

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção



Dissertação

**Síntese de análogos da curcumina e avaliação *in vitro*
da sua atividade antitumoral em câncer de bexiga**

Chayane Porto Flores

Pelotas, dezembro de 2015.

Chayane Porto Flores

**Síntese de análogos da curcumina e avaliação *in vitro* da
sua atividade antitumoral em câncer de bexiga**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Bioprospecção.

Orientador: Prof. Dr. Tiago Veiras Collares

Co-orientador: Prof. Dr. Claudio Martin Pereira de Pereira

Pelotas, dezembro de 2015.

Dados de catalogação na fonte:

Maria Beatriz Vaghetti Vieira - CRB 10/1032

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

F634s

Flores, Chayane Porto

Síntese e avaliação in vitro da atividade antitumoral de análogos de curcumina / Chayane Porto Flores. - 63f. : il. - Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas. Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, 2015. - Orientador Tiago Veiras Collares ; co-orientador Claudio Martin Pereira de Pereira.

1. Câncer de bexiga. 2. Atividade antitumoral. 3. Curcumina. I.Collares, Tiago Veiras. II.Pereira, Claudio Martin Pereira de. III.Título.

CDD: 616.994

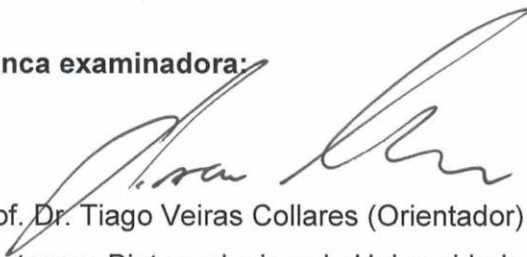
Chayane Porto Flores

**Síntese de análogos da curcumina e avaliação *in vitro* da sua
atividade antitumoral em câncer de bexiga**

Dissertação aprovada como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Bioprospecção, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Universidade Federal de Pelotas.

21.12.2015

Banca examinadora:



Prof. Dr. Tiago Veiras Collares (Orientador)

Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas.



Prof. Dr. Vinicius Farias Campos

Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas.



Prof.^a Dr.^a Priscila Marques Moura de Leon

Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas.

Prof.^a Dr.^a Fabiana Kommling Seixas (suplente)

Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas.

Dedico este trabalho a minha mãe, minha irmã
e meu namorado por todo apoio que me deram.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar o merecimento de chegar aonde cheguei.

A minha avó Nilca, que mesmo não estando mais entre nós, sei que está sempre ao meu lado, me protegendo e amparando de onde ela estiver.

A minha mãe Márcia, pelo incentivo, amor e carinho, por ser a pessoa maravilhosa que é, por estar sempre presente em todos os momentos de minha vida, ser minha mãe, pai e amiga, por me proporcionar condições para que eu chegasse até aqui e me apoiar em todas as minhas decisões.

A minha irmã Natália pela parceria nas madrugadas em frente ao computador, incentivo, carinho, amizade, por me fazer rir com seu jeito estressado e ao mesmo tempo engraçado de ser, a pessoa com quem sei que sempre posso contar. Enfim por ser minha melhor amiga,

Ao meu namorado Paulo por estar sempre ao meu lado, me incentivando e dando forças para eu seguir em frente, por me mostrar que sempre existe uma luz no fim do túnel, quando estava cheia de coisas, sem saber por onde começar, pelo seu amor, carinho, amizade, parceria, por sempre me apoiar e por me fazer rir e tornar minha vida mais leve e feliz.

As minhas amigas Bárbara, Julie e Gabriele pelas risadas, me aliviar a tensão do dia-dia com uma história engraçada ou uma palavra amiga.

Ao meu padasto Jorge pelo incentivo e apoio.

A todos meus familiares que sempre estiveram do meu lado me apoiando e torcendo por mim.

Ao meu orientador Tiago Collares e seu grupo de pesquisa, por todo apoio e pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal, em especial para Mariana que esteve na pesquisa comigo e sempre me ajudou desde o início, se colocando disponível para o que eu precisasse.

A Bruna que também me ajudou na pesquisa e sempre se colocou à disposição para me ajudar.

A Marina pela ajuda durante a síntese, sem ela não tinha conseguido.

Ao meu co-orientador Claudio M. P. Pereira pelo apoio e oportunidade.

"A pior ambição do ser humano é querer
colher os frutos daquilo que nunca plantou."
(Mahatma Gandhi)

PARTE I

RESUMO

FLORES, Chayane Porto. **Síntese de análogos da curcumina e avaliação *in vitro* da sua atividade antitumoral em câncer de bexiga**. 2015. 63 f. Dissertação de mestrado, Programa de pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS, Brasil.

O câncer de bexiga é uma das principais causas de morte por câncer no mundo. A curcumina, um composto fenólico de coloração amarela encontrado no rizoma da cúrcuma, tem demonstrado potencial quimiopreventivo e quimioterápico. Nesse contexto, o presente trabalho objetivou sintetizar cinco derivados de curcumina, a partir de cinco diferentes aldeídos aromáticos, bem como avaliar o potencial citotóxico dos compostos contra uma linhagem celular de câncer de bexiga 5637 e uma linhagem não tumoral CHO-K1. Os compostos foram obtidos com rendimentos entre 50% e 90% e analisados por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (GC-MS). O composto 5 exibiu a maior atividade citotóxica entre os compostos testados contra a linhagem 5637, inibindo 50% do crescimento celular após 24 horas de exposição a uma concentração de 9,5 μ M. Além disso, os compostos 2, 3 e 4 demonstraram boas atividades contra a linhagem de câncer da bexiga, inibindo mais do que 50% do crescimento das células após 24h de exposição. Os compostos demonstraram ainda uma menor citotoxicidade sobre a linhagem não tumoral CHO-K1.

Palavras-chave: câncer de bexiga, compostos sintéticos, curcumina, anticancerígeno, atividade citotóxica.

ABSTRACT

FLORES, Chayane Porto. **Síntese de análogos da curcumina e avaliação *in vitro* da sua atividade antitumoral em câncer de bexiga.** 2015. 63 f. Dissertação de mestrado, Programa de pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS, Brasil.

Bladder cancer is one of the leading causes of cancer-related death in the world. Curcumin, a spice found in curry powder, is receiving considerable attention as a possible chemopreventative and chemotherapeutic. This work was performed to synthesize five curcumin derivatives, from five different aromatic aldehydes, as well as evaluate their cytotoxic potential against human bladder cancer 5637 and non cancer cell line CHO-K1. The compounds were obtained in yields ranging between 50 % and 90 % and analyzed by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (CG-MS). Compound 5 displayed the highest cytotoxic activity of all the compounds tested against the 5637 cells, inhibiting 50% of the cells growth after 24h of exposure at a concentration of 9,5µM. In addition, compounds 2, 3 and 4 demonstrated good activities against bladder cancer cell line, inhibiting more than 50% of the cells growth after 24h of exposure. Our results also showed that the synthesized compounds have low cytotoxic effect against cell line CHO-K1.

Keywords: Bladder Cancer, synthetic compounds, Curcumin, anticancer, cytotoxic activity.

LISTA DE FIGURA

Figura 1. Estruturas dos principais curcuminóides: curcumina ($R_1 = \text{OCH}_3$; $R_2 = \text{OCH}_3$); desmetoxicurcumina ($R_1 = \text{OCH}_3$; $R_2 = \text{H}$) e bisdesmetoxicurcumina ($R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{H}$)	26
Figura 2. Primeira síntese descrita para a curcumina.....	28
Figura 3. Subunidades passíveis de modificações estruturais na curcumina.....	29
Figura 4. Metodologia sintética para a preparação de diarilpentanoides realizada por Yamakoshi e colaboradores.	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação do câncer de bexiga quanto à invasibilidade..... 21

Tabela 2. Classificação do câncer de bexiga quanto o estadiamento..... 22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS – Organização Mundial da saúde

INCA – Instituto Nacional do Câncer

CUR – Curcumina

DMC - Desmetoxicurcumina

BDMC - Bisdesmetoxcurcumina

REA - Reação Estrutura- Atividade

HCT - Carcinoma de colon humano

ISO – Organização Internacional para Padronização

MTT - Brometo de 3-(4,5-Dimetil-tiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazólio

SRB –Sulforrodamina B

AP-1- Ativador da proteína 1

NF-κB – Fator Nuclear Kappa B

STAT3 – Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	OBJETIVOS	18
	Objetivo Geral	18
	Objetivos específicos:	18
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
	Câncer	19
	Câncer de bexiga	20
	Curcuma	25
	Curcumina	25
	Síntese da curcumina	27
	Curcumina e o câncer	30
4.	ARTIGO	33
5.	CONCLUSÃO	46
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
7.	ANEXOS	53

PARTE II

1. INTRODUÇÃO

Desde a Pré-História partes de vegetais vêm sendo utilizadas por diversas populações com fins medicinais, seja na amenização de dores ou no tratamento de diferentes enfermidades. Primariamente, a utilização de plantas medicinais funcionava de maneira totalmente empírica e se baseava em descobertas acidentais (LAMERA & PINTO, 2008). Ao longo de sua evolução o homem foi aprofundando seus conhecimentos sobre as propriedades terapêuticas das plantas, melhorando assim sua utilização na prevenção e cura de doenças e seus sintomas (BALUNAS & KINGHORN, 2005).

Embora a utilização de plantas no tratamento e cura de enfermidades seja amplamente disseminada, muitas vezes os constituintes químicos responsáveis pelos efeitos biológicos são desconhecidos. Entretanto, o desenvolvimento científico e tecnológico permitiu o surgimento de metodologias para caracterização fotoquímica de plantas medicinais, e a identificação dos compostos bioativos responsáveis pelos efeitos farmacológicos dessas (KINGHORN, 2001). Desde então, pesquisadores têm estudado uma gama de espécies de plantas medicinais, dentre elas a cúrcuma, planta de origem asiática, de grande importância devido às características peculiares de seu rizoma, no qual se encontra a curcumina.

A curcumina é um composto fenólico de coloração amarela encontrado no rizoma da cúrcuma, sendo ela o componente majoritário, responsável por cerca de 2% do peso seco dos rizomas (SANTIAGO *et al.*, 2015). Seus efeitos biológicos têm sido bastante estudados, entre eles, efeitos antiprotozoários, antimicrobianos, antivirais, bem como sua aplicação em doenças cardiovasculares, diabetes e em doenças neurodegenerativas como esclerose múltipla, doença de Parkinson e doença de Alzheimer. No entanto ela tem demonstrando principalmente ação antioxidante, antiinflamatória e anticâncer (MANIGLIA *et al.*, 2013).

Embora a curcumina apresente grande potencial antitumoral, sua utilização clínica ainda é inviável devido à sua baixa biodisponibilidade, quando administrada por via oral, devido à má absorção e rápida metabolização e eliminação, limitando a sua eficácia terapêutica, o que estimulou vários estudos

para melhorar a sua biodisponibilidade, dentre os quais se encontra a modificação estrutural da molécula através da síntese de análogos moleculares (GUPTA *et al.*, 2012).

O método clássico para a síntese de curcuminas ocorre pela condensação entre uma cetona e dois aldeídos aromáticos equivalentes na presença de catalisador. Estas moléculas são extremamente versáteis, devido à possibilidade de variação nas estruturas dos anéis aromáticos, que podem conter ou não heteroátomos em sua estrutura, além de diferentes substituintes (SANTIAGO *et al.*, 2015).

Apesar do considerável arsenal de fármacos já existentes para o tratamento de neoplasias malignas e o sucesso terapêutico em vários tipos de tratamentos, ainda não se chegou a um composto ideal. A maior parte dos fármacos antitumorais disponíveis atualmente é tóxica para as células normais e causam imunotoxicidade, o que afeta não só o desenvolvimento do tumor, mas também agrava a recuperação do paciente. Dessa forma, a busca por novos compostos mais seletivos, com menos efeitos colaterais, maior potência terapêutica e menor índice de resistência ainda é de extrema relevância no contexto científico mundial (DUDHATRA *et al.*, 2012), visto que o câncer é uma das doenças que mais mata no mundo.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) fez uma projeção de 27 milhões de novos casos de câncer para o ano de 2030 em todo o mundo, e 17 milhões de mortes pela doença. Dentre esses casos, inclui-se o câncer de bexiga, no qual recentemente, ocorreu um aumento significativo da incidência de taxas de mortalidade atribuídas a esse tipo de tumor (TANAKA *et al.*, 2011), o Instituto Nacional de Câncer (INCA), estimou nesse ano de 2015, 8.940 novos casos de câncer de bexiga no Brasil (6.750 em homens e 2.190 em mulheres). Esses números correspondem a um risco estimado de 6,89 casos novos a cada 100 mil homens e 2,15 a cada 100 mil mulheres.

Este tipo de neoplasia atinge principalmente pessoas com idade superior a 55 anos, sendo a maioria do sexo masculino. Os homens têm de 3 a 4 vezes mais chances de desenvolverem um câncer de bexiga durante sua vida comparados com as mulheres (OMS, 2015).

Neoplasia de bexiga é um tipo de tumor que começa nas células que revestem a bexiga, e é o tumor mais comum do sistema urinário, e o nono mais comum no mundo (PLOEG *et al.*, 2009). Ocorre uma transformação do urotélio, que passa a se proliferar de forma anormal e ganha a capacidade de invadir o órgão e em alguns casos, podendo se espalhar pelo corpo e produzir tumores em outras regiões (metástase) (OMS, 2015).

Em conexão com substâncias com atividade biológica as curcuminas aparecem na literatura como moléculas promissoras na prevenção e no tratamento do câncer (MANIGLIA e *et.al.* 2013), devido ela possuir ação quimiopreventiva e quimioterapêutica (GUPTA *et al.*, 2012).

Estudos têm demonstrado que o principal mecanismo pelo qual a curcumina induz a citotoxicidade é através da indução a apoptose em diversas linhagens celulares. Porém, tem-se demonstrando também que ela é capaz de inibir o desenvolvimento e progressão do câncer, atuando nas várias etapas do processo tumorigênico, incluindo a transformação celular, promoção, sobrevivência, proliferação, invasão, angiogênese e metástases (GUPTA *et al.*, 2012; SUNG *et al.*, 2012). Além de possuir ação quimiopreventiva e quimioterapêutica, a curcumina demonstra ação na eliminação de células tumorais quimiorresistentes, em partes devido à inibição das vias metabólicas que levam à resistência ao tratamento (GUPTA *et al.*, 2012).

Este conjunto de resultados eleva a curcumina ao status de uma molécula que pode servir de protótipo ao desenvolvimento de fármacos multialvos, podendo ser úteis tanto na prevenção quanto no tratamento do câncer (SUNG *et al.*, 2012).

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho foi sintetizar derivados sintéticos de curcumina e avaliar o potencial citotóxico *in vitro* sobre células de câncer de bexiga.

Objetivos específicos:

- 1) Realizar a síntese de cinco derivados da curcumina através da reação entre diferentes aldeídos aromáticos e uma cetona;
- 2) Identificar as estruturas e analisar a pureza dos compostos sintéticos através de espectrometria de massas;
- 3) Avaliar a citotoxicidade das moléculas sintetizadas frente a linhagens de células tumorais 5637 e não tumorigênicas CHO- K1.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Câncer

Câncer é o nome dado a um conjunto de doenças nas quais ocorre o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo (metástase). Estas células passam a dividir-se rapidamente e tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas. (RAVINDRAN *et al.*, 2009).

Todas as células possuem a capacidade de se tornar uma célula cancerosa. As células possuem DNA, e é através deles que os cromossomos passam as informações para o funcionamento da célula. No entanto, uma célula normal pode sofrer alterações no seu DNA levando a uma mutação genética se o mesmo não sofrer as reparações devidas através dos mecanismos de reparação existentes. As células cujo material genético foi alterado passam a receber instruções erradas para as suas atividades. Essas alterações podem ocorrer em genes especiais, os protooncogenes, que a princípio são inativos em células normais, no entanto, quando ativados transformam-se em oncogenes responsáveis pela malignização das células normais (INCA, 2015).

Por outro lado, um tumor benigno significa simplesmente uma massa localizada de células que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original, raramente constituindo um risco de vida (RAVINDRAN *et al.*, 2009).

O câncer é a doença mais terrível do mundo em termos de morbidade e mortalidade. A Organização Mundial da Saúde (OMS) fez uma projeção de 27 milhões de novos casos de câncer para o ano de 2030 em todo o mundo, e 17 milhões de mortes pela doença. Os países em desenvolvimento serão os mais afetados, entre eles o Brasil. Esse número foi calculado com base nas taxas de mortalidade dos estados e capitais brasileiras (Sistema de Informação Sobre

Mortalidade - SIM). As taxas de incidência foram obtidas nas 23 cidades onde existem Registros de Câncer de Base Populacional (INCA, 2015).

A causa exata dele e seu desenvolvimento e progressão não é totalmente conhecida, mas pensa-se que ele ocorre devido a causas internas, alterações estruturais e funcionais nos genes (RAHMANI *et al.*, 2014) ou ainda por causas externas relacionadas ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de um ambiente social e cultural. Esses fatores causais podem interagir de várias formas, aumentando a probabilidade de transformações malignas em células normais (PARK *et al.*, 2013).

Há quatro tipos de câncer; (a) carcinoma: surgem a partir da folha epitelial que cobre as superfícies, por exemplo, pele, cólon, bexiga etc. Aproximadamente 90% de todos os cânceres humanos são carcinomas; (b) sarcoma: estes incluem câncer do tecido conjuntivo, tais como o músculo, osso, cartilagem e tecido fibroso. Cerca de 2% de todos os cânceres são sarcomas; (c) leucemia e (d) linfoma: são originários a partir de células do sangue e formação de células do sistema imunitário, respectivamente. Aproximadamente 8% de todos os cânceres são leucemia e linfomas (RAVINDRAN *et al.*, 2009).

Câncer de bexiga

A bexiga é um órgão situado na pelve, constituído basicamente por uma camada muscular (detrusor) e revestida internamente por uma mucosa, o urotélio. O câncer de bexiga representa o tumor mais comum do sistema urinário, e o nono mais comum no mundo (PLOEG *et al.*, 2009). Ocorre uma transformação do urotélio, que passa a se proliferar de forma anormal e ganha a capacidade de invadir o órgão e até, em alguns casos, circular pelo corpo e produzir tumores em outras partes do corpo (metástase) (OMS, 2015).

Neoplasia de bexiga é um tipo de tumor que começa nas células que revestem a bexiga. Recentemente, tem havido um aumento significativo da incidência de taxas de mortalidade atribuídas ao câncer de bexiga (TANAKA

et al., 2011), o Instituto Nacional de Câncer (INCA) estimou nesse ano de 2015, 8.940 novos casos de câncer de bexiga no Brasil (6.750 em homens e 2.190 em mulheres). Esses números correspondem a um risco estimado de 6,89 casos novos a cada 100 mil homens e 2,15 a cada 100 mil mulheres.

Este tipo de neoplasia atinge principalmente pessoas com idade superior a 55 anos, sendo a maioria do sexo masculino. Os homens têm de 3 a 4 vezes mais chances de desenvolverem um câncer de bexiga durante sua vida comparados com as mulheres (OMS, 2015). Aproximadamente 70% dos pacientes com câncer de bexiga diagnosticado recentemente têm "doença superficial" confinado à mucosa. Este tipo de câncer ao longo da vida exige um acompanhamento por cistoscopia e tratamento frequentes. Os 30% dos pacientes restantes recém diagnosticados têm a doença mais avançada ou essa progredi para estágios mais elevados após o tratamento da doença superficial (APOLO *et al.*, 2009).

Na OMS os cânceres de bexiga são descritos com base em duas características importantes para determinar seu prognóstico, o seu estadiamento e invasibilidade, conforme descrito na tabela 1 e 2.

Tabela 1: Classificação do câncer de bexiga quanto à invasibilidade.

Invasibilidade	Profundidade de acometimento
Não Invasivo	Estão ainda na camada interna de células (epitélio de transicional), mas não invadiram camadas mais profundas.
Invasivo	Crescem na lâminaprópria ou na camada muscular mais profunda. Cânceres invasivos são mais propensos a se disseminarem e são mais difíceis de serem tratados.

Tabela 2: Classificação do câncer de bexiga quanto o estadiamento.

Estadiamento	Características tumorais
Estádio 0	Tumores não invasivos localizados somente no revestimento da bexiga.
Estádio I	O tumor atravessa o revestimento da bexiga, mas não atinge a camada muscular da bexiga.
Estádio II	O tumor atinge a camada muscular da bexiga.
Estádio III	O tumor ultrapassa a camada muscular da bexiga atingindo os tecidos ao redor da bexiga.
Estádio IV	O tumor se espalha para os linfonodos vizinhos ou para lugares distantes (metástase).

Quando o câncer se limita ao tecido de revestimento da bexiga, é chamado de superficial. Porém é de suma importância diagnosticar displasia concomitante, à medida que aumenta o risco de progressão do tumor, pois mais de 70% de todos os pacientes tratados de câncer de bexiga superficial desenvolvem posteriormente um ou mais tumores recorrentes, e em cerca de um terço dos pacientes o tumor superficial evolui invadindo o músculo circundante (BELTRAN, 2008).

Existem três tipos de câncer que começam nas células que revestem a bexiga. Segundo a OMS a classificação se dá de acordo com os tipos de células onde se iniciam:

- Carcinoma de células de transição: representa a maioria dos casos e começa nas células do tecido mais interno da bexiga (TANAKA *et al.*, 2011). Os Carcinomas transicionais são também divididos em carcinomas papilares que geralmente crescem em direção ao centro da bexiga, e são denominados

câncer de bexiga papilar não invasivo e carcinomas planos, os quais se desenvolvem apenas na camada interna de células da bexiga, e são conhecidos como carcinoma plano não invasivo ou carcinoma plano *in situ* (YOUSSEF *et al.*, 2009).

- Carcinoma de células escamosas: afetam as células delgadas e planas que podem surgir na bexiga depois de infecção ou irritação prolongada. Quase todos os carcinomas de células escamosas são invasivos.

- Adenocarcinoma: se inicia nas células glandulares (de secreção) que podem se formar na bexiga depois de um longo tempo de irritação ou inflamação. Quase todos são invasivos e ocorrem com menos frequência que os carcinomas (TANAKA *et al.*, 2011).

Os tumores são também classificados em baixo grau (células bem diferenciadas, semelhantes à mucosa normal da bexiga) e alto grau (células muito diferentes das normais, com taxa de proliferação rápida) (PARK *et al.*, 2014).

O câncer na bexiga acontece quando as células da bexiga começam a crescer de forma anormal, em vez de crescer e se dividir de uma forma ordenada como deveria acontecer naturalmente, essas células desenvolvem mutações que fazem com que cresçam fora de controle (INCA, 2015). As causas do tumor na bexiga nem sempre são claras, porém existem fatores que podem aumentar o risco de câncer de bexiga, entre uma série de fatores de risco, exposições ambientais são responsáveis pela maioria dos casos (PARK *et al.*, 2014).

Tabagismo: fumar produtos derivados do tabaco e que contenham altos níveis de nicotina pode aumentar o risco de câncer de bexiga. Ao fumar, o corpo processa as substâncias tóxicas presentes nesses produtos e excreta algumas delas pela urina. O acúmulo dessas substâncias nocivas pode danificar e prejudicar o revestimento da bexiga, aumentando, assim, o risco de a pessoa desenvolver câncer na região (FREEDMAN *et al.*, 2011).

Exposição a determinados produtos químicos: os rins desempenham papel fundamental na filtragem de substâncias químicas nocivas, passando-as da corrente sanguínea para a bexiga. Devido a isso, acredita-se que ser exposto a certas substâncias químicas pode aumentar o risco do câncer de bexiga.

Produtos químicos ligados ao maior risco de desenvolver a doença incluem arsênio, aminas aromáticas e produtos químicos utilizados na fabricação de tintas, borracha, couro e têxteis (JEMAL *et al.*, 2011).

Tratamento do tumor anterior: o tratamento para outros tipos de câncer, principalmente quando este é feito à base de medicamentos e radioterapia, aumenta o risco de câncer de bexiga. A incidência aumenta ainda mais se o tratamento for quimioterapia (PARK *et al.*, 2014).

Inflamação crônica da bexiga: infecções crônicas no trato urinário e especialmente na bexiga, bem como inflamações, podem aumentar o risco de câncer de bexiga de células escamosas (BERMEJO *et al.*, 2009).

Genética: histórico de câncer de bexiga na família propicia grande risco de desenvolver a doença (TANAKA *et al.*, 2011).

De acordo com o INCA o tratamento para o câncer de bexiga depende do estágio da doença, da gravidade dos sintomas e da saúde geral do paciente. Os tratamentos adotados são quimioterapia, radioterapia, imunoterapia e cirurgia. O tipo de tratamento é indicado conforme o estágio do tumor. Para os estágios 0 e I, o tratamento inclui cirurgia para remover o tumor sem remover o resto da bexiga e quimioterapia ou imunoterapia diretamente na bexiga. Já para os estágios II e III podem ser feitos, cirurgia para remover a bexiga inteira (cistectomia radical), cirurgia para remover somente parte da bexiga, seguida de radioterapia e quimioterapia, quimioterapia para diminuir o tumor antes da cirurgia e combinação de quimioterapia e radiação (em pacientes que optam por não ser operados ou que não podem ser operados). Tumores de estágio IV na maioria dos casos não possuem cura e a cirurgia não é adequada. Para esses pacientes, a quimioterapia é quase sempre uma escolha (OMS, 2015).

Contudo a abordagem atual para o tratamento do câncer é cara, e gera muitos efeitos colaterais, podendo afetar as células não tumorais. Dessa forma ainda se faz necessário um modo seguro e eficaz de tratamento para controlar o desenvolvimento e progressão do câncer (SUNG *et al.*, 2012). Algumas plantas medicinais fornecem esse remédio seguro e eficaz, dentre essas plantas encontra-se a cúrcuma (*Curcuma longa*) (SANTIAGO *et al.*, 2015).

Curcuma

A curcuma é uma planta do tipo herbácea e perene, encontrada principalmente em regiões tropicais e subtropicais, sendo originária do sudeste da Ásia, e cultivada extensamente na Índia. Há alguns anos seu cultivo foi introduzido em algumas regiões do Brasil, onde é popularmente conhecida como açafrão da Índia, açafrão ou gengibre dourado (SHARMA *et al.*, 2005).

Curcuma longa ou “turmeric” como é conhecida no mercado internacional, tem grande importância devido às peculiares características de seu rizoma que pode ser consumido fresco ou seco e é a parte de maior interesse dessa planta. Para fins de conservação esse rizoma é desidratado e moído, gerando um pó de coloração dourado (SANTIAGO *et al.*, 2015). O pó do rizoma é utilizado principalmente como corante em alimentos devido à sua forte coloração amarela, associada a efeitos terapêuticos e dietéticos e é popularmente conhecido na culinária como açafrão da Índia e como sendo um dos componentes do Curry, um dos temperos mais utilizados, especialmente na região continental da Índia (SONY *et al.*, 2014).

A composição química da cúrcuma é bastante variada, tendo como principais classes de compostos os terpenos voláteis, presentes no óleo essencial de diferentes partes do vegetal, além dos curcuminóides, componentes majoritários da fração não volátil (figura 1). Estes ocorrem em maior proporção nos rizomas da planta, com destaque para curcumina (CUR), desmetoxicurcumina (DMC) e bisdesmetoxicurcumina (BDMC), além de curcuminóides minoritários (SANTIAGO *et al.*, 2015).

Embora a *C. longa* possua uma variedade de compostos, muitos dos seus efeitos biológicos e terapêuticos são atribuídos, principalmente a presença da curcumina (SHARMA *et al.*, 2005).

Curcumina

A curcumina é um composto fenólico de coloração amarela encontrado no rizoma da cúrcuma e é o componente majoritário dos rizomas de *C. longa*, sendo responsável por cerca de 2% do peso seco dos rizomas.

Atualmente ela pode ser obtida comercialmente como uma mistura de três componentes: curcumina (~77%), desmetoxicurcumina (~17%), e bisdesmetoxicurcumina (~3%).

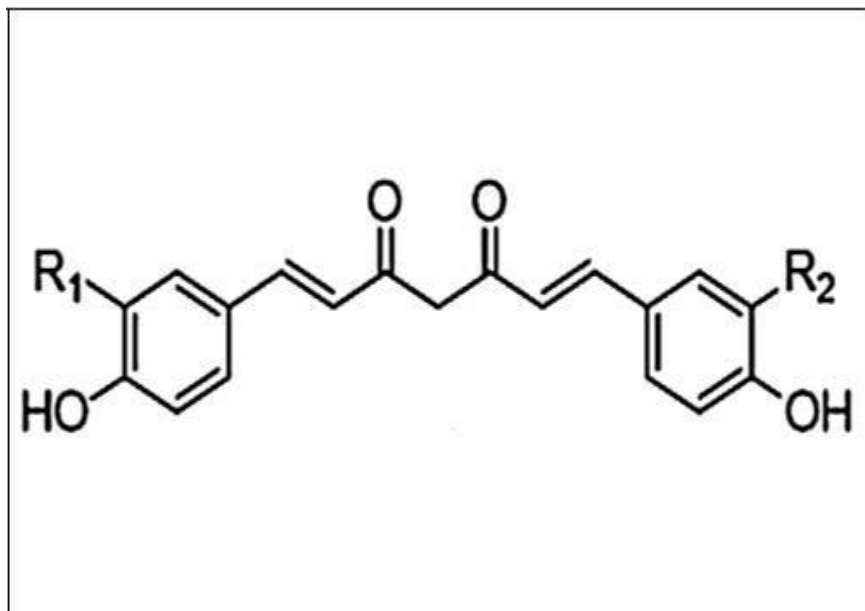


Figura 1: Estruturas dos principais curcuminóides: curcumina ($R_1 = \text{OCH}_3$; $R_2 = \text{OCH}_3$); desmetoxicurcumina ($R_1 = \text{OCH}_3$; $R_2 = \text{H}$) e bisdesmetoxicurcumina ($R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{H}$). Fonte: SANTIAGO et., al., 2015.

Na Índia pode-se encontrar esta mistura de curcuminóides na forma de cápsulas, pomadas, cremes e curativos para aplicação tópica, misturada ou não com outros componentes. Contudo, a principal utilização destas substâncias ao redor do mundo é na culinária, como componentes do Curry (SANTIAGO *et al.*, 2015)

Seus efeitos biológicos têm sido bastante estudados, entre eles, efeitos antiprotozoários, antimicrobianos, antivirais, bem como sua aplicação em doenças cardiovasculares, diabetes e em doenças neurodegenerativas como esclerose múltipla, doença de Parkinson e doença de Alzheimer. No entanto ela tem demonstrando principalmente ação antioxidante, antiinflamatória e anticâncer (MANIGLIA *et al.*, 2014), sendo essa uma promissora alternativa para a prevenção do câncer, devido apresentar efeito quimiopreventivo em vários tipos de tumor (RAHMANI *et al.*, 2014).

Um dos maiores problemas referentes à utilização clínica da curcumina é devido à sua baixa biodisponibilidade. Sua reduzida solubilidade em água faz com que ela seja pouco absorvida, e a presença de sítios lábeis ao metabolismo faz com que a mesma sofra metabolismo hepático de primeira passagem. A baixa eficácia da administração da curcumina *in vivo* é agravada pelo fato de seus metabólitos serem inativos, no que se refere à maioria das atividades biológicas associadas a seu uso. O tipo de metabolismo envolvido está diretamente ligado à via de administração da curcumina (SUNG *et al.*, 2008).

Síntese da curcumina

A primeira metodologia utilizada para a síntese da curcumina (Figura 2) foi publicada por Lampe e colaboradores em 1913, utilizando como material de partida o cloreto de carbometoxiferuloila (a), esse reagiu com acetoacetato de etila para formar o derivado (b), que foi descarboxilado para gerar a dicetona (c). Essa dicetona foi novamente acilada pelo cloreto de ácido inicial, para formar o diarileptanoide (d), Em seguida uma segunda descarboxilação, forneceu o derivado protegido (e), e a remoção dos grupos protetores geraram a curcumina e permitiram que sua estrutura fosse elucidada. Esta metodologia, embora importante para a elucidação estrutural da curcumina, não possui aplicabilidade prática, devido ao número de etapas e baixo rendimento global (SANTIAGO *et al.*, 2015).

Nos últimos anos, vários trabalhos vêm sendo publicados mostrando o aprimoramento de metodologias para síntese de curcumina, variando reagentes de partida, catalisadores, solventes e agentes promotores das reações. Esta variedade de trabalhos se deve a tendência atual da comunidade científica em adotar procedimentos que sejam menos agressivos ao meio ambiente. Para isto se dá a preferência ao uso de solventes e reagentes menos tóxicos e a processos que sejam mais rápidos e econômicos, onde haja a possibilidade de emprego de energias alternativas (DUBE & SALEHPOUR, 2014; LU *et al.*, 2013).

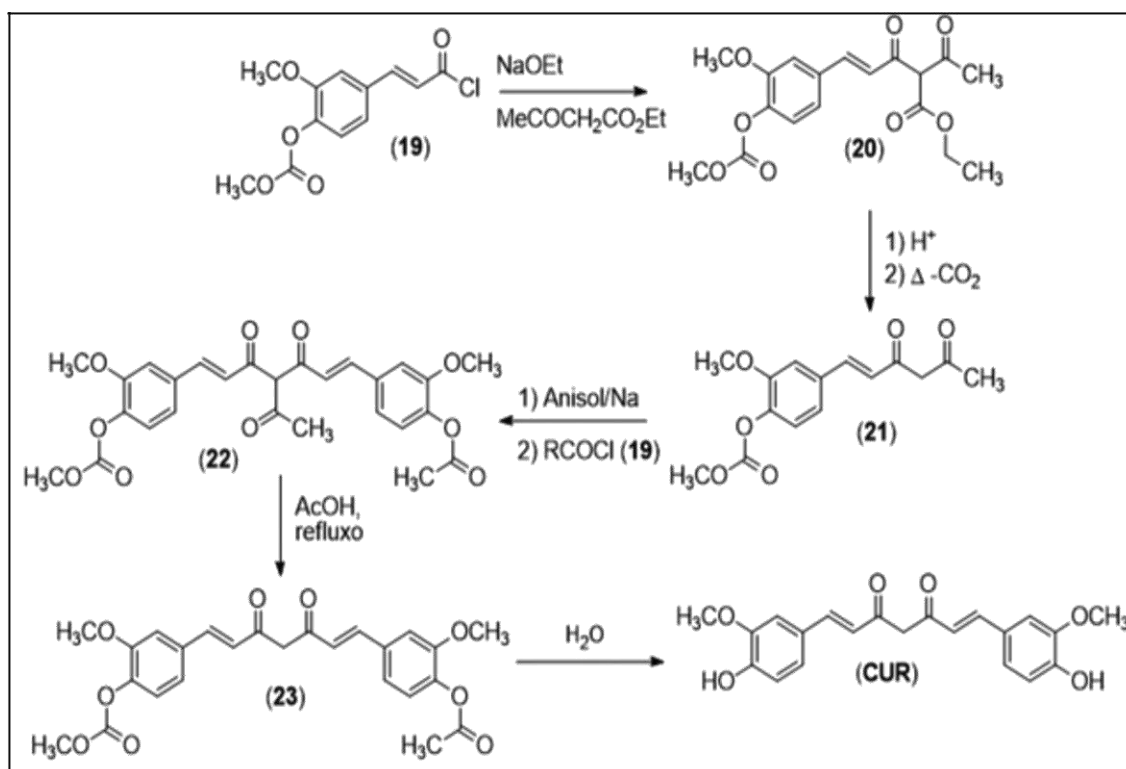


Figura 2: Primeira síntese descrita para a curcumina. Fonte: SANTIAGO, et. al. 2015.

A estrutura da curcumina pode ser subdividida em três subunidades (Figura 4) passíveis de modificações estruturais, que viabilizam o acesso a diferentes derivados estruturalmente relacionados à curcumina. Estas transformações possibilitam a realização de estudos de REA (Relação Estrutura-Atividade) que fornecem informações sobre os requisitos estruturais relevantes para as diferentes atividades biológicas associadas a essa classe de substâncias (SANTIAGO *et al.*, 2015).

A subunidade A corresponde ao aldeído, podendo esses anéis variar de 4 a 6 carbonos, dependendo do aldeído utilizado. A subunidade B, corresponde à cadeia espaçadora de 7 carbonos entre os grupamentos aril da curcumina, pode ser modificada utilizando-se das estratégias de funcionalização, homologação e liberdade conformacional. A síntese de derivados da curcumina com modificações estruturais na subunidade C normalmente é baseada nas relações isostéricas entre a 1,3-dicetona e heterociclos (SANTIAGO *et al.*, 2015).

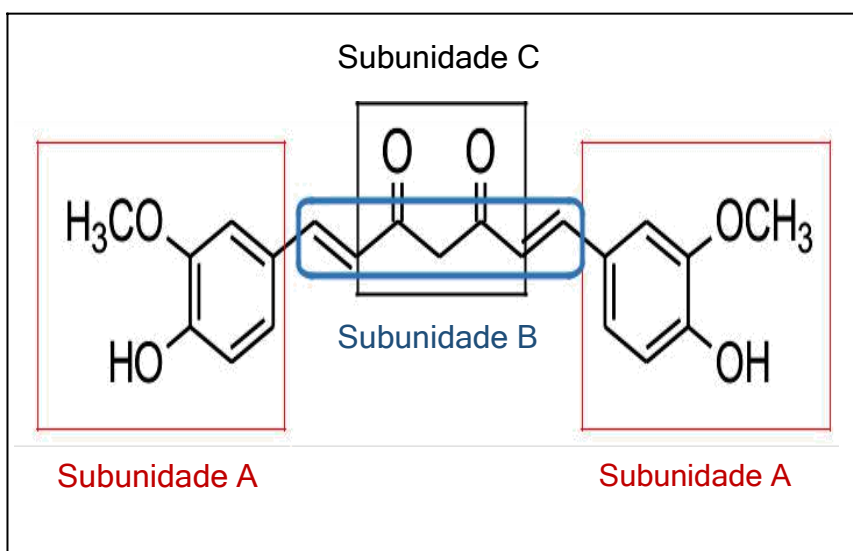


Figura 3: Subunidades passíveis de modificações estruturais na curcumina. Fonte: adaptada de SANTIAGO et., al., 2015.

A homologação inferior da subunidade B, gerando derivados contendo uma carbonila (diarilpentanoides e chalconas), é a estratégia mais utilizada na síntese de derivados curcuminoides. A síntese desses derivados é mais acessível, devido ao fato de não haver necessidade da formação do complexo de boro, o que normalmente permite sua síntese a partir de uma única etapa de condensação entre um aldeído e uma cetona.

O método clássico para a síntese de curcuminas ocorre pela condensação entre uma cetona e dois aldeídos aromáticos equivalentes na presença de catalisador. Estas moléculas são extremamente versáteis, devido à possibilidade de variação nas estruturas dos anéis aromáticos, que podem conter ou não heteroátomos em sua estrutura, além de diferentes Substituintes (HANG *et al.*, 2013).

Dessa forma, Yamakoshi e colaboradores sintetizaram uma série de análogos estruturais da curcumina, contendo 5 átomos de carbono na subunidade B, denominados diarilpentanoides. Esses análogos foram preparados por meio da reação de condensação entre aldeídos aromáticos com diversos padrões de substituição e acetona, em etanol e meio básico (Figura 4).

O análogo direto da curcumina, denominado C5-curcumina, é um produto natural isolado dos rizomas de *C. longa* em uma concentração muito mais baixa do que a curcumina (YAMAKOSHI *et al.*, 2010).

Esse produto natural serviu como protótipo para a síntese dos outros diarilpentanoides, que foram testados por Yamakoshi em modelos de células tumorais com o intuito de funcionar tanto como um inibidor de crescimento celular quanto como um padrão estrutural passível de hibridação com sondas fluorescentes para detecção de tumores *in vivo*. Os ensaios foram realizados em células tumorais humanas de câncer de cólon, linhagem HCT-116, e os resultados permitiram a construção de um modelo de REA. O estudo realizado pelo grupo sobre esse padrão estrutural mostrou que anéis aromáticos simétricos tetros substituídos ou anéis hexas substituídos são aqueles que apresentam a maior atividade citotóxica (SANTIAGO *et al.*, 2014).

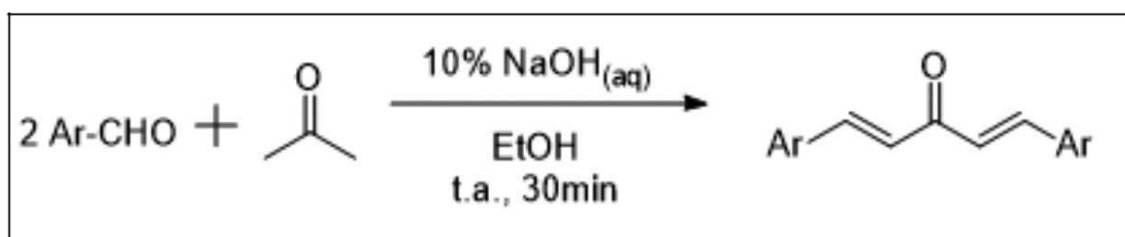


Figura 4: Metodologia sintética para a preparação de diarilpentanoides realizada por Yamakoshi e colaboradores. Fonte: YAMAKOSHI *et. al.*, 2010.

Curcumina e o câncer

A curcumina tem demonstrado sua ação citotóxica para várias linhagens de células tumorais. Sua ação depende do tipo de célula maligna presente, da 35 concentração de curcumina utilizada, da presença ou não de adjuvantes na formulação, e da duração do tratamento (GUPTA *et al.*, 2012).

Estudos têm demonstrado que o principal mecanismo pelo qual a curcumina induz a citotoxicidade é através da indução a apoptose em diversas linhagens celulares. Porém, tem-se demonstrando também que ela é capaz de

inibir o desenvolvimento e progressão do câncer, atuando nas várias etapas do processo tumorigênico, incluindo a transformação celular, promoção, sobrevivência, proliferação, invasão, angiogênese e metástases (GUPTA *et al.*, 2012; SUNG *et al.*, 2012). Além de possuir ação quimiopreventiva e quimioterapêutica, a curcumina demonstra ação na eliminação de células tumorais quimiorresistentes, em partes devido à inibição das vias metabólicas que levam à resistência ao tratamento (GUPTA *et al.*, 2012).

A curcumina também atua sobre fatores de transcrição como o AP-1, NF- κ B e STAT3. Eles encontram-se superativados nas células cancerosas, portanto representam alvos promissores para o tratamento e prevenção do câncer (SANTIAGO *et al.*, 2015). Esses fatores de transcrição desempenham um papel importante no desenvolvimento e progressão do câncer, pois regulam negativamente a expressão de diversos genes que produzem mediadores químicos associados à sobrevivência, proliferação celular, invasão, angiogênese, tumorigênese, metástase e inflamação. A curcumina atua regulando os fatores de transcrição, sendo assim considerada um promissor agente quimiopreventivo e quimioterapêutico (BARTOSZ & BARTOSZ, 2014).

Os agentes quimiopreventivos são classificados em antiproliferativos (reversão), antioxidantes (prevenção) ou agente de bloqueio, a curcumina possui as três propriedades devido a sua característica pleiotrópica (PARK *et al.*, 2013).

Dessa forma, a curcumina, derivados e análogos participam da modulação de diferentes fenômenos biológicos, que vão da interferência na ativação de células do sistema imunitário, passando pela inibição de sinalizadores moleculares da resposta inflamatória, atividade antiparasitária, além da sua reconhecida ação antitumoral. Este conjunto de resultados eleva a curcumina e seus derivados ao status de moléculas que pode servir de protótipo ao desenvolvimento de fármacos multialvos, podendo ser úteis tanto na prevenção quanto no tratamento do câncer (KUNNUMAKKARA *et al.*, 2008).

PARTE III

Capítulo 1

ARTIGO CIENTÍFICO

Todos os resultados dessa dissertação serão apresentados na forma de manuscrito a submetido ao periódico internacional Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.

Curcumin derivatives have inhibitory effects on the growth of human bladder cancer cells

Chayane Porto Flores^{1,2#}, Bruna S. Pacheco^{1,2#}, Mariana Sonogo², Marina Ritter¹, Rosiane Mastelari Martins², Fabiana K Seixas², Claudio M. P. Pereira^{1,2}, Tiago Collares^{2*}

¹ Center of Chemical Sciences, Pharmaceutical and Food, Federal University of Pelotas, Laboratory of Lipidomic and Bio-Organic, Pelotas, 96001-970, Brazil.

² Research Group on Cellular and Molecular Oncology, Biotechnology / Technology Development Center, Federal University of Pelotas, Pelotas, 96010-900, RS, Brazil.

These authors contributed equally to this study

* Corresponding author: Tiago Collares. Research Group of Cellular and Molecular Oncology, Federal University of Pelotas (UFPel). E-mail: collares.t@gmail.com.

Abstract

Bladder cancer is one of the leading causes of cancer-related death in the world. Curcumin, a spice found in curry powder, is receiving considerable attention as a possible chemopreventative and chemotherapeutic. This work was performed to synthesize five curcumin derivatives, from five different aromatic aldehydes, as well as evaluate their cytotoxic potential against human bladder cancer 5637 and non cancer cell line CHO-K1. Compound 5 displayed the highest cytotoxic activity of all the compounds tested against the 5637 cells, inhibiting 50% of the cells growth after 24h of exposure at a concentration of 9,5µM. In addition, compounds 2, 3 and 4 demonstrated good activities against bladder cancer cell line, inhibiting more than 50% of the cells growth after 24h of exposure. Our data speculate that curcumin derivatives may represent a source of therapeutic agents for human bladder cancer.

Keywords: Bladder Cancer, synthetic compounds, Curcumin, anticancer, cytotoxic activity

1. Introduction

Curcumin is the major constituent extracted from dried rhizomes of *Curcuma longa*, a commonly spice used in traditional Indian medicine (Ayurveda)¹. It has been demonstrated to have a wide range of biological effects including antifungal², antioxidant³, neuroprotective⁴ and anticarcinogenic⁵ properties.

The potential use of curcumin as molecule with biological activities is limited because of its chemical instability and low solubility in water. In this context, many strategies to improve solubility and availability of curcumin are being established in order to enable the use of this compound, like production of curcumin nanoparticles⁶ and synthesis of curcumin derivatives⁷.

Bladder cancer is the fourth most common cancer in men and the eleventh most common in women; in addition, it is responsible for approximately 5 % of all deaths due to cancer in humans⁸.

Generally, non-muscle invasive superficial bladder cancers are treated by transurethral resection following intravesical chemotherapy or immunotherapy, but the recurrence rate is still high, and some cases progress to a higher grade⁹. Thus, efforts to develop novel agents to target relevant molecules or pathways can help patients to achieve better therapeutic efficacy.

The literature suggests the therapeutic potential of curcumin in the treatment of bladder cancer and also indicates that curcumin promotes KLF5 proteasome-dependent degradation through targeting YAP/TAZ in bladder cancer cells¹⁰. In addition, synergism inhibition of curcumin combined with cisplatin on bladder carcinoma cells have been observed¹¹.

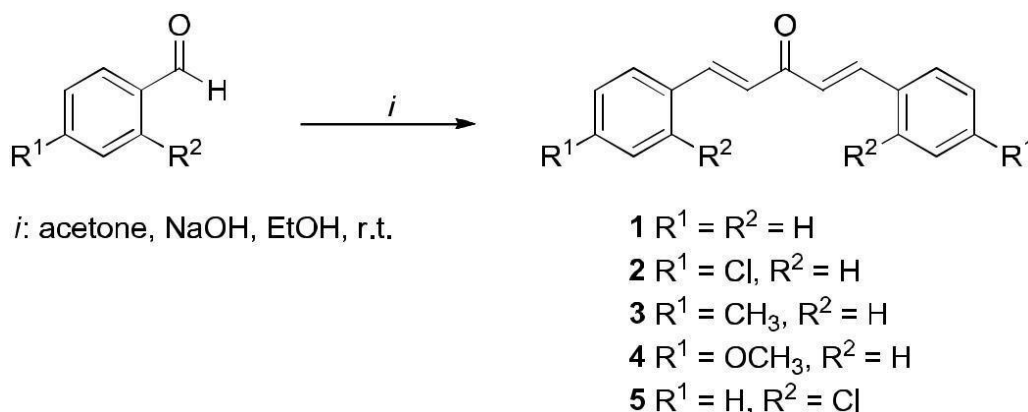
In recent years, our research group has been studying new in vitro therapeutic strategies against bladder cancer¹²⁻¹⁴. As a follow up of our studies in this area, this work aimed to evaluate the cytotoxic potential of synthetic curcumin derivatives against human bladder cancer cell line.

2. Materials and methods

Synthesis of curcumin derivatives

The synthetic curcuminoids (1*E*,4*E*)-1,5-(diphenylpenta)-1,4-dien-3-one derivatives 1-5 were prepared by a mixture of sodium hydroxide (2.5 mmol),

acetone (1 mmol) and ethanolic solution of corresponding aromatic aldehyde (2.0 mmol) at room temperature until the formation of precipitate, as shown by thin layer chromatography (TLC) after around 1 hour (Scheme 1). The solid was vacuum filtered, washed with H₂O/EtOH and recrystallized with hexane/ethyl acetate (3:1) to provide the pure products. Melting points were measured using equipment Fisaton 430.



Scheme 1. Synthesis of curcumin derivatives 1-5.

Mass Spectrometry analysis

The structure and purity of synthesized curcumin derivatives **1-5** were analyzed by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS). Mass spectra were obtained on a Shimadzu GC-MS-QP 2010SE mass spectrometer coupled gas chromatograph (GC-MS) with an AOC-20i automatic injector and Rtx-5MS 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm column.

Determination of cytotoxicity

Cell culture

The human bladder carcinoma (5637) and non-cancer (CHO-K1) cell lines were obtained from the Rio de Janeiro Cell Bank (PABCAM, IMETRO, Rio de Janeiro, Brazil) and routinely cultured in our laboratory in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 10 % foetal bovine serum (FBS) purchased respectively from Vitrocell Embriolife (Campinas, Brazil) and Gibco (Grand Island, NY, USA). Cells were seeded at a density of 2×10^4 cell per well in a volume of 100 mL in 96-well plates, grown at 37°C in an atmosphere of 95% humidified air and 5% CO₂. The experiments were

performed with cells in the logarithmic phase of growth. Cells without any treatment were used as controls in all experiments.

Cell viability assay

Cells were treated with different concentrations (6.25 – 100 μM) of curcumin derivatives 1-5 for 24 hours. The viability of 5637 and CHO-K1 cell lines were assessed by measuring the reduction of soluble MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) to water-insoluble formazan (Vasconcelos *et al.*, 2013). Compounds were previously dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and added to the medium supplemented with 10% FBS to the desired concentrations. The final DMSO concentration in the medium never exceeded 0.2%, and an additional group was exposed to an equivalent concentration of this solvent.

Thereafter, the incubation medium was removed, and subsequently 180 μL of medium and 20 μL MTT (5 mg MTT/mL solution) were added to each well. The plates were incubated for an additional 3 h, and the medium was discarded. DMSO was added to each well, and the formazan was solubilized on a shaker for 5 min at 100g. The absorbance was read on a microplate reader (Victor X5, Perkin Elmer, USA) at a test wavelength of 492 nm. Cell inhibitory growth was determined as follows: inhibitory rate = $(1 - \text{Abs}_{492\text{treated cells}} / \text{Abs}_{492\text{control cells}}) \times 100\%$. All observations were validated by three independent experiments in triplicates for each experiment.

Statistical analysis

Data sets MTT assay were analyzed using a factorial ANOVA followed by a Tukey test for multiple comparisons. All data were expressed as mean ± SEM. Significance was considered at p value < 0.05 in all analyses.

3. Results

Chemistry

The compounds were obtained with satisfactory yields, ranging from 50% to 90%. The structure and purity of synthesized curcumin derivatives 1-5 were analyzed by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS).

The physicochemical properties including color, melting point, yield and GC-MS data for curcumin derivatives 1-5 are as follows:

(1E,4E)-1,5-(diphenylpenta)-1,4-dien-3-one 1

Yield: 90%, C₁₇H₁₄O, 234.29, yellow solid, melting point (mp) 108-110 °C [110-112 °C (Gomesa *et al.*, 2014)]; GC-MS *m/z* (%): 234.15[M]⁺(100), 191.15 (13), 131.10 (47), 103.10 (85), 91.10 (33), 77.05 (69).

(1E,4E)-1,5-bis(4-chlorophenyl)penta-1,4-dien-3-one 2

Yield: 80%, C₁₇H₁₂Cl₂O, 302.03, yellow solid, melting point (mp) 185-187 °C; GC-MS *m/z* (%): 304.05[M+1](37), 303.05[M+1] (30), 302.05[M]⁺ (53), 268.10[M+1] (10), 267.05 (45), 204.15 (49), 166.00[M+1] (5), 165.00 (42), 137.05[M+1] (40), 136.00 (8), 101.05[M+1] (100), 100.15 (6), 76.05[M+1] (10), 75.05 (33).

(1E,4E)-1,5-di-*p*-tolylpenta-1,4-dien-3-one 3

Yield: 50%, C₁₉H₁₈O, 262.14, yellow solid, melting point (mp) 125-127 °C [128-130 °C (Weber *et al.*, 2005)]; GC-MS *m/z* (%): 262.15[M]⁺(74), 261.15 (47), 247.15 (100), 233.15 (7), 219.15 (30), 204.10 (18), 115.10 (78), 105.10 (42), 91.05 (39).

(1E,4E)-1,5-bis(4-methoxyphenyl)penta-1,4-dien-3-one 4

Yield: 85%, C₁₉H₁₈O₃, 294.13, orange solid, melting point (mp) 165-167 °C; GC-MS *m/z* (%): 294.20[M]⁺(100), 293.15 (25), 263.10 (9), 235.15 (14), 186.05 (76), 161.05 (38), 133.10 (46), 121.10 (38), 103.05 (10), 77.05 (21).

(1E,4E)-1,5-bis(2-chlorophenyl)penta-1,4-dien-3-one 5

Yield: 80%, C₁₇H₁₂Cl₂O 302.03, yellow solid, melting point (mp) 93-95 °C; GC-MS *m/z* (%): 304.10[M+2] (11), 303.10[M+1] (4), 302.05[M]⁺(18), 268.10[M+1] (18), 267.10 (100), 204.10 (22), 166.05[M+1] (1), 165.05 (13), 138.10[M+1] (7), 137.00 (23), 102.00[M+1] (33), 101.10 (67), 76.05[M+1] (7), 75.05 (25).

Cytotoxicity evaluation

The results from the cytotoxicity screening of the curcumin derivatives 1-5 against 5637 cell line are shown in Figure 1. IC₅₀ values of compounds are demonstrated in Table 1. Compound 5 displayed the highest cytotoxic activity

of all the compounds tested against the 5637 cells. At a concentration of 9,5 μ M, that compound was able to inhibited 50% of the cells growth; in addition, this compound inhibited 80.18 and 95.54% of the cancer cells growth at the concentration of 25 and 50 μ M respectively, after 24h of exposure.

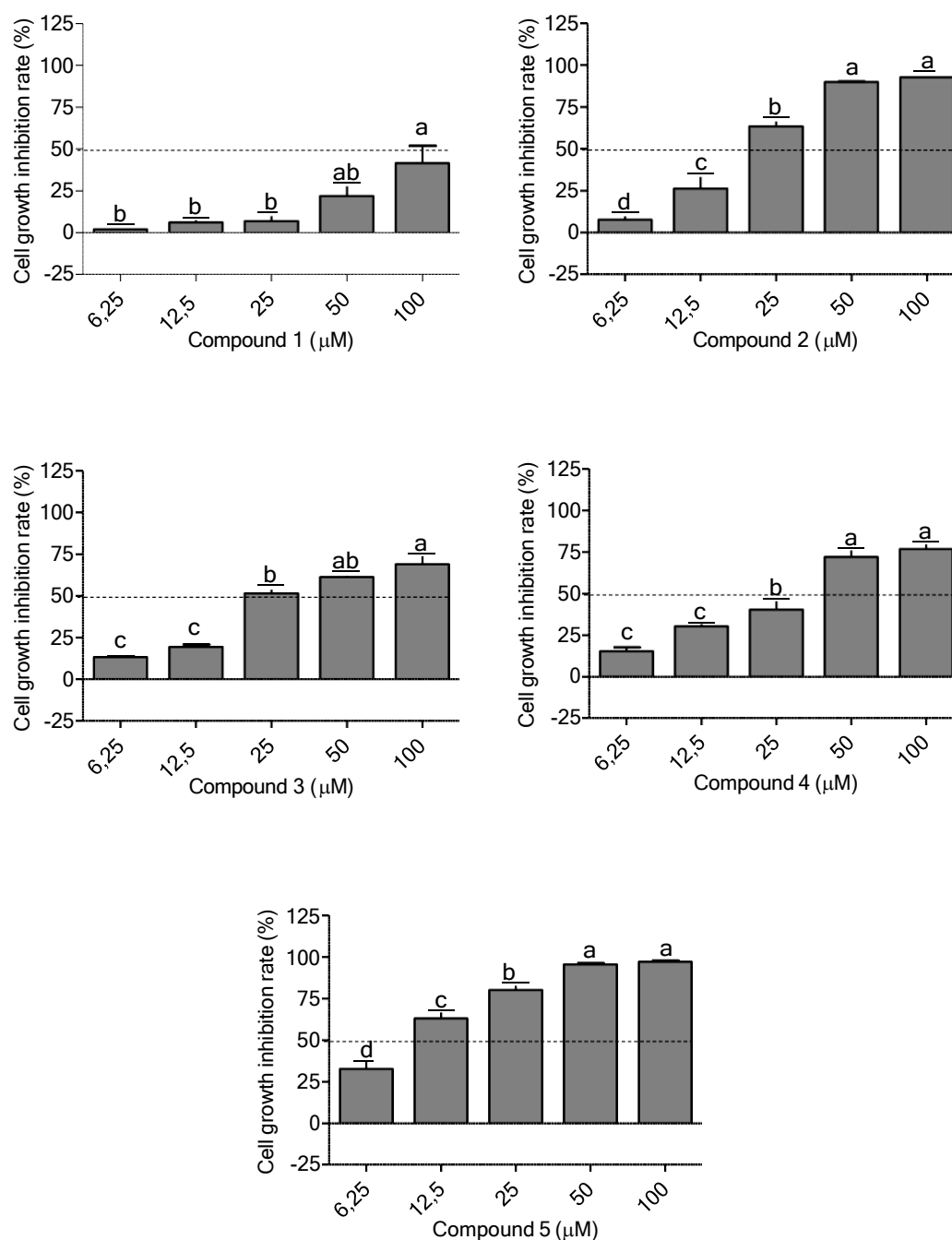


Figure 1. Effect of different concentrations of compounds 1-5 on the inhibition of 5637 cell line following exposure for 24h. Data are expressed as the means $\pm$ SEM. Different letters indicate significant differences between the concentrations p-value < 0.05 was considered significant (Tukey test).

Table 1. IC₅₀ values (μM) of curcumin derivatives 1-5 on 5637 and CHO-K1 cell lines after exposure for 24h. Data are expressed as the means ± SEM (n=3).

Compound	IC ₅₀ (μM)	
	5637	CHO-K1
1	98.25 ± 3,78	>100
2	20.17 ± 1,36	60.57 ± 13.67
3	24.83 ± 1,64	88.33 ± 20.18
4	32.33 ± 3,42	56.67 ± 10.04
5	9,5 ± 0,58	42,67 ± 9,60

Compounds 2, 3 and 4 demonstrated similar activities against bladder cancer cell line, inhibiting 50% of the cells growth at the concentrations of 20.17, 24.83 and 32.33μM, respectively. Furthermore, compound 2 was able to inhibit 90% of the cancer cells growth at 50μM after 24 h of exposure.

Compound 1 had low cytotoxicity against the 5637 cell line, with an inhibitory rate lower than 50% at concentrations up to 100μM after 24 h of exposure. In addition, the cytotoxicity assay results revealed that the compounds presented a lower cytotoxicity against non cancer cell line (CHO-K1) in relation to bladder cancer cell line 5637 (Fig. 2).

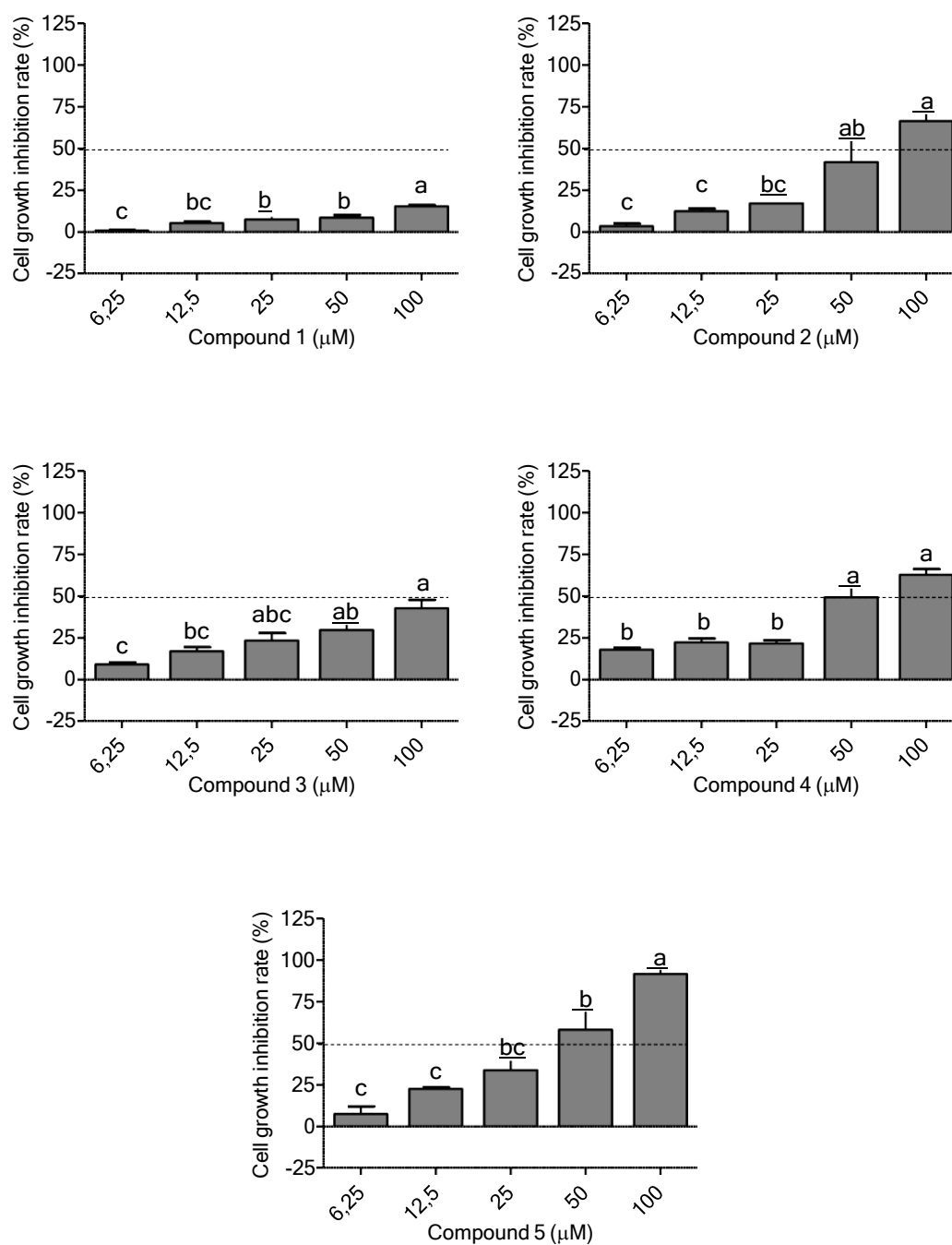


Figure 2. Effect of different concentrations of compounds 1-5 on the inhibition of CHO cell line following exposure for 24h. Data are expressed as the means $\pm$ SEM. Different letters indicate significant differences between the concentrations. A p-value < 0.05 was considered significant (Tukey test).

4. Discussion

Structural modifications in curcumin molecule may be one of the best alternative to enhance its biological effects. The aim of these modifications is to produce a compound with greater stability, bioavailability and ultimately efficacy. Studies have demonstrated potential of some curcumin analogues against several types of cancer *in vitro* and *in vivo*¹⁵⁻¹⁷. The potential anticancer mechanisms of curcumin derivatives are frequently associated to its apoptotic, anti-proliferative and anti-angiogenic properties^{18,19}.

Recently, three series of curcumin derivatives including phosphorylated, etherified, and esterified products of curcumin were synthesized, and their anti-tumor activities were assessed against human breast cancer MCF-7, hepatocellular carcinoma Hep-G2, and human cervical carcinoma HeLa cells¹⁹. Among them, 4-((1E,6E)-7-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-3,5-dioxohepta-1,6-dienyl)-2-methoxyphenyl dihydrogen phosphate showed the strongest activity with an IC₅₀ of 6.78 μM against HeLa cells compared with curcumin with an IC₅₀ of 17.67 μM. Also, curcumin analogues produced by exchanging the b-diketone moiety for an αβ unsaturated ketone, exhibited more potent antitumor activity than curcumin in various ER+ and ER- human breast cancer cells²⁰. The cytotoxic activity of curcumin derivatives synthesized in this work have been demonstrated on other cancer cell lines, such as prostate²¹ and lung¹⁹. This paper demonstrates the potential of those compounds against bladder cancer cell line 5637.

Curcumin derivatives **2** and **5** exhibited high cytotoxic activity against the 5637 cells. It may be assigned to electron donator effect from chloro atom in the ring. This effect increased the electronic density in *ortho* position favoring reactivity of carbonyl group²². Similar effect was observed in compound **4** which have the group 4-methoxy, however with a lesser intensity, due its lowest inductive effect. The literature suggests that incorporating one or more pairs of methoxy groups is key to increasing cytotoxicity. Ohori et al.²³ screened over 50 curcumin derivatives. The most potent were compounds, which incorporated multiple methoxy groups. Donator effect of 4-methyl group was observed in compound **3**. That substituent increasing the electronic density all through out carbons in the ring and increases the carbonyl reactive. Our results also showed that the synthesized compounds have low cytotoxic effect against cell

line CHO-K1, demonstrating the possible potential of do little damage to non cancer cell lines. In this context, other potentially important biological activities of these compounds should be explored in the future.

In conclusion, our findings indicate that curcumin derivatives induces cytotoxicity on superficial bladder cancer cells *in vitro* and demonstrate the influence of different substituents in aryl rings on activity. Despite being an initial study, this paper speculate that curcumin derivatives may represent a source of therapeutic agents for bladder cancer. Further research should be performed to explore the bioactive potential of the studied curcumin derivatives to ensure their successful application as potential therapeutic tools.

Conflict of interest

There is no conflict of interest between the authors in the manuscript preparation.

Acknowledgements

The authors are grateful to CNPq and CAPES for financial support.

References

1. Elias, G.; Jacob, P. J.; Hareeshbabu, E.; Mathew, V. B.; Krishnan, B.; Krishnakumar, K. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2015**, *6*, 2671-2680.
2. Martins, C. V. B.; Da Silva, D. L.; Neres, A. T. M.; Magalhães, T. F. F.; Watanabe, G. A.; Modolo, L. V.; Sabino, A. A.; De Fátima, Â.; De Resende, M. A. *J. Antimicrob. Chemother.* **2009**, *63*, 337-339.
3. Khalil, O. A. K.; De Faria Oliveira, O. M. M.; Velloso, J. C. R.; De Quadros, A. U.; Dalposso, L. M.; Karam, T. K.; Mainardes, R. M.; Khalil, N. M. *Food Chem.* **2012**, *133*, 1001-1005.
4. Kuo, C.-P.; Lu, C.-H.; Wen, L.-L.; Cherng, C.-H.; Wong, C.-S.; Borel, C. O.; Ju, D.-T.; Chen, C.-M.; Wu, C.-T. *Anesthesiology* **2011**, *115*, 1229-38.
5. Ide, H.; Lu, Y.; Yamaguchi, R.; Muto, S.; Horie, S. *Cancer Res.* **2014**, *74*, 226.
6. Bhawana; Basniwal, R. K.; Buttar, H. S.; Jain, V. K.; Jain, N. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 2056-2061.
7. Chittigori, J.; Kumar, A.; Li, L.; Thota, S.; Kokil, A.; Samuelson, L. A.; Sandman, D. J.; Kumar, J. *Tetrahedron* **2014**, *70*, 991-995.
8. Siegel, R.; Ward, E.; Brawley, O.; Jemal, A. *Cancer J Clin* **2011**, *61*:212-236
9. van Rhijn, B. W. G.; Burger, M.; Lotan, Y.; Solsona, E.; Stief, C. G.; Sylvester, R. J.; Witjes, J. A.; Zlotta, A. R. *Eur. Urol.* **2009**, *56*, 430-442.
10. Yang, G.; Qi, S.; Shan, X.; Chong, D.; Liang, L.; Kaijie W.; Ke W.; Xinyang W.; Luke, S. C.; Dalin, H.; Peng G. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*,

15173-15187

11. Zhang, S. N.; Yong, Q.; Wu, X. L.; Liu, X. . *Zhong Yao Cai*. **2014**, 37, 2043-2046.
12. Begnini, K. R.; Buss, J. H.; Collares, T.; Seixas, F. K. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, 99, 3741-3754.
13. Begnini, K. R.; Moura de Leon, P. M.; Thurow, H.; Schultze, E.; Campos, V. F.; Martins Rodrigues, F.; Borsuk, S.; Dellagostin, O. A.; Savegnago, L.; Roesch-Ely, M.; Moura, S.; Padilha, F. F.; Collares, T.; Pêgas Henriques, J. A.; Seixas, F. K. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* **2014**, 2014, 1-13.
14. Begnini, K. R.; Rizzi, C.; Campos, V. F.; Borsuk, S.; Schultze, E.; Yurgel, V. C.; Nedel, F.; Dellagostin, O. A.; Collares, T.; Seixas, F. K. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, 97, 1543-1552.
15. Shim, J. S.; Lee, J.; Park, H.-J.; Park, S.-J.; Kwon, H. J. *Chem. Biol.* **2004**, 11, 1455-1463.
16. Shen, T.; Jiang, T.; Long, M.; Chen, J.; Ren, D.-M.; Wong, P. K.; Chapman, E.; Zhou, B.; Zhang, D. D. *Antioxid. Redox Signal.* **2015**, 23, 651-64.
17. Simoni, D.; Rizzi, M.; Rondanin, R.; Baruchello, R.; Marchetti, P.; Invidiata, F. P.; Labbozzetta, M.; Poma, P.; Carina, V.; Notarbartolo, M.; Alaimo, A.; D'Alessandro, N. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 845-849.
18. Shehzad, A.; Wahid, F.; Lee, Y. S. *Arch. Pharm. (Weinheim)*. **2010**, 343, 489-499.
19. Dai, F.; Liu, G. Y.; Li, Y.; Yan, W. J.; Wang, Q.; Yang, J.; Lu, D. L.; Ding, D. J.; Lin, D.; Zhou, B. *Free Radic. Biol. Med.* **2015**, 85, 127-137.
20. Lin, L.; Hutzen, B.; Ball, S.; Foust, E.; Sobo, M.; Deangelis, S.; Pandit, B.; Friedman, L.; Li, C.; Li, P. K.; Fuchs, J.; Lin, J. *Cancer Sci.* **2009**, 100, 1719-1727.
21. Anand, P.; Sung, B.; Kunnumakkara, A. B.; Rajasekharan, K. N.; Aggarwal, B. B. *Biochem. Pharmacol.* **2011**, 82, 1901-1909.
22. Inami, K.; Iizuka, Y.; Furukawa, M.; Nakanishi, I.; Ohkubo, K.; Fukuhara, K.; Fukuzumi, S.; Mochizuki, M. *Bioorg Med Chem.* **2012**, 20(13), 4049-55.
23. Ohori, H.; Yamakoshi, H.; Tomizawa, M.; Shibuya, M.; Kakudo, Y.; Takahashi, A.; Takahashi, S.; Ito, S.; Suzuki, T.; Ishioka, C.; Iwabuchi Y and Shibata H. *Mol Cancer Ther.* **2006**, 5, 2563-71

PARTE IV

5. CONCLUSÃO

Cinco derivados sintéticos de curcumina foram sintetizados com bons rendimentos. A avaliação citotóxica demonstrou que os compostos são capazes de inibir o crescimento de células humanas de câncer de bexiga (5637). Observou-se também a influência de diferentes substituintes nos anéis aromáticos. Entre os derivados de curcumina testados, o composto 5 exibiu o melhor potencial citotóxico, inibindo 50% do crescimento das células de câncer de bexiga após 24h de exposição a uma concentração de 9,5 μ M. Além disso, os compostos estudados apresentaram baixa citotoxicidade sobre a linhagem não tumoral CHO-k1. Os possíveis mecanismos de ação envolvidos serão investigados em estudos futuros.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APOLO, A. B.; MILOWSKY, M.; BAJORIN, D. F. Clinical states model for biomarkers in bladder cancer. **Future Oncology**, 2009, v.5, n7, p.977-992.

AZEVEDO, F. A. A toxicologia e o futuro. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, 2010, v.3, n.3, p.14.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug Discovery from Medicinal Plants. **Life Sciences**, 2008, v. 78, n. 5, p. 431-441.

BARTOSZ, I. S.; BARTOSZ, G. Effect of Antioxidants Supplementation on Aging and Longevity. **Biomed Research International**, 2014, v. 2014, p. 17

BELTRAN, L. Bladder cancer: clinical and pathological profile. **Scandinavian Journal of Urology and Nephrology**, 2008, v.42, n. 218, p. 95-109.

BERMEJO, J. L.; SUNDQUIST, J.; HEMMINKI, K. Bladder cancer in cancer patients: population-based estimates from a large Swedish study. **British Journal of Cancer**, 2009, v. 101, p. 1091 – 1099.

CAZARIN, K. C. C.; CORRÊA, C. L.; ZAMBRONE, F. A. D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 2004, v. 40, n.3, p.11.

CRUZ, M.; ENES, M.; PEREIRA, M.; Modelos experimentais em oncologia: O contributo da cultura de células para o conhecimento da biologia do cancro. **Revista Portuguesa de Pneumologia**, 2009, v.15, n.4, p.669- 682.

DUBE, M. A.; SALEHPOUR, S.; Applying the Principles of Green Chemistry to Polymer Production Technology. **Macromolecular Reaction Engineering, Weinheim**, 2014, v. 8, p. 7-28.

DUDHATRA, G. B.; MODY, S.K.; AWALE, M. M.; PATEL, H. B.; MODI, C.M.; KUMAR,A.; KAMANI,D.R.; CHAUHAN, B.N. A Comprehensive Review on Pharmacotherapeutics of Herbal Bioenhancers. **The Scientific World Journal**, 2012, v. 2012, p. 637-953.

FREEDMAN, N. D.; SILVERMAN, D. T.; HOLLENBECK, A. R.; SCHATZKIN, A.; ABENET, C. C.; Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. **JAMA**. 2011, n. 306, p. 737-745.

FRESHNEY I. R. Culture of animal cells. A manual of Basic Technique and Specialized Applications. **Wiley-Liss academic journals**, 2010, 6 ed., p.796.

GUPTA, S. C.; PATCHVA, S.; KOH, W.; AGGARWAL, B.B. Discovery of Curcumin, a Component of the Golden Spice, and Its Miraculous Biological Activities. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, 2012, v. 39, n. 3, p. 283-299.

HANG, J.; FU, X. L.; YANG, N.; WANG, Q. A. Synthesis and Cytotoxicity of Chalcones and 5-Deoxyflavonoids. **Scientific World Journal**, .2013, v. 2013, p. 6.

HOUGHTON, P.; FANG, R.; TECHATANAWAT, I.; STEVENTON, G.; HYLANDS, P. J.; LEE, C. C.; The sulphorhodamide (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. **Methods**, 2007, v. 42, p. 377-387.

INCA. **Instituto Nacional de Câncer**. [Acesso em 08 de Novembro de 2015]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>.

INCA. **Instituto Nacional do câncer**. Estatísticas do Câncer. Estimativa 2014/2015. [Acesso em 08 de Novembro de 2015]. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/estimativa>.

JEMAL, F.; BRAY, M. M.; CENTER, J.; FERLAY, E.; WARD,; FORMAN, D. Global cancer statistics. **CA Cancer Journal for Clinicians**, 2011, v. 61, n. 2, p. 69-90.

KATZ, M. L; MUELLER, L. V.; POLYAKOV, M.; WEINSTOCK, S. F. Where have all the antibiotic patents gone? **Nature Biotechnology**, 2006, v. 24, n. 1, p. 1529-1531.

KINGHORN, A. D. Pharmacognosy in the 21st century. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 2001, v. 53, n.2, p. 135-148.

KUNNUMAKKARA, A. B.; ANAND, P.; AGGARWAL, B. B. Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction proteins. **Cancer Letters**, 2008, v. 265, n. 2, p. 199-225.

LAMEIRA, O. A.; PINTO, J. E. B. P. Em Plantas Medicinais: do cultivo, manipulação e uso à recomendação popular. **Editores EMBRAPA**, 2008, p. 19-26.

LINDEE S. M. The culture of cell culture. **Science**, 2007, v. 316, n. 5831, p. 1568-1569.

LU, H. F.; ZHOU, J. T.; CHENG, H. L.; SUN, L. L.; YANG, F. F.; WU, R. Z.; GAO Y. H.; LUO, Z. B. An efficient catalyst for ring opening of epoxides with phenol and thiophenol under solvent-free conditions. **Tetrahedron**, 2013, v. 69, n.52, p. 11174-11184.

MANIGLIA, B. C.; DOMINGOS, J. R.; PAULA, R. L.; BLÁCIDO, D. R. Development of bioactive edible film from turmeric dye solvent extraction residue. **LWT - Food Science and Technology**, 2013,V.56, p. 269.

MOURA, N. S.; VASCONCELOS, A. C. M.; BERNABÉ, M. G.; TEIXEIRA, L. J. Q.; SARAIVA, S. H. Ensaios toxicológicos: um estudo sobre a utilização de testes *in vivo* e *in vitro*. **Centro Científico Conhecer**, 2012, p.15.

NCI. **Nacional Cancer Institute**. [Acesso em 21 de Novembro de 2015]. Disponível em: <http://www.cancer.gov>

OMS. **Organização Mundial da Saúde**. [Acesso em 14 de Novembro de 2015]. Disponível em: <http://www.who.int/eportuguese/publications>.

PARK, W.; AMIN, A. R. M. R.; CHEN, Z. G.; SHIN, D.M. New perspectives of curcumin in cancer prevention. **Cancer Prevention Research**, 2013, v. 6, n.5 p. 3587- 400.

PARK, J.G.; CITRIN, D.E.; AGARWAL, P.K.; APOLO, A.B. Multimodal management of muscle invasive bladder cancer. **Current Problems in Cancer**, 2014, v.38, n. 3, p.80-108.

PITHON, M. M.; SANTOS, R. L.; RUELLAS, A. C. O.; FIDALGO, T. K. S.; ROMANOS, M. T. V.; MENDES, G. S. Citotoxicidade in vitro de elásticos ortodônticos: comparação entre duas metodologias. **Revista Saúde**, 2008, v. 4, n. 1, p. 19-26.

PLOEG, M.; ABEN, K. K.; KIEMENEY, L. A.; The present and future burden of urinary bladder cancer in the world. **World Journal of Urology**, 2009, v. 27, p. 289-293.

RAHMANI, A.H.; ZOHAIRY, H. A. A.; ALY, S.; KHAN, A. A. Review Article Curcumin: A Potential Candidate in Prevention of Cancer via Modulation of Molecular Pathways. **Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International**, 2014, v. 2014, p. 15.

RAVINDRAN, J.; PRASAD, S.; AGGARWAL, B. B. Review article Curcumin and Cancer Cells: How Many Ways Can Curry Kill Tumor Cells Selectively. **The AAPS Journal**, 2009, V. 11, n. 3, p. 16.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. Testes *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, 2003, v. 6, n. 3, p. 317-320.

SANTIAGO, V.S.; SILVA, G.P.M.; RICARDO, D.D.; LIMA, M.E.F. Curcumina, o pó dourado do açafrão-da-terra: introspecções sobre química e atividades biológicas. **Química Nova**, 2015, v. 38, n. 4, p. 538-552.

SHARMA, R. A.; GESCHER, A. J.; STEWARD, W. P. Curcumin: the story so far. **European Journal of Cancer**, 2005, v. 41, n. 13, p. 1955-1968.

SONY, D.; LATHEEF, L.; KAMATH, K.; KHALED, M.; WILKINS, J.; KOCHIKU-ZHYIL, B. M.; BALIGA, M. S.; Polyphenols in Human Health and Disease. **Academic Press**, 2014, v. 1, p. 785.

SUNG, B.; PRASAD, S.; YADAV, V. R.; AGGARWAL, B. B. Cancer Cell Signaling Pathways Targeted by Spice-Derived Nutraceuticals. **Nutrition and Cancer**, 2012, v. 64, n. 2, p. 173-197.

TANAKA, T.; MIYAZAWA, K.; TSUKAMOTO, T.; KUNO, T. SUZUKI, K. Review Article Pathobiology and Chemoprevention of Bladder Cancer. **Hindawi Publishing Corporation Journal of Oncology**, 2011, V. 2011, p. 23.

YAMAKOSHI, H.; OHORI, H.; SATO, A.; KANON, N.; ISHIOKA, C.; SHIBTA, H.; IWABUCHI, Y. Structure-activity relationship of C5-curcuminoids and synthesis of their molecular probes thereof. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 2010, v. 18, n. 3, p. 1083-1092.

YOUSSEF, R. F.; MITRA, A. P.; BARTSCH, J. R.; JONES, P.A.; SKINNER, D.G.; COTE, R. J. Molecular targets and targetedtherapies in bladder cancer management. **World Journalof Urology**, 2009, v. 27, n. 1, p. 9-20.

ANEXOS

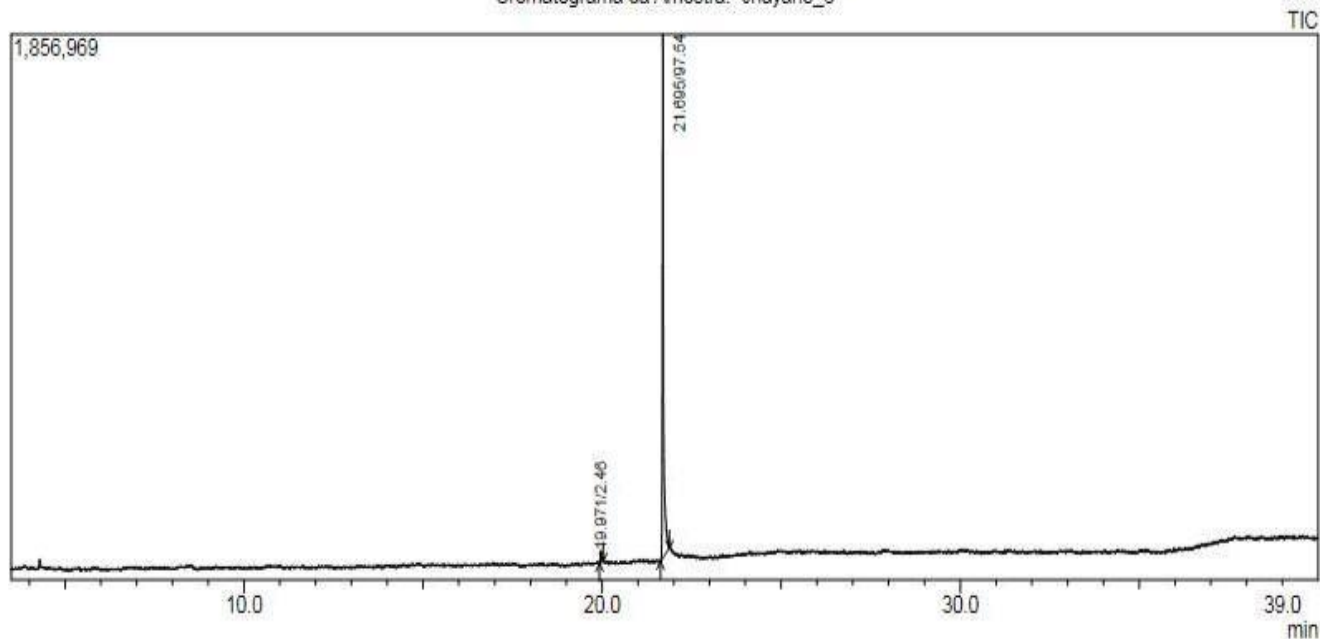
Anexos

Análises por Cromatografia a Gás e Espectrometria de Massas.

Informação da Amostra

Analisado em : 15/09/2015 16:38:47
Amostra : chayane_8
ID Amostra : chayane_8
Vial # : 8
Injection Volume : 1.00
Arquivo : C:\GCMSsolution\Data\Síntese\2015\SETEMBRO\chayane\chayane_8.qgd
Método : C:\GCMSsolution\Data\Métodos\Método Síntese.qgm
Arquivo Tuning : C:\GCMSsolution\System\Tune1\2015\06_01_2015.qgt

Cromatograma da Amostra: chayane_8

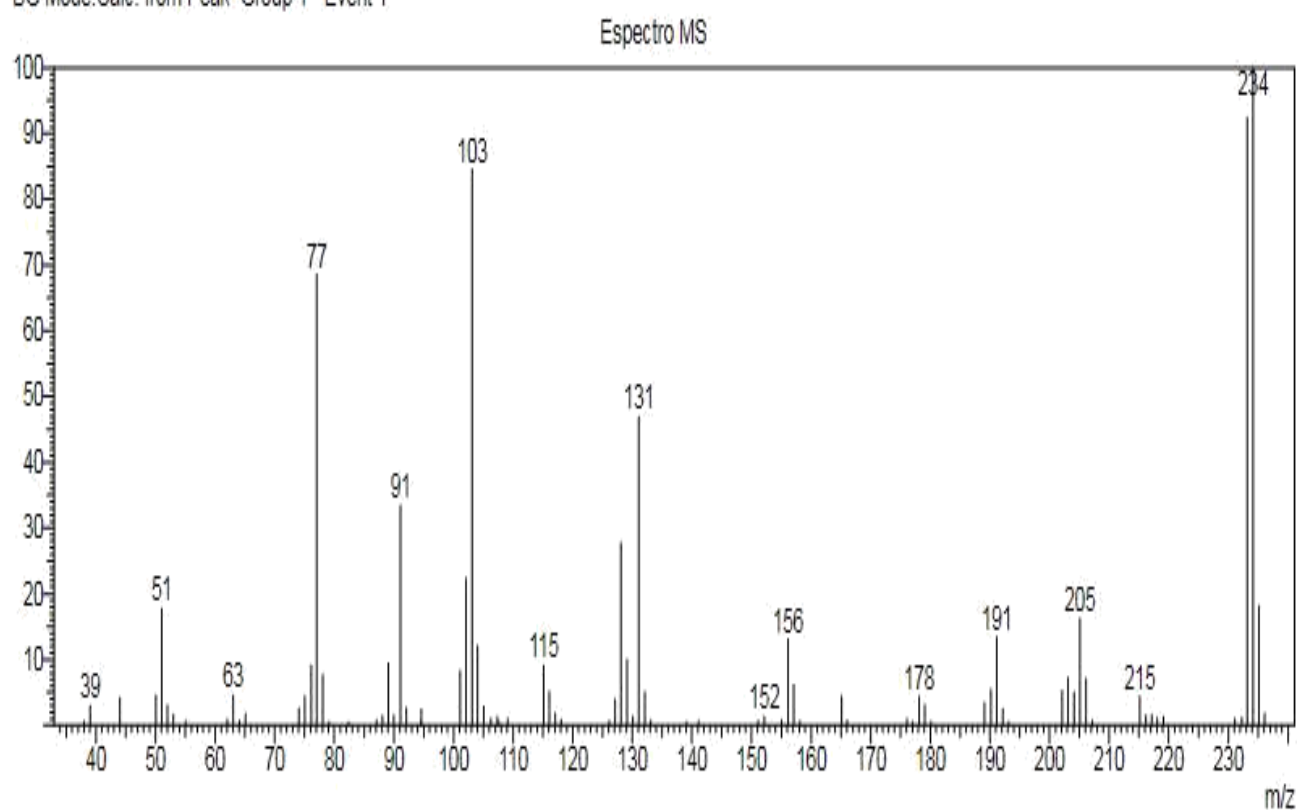


Cromatograma TIC

Pico#	R.Time	Area%	Height%	A/H
1	19.971	2.46	2.18	2.65
2	21.695	97.54	97.82	2.35
		100.00	100.00	

Anexo 1: Cromatografia de 1,5-difenilpenta- 1,4-dien-3-ona

Peak#2 R.Time:21.695(Scan#:2184)
MassPeaks:85
RawMode:Averaged 21.633-21.883(2177-2207)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1

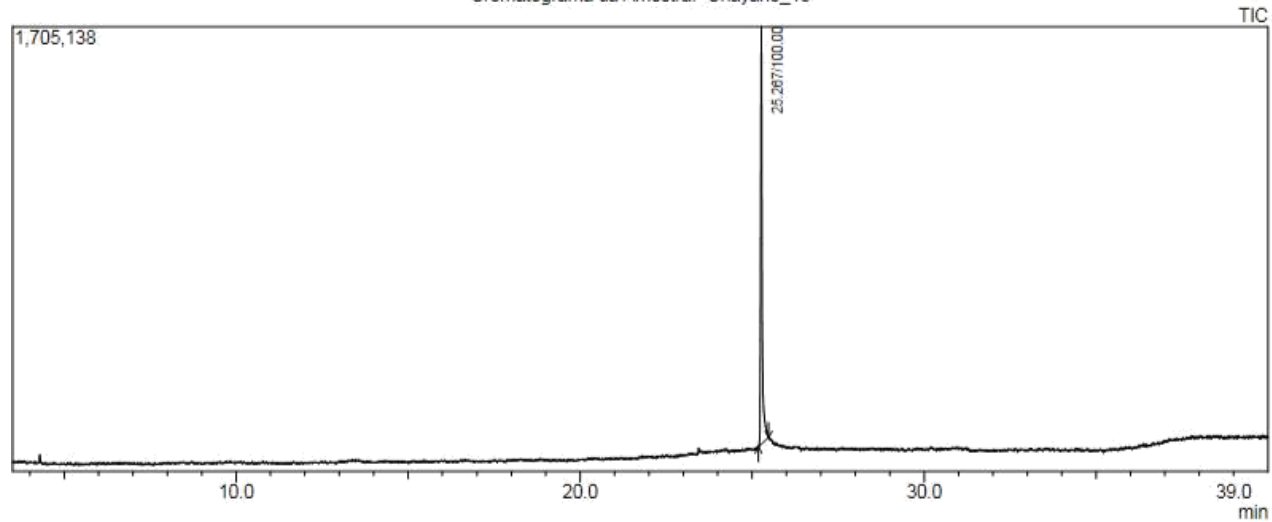


Anexo 2: Espectro de massas de 1,5-difenilpenta- 1,4-dien-3-ona

Informação da Amostra

Analisado em : 15/09/2015 21:53:03
 Amostra : Chayane_15
 ID Amostra : Chayane_15
 Vial # : 5
 Injection Volume : 1.00
 Arquivo : C:\GCMSsolution\Data\Síntese\2015\SETEMBRO\chayane\15.09.15\Chayane_15.qgd
 Método : C:\GCMSsolution\Data\Métodos\Método Síntese.qgm
 Arquivo Tuning : C:\GCMSsolution\System\Tune1\2015\06_01_2015.qgt

Cromatograma da Amostra: Chayane_15

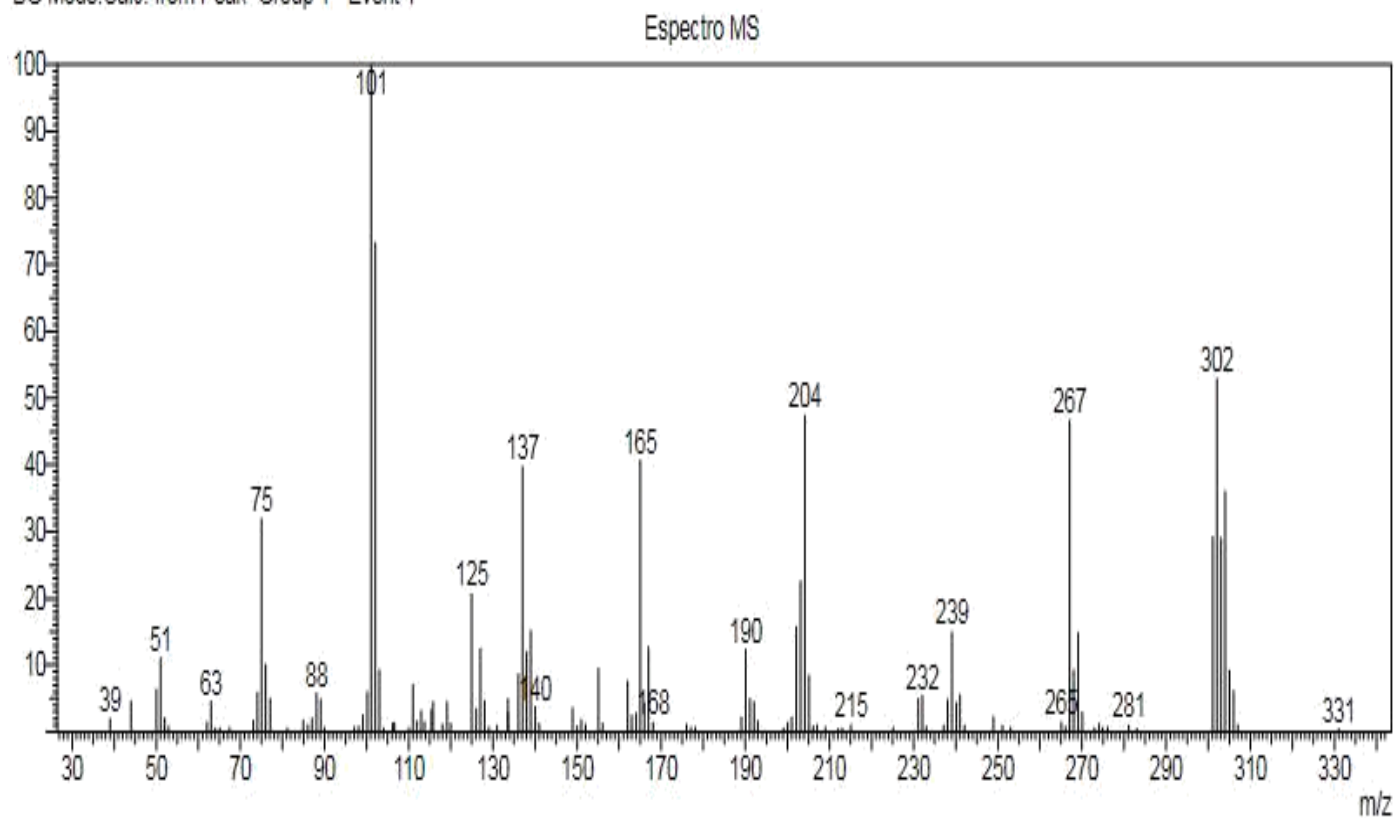


Cromatograma TIC:

Pico#	R.Time	Area%	Height%	A/H
1	25.267	100.00	100.00	2.75
		100.00	100.00	

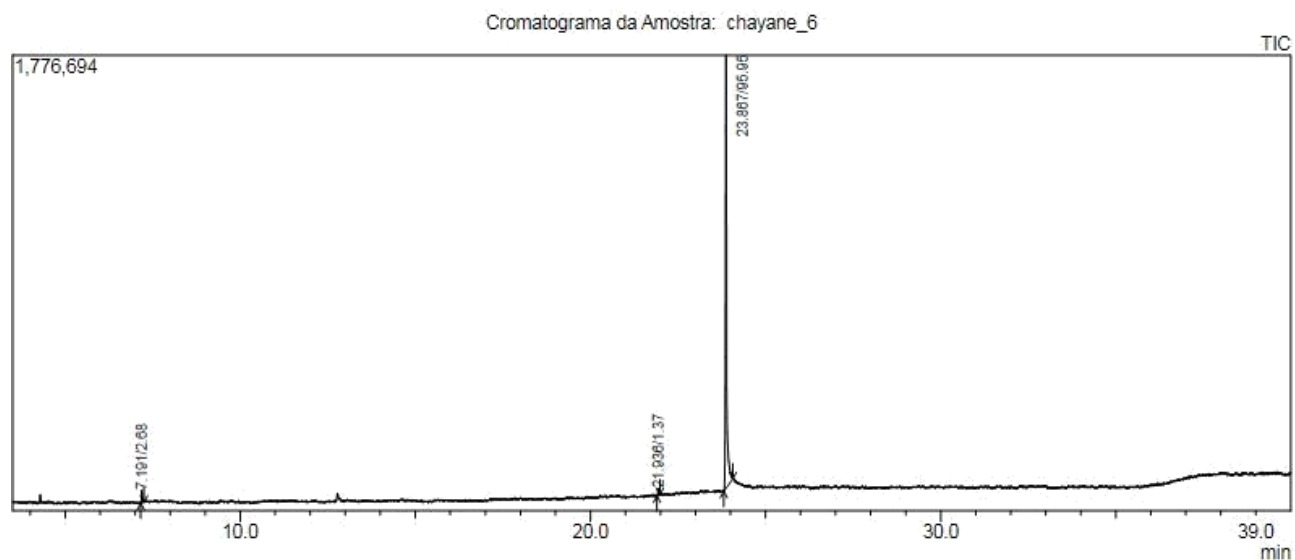
Anexo 3:Cromatografia de 1,5-bis(4-clorofenil) penta-1,4-dien-3-ona

Peak#:1 R.Time:25.267(Scan#:2613)
MassPeaks:124
RawMode:Averaged 25.183-25.475(2603-2638)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



Anexo 4: Espectro de massas de 1,5-bis(4-clorofenil) penta-1,4-dien-3-ona

Informação da Amostra
 Analisado em : 15/09/2015 15:09:12
 Amostra : chayane_6
 ID Amostra : chayane_6
 Vial # : 6
 Injection Volume : 1.00
 Arquivo : C:\GCMSsolution\Data\Síntese\2015\SETEMBRO\chayane\chayane_6.qgd
 Método : C:\GCMSsolution\Data\Métodos\Método Síntese.qgm
 Arquivo Tuning : C:\GCMSsolution\System\Tune1\2015\06_01_2015.qgt

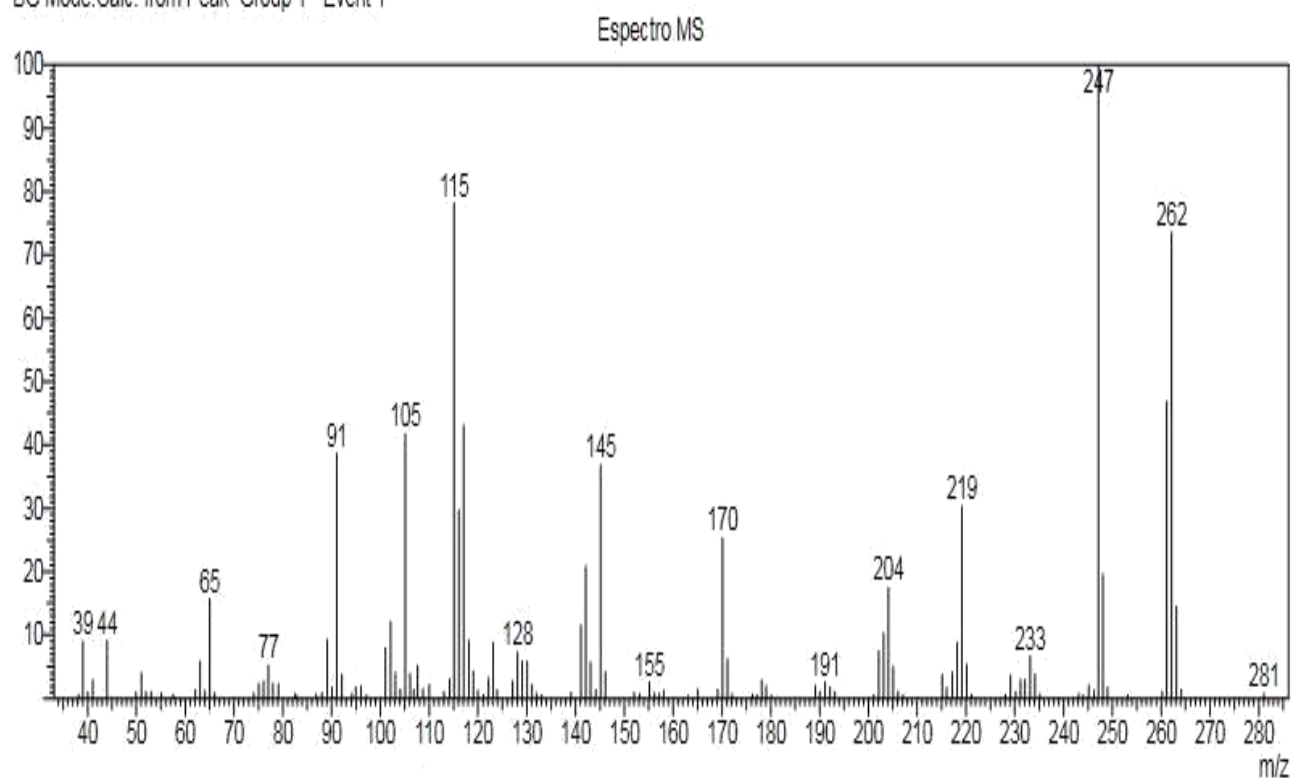


Cromatograma TIC

Pico#	R.Time	Area%	Height%	A/H
1	7.191	2.68	2.75	2.13
2	21.936	1.37	1.54	1.93
3	23.867	95.95	95.71	2.19
		100.00	100.00	

Anexo 5: Cromatografia de 1,5-bis(4-metilfenil) penta-1,4-dien-3-ona

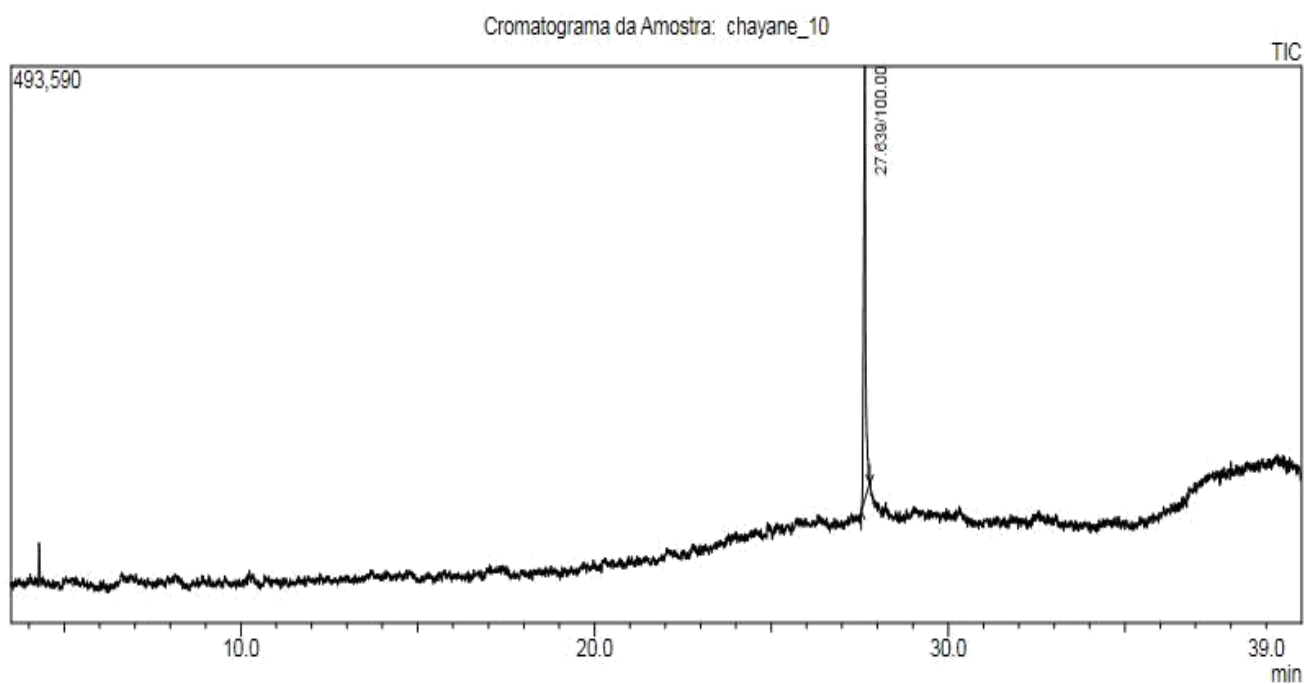
Peak#3 R.Time:23.867(Scan#:2445)
MassPeaks:128
RawMode:Averaged 23.800-24.067(2437-2469)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



Anexo 6:Espectro de massas de 1,5-bis(4-metilfenil) penta-1,4-dien-3-ona

Informação da Amostra

Analisado em : 15/09/2015 18:08:31
 Amostra : chayane_10
 ID Amostra : chayane_10
 Vial # : 10
 Injection Volume : 1.00
 Arquivo : C:\GCMSsolution\Data\Síntese\2015\SETEMBRO\chayane\chayane_10.qgd
 Método : C:\GCMSsolution\Data\Métodos\Método Síntese.qgm
 Arquivo Tuning : C:\GCMSsolution\System\Tune\1\2015\06_01_2015.qgt

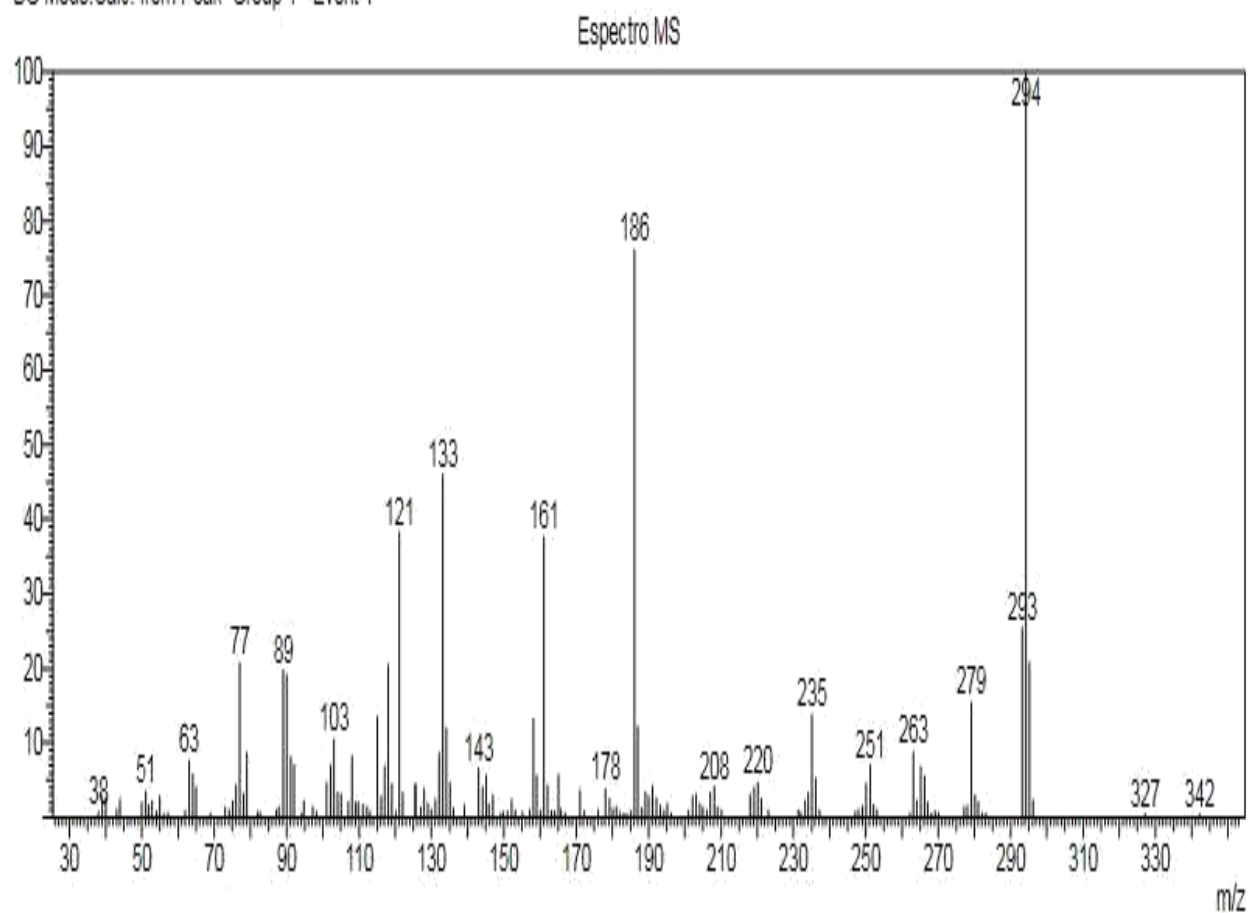


Cromatograma TIC

Pico#	R.Time	Area%	Height%	A/H
1	27.639	100.00	100.00	3.78
		100.00	100.00	

Anexo 7: Cromatografia de 1,5-bis(4-metoxifenil)penta-1,4-dien-3-ona

Peak# 1 R.Time:27.639(Scan#:2898)
MassPeaks:165
RawMode:Averaged 27.542-27.783(2886-2915)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1

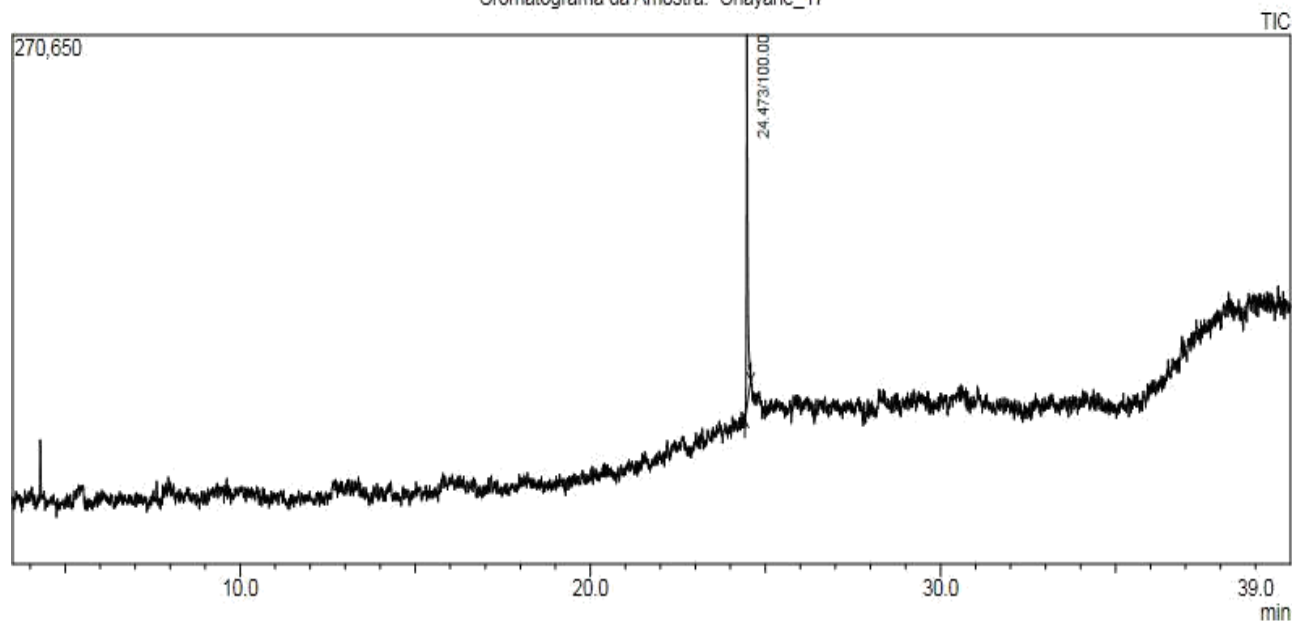


Anexo 8:Espectro de massas de 1,5-bis(4-metoxifenil)penta-1,4-dien-3-ona

Informação da Amostra

Analisado em : 15/09/2015 23:22:34
 Amostra : Chayane_17
 ID Amostra : Chayane_17
 Vial # : 7
 Injection Volume : 1.00
 Arquivo : C:\GCMSsolution\Data\Síntese\2015\SETEMBRO\chayane\15.09.15\Chayane_17.qgd
 Método : C:\GCMSsolution\Data\Métodos\Método Síntese.qgm
 Arquivo Tuning : C:\GCMSsolution\System\Tune1\2015\06_01_2015.qgt

Cromatograma da Amostra: Chayane_17



Cromatograma TIC

Pico#	R.Time	Area%	Height%	A/H
1	24.473	100.00	100.00	2.59
		100.00	100.00	

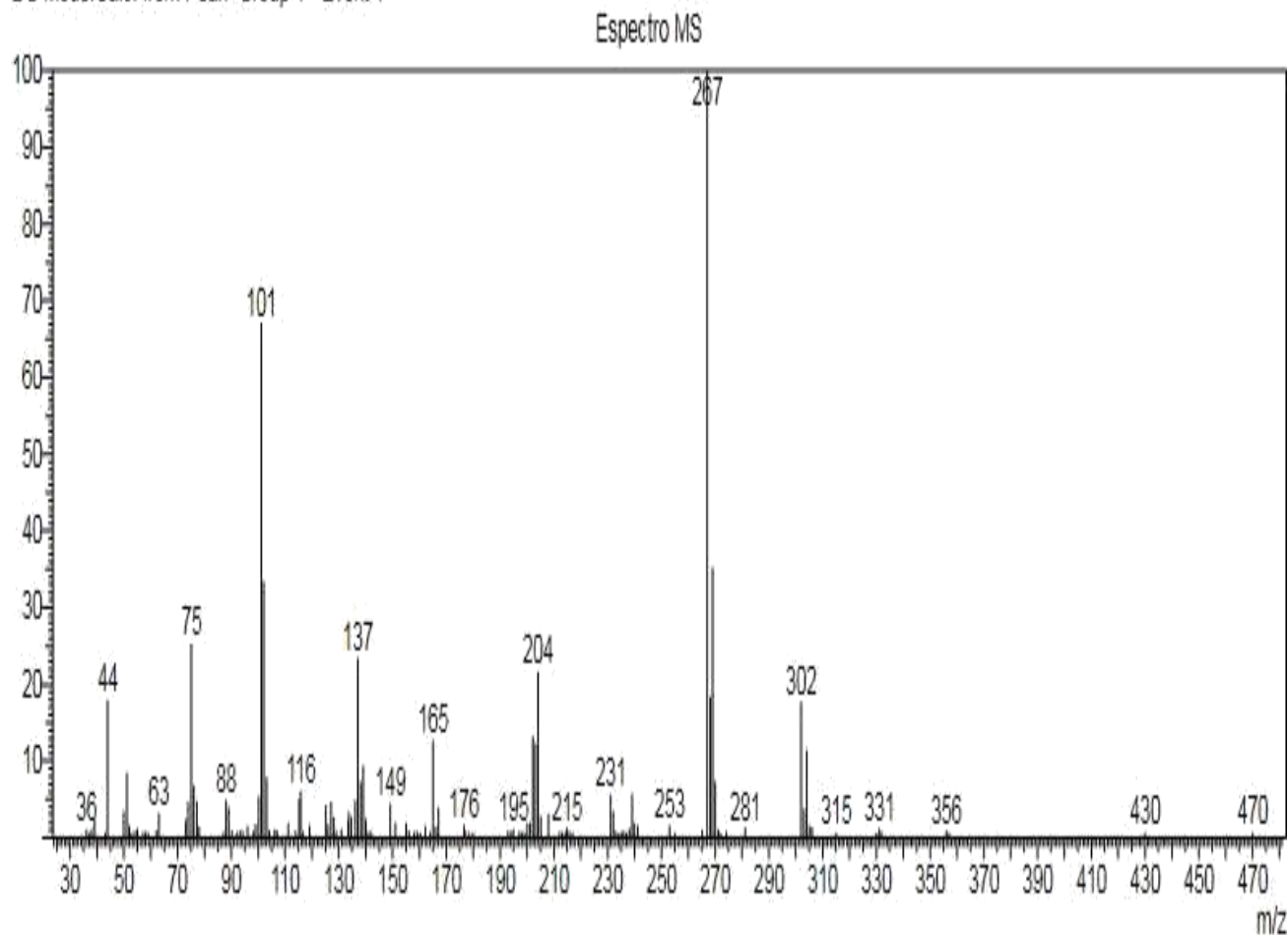
Anexo 9: Cromatografia de, 5-bis (2-clorofenil) penta-1,4-dien-3-ona

Peak#1 R.Time:24.473(Scan#:2518)

MassPeaks:132

RawMode:Averaged 24.417-24.583(2511-2531)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



Anexo 10: Espectro de massas de 5-bis(2-clorofenil) penta-1,4-dien-3-ona