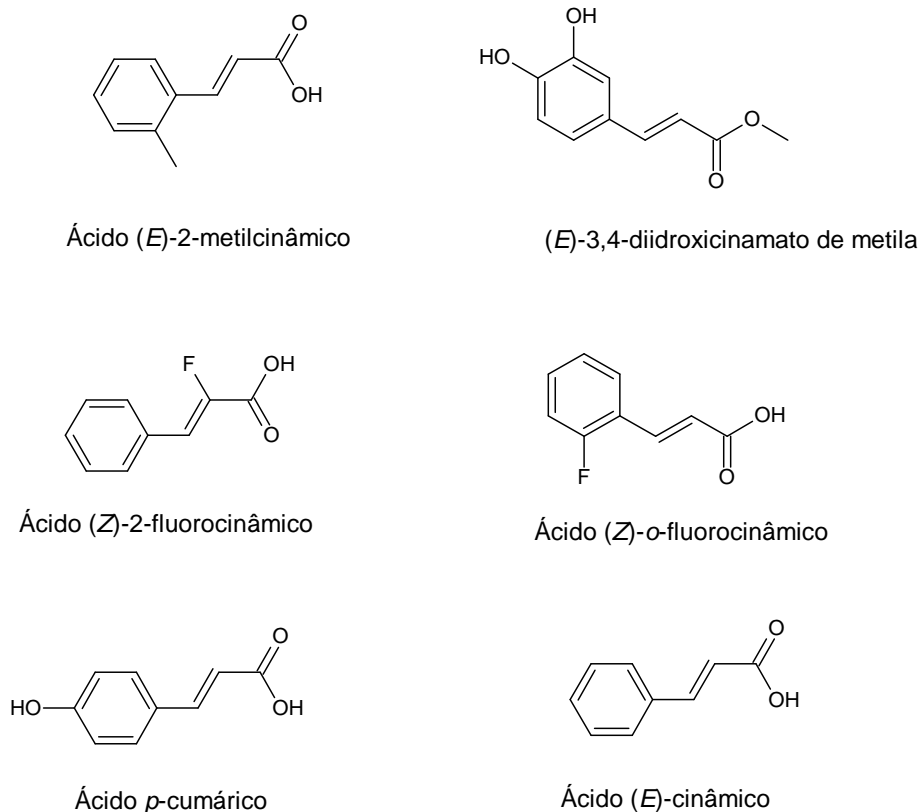


com escores de Tanimoto iguais ou maiores do que 0,6 na busca farmacofórica; *ii*) cujos ligantes selecionados na busca farmacofórica se encontravam em cavidades das proteínas; *iii*) e cujos ligantes selecionados na busca farmacofórica não estavam quimicamente ligados às proteínas. As sequências de aminoácidos das proteínas selecionadas foram utilizadas em buscas nos genoma de nematoides através do NCBI (National Center for Biotechnology Information - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando-se a ferramenta de alinhamento Blastp 2.10.0+ (ALTSCHUL et al., 1997; ALTSCHUL et al., 2005), com o Delta-Blast (Domain Enhanced Lookup Time Accelerated) (BORATYN et al., 2012). Tais buscas foram feitas no banco de dados não redundante (nr) de proteínas. Para se buscar por sequências de proteínas dentro das sequências de DNA e RNA de nematoides, utilizou-se o Tblastn 2.10.0+, que fez buscas no banco de dados não redundante (ALTSCHUL et al., 1997). Os vários parâmetros dos programas computacionais utilizados foram mantidos com os valores padrões. Para dar continuidade ao trabalho, selecionaram-se apenas aquelas proteínas com escores acima de 200 para no mínimo um nematoide fitoparasita e para o nematoide de vida livre *C. elegans*.

## **2.10 Seleção de potenciais alvos proteicos a partir de busca farmacofórica no banco de dados do BRENDA para as substâncias 13, 14 e 15 e seus análogos.**

Na base de dados especializada BRENDA (<https://www.brenda-enzymes.org>) (JESKE et al., 2018) foi desenhada a estrutura da substância (*E*)-cinamato de metila, que foi utilizada em buscas por substâncias com 50% ou mais de similaridade. Somente foram selecionados para a etapa seguinte, aquelas enzimas inibidas por alguma das substâncias resultantes da referida busca, segundo o BRENDA (FIGURA 6) As sequências de aminoácidos das enzimas  $\alpha$ -hidroxiesteroide desidrogenase, histidina decarboxilase, laccase, caboxipeptidase, fenilalanina amonia liase, poligalacturase e polifenol oxidase foram obtidas do RCSB Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org>) (BERMAN et al., 2000). Tais sequências foram utilizadas em buscas nos genomas de nematoides, através do NCBI, conforme descrito acima. Para dar continuidade ao trabalho, selecionaram-se apenas aquelas proteínas com escores acima de 200 para no mínimo um nematoide fitoparasita e para o nematoide de vida livre *C. elegans*.

Figura 3 - Análogos das substâncias 13, 14 e 15, com atividades enzimáticas, obtidos no BRENDA.



Fonte: Do autor (2020).

### 2.11 Seleção de potenciais alvos proteicos a partir de busca farmacofórica no banco de dados do ChEMBL para a seleção de potenciais alvos enzimáticos.

A base de dados ChEMBL protein target tree (GAULTON et al., 2016), versão 24 de 11/01/2019, que continha 757.468 compostos biologicamente ativos, foi obtida do PUBCHEM (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) (KIM et al., 2018) em 09 de dezembro de 2019. Todos os arquivos, que estavam no formato sdf, foram convertidos ao formato mol2 utilizando o programa computacional OpenBabel 2.3.2, para serem submetidos a uma busca farmacofórica com programa Lisica 1.0.1, com vistas a encontrar estruturas químicas similares às conformações mais estáveis das substâncias 13, 14 e 15. Todas as substâncias com escores de Tanimoto iguais ou maiores do que 0,75 (WILLETT, 2006) e atividade contra proteínas de acordo com os dados do ChEMBL, foram selecionadas para a próxima etapa, que consistiu em buscar por sequências de aminoácidos para tais proteínas no RCSB Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org>) e no BRENDA (<https://www.brenda-enzymes.org/>) (JESKE et

al., 2018). As sequências de aminoácidos obtidas foram, então, utilizadas em buscas por sequências similares nos genomas de nematoides, através do NCBI, conforme descrito acima. Para dar continuidade ao trabalho, selecionaram-se apenas aquelas proteínas com escores acima de 200 para no mínimo um nematoide fitoparasita e para o nematoide de vida livre *C. elegans*.

## 2.12 Seleção de estruturas tridimensionais da histona deacetilase (HDAC)

Do RCSB Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org>) (BERMAN et al., 2000) foram obtidos os arquivos fasta e pdb da histona deacetilase 1T64 (SOMOZA et al., 2004) e de todas aquelas com 95 % ou mais de similaridade de sequência de aminoácidos em relação a 1T64. Utilizando-se o programa Ugene 1.16.2 (OKONECHNIKOV et al., 2012) com o algoritmo Clustal Omega 1.2.1, alinharam-se tais sequências com 10 iterações (SIEVERS; HIGGINS, 2014). A partir do resultado de tal alinhamento, calculou-se a dissimilaridade de Hamming (%) considerando todos o *gaps*. Em seguida, calculou-se a similaridade (%) através da seguinte fórmula: 100 – dissimilaridade de Hamming. Todas as histona deacetilases com 60 % ou menos de similaridade em relação à enzima 1T64 foram descartadas. Também foram descartadas as seguintes enzimas: a) cujos ligantes não estivessem localizados em cavidades na enzima; b) contendo número de resíduos de aminoácidos igual a 50 unidades abaixo ou acima do número de resíduos da 1T64, que era igual a 377; c) cujas enzimas não tinham o íon  $Zn^{+2}$  no sítio ativo; d) e com mutações fora das extremidades das cadeias. Para facilitar a aplicação dos quesitos "a" e "d", as estruturas tridimensionais das enzimas foram visualizadas com o uso do programa computacional UCSF Chimera 1.13.1 (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>) (PETTERSEN et al., 2004).

Os arquivos pdb das histona deacetilases selecionadas foram convertidos em arquivos pdb contendo as unidades biológicas pelo emprego do *script* em Python MakeMultimer.py (<http://watcut.uwaterloo.ca/tools/makemultimer/>). As estruturas tridimensionais resultantes foram alinhadas com o programa computacional Lovoalign 18.320 (MARTÍNEZ; ANDREANI; MARTÍNEZ, 2007), que também foi utilizado para calcular o desvio da raiz quadrada média das posições atômicas (RMSD) para cada par de estruturas. Aquelas apresentando valores de RMSD acima de 6 Å em relação à 1T64 também foram descartadas.

### 2.13 Identificação do sítio de ligação das substâncias 13, 14 e 15 na histona deacetilase.

Com o uso do psfgen inserido no programa computacional VMD 1.9.2 (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996), adicionaram-se átomos ausentes nas estruturas tridimensionais das histona deacetilases selecionadas conforme descrito acima, para que as mesmas fossem salvas no formato pdb e, em seguida, convertidas para o formato pdbqt pelo emprego do programa computacional Autodock Tools 1.5.7rc1 (TROTT; OLSON, 2010). Ao final do processo, a carga 2+ foi adicionada manualmente para os íons  $Zn^{+2}$  em cada uma das cadeias alinhadas. De forma análoga, utilizou-se o programa Autodock Tools para converter os arquivos pdb das configurações mais estáveis das substâncias 13, 14 e 15 (FIGURA 7), para o formato pdbqt.

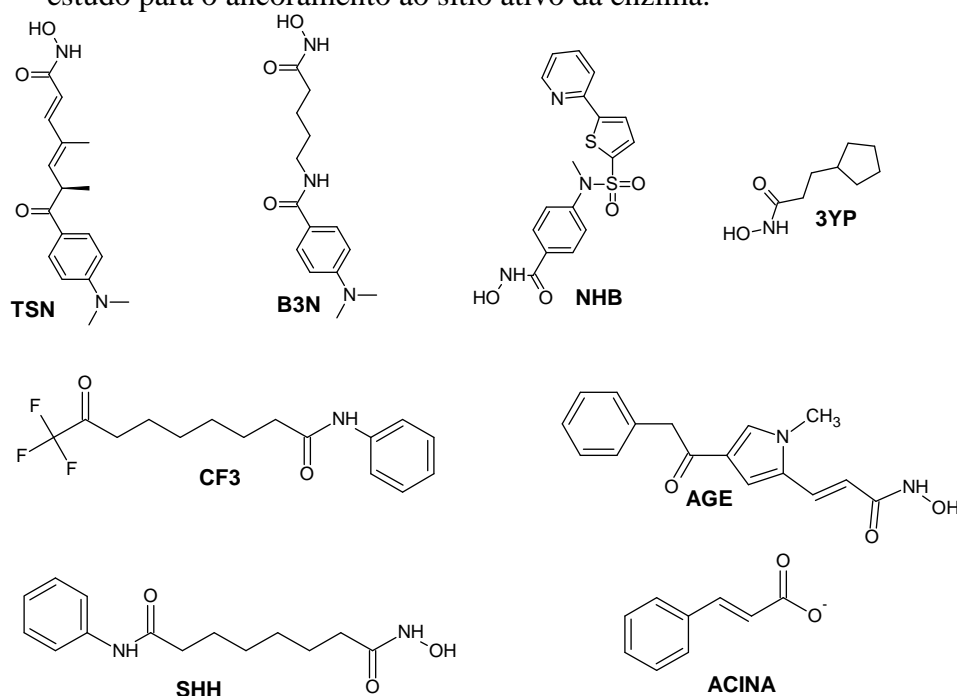
Com o uso do programa VMD 1.9.2 (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996), calcularam-se as dimensões das histona deacetilases ( $54.34 \times 48.96 \times 54.83 \text{ \AA}^3$ ; x, y, z) e seus centros de gravidade ( $-2,01, -0,53, 38,42 \text{ \AA}$ ; x, y, z). Em seguida, utilizando-se o *software* QuickVina-W (HASSAN; ALHOSSARY; MU; KWOH, 2017; TROTT; OLSON, 2010), fez-se o ancoramento às cegas das substâncias 13, 14 e 15 (FIGURA 8), nas histona deacetilases. O parâmetro *exhaustiveness* foi ajustado para valor igual a 128, enquanto todos os outros permaneceram com os valores padrões do programa.

### 2.14 Ancoramentos (*docking*) no sítio da histona deacetilase.

Para este estudo, foram utilizadas as estruturas tridimensionais das conformações mais estáveis das substâncias 13, 14 e 15 (FIGURA 9), no formato pdbqt, bem como dos seguintes inibidores de histona deacetilases: 7-(4-(dimetilamino)-fenil)-N-hidroxi-4,6-dimetil-7-oxo-2,4-heptadienamida (TSN)(SOMOZA et al., 2004), 4-(dimetilamino)-N-(7-(hidroxiamino)-7-oxo-heptil)-benzamida (B3N) (SOMOZA et al., 2004), N-hidroxi-4-(metil-(5-(piridin-2-il)-tien-2-il)-sulfoni)-amino-benzamida (NHB) (VANNINI; VOLPARI; FILOCAMO; CASAVOLA et al., 2004), 3-ciclopentil-N-hidroxiopropanamida (3YP) (NIELSEN et al., 2005), 9,9,9-trifluoro-8-oxo-N-fenilnonamida (CF3) (NIELSEN et al., 2007), N-fenil-N'-hidroxioctanodiamida (SHH) (NIELSEN et al., 2005), (*E*)-3-(4-(benzilcarbonil)-1-metil-1*H*-pirrol-2-il)-N-hidroxiopropanamida (AGE) (DOWLING et al., 2008) e (*E*)-cinamato (busca farmacofórica no ChEMBL) (ACINA). Para se obter as conformações mais estáveis de tais

inibidores, no formato pdbqt, utilizou-se o mesmo procedimento descrito acima para as substâncias 13, 14 e 15 (FIGURA 10). Entretanto, antes de se dar início ao processo, os seus valores de pka foram calculados com o uso do programa computacional Marvin Sketch 19.25.0 (CSIZMADIA, 1999) para que os estados de protonação corretos fossem utilizados. Com o uso do programa computacional Autodock Tools 1.5.7rc1(TROTT; OLSON, 2010), escolheu-se a região (22.5 x 18.75 x 24 Å<sup>3</sup> ; x , y, z) para o ancoramento que englobasse o sítio de ligação de acordo com o ancoramento as cegas das substâncias 13, 14 e 15, descrito acima, e com as localizações dos inibidores da histona deacetilases nos complexos experimentalmente disponíveis no RCSB Protein Data Bank. Os ancoramentos foram feitos com o programa QuickVina 2.1 (HANDOKO et al., 2012; TROTT; OLSON, 2010), utilizando valor de 128 para o parâmetro *exhaustiveness*. Para todos os outros parâmetros foram mantidos os valores padrões do programa. Os valores obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas de acordo com o teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ). Para tanto, utilizou-se o programa SISVAR 5.6 (FERREIRA, 2011).

Figura 4 - Estruturas químicas de inibidores da histona deacetilase utilizados no presente estudo para o ancoramento ao sítio ativo da enzima.

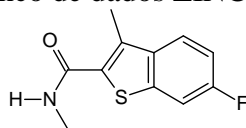


Fonte: Do autor (2020).

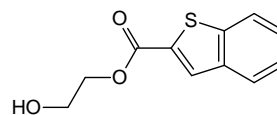
### **2.15 Busca por análogos das substâncias 13, 14 e 15 que possam ligar-se mais fortemente à enzima histona deacetilase.**

Utilizando as conformações mais estáveis de 13, 14 e 15, fez-se uma busca farmacofórica na base de dados do ZINC15 (<https://zinc15.docking.org/>) (STERLING; IRWIN, 2015), que foi obtida em novembro/2019. Para isto, utilizou-se o programa Lisica 1.0.1. Selecionaram-se as 21 substâncias (FIGURAS 5 e 6) com os maiores valores de escore de Tanimoto, para serem desenhadas no ChemsSketch 12.01 e submetidas às buscas conformacionais, conforme descrito acima para as substâncias 13, 14 e 15. Vale mencionar que, mais uma vez, utilizou-se o programa Marvin Sketch 19.25.0 (CSIZMADIA, 1999) para os cálculos dos valores de pka de cada substância, para que o correto estado de protonação fosse utilizado. Em seguida, as substâncias 13, 14 e 15, bem como as selecionadas na busca feita no ZINC 15, foram ancoradas com o QuickVina 2.1 (HANDOKO et al., 2012; TROTT; OLSON, 2010), na enzima histona deacetilase, usando o mesmo procedimento e a mesma região de ancoramento descritos acima. As análises estatísticas foram iguais as do ancoramento anterior.

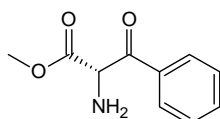
Figura 5 - Estruturas químicas de análogos das substâncias 13, 14 e 15, selecionadas por terem os maiores valores de escore de Tanimoto em buscas farmacofóricas feitas no banco de dados ZINC15.



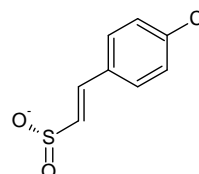
A) 6-fluoro-*N*,3-dimetil-1-benzotiofeno-2-carboxamida



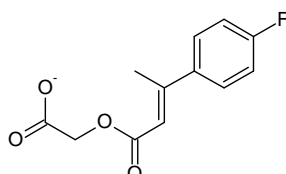
B) 1-benzotiofeno-2-carboxilato de 2-hidroxietila



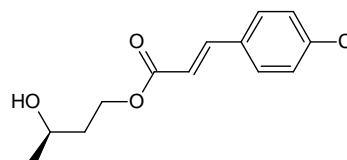
C) (2*S*)-2-amino-3-oxo-3-fenilpropanoato de metila



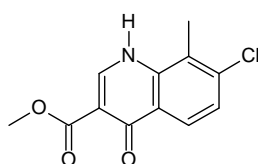
D) (*E*)-2-(4-clorofenil)etenilsulfinato



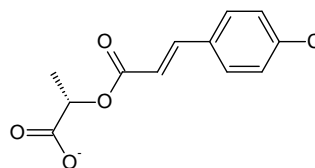
E) (((2*E*)-3-(4-fluorofenil)but-2-eno-il)oxi)acetato



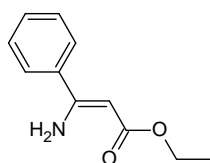
F) (2*R*)-4-(((2*E*)-3-(4-clorofenil)prop-2-enoil)-oxi)butan-2-ol



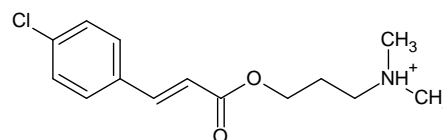
G) 7-cloro-8-metil-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato de metila



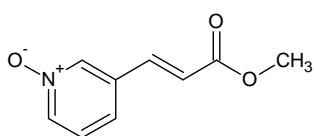
H) (2*S*)-2-(((2*E*)-3-(4-clorofenil)prop-2-enil)oxi)propanoato



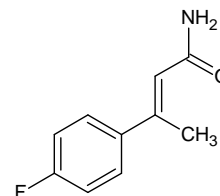
I) (2*Z*)-3-amino-3-fenilprop-2-enoato de etila



J) *N*-(3-(((2*E*)-3-(4-clorofenil)prop-2-enoil)oxi)propil)-*N,N*-dimetilamônio



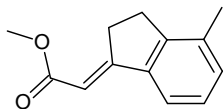
K) (2*E*)-3-(1-oxidopiridina-3-il)prop-2-enoato de metila



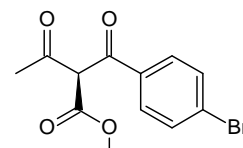
L) (2*E*)-3-(4-fluorofenil)but-2-enamida

Fonte: Do autor (2020).

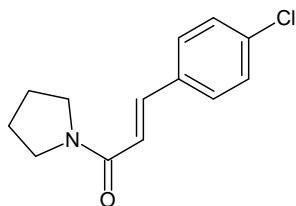
Figura 6 - Estruturas químicas de análogos das substâncias 13, 14 e 15, selecionadas por terem os maiores valores de escore de Tanimoto em buscas farmacofóricas feitas no banco de dados ZINC15.



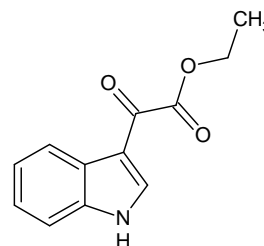
**M)** (2E)-4-metil-2,3-diidro-1H-inden-1-il-ideno)etanoato de metila



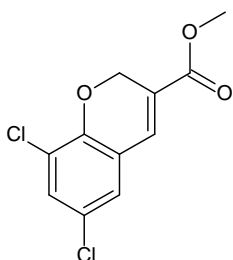
**N)** (2S)-2-((4-bromofenil)carbonil)-3-oxobutanoato de metila



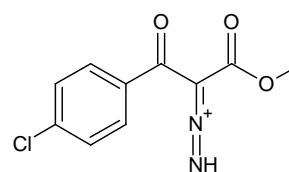
**O)** (2E)-3-(4-clorofenil)-1-(pirrolidin-1-il)prop-2-en-1-ona



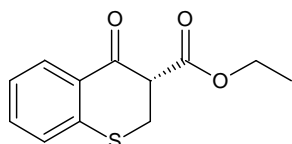
**P)** 1H-indol-3-il(oxo)acetato de etila



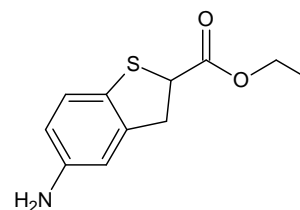
**Q)** 6,8-dicloro-2H-cromeno-3-carboxilato de metila



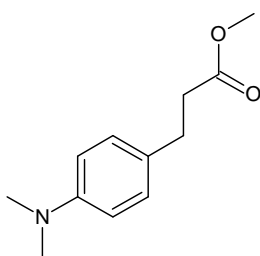
**R)** (1-(4-clorofenil)-3-metoxi-1,3-dioxopropan-2-ilideno)diazenium



**S)** (3R)-4-oxo-3,4-dihidro-2H-tiocromeno-3-carboxilato de etila



**T)** 5-amino-2,3-diidro-1-benzotiofeno-2-carboxilato de etila



**U)** 3-(4-(dimetilamino)fenil)propanoato de metila

Fonte: Do autor (2020).

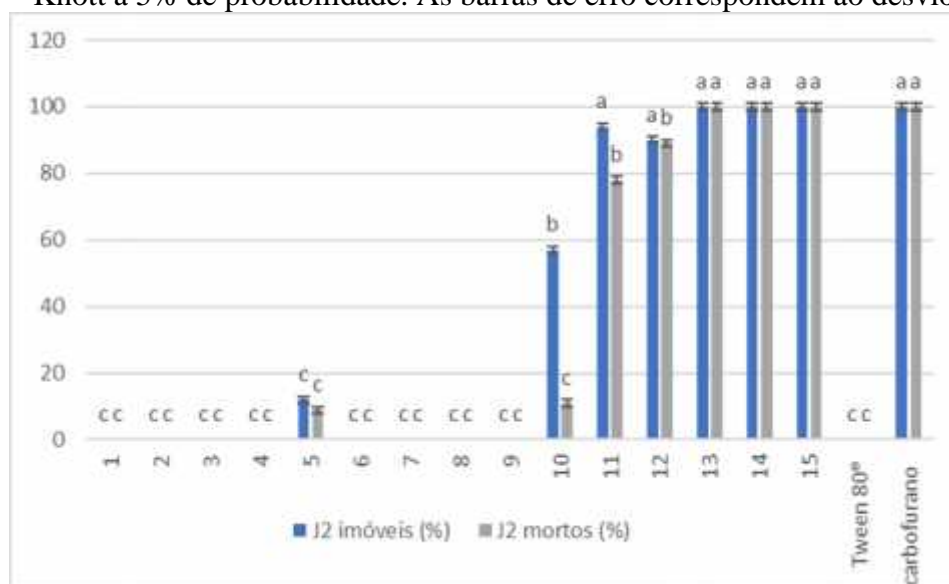


### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Motilidade e mortalidade *in vitro* de J2 de *M. incognita* expostos a ésteres do ácido (*E*)-cinâmico.

Das quinze substâncias testadas, somente as identificadas como 10-15 reduziram a mobilidade do nematoide, com destaque para as substâncias 11-15, que apresentaram valores estatisticamente iguais ao observado para o nematicida carbofurano. Dentre tais substâncias, as únicas que apresentaram valores de J2 mortos estatisticamente iguais ao do carbofurano foram as de número 13, 14 e 15 (FIGURA 7).

Figura 7 - Efeitos dos ésteres do ácido (*E*)-cinâmico sobre a motilidade e mortalidade de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*. Médias seguidas da mesma letra em barra com a mesma cor, não diferem entre si pelo teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade. As barras de erro correspondem ao desvio padrão.



Fonte: Do autor (2020).

De acordo aos resultados, pode se perceber que a presença de um substituinte eletronegativo no anel, pode melhorar ou piorar a atividade nematicida dos análogos do ácido (*E*)-cinâmico testados. Este fenômeno pode se observar nas substâncias 7, 10, 11 e 12. No caso da substância 7, a presença de um grupo nitro.

Quanto a substância 10, percebe-se que o átomo de iodo influenciou negativamente na atividade nematicida, podendo-se dever ao fato de sua baixa reatividade quando comparada com outros halogênios. Quando analisados os compostos 11 e 12 observou-se que o fato de

conter um substituinte com maior eletronegatividade como o oxigênio do radical metoxi (12) melhora consideravelmente o efeito biológico da substância. Estes resultados se aproximam com os obtidos em estudos anteriores, onde o (*E*)-*p*-metoxicinamato de etila e o (*E*)-cinamato de etila, tiveram atividade sobre o fitonematoide *Heterodera avenae* Wollenweber, e previamente sobre *B. xylophilus* e *M. incognita* (LI et al., 2017). Um fato importante é que as duas substâncias mencionadas não foram tóxicas a mamíferos ( $DL_{50} > 2000 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) (UMAR et al., 2012).

### 3.2 Concentração letal de ésteres do ácido (*E*)-cinâmico para 50 % ( $CL_{50}$ ) dos J2 de *M. incognita*

Dentre as substâncias mais ativas *in vitro* contra J2 *M. incognita*, em concentração única (FIGURA 8), a de menor valor de  $CL_{50}$  foi a de número 14, seguida pelas substâncias 13 e 15 (TABELA 1). Tais valores foram aproximadamente da mesma ordem de grandeza da  $CL_{50}$  observada para o carbofurano e em torno de cinco vezes superiores aos valores observados para a fluensulfona e para o (*E*)-cinamaldeído.

Tabela 1 - Concentrações letais para 50 % ( $CL_{50}$ ) dos juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*, calculadas para as substâncias 13, 14 e 15, bem como para (*E*)-cinamaldeído, carbofurano e fluensulfona.

Substância	$CL_{50} \pm \text{erro} (\mu\text{g mL}^{-1})$	
	Teste I	Teste II
<b>13</b>	$169,8 \pm 6,0$	$167,7 \pm 7,3$
<b>14</b>	$99,2 \pm 3,9$	$92,85 \pm 2,7$
<b>15</b>	$226,5 \pm 5,9$	$205,7 \pm 3,2$
Carbofurano	$159,5 \pm 5,6$	
( <i>E</i> )-cinamaldeído	$33,8 \pm 1,4$	
Fluensulfona	$34,3 \pm 6,6$	

Fonte: Do autor (2020).

Os resultados sugerem que existem diferenças químicas favorecidas pelos halogênios contidos nas estruturas 13, 14 e 15, os quais podem contribuir e diferenciar a atividade nematicida entre as substâncias testadas. Algumas características como: comprimentos de ligações carbono-halogênio, eletronegatividade, polaridade ou momentos dipolo e valores de  $pK_a$ , são frequentemente utilizadas no desenvolvimento de novos agroquímicos (JESCHKE, 2017). Em decorrência disto, durante os últimos 35 anos tem se aproveitado as propriedades

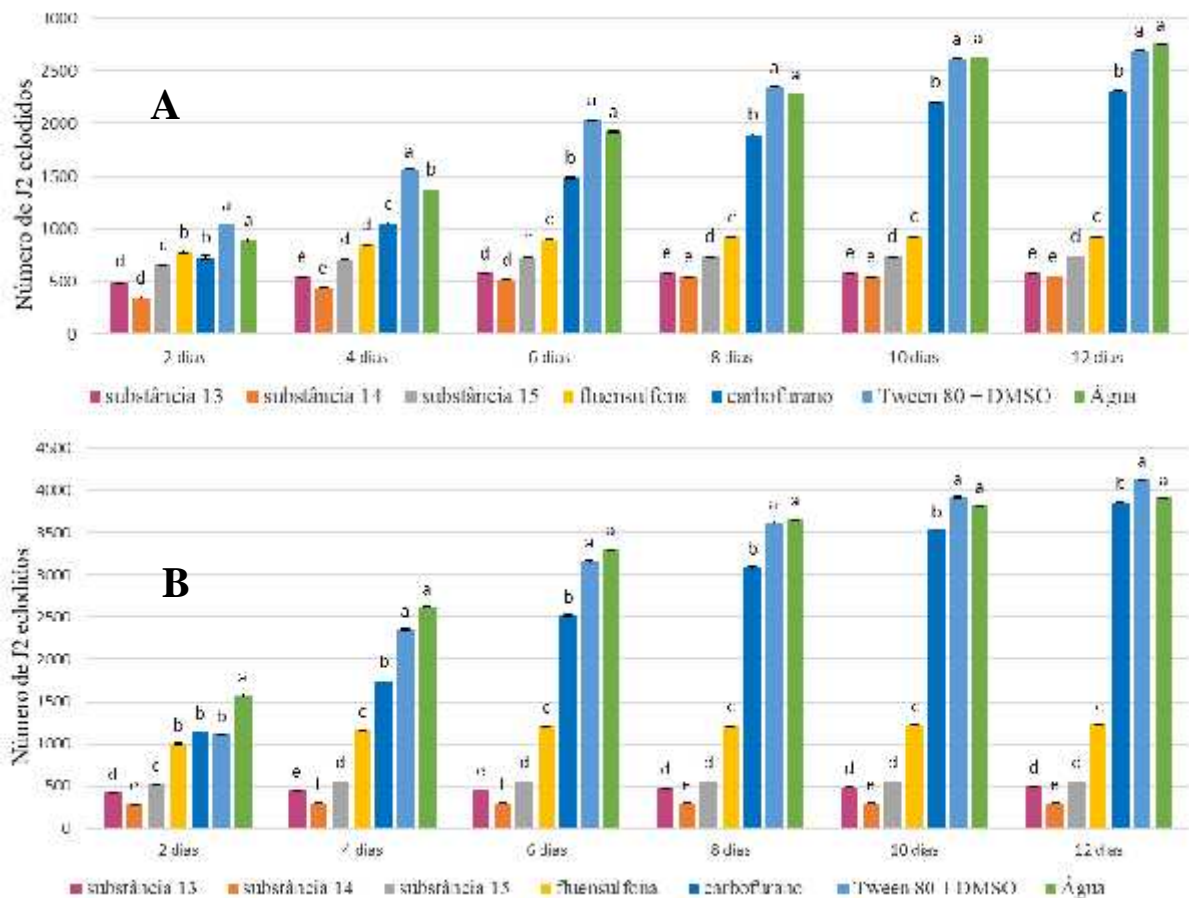
de estabilidade metabólica, oxidativa, térmica e lipofílicas dos halogênios para desenvolver inseticidas, herbicidas e nematicidas com melhor performance (JESCHKE, 2010). Da mesma maneira, observou-se que os valores de controle letal médio (CL<sub>50</sub>) das substâncias 13, 14 e 15 não atingiram valores satisfatórios quando comparados com o nematicida comercial fluensulfona, devido ao fato de ser uma molécula mais complexa com vários halogênios ligados na sua estrutura. Porém, as substâncias 13, 14 e 15 conseguiram melhorar a atividade biológica significativamente frente ao nematicida tradicional carbofurano, o qual apresenta vários átomos eletronegativos na sua estrutura e diferentes possibilidades de interagir com outras moléculas a través de ligações de hidrogênio.

Os valores de CL<sub>50</sub> das substâncias 13, 14 e 15 mostraram semelhanças com outros trabalhos, onde o (*E*)-*p*-metoxi cinamato de etila apresentou CL<sub>50</sub>: 83 µg mL<sup>-1</sup> e o (*E*)-cinamato de etila CL<sub>50</sub>: 100,6 µg mL<sup>-1</sup> sobre o fitonematoide *Heterodera avenae* Wollenweber (LI et al., 2017), sendo estas concentrações maiores para as encontradas por outros autores, onde o (*E*)-cinamato de metila e (*E*)-cinamato de etila geraram 100% de mortalidade sobre fitonematoide *B. xylophilus* nas concentrações de 62,5 e 125 µg mL<sup>-1</sup> respectivamente, sugerindo que os efeitos nematicidas dos ésteres do ácido (*E*)-cinâmico estão ligados à espécie de nematoide e atribuem suas atividades à presença da carbonila e à dupla ligação na posição , dentro de suas estruturas (PARK; SEO; KIM, 2011).

### 3.3 Influência de ésteres do ácido (*E*)-cinâmico sobre a eclosão de J2 de *M. incognita*

Os ésteres do ácido (*E*)-cinâmico (substâncias 13, 14 e 15) inibiram a eclosão dos J2 de *M. incognita* quando comparados com os nematicidas carbofurano e fluensulfona. Tais ésteres foram estatisticamente diferentes dos tratamentos controle, com destaque para a substância 14, que apresentou os menores valores de J2 eclodidos. Ainda vale mencionar que o carbofurano, foi bem menos eficiente do que a fluensulfona, sendo evidente as suas diferenças nos valores finais de eclosão de *M. incognita* (FIGURA 8).

Figura 8 - Eclusão de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* acumulada, após exposição dos ovos por 48 h aos compostos 13, 14 e 15. Médias seguidas da mesma letra em barras referentes ao mesmo período de tempo, e no mesmo gráfico, não diferem entre si pelo teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade. Os resultados dos dois experimentos (A e B) são apresentados separadamente porque não foi possível atender aos princípios de normalidade e de homocedasticidade para a análise estatística dos dois experimentos em conjunto. As barras de erro correspondem ao desvio padrão.



Fonte: Do autor (2020).

Observa-se que a eclusão dos J2 foi inibida após exposição durante 48 h com as substâncias 13, 14 e 15, já que os tratamentos com estas substâncias somente permitiram eclodir ao redor de 500 J2. Diferente estatisticamente dos controles água e Tween 80 + DMSO, os quais tiveram entre 2600 e 4000 juvenis eclodidos (FIGURAS 9 e 10) após 12 dias e nos dois experimentos. Da mesma maneira, o tratamento com a fluensulfona permitiu a eclusão de ao redor de 1000 J2, sendo diferente estatisticamente dos análogos do ácido (*E*)-cinâmico. Trabalhos feitos por outros autores descrevem que o (*E*)-cinamato de etila e o (*E*)-

*p*-metoxicinamato de etila conseguiram 100% de inibição da eclosão de J2 de *M. incognita* na concentração de 125 µg mL<sup>-1</sup> (LEE et al., 2011).

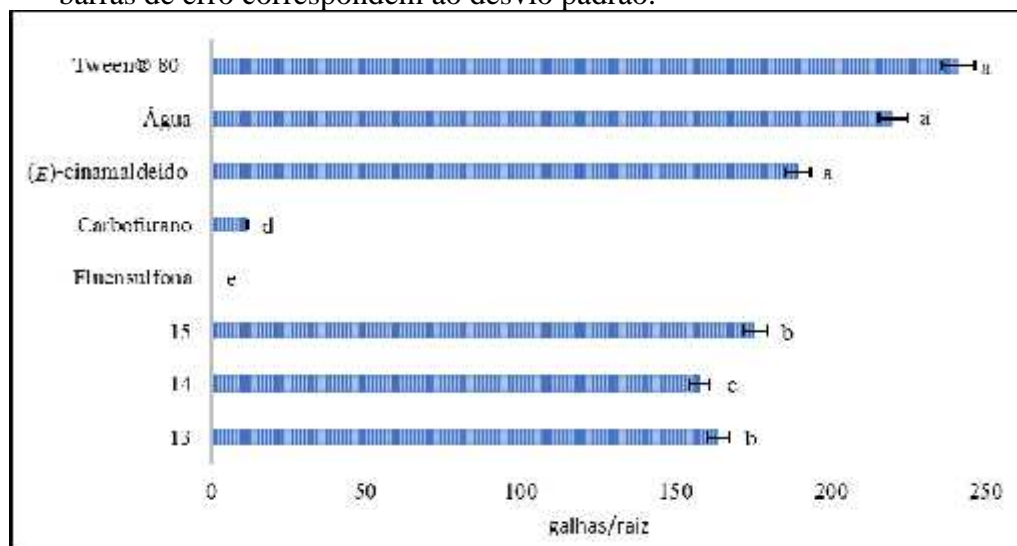
O carbofurano inibiu fracamente a eclosão dos nematoides, permitindo eclodir mais de dois mil nematoides no final do teste. Isto ratifica a baixa eficiência deste nematicida sobre ovos. A mesma tendência foi observada em outros trabalhos, onde o carbofurano atingiu a inibição do 100% dos J2 de *M. incognita* somente na concentração de 1000 µg mL<sup>-1</sup> (LEE et al., 2011).

A tendência de bioatividade para as substâncias avaliadas continua destacando a molécula 14 frente a 13 e 15, sendo coerente com os valores de CL<sub>50</sub> para cada uma delas. Porém, observou-se que na concentração de 200 µg mL<sup>-1</sup> (~ 7 vezes sua CL<sub>50</sub>), a fluensulfona não foi o melhor tratamento, isto sugere que tanto as substâncias 13, 14 e 15, como a fluensulfona deveriam apresentar concentrações letais meias sobre ovos diferentes das obtidas sobre J2. A capacidade dos ésteres do ácido (*E*)-cinâmico de inibir a eclosão dos J2, é uma característica relevante, já que o estágio de ovo nos nematoides é considerado o mais resistente no seu ciclo de vida (WHARTON, 2002). Em decorrência, as substâncias 13, 14 e 15 poderiam ser úteis no desenvolvimento de nematicidas com efeito ovicida.

#### **3.4 Efeito de ésteres do ácido (*E*)-cinâmico sobre *M. incognita* em tomateiros inoculados com J2 do nematoide.**

Dentre os ésteres do ácido (*E*)-cinâmico testados, a substância 14 foi a que causou maior redução no número de galhas (FIGURA 10). Todos os ésteres foram mais eficientes do que o (*E*)-cinamaldeído, que apresentou resultado estatisticamente igual ao observado para os controles água e Tween 80®. Os melhores tratamentos foram os nematicidas carbofurano e fluensulfona.

Figura 9 - Efeito dos ésteres do ácido (*E*)-cinâmico (compostos 13, 14 e 15) sobre a formação de galhas em mudas de tomateiro após 20 dias de inoculação com juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne incognita*. Barras com a mesma letra, no gráfico, não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott e Knott ( $P < 0,05$ ). As barras de erro correspondem ao desvio padrão.



Fonte: Do autor (2020).

Segundo os resultados, os ésteres do ácido (*E*)-cinâmico testados, tiveram melhor eficiência sobre condições de casa de vegetação quando comparados com o aldeído, sugerindo que estas substâncias não são facilmente afetadas pelos fatores ambientais, diferente do (*E*)-cinamaldeído quem diminuiu sua persistência e conseqüentemente sua capacidade de inibir a formação de galhas. A fluensulfona teve melhor efeito inibidor da formação de galhas quando comparada com o carbofurano, isto é produto de sua alta atividade nematicida ( $CL_{50} < 40 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), porém o carbofurano pode ser absorvido pelas raízes atingindo os nematoides dentro da planta e com isto, inibindo a formação de galhas (STEFFEN et al., 2011).

Vários estudos sobre a atividade nematicida dos ésteres do ácido (*E*)-cinâmico, ratificam a eficácia deles sobre estádios juvenis de diferentes nematoides (ASADI et al., 2015; SULTANA et al., 2010).

### 3.5 Estudo *in silico*: busca conformacional para as substâncias 13, 14 e 15.

O processo de dinâmica molecular, empregando a mecânica molecular, gerou sete conformações diferentes para cada uma das substâncias 13, 14 e 15. Entretanto, após otimização de todas as conformações pelo emprego da mecânica quântica, apenas quatro de

tais conformações apresentavam energias correspondentes a populações acima de 1% de acordo com a distribuição de Boltzmann (TABELAS 2 e 3).

Tabela 2 - Valores de energia das conformações obtidas para a substância 13 após busca conformacional por dinâmica molecular (mecânica molecular empregando MMFF94) e subsequente otimização das melhores conformações usando a mecânica quântica (método semi-empírico com o Hamiltoniano PM7).

Conformações	Após dinâmica molecular	Após otimização com mecânica quântica	Distribuição de Boltzmann (%) *
	Energia (Kcal/mol)	Energia total (eV)	
1	1,6740	-2405,88487	31
2	1,6740	-2405,88529	31
3	2,3516	-2405,87164	18
4	2,3516	-2405,87344	20
5	10,6441	-2405,69804	0
6	10,6797	-2405,68856	0
7	10,6797	-2405,69631	0
<b>soma</b>			<b>100</b>

\* Calculada com base nas energias obtidas através da otimização com mecânica quântica.

Fonte: Do autor (2020).

Tabela 3 - Valores de energia das conformações obtidas para a substância 14 após busca conformacional por dinâmica molecular (mecânica molecular empregando MMFF94) e subsequente otimização das melhores conformações usando a mecânica quântica (método semi-empírico com o Hamiltoniano PM7).

Conformações	Após dinâmica molecular	Após otimização com mecânica quântica	Distribuição de Boltzmann (%) *
	Energia (Kcal/mol)	Energia total (eV)	
1	3,2814	-2207,22312	31
2	3,2814	-2207,22312	29
3	3,9531	-2207,21312	21
4	3,9531	-2207,21312	19
5	12,2505	-2207,04851	0
6	12,2813	-2207,03831	0
7	12,2813	-2207,04110	0
<b>soma</b>			<b>100</b>

\* Calculada com base nas energias obtidas através da otimização com mecânica quântica.

Fonte: Do autor (2020).

Tabela 4 - Valores de energia das conformações obtidas para a substância 15 após busca conformacional por dinâmica molecular (mecânica molecular empregando MMFF94) e subsequente otimização das melhores conformações usando a mecânica quântica (método semi-empírico com o Hamiltoniano PM7).

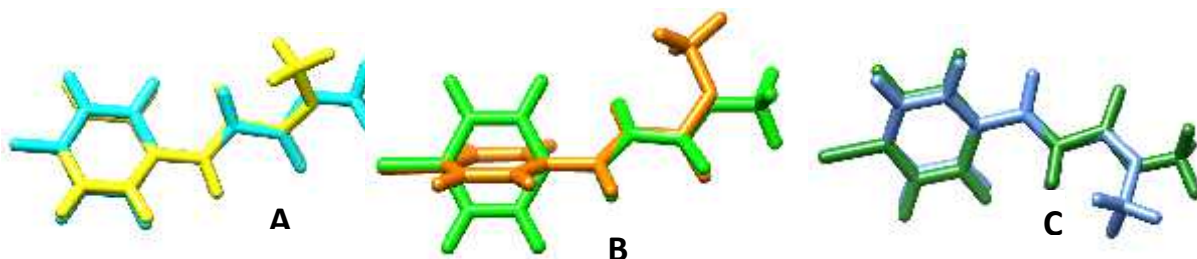
Conformações	Após dinâmica molecular	Após otimização com mecânica quântica	Distribuição de Boltzmann (%) *
	Energia (Kcal/mol)	Energia total (eV)	
1	4,5761	-2162,61308	30
2	4,5761	-2162,61114	28
3	5,2537	-2162,60414	21
4	5,2537	-2162,60301	20
5	13,5428	-2162,41512	0
6	13,5783	-2162,42697	0
7	13,5783	-2162,42439	0
<b>soma</b>			100

\* Calculada com base nas energias obtidas através da otimização com mecânica quântica.

Fonte: Do autor (2020).

De modo geral, as maiores diferenças entre as conformações, após a otimização através da mecânica quântica, estão relacionadas ao posicionamento do grupo metil (FIGURA 10). Isto sugere que, para redução da energia total do sistema, existe uma tendência de alinhamento de todos os orbitais  $\pi$ , de forma a maximizar as interações por ressonância (ALVES, 2012).

Figura 10 - Estruturas tridimensionais das conformações com maiores e menores valores de energias para as substâncias A. 13 (melhor conformação azul); B. 14 (melhor conformação verde claro) e C. 15 (melhor conformação verde escuro).



Fonte: Do autor (2020).



### **3.6 Busca farmacofórica no banco de dados do Ligand Expo para a seleção de potenciais alvos enzimáticos.**

Na busca farmacofórica para as melhores conformações das **substâncias 13, 14 e 15**, obtiveram-se, respectivamente, 24, 29 e 23 complexos de proteínas com ligantes que apresentavam escores de Tanimoto iguais ou superiores a 0,625 (TABELAS 5, 6 e 7). Além disto, observou-se que vários complexos eram repetidos na busca farmacofórica feita para cada uma das substâncias e inter-substâncias.

Tabela 5 - Resultados busca farmacofórica no banco de dados do Ligand-Expo, para a substância 13.

Escore de Tanimoto	Complexo: Proteína + ligante	Proteína: organismo
0,866	4yil_4D3_1_A_404__E	NADPH dehydrogenase 1: <i>Saccharomyces pastorianus</i>
0,800	4ync_4EG_1_A_402__C	NADPH dehydrogenase 1: <i>Saccharomyces pastorianus</i>
0,705	3qm1_ZYC_1_A_245__B	Cinnamoyl esterase: <i>Lactobacillus johnsonii</i>
0,705	3pfb_ZYC_1_B_264__X	Cinnamoyl esterase: <i>Lactobacillus johnsonii</i>
0,666	5n4z_8MK_1_A_401__C	Serine/threonine-protein kinase pim-1: <i>Homo sapiens</i>
0,666	2nn7_M29_1_B_312__G	Carbonic anhydrase 1: <i>Homo sapiens</i>
0,666	2nn7_M29_1_B_312__F	Carbonic anhydrase 1: <i>Homo sapiens</i>
0,666	2nn7_M29_1_A_311__E	Carbonic anhydrase 1: <i>Homo sapiens</i>
0,666	2nn7_M29_1_A_311__D	Carbonic anhydrase 1: <i>Homo sapiens</i>
0,625	5jmx_DZ5_1_A_304__E	Metallo-beta-lactamase type 2: <i>Bacillus cereus</i>
0,625	3p9k_CIY_1_D_604__L	Caffeic acid O-methyltransferase: <i>Lolium perenne</i>
0,625	3p9k_CIY_1_C_603__J	Caffeic acid O-methyltransferase: <i>Lolium perenne</i>
0,625	3p9k_CIY_1_B_602__H	Caffeic acid O-methyltransferase: <i>Lolium perenne</i>
0,625	3p9k_CIY_1_A_601__F	Caffeic acid O-methyltransferase: <i>Lolium perenne</i>
0,625	6gxa_TB8_1_D_504__BA	Histone deacetylase: <i>Schistosoma mansoni</i>
0,625	6gxa_TB8_1_C_504__U	Histone deacetylase: <i>Schistosoma mansoni</i>
0,625	6gxa_TB8_1_B_504__N	Histone deacetylase: <i>Schistosoma mansoni</i>
0,625	6gxa_TB8_1_A_504__H	Histone deacetylase: <i>Schistosoma mansoni</i>
0,625	5jmx_DZ5_1_A_304__E	Metallo-beta-lactamase type 2: <i>Bacillus cereus</i>
0,625	4cuq_5K3_1_A_2971__B	Romodomain adjacente to zinc finger domain protein 2B: <i>Homo sapiens</i>
0,625	2ilp_GB5_1_B_600__G	Botulinum neurotoxin A light-chain: <i>Clostridium botulinum</i>
0,625	2ilp_GB5_1_B_600__F	Botulinum neurotoxin A light-chain: <i>Clostridium botulinum</i>
0,625	2ilp_GB5_1_A_600__G	Botulinum neurotoxin A light-chain: <i>Clostridium botulinum</i>
0,625	2ilp_GB5_1_A_600__E	Botulinum neurotoxin A light-chain: <i>Clostridium botulinum</i>

Fonte: Do autor (2020).

Tabela 6 - Resultados busca farmacofórica no banco de dados do Ligand-Expo, para a substância 14.

<b>Escore de Tanimoto</b>	<b>Complexo: Proteína + ligante</b>	<b>Proteína: organismo</b>
0,800	4ync_4EG_1_A_402__C	NADPH dehydrogenase 1: <i>Saccharomyces pastorianus</i>
0,750	4yil_4D3_1_A_404__E	NADPH dehydrogenase 1: <i>Saccharomyces pastorianus</i>
0,733	2ilp_GB5_1_B_600__G	Botulinum neurotoxin A light-chain: <i>Clostridium botulinum</i>
0,733	2ilp_GB5_1_B_600__F	Botulinum neurotoxin A light-chain: <i>Clostridium botulinum</i>
0,733	2ilp_GB5_1_A_600__G	Botulinum neurotoxin A light-chain: <i>Clostridium botulinum</i>
0,733	2ilp_GB5_1_A_600__E	Botulinum neurotoxin A light-chain: <i>Clostridium botulinum</i>
0,705	3qm1_ZYC_1_A_245__B	Cinnamoyl esterase: <i>Lactobacillus johnsonii</i>
0,705	3pfb_ZYC_1_B_264__X	Cinnamoyl esterase: <i>Lactobacillus johnsonii</i>
0,687	2ima_GB4_1_B_600__F	Botulinum neurotoxin A light-chain: <i>Clostridium botulinum</i>
0,687	2ima_GB4_1_A_600__E	Botulinum neurotoxin A light-chain: <i>Clostridium botulinum</i>
0,687	2ima_GB4_1_A_600__D	Botulinum neurotoxin A light-chain: <i>Clostridium botulinum</i>
0,666	5n4z_8MK_1_A_401__C	Serine/threonine-protein kinase pim-1: <i>Homo sapiens</i>
0,666	2nn7_M29_1_B_312__G	Carbonic anhydrase 1: <i>Homo sapiens</i>
0,666	2nn7_M29_1_B_312__F	Carbonic anhydrase 1: <i>Homo sapiens</i>
0,666	2nn7_M29_1_A_311__E	Carbonic anhydrase 1: <i>Homo sapiens</i>
0,666	2nn7_M29_1_A_311__D	Carbonic anhydrase 1: <i>Homo sapiens</i>
0,625	5fnk_5OO_1_A_1267__G	Carbonic anhydrase 2: <i>Homo sapiens</i>
0,625	5fls_6ZX_1_A_1263__D	Carbonic anhydrase 2: <i>Homo sapiens</i>
0,625	5ehw_5OO_1_A_303__D	Carbonic anhydrase 2: <i>Homo sapiens</i>
0,625	2ilp_GB5_1_B_600__F	Botulinum neurotoxin A light-chain: <i>Clostridium botulinum</i>
0,625	2ilp_GB5_1_A_600__G	Botulinum neurotoxin A light-chain: <i>Clostridium botulinum</i>
0,625	2ilp_GB5_1_A_600__E	Botulinum neurotoxin A light-chain: <i>Clostridium botulinum</i>
0,625	6gxa_TB8_1_D_504__BA	Histone deacetylase: <i>Schistosoma mansoni</i>
0,625	6gxa_TB8_1_C_504__U	Histone deacetylase: <i>Schistosoma mansoni</i>
0,625	6gxa_TB8_1_B_504__N	Histone deacetylase: <i>Schistosoma mansoni</i>
0,625	6gxa_TB8_1_A_504__H	Histone deacetylase: <i>Schistosoma mansoni</i>
0,625	5fnk_5OO_1_A_1267__G	Carbonic anhydrase 2: <i>Homo sapiens</i>
0,625	5fls_6ZX_1_A_1263__D	Carbonic anhydrase 2: <i>Homo sapiens</i>
0,625	5ehw_5OO_1_A_303__D	Carbonic anhydrase 2: <i>Homo sapiens</i>

Fonte: Do autor (2020).

Tabela 7 - Resultados busca farmacofórica no banco de dados do Ligand-Expo, para a substância 15.

Escore de Tanimoto	Complexo: Proteína + ligante	Proteína: organismo
0,800	4ync_4EG_1_A_402__C	NADPH dehydrogenase 1: <i>Saccharomyces pastorianus</i>
0,750	4yil_4D3_1_A_404__E	NADPH dehydrogenase 1: <i>Saccharomyces pastorianus</i>
0,705	3qm1_ZYC_1_A_245__B	Cinnamoyl esterase: <i>Lactobacillus johnsonii</i>
0,705	3pfb_ZYC_1_B_264__X	Cinnamoyl esterase: <i>Lactobacillus johnsonii</i>
0,666	5n4z_8MK_1_A_401__C	Serine/threonine-protein kinase pim-1: <i>Homo sapiens</i>
0,666	5afj_42R_1_E_1205__FA	Acetylcholine-binding protein, neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-7: <i>Homo sapiens, Lymnaea stagnalis</i>
0,666	5afj_42R_1_D_1205__Z	Acetylcholine-binding protein, neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-7: <i>Homo sapiens, Lymnaea stagnalis</i>
0,666	5afj_42R_1_C_1205__R	Acetylcholine-binding protein, neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-7: <i>Homo sapiens, Lymnaea stagnalis</i>
0,666	5afj_42R_1_A_1205__H	Acetylcholine-binding protein, neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-7: <i>Homo sapiens, Lymnaea stagnalis</i>
0,666	2nn7_M29_1_B_312__G	Carbonic anhydrase 1: <i>Homo sapiens</i>
0,666	2nn7_M29_1_B_312__F	Carbonic anhydrase 1: <i>Homo sapiens</i>
0,666	2nn7_M29_1_A_311__E	Carbonic anhydrase 1: <i>Homo sapiens</i>
0,666	2nn7_M29_1_A_311__D	Carbonic anhydrase 1: <i>Homo sapiens</i>
0,625	6gxa_TB8_1_D_504__BA	Histone deacetylase: <i>Schistosoma mansoni</i>
0,625	6gxa_TB8_1_C_504__U	Histone deacetylase: <i>Schistosoma mansoni</i>
0,625	6gxa_TB8_1_B_504__N	Histone deacetylase: <i>Schistosoma mansoni</i>
0,625	6gxa_TB8_1_A_504__H	Histone deacetylase: <i>Schistosoma mansoni</i>
0,625	2ilp_GB5_1_B_600__G	Botulinum neurotoxin A light-chain: <i>Clostridium botulinum</i>
0,625	2ilp_GB5_1_B_600__F	Botulinum neurotoxin A light-chain: <i>Clostridium botulinum</i>
0,625	2ilp_GB5_1_A_600__G	Botulinum neurotoxin A light-chain: <i>Clostridium botulinum</i>
0,625	2ilp_GB5_1_A_600__E	Botulinum neurotoxin A light-chain: <i>Clostridium botulinum</i>
0,625	2xag_TCF_1_A_901__D	Lisine-specific histone demethylase 1: <i>Homo sapiens</i>
0,625	2xaf_TCF_1_A_901__D	Lisine-specific histone demethylase 1: <i>Homo sapiens</i>

Fonte: Do autor (2020).

Dos 76 complexos selecionados na busca farmacofórica (TABELAS 5 e 7), em apenas 18 deles o ligante identificado na referida busca se encontrava em cavidade na proteína e possuía algum efeito inibidor da ação da proteína (TABELA 8). Conseqüentemente, estes 18 complexos foram selecionados para a etapa seguinte do trabalho, pois se as substâncias 13, 14 e 15 são estruturalmente semelhantes aos inibidores das proteínas nestes 18 complexos, é provável que as substâncias 13, 14 e 15 também tenham algum efeito inibidor de tais proteínas

Tabela 8 - Proteínas selecionadas na busca farmacofórica com as conformações das substâncias 13, 14 e 15, cujos ligantes estavam em cavidades da proteína e inibiam a ação da mesma.

<b>Código*</b>	<b>Referências</b>	<b>Proteína: organismo</b>
2ILP	(SILVAGGI; BOLDT; HIXON; KENNEDY <i>et al.</i> , 2007)	Botulinum neurotoxin A light-chain: <i>Clostridium botulinum</i>
2IMA	(SILVAGGI; BOLDT; HIXON; KENNEDY <i>et al.</i> , 2007)	Botulinum neurotoxin A light-chain: <i>Clostridium botulinum</i>
2XAF	(BINDA; VALENTE; ROMANENGHI; PILOTTO <i>et al.</i> , 2010)	Lisine-specific histone demethylase 1: <i>Homo sapiens</i>
2XAG	(BINDA; VALENTE; ROMANENGHI; PILOTTO <i>et al.</i> , 2010)	Lisine-specific histone demethylase 1: <i>Homo sapiens</i>
2NN7	(SRIVASTAVA; JUDE; BANERJEE; HALDAR <i>et al.</i> , 2007)	carbonic anhydrase 1: <i>Homo sapiens</i>
3P9K	(LOUIE; BOWMAN; TU; MOURADOV <i>et al.</i> , 2010)	caffeic acid O-methyltransferase: <i>Lolium perenne</i>
3P9K	(LOUIE; BOWMAN; TU; MOURADOV <i>et al.</i> , 2010)	cinnamoyl esterase: <i>Lactobacillus johnsonii</i>
3QM1	(LAI; STOGIOS; VU; XU <i>et al.</i> , 2011)	cinnamoyl esterase: <i>Lactobacillus johnsonii</i>
4CUQ	Trabalho ainda por publicar	romodomain adjacent to zinc finger domain protein 2B: <i>Homo sapiens</i>
4YIL	(BRENNNA; CROTTI; GATTI; MONTI <i>et al.</i> , 2015)	NADPH dehydrogenase 1: <i>Saccharomyces pastorianus</i>
4YNC	(BRENNNA; CROTTI; GATTI; MONTI <i>et al.</i> , 2015)	NADPH dehydrogenase 1: <i>Saccharomyces pastorianus</i>
5AFJ	(SPURNY; DEBAVEYE; FARINHA; VEYS <i>et al.</i> , 2015)	Acetylcholine-binding protein, neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-7: <i>Homo sapiens, Lymnaea stagnalis</i>
5EHW	(WOODS; DOLEZAL; REN; RYAN <i>et al.</i> , 2016)	Carbonic anhydrase 2: <i>Homo sapiens</i>
5FLS	(WOODS; DOLEZAL; REN; RYAN <i>et al.</i> , 2016)	carbonic anhydrase 2: <i>Homo sapiens</i>
5FNK	(WOODS; DOLEZAL; REN; RYAN <i>et al.</i> , 2016)	carbonic anhydrase 2: <i>Homo sapiens</i>
5JMX	(ZHANG; MARKOULIDES; STEPANOV; RYDZIK <i>et al.</i> , 2018)	Metallo-beta-lactamase type 2: <i>Bacillus cereus</i>
5N4Z	Trabalho ainda por publicar	Serine/threonine-protein kinase pim-1: <i>Homo sapiens</i>
6GXA	(BAYER; CHAKRABARTI; LANCELOT; SHAIK <i>et al.</i> , 2018)	Histone deacetylase: <i>Schistosoma mansoni</i>

\* De acordo com o RCSB Protein Data Bank (Disponível em: <<https://www.rcsb.org>>

Fonte: Berman et al. (2000).

Como nenhuma das proteínas selecionadas (TABELA 8) era produzida por nematoides, as suas sequências de aminoácidos foram utilizadas para buscas por sequências de aminoácidos similares nos genomas de nematoides em geral. Apenas quatro apresentaram resultados com escores acima de 200 (TABELA 9). Entretanto, para nenhuma delas foi encontrado qualquer resultado com escore acima de 200 para um nematoide parasita de plantas. Isto sugeriu que tais proteínas não são produzidas por nematoides fitoparasitas, o que significa dizer que não devem ser os alvos das substâncias 13, 14 e 15 em *M. incognita*. Conseqüentemente, foi necessário utilizar outra abordagem como, por exemplo, a utilização do banco de dados do BRENDA (JESKE et al., 2018).

Tabela 9 - Resultados da busca por sequências de aminoácidos similares às das proteínas selecionadas (Tabela 2.8), com escores acima de 200, que foi feita pelo emprego dos programas computacionais Blastp 2.10.0+ e Tblastn 2.10.0, no banco de genomas de Nematode (Tax id 6231) do National Center for Biotechnology Information – NCBI.

<b>Código da proteína*</b>	<b>Referências</b>	<b>Número de sequências com escores acima de 200</b>
2XAG	(BINDA; VALENTE; ROMANENGHI; PILOTTO <i>et al.</i> , 2010)	73
2XAF	(BINDA; VALENTE; ROMANENGHI; PILOTTO <i>et al.</i> , 2010)	69
5N4Z	<a href="https://www.rcsb.org/structure/5n4z">https://www.rcsb.org/structure/5n4z</a>	116
6GXA	(BAYER; CHAKRABARTI; LANCELOT; SHAIK <i>et al.</i> , 2018)	100

\* De acordo com o RCSB Protein Data Bank (Disponível em: <<https://www.rcsb.org>>)  
Fonte: Bermam et al. (2000).

### **3.7 Busca de atividades biológicas para as substâncias 13, 14 e 15 e seus análogos no BRENDA.**

Encontraram-se sete enzimas que eram inibidas por análogos das substâncias 13, 14 e 15. Logo, era razoável esperar que estas substâncias também fossem capazes de inibir tais enzimas. Para cada uma destas enzimas, encontraram-se várias estruturas tridimensionais no RCSB Protein Data Bank, porém nenhuma delas era produzida por nematoides (TABELA 10). Logo, buscou-se averiguar se tais enzimas também poderiam ser produzidas por nematoides.

Tabela 10 - Enzimas escolhidas após busca no site especializado BRENDA, que eram inibidas por análogos das substâncias 13, 14 e 15. O número de estruturas tridimensionais identificadas no RCSB Protein Data Bank, bem como o organismo de origem de cada uma delas, também são apresentados.

Enzima	Organismo	Número de estruturas tridimensionais no RCSB PDB
-hidroxiesteroide desidrogenase	<i>Homo sapiens</i>	68
Histidina decarboxilase	<i>Homo sapiens</i>	185
Lacasse	<i>Perenniporia tephropora</i>	0
	<i>Melanocarpus albomyces</i>	9
	<i>Aspergillus niger</i>	3
	<i>Coprinopsis cinerea</i>	2
	<i>Coriolopsis trogii</i>	2
	<i>Steccherinum ochraceum</i>	4
	<i>Trametes hirsuta</i>	4
	<i>Cerrena</i>	3
	<i>Trametes sanguinea</i>	2
	<i>Trametes versicolor</i>	2
Carboxipeptidase A	<i>Bos taurus</i>	38
Fenilalanina amonia liase	<i>Rhodotorula glutinis</i>	3
Poligalacturase	<i>Aspergillus niger</i>	2
Polifenol oxidase	<i>Coffea arabica</i>	0
	<i>Coreopsis grandiflora</i>	7
	<i>Malus domestica</i>	3
	<i>Solanum lycopersicum</i>	2
	<i>Vitis vinifera</i>	1
	<i>Juglans regia</i>	1

Fonte: Do autor (2020).

Nenhuma destas enzimas (TABELA 10) tinha sequência de aminoácidos com escore acima de 200 em relação às sequências de aminoácidos identificadas nos genomas de nematoides (TABELA 11), sugerindo que tais enzimas não são produzidas por nematoides e, conseqüentemente, não podem ser os alvos das substâncias 13, 14 e 15 em *M. incognita*. Em decorrência, foi necessário adotar mais outra abordagem para selecionar potenciais alvos proteicos das substâncias 13, 14 e 15 em nematoides.



Tabela 11 - Resultados da busca por sequências de aminoácidos similares às das proteínas selecionadas (Tabela 2.10), com escores acima de 200, que foi feita pelo emprego dos programas computacionais Blastp 2.10.0+ e Tblastn 2.10.0, no banco de genomas de Nematode (Taxid 6231) do National Center for Biotechnology Information – NCBI.

<b>Proteína</b>	<b>Número de sequências com escores acima de 200</b>
-hidroxiesteroide desidrogenase	0
Histidina decarboxilase	0
Lacasse	0
Caboxipeptidase A	0
Fenilalanina amonia liase	0
Poligalacturase	0
Polifenol oxidase	0

Fonte: Do autor (2020).

### **3.8 Busca farmacofórica no banco de dados do ChEMBL para a seleção de potenciais alvos enzimáticos**

A busca farmacofórica na base de dados do ChEMBL, com as substâncias 13, 14 e 15, permitiu selecionar várias substâncias com valores altos de escore de Tanimoto (0,84). Porém, poucas destas substâncias selecionadas tinham atividades evidentes sobre enzimas (TABELAS 12,13 e 14).

Tabela 12 - Substâncias selecionadas na busca farmacofórica com a substância 13, na base de dados ChEMBL do PUBCHEM, com escores de Tanimoto 0,84, que inibem alguma enzima.

Escore de Tanimoto	Código PUBCHEM	Proteína	Substância selecionada na busca
1,000	958751	Glyoxalase I (humano)	(E)-4-fluorocinamato de metila
0,861	16452216	Calpain 1 (porco)	Ácido (E)-3-(4-fluorofenil)-2-sulfonilprop-2-en-óico
0,861	7649	Luciferase ( <i>Photinus pyralis</i> )	(E)-3-fenilprop-2-enoato de etila
0,861	5370693	Quinone oxidoreductase ( <i>Mus musculus</i> )	(E)-3-(2-hidroxifenil)-prop-2-enoato de metila
0,861	5319562	Carbonic anhydrase 12, 7, 2, 1, 14, 9 (humano)	(E)-4-hidroxicinamato de metila
0,843	444539	Histone deacetilase (humano), tankyrase (humano), ácido hidroxicarboxílico receptor 2 (humano) e Tirosina-proteína kinase SYK ( <i>Rattus norvegicus</i> ).	Ácido-(E)-cinâmico

Fonte: Do autor (2020).

Tabela 13 - Substâncias selecionadas na busca farmacofórica com a substância 14, na base de dados ChEMBL do PUBCHEM, com escores de Tanimoto 0,84, que inibem alguma enzima.

Escore de Tanimoto	Código PUBCHEM	Proteína	Ligante
0,920	637797	-glucosidase (human)	Ácido (E)-4-clorocinâmico

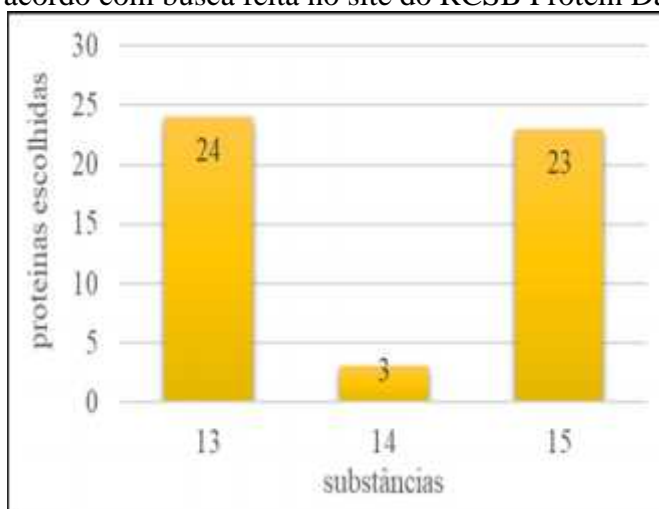
Fonte: Do autor (2020).

Tabela 14 - Substâncias selecionadas na busca farmacofórica com a substância 15, na base de dados ChEMBL do PUBCHEM, com escores de Tanimoto 0,84, que inibem alguma enzima.

Escore de Tanimoto	Código PUBCHEM	Proteína	Ligante
0,857	16633992	Calpain 1 (suíno)	Ácido (Z)-3-(4-Bromofenil)-2-sulfonilprop-2-enóico
0,857	7649	Luciferase- <i>Photinus pyralis</i>	(E)-3-fenilprop-2-enoato de etila
0,857	5370693	Quinone oxidoreductase - <i>Mus musculus</i>	(E)-3-(2-hidroxifenil)prop-2-enoato de metila
0,857	5319562	Carbonic anhydrase 12, 7, 2, 1, 14, 9 (humano)	(E)-4-hidroxicinamato de metila
0,846	444539	Histone deacetilase (humano), tankyrase (humano), ácido hidroxicarboxílico receptor 2 (humano) e Tirosina-proteína kinase SYK ( <i>Rattus norvegicus</i> ).	Ácido-(E)-cinâmico

Encontraram-se 50 estruturas tridimensionais (FIGURA 11) no RCSB Protein Data Bank, para as proteínas selecionadas (TABELAS 12 e 14). Em princípio, elas devem ser inibidas pelas substâncias selecionadas na busca farmacofórica, bem como pelas substâncias 13, 14 e 15, que são estruturalmente similares à tais substâncias selecionadas.

Figura 11 - Número de estruturas tridimensionais para as proteínas escolhidas (TABELAS 12 e 14), de acordo com busca feita no site do RCSB Protein Data Bank.



Fonte: Do autor (2020).

Quando as sequências de aminoácidos das proteínas selecionadas (TABELAS 12 e 14 e FIGURA 12) foram empregadas para buscas por sequências similares no genoma de nematoides em geral, observaram-se 19 proteínas escores acima de 200 (TABELA 15), o que sugeria que os nematoides podiam produzir tais proteínas. Logo, elas poderiam ser alvos das substâncias 13, 14 e 15 em *M. incognita*.

Tabela 15 - Resultados da busca por sequências de aminoácidos similares às das proteínas selecionadas, com escores acima de 200, que foi feita pelo emprego dos programas computacionais Blastp 2.10.0+ e Tblastn 2.10.0, no banco de genomas de nematoides (Taxid 6231) do National Center for Biotechnology Information – NCBI. (continua)

<b>Código da proteína*</b>	<b>Referência</b>	<b>Número de sequências com escores acima de 200</b>
1QIN	(CAMERON; RIDDERSTRÖM; OLIN; KAVARANA <i>et al.</i> , 1999)	12
4PHN	(ADAMS; RIZKALLAH; MILLER; ROBINSON <i>et al.</i> , 2014)	343
1BA3	(FRANKS; JENKINS; CONTI; LIEB <i>et al.</i> , 1998)	527
3IES	(AULD; LOVELL; THORNE; LEA <i>et al.</i> , 2010)	533
1CA2	(ERIKSSON; JONES; LILJAS, 1988)	374
3EFT	(CIANI; CECCHI; TEMPERINI; SUPURAN <i>et al.</i> , 2009)	365
5BNL	(MARESCA; TEMPERINI; POCHET; MASEREEL <i>et al.</i> , 2015)	374
3F8E	(MARESCA; TEMPERINI; VU; PHAM <i>et al.</i> , 2009)	365
1T64	(SOMOZA; SKENE; KATZ; MOL <i>et al.</i> , 2004)	605
3UH4	(KIRBY; CHEUNG; FAZAL; SHULTZ <i>et al.</i> , 2012)	30
3KR8	(KARLBERG; MARKOVA; JOHANSSON; HAMMARSTRÖM <i>et al.</i> , 2010)	35
3MHJ	(WAHLBERG; KARLBERG; KOUZNETSOVA; MARKOVA <i>et al.</i> , 2012)	32

Fonte: Do autor (2020).

Tabela 16 - Resultados da busca por sequências de aminoácidos similares às das proteínas selecionadas, com escores acima de 200, que foi feita pelo emprego dos programas computacionais Blastp 2.10.0+ e Tblastn 2.10.0+, no banco de genomas de Nematode (Taxid 6231) do National Center for Biotechnology Information – NCBI. (conclusão)

Proteína	Referência	Resultados Blastp 2.10.0+ e Tblastn 2.10.0+	
		Nematode (Taxid:6231)	Meloidogynidae (taxid:315429) e Heteroderidae (taxid:6301)
3MHK	(WAHLBERG; KARLBERG; KOUZNETSOVA; MARKOVA <i>et al.</i> , 2012)	30	0
3P0N	(WAHLBERG; KARLBERG; KOUZNETSOVA; MARKOVA <i>et al.</i> , 2012)	31	0
3P0P	(WAHLBERG; KARLBERG; KOUZNETSOVA; MARKOVA <i>et al.</i> , 2012)	33	0
3U9H	(NARWAL; VENKANNAGARI; LEHTIÖ, 2012)	33	0
Q8TET4	(HIRSCHHORN; HUIE; KASPER, 2002)	598	0
O43451	(NICHOLS; ELDERING; AVERY; HAHN <i>et al.</i> , 1998)	665	0
P10253	(HOEFSLOOT; HOOGEVEEN WESTERVELD; KROOS; VAN BEEUMEN <i>et al.</i> , 1988)	631	0

\* De acordo com o RCSB Protein Data Bank (Disponível em: <<https://www.rcsb.org>>). Berman et al. (2000).

Dentre as enzimas selecionadas (TABELAS 15 e 16), a única com escores, coberturas e identidades acima de 200, 60 % e 28 %, respectivamente, para *Caenorhabditis elegans* e para um nematoide fitoparasita, foi a enzima 1T64, que se trata de uma histona deacetilase (SOMOZA et al., 2004) (TABELA 17). Tais resultados sugeriam que esta proteína era aquela com maior probabilidade de ser o alvo das substâncias 13, 14 e 15 em *M. incognita*.

Tabela 17 - Proteínas com escores, coberturas e identidades acima de 200, 60 % e 28 %, respectivamente, para *Caenorhabditis elegans* ou para um nematoide fitoparasita. (continua)

<b>Código da proteína</b>	<b>Referências</b>	<b>Nome da proteína</b>	<b>Escore</b>	<b>Cobertura (%)</b>	<b>Identidade (%)</b>	<b>Organismo</b>
4PHN	(ADAMS; RIZKALLAH; MILLER; ROBINSON <i>et al.</i> , 2014)	Calpain small subunit 1	205	99	28	<i>C. elegans</i>
1BA3	(FRANKS; JENKINS; CONTI; LIEB <i>et al.</i> , 1998)	Luciferase	469	95	34	<i>C. elegans</i>
3IES	(AULD; LOVELL; THORNE; LEA <i>et al.</i> , 2010)	Luciferin 4-monooxygenase	277	80	38	<i>C. elegans</i>
1CA2	(ERIKSSON; JONES; LILJAS, 1988)	Carbonic anhydrase 2	291	97	34	<i>C. elegans</i>
3EFT	(CIANI; CECCHI; TEMPERINI; SUPURAN <i>et al.</i> , 2009)	Carbonic anhydrase 2	293	98	34	<i>C. elegans</i>
5BNL	(MARESCA; TEMPERINI; POCHET; MASEREEL <i>et al.</i> , 2015)	Carbonic anhydrase 2	291	98	34	<i>C. elegans</i>
3F8E	(MARESCA; TEMPERINI; VU; PHAM <i>et al.</i> , 2009)	Carbonic anhydrase 2	293	98	34	<i>C. elegans</i>
1T64	(SOMOZA; SKENE; KATZ; MOL <i>et al.</i> , 2004)	Histone deacetylase 8	298	90	41	<i>B. xylophilus</i>
1T64	(SOMOZA; SKENE; KATZ; MOL <i>et al.</i> , 2004)	Histone deacetylase	421	96	41	<i>C. elegans</i>
1T64	(SOMOZA; SKENE; KATZ; MOL <i>et al.</i> , 2004)	CBN-HDA-3 protein	421	98	40	<i>C. elegans</i>
1T64	(SOMOZA; SKENE; KATZ; MOL <i>et al.</i> , 2004)	Protein CBR-HDA-3	416	95	41	<i>C. elegans</i>

Tabela 17 - Proteínas com escores, coberturas e identidades acima de 200, 60 % e 28 %, respectivamente, para *Caenorhabditis elegans* ou para um nematoide fitoparasita. (conclusão).

1T64	(SOMOZA; SKENE; KATZ; MOL <i>et al.</i> , 2004)	CBRHDA-1 protein	412	96	40	<i>C. elegans</i>
1T64	(SOMOZA; SKENE; KATZ; MOL <i>et al.</i> , 2004)	Histone deacetylase 1	411	96	40	<i>C. elegans</i>
1T64	(SOMOZA; SKENE; KATZ; MOL <i>et al.</i> , 2004)	Putative histone deacetylase 2	379	92	37	<i>C. elegans</i>
1T64	(SOMOZA; SKENE; KATZ; MOL <i>et al.</i> , 2004)	Histone deacetylase 6	639	96	23	<i>C. elegans</i>
1T64	(SOMOZA; SKENE; KATZ; MOL <i>et al.</i> , 2004)	Histone deacetylase 4	324	85	23	<i>C. elegans</i>
1T64	(SOMOZA; SKENE; KATZ; MOL <i>et al.</i> , 2004)	Histone deacetylase (hda-3)	306	90	42	<i>C. elegans</i>
O43451	(NICHOLS; ELDERING; AVERY; HAHN <i>et al.</i> , 1998)	Maltase-glucoamylase	550	85	39	<i>C. elegans</i>
P10253	(HOEFSLOOT; HOOGEVEEN WESTERVELD; KROOS; VAN BEEUMEN <i>et al.</i> , 1988)	Lysosomal alpha- glucosidase	723	67	61	<i>C. elegans</i>

Fonte: Do autor (2020).

A histona deacetilase pertence a um grupo de enzimas que atuam removendo grupos acetil introduzidos pela histona acetiltransferase, os quais geram a condensação da cromatina no núcleo celular, desta maneira evitam a transcrição gênica, é dizer regulam a expressão de genes (epigenética) nos organismos (MONTEIRO-ALFREDO, 2016; PAVAN, 2018). As histonas deacetilase estão geralmente no núcleo celular (a exceção da histona deacetilase 6, 10, 4, 5, 7, 8 e 9) e apresentam entre 300 e 1200 resíduos de aminoácidos) (ASFAHA et al., 2019). Em total são 18 histonas deacetilase que são divididas em quatro classes (I-IV) de acordo com suas sequencias e atividade catalítica. As classes I (histonas deacetilases 1, 2, 3 e 8), IIa (histona deacetilase 4, 5, 7 e 9), IIb (histona deacetilase 6 e 10) e IV (histona deacetilase 11) são hidrolases dependentes de zinco, enquanto a classe III (contém 7 histonas deacetilase) agrupa hidrolases dependentes de NAD (LÓPEZ; SULLIVAN; FIERKE, 2016). De maneira interessante, a natureza encargou-se de fornecer vários inibidores da histidina deacetilase, entre eles encontrasse o depsipeptídeo Romidepsina (Istodax®). A Trichostatina A, foi o primeiro hidroxamato inibidor da histona deacetilase das classes I e II de ocorrência natural (actinomiceto), que serviu para o desenvolvimento do Vorinostat®, medicamento para o tratamento linfomas em células cutâneas. A partir disto, um grande número de compostos alimentares foram identificados como inibidores da histona deacetilase (SEIDEL et al., 2012). A classe I contém a histona deacetilase 8 a qual é modulada quando interage com a cromatina (complexo de DNA e proteína) Sin3, NuRDs e Co-REST (ZHANG et al., 1999).

Variada de moduladores de histonas deacetilase de diferentes classes química foram reportados em trabalhos previos, entre eles encontramos: os peptídeos cíclicos, depsipeptídeos, flavonoides, hidroxamatos (Amamistatina e Trichostatina A), isotiocianatos organosulfurados (alil mercaptano), ácidos graxos de cadeia curta e outros como a cafeína e a nicotinamida (SEIDEL; SCHNEKENBURGER; DICATO; DIEDERICH, 2012).

Vários organismos apresentam diferentes tipos de histonas deacetilase, por exemplo: A levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Meyen) E.C. Hansen, contém 10 (três classe I, dois classe II, cinco classe III), o homem contém 18 (quatro classe I, seis classe II, sete classe III e uma classe IV) e o nematoide *C. elegans* contém 12 (três classe I, quatro classe II, quatro classe III e uma classe IV) (GREGORETTI; LEE; GOODSON, 2004; MARKS; MILLER; RICHON, 2003). Estudos demonstraram que indivíduos de *C. elegans* mutantes sem a enzima histona deacetilase mostraram desenvolvimento vulvar e gonadal defeituoso, levando à esterilidade, diminuindo sua fertilidade (ZINOVYEVA et al., 2006) ou diminuição na geração



de ovos (SMIALOWSKA; BAUMEISTER, 2006). Particularmente, as histonas deacetilase de classe I estão presentes em células tanto somáticas como germinativas, sendo expressas durante o desenvolvimento embrionário e pós embrionário; a ausência desta enzima gera morte embrionária (DUFOURCQ et al., 2002; SHI; MELLO, 1998).

No caso dos nematoides recentemente foi demonstrado que o fitonematoide *heterodera schachtii* A.Schmidt injeta um efector dentro das células da raiz que inibe a histona deacetilase da planta *Arabidopsis thaliana*, ajudando com isto na formação do sitio de alimentação (VIJAYAPALANI et al., 2018). Atualmente não existem trabalhos reportados em base de dados com informações de inibidores da histona deacetilase utilizados no desenvolvimento de nematicidas.

Com base nos resultados do alinhamento foram tidos em conta os parâmetros de escore, cobertura e identidade, os quais compara de maneira quantitativa a semelhança entre a sequência escolhida e outras sequencias armazenada em base de dados. Para tanto, evidenciou-se que a proteína 1T64 apresentou a melhor combinação de parâmetros para os nematoides *B. xylophilus* e *C. elegans*. A partir destas interpretações, sugeriu-se que a enzima histona deacetilase é produzida pelo nematoide modelo *C. elegans* e o fitonematoide *B. xylophilus*. Trabalhos feitos com diferentes substâncias nematicidas evidenciam a semelhança entre ditas espécies através da suas eficiências de controle, sugerindo que tanto *C. elegans* como *B. xylophilus* compartilham os mesmos alvos enzimáticos para as substâncias testadas (CHENG et al., 2017; JANG et al., 2019; LIU et al., 2016; PAN et al., 2016; RAJASEKHARAN et al., 2019).

### 3.9 Seleção de estruturas tridimensionais da histona deacetilase (HDAC)

Foram encontradas 137 estruturas tridimensionais de histona deacetilases cujas sequências de aminoácidos apresentavam semelhança 95% em relação a 1T64 (SOMOZA et al., 2004), segundo o RCSB Protein Data Bank. Restaram apenas 13 estruturas tridimensionais (TABELA 18) após eliminar aquelas com: similaridade inferior a 60 % em relação à 1T64 de acordo com cálculo realizado pelo Ugene 1.16.2; sem Zn<sup>2+</sup> no sítio ativo; com mutações fora das extremidades das cadeias; e com número de resíduos muito diferentes daquele observado para a 1T64.

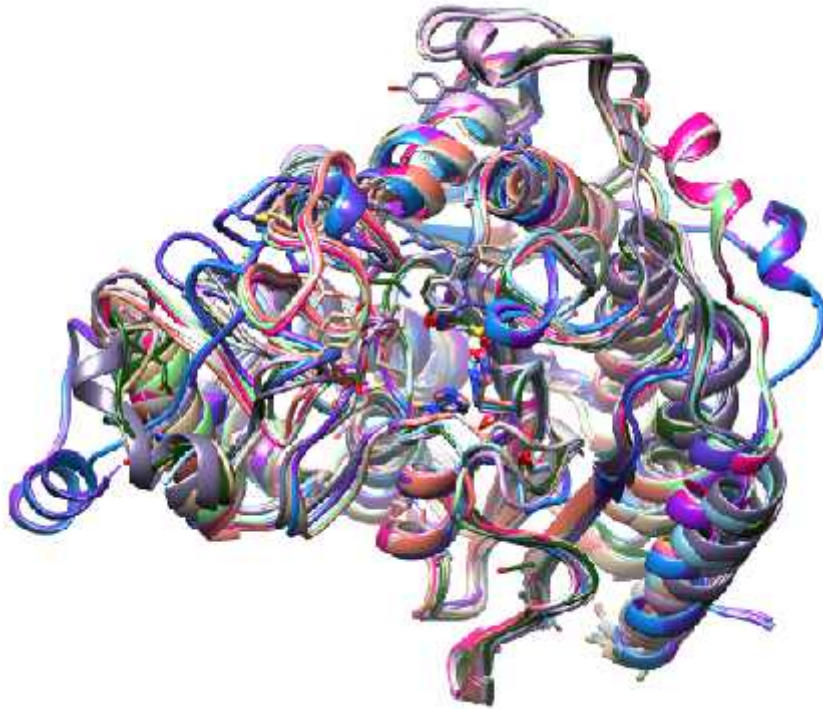
Tabela 18 - Histonas deacetilase semelhantes a 1T64 escolhidas para alinhamento e ancoramento com as substâncias 13, 14, 15 e inibidores testados experimentalmente.

Códigos das proteínas*	Referências	Número de resíduos	Unidade biológica
1T64	(SOMOZA; SKENE; KATZ; MOL <i>et al.</i> , 2004)	377	monomérica
1T67	(SOMOZA; SKENE; KATZ; MOL <i>et al.</i> , 2004)	377	monomérica
1W22	(VANNINI; VOLPARI; FILOCAMO; CASAVOLA <i>et al.</i> , 2004)	377	monomérica
1ZZ0	(NIELSEN; HILDMANN; DICKMANN; SCHWIENHORST <i>et al.</i> , 2005)	369	monomérica
1ZZ1	(NIELSEN; HILDMANN; DICKMANN; SCHWIENHORST <i>et al.</i> , 2005)	369	monomérica
1ZZ3	(NIELSEN; HILDMANN; DICKMANN; SCHWIENHORST <i>et al.</i> , 2005)	369	monomérica
2GH6	(NIELSEN; HILDMANN; RIESTER; WEGENER <i>et al.</i> , 2007)	369	monomérica
2VQJ	(BOTTOMLEY; SURDO; DI GIOVINE; CIRILLO <i>et al.</i> , 2008)	413	monomérica
3C0Y	(SCHUETZ; MIN; ALLALI-HASSANI; SCHAPIRA <i>et al.</i> , 2008)	423	monomérica
3C0Z	(SCHUETZ; MIN; ALLALI-HASSANI; SCHAPIRA <i>et al.</i> , 2008)	423	monomérica
3C10	(SCHUETZ; MIN; ALLALI-HASSANI; SCHAPIRA <i>et al.</i> , 2008)	423	monomérica
3F07	(DOWLING; GANTT; GATTIS; FIERKE <i>et al.</i> , 2008)	388	monomérica
4A69	(WATSON; FAIRALL; SANTOS; SCHWABE, 2012)	376	dimérica

\* De acordo com o RCSB Protein Data Bank (Disponível em: <<https://www.rcsb.org>>). Berman *et al.* (2000).

Após eliminar as estruturas tridimensionais das proteínas 1ZZ0, 1ZZ1, 1ZZ3 e 2GH6, que possuíam RMSD acima de 14 Å em relação à 1T64, todas as restantes apresentaram valores de RMSD abaixo de 4 Å (FIGURA 12). Logo, todas as histonas deacetilases a serem utilizadas eram similares à 1T64 que, como já demonstrado, era similar às enzimas produzidas por *C. elegans* e *B. xylophilus*.

Figura 12 - Estruturas de histonas deacetilases alinhadas à estrutura da 1T64 com valores de RMSD abaixo de 4 Å.

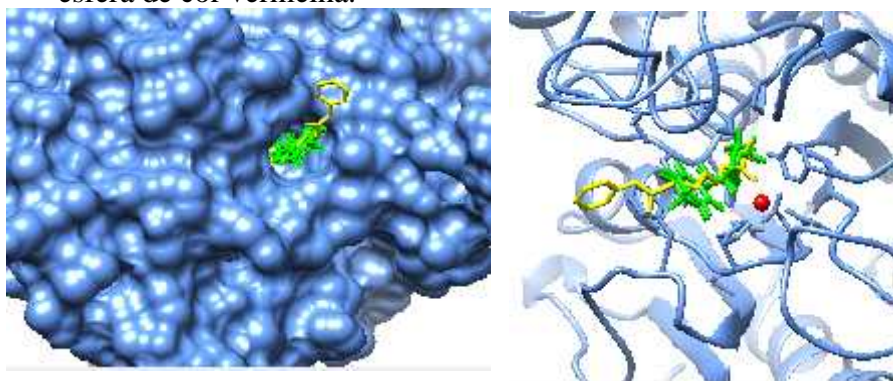


Fonte: Do autor (2020).

### 3.10 Identificação do sítio de ligação das substâncias 13, 14 e 15 na histona deacetilase

No ancoramento às cegas as substâncias 13, 14 e 15 se ligaram preferencialmente à mesma cavidade nas histonas deacetilases, com afinidades aproximadamente iguais a 6,6 kcal/mol. Tal cavidade correspondia ao sítio ativo das enzimas, na qual se observava a presença do íon  $Zn^{2+}$ . Além disto, tal cavidade é exatamente a mesma na qual vários inibidores desta enzima se encontram ligados em estruturas tridimensionais experimentalmente obtidos disponíveis no RCSB Protein Data Bank (FIGURA 13).

Figura 13 - Histona deacetilase 1T64 (SOMOZA; SKENE; KATZ; MOL et al., 2004) contendo o inibidor TSN (amarelo) no seu sítio ativo, conforme dados experimentais disponíveis no RCSB Protein Data Bank, e as substâncias 13, 14 e 15 (verde) ancoradas às cegas no mesmo sítio da enzima, através do uso do programa computacional QuickVina-W (HASSAN; ALHOSSARY; MU; KWOH, 2017; TROTT; OLSON, 2010). O íon  $Zn^{2+}$  é mostrado como uma esfera de cor vermelha.



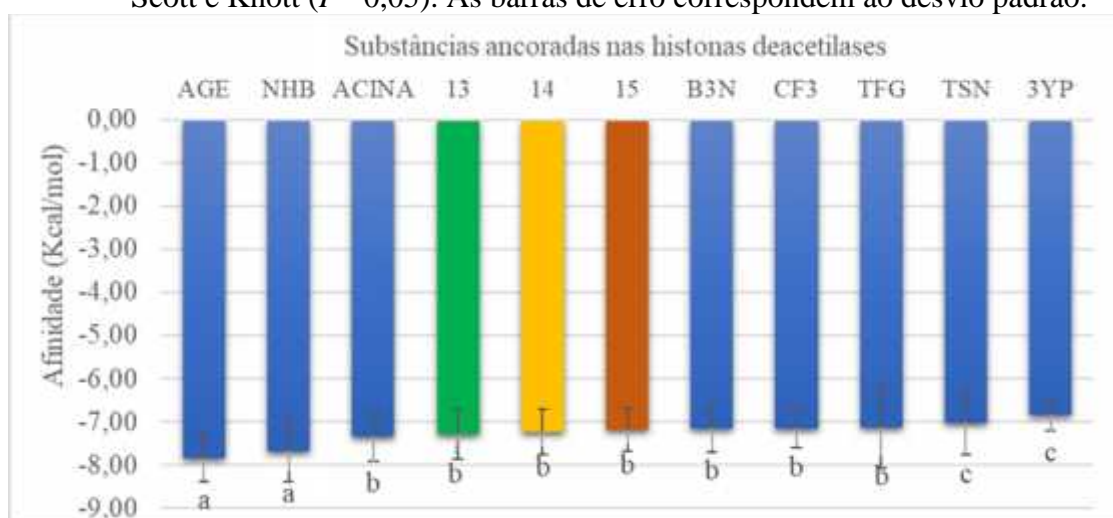
Fonte: Do autor (2020).

A histona deacetilase, escolhida como alvo das substâncias 13, 14 e 15, é uma enzima que apresenta um sítio ativo único, estabilizado por um átomo de zinco, o qual gera as condições apropriadas para o desenvolvimento das funções catalíticas da enzima. Além disto, não se encontrou informações em bases de dados que evidenciem que dita enzima possa sofrer inibições alostéricas por alguma outra molécula. Logo, o sítio de ligação das substâncias 13, 14 e 15, proposto com base nos cálculos computacionais, está em sintonia com os dados descritos na literatura para tal enzima. (HODAWADEKAR; MARMORSTEIN, 2007).

### 3.10 Ancoramentos (*docking*) nos sítios da histona deacetilase.

As substâncias que mais fortemente se ligam às histonas deacetilases são os inibidores AGE e NHB, com afinidades de  $-7,85 \pm 0,6$  e  $-7,67 \pm 0,7$  Kcal/mol, respectivamente. Embora os valores de afinidades calculadas para as substâncias 13, 14 e 15, sejam maiores, são estatisticamente iguais às calculadas para os inibidores B3N, CF3, TFG e TSN. Além disto, são menores do que as calculadas para o inibidor 3YP (FIGURA 14).

Figura 14 - Valores de afinidades (Kcal/mol) das substâncias 13, 14 e 15, bem como dos inibidores da histona deacetilase: 7-(4-(dimetilamino)-fenil)-N-hidroxi-4,6-dimetil-7-oxo-2,4-heptadienamida (TSN), 4-(dimetilamino)-N-(7-(hidroxiamino)-7-oxo-heptil)-benzamida (B3N), *N*-hidroxi-4-(metil-(5-(piridin-2-il)-tien-2-il)-sulfoni)-amino-benzamida (NHB), 3-ciclopentil-*N*-hidroxipropanamida (3YP), 9,9,9-trifluoro-8-oxo-*N*-fenilnonamida (CF3), *N*-fenil-*N'*-hidroxioctanodiamida (SHH), (*E*)-3-(4-(benzilcarbonil)-1-metil-1*H*-pirrol-2-il)-*N*-hidroxipropenamida (AGE), (*E*)-cinamato (ACINA). As afinidades das substâncias pelo sítio ativo das histonas deacetilases foram calculadas pelo programa computacional QuickVina 2.1 (HANDOKO; OUYANG; SU; KWOH *et al.*, 2012; TROTT; OLSON, 2010). Barras com a mesma letra, no gráfico, não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott e Knott ( $P < 0,05$ ). As barras de erro correspondem ao desvio padrão.



Fonte: Do autor (2020).

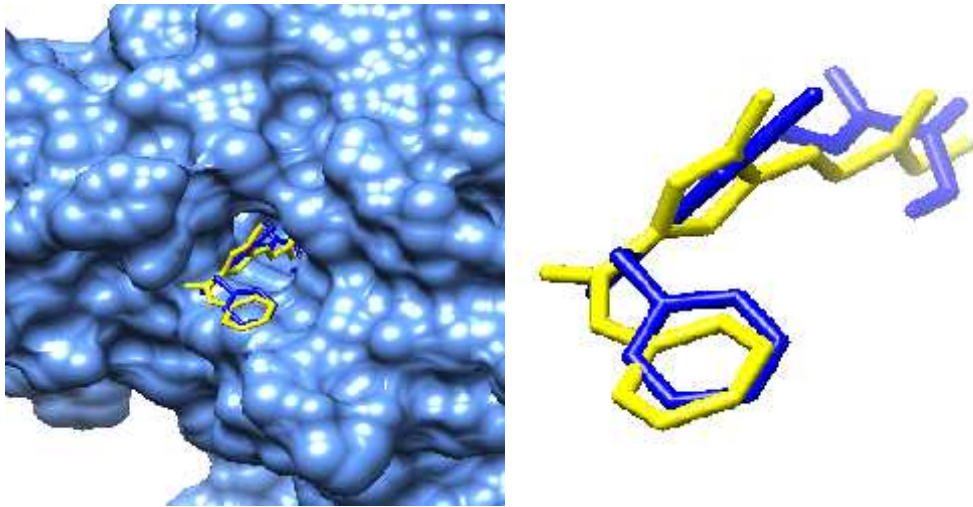
As afinidades para as substâncias 13, 14 e 15 estiveram na média quando comparadas com os melhores e piores inibidores (FIGURA 15). Como os inibidores utilizados no presente estudo apresentam valores de  $IC_{50}$  sobre a histona deacetilase entre 317 nmol/L e 3  $\mu$ mol/L (BOTTOMLEY; SURDO; DI GIOVINE; CIRILLO *et al.*, 2008; DOWLING *et al.*, 2008; NIELSEN *et al.*, 2005; VANNINI *et al.*, 2004), é de se esperar que os ésteres do ácido (*E*)-cinâmico selecionados (13, 14 e 15) apresentem valores de  $IC_{50}$  entre estes dois limites descritos acima para inibidores da enzima.

Vale mencionar que houve boa sobreposição entre as estruturas dos inibidores experimentalmente complexados às enzimas e aquelas ancoradas pelo programa computacional QuickVina 2.1 nas mesmas enzimas. Para exemplificar é possível citar o inibidor AGE, que estava experimentalmente complexado à enzima 3F07 (DOWLING *et al.*, 2008) (FIGURA 16). Da mesma maneira, observou-se que outros inibidores como o NHB,



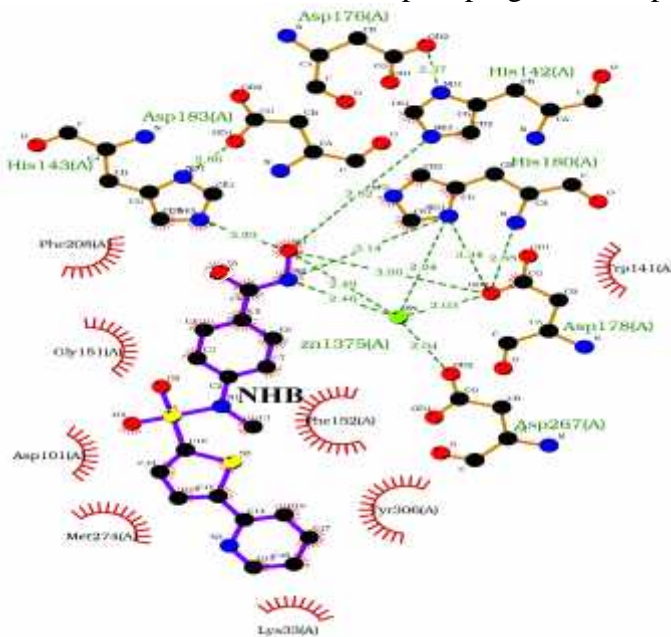
CF3, 3YP e TFG, foram ancorados na mesma posição que os ligantes experimentalmente testados. Logo, o método de ancoramento é confiável, pois tem a capacidade de reproduzir os dados obtidos experimentalmente.

Figura 15 - Estruturas do inibidor AGE experimentalmente complexado (amarelo) à enzima 3F07 (DOWLING; GANTT; GATTIS; FIERKE et al., 2008) e ancorado (azul) pelo programa computacional na mesma enzima.



Fonte: Do autor (2020).

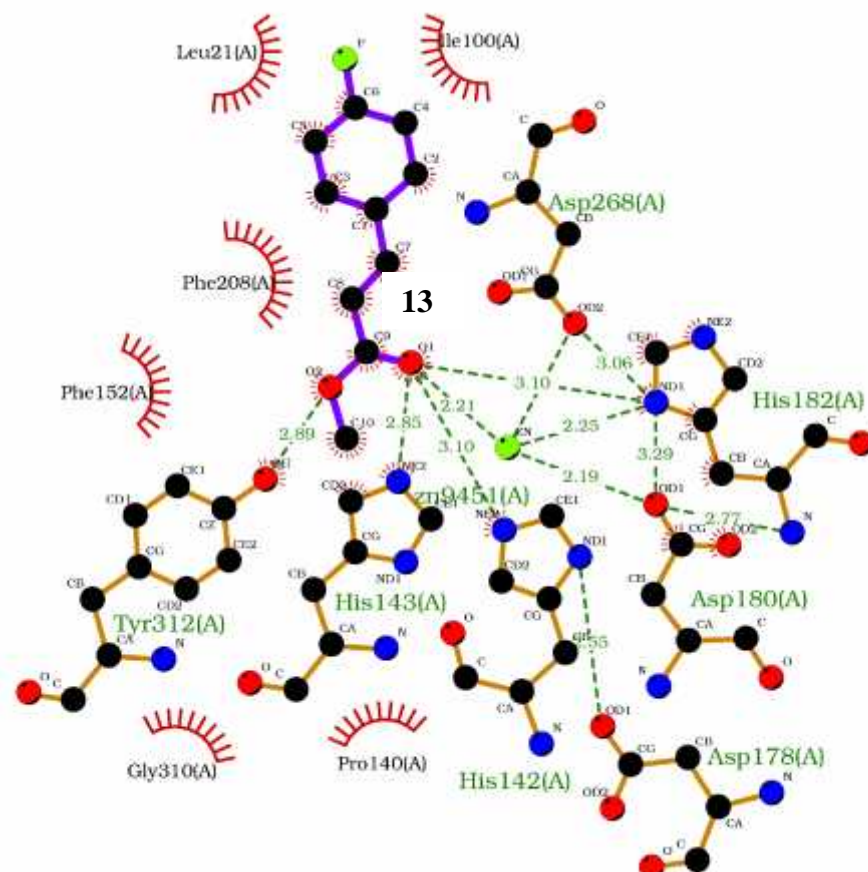
Figura 16 - Interações do inibidor NHB com o sítio ativo da histona deacetilase 1w22 de acordo com ancoramento feito pelo programa computacional QuickVina 2.1



Fonte: Do autor (2020).

O inibidor NHB faz quatro ligações de hidrogênio através do grupo hidróxi e do nitrogênio do grupo amido (FIGURA 17). Os resíduos de aminoácidos ionizados do aspartato (183, 178, 267) e histidina (142, 180), são os responsáveis por fazer ditas ligações com NHB. Além disto, o inibidor também se encontra interagindo com o íon  $Zn^{2+}$ , que é estabilizado através de ligações com os resíduos de aspartato (267, 178) e histidina (180). O resto da estrutura do inibidor faz interações apolares com os resíduos de fenilalanina (152, 208), glicina (151), aspartato (101), metionina (274), tirosina (306) e lisina (33). Outro fato importante é que as ligações de hidrogênio e as interações com o íon  $Zn^{2+}$  são feitas entre átomos com menos de 3,3 Å de distância, o que torna tais interações bastante eficientes (OLIVEIRA; ARAÚJO, 2012).

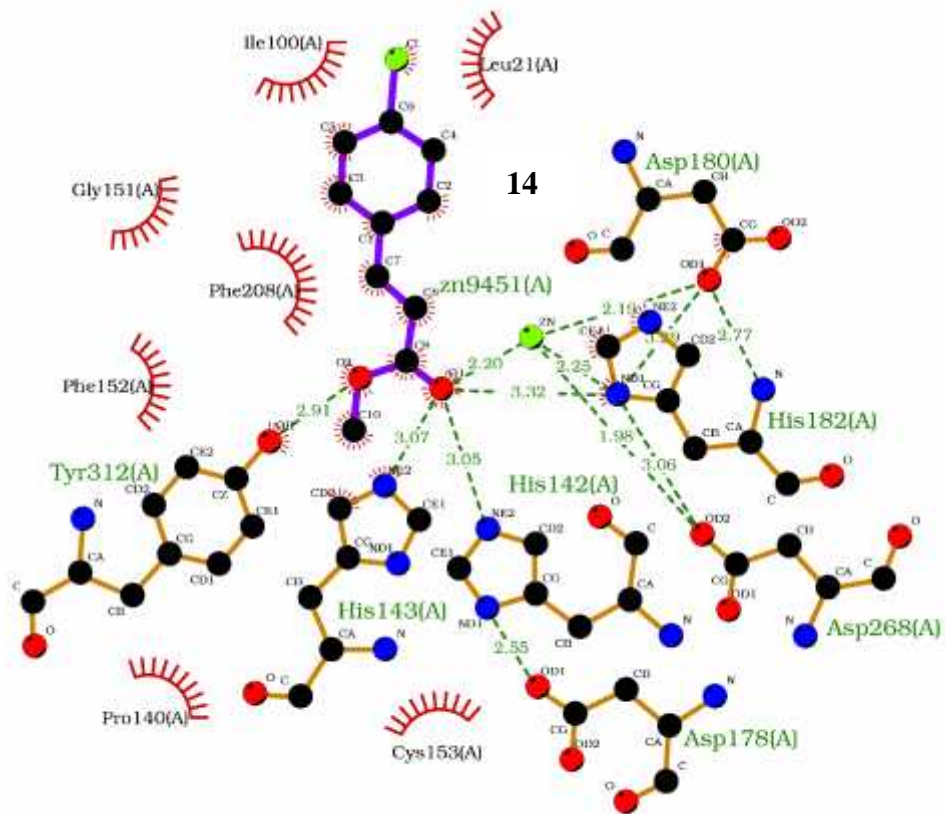
Figura 17 - Interações da substância 13 com o sítio ativo da histona deacetilase 1w22 de acordo com ancoramento feito pelo programa computacional QuickVina 2.1.



Fonte: Do autor (2020).

Na interação da substância 13 com sítio ativo da enzima histona deacetilase se observa que ambos os átomos de oxigênio são responsáveis por fazer ligações de hidrogênio com os resíduos de tirosina (312) e histidina (143, 142, 182, 268) (Figura 2.18). Da mesma maneira, é importante destacar que o íon  $Zn^{2+}$  interage com o oxigênio da carbonila e com resíduos de aminoácidos de aspartato (268, 180) e histidina (182), que contribuem na estabilização de dito íon. O anel, o halogênio e parte da cadeia com dupla ligação fizeram interações apolares com os resíduos de fenilalanina (208, 152) leucina (21) e isoleucina (100).

Figura 18 - Interações da substância 14 com o sítio ativo da histona deacetilase 1w22 de acordo com ancoramento feito pelo programa computacional QuickVina 2.1



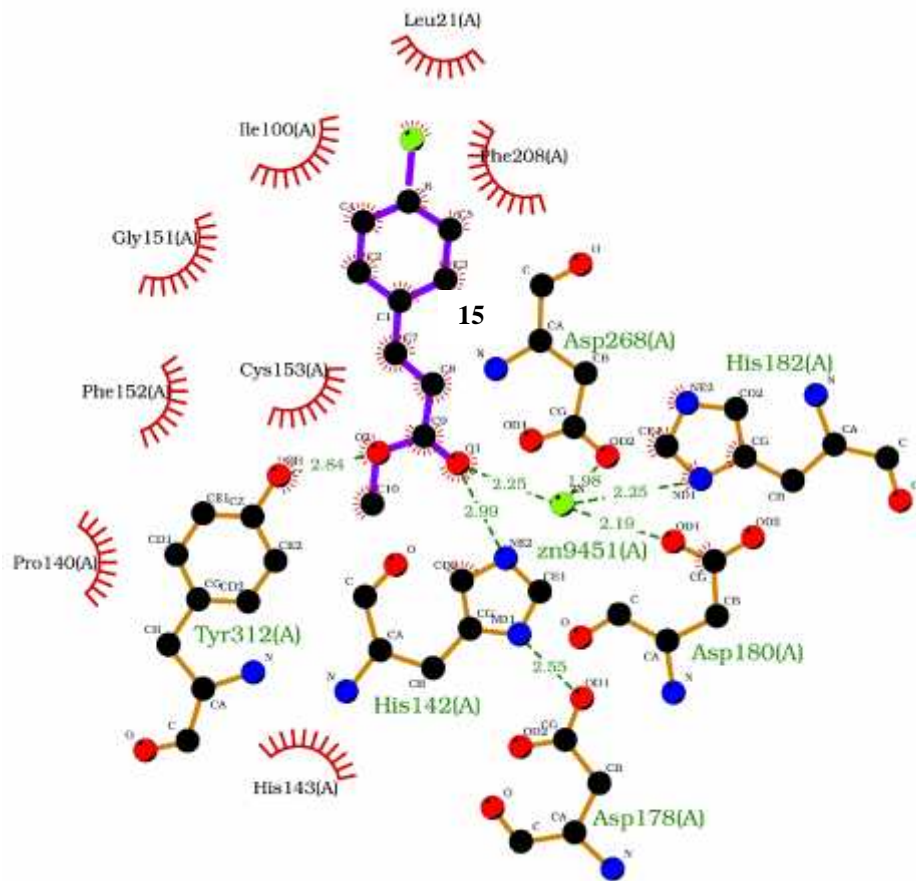
Fonte: Do autor (2020).

No caso da substância 14, evidencia-se a mesma tendência no tipo e número de interações descritas acima para a substância 13. Os átomos de oxigênio fazem as ligações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos de tirosina (312), histidina (143, 142, 182) e



aspartato (180), enquanto as interações apolares são feitas com os resíduos de isoleucina (100), leucina (21), fenilalanina (208, 152) e glicina (151) (FIGURA 19).

Figura 19 - Interações da substância 15 com o sítio ativo da histona deacetilase 1w22 de acordo com ancoramento feito pelo programa computacional QuickVina 2.1.



Fonte: Do autor (2020).

Na substância 15, o número de ligações de hidrogênio é menor. Duas delas são feitas com os resíduos de tirosina (312) e histidina (142). Há também, uma interação o íon  $Zn^{2+}$ , que se encontra estabilizado pelos resíduos de aminoácidos de aspartato (268, 180) e histidina (182). As interações apolares com o resto da estrutura da substância 15 foram feitas com os resíduos de leucina (21), fenilalanina (208, 152), isoleucina (100), glicina (151) e cisteína (153) (FIGURA 20).

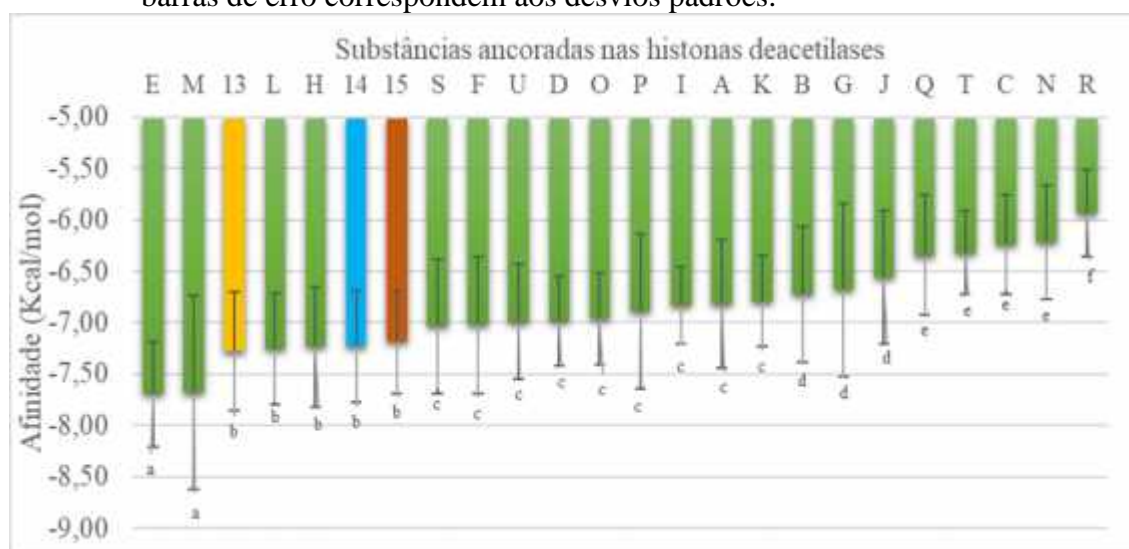
Aparentemente, o número de ligações de hidrogênio e a diversidade destas, foram os responsáveis pela melhor afinidade do inibidor NHB pela enzima, quando os valores são

comparados aos calculados para as substâncias 13, 14 e 15. Tanto o inibidor NHB, quanto as substâncias 13, 14 e 15, interagem facilmente com o íon  $Zn^{2+}$ , o que está de acordo com dados da literatura, segundo os quais as carbonilas são ativadas pelo átomo de  $Zn^{2+}$ , facilitando a remoção do grupo acetil através de hidrólise (HODAWADEKAR; MARMORSTEIN, 2007). Vale mencionar que só foram observadas interações apolares entre os átomos de halogênios das substâncias 13, 14 e 15, e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da enzima. De qualquer forma, mesmo não atingindo as melhores afinidades, observa-se que as substâncias 13, 14 e 15, apresentam farmacóforos chaves na inibição da histona deacetilase. Em decorrência disto, podem servir como modelos no desenvolvimento de análogos com melhores afinidades.

### **3.11 Análogos das substâncias 13, 14 e 15 que possam ligar-se mais fortemente à enzima histona deacetilase**

Embora várias substâncias selecionadas através de busca farmacofórica com as substâncias 13, 14 e 15, no banco de dados do ZINC15, tenham apresentado afinidades superiores às calculadas para tais ésteres do ácido (*E*)-cinâmico, os compostos 'E' e 'M' (FIGURAS 5 e 6) apresentaram afinidades estatisticamente inferiores (FIGURA 21).

Figura 20 - Valores de afinidades (Kcal/mol) das substâncias 13, 14 e 15, e das seguintes substâncias selecionadas a partir do banco de dados do ZINC15: (A) 6-fluoro-N,3-dimetil-1-benzotiofeno-2-carboxamida, (B) 1-benzotiofeno-2-carboxilato de 2-hidroxietila, (C) (2S)-2-amino-3-oxo-3-fenilpropanoato de metila, (D) (E)-2-(4-clorofenil)etenilsulfonato, (E) (((2E)-3-(4-fluorofenil)but-2-enil)oxi)acetato, (F) (2R)-4-(((2E)-3-(4-clorofenil)prop-2-enil)-oxi)butan-2-ol, (G) 7-cloro-8-metil-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato de metila, (H) (2S)-2-(((2E)-3-(4-clorofenil)prop-2-enil)oxi)propanoato, (I) (2Z)-3-amino-3-fenilprop-2-enoato de etila, (J) N-(3-(((2E)-3-(4-clorofenil)prop-2-enil)oxi)propil)-N,N-dimetilamônio, (K) (2E)-3-(1-oxidopiridina-3-il)prop-2-enoato de metila, (L) (2E)-3-(4-fluorofenil)but-2-enamida, (M) (2E)-(4-metil-2,3-diidro-1H-inden-1-il-ideno)etanoato de metila, (N) (2S)-2-((4-bromofenil)carbonil)-3-oxobutanoato de metila, (O) (2E)-3-(clorofenil)-1-(pirrolidin-1-il)prop-2-en-ona, (P) 1H-indol-3-il(oxo)acetato de etila, (Q) 6,8-dicloro-2H-cromeno-3-carboxilato de metila, (R) (1-(4-clorofenil)-3-metoxi-1,3-dioxopropan-2-ilideno]diazênio, (S) (3R)-4-oxo-3,4-diidro-2H-tiocromeno-3-carboxilato de etila, (T) 5-amino-2,3-diidro-1-benzotiofeno-2-carboxilato de etila, (U) 3-(4-(dimetilamino)fenil)propanoato de metila. Tais valores foram calculados pelo programa computacional QuickVina 2.1 para ancoramentos nos sítios ativos das histonas deacetilases. Barras com a mesma letra, no gráfico, não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott e Knott ( $P < 0,05$ ). As barras de erro correspondem aos desvios padrões.

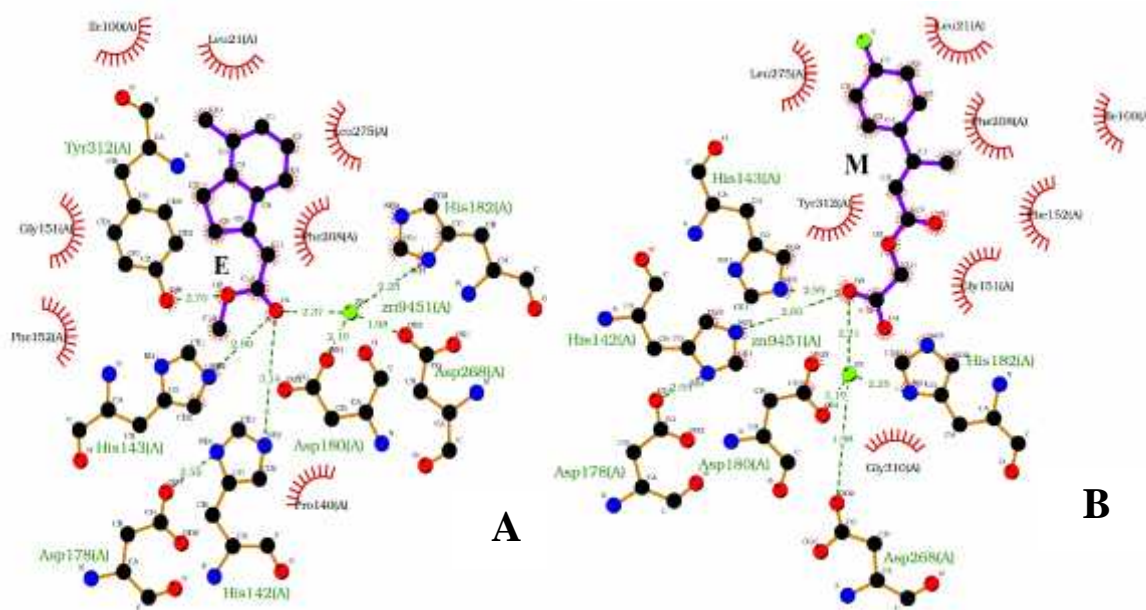


Fonte: Do autor (2020).

Os análogos dos ésteres do ácido (E)-cinâmico identificados com as letras “E” e “M” foram os que melhor afinidade tiveram (FIGURA 21) dentro de 21 substâncias ancoradas. Ditos análogos atingiram afinidades ao redor de  $-7,7 \text{ Kcal mol}^{-1}$ . É dizer que têm a capacidade

de gerar complexos mais estáveis com a histona deacetilase. Em decorrência disto, existe a possibilidade de desenhar estruturas análogas de 13, 14 e 15 com melhores características farmacofóricas, mantendo o mesmo alvo enzimático. Isto pode ser feito graças aos métodos *in silico*, os quais permitem aprimorar as estruturas das substâncias mais ativas.

Figura 21 - Interações feitas pelos análogos das substâncias 13, 14 e 15 obtidos do banco de dados ZINC15, sobre a enzima histona deacetilase. A. Análogo E; B. Análogo M.



Fonte: Do autor (2020).

Observa-se que ao igual que para as substâncias 13, 14 e 15, a ligação entre o oxigênio da carbonila e o íon de  $Zn^{2+}$  é fundamental para levar a cabo o ancoramento dos análogos no sítio ativo da histona deacetilase. No caso do análogo "E" (FIGURA 21A), observou-se que o oxigênio da carbonila faz ligação de hidrogênio com dois resíduos do aminoácido histidina (143, 142) e mantém uma ligação com o zinco, favorecendo a estabilidade deste átomo junto com os resíduos do aminoácido histidina (182) e aspartato (268, 180). Da mesma maneira, o resíduo do aminoácido tirosina (312) utiliza sua hidroxila para fazer mais uma ligação de hidrogênio com o oxigênio do grupo acetil. Entre tanto, os resíduos dos aminoácidos isoleucina (100), leucina (21, 275) e fenilalanina (208) mantêm interações apolares com os anéis da estrutura. O análogo "M" (FIGURA 21B) apresentou algumas diferenças, mesmo manteve a afinidade pela histona deacetilase. Observou-se que o oxigênio da carbonila faz

duas ligações de hidrogênio com o resíduo do aminoácido histona (143, 142) e uma ligação com o íon de  $Zn^{2+}$ . Particularmente, o análogo “M” apresenta um grupo carboxila desprotonado sob pH fisiológico. A localização deste grupo desprotonado perto do grupo imidazol (pKa 6,04) da histidina (182), evita a formação de uma ligação entre eles. A partir da caracterização das interações, pode-se identificar que o íon de  $Zn^{2+}$  é favorecido pelos elétrons livres dos átomos de oxigênio e nitrogênio contidos na carbonila dos inibidores e no grupo imidazol da histidina respectivamente.

A partir do ano 1990 foi proposto um modelo farmacofórico para o desenho de inibidores da histona deacetilase. Dito modelo está composto de três partes: um grupo de ligação com o átomo de zinco, um ligante que imita a acetil-lisina e interage com o túnel de ligação do substrato e um “boné”, também conhecido como domínio de reconhecimento de superfície. Algum tempo depois, este modelo foi modificado, de forma a conter seis elementos: o ligante com zinco, o ligante que imita a acetil-lisina e quatro domínios de reconhecimento de superfície (FINNINT al., 1999; JUNG, 2001; JUNG; HOFFMANN; BROSCHE; LOIDL, 1997; MELESINA et al., 2018). Isso explicaria os valores de afinidades dos inibidores NHB, AGE e os análogos “E” e “M”, pois suas estruturas químicas apresentam regiões hidrófobas chaves no reconhecimento da superfície enzimática, ao igual que grupos responsáveis pela ligação com o íon  $Zn^{2+}$ , melhorando com isto a capacidade de inibir a histona deacetilase (SALVATELLA et al., 1999). Da mesma maneira, o notável efeito sobre a inibição da eclosão de ovos, abre uma janela para o desenho de estratégias de controle inovadoras, baseadas nas estruturas de resistência dos fitonematoides (ovos). Com isto, os resultados do presente estudo sugerem que estes devem ser considerados como estruturas modelos com grupos farmacofóricos de interesse para o desenvolvimento de nematicidas de baixo impacto ambiental, menos tóxicos ao homem ( $DL_{50} > 2000 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) e com diferente modo de ação (ovicida). Em decorrência disto, a elucidação da relação estrutura-atividade através de estudos *in silico*, contribui no entendimento dos alvos enzimáticos destas substâncias.

## 4 CONCLUSÕES

Encontrou-se que os ésteres do ácido (*E*)-cinâmico identificados como 13, 14 e 15 tiveram efeito nematicida *in vitro* e *in vivo* sobre o fitonematoide *M. incognita*. Tais substâncias foram mais eficientes contra o nematoide quando estiveram em contato direto com os ovos de *M. incognita*, sugerindo que são mais ativas sobre estádios embrionários ou de crescimento ativo. Estudos *in silico* demonstraram que as substâncias 13, 14 e 15 podem inibir a enzima histona deacetilase, a qual é responsável pelo controle na transcrição de genes e na expressão epigenética. Os mesmos estudos mostraram que a presença de carbonilas e heteroátomos como o nitrogênio ou oxigênio podem melhorar a afinidade enzimática, pois garantem maior número de ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas com o íon  $Zn^{2+}$  presente no sítio catalítico da histona deacetilase. Em decorrência disto, acredita-se que os ésteres do ácido (*E*)-cinâmico e a histona deacetilase podem ser úteis no desenho e desenvolvimento de novos nematicidas menos tóxicos ao homem e com mecanismos de ação diferentes dos tradicionalmente conhecidos.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, S. E.; RIZKALLAH, P. J.; MILLER, D. J.; ROBINSON, E. J. *et al.* The structural basis of differential inhibition of human calpain by indole and phenyl -mercaptoacrylic acids. **Journal of Structural Biology**, v. 187, n. 3, p. 236-241, 2014/09/01/ 2014.
- ALLOUCHE, A. R. Gabedit-A graphical user interface for computational chemistry softwares. **Journal of computational chemistry**, v. 32, n. 1, p. 174-182, 2011.
- ALMEIDA, R. D. C. B. D. **Síntese de indóis e N-hidróxi-indóis polifuncionalizados e de análogos do mitotano partindo de 3, 3-diaril-cinamatos substituídos.** 2017.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- ALTSCHUL, S. F.; WOOTTON, J. C.; GERTZ, E. M.; AGARWALA, R. *et al.* Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. **The FEBS journal**, v. 272, n. 20, p. 5101-5109, 2005.
- ALVES, N. G. **Sistemas conjugados: importância na ação e potenciação de fármacos.** 2012. 100 p. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade do Algarve, Algarve, 2012.
- ANALYTICS, C. **Web of science.** 2019.
- ARAÚJO, F. F. D.; BRAGANTE, R. J.; BRAGANTE, C. E. Controle genético, químico e biológico de meloidoginose na cultura da soja. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, V. 42, n. 2, p. 220-224, 2012-06 2012.
- ASADI SARDARI, A.; HOJAT JALALI, A. A.; BAHRAMINEJAD, S.; SAFAEE, D. Effect of plant extracts on the mortality of root-knot nematodes' J2, *Meloidogyne javanica*. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 48, n. 4, p. 365-375, 2015.
- ASFAHA, Y.; SCHRENK, C.; ALVES AVELAR, L. A.; HAMACHER, A. *et al.* Recent advances in class IIa histone deacetylases research. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 27, n. 22, p. 115087, 2019/11/15/ 2019.
- AULD, D. S.; LOVELL, S.; THORNE, N.; LEA, W. A. *et al.* Molecular basis for the high-affinity binding and stabilization of firefly luciferase by PTC124. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 11, p. 4878, 2010.
- AZAMBUJA, F. D. **Ativações CH catalisadas por Pd (II) e Rh (III): estudos metodológicos e do mecanismo para a síntese de diariletanos e congêneres e avaliações da sua atividade biológica.** 2015. 375 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química da Unicamp, Campinas, SP, 2015.

BARROS, A. F.; CAMPOS, V. P.; DA SILVA, J. C. P.; PEDROSO, M. P. *et al.* Nematicidal activity of volatile organic compounds emitted by *Brassica juncea*, *Azadirachta indica*, *Canavalia ensiformis*, *Mucuna pruriens* and *Cajanus cajan* against *Meloidogyne incognita*. **Applied Soil Ecology**, v. 80, p. 34-43, 2014.

BARTLETT, M. S. Properties of sufficiency and statistical tests. **Proceedings of the Royal Society of London. Series A-Mathematical and Physical Sciences**, v. 160, n. 901, p. 268-282, 1937.

BAYER, T.; CHAKRABARTI, A.; LANCELOT, J.; SHAIK, T. B. *et al.* Synthesis, Crystallization Studies, and in vitro Characterization of Cinnamic Acid Derivatives as SmHDAC8 Inhibitors for the Treatment of Schistosomiasis. **ChemMedChem**, v. 13, n. 15, p. 1517-1529, 2018/08/10 2018.

BERMAN, H. M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G. *et al.* The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235-242, 2000.

BINDA, C.; VALENTE, S.; ROMANENGGHI, M.; PILOTTO, S. *et al.* Biochemical, Structural, and Biological Evaluation of Tranylcpromine Derivatives as Inhibitors of Histone Demethylases LSD1 and LSD2. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 19, p. 6827-6833, maio. 2010.

BODE, B. M.; GORDON, M. S. Macmolplt: a graphical user interface for GAMESS. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 16, n. 3, p. 133-138, 1998.

BORATYN, G. M.; SCHÄFFER, A. A.; AGARWALA, R.; ALTSCHUL, S. F. *et al.* Domain enhanced lookup time accelerated BLAST. **Biology direct**, v. 7, n. 1, p. 12, 2012.

BOTTOMLEY, M. J.; SURDO, P. L.; DI GIOVINE, P.; CIRILLO, A. *et al.* Structural and functional analysis of the human HDAC4 catalytic domain reveals a regulatory structural zinc-binding domain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 39, p. 26694-26704, 2008.

BOX, G. E. P.; COX, D. R. An analysis of transformations. **Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)**, v. 26, n. 2, p. 211-243, 1964.

BRENNA, E.; CROTTI, M.; GATTI, F. G.; MONTI, D. *et al.* Opposite Enantioselectivity in the Bioreduction of (Z) Aryl cyanoacrylates Mediated by the Tryptophan 116 Mutants of Old Yellow Enzyme 1: Synthetic Approach to (R) and (S) Aryl lactams. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 357, n. 8, p. 1849-1860, 2015.

BRIDGE, J.; STARR, J. **Plant nematodes of agricultural importance: a colour handbook**. CRC Press, 2007.

BRUINSMA, J. **World agriculture: towards 2015/2030: an FAO study**. Routledge, 2017. 1351536354.

BURKERT, U. Molecular mechanics. **ACS monograph**, v. 177, 1982.



CABONI, P.; SABA, M.; TOCCO, G.; CASU, L. *et al.* Nematicidal activity of mint aqueous extracts against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 41, p. 9784-9788, 2013.

CAMERON, A. D.; RIDDERSTRÖM, M.; OLIN, B.; KAVARANA, M. J. *et al.* Reaction mechanism of glyoxalase I explored by an X-ray crystallographic analysis of the human enzyme in complex with a transition state analogue. **Biochemistry**, v. 38, n. 41, p. 13480-13490, 1999.

CASE, D. A.; CHEATHAM III, T. E.; DARDEN, T.; GOHLKE, H. *et al.* The Amber biomolecular simulation programs. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, n. 16, p. 1668-1688, 2005/12/01 2005.

CASTAGNONE-SERENO, P.; DANCHIN, E. G. J. Parasitic success without sex - the nematode experience. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 27, n. 7, p. 1323-1333, 2014. Review.

CERCIGNANI, C. The boltzmann equation. In: **The Boltzmann equation and its applications**: Springer, 1988. p. 40-103.

CHAVES-ULATE, E. C.; ESQUIVEL-RODRIGUEZ, P. Chlorogenic acids present in coffee: antioxidant and antimicrobial capacity. **Agronomia Mesoamericana**, 30, n. 1, p. 299-311, Jan-Apr 2019.

CHEN, S. Y.; DICKSON, D. W. A Technique for Determining Live Second-stage Juveniles of *Heterodera glycines*. **Journal of nematology**, v. 32, n. 1, p. 117-121, 2000.

CHENG, F. X.; WANG, J.; SONG, Z. Q.; CHENG, J. E. *et al.* Nematicidal Effects of 5-Aminolevulinic Acid on Plant-Parasitic Nematodes. **Journal of Nematology**, v. 49, n. 3, p. 295-303, Sep 2017.

CHITWOOD, B. G. ROOT-KNOT NEMATODES .2. QUANTITATIVE RELATIONS OF THE ROOT-KNOT NEMATODE - MELOIDOGYNE-HAPLA CHITWOOD, 1949 WITH TOMATOES, ONIONS AND LIMA BEANS. **Plant and Soil**, v. 3, n. 1, p. 47-50, 1951. Article.

CIANI, L.; CECCHI, A.; TEMPERINI, C.; SUPURAN, C. T. *et al.* Dissecting the Inhibition Mechanism of Cytosolic versus Transmembrane Carbonic Anhydrases by ESR. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 113, n. 42, p. 13998-14005, 2009/10/22 2009.

COELHO, L. W.; JUNQUEIRA, G. M. A.; HERRERA, J. O. M.; MACHADO, S. D. P. *et al.* Aplicação de mecânica molecular em química inorgânica. **Química Nova**, v. 22, n. 3, p. 396-404, 1999.

COLAGIERO, M.; ROSSO, L. C.; CIANCIO, A. Diversity and biocontrol potential of bacterial consortia associated to root-knot nematodes. **Biological Control**, v. 120, p. 11-16, 2018/05/01/ 2018.

CSIZMADIA, P. **MarvinSketch and MarvinView**: molecule applets for the World Wide Web. 1999.

CUNNINGHAM, O. D.; EDWARDS, R. Modifying the acylation of flavonols in *Petunia hybrida*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 10, p. 2016-2021, 2008..

CURY, N. M.; CAPITAO, R. M.; DE ALMEIDA, R. D. C. B.; ARTICO, L. L. *et al.* Synthesis and evaluation of 2-carboxy indole derivatives as potent and selective anti-leukemic agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 181, p. 111570, 2019.

D.R, A.; F.E.D, R.; D.F, O.; V.P, C. Purification of two substances from bulbs of onion (*Allium cepa* L.) with nematicidal activity against *Meloidogyne exigua* Goeldi. **Nematology**, v. 5, p. 859-864, mar. 2003.

DE MOURA, R. M. O gênero meloidogyne e a meloidoginose Parte III-Resenha HISTÓRICA. In: ACADEMIA PERNAMBUCANA DE CIÊNCIA AGRONÔMICA. **Anais...** v. 13, p. 93-144, 2018.

DE, P.; BALTAS, M.; BEDOS-BELVAL, F. Cinnamic acid derivatives as anticancer agents-a review. **Current medicinal chemistry**, v. 18, n. 11, p. 1672-1703, 2011.

DE, P.; BEDOS-BELVAL, F.; VANUCCI-BACQUE, C.; BALTAS, M. Cinnamic acid derivatives in tuberculosis, malaria and cardiovascular diseases-a review. **Current Organic Chemistry**, v. 16, n. 6, p. 747-768, 2012.

DOS SANTOS, M. F. A.; FURLANETTO, C.; ALMEIDA, M. R. A.; CARNEIRO, M. D. G. *et al.* Biometrical, biological, biochemical and molecular characteristics of *Meloidogyne incognita* isolates and related species. **European Journal of Plant Pathology**, v. 134, n. 4, p. 671-684, 2012. Article.

DOWLING, D. P.; GANTT, S. L.; GATTIS, S. G.; FIERKE, C. A. *et al.* Structural Studies of Human Histone Deacetylase 8 and Its Site-Specific Variants Complexed with Substrate and Inhibitors. **Biochemistry**, v. 47, n. 51, p. 13554-13563, dez. 2008.

DU VIVANT, É. D. C. **Avaliação estrutural e funcional de novos peptídeos antimicrobianos obtidos a partir de desenho racional**. 2016.

DUFOURCQ, P.; VICTOR, M.; GAY, F.; CALVO, D. *et al.* Functional requirement for histone deacetylase 1 in *Caenorhabditis elegans* gonadogenesis. **Molecular and cellular biology**, v. 22, n. 9, p. 3024-3034, 2002.

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

ELIEL, E. L.; WILEN, S. H. **Stereochemistry of organic compounds**. John Wiley & Sons, 2008.

- ERIKSSON, A. E.; JONES, T. A.; LILJAS, A. Refined structure of human carbonic anhydrase II at 2.0 Å resolution. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 4, n. 4, p. 274-282, 1988/01/01 1988.
- ESPINDOLA, J. A. A.; CARVALHO, G. J. A. D.; RODRIGUES, E. P.; CARVALHO, M. G. D. *et al.* Potencial alelopático de ésteres derivados do ácido cinâmico. **Floresta e Ambiente**, v. 13, n. 1, p. 53-60, 2012.
- FENG, Z.; CHEN, L.; MADDULA, H.; AKCAN, O. *et al.* Ligand Depot: a data warehouse for ligands bound to macromolecules. **Bioinformatics**, v. 20, n. 13, p. 2153-2155, 2004.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.
- FESTING, M. F. W. Reduction of animal use: experimental design and quality of experiments. **Laboratory Animals**, v. 28, n. 3, p. 212-221, 1994.
- FINNIN, M. S.; DONIGIAN, J. R.; COHEN, A.; RICHON, V. M. *et al.* Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. **Nature**, v. 401, n. 6749, p. 188-193, 1999.
- FISCHER, E.; SPEIER, A. Darstellung der ester. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 28, n. 3, p. 3252-3258, 1895.
- FRANKS, N. P.; JENKINS, A.; CONTI, E.; LIEB, W. R. *et al.* Structural Basis for the Inhibition of Firefly Luciferase by a General Anesthetic. **Biophysical Journal**, v. 75, n. 5, p. 2205-2211, 1998.
- GAULTON, A.; HERSEY, A.; NOWOTKA, M.; BENTO, A. P. *et al.* The ChEMBL database in 2017. **Nucleic acids research**, 45, n. D1, p. D945-D954, 2016.
- GOMES, P. H.; SÁ, C. R.; DE ARAÚJO, M. F. Ésteres Derivados dos Ácidos Cinâmico e p-Cumárico Candidatos a Agentes Antimicrobianos. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA, 20., 2015, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro, 08 a 10 jun. 2015.
- GOODSELL, D. S.; MORRIS, G. M.; OLSON, A. J. Automated docking of flexible ligands: applications of AutoDock. **Journal of Molecular Recognition**, v. 9, n. 1, p. 1-5, 1996.
- GREGORETTI, I.; LEE, Y.-M.; GOODSON, H. V. Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. **Journal of molecular biology**, v. 338, n. 1, p. 17-31, 2004.
- GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **VEstudos avançados**, v. 24, n. 70, p. 81-98, 2010.

GUPTA, M.; SHARMA, R.; KUMAR, A. Docking techniques in pharmacology: How much promising? **Computational biology and chemistry**, v. 76, p. 210-217, 2018.

GUZMAN, J. D. Natural cinnamic acids, synthetic derivatives and hybrids with antimicrobial activity. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 19292-19349, 2014.

HAMIDPOUR, R.; HAMIDPOUR, M.; HAMIDPOUR, S.; SHAHLARI, M. Cinnamon from the selection of traditional applications to its novel effects on the inhibition of angiogenesis in cancer cells and prevention of Alzheimer's disease, and a series of functions such as antioxidant, anticholesterol, antidiabetes, antibacterial, antifungal, nematocidal, acaricidal, and repellent activities. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 5, n. 2, p. 66-70, jan. 2015.

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

HASSAN, M. A.; PHAM, T. H.; SHI, H.; ZHENG, J. Nematodes threats to global food security. **Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science**, v. 63, n. 5, p. 420-425, jul. 2013.

HASSAN, N. M.; ALHOSSARY, A. A.; MU, Y.; KWOH, C.-K. Protein-Ligand Blind Docking Using QuickVina-W With Inter-Process Spatio-Temporal Integration. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 15451, nov. 2017.

HEUVELINK, E. **Tomatoes**. CABI, 2018.

HIRSCHHORN, R.; HUIE, M. L.; KASPER, J. S. Computer assisted cloning of human neutral  $\alpha$ -glucosidase C (GANC): A new paralog in the glycosyl hydrolase gene family 31. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 21, p. 13642-13646, 2002.

HODAWADEKAR, S. C.; MARMORSTEIN, R. Chemistry of acetyl transfer by histone modifying enzymes: structure, mechanism and implications for effector design. **Oncogene**, v. 26, n. 37, p. 5528-5540, 2007.

HOEFSLOOT, L. H.; HOOGEVEEN WESTERVELD, M.; KROOS, M. A.; VAN BEEUMEN, J. *et al.* Primary structure and processing of lysosomal alpha glucosidase; homology with the intestinal sucrase isomaltase complex. **The EMBO journal**, v. 7, n. 6, p. 1697-1704, 1988.

HOLDEN-DYE, L.; WALKER, R. **Anthelmintic drugs and nematocides**: studies in *Caenorhabditis elegans*. WormBook: the online review of *C. elegans* biology, 2014. p. 1-29;

HUANG, S.-Y.; LI, M.; WANG, J.; PAN, Y. HybridDock: a hybrid protein–ligand docking protocol integrating protein- and ligand-based approaches. **Journal of chemical information and modeling**, v. 56, n. 6, p. 1078-1087, 2015.

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

HUSSAIN, M.; ZOUHAR, M.; RYŠÁNEK, P. Suppression of meloidogyne incognita by the entomopathogenic fungus lecanicillium muscarium. **Plant Disease**, v. 102, n. 5, p. 977-982, 2018. Article.

HUSSEY, R. S. A comparison of methods of collecting inocula of Meloidogyne spp., including a new technique. **Plant Dis. Rep.**, v. 57, p. 1025-1028, 1973 1973.

JANG, J. Y.; DANG, Q. L.; CHOI, G. J.; PARK, H. W. *et al.* Control of root-knot nematodes using *Waltheria indica* producing 4-quinolone alkaloids. **Pest Management Science**, v. 75, n. 8, p. 2264-2270, Aug 2019.

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

JEON, J.-H.; KO, H.-R.; KIM, S.-J.; LEE, J.-K. Chemical compositions and nematocidal activities of essential oils on *Meloidogyne hapla* (Nematoda: Tylenchida) under laboratory conditions. **The Korean Journal of Pesticide Science**, v. 20, n. 1, p. 30-34, 2016.

JESCHKE, P. The unique role of halogen substituents in the design of modern agrochemicals. **Pest Management Science**, v. 66, n. 1, p. 10-27, 2010/01/01 2010.

JESCHKE, P. Latest generation of halogen-containing pesticides. **Pest Management Science**, v. 73, n. 6, p. 1053-1066, jun. 2017.

JESKE, L.; PLACZEK, S.; SCHOMBURG, I.; CHANG, A. *et al.* BRENDA in 2019: a European ELIXIR core data resource. **Nucleic acids research**, v. 47, n. 1, p. 542-549, 2018.

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

JONES, J. T.; HAEGEMAN, A.; DANCHIN, E. G. J.; GAUR, H. S. *et al.* Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 14, n. 9, p. 946-961, 2013/12/01 2013.

JU-YONG, P.; IN-HO, C.; IL-KWON, P.; SANG-CHUL, S. Nematicidal activity of medicinal plant extracts and two cinnamates isolated from *Kaempferia galanga* L. (Proh Hom) against the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. **Nematology**, v. 8, n. 3, p. 359-365, 2006.

JUNG, M. Inhibitors of histone deacetylase as new anticancer agents. **Current medicinal chemistry**, v. 8, n. 12, p. 1505-1511, 2001.

JUNG, M.; HOFFMANN, K.; BROSCHE, G.; LOIDL, P. Analogues of trichostatin A and trapoxin B as histone deacetylase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 7, n. 13, p. 1655-1658, 1997.

KARLBERG, T.; MARKOVA, N.; JOHANSSON, I.; HAMMARSTRÖM, M. *et al.* Structural Basis for the Interaction between Tankyrase-2 and a Potent Wnt-Signaling Inhibitor. **Journal of Medicinal Chemistry**, 5v. 3, n. 14, p. 5352-5355, jul. 2010.

KHAN, M. R. **Plant nematodes: methodology, morphology, systematics, biology and ecology.** CRC Press, 2008.

KIM, S.; CHEN, J.; CHENG, T.; GINDULYTE, A. *et al.* PubChem 2019 update: improved access to chemical data. **Nucleic acids research**, v. 47, n. 1, p. 1102-1109, 2018.

KIRBY, C. A.; CHEUNG, A.; FAZAL, A.; SHULTZ, M. D. *et al.* Structure of human tankyrase 1 in complex with small-molecule inhibitors PJ34 and XAV939. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 68, n. 2, p. 115-118, 2012.

KITCHEN, D. B.; DECORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature reviews Drug discovery**, v. 3, n. 11, p. 935, 2004.

KLAMT, A.; SCHÜÜRMAN, G. COSMO: a new approach to dielectric screening in solvents with explicit expressions for the screening energy and its gradient. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions**, v. 2, n. 5, p. 799-805, 1993.

KORB, O.; STUTZLE, T.; EXNER, T. E. Empirical scoring functions for advanced protein–ligand docking with PLANTS. **Journal of chemical information and modeling**, v. 49, n. 1, p. 84-96, 2009.

KOSLOFF, D.; KOSLOFF, R. A Fourier method solution for the time dependent Schrödinger equation as a tool in molecular dynamics. **Journal of Computational Physics**, v. 52, n. 1, p. 35-53, 1983.

KROHN, K.; STEINGRÖVER, K.; SRINIVASA RAO, M. Isolation and synthesis of chalcones with different degrees of saturation. **Phytochemistry**, v. 61, n. 8, p. 931-936, jan. 2002.

KWON, B.-M.; LEE, S.-H.; CHO, Y.-K.; BOK, S.-H. *et al.* Synthesis and biological activity of cinnamaldehydes as angiogenesis inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 7, n. 19, p. 2473-2476, jul. 1997.

KYNDT, T.; VIEIRA, P.; GHEYSEN, G.; DE ALMEIDA-ENGLER, J. Nematode feeding sites: Unique organs in plant roots. **Planta**, v. 238, n. 5, p. 807-818, 2013.

LAI, K.-K.; STOGIOS, P. J.; VU, C.; XU, X. *et al.* An Inserted / Subdomain Shapes the Catalytic Pocket of *Lactobacillus johnsonii* Cinnamoyl Esterase. **PLOS ONE**, v. 6, n. 8, p. e23269, 2011.

LEE, J.-K.; HEO, J.-W.; KIM, S.-I.; HONG, T.-K. *et al.* Toxicity of *Kaempferia galanga* rhizome constituents to *Meloidogyne incognita* juveniles and eggs. **Nematology**, v. 13, n. 2, p. 235-244, 2011.

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

LI, Y. C.; JI, H.; LI, X. H.; ZHANG, H. X. *et al.* Isolation of nematicidal constituents from essential oil of *Kaempferia galanga* L rhizome and their activity against *Heterodera avenae* Wollenweber. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 16, n. 1, p. 59-65, 2017.

LINDAHL, E.; HESS, B.; VAN DER SPOEL, D. GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. **Molecular modeling annual**, v. 7, n. 8, p. 306-317, 2001.

LIU, G.; LAI, D. W.; LIU, Q. Z.; ZHOU, L. G. *et al.* Identification of Nematicidal Constituents of *Notopterygium incisum* Rhizomes against *Bursaphelenchus xylophilus* and *Meloidogyne incognita*. **Molecules**, v. 21, n. 10, oct. 2016.

LIU, Z.; FANG, H.; REAGAN, K.; XU, X. *et al.* In silico drug repositioning—what we need to know. **Drug discovery today**, v. 18, n. 3-4, p. 110-115, 2013.

LIU, Z.; LIU, Y.; ZENG, G.; SHAO, B. *et al.* Application of molecular docking for the degradation of organic pollutants in the environmental remediation: A review. **Chemosphere**, v. 203, p. 139-150, 2018.

LOPEZ-SERNA, R.; ERNST, F.; WU, L. S. Analysis of cinnamaldehyde and diallyl disulfide as eco-pesticides in soils of different textures—a laboratory-scale mobility study. **Journal of Soils and Sediments**, v. 16, n. 2, p. 566-580, Feb 2016.

LOUIE, G. V.; BOWMAN, M. E.; TU, Y.; MOURADOV, A. *et al.* Structure-Function Analyses of a Caffeic Acid *O*-Methyltransferase from Perennial Ryegrass Reveal the Molecular Basis for Substrate Preference. **The Plant Cell**, v. 22, n. 12, p. 4114, 2010.

LUZHKOV, V.; WARSHEL, A. Microscopic models for quantum mechanical calculations of chemical processes in solutions: LD/AMPAC and SCAAS/AMPAC calculations of solvation energies. **Journal of Computational Chemistry**, v. 13, n. 2, p. 199-213, 1992.

LÓPEZ, J. E.; SULLIVAN, E. D.; FIERKE, C. A. Metal-dependent deacetylases: cancer and epigenetic regulators. **ACS chemical biology**, v. 11, n. 3, p. 706-716, 2016.

MARESCA, A.; TEMPERINI, C.; POCHET, L.; MASEREEL, B. *et al.* Correction to Deciphering the Mechanism of Carbonic Anhydrase Inhibition with Coumarins and Thiocoumarins. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 14, p. 5689-5689, jul. 2015.

MARESCA, A.; TEMPERINI, C.; VU, H.; PHAM, N. B. *et al.* Non-Zinc Mediated Inhibition of Carbonic Anhydrases: Coumarins Are a New Class of Suicide Inhibitors. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 8, p. 3057-3062, mar. 2009.

MARKS, P. A.; MILLER, T.; RICHON, V. M. Histone deacetylases. **Current opinion in pharmacology**, v. 3, n. 4, p. 344-351, 2003.

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

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

MEIER, R.; PIPPEL, M.; BRANDT, F.; SIPPL, W. *et al.* ParaDockS: a framework for molecular docking with population-based metaheuristics. **Journal of chemical information and modeling**, v. 50, n. 5, p. 879-889, 2010.

MELESINA, J.; PRAETORIUS, L.; SIMOBEN, C. V.; ROBAA, D. *et al.* **Design of selective histone deacetylase inhibitors: rethinking classical pharmacophore**. Future Science, 2018.

MEYER, S. L. F.; ROBERTS, D. P. Combinations of biocontrol agents for management of plant-parasitic nematodes and soilborne plant-pathogenic fungi. **Journal of nematology**, v. 34, n. 1, p. 1-8, 2002.

MOMTAZ, S.; HASSANI, S.; KHAN, F.; ZIAEE, M. *et al.* Cinnamon, a promising prospect towards Alzheimer's disease. **Pharmacological Research**, v. 130, p. 241-258, abr. 2018.

MONTEIRO-ALFREDO, T. **Composição química, avaliação do potencial antioxidante e toxicidade das folhas de *Acrocomia aculeata* (Jacq) Lodd. ex. Mart.** 2016.

MOPAC, S. J. J. P. **Colorado Springs, CO: Stewart Computational Chemistry, USA, 2017.** 2016.

MUKHTAR, T.; KAYANI, M. Z.; HUSSAIN, M. A. Nematicidal activities of *Cannabis sativa* L. and *Zanthoxylum alatum* Roxb. against *Meloidogyne incognita*. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 447-453, 2013/03/01/ 2013.

MUNIF, A.; HALLMANN, J.; SIKORA, R. A. The influence of endophytic bacteria on *Meloidogyne incognita* infection and tomato plant growth. **Journal of the International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences**, v. 19, n. 2, p. 68-74, 2013.

NARWAL, M.; VENKANNAGARI, H.; LEHTIÖ, L. Structural Basis of Selective Inhibition of Human Tankyrases. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 3, p. 1360-1367, 2012/02/09 2012.



NAZ, I.; ABDULKAFI, S.; MUNIR, I.; AHMAD, M. *et al.* Cis- and trans-protopinium, a novel nematicide, for the eco-friendly management of root-knot nematodes. **Crop Protection**, v. 81, p. 138-144, 2016.

NAZ, I.; ABDULKAFI, S.; MUNIR, I.; AHMAD, M. *et al.* Cis- and trans-protopinium, a novel nematicide, for the eco-friendly management of root-knot nematodes. **Crop Protection**, v. 81, p. 138-144, mar. 2016.

NEESE, F. ORCA-an ab initio. **Density Functional and Semiempirical program package, version**, v. 2, 2008.

NGALA, B. M.; VALDES, Y.; DOS SANTOS, G.; PERRY, R. N. *et al.* Seaweed-based products from *Ecklonia maxima* and *Ascophyllum nodosum* as control agents for the root-knot nematodes *Meloidogyne chitwoodi* and *Meloidogyne hapla* on tomato plants. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 3, p. 2073-2082, 2016..

NGUYEN, D. M. C.; SEO, D. J.; KIM, K. Y.; PARK, R. D. *et al.* Nematicidal activity of 3,4-dihydroxybenzoic acid purified from *Terminalia nigrovenulosa* bark against *Meloidogyne incognita*. **Microbial Pathogenesis**, v. 59-60, p. 52-59, 2013.

NICHOLS, B. L.; ELDERING, J.; AVERY, S.; HAHN, D. *et al.* Human small intestinal maltase-glucoamylase cDNA cloning homology to sucrase-isomaltase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 5, p. 3076-3081, 1998.

NIELSEN, T. K.; HILDMANN, C.; DICKMANN, A.; SCHWIENHORST, A. *et al.* Crystal Structure of a Bacterial Class 2 Histone Deacetylase Homologue. **Journal of Molecular Biology**, v. 354, n. 1, p. 107-120, nov. 2005.

NIELSEN, T. K.; HILDMANN, C.; RIESTER, D.; WEGENER, D. *et al.* Complex structure of a bacterial class 2 histone deacetylase homologue with a trifluoromethylketone inhibitor. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 63, n. 4, p. 270-273, 2007.

NILE, S. H.; NILE, A. S.; KEUM, Y. S.; BASKAR, V. *et al.* In vitro and in planta nematicidal activity of black pepper (*Piper nigrum* L.) leaf extracts. **Crop Protection**, v. 100, p. 1-7, 2017.

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

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

OLIVEIRA, B. G.; ARAÚJO, R. C. M. U. SAPT: ligação de hidrogênio ou interação de van der Waals? **Química Nova**, v. 35, n. 10, p. 2002-2012, 2012.

- OLIVEIRA, D. F.; CARVALHO, H. W. P. D.; NUNES, A. S.; SILVA, G. H. *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**, v. 31, p. 202-209, 2007.
- OLIVEIRA, D. F.; COSTA, V. A.; TERRA, W. C.; CAMPOS, V. P. *et al.* Impact of phenolic compounds on *Meloidogyne incognita* in vitro and in tomato plants. **Experimental parasitology**, v. 199, p. 17-23, 2019.
- PAL, S.; BANDYOPADHYAY, S.; RAY, S. Evolutionary Computation in Bioinformatics: A Review. **IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics, Part-C**, jan. 2005.
- PAN, L.; LI, X. Z.; SUN, D. A.; JIN, H. *et al.* Design and synthesis of novel coumarin analogs and their nematocidal activity against five phytonematodes. **Chinese Chemical Letters**, v. 27, n. 3, p. 375-379, Mar 2016.
- PARK, I.-K.; SEO, S.-M.; KIM, J. Nematicidal activity of plant essential oils and components from *Gaultheria fragrantissima* and *Zanthoxylum alatum* against the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. **Nematology**, v. 13, n. 1, p. 87-93, 2011.
- PATRICK, G. L. **An introduction to medicinal chemistry**. Oxford university press, 2013.
- PAVAN, A. R. Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de novos derivados ftalimídicos inibidores de histona deacetilase para anemia falciforme. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, SP, 2018.
- PERRY, R. N.; MOENS, M.; STARR, J. L. **Root-knot nematodes**. CABI, 2009. 184593492X.
- PETTERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; COUCH, G. S. *et al.* UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of computational chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605-1612, 2004.
- PHILLIPS, J. C.; BRAUN, R.; WANG, W.; GUMBART, J. *et al.* Scalable molecular dynamics with NAMD. **Journal of computational chemistry**, v. 26, n. 16, p. 1781-1802, 2005.
- RAJASEKHARAN, S. K.; LEE, J. H.; RAVICHANDRAN, V.; KIM, J. C. *et al.* Nematicidal and insecticidal activities of halogenated indoles. **Scientific Reports**, v. 9, feb. 2019.
- RAO, M. S.; UMAMAHESWARI, R.; PRITI, K.; RAJINIKANTH, R. *et al.* Role of biopesticides in the management of nematodes and associated diseases in horticultural crops. *In: Plant, Soil and Microbes*: Springer, 2016. p. 117-148.
- RAUNIO, H. In silico toxicology—non-testing methods. **Frontiers in pharmacology**, v. 2, p. 33, 2011.

RAVICHANDRA, N. G. **Horticultural nematology**. Springer, 2014.

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

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

RODRIGUES, C. R. **Processos Modernos no desenvolvimento de Fármacos: Modelagem molecular**. Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola, 2001.

SALVATELLA, X.; HAACK, T.; GAIRÍ, M.; MENDOZA, J. D. *et al.* Protein Surface Recognition. *In*: PONS, M. (Ed.). **NMR in Supramolecular Chemistry**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1999. p. 267-280.

SASSER, J. N.; CARTER, C. C. **Overview of the international Meloidogyne project 1975-1984**. 1985.

SATO, H.; SAITO, K.; YAMAZAKI, M. Acceleration of Mechanistic Investigation of Plant Secondary Metabolism Based on Computational Chemistry. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, 2019.

SCHLEGEL, H. B.; MILLAM, J. M.; IYENGAR, S. S.; VOTH, G. A. *et al.* Ab initio molecular dynamics: Propagating the density matrix with Gaussian orbitals. **The Journal of Chemical Physics**, v. 114, n. 22, p. 9758-9763, 2001.

SCHUETZ, A.; MIN, J.; ALLALI-HASSANI, A.; SCHAPIRA, M. *et al.* Human HDAC7 harbors a class IIa histone deacetylase-specific zinc binding motif and cryptic deacetylase activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 17, p. 11355-11363, 2008.

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

SEIDEL, C.; SCHNEKENBURGER, M.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Histone deacetylase modulators provided by Mother Nature. **Genes & nutrition**, v. 7, n. 3, p. 357, 2012.

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

SHI, Y.; MELLO, C. A CBP/p300 homolog specifies multiple differentiation pathways in *Caenorhabditis elegans*. **Genes & development**, v. 12, n. 7, p. 943-955, 1998.

SHREAZ, S.; WANI, W. A.; BEHBEHANI, J. M.; RAJA, V. *et al.* Cinnamaldehyde and its derivatives, a novel class of antifungal agents. **Fitoterapia**, v. 112, p. 116-131, jul. 2016.

SIEVERS, F.; HIGGINS, D. G. Clustal Omega, accurate alignment of very large numbers of sequences. *In: Multiple sequence alignment methods*: Springer, 2014. p. 105-116.

SIKORA, R. A.; COYNE, D.; HALLMANN, J.; TIMPER, P. **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. Cabi, 2018.

SILVA, F. A. M. D. **Síntese de derivados de ácidos cinâmicos**: Determinação da actividade anti-radicalar e antioxidante. 1998.

SILVA, G. H.; OLIVEIRA, D. F.; CAMPOS, V. P. Purificação de metabólitos fúngicos com efeitos tóxicos sobre *Meloidogyne incognita*. **Fitopatologia brasileira**, v. 27, p. 594-598, 2002.

SILVA, J. D. O.; SANTANA, M. V.; FREIRE, L. L.; FERREIRA, B. D. S. *et al.* Biocontrol agents in the management of *Meloidogyne incognita* in tomato. **Ciência Rural**, v. 47, n. 10, 2017-08-10 2017.

SILVAGGI, N. R.; BOLDT, G. E.; HIXON, M. S.; KENNEDY, J. P. *et al.* Structures of Clostridium botulinum Neurotoxin Serotype A Light Chain Complexed with Small-Molecule Inhibitors Highlight Active-Site Flexibility. **Chemistry & Biology**, v. 14, n. 5, p. 533-542, 2007/05/29/ 2007.

SLIWOSKI, G.; KOTHIWALE, S.; MEILER, J.; LOWE, E. W. Computational methods in drug discovery. **Pharmacological reviews**, v. 66, n. 1, p. 334-395, 2014.

SMIALOWSKA, A.; BAUMEISTER, R. Presenilin function in *Caenorhabditis elegans*. **Neurodegenerative Diseases**, v. 3, n. 4-5, p. 227-232, 2006.

SOMOZA, J. R.; SKENE, R. J.; KATZ, B. A.; MOL, C. *et al.* Structural Snapshots of Human HDAC8 Provide Insights into the Class I Histone Deacetylases. **Structure**, v. 12, n. 7, p. 1325-1334, 2004.

SOTOMAYOR, M.; SCHULTEN, K. Single-Molecule Experiments in Vitro and in Silico. **Science**, v. 316, n. 5828, p. 1144, 2007.

SOVA, M. Antioxidant and antimicrobial activities of cinnamic acid derivatives. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 12, n. 8, p. 749-767, 2012.

SPURNY, R.; DEBAVEYE, S.; FARINHA, A.; VEYS, K. *et al.* Molecular blueprint of allosteric binding sites in a homologue of the agonist-binding domain of the  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 19, p. E2543-E2552, 2015.

SRIVASTAVA, D. K.; JUDE, K. M.; BANERJEE, A. L.; HALDAR, M. *et al.* Structural Analysis of Charge Discrimination in the Binding of Inhibitors to Human Carbonic Anhydrases I and II. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 17, p. 5528-5537, 2007/05/01 2007.

STEFFEN, R. B.; STEFFEN, G. P. K.; ANTONIOLLI, Z. I.; JACQUES, R. J. S. *et al.* Efeito da abamectina e carbofuran no controle de danos causados por *Meloidogyne graminicola* em plantas de arroz irrigado. **Revista da FZVA**, v. 18, n. 2, 2011.

STERLING, T.; IRWIN, J. J. ZINC 15 – Ligand Discovery for Everyone. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 55, n. 11, p. 2324-2337, 2015/11/23 2015.

STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods II. Applications. **Journal of computational chemistry**, v. 10, n. 2, p. 221-264, 1989.

STEWART, J. J. P. MOPAC: a semiempirical molecular orbital program. **Journal of computer-aided molecular design**, v. 4, n. 1, p. 1-103, 1990.

SULTANA, N.; AKHTER, M.; KHAN, R. A.; AFZA, N. *et al.* Nematicidal natural products from the aerial parts of *Buddleja crispa*. **Natural Product Research**, v. 24, n. 9, p. 783-788, 2010.

SZABO, A.; OSTLUND, N. S. **Modern quantum chemistry**: introduction to advanced electronic structure theory. Courier Corporation, 2012.

TALELE, T. T.; KHEDKAR, S. A.; RIGBY, A. C. Successful applications of computer aided drug discovery: moving drugs from concept to the clinic. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 10, n. 1, p. 127-141, 2010.

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

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

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

TOCCO, G.; ELOH, K.; ONNIS, V.; SASANELLI, N. *et al.* Haloacetophenones as newly potent nematicides against *Meloidogyne incognita*. **Industrial Crops and Products**, v. 110, p. 94-102, 2017.

TOLEDO, A. C. O.; HIRATA, L. L.; BUFFON, M. D. C. M.; MIGUEL, M. D. *et al.* Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, v. 21, n. 1/2, p. 7-13, 2003.

TOSCO, P.; BALLE, T.; SHIRI, F. Open3DALIGN: an open-source software aimed at unsupervised ligand alignment. **Journal of computer-aided molecular design**, v. 25, n. 8, p. 777, 2011.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455-461, 2010.

UMAR, M. I.; ASMAWI, M. Z.; SADIKUN, A.; ATANGWHO, I. J. *et al.* Bioactivity-guided isolation of ethyl-p-methoxycinnamate, an anti-inflammatory constituent, from *Kaempferia galanga* L. extracts. **Molecules**, v. 17, n. 7, p. 8720-8734, 2012.

VANNINI, A.; VOLPARI, C.; FILOCAMO, G.; CASAVOLA, E. C. *et al.* Crystal structure of a eukaryotic zinc-dependent histone deacetylase, human HDAC8, complexed with a hydroxamic acid inhibitor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 42, p. 15064, 2004.

VIJAYAPALANI, P.; HEWEZI, T.; PONTVIANNE, F.; BAUM, T. J. An Effector from the Cyst Nematode *Heterodera schachtii* Derepresses Host rRNA Genes by Altering Histone Acetylation. **Plant Cell**, v. 30, n. 11, p. 2795-2812, Nov 2018. Article.

VOS, C.; SCHOUTEDEN, N.; VAN TUINEN, D.; CHATAGNIER, O. *et al.* Mycorrhiza-induced resistance against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* involves priming of defense gene responses in tomato. **Soil Biology and Biochemistry**, 60, p. 45-54, 2013. Article.

WAHLBERG, E.; KARLBERG, T.; KOUZNETSOVA, E.; MARKOVA, N. *et al.* Family-wide chemical profiling and structural analysis of PARP and tankyrase inhibitors. **Nature Biotechnology**, v. 30, n. 3, p. 283-288, 2012/03/01 2012.

WANG, S. C.; ALSEEKH, S.; FERNIE, A. R.; LUO, J. The Structure and Function of Major Plant Metabolite Modifications. **Molecular Plant**, 12, n. 7, p. 899-919, Jul 2019. Review.

WATSON, P. J.; FAIRALL, L.; SANTOS, G. M.; SCHWABE, J. W. R. Structure of HDAC3 bound to co-repressor and inositol tetrakisphosphate. **Nature**, v. 481, n. 7381, p. 335-340, jan. 2012.

WHARTON, D. A. 16. Nematode Survival Strategies. **The biology of nematodes**, p. 389, 2002.

WHITEHEAD, A. G.; HEMMING, J. R. A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil. **Annals of Applied Biology**, 55, n. 1, p. 25-+, 1965.

WILLETT, P. Similarity-based virtual screening using 2D fingerprints. **Drug discovery today**, v. 11, n. 23-24, p. 1046-1053, 2006.

WOODS, L. A.; DOLEZAL, O.; REN, B.; RYAN, J. H. *et al.* Native State Mass Spectrometry, Surface Plasmon Resonance, and X-ray Crystallography Correlate Strongly as a Fragment Screening Combination. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 5, p. 2192-2204, 2016/03/10 2016.

ZAKARIA, H. M.; KASSAB, A. S.; SHAMSELDEAN, M. M.; ORABY, M. M. *et al.* Controlling the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* in cucumber plants using some soil bioagents and some amendments under simulated field conditions. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 58, n. 1, p. 77-82, 2013.

ZAKI, M. J.; HSIAO, C.-J., **CHARM**: An efficient algorithm for closed itemset mining. **SIAM**. 457-473.

ZHANG, D.; MARKOULIDES, M. S.; STEPANOV, D.; RYDZIK, A. M. *et al.* Structure activity relationship studies on rhodanines and derived enethiol inhibitors of metallo- - lactamases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 11, p. 2928-2936, jul. 2018.

ZHANG, Y.; NG, H.-H.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; TEMPST, P. *et al.* Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. **Genes & development**, v. 13, n. 15, p. 1924-1935, 1999.

ZINOVYEVA, A. Y.; GRAHAM, S. M.; CLOUD, V. J.; FORRESTER, W. C. The *C. elegans* histone deacetylase HDA-1 is required for cell migration and axon pathfinding. **Developmental Biology**, v. 289, n. 1, p. 229-242, jan 2006.

ZOU, J.; GAO, P.; HAO, X.; XU, H. *et al.* Recent progress in the structural modification and pharmacological activities of ligustrazine derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 147, p. 150-162, out. 2018.