



**CONFORME SOLICITAÇÃO DO AUTOR, ESTA
PRODUÇÃO INTELECTUAL POSSUI
RESTRIÇÃO DE ACESSO**

**CAXIAS DO SUL
2018**

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA

PAULINE FAGUNDES ROSALES

***Alcaloides indólicos de *Tabernaemontana catharinensis*: fracionamento, isolamento,
síntese e estudos de atividade *in vitro* e *in silico****

CAXIAS DO SUL
2020

PAULINE FAGUNDES ROSALES

**Alcaloides indólicos de *Tabernaemontana catharinensis*: fracionamento, isolamento,
síntese e estudos de atividade *in vitro* e *in silico***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção de grau de Doutora em Biotecnologia.

Orientador Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva

Coorientadora Dr^a. Adriana del Carmen Escalona Gower

CAXIAS DO SUL

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

R788a Rosales, Pauline Fagundes

Alcaloides indólicos de *Tabernaemontana catharinensis* :
fracionamento, isolamento, síntese e estudos de atividade *in vitro* e *in*
silico / Pauline Fagundes Rosales. – 2020.

144, 26 f. : il. ; 30 cm

Tese (Doutorado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia, 2020.

Orientação: Sidnei Moura e Silva.

Coorientação: Adriana del Carmen Escalona Gower.

1. Química farmacêutica. 2. Química vegetal. 3. Plantas medicinais.
4. Agentes antineoplásicos. 5. Alcalóides indólicos. I. Silva, Sidnei
Moura e, orient. II. Gower, Adriana del Carmen Escalona, coorient. III.
Título.

CDU 2. ed.: 615.277.3

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)
Ana Guimarães Pereira - CRB 10/1460

PAULINE FAGUNDES ROSALES

**Alcaloides indólicos de *Tabernaemontana catharinensis*: fracionamento, isolamento,
síntese e estudos de atividade *in vitro* e *in silico***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção de grau de Doutora em Biotecnologia.

Aprovada em 25 de maio de 2020.

Banca Examinadora

Orientador: Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva
Universidade de Caxias do Sul

Coorientadora: Dr^a Adriana del Carmen Escalona Gower

Prof. Dr. Leandro Tasso
Universidade de Caxias do Sul

Prof. Dr. Claudio Martin Pereira de Pereira
Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Fernando Batista da Costa
Universidade de São Paulo - *Campus* Ribeirão Preto

AGRADECIMENTOS

Agradeço a CAPES, CNPq e FAPERGS pelo apoio financeiro.

À Universidade de Caxias do Sul e ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia.

Ao IFRS pela oportunidade de afastamento durante o doutorado.

Às Universidades parceiras neste trabalho: UNIJUÍ, pela coleta da planta; UNIPAMPA, pelos estudos *in silico* e UFPel, pelos ensaios *in vitro*. E também ao Laboratório de Genoma Proteômica e Reparos de DNA da UCS pela realização dos ensaios biológicos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sidnei Moura, pela confiança depositada para o desenvolvimento deste projeto, apoio, entusiasmo e paciência durante as dificuldades encontradas durante as etapas.

À minha querida coorientadora Dr^a. Adriana del Carmen Escalona Gower pelo oportunidade imensurável de aprendizado que me proporcionou, pelas ajudas incansáveis, orientação até mesmo à distância, e mais do que isso, a nossa amizade.

A todos os colegas e amigos do LBIOP que participaram de modo direto ou indireto na realização deste trabalho. Principalmente, a técnica de laboratório, Dr^a Fabiana Agostini, pela realização nas análises de massas.

Aos bolsistas de iniciação científica que me ajudaram muito na realização deste trabalho: Vinícius Molon, Larissa Dutra, Yasmin Cusin, Franco Smiderle e, principalmente à Gabriela Bordin, que foi incansável e dedicada durante todo o tempo que esteve atuando na pesquisa.

Aos estagiários do IFRS–*Campus* Caxias do Sul, que também passaram por este projeto: Camila Cavalheiro, Lucas Bovo, Letícia Vedana, Bruna Meira e Alisson Bonatto.

À minha amiga e colega Maiara Moraes, que esteve sempre disposta a ajudar no que fosse preciso, tanto nas discussões científicas quanto na minha vida pessoal durante este período.

À minha amiga e colega Luana Crocoli, agradeço por toda força e incentivo, além é claro, das nossas conversas durante o café.

Um agradecimento especial, a ex-colega de laboratório Marilda Chiarello, minha grande amiga, que tornava os meus dias mais felizes.

Ao meu amado esposo, Thiago Souto, que me incentivou desde o começo desta caminhada, me apoiando e sendo paciente nos momentos difíceis.

À minha família, pelo amor, carinho, apoio e compreensão. Obrigada por acreditarem em mim!

Agradeço a todos que fizeram parte desta caminhada ao meu lado.

RESUMO

A diversidade molecular proveniente de plantas tem sido empregada com êxito na área de química medicinal, em especial na obtenção de substância, pois os metabólitos secundários das plantas, em muitos casos, são ativos em sistemas biológicos. Em consequência, temos uma fonte de novas substâncias como protótipos na pesquisa de novos fármacos. Os alcaloides constituem a classe com maior diversidade estrutural na natureza. Com foco em atividade biológica, *in vitro* e *in vivo*, estes compostos têm sido aplicados, principalmente, como inibidores mitóticos, bem como na desmontagem de microtúbulos e inibidores da topoisomerase I. Sendo assim, esse trabalho teve como objetivo realizar um estudo bio-guiado da atividade antitumoral dos alcaloides indólicos provenientes da planta *Tabernaemontana catharinensis*. Para isto, frações foram obtidas e avaliadas quanto à citotoxicidade *in vitro* contra duas linhagens tumorais A375 (melanoma) e A549 (pulmão). Além disso, os alcaloides indólicos identificados nessas frações foram avaliados quanto a sua toxicidade *in silico* e afinidades de ligação com a enzima topoisomerase I. No resultado preliminar, foi percebido que a fração mais ativa continha o alcaloide afinisina. Posto isto, a substância foi isolada e caracterizada quimicamente por RMN e EMAR. Posteriormente, este composto foi testado *in vitro* com diferentes linhagens de melanoma (A375, WM1366 e SK-MEL-28), além de avaliar a indução de apoptose e a parada do ciclo celular para identificação do mecanismo de ação. O resultado dessa segunda etapa mostrou que a afinisina foi mais ativa frente às linhagens WM1366 e A375, com CI_{50} variando entre 32,86 e 57,62 $\mu\text{g/mL}$. Ademais, a indução de apoptose e a parada das células na fase G0/G1 indicaram que o composto pode ser uma potencial protótipo para o desenvolvimento de novos agentes antineoplásicos. Nesse contexto, a última etapa deste estudo foi a proposta de nove compostos com estrutura semelhante à afinisina e simplificação molecular, para avaliação *in silico* quanto a atividade, toxicidade e afinidades de ligação com a topoisomerase I. Baseando-se nos resultados obtidos, foi realizado a síntese de um dos compostos e avaliação da citotoxicidade contra células de melanoma (WM1366 e A375). Porém a substância não apresentou atividade frente à essas linhagens celulares. Foi concluído a partir desses estudos que a afinisina é o melhor protótipo e pode ser usada em novos estudos antitumorais, como modelo de estrutura básica para busca de outros compostos ativos.

Palavras-chave: alcaloides indólicos, afinisina, *T. catharinensis*, antitumoral, melanoma.

ABSTRACT

The molecular diversity provided by plants has been used successfully in the field of medicinal chemistry, especially in obtaining substances, since the plant's secondary metabolites, in many cases, are active in biological systems. As a result, there is a source of new substances as prototypes in the search for new drugs. Alkaloids are the class with the greatest structural diversity in nature. Focusing on biological activity, *in vitro* and *in vivo*, these compounds have been applied, mainly, as mitotic inhibitors, as well as the disassembly of microtubules and topoisomerase I inhibitors. Therefore, this work aimed to conduct a bio-guided study of the antitumor activity of the indole alkaloids from the plant *Tabernaemontana catharinensis*. For this, fractions were obtained and evaluated for cytotoxicity *in vitro* against two tumor lines A375 (melanoma) and A549 (lung). In addition, the indole alkaloids identified in these fractions were evaluated for their *in silico* toxicity and binding affinities with the topoisomerase I enzyme. In the preliminary result, it was noticed that the most active fraction was contained the indole alkaloid affinisine. Thus, this substance was carried-out, as well chemically characterized by NMR and HRMS. Subsequently, this compound was tested *in vitro* with different strains of melanoma (A375, WM1366 and SK-MEL-28), in addition to evaluating the induction of apoptosis and the arrest of the cell cycle to identify the mechanism of action. The result of this second step showed that the affinisine was more active compared to the lines WM1366 and A375, with IC_{50} varying between 32.86 and 57.62 $\mu\text{g/mL}$. Furthermore, the induction of apoptosis and the arrest of cells in the G0/G1 phase indicated that the compound might be a potential prototype for the development of new antineoplastic agents. In this context, the last step of this study was the proposal of nine compounds with a structure similar to affinisine and molecular simplification, for *in silico* evaluation regarding the activity, toxicity and binding affinities with topoisomerase I. Based on the results obtained, the synthesis of a compound and evaluation of cytotoxicity against melanoma cells (WM1366 and A375) were performed. However, the substance showed no activity against these cell lines. In summary, this work indicated that affinisine is the best prototype and can be used in new antitumor studies, as a basic structure model for the search for other active compounds.

Keywords: indole alkaloids, affinisine, *T. catharinensis*, antitumor, melanoma.