

Semissíntese de conjugados derivados da própolis verde com aplicações terapêuticas

Autores: Carolina Guimarães Moura¹, Vanessa Leiria Campo²

Colaboradores: Lílian Cataldi Rodrigues³

^{1,2}Centro Universitário Barão de Mauá

³Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP

¹*carolinaguimoura@hotmail.com (Medicina)*, ²*vanessa.campo@baraodemaua.br*

Resumo

Diversas substâncias naturais já se comprovaram eficazes no combate a doenças crônicas como o câncer. Porém, a incidência de neoplasias continua crescendo e seu tratamento ainda possui efeitos nocivos. O ácido ferúlico, um produto natural isolado da própolis verde, surge como um promissor anticancerígeno. Logo, este trabalho objetiva a semissíntese de derivados do ácido ferúlico, visando sua aplicação em ensaios biológicos, tais como atividade antitumoral.

Introdução

A própolis é uma substância natural e atóxica resinosa coletada por abelhas de mel de diversas fontes vegetais, possuindo relatos de seu uso na medicina desde 300 a.C. (GHISALBERTI, 1979). Dentre os principais constituintes da própolis verde está um composto fenólico denominado ácido ferúlico, o qual tem se destacado no cenário atual da pesquisa farmacológica.

De acordo com descrições na literatura, o ácido ferúlico possui propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, antidiabéticas, hepatoprotetoras, anti-ateroscleróticas, antibacterianas, neuroprotetoras e antineoplásicas (DEDEK *et al.*, 2019). Esta substância natural, através da sua potente atividade antioxidante, é capaz de prevenir a formação de espécies reativas de oxigênio, as quais causam lesões celulares associadas ao surgimento de diversas doenças, incluindo câncer (DAMASCENO *et al.*, 2017). No que se refere à atividade antitumoral, Cui *et al.* (2018) relatou que a modificação de nanopartículas de selênio com ácido ferúlico potencializou o efeito inibitório deste no crescimento de células neoplásicas, sendo também capaz de inibir a proliferação cancerígena de diversas outras maneiras, como pela alteração do ciclo celular da célula tumoral, induzindo a apoptose e regulando a produção proteica (GUPTA *et al.*, 2021). Além disso, diversos outros estudos obtiveram resultados positivos quanto ao potencial do fármaco no tratamento de neoplasias (ALANAZI *et al.*, 2021; BASKARAN *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2016).

Nas últimas décadas, tem se tornado cada vez mais popular o estudo de compostos naturais derivados de plantas no combate de diversas doenças crônicas, especialmente contra diferentes tipos de neoplasias (SAMTIYA *et al.*, 2021). O principal motivo para estas incessantes pesquisas é que, mesmo com os avanços terapêuticos no campo das ciências da saúde, o câncer continua sendo uma das principais causas de mortalidade e morbidade no mundo, com aproximadamente 10 milhões de mortes contabilizadas em 2020 (TULI *et al.*, 2022; FERLAY *et al.*, 2021).

Nesse sentido, os cânceres de pele se destacam por possuir uma nova incidência de diagnósticos a cada ano, maior do que a de todas outras formas de câncer combinadas (ONEILL; SCOGGINS, 2019). Dentre as neoplasias de pele, o melanoma cutâneo é o tipo mais mortal, possuindo também crescimento mais rápido do que qualquer outra malignidade (VOLKOVOVA *et al.*, 2012). Portanto, há uma busca constante por fármacos capazes de tratar e prevenir a ocorrência desta patologia. Ambothi e Nagarajan (2014) observaram em seu estudo que o ácido ferúlico é capaz de reduzir a formação de espécies reativas de oxigênio induzida por radiação ultravioleta-B em fibroblastos da pele humana, a qual é um dos fatores que contribuem significativamente para o desenvolvimento de neoplasias cutâneas. Portanto, indicando se tratar de uma substância com potencial anticancerígeno promissor e sugerindo a possibilidade do seu uso como um novo agente quimioterápico, o que também foi observado em outros estudos (AMBOTHI; NAGARAJAN, 2014; YOON *et al.*, 2015).

Ademais, apesar de já existirem fármacos amplamente utilizados no tratamento das doenças neoplásicas, há diversos relatos na literatura sobre os efeitos maléficos de tais medicações. Em seu estudo, Kleckner *et al.* (2019) destaca que uma gama de efeitos colaterais estão presentes na terapia do câncer, sendo alguns deles: vômitos, anorexia, queixas cognitivas, distúrbios do sono, estresse psicológico, toxicidade metabólica, cardiovascular

e para a saúde óssea, além de neuropatia periférica induzida pela quimioterapia.

Desse modo, evidencia-se a necessidade de investigação de novas estratégias menos danosas e mais eficazes no tratamento do melanoma e dos demais tipos de neoplasias, sendo os derivados da própolis verde compostos atrativos para a pesquisa terapêutica pelas suas propriedades biológicas e atoxicidade.

Com base no exposto, este trabalho apresenta a semissíntese de derivados do ácido ferúlico conjugados a aminoácidos, visando aplicações terapêuticas em ensaios antitumorais. Desta forma, os derivados de ácido ferúlico obtidos podem vir a representar agentes terapêuticos eficazes, porém com menos efeitos colaterais se comparados aos fármacos tradicionais atualmente utilizados. Ressalta-se que o ácido ferúlico, isolado da própolis verde, possui boa disponibilidade comercial e um baixo custo para síntese laboratorial, o que o torna um protótipo ainda mais atrativo, corroborando a ideia de futura implementação deste produto natural e seus derivados na prática clínica (DINIZ et al., 2019).

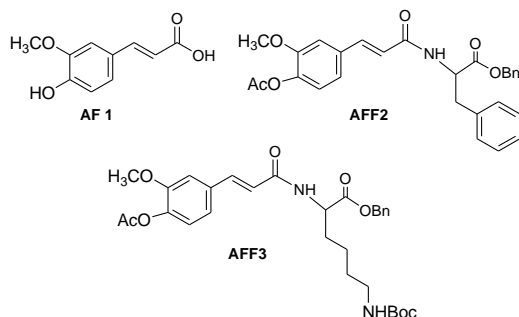
Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi realizar a preparação de derivados do composto ácido ferúlico (AF), isolado da própolis verde, visando aplicação em ensaios antitumorais.

Neste contexto, os objetivos específicos foram:

- 1) A realização da semissíntese de derivados do ácido ferúlico (AF) conjugados aos aminoácidos fenilalanina e lisina. O composto natural ácido ferúlico (AF) **1** e os derivados ácido ferúlico-fenilalanina (AFF) **2** e ácido ferúlico lisina (AFL) **3** estão representados na Figura 1.
- 2) Aplicação dos compostos AF **1**, AFF **2** e AFF **3** em ensaios antitumorais *in vitro* com células de melanoma B16F10.

Figura 1 - Estruturas químicas dos compostos ácido ferúlico 1, ácido ferúlico-fenilalanina (AFF) 2 e ácido ferúlico-lisina (AFL) 3



Fonte: Os autores

Materiais e Métodos

Este projeto foi realizado em parceria com a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP), com participação em Projeto Temático FAPESP ligado a pesquisas com própolis (processo 2017/04138-8).

As reações químicas para obtenção dos compostos semissintéticos ácido ferúlico-fenilalanina (AFF) **2** e ácido ferúlico lisina (AFL) **3** foram realizadas no laboratório de síntese orgânica na FCFRP-USP. As análises de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H) para comprovação das estruturas obtidas foram realizadas no equipamento Bruker Advance DPX 400 (400 MHz) da FFCLRP-USP. Os ensaios antitumorais com os compostos AF **1**, AFF **2** e AFL **3** foram realizados no laboratório de Imunoglicobiologia da FCFRP-USP.

Semissíntese dos derivados ácido ferúlico-fenilalanina 2 e lisina 3

Síntese de acetil-ácido ferúlico 4

O composto ácido ferúlico **1** (200 mg, 1,03 mmol) foi acetilado com piridina (5 ml) e anidrido acético (5,5 ml), sendo a solução agitada por aproximadamente 12 horas à temperatura ambiente (JEANLOZ; FLOWERS, 1962). Em seguida, a mistura foi rotaevaporada a pressão reduzida para remoção do solvente e purificada por coluna cromatográfica clássica utilizando o sistema de solventes Acetato de etila (AcOEt)/Hexano (Hex) 7:3. Desta forma, o ácido ferúlico acetilado **4** foi obtido com rendimento quantitativo (243 mg, 1,03 mmol).

Síntese de Fenilalanina-O-benzil (NH₂PheOBn) 5

O aminoácido N-Fmoc-fenilalanina O-benzil **6** (155 mg, 0,32 mmol) foi tratado com solução de morfolina 50% em DMF (2 mL), sendo a mistura reacional agitada à temperatura ambiente por 1 h (MARTINS-TEIXEIRA et al., 2013). A seguir, foi realizada a remoção do solvente e purificação da mistura por coluna cromatográfica clássica utilizando o sistema de solventes Acetato de etila (AcOEt)/Hexano (Hex) 7:3. Assim, o aminoácido NH₂-Phe-OBn **5** foi obtido com rendimento de 65% (53 mg, 0,206 mmol).

Síntese de Ácido Ferúlico-Fenilalanina (AFF) 2

Uma solução de ácido ferúlico acetilado **4** (24 mg, 0,1 mmol) e aminoácido NH₂-Phe-OBn **5** (50 mg, 0,2 mmol) em DMF (1 mL) foi tratada com o reagente HATU (66 mg, 0,2 mmol), e a base DIPEA (52 µl, 0,2 mmol) em DMF (RODRIGUES et al., 2021). A mistura reacional foi agitada por 16 horas, concentrada e purificada por coluna cromatográfica clássica, fase móvel Hex/AcOEt

(1:1 v/v), fornecendo o produto AFF **2** como um sólido branco, com rendimento quantitativo (53,5 mg, 0,11 mmol). 50% em DMF (2 mL), sendo a mistura reacional agitada à temperatura ambiente por 1 h. A seguir, foi realizada a remoção do solvente e purificação da mistura por coluna cromatográfica clássica utilizando o sistema de solventes Acetato de etila (AcOEt)/ Hexano (Hex) 7:3. Assim, o aminoácido NH₂-Lis-OBn **7** foi obtido com rendimento de 70% (84 mg, 0,25 mmol).

Síntese de Ácido Ferúlico-Lisina (AFL) **3**

Uma solução de ácido ferúlico acetilado **4** (7,3 mg, 0,03 mmol) e aminoácido NH₂-Lis-OBn **7** (21 mg, 0,062 mmol) em DMF (1 mL) foi tratada com o reagente HATU (23,8 mg, 0,062 mmol), e a base DIPEA (25 µl, 0,3 mmol) em DMF (RODRIGUES *et al.*, 2021). A mistura reacional foi agitada por 16 horas, concentrada e purificada por coluna cromatográfica clássica, fase móvel Hex/AcOEt (1:1 v/v), fornecendo o produto AFL **3** como um sólido branco, com rendimento quantitativo (17 mg, 0,03 mmol).

Atividade antitumoral *in vitro*

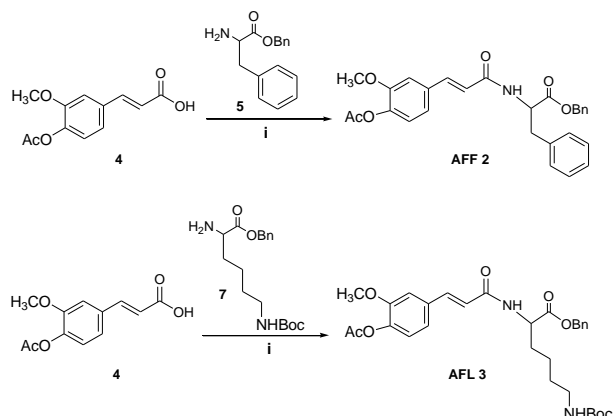
O método conhecido como MTT (3- 4,5-dimethyl-2-thiazolyl -2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide), baseado na medida de viabilidade celular, foi utilizado para a avaliação da atividade antitumoral dos compostos AF **1**, AFF **2** e AFF **3**. As células tumorais de melanoma B16F10 e as células normais de fibroblasto NIH3T3 (controle) foram plaqueadas em placas de 96 poços. Após 24 h as células foram tratadas com os compostos solubilizados em tampão PBS com 0,5% de DMSO, em concentrações de 2,5 µM a 200 µM. As placas foram então incubadas por 72 h e a seguir submetidas à leitura em espectrofotômetro a 570 nm (RODRIGUES, 2021). Os dados obtidos foram processados no programa GraphPad Prism v.5, sendo possível determinar as taxas de viabilidade celular.

Resultados e Discussão

A semissíntese dos derivados do ácido ferúlico AFF **2** e AFL **3** foi realizada a partir de reações de acoplamento do ácido ferúlico acetilado **4** com os aminoácidos NH₂PheOBn **5** e NH₂-Lis-OBn **7**. Inicialmente, foi realizada a acetilação do ácido ferúlico **1**, utilizando-se piridina e anidrido acético (JEANLOZ; FLOWERS, 1962), com o objetivo de aumentar a estabilidade da molécula para as reações subsequentes. As reações de acoplamento foram realizadas utilizando-se o reagente de acoplamento HATU (hexafluorofosfato azabenzotriazol tetrametil urônio) e a base DIPEA (diisopropiletilamina) em solvente DMF (dimetilformamida), à temperatura ambiente durante 16 horas (Esquema 1), com

subsequente purificação dos produtos obtidos por coluna cromatográfica clássica (RODRIGUES, 2021). Os derivados semissintéticos obtidos ácido ferúlico-fenilalanina (AFF) **2** e ácido ferúlico-lisina (AFL) **3** foram obtidos com rendimentos de 100 % e 70%, respectivamente.

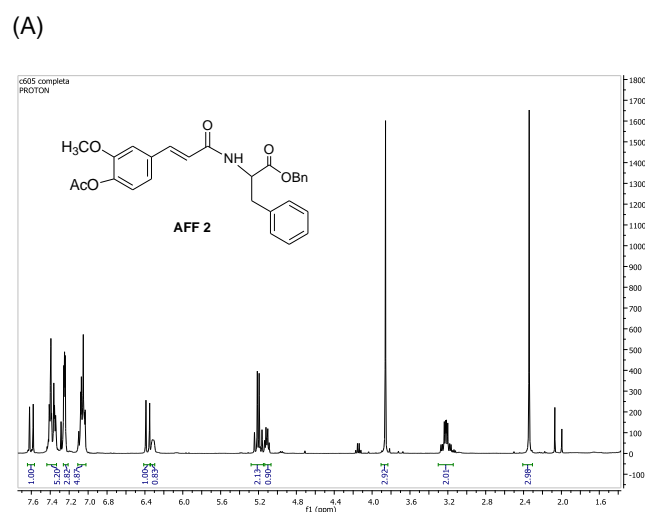
Esquema 1 - Síntese dos derivados ácido-ferúlico fenilalanina **2** e ácido ferúlico-lisina **3** por reações de acoplamento. Condições reacionais: i. HATU, DIPEA e DMF.



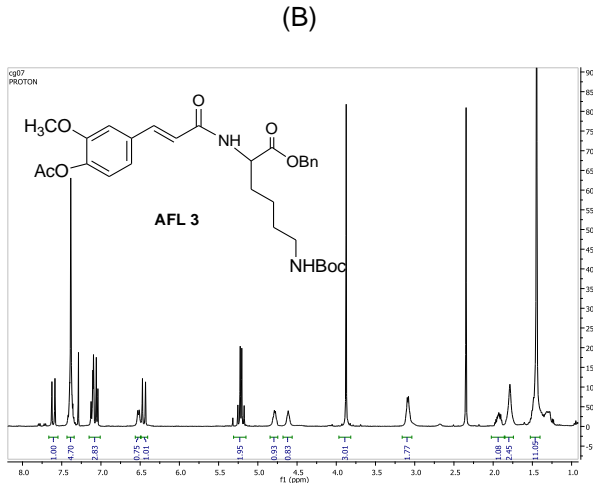
Fonte: Os autores

As estruturas dos derivados AFF **2** e AFL **3** obtidos foram comprovadas pelos espectros de RMN ¹H, conforme apresentado na Figura 2. Nos espectros são observados sinais característicos de grupos químicos essenciais, tais como dos anéis aromáticos e grupamentos alquílicos do ácido ferúlico e dos aminoácidos fenilalanina e lisina.

Figura 2 - Espectros de RMN ¹H dos derivados ácido-ferúlico fenilalanina (AFF) **2** (A) e ácido ferúlico-lisina (AFL) **3** (B)



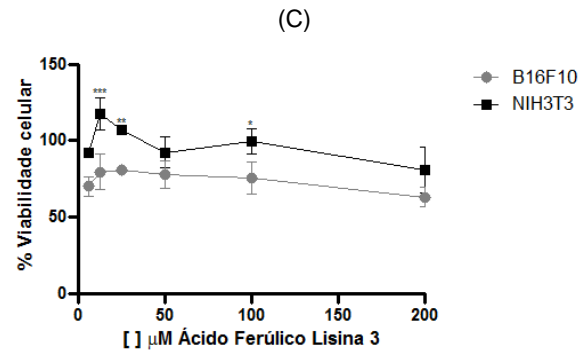
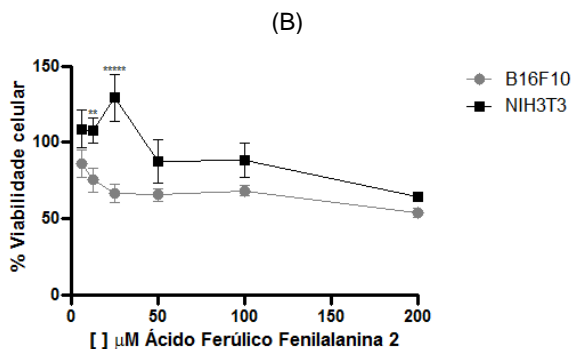
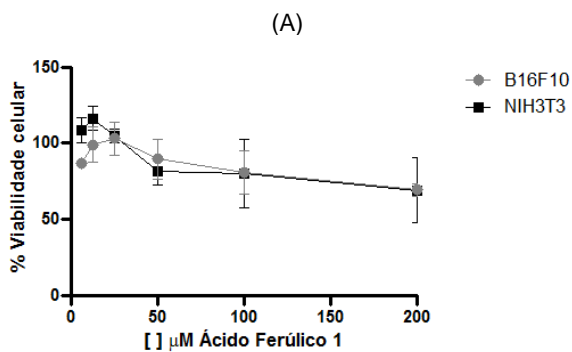
Fonte: Os autores



Fonte: Os autores

De acordo com os ensaios biológicos realizados, os derivados ácido ferúlico-fenilalanina (AFF) **2** e ácido ferúlico-lisina (AFL) **3** apresentaram atividade citotóxica frente às células de melanoma B16F10. Nos gráficos apresentados na Figura 3 é possível observar uma redução de viabilidade celular de cerca de 50% para os compostos (AFF) **2** e (AFL) **3**, não sendo verificada atividade significativa para o composto natural ácido ferúlico (AF) **1**. Este resultado demonstra que a conjugação do ácido ferúlico com os aminoácidos fenilalanina e lisina teve um efeito positivo na redução do crescimento de células tumorais de melanoma.

Figura 3 - Atividade antitumoral do composto AF 1 (A), AFF 2 (B) e AFL 3 (C)



Fonte: Os autores

Conclusão

As semissínteses dos derivados ácido ferúlico-fenilalanina (AFF) **2** e ácido ferúlico-lisina (AFL) **3** a partir do ácido ferúlico, isolado da própolis verde, foram realizadas de forma satisfatória a partir dos métodos sintéticos utilizados. Os compostos obtidos foram submetidos a ensaios antitumorais *in vitro* com células de melanoma B16F10, sendo verificada uma redução de viabilidade celular de cerca de 50%. Como próximas etapas, estes compostos serão avaliados em modelos antitumorais *in vivo* de melanoma, no biotério do CBM. Ademais, há também perspectiva de aplicação destes compostos em outras atividades terapêuticas.

Referências

- ALANAZI, Samyah *et al.* Chemical characterization of Saudi propolis and its antiparasitic and anticancer properties. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 11, n. 1, p. 1-9, 8 mar. 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-021-84717-5>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-84717-5>. Acesso em: 08 maio 2023.
- AMBOTHI, Kanagalakshmi; NAGARAJAN, Rajendra Prasad. Ferulic acid prevents ultraviolet-B radiation induced oxidative DNA damage in human dermal fibroblasts. **International Journal Of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases**, [s.l.], v. 4, n. 4, p. 203, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.4103/2231-0738.139400>. Disponível em: https://journals.lww.com/ijnp/Fulltext/2014/04040/Ferulic_acid_prevents_ultraviolet_B_radiation.3.aspx. Acesso em: 09 maio 2023.
- BASKARAN, Nagarethinam *et al.* Chemopreventive potential of ferulic acid in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary carcinogenesis in Sprague–Dawley rats. **European Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 637, n. 1-3, p. 22-29, jul. 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.03.054>.

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0014299910002815?via%3Dihub>. Acesso em: 08 maio 2023.

CUI, Dongxiao *et al.* Synthesis, characterization and antitumor properties of selenium nanoparticles coupling with ferulic acid. **Materials Science And Engineering: C**, [s.l.], v. 90, p. 104-112, set. 2018. DOI:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2018.04.048>.

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493117326334?via%3Dihub>. Acesso em: 08 maio 2023.

DAMASCENO, Sarah S. *et al.* Chemical Properties of Caffeic and Ferulic Acids in Biological System: implications in cancer therapy. a review. **Current Pharmaceutical Design**, [s.l.], v. 23, n. 20, p. 3015-3023, 18 ago. 2017. DOI:

<http://dx.doi.org/10.2174/1381612822666161208145508>. Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/316990509_Chemical_Properties_of_Caffeic_and_Ferulic_Acids_in_Biological_System_Implications_in_Cancer_Therapy_A_Review. Acesso em: 08 maio 2023.

DEDEK, Kamil *et al.* Characteristics and biological properties of ferulic acid. **Biotechnology And Food Science**, [s.l.], v. 83, n. 1, p. 71-85, mar. 2019. DOI:

<http://dx.doi.org/10.34658/BFS.2019.83.1.71-85>.

Disponível em:

<https://eczasopisma.p.lodz.pl/BFS/article/view/234>. Acesso em: 08 maio 2023.

DINIZ, Lúcio Ricardo Leite *et al.* Antidepressant Potential of Cinnamic Acids: mechanisms of action and perspectives in drug development. **Molecules**, [s.l.], v. 24, n. 24, p. 4469, 6 dez. 2019. DOI:

<http://dx.doi.org/10.3390/molecules24244469>.

Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/24/4469>. Acesso em: 09 maio 2023.

FERLAY, Jacques *et al.* Cancer statistics for the year 2020: an overview. **International Journal Of Cancer**, [s.l.], v. 149, n. 4, p. 778-789, 22 abr. 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.33588>.

Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.33588>. Acesso em: 09 maio 2023.

GHISALBERTI, E. L. Propolis: a review. **Bee World**, [s.l.], v. 60, n. 2, p. 59-84, jan. 1979. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/0005772x.1979.11097738>. Disponível em:

<https://www.scribd.com/document/380506363/Bee>

[-World-Volume-60-Issue-2-1979-Doi-10-1080-2F0005772x-1979-11097738-Ghisalberti-E-L-Propolis-A-Review](https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/2F0005772x-1979-11097738-Ghisalberti-E-L-Propolis-A-Review). Acesso em: 08 maio 2023.

GUPTA, Ashutosh *et al.* Ferulic acid-mediated modulation of apoptotic signaling pathways in cancer. **Advances In Protein Chemistry And Structural Biology**, [s.l.], p. 215-257, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.apcsb.2020.12.005>.

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1876162320300912?via%3Dihub>. Acesso em: 09 maio 2023.

JEANLOZ, Roger W.; FLOWERS, Harold M.. The Isolation and Synthesis of the Methyl Ester-Methyl α -Glycoside of 3-O- β -D-Glucuronosyl-N-Acetyl-D - Glucosamine (Hyalobiuronic Acid). **Journal Of The American Chemical Society**, [s.l.], v. 84, n. 15, p. 3030-3030, ago. 1962. DOI:

<http://dx.doi.org/10.1021/ja00874a045>. Disponível em:

<https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ja00874a045>. Acesso em: 08 maio 2023.

KLECKNER, Amber S. *et al.* Opportunities for cannabis in supportive care in cancer. **Therapeutic Advances In Medical Oncology**, [s.l.], v. 11, p. 175883591986636, jan. 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1177/1758835919866362>.

Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6676264/>. Acesso em: 09 maio 2023.

MARTINS-TEIXEIRA, Maristela B. *et al.* α - Selective glycosylation affords mucin-related GalNAc amino acids and diketopiperazines active on Trypanosoma cruzi. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 21, n. 7, p. 1978-1987, abr. 2013. DOI:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2013.01.027>.

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089613000564?via%3Dihub>. Acesso em: 08 maio 2023.

O'NEILL, Conor H.; SCOGGINS, Charles R.. Melanoma. **Journal Of Surgical Oncology**, [s.l.], v. 120, n. 5, p. 873-881, 27 jun. 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jso.25604>. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jso.25604>. Acesso em: 09 maio 2023.

RODRIGUES, Débora Munhoz *et al.* Synthesis, antitumor activity and in silico analyses of amino acid derivatives of artemisinin, drupanin and baccharin from green propolis. **Bioorganic & medicinal chemistry**, [s.l.], v. 47, p. 116372, out. 2021. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2021.116372>.

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0968089621003801?via%3Dihub>. Acesso

em: 09 maio 2023.

SAMTIYA, Mrinal *et al.* Potential Health Benefits of Plant Food-Derived Bioactive Components: an overview. **Foods**, [s.l.], v. 10, n. 4, p. 839, 12 abr. 2021. DOI:

<http://dx.doi.org/10.3390/foods10040839>.

Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8068854/>. Acesso em: 09 maio 2023.

TULI, Hardeep Singh *et al.* Ferulic Acid: a natural phenol that inhibits neoplastic events through modulation of oncogenic signaling. **Molecules**, [s.l.], v. 27, n. 21, p. 7653, 7 nov. 2022. DOI:

<http://dx.doi.org/10.3390/molecules27217653>.

Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/21/7653>. Acesso em: 09 maio 2023.

VOLKOVOVA, Katarina *et al.* Associations between environmental factors and incidence of cutaneous melanoma. Review. **Environmental Health**, [s.l.], v. 11 (Suppl 1), n. S12, p. 1-13, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1476-069x-11-s1-s12>. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3388446/>. Acesso em: 09 maio 2023.

YOON, Hoon Seok *et al.* Differential Effects of Methoxylated p-Coumaric Acids on Melanoma in B16/F10 Cells. **Preventive Nutrition And Food Science**, [s.l.], v. 20, n. 1, p. 73-77, 31 mar. 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.3746/pnf.2015.20.1.73>.

Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4391544/>. Acesso em: 09 maio 2023.

ZHANG, Xiang *et al.* Ferulic acid exerts antitumor activity and inhibits metastasis in breast cancer cells by regulating epithelial to mesenchymal transition. **Oncology Reports**, [s.l.], v. 36, n. 1, p. 271-278, 12 maio 2016. DOI:

<http://dx.doi.org/10.3892/or.2016.4804>. Disponível

em: <https://www.spandidos-publications.com/or/36/1/271>. Acesso em: 09 maio 2023.