



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
Escola de Farmácia



VANESSA DANIELE ZACARIAS

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO CITOTÓXICA DE
3-BROMO FLAVONAS

TRABALHO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Ouro Preto, dezembro de 2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
Escola de Farmácia



VANESSA DANIELE ZACARIAS

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO CITOTÓXICA DE
3-BROMO FLAVONAS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Bacharel em Farmácia ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto.

Orientador: Prof. Dr. Jason Guy Taylor

Ouro Preto, dezembro de 2017

Z13s Zacarias, Vanessa Daniele.
Síntese, caracterização e avaliação citotóxica de 3-Bromo flavonas [manuscrito]
/ Vanessa Daniele Zacarias. - 2017.

61f.: il.: color; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Jason Guy Taylor.

Monografia (Graduação). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Departamento de Farmácia.

1. Síntese orgânica. 2. Flavonoides. 3. Citotoxicidade. 4. Artemia Salina. I. Taylor, Jason Guy. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 615

Catálogo: ficha@sisbin.ufop.br



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP

Escola de Farmácia

TERMO DE APROVAÇÃO

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO CITOTÓXICA DE 3-BROMO FLAVONAS

Trabalho de conclusão de Curso defendido por **VANESSA DANIELE ZACARIAS**, matrícula 11.2.2085 em 20 de dezembro de 2017, e aprovado pela comissão examinadora:

Prof. Dr. Jason Guy Taylor
DEQUI-ICEB-UFOP, orientador

Prof. Dra. Tânia Márcia Sacramento Araújo
DEQUI-ICEB-UFOP

Prof. Dra. Viviane Martins Rebello Dos Santos
DEQUI-ICEB-UFOP

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a meus pais que estiveram comigo em toda a trajetória, me apoiaram nas dificuldades e me inspiraram a sempre continuar em frente.

Agradeço também ao meu orientador, Prof. Jason Guy Taylor, que me salvou não apenas uma, mas várias vezes, com sua paciência e dedicação.

Agradeço ainda ao André, pelo carinho, amor, compreensão e ajuda durante todo o processo.

Agradeço às minhas amigas, em especial Marlucy e Isabella, que sempre me ajudaram e nunca me deixaram fraquejar.

Agradeço, por fim, a todos que participaram desses anos da minha vida estudantil, contribuindo direta e indiretamente para meu sucesso.

RESUMO

As flavonas, uma subclasse do grupo dos flavonoides, possuem um amplo espectro de atividade biológica, entre elas, antitumoral, antimicrobiana, antioxidante, antifúngica e uma variedade de potenciais farmacológicos, o que faz desses compostos alvos de muitas pesquisas. Nesse sentido, foi realizada uma síntese de 3 etapas, para a obtenção de flavonas substituídas. Sabendo ainda que compostos halogenados também possuem atividade biológica, foi feita uma nova etapa de reações arranjada em dois passos para a substituição do H de C3, por Br nessas flavonas. Por fim, as moléculas formadas ao fim da etapa de bromação, foram submetidas à ensaio citotóxico com *Artemia salina*. Foram obtidas na primeira síntese, seis análogos de flavona, enquanto que na segunda etapa de reações, apenas três foram efetivamente bromadas. A rota sintética utilizada demonstrou-se efetiva para a obtenção de flavonas, mas pouco adequada à obtenção de 3-bromo flavonas, visto que apresentaram rendimento variável e não expressivo em alguns casos, apesar do longo tempo de reação. Em relação ao ensaio citotóxico, o resultado acabou por ser inconclusivo, visto que foi feito como teste preliminar e a utilização dos solventes orgânicos no ensaio pode ter influenciado no parâmetro de morte das Artemias.

Palavras-chave: flavonoides, flavonas, síntese orgânica, 3-bromo flavonas, citotoxicidade, *Artemia salina*,

ABSTRACT

Flavones are a subclass of flavonoid group, have a broad spectrum of biological activity, such as antitumor, antibacterial, antioxidant, antifungal and a great variety of pharmacological potential, which makes these compounds targets for many researchers. Regarding this, a synthesis was carried out in three steps in order to obtain substituted flavones. With the information that halogenated compounds also have biological activity, was constructed a new phase of reactions, in two parts, for the substitution of H, from C3, for Br on these flavones. Lastly, the formed molecules at the end of Br addition were submitted to a cytotoxic test with Brine Shrimps (*Artemia Salina*). In the first synthesis, six analogues of flavone were obtained, although only three of them were effectively brominated. The synthetic route used has showed to be effective to acquire flavones, but poorly adequate to obtain 3-bromine flavones, as they presented a variable and inexpressive yield in some cases, despite its long reaction time. About the cytotoxic experiment, the result demonstrated to be inconclusive, as it had been done as a preliminary test, and the usage of organic solvents may have influenced the parameter of Shrimps' mortality.

Keywords: flavonoids, flavones, organic synthesis, 3-bromine flavones, cytotoxicity, *Artemia salina*,

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Figura 4.1: Estrutura geral dos flavonoides.....	7
Figura 4.2: Estruturas das principais classes de flavonoides.....	8
Figura 4.3: Estrutura geral da flavona.....	9
Figura 4.4: Perfil de atividade terapêutica da flavona.....	10
Figura 4.5: Estrutura geral das 3-Bromo flavonas.....	11
Figura 4.6: Esquema da síntese de flavona via β -dicetona intermediário.....	12
Figura 4.7: Proposta de rota sintética para a formação de flavonas a partir de acetofenona e salicilaldeído.....	12
Figura 4.8: Proposta de rota sintética para a formação de flavonas a partir de nitrato de metilamônia e irradiação de micro-ondas.....	13
Figura 4.9: Proposta de rota sintética para a formação de flavonas com etapa única.....	13
Figura 4.10: Esquema das rotas sintéticas propostas para obtenção de 3-Bromoflavonas a partir de flavonas.....	14
Figura 4.11: <i>Artemia salina</i> 24 horas após incubação.....	16
Figura 5.1: Proposta geral de rota sintética para a formação de 3-Bromo flavonas	17
Figura 5.2: Montagem do ambiente de eclosão das <i>Artemias salina</i>	19
Figura 6.1 – Proposta de mecanismo para a etapa I	21
Figura 6.2 – Proposta de mecanismo para a etapa II.....	22
Figura 6.3 – Proposta de mecanismo para a etapa III.....	22
Figura 6.4 – Proposta de mecanismo para as etapas IV e V.....	23
Figura 6.5 – Representação geral das 3-Bromo Flavonas sintetizadas.....	23

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Rendimentos obtidos em cada etapa de reação com os diversos substituintes.....	24
Tabela 2 – Pontos de fusão obtidos nas etapas III e V de reação.....	25

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo geral	3
2.2. Objetivos específicos	3
3. JUSTIFICATIVA	5
4. REVISÃO DE LITERATURA	7
4.1. Flavonoides	7
4.2. Flavonas e derivados bromados	9
4.3. Rotas sintéticas	11
4.3.1. Flavonas	11
4.3.2. 3-Bromo Flavonas	13
4.4. Citotoxicidade e Potencial Antitumoral	15
5. METODOLOGIA	17
5.1. Rotas Sintéticas	17
5.2. Ensaio citotóxico	18
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
6.1. Síntese de 3-Bromo flavonas	21
6.2. Caracterização das moléculas	25
6.2.1. Ponto de Fusão	25
6.2.2. Ressonância Magnética Nuclear	25
6.3. Ensaio citotóxico	26
7. CONCLUSÕES	27
8. REFERÊNCIAS	29
APÊNDICE A - Espectros RMN ¹³C e ¹H do 2-(p-toluil)-cromen-4-ona	33
APÊNDICE B - Espectros RMN ¹³C e ¹H e IV do 2-(4-Cloro-fenil)-cromen-4-ona	35
APÊNDICE D - Espectros RMN ¹³C e ¹H do 3-Bromo 2-(4-Cloro-fenil)-cromen-4-ona	39
APÊNDICE E - Espectros RMN ¹³C e ¹H do 2-(3,4,5-Trimetoxi-fenil)-cromen-4-ona	41
APÊNDICE F - Espectros RMN ¹³C e ¹H do 2-(3-Nitro-fenil)-cromen-4-ona	43
APÊNDICE G – Espectros RMN ¹³C e ¹H e IV 2-Furan-2-il-cromen-4-ona	45

1. INTRODUÇÃO

As flavonas correspondem a uma subclasse do grupo dos flavonoides, metabólitos secundários de plantas, nas quais são responsáveis pela proteção e atração de polinizadores. Estão presentes em inúmeras frutas e verduras, bem como em bebidas do dia a dia como café, chá, cerveja e mesmo em vinho.

Algo interessante sobre esse grupo de metabólitos secundários advém de seu amplo espectro de atividade biológica, o que inclui ação antitumoral, antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, antioxidante e uma variedade de potenciais farmacológicos, o que faz desses compostos alvos de muitas pesquisas. Por isso tantas rotas sintéticas que envolvam as flavonas têm sido descritas na literatura. Não obstante, a ausência de qualquer flavona natural halogenada, é um detalhe a ser considerado, uma vez que substituintes halogenados, geralmente conferem um ganho em atividade biológica para a estrutura. Nesse contexto, tem-se o que motiva e justifica esse estudo, especificamente a bromação do C3 do esqueleto da flavona, estrutura a qual não se tem muitos relatos na literatura.

O presente trabalho se baseou na síntese de flavonas distintas com adição do bromo na posição 3 do anel A e sua caracterização espectrofotométrica a partir de rotas sintéticas tradicionais que, embora sejam relativamente longas e utilizem reagentes fortes que demandam certos cuidados, já foram completamente elucidadas pela literatura, apresentando rendimentos consideráveis. Bem como na sua avaliação, enquanto flavona bromada e flavona apenas, frente a um ensaio simples de ação citotóxica, a fim de se definir uma relação estrutura-atividade comparando-se os resultados, objetivando-se obter flavonas e bromoflavonas com alto índice de pureza e rendimento, devidamente caracterizadas e com atividade biológica comprovada.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Sintetizar flavonas e derivados bromados na posição 3 e avaliação da atividade citotóxica.

2.2. Objetivos específicos

- Obter uma rota sintética eficiente para a obtenção de flavona, bem como para a bromação eficaz destas;
- Sintetizar flavonas substituídas e submetê-las ao processo de bromação;
- Caracterizar os produtos finais por métodos espectroscópios;
- Fazer ensaios biológicos de citotoxicidade;
- Comparar os resultados obtidos das flavonas e de seus derivados halogenados, a fim de avaliar esta substituição na atividade citotóxica.

3. JUSTIFICATIVA

As flavonas de modo geral, tanto naturais quanto sintéticas, exibem um amplo espectro de atividade biológica, incluindo ação antioxidante, anti-câncer, anti-HIV, anti-hipertensiva, antimicrobiana, antifúngica e anti-inflamatória (SINGH, Manjinder; KAUR, Maninder; SILAKARI, Om, 2014). Por ser uma substância natural, a incidência tal como os próprios efeitos adversos são minimizados, e seu espectro farmacológico inspira novas formulações. Além disso, substituintes halogenados apresentam ampla atividade biológica, no entanto não se tem relato de nenhuma flavona natural atualmente isolada e caracterizada que apresente halogenação em sua estrutura (MUGHAL, Ehsan Ullah et al.; 2006).

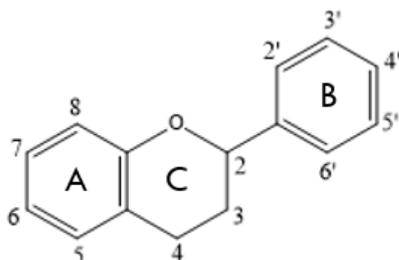
A partir daí poucos relatos foram feitos na literatura sobre a avaliação de atividade biológica das flavonas com adição de bromo na posição C3 e, não obstante, não se tem ainda nenhum relato avaliando esses compostos como potenciais agentes citotóxicos e antioxidantes. Esse contexto, então, reafirma o intuito científico do trabalho, justificando a necessidade de se explorar a síntese de substâncias com potencial já conhecido, numa vertente ainda não encontrada entre os compostos naturais e que pode, de forma simples, potencializar ou ampliar sua atividade, fazendo deste um fármaco em potencial para enfermidades diversas.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. Flavonoides

Os flavonoides são um grupo de metabólitos secundários poli fenólicos amplamente encontrados em plantas (TUNDIS, Rosa et al, 2005). Os metabólitos são, geralmente, quimicamente constituídos de um anel benzênico (A), condensado a outro de 6 membros (C) onde, na posição 2, carrega um grupo fenil (Figura 4.1). Desde o início da década de 80, já existem em torno de 500 flavonoides já conhecidos (HAVSTEEN, B., 1983). Atualmente, aproximadamente 4000 estruturas únicas de flavonoides já foram isoladas (SASHIDHARA, K.V.; KUMAR, Manoj; KUMAR, Abdhesh, 2012).

Figura 4.1: Estrutura geral dos flavonoides

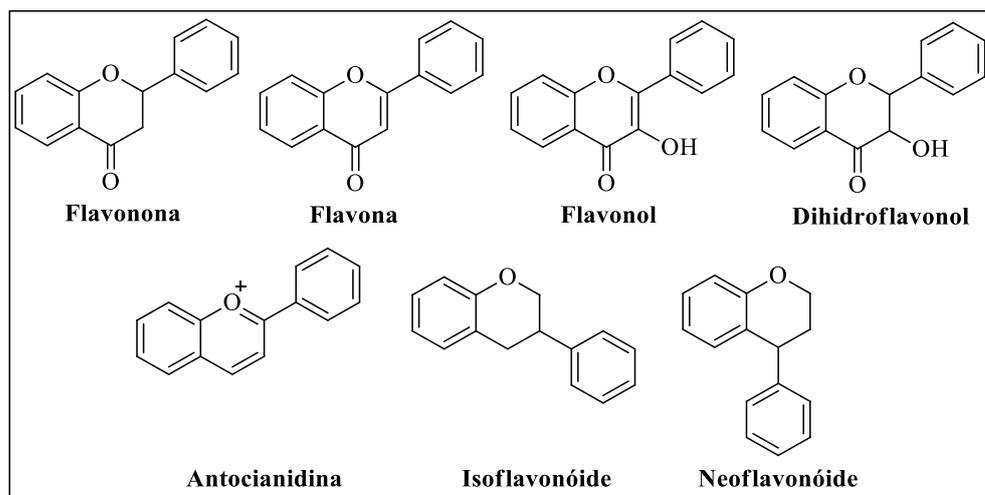


Fonte: Elaborado pela autora

Ao contrário do que se pode esperar, os flavonoides estão frequentemente presentes em frutas e vegetais presentes na nossa dieta, bem como em bebidas como cerveja, chá, vinho e café (SINGH, Manjinder; KAUR, Maninder; SILAKARI, Om, 2014). Nas plantas em que se encontram, os flavonoides se relacionam principalmente à coloração forte, mas também tem função protetora. Essa proteção inclui raios UVB, invasão de microrganismos (fungos, vírus e bactérias) e até mesmo do próprio consumo frente a insetos e mamíferos herbívoros. (HARBONE, Jeffrey B; WILLIAMS, Christine A., 2000).

Sendo um grupo muito amplo de metabólitos secundários, os flavonoides são quimicamente classificados em várias classes (Figura 4.2), dentre essas classificações estão o flavonol, glicosídeo flavonoidico, flavona, flavonolignana, flavonona, isoflavonoide, leucoantocianidinas, antocianidinas, flavana, auronas, chalconas e neoflavonoides (SINGH, Manjinder; KAUR, Maninder; SILAKARI, Om, 2014).

Figura 4.2: Estruturas das principais classes de flavonoides



Fonte: Elaborado pela autora

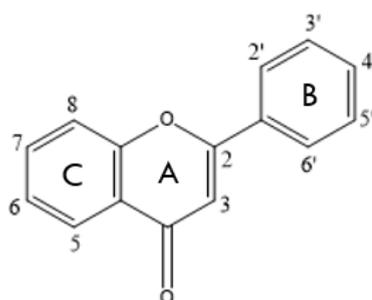
O uso terapêutico dos flavonoides transcende séculos que antecedem a própria química, ou seja, seu uso era baseado unicamente no conhecimento empírico (HAVSTEEN, B., 1983). Esses compostos apresentam um leque sem fim de atividade biológica e uso terapêutico nas mais variadas enfermidades. Já em 2000, foram elucidadas, nos flavonoides, atividades farmacológicas distintas, como antioxidante, anti-inflamatório, inibidor de enzimas, citotoxicidade tumoral e atividade vascular, além de ação antiespasmódica, antifúngica, antibacteriana e como agentes hepatoprotetores (HARBONE, Jeffrey B; WILLIAMS, Christine A., 2000). Apesar disso, a importância dos flavonoides como potencial farmacológico já provém de estudos que datam as décadas de 70 e 80 com observação de inúmeras ações dos flavonoides em várias doenças como diabetes mellitus, alergia e câncer; ainda que a maior parte dos mecanismos fossem apenas hipotéticos ou só comprovados em laboratório, sem embasamento clínico que os suportassem (HAVSTEEN, B., 1983).

Havsteen (1983) ressalta ainda que muitos estudos retratam os flavonoides como inibidores de uma grande variedade de enzimas e lembram também a influência destas na permeabilidade de membranas tanto naturais quanto sintéticas. Além disso, o seu acentuado potencial antioxidante e sua ação inibidora da tirosina quinase, remete a estas habilidades de controle da proliferação celular e destruição de alguns patógenos no organismo. Assim sendo, inúmeras classes de flavonoides demonstram, além de todas ações biológicas já pontuadas, propriedades antitumoral e citotóxica em algum nível, entre elas encontram-se o flavonol, a flavanona e a flavona (TUNDIS, Rosa et al, 2005), foco desse estudo.

4.2. Flavonas e derivados bromados

Dentre as classes dos flavonoides, as flavonas têm especial destaque e interesse no meio científico. Como já mencionado, são metabólitos secundários de uma variedade de plantas. Sua fórmula molecular básica é $C_{15}H_{10}O_2$ arranjados em um esqueleto, C6-C3-C6, de três anéis (Figura 4.3). São substâncias cristalinas com cores que variam do branco ao amarelo (SINGH, Manjinder; KAUR, Maninder; SILAKARI, Om, 2014).

Figura 4.3: Estrutura geral da flavona



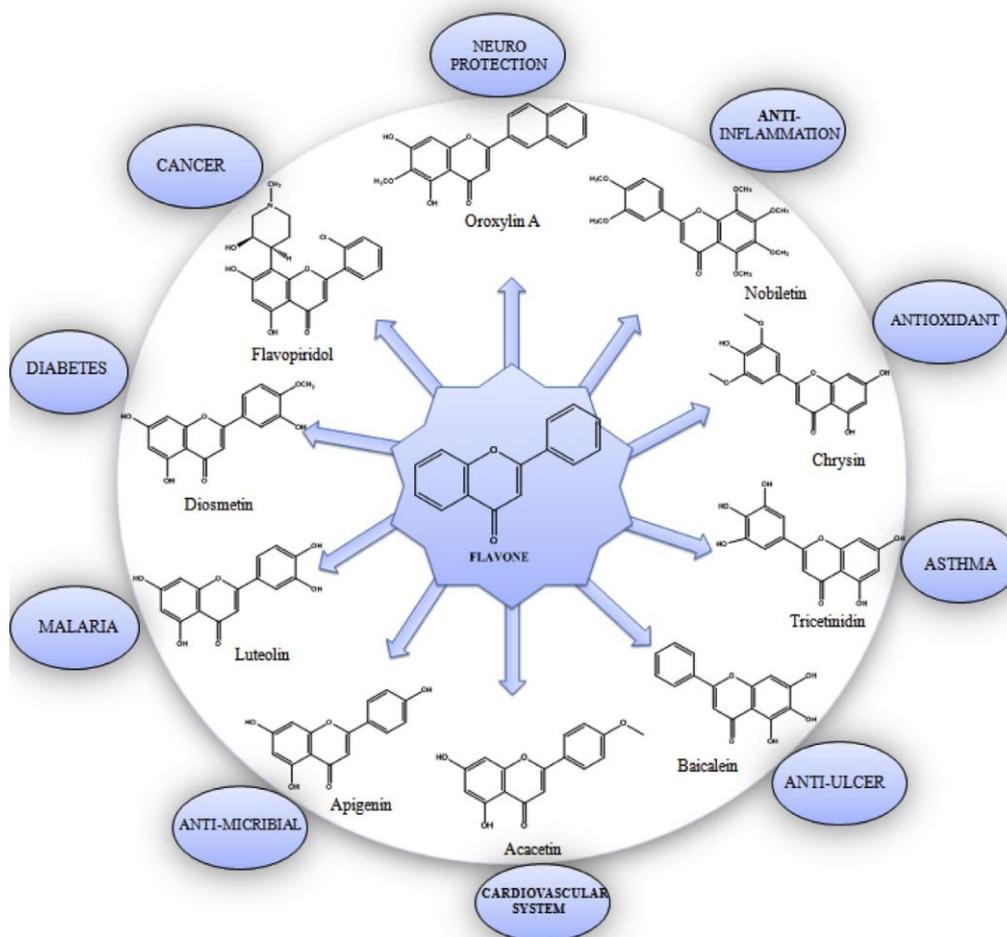
Fonte: Elaborada pela autora

A estrutura das flavonas exibe três grupos funcionais: Hidroxila, carbonila e ligações duplas conjugadas. Esses grupos podem sofrer reações tradicionais como redução, oxidação, substituição, condensação, entre outros (SINGH, Manjinder; KAUR, Maninder; SILAKARI, Om, 2014).

As flavonas estão presentes em inúmeras frutas e vegetais. Na natureza, elas se encarregam não só da proteção UV e antimicrobiana típica dos flavonoides, mas também atuam atraindo insetos para polinização (Verma, A. K.; Pratap, R.; 2010). Essa presença exacerbada das flavonas faz com que elas sejam consumidas a todo tempo, consumo esse que leva a um impacto altamente positivo na saúde do indivíduo (SINGH, Manjinder; KAUR, Maninder; SILAKARI, Om, 2014).

Num contexto químico-terapêutico, as atividades biológicas próprias da flavona, seja ela natural ou sintética, são múltiplas e variam conforme seus substituintes numa relação simples de estrutura-atividade (Figura 4.4). Relação essa que é, atualmente, foco de muitos estudos.

Figura 4.4: Perfil de atividade terapêutica da flavona

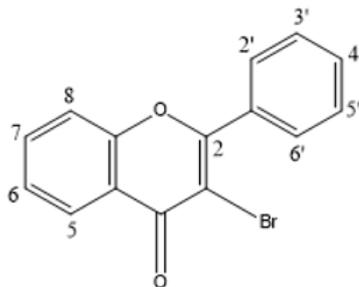


Fonte: SINGH, Manjinder; KAUR, Maninder; SILAKARI, Om, 2014, p.210.

Somado a esse panorama onde os flavonoides, de modo geral, já apresentam um enorme leque de atividade biológica, tem-se os compostos halogenados que também apresentam alta atividade biológica. No entanto, esses substituintes halogenados ainda não foram encontrados em flavonoides naturais (MUGHAL, Ehsan Ullah et al.; 2006), e se tem muito pouco estudo sobre sua atividade.

As 3-Bromo flavonas são caracterizadas pela substituição de um hidrogênio da posição 3 (anel C), por um átomo de bromo (Figura 4.5).

Figura 4.5: Estrutura geral das 3-Bromo flavonas



Fonte: Elaborado pela autora

Muitas técnicas que são descritas na literatura com o intuito de potencializar e efetivar essa rota de síntese, porém em um estudo biológico muito pouco foi realizado com esses derivados, o que aumenta ainda mais o interesse neste trabalho.

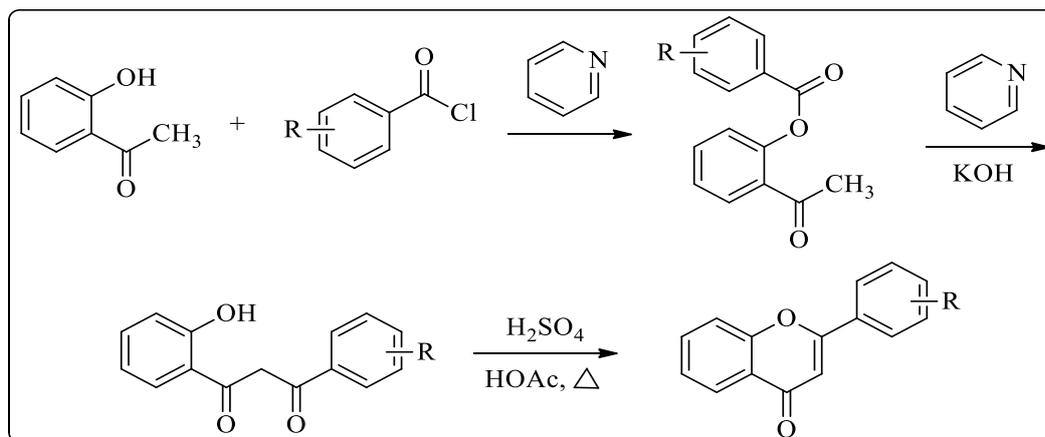
4.3. Rotas sintéticas

4.3.1. Flavonas

Inúmeras rotas sintéticas foram e são continuamente produzidas a fim de se aumentar o rendimento do produto final, acelerar a reação, aumentar a pureza e a qualidade final da flavona sintetizada.

Dentre essas sínteses, a mais clássica e utilizada é uma técnica de 3 etapas baseada no método de Baker-Venkataraman (Figura 4.6). Esse método consiste na conversão da 2-hidroxiacetofenona em um éster fenólico na primeira etapa, seguida de uma condensação intramolecular, a condensação de Claisen, que é feita na presença de base e forma um intermediário da reação, uma β -dicetona. A última etapa da síntese consiste na ciclização catalisada por ácido dessa dicetona em flavona. Embora seja uma rota tradicionalmente empregada, utiliza ácidos e bases fortes e leva um tempo de reação considerável (SINGH, Manjinder; KAUR, Maninder; SILAKARI, Om, 2014). No entanto, a média de seus rendimentos é de aproximadamente 80% (MUGHAL, Ehsan Ullah et al.; 2006).

Figura 4.6: Esquema da síntese de flavona via β -dicetona intermediário.

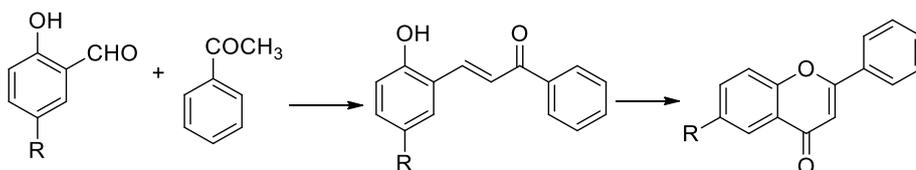


Fonte:

Elaborada pela autora

Visto as desvantagens do método tradicional, cientistas visaram a obtenção de flavonas propondo diversas rotas de síntese. Um dessas sínteses passa por uma rota livre de solventes que utiliza iodine como catalisador e compostos de partida facilmente acessíveis: acetofenona e salicilaldeído (Figura 4.7); gerando rendimentos razoáveis em tempo hábil (SASHIDHARA, K.V.; KUMAR, Manoj; KUMAR, Abdhesh, 2012).

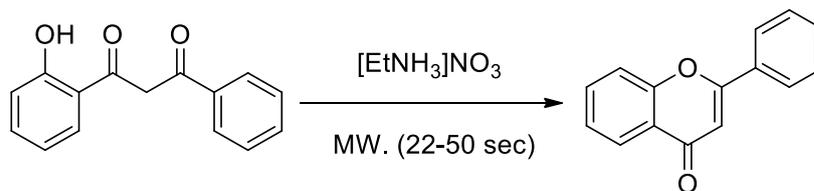
Figura 4.7: Proposta de rota sintética para a formação de flavonas a partir de acetofenona e salicilaldeído



Fonte: SASHIDHARA, K.V.; KUMAR, Manoj; KUMAR, Abdhesh, 2012

Outras tentativas de rotas incluem a conversão do intermediário 1,3 Dicetona em flavona por meio de líquido iônico catalisador, o nitrato de metilamonia (Figura 4.8), sob irradiação de micro-ondas, método muito mais rápido (22-50 segundos), com rendimento de 80-90% (SARDA, Swapnil R et al; 2006), mas que demanda instrumentação.

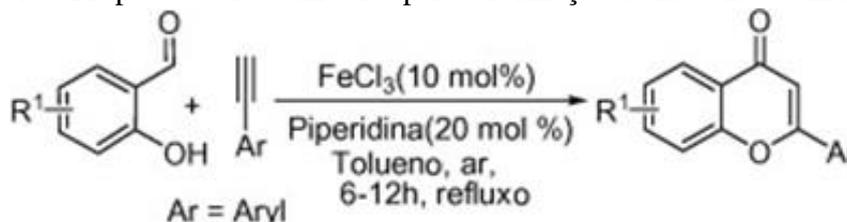
Figura 4.8: Formação de flavonas utilizando nitrato de metilamônia e micro-ondas



Fonte: SARDA, Swapnil R et al; 2006

Por fim, outras técnicas foram desenvolvidas envolvendo, por exemplo, uma rota em passo único também que leva à obtenção de flavonas a partir de 2-hidroxiaril aldeído e aril acetileno, com FeCl₃ e piperidina em tolueno e sob refluxo (Figura 4.9). Embora seja uma rota simples de um único passo, o tempo reacional gira em torno de 7 a 12 horas (MAITI, Gouhari et al. 2011).

Figura 4.9: Proposta de rota sintética para a formação de flavonas com etapa única



Fonte: MAITI, Gouhari et al. 2011

Visto algumas dessas tantas tentativas de melhorar a pureza final, rendimento e tempo reacional, é possível perceber que cada técnica tem suas desvantagens. Por isso, ainda hoje o método tradicional continua sendo aplicado. Embora utilize ácidos e bases fortes, é uma rota bem elucidada e com rendimentos consideráveis.

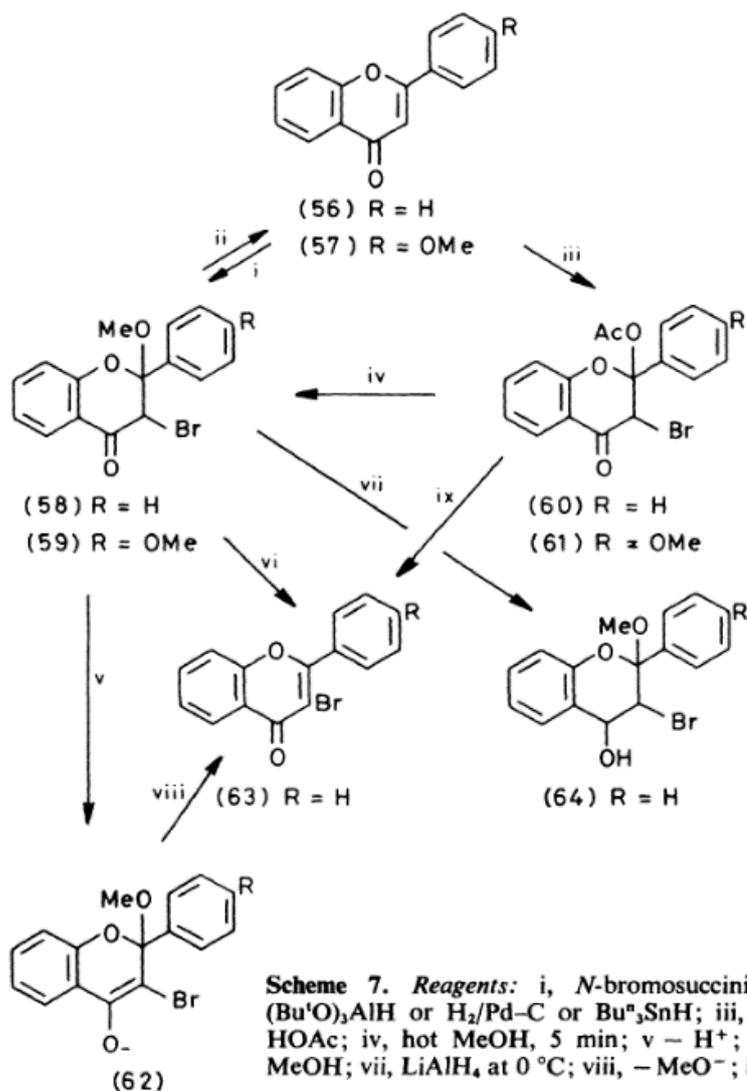
4.3.2. 3-Bromo Flavonas

Assim como as flavonas, são diversas as rotas que levam à substituição do hidrogênio em C3 por um bromo. Partindo-se da flavona simples, a bromação do C3 pode ocorrer em condições variadas, passando-se geralmente por um intermediário. Propostas mais antigas (BIRD, T., 1983) utilizam 2 ou 3 etapas para a rota sintética.

Passando-se pelo intermediário 2-acetoxi-3-bromoflavona (Figura 4.10), a primeira etapa envolve *N*-Bromosuccinamida como provedor de bromo e anidrido acético – ácido acético

junto à flavona, logo em seguida a flavona bromada é obtida solubilizada em metanol aquecido. Os rendimentos na primeira etapa foram em torno de 92% na segunda, porém foi uma rota com tempo de reação maior. Análogo a esse método e passando pelo 2-metoxi-3-bromoflavona, muitas outras rotas podem ser obtidas (Figura 4.10). Dentre as sínteses propostas com rendimento apreciável, pode ser obtida a partir do intermediário 2-acetoxi-3-bromoflavona, por redução com NABH_4 a partir do 3-metoxi-3-bromoflavona tem rendimentos equivalentes (BIRD, T. Geoffrey C. et al, 1983).

Figura 4.10: Esquema das rotas sintéticas propostas para obtenção de 3-Bromoflavonas a partir de flavonas



Fonte: BIRD, T. Geoffrey C et al, 1983, p. 1835.

4.4. Citotoxicidade e Potencial Antitumoral

Segundo a OMS, câncer é um termo utilizado para designar um enorme grupo de doenças que são caracterizadas pelo crescimento completamente desordenado e sem controle de células anormais. Essa anormalidade pode ser desencadeada por fatores físicos, químicos e até mesmo ambientais. Nesse contexto, a atividade citotóxica é comumente usada para descobrir novos potenciais compostos antitumorais (TUNDIS, Rosa et al, 2005), ou seja, essa característica biológica das flavonas comprovadas em vários estudos é importante na terapêutica tumoral.

Os bioensaios de letalidade são considerados uma das ferramentas mais úteis para a avaliação preliminar da toxicidade de compostos com potencial atividade biológica (FERRAZ FILHA, Z. S. et al 2012). A simplicidade desse bioensaio favorece sua utilização rotineira, podendo ser desenvolvido no próprio laboratório, uma vez que se caracteriza por ser de baixo custo, rápido e não exigir técnicas assépticas (SIQUEIRA, J M et al, 1998).

As *artemias salina* tem sido utilizado durante décadas como um organismo teste (MICHALE et al. 1956.) em pesquisas de produtos naturais (MEYER et al, 1982.) e para avaliar o efeito de produtos químicos em ambientes aquáticos (PERSOONE & WELLS, 1987). O ensaio de *Artemia* é usado rotineiramente nos laboratórios de todo o mundo para avaliação de extratos de plantas com potenciais propriedades medicinais (ex.: antimicrobianos ou antiparasitários), para fracionamento biomonitorado de constituintes bioativos de extratos de plantas e para a detecção de efeitos citotóxicos (CÁCERES et al, 1998; MOSHI et al, 2004; OLIVA et al, 2007). De modo geral, é um rápido e simples monitoramento da resposta biológica que mede apenas um parâmetro, morte ou vida.

As *Artemia salina* (Figura 4.11) são microcrustáceos invertebrados de tamanho e coloração variados. Vivem em ambientes extremos onde poucas espécies tem capacidade de se desenvolverem. Estão em constante estado de locomoção, pois são animais filtradores que dependem disso para alimentar-se e respirar.

Figura 4.11: *Artemia salina* 24 horas após incubação



Fonte: ARAUJO, M. Aquariofilia¹

A correlação significativa entre o ensaio biológico com camarão de salina e a inibição do crescimento *in vitro* de linhas celulares de tumores humanos que foi demonstrado pelo Instituto Nacional do Câncer (NCI, EUA) é significativo porque mostra o valor deste bioensaio como uma ferramenta de pré-triagem para pesquisa de drogas antitumor (ARCANJO, DDR. et al, 2012), o que justifica seu uso como uma etapa na descoberta e análise de novos fármacos.

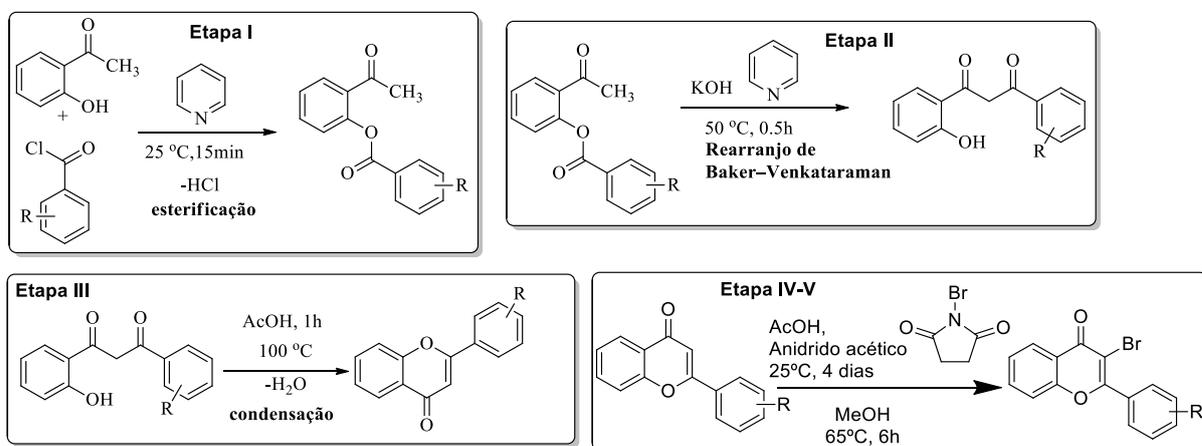
¹ Disponível em: <<http://aquariofilia-mario.blogspot.com.br/2009/06/artemia-salina-pequenos-truques-i.html>> acessado em 12 de dezembro, 2017.

5. METODOLOGIA

5.1. Rotas Sintéticas

A rota sintética completa utilizada para a formação de 3-Bromo Flavonas (Figura 5.1), se divide em um total de cinco etapas. As primeiras três etapas têm por objetivo a formação de flavonas, substituídas ou não, enquanto que as duas últimas etapas de reação correspondem ao processo de obtenção das 3-bromo flavonas.

Figura 5.1: Proposta geral de rota sintética para a formação de 3-Bromo flavonas



Fonte: Elaborado pela autora

Etapa I - Em um balão de fundo redondo foram adicionados piridina (20 mL), 2-hidroxiacetofenona (0,1 mmol) e um cloreto de benzoíla (0,15 mmol). A mistura reacional foi mantida sob agitação constante por 15 minutos. Após esse tempo de agitação, adicionou-se 60mL de ácido clorídrico (3M) e gelo ao balão. Após o término da reação ocorreu a formação de um precipitado que foi filtrado a vácuo e lavado com água para retirar resíduos.

Etapa II - O sólido formado na etapa I foi adicionado a um balão de fundo redondo com piridina (75 mL) e aqueceu-se essa solução até a temperatura de 50°C. Em seguida, adicionou-se hidróxido de potássio (7g) a essa solução que foi mantida sob agitação constante por 15 minutos. Em seguida, a solução foi resfriada até a temperatura ambiente e, então, foi adicionado 50 mL de ácido acético (10%). Houve então a formação de precipitado que foi, por fim, filtrada a vácuo e obteve-se um sólido seco.

Etapa III (Formação de Flavona) - Transferiu-se todo o sólido formado na etapa II para um balão de fundo redondo, em seguida foram adicionados os ácidos acético glacial (90 mL) e sulfúrico concentrado (3,5 mL). Um condensador de refluxo foi acoplado a balão e deixado em refluxo. A mistura reacional foi mantida sob agitação constante a temperatura de 100°C por 1 hora. Em seguida, colocou-se a solução em um béquer contendo gelo sob agitação até completo resfriamento do sistema. Em seguida, foi feita a filtração a vácuo, obtendo-se um sólido, obtendo-se a flavona ou derivado.

Etapa IV - Preparou-se uma solução utilizando N-bromosuccinamida (4,75 g; 26,7 mmol) em ácido acético-anidrido acético 1:1 (50 mL). Esta solução foi adicionada a uma outra solução de flavona (5 g; 22,5 mmol) e ácido acético-anidrido acético 1:1 (10 mL). A mistura reacional foi mantida sob agitação constante por 4 dias. Após esse tempo, houve formação de um precipitado que foi filtrado à vácuo, obtendo-se um sólido úmido que foi levado ao dessecador.

Etapa V (Obtenção de 3-Bromo Flavona) - Colocou-se o precipitado formado na etapa IV em um balão de fundo redondo e metanol (150 mL), sob agitação constante à temperatura de 65°C por 6 horas. Após a formação do sólido, foi realizada a filtração à vácuo, obtendo-se flavona ou derivado, bromado.

5.2. Ensaio citotóxico

Etapa Única - Pesou-se 39,0g de sal marinho que foi diluído em 1L de água destilada a fim de proporcionar um meio adequado. A esse meio, adicionou-se duas mini-espátulas de cistos de *A. salina* e colocou-se o recipiente sob radiação luminosa e aeração constante (Figura 5.2).

Figura 5.2: Montagem do ambiente de eclosão das *Artemias salina*



Fonte: Capturado pela autora

A eclosão dos cistos ocorreu, no geral, com 24h sob essas condições. Uma vez eclodidos, transferiu-se dez *A. salina* para cada tubo de ensaio com 4,0mL do meio salino e 1,0mL da amostra diluída, esperou-se 24h e contou-se o número de *A. salina* sobreviventes. As amostras foram analisadas em quatro concentrações diferentes (100µg/mL, 80µg/mL, 40µg/mL e 20µg/mL) e em triplicata. O controle positivo utilizado foi uma solução de Lapachol seguindo o mesmo procedimento das amostras de interesse, enquanto o controle negativo foi feito com água marinha artificial e um solvente orgânico.

As *A. salina* permaneceram durante 24h nas soluções, e em seguida analisou-se o índice de mortalidade para determinar a toxicidade dos compostos a fim de calcular a DL₅₀ pelo método de Probitos.

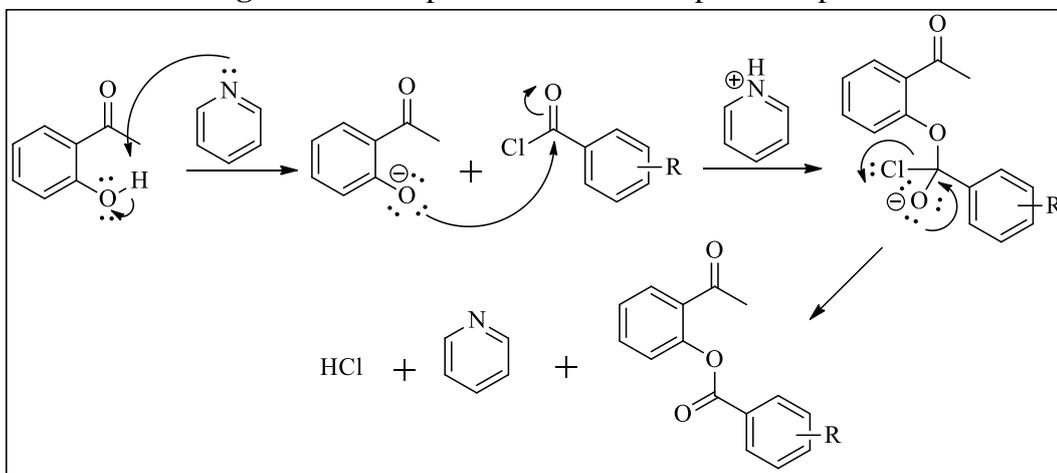
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Síntese de 3-Bromo flavonas

A caracterização dos compostos orgânicos foi confirmada por comparação dos seus pontos de fusão com os valores conhecidos na literatura. Os pontos de fusão não estão corrigidos e foram medidos no aparelho Büchi Melting Point B-540. Os dados de RMN foram obtidos com instrumentos de RMN na UFV (300MHz), os deslocamentos químicos são referidos em δ (ppm) com referência a prótons residuais e os sinais de ^{13}C em solvente deuterado (CDCl_3).

O método clássico para a síntese de flavonas e seus análogos com rearranjo de Baker-Venkataraman apresentou-se muito eficiente sendo uma rota relativamente simples e de bons rendimentos. Na primeira etapa de reação para a formação de flavonas e seus análogos, ocorre uma esterificação entre os compostos cloreto de benzoíla e 2-hidroxiacetofenona a fim de formar benzoato de 2-acetilfenil (Figura 6.1).

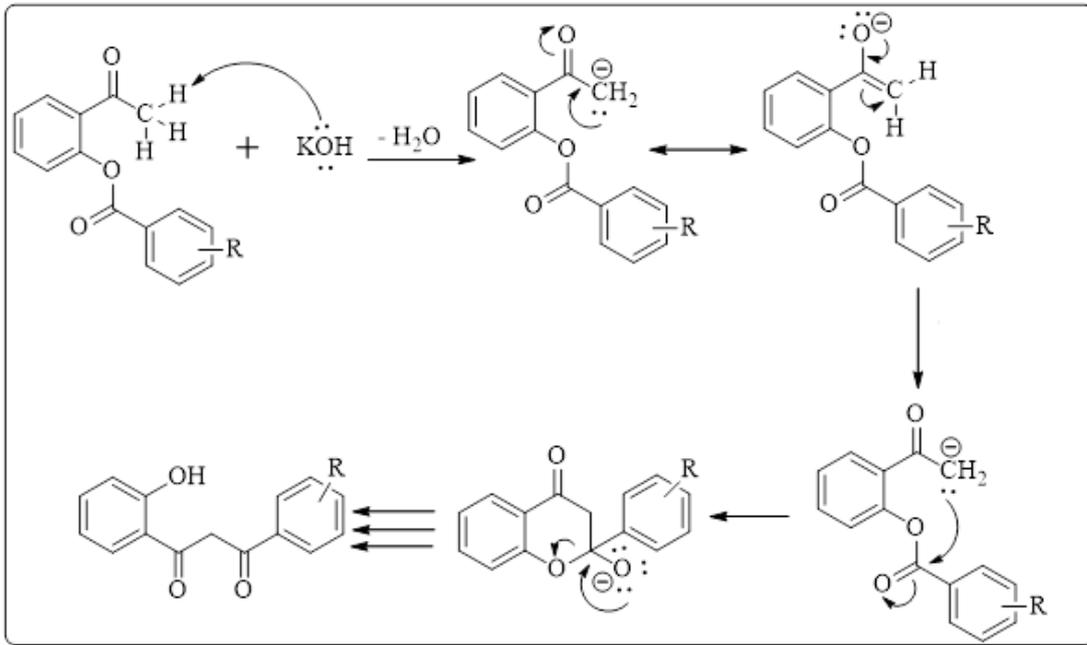
Figura 6.1 – Proposta de mecanismo para a etapa I



Fonte: Elaborado pela autora

Após a esterificação, ocorre o rearranjo de Baker-Venkataraman (etapa II). Esse rearranjo é facilitado por uma base e forma β -dicetona, que é um intermediário fundamental na síntese de flavonas. O mecanismo de reação dessa etapa passa pela formação de um enolato, seguido pelo ataque intramolecular da carbonila do éster, resultando na migração da subunidade de benzoíla (Figura 6.2).

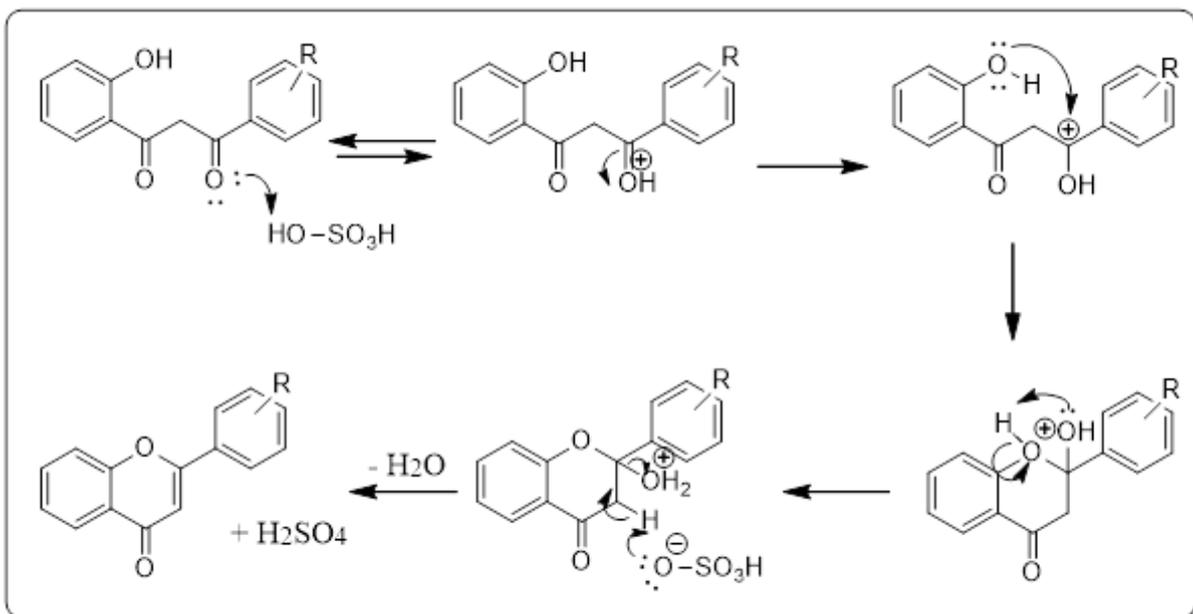
Figura 6.2 – Proposta de mecanismo para a etapa II



Fonte: Elaborado pela autora

A seguir, a β -dicetona é transformada em flavona (etapa III) através de uma reação de condensação, utilizando o ácido sulfúrico concentrado como catalisador (Figura 6.3).

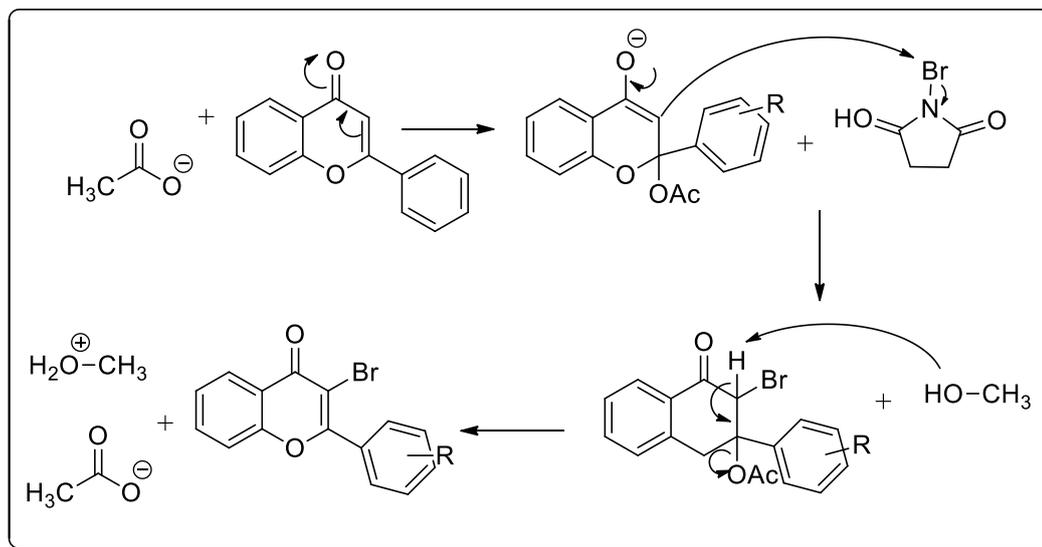
Figura 6.3 – Proposta de mecanismo para a etapa III



Fonte: Elaborado pela autora

Por fim a flavona é transformada em 3-bromo flavona (Figura 6.4) por uma reação com N-bromo succinamida (etapa IV), a fonte de bromo que foi utilizada, seguida de eliminação do grupamento acetato pela exposição ao metanol (etapa V).

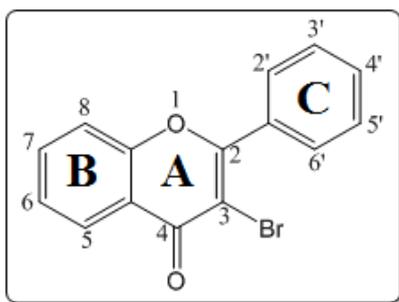
Figura 6.4 – Proposta de mecanismo para as etapas IV e V



Fonte: Elaborado pela autora

Foi desenvolvido nesse trabalho, a síntese de 3-bromo flavonas (Figura 6.5) a partir de flavonas.

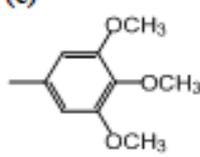
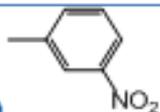
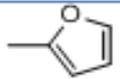
Figura 6.5 – Representação geral das 3-Bromo Flavonas sintetizadas



Fonte: Elaborado pela autora

Dessa forma foi possível variar os substituintes do anel C, introduzido pelo uso do cloreto de benzoíla apropriado na primeira etapa de reação. Foi utilizado, nesse trabalho, cinco cloretos de benzoíla distintos e um cloreto de furanoíla, para a obtenção de flavonas e 3-bromo flavonas substituídas (Tabela 1).

Tabela 1 – Rendimentos obtidos em cada etapa de reação com os diversos substituintes

C	Rendimento de cada etapa (%)				
	I	II	III	IV	V
(a) 	62	80	61	70	10
(b) 	96	93,7	52,3	63,4	77,9
(c) 	95	32,7	90,1	--	--
(d) 	96	95	17,8	--	--
(e) 	95	45,5	59	73,5	25,9
(f) 	96	96,5	70,9	--	--

Fonte: Elaborada pela autora

Neste experimento não foi possível obter a 3-bromo flavona proveniente dos Cloretos de furanoíla (f), 3-nitrobenzoíla (d) e 3,4,5-trimetoxilbenzoíla (c) com a rota sintética proposta. Isso ocorreu, provavelmente, em função da influência dos substituintes no anel e, conseqüentemente, na ativação do sítio reacional, seja pela desativação exacerbada do anel aromático, ou mesmo por impedimento estérico. Isso fica ainda mais claro quando analisamos os rendimentos (Tabela 2), que variam significativamente ao final da etapa V, apesar das mesmas condições de reação.

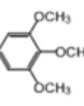
A flavona substituída com cloro em C4', por exemplo, teve um rendimento expressivo, possivelmente porque o cloro atuou como um agente desativador do anel aromático, propiciando um sítio reacional adequado à substituição do Hidrogênio pelo Bromo nas condições propostas. As flavonas não substituída e substituída por CH₃, porém, apesar da bromação ter ocorrido, obtiveram rendimentos não expressivos. Dessa forma é claro que o substituinte tem papel importante na etapa de formação de 3-bromo flavona.

6.2. Caracterização das moléculas

6.2.1. Ponto de Fusão

Para confirmação das moléculas obtidas nas etapas 3 e 5, foi realizado a medida dos pontos de fusão e estes foram comparados aos de literatura (Tabela 3) a partir da base de dados acessados no site Reaxys | Elsevier.

Tabela 2 – Pontos de fusão obtidos nas etapas III e V de reação com os diversos substituintes

C	PF – Etapa III	PF - Literatura	PF – Etapa V	PF - Literatura
(a) 	96-97°C	P.F 95-97°C Lit. (WHEELER, T. S., 1963)	110-115°C	P.F 125-126°C Lit. (BIRD, T. G. C. <i>et al</i> , 1983)
(b) 	182,5-185°C	P.F 186-187°C Lit. (DAS, J.; GHOSH, S., 2011)	185-187°C	P.F. 179 - 180 °C lit. (Rho, Ho Sik; Ko, Byoung-Seob; Kim, Ho Kyoung; Ju, Young-Sung, 2002)
(c) 	177-179°C	P.F 173-174°C Lit. (VIMAL, M. <i>et al</i> . Heterocyclic communication 2010, vol. 16(2-3), pg. 151-154)	-	-
(d) 	193-195°C	P.F 194-197°C Lit. (Naik, Mayuri M.; Tilve, Santosh G.; Kamat, Vijayendra P., 2014)	-	-
(e) 	106-109 °C	P.F 106-107 °C Lit. (Ganguly, Nemaí C.; Chandra, Sumanta; Barik, Sujoy Kumar, 2013)	170-172,5 °C	P.F 165 - 167 °C Lit. (Joo, Yung Hyup; Kim, Jin Kwan, 1998)
(f) 	135-137°C	P.F 134-138°C Lit. (Tetrahedron Letters, 2012, vol. 53(18), pg. 2355)	-	-

Fonte: Elaborada pela autora

6.2.2. Ressonância Magnética Nuclear

Para caracterização das moléculas obtidas, foi utilizado técnicas de análise orgânica. Abaixo, estão alguns espectros representativos de ^1H e ^{13}C RMN da flavona como intermediário e da 3-bromo flavona como produto final. Os espectros de todos os produtos, flavonas e 3-bromo flavonas, estão exibidos nos apêndices.

Analisando o espectro de RMN de ^1H do 2-(p-toluil)-cromen-4-ona (Apêndice A), o sinal de hidrogênio na região 2-3 ppm representa os 3H referentes ao grupo metil existente na posição *para* do anel C. Enquanto que os outros H representados, na região de 6,5-8,5 ppm, são os presentes nos anéis aromáticos que totalizam 7 sinais de hidrogênios diferentes de um total de 9 hidrogênios aromáticos.

Além de a representação do espectro RMN de ^1H , o espectro de ^{13}C (Apêndice A) mostra 14 sinais, o que corresponde à quantidade de C diferentes presentes na estrutura correspondente. Os resultados obtidos a partir da análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram suficientes para provar a ocorrência da mudança química, principalmente pela ausência do sinal de hidrogênio correspondente ao ligado à C3 (6.87 ppm) no espectro demonstrado pela flavona bromada, reafirmando a substituição do hidrogênio, nessa molécula, pelo bromo.

6.3. Ensaio citotóxico

A triagem citotóxica feita a partir de ensaio com *Artemia salina* foi realizado em triplicata nas 3-bromo flavonas substituídas (b) e (e), bem como na 3-bromo flavona simples (a) e nas flavonas que as deram origem. Foram utilizadas na análise quatro concentrações distintas (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para cada amostra e em todas elas o resultado demonstrou 100% de letalidade. Como controle positivo foi utilizado lapachol em concentrações equivalentes, enquanto o controle negativo foi feito a partir da água marinha e do solvente orgânico adequado para solubilizar a amostra, o metanol, para garantir que a morte das *Artemias* não tinha influência do solvente. O índice de letalidade foi de 100% para todos os compostos, no entanto, mesmo no controle positivo, algumas *Artemias* morreram, o que leva a um resultado inconclusivo frente à citotoxicidade das moléculas sintetizadas.

7. CONCLUSÕES

Foi observado através da rota sintética demonstrada, que é uma rota eficaz para a obtenção de flavonas, mas não totalmente eficaz para a obtenção das 3-bromo flavonas, resultando em baixos rendimentos e encontrando dificuldades para a inserção do bromo em alguns análogos de flavonas. Foi possível confirmar os produtos obtidos através de técnicas espectroscópicas como RMN de ^{13}C e ^1H e pelo ponto de fusão comparativamente à literatura.

Os resultados do ensaio preliminar de citotoxicidade com Artemias das 3-bromo flavonas analisadas, **(a)**, **(b)** e **(e)**, foi inconclusivo. O solvente orgânico utilizado para solubilizar as 3-bromo flavonas pode ter influenciado no índice de letalidade de 100%, uma vez que o controle negativo também apresentou morte das artemias.

Esse trabalho foi de extrema importância na formação enquanto farmacêutica, antes de tudo pela interdisciplinaridade utilizada. Muitas disciplinas do decorrer do curso se entrelaçaram nesse projeto, não só a química orgânica e a análise orgânica, mas também disciplinas específicas da área, como a química farmacêutica e a farmacognosia.

Não só isso, mas a oportunidade de desenvolver na prática conhecimentos teóricos, planejando o experimento, a rota de síntese, pesquisando rotas em detrimento da disponibilidade de reagentes do laboratório de pesquisa, adequando etapas, e tendo efetivamente essa experiência de bancada foi de suma importância na formação, visto que é um diferencial frente a muitos outros profissionais.

Finalmente, a oportunidade de desenvolver esse projeto e levar a síntese orgânica até uma etapa de avaliação biológica foi gratificante, ver o resultado do esforço e interpretar como e porque as reações aconteciam com o embasamento teórico e a visão da prática com certeza será um conhecimento muito bem utilizado na vida profissional e mesmo na pessoal uma vez que a química, acima de tudo, sempre foi um ótimo desafio.

8. REFERÊNCIAS

ARCANJO, DDR. et al. Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. *Braz. J. Biol.* [online]. 2012, vol.72, n.3, pp. 505-509.

BIRD, T. Geoffrey C.; BROWN, Ben R.; STUART, Ian A.; TYRRELL, A. William R.; Reactions of Flav-2-enes and Flav-2-em-4-ones (Flavones), *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions I*, 1983, p. 1831-1846.

COTELLE, Nicole; BERNIER, Jean-Luc; CATTEAU, Jean-Pierre; POMMERY, Jean; WALLET, Jean-Claude; GAYDOU, Emily M.; Antioxidant properties of hydroxy-flavones, *Free Radical Biology and Medicine*, Volume 20, Ed. 1, 1996, p. 35-43.

HARBONE, Jeffrey B; WILLIAMS, Christine A. Advances in flavonoid research since 1992, *Phytochemistry*, Volume 55, Ed. 6, 2000, p. 481-504.

HAVSTEEN, B., Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency, *Biochemical Pharmacology*, Volume 32, No 7, 1983, p. 1141-1148.

HYUN, J; WOO, Y.; HWANG, D.; JO, G.; EOM, S.; LEE, Y.; PARK, J.C. LIM, Y., Relationships between structures of hydroxyflavones and their antioxidative effects, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Volume 20, Ed. 18, 2010, p.5510-5513.

LIACUNA, Laura; MACH, Nuria, Papel de los antioxidantes en la prevención del cáncer, *Revista Española de Nutrición Humana y Dietética*, Volume 16, Ed. 1, 2012, p. 16-24.

MAITI, Gouhari; KARMAKAR, Rajiv; BHATTACHARYA, Rudraksha N.; KAYAL, Utpal. A novel one pot route to flavones under dual catalysis, an organo- and a Lewis acid catalyst, *Tetrahedron Letters*, Volume 52, Ed. 43, 2011, p. 5610-5612.

MARDE, Mariel; ZINCZUV, Juan; COLOMBO, María I.; WASOWSKI, Cristina; VIOLA, Haydee; WOLFMAN, Claudia; MEDINA, Jorge H.; RÚVEDA, Edmundo A.; PALADINI,

Alejandro C.; Synthesis of halogenated/nitrated flavone derivatives and evaluation of their affinity for the central benzodiazepine receptor, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Volume 7, Ed. 15, 1997, p. 2003-2008.

MAYORGA, Pablo; PEREZ, Karen R.; CRUZ, Sully M. and CACERES, Armando. Comparison of bioassays using the anostracan crustaceans *Artemia salina* and *Thamnocephalus platyurus* for plant extract toxicity screening. *Rev. bras. farmacogn.* [online]. 2010, vol.20, n.6, pp. 897-903.

MUGHAL, Ehsan Ullah; AYAZ, Muhammad; HUSSAIN, Zakir; HASAN, Aurangzeb; SADIG, Amina; RIAZ, Muhammad; MALIK, Abdul; HUSSAIN, Samreen; CHOUDHARY, M. Iqbal; Synthesis and antibacterial activity of substituted flavones, 4-thioflavones and 4-iminoflavones, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Volume 14, 2006, p. 4704-4711.

NAGAO, Tsuneatsu; AEE, Fumiko; KINJO, Junei; OKABE, Hikaru; Antiproliferative Constituents in Plants 10. Flavones from the Leaves of *Lantana montevidensis* BRIQ. and Consideration of Structure–Activity Relationship, *Biol. Pharm. Bull.* Volume 25. 2002, p. 875-879.

REAXYS | ELSEVIER, Chemistry data and chemical literatura. Disponível em: <www.elsevier.com/solutions/reaxys>, acessado em 16 dez 2017.

SARDA, Swapnil R.; PATHAN, Mohsin Y.; PAIKE, Vijaykumar V.; PACHMASE, Pandurang R.; JADHAV, Wamanrao N.; PAWAR, Rajendra P.; A facile synthesis of flavones using recyclable ionic liquid under microwave irradiation; *Arkivoc*, Volume 16, Ed. 4, 2006, p. 43-48.

SASHIDHARA, Koneni V.; KUMAR, Manoj; KUMAR, Abdhesh. A novel route to synthesis of flavones from salicylaldehyde and acetophenone derivatives, *Tetrahedron Letters*, Volume 53, Volume 18, 2012, p. 2355-2359.

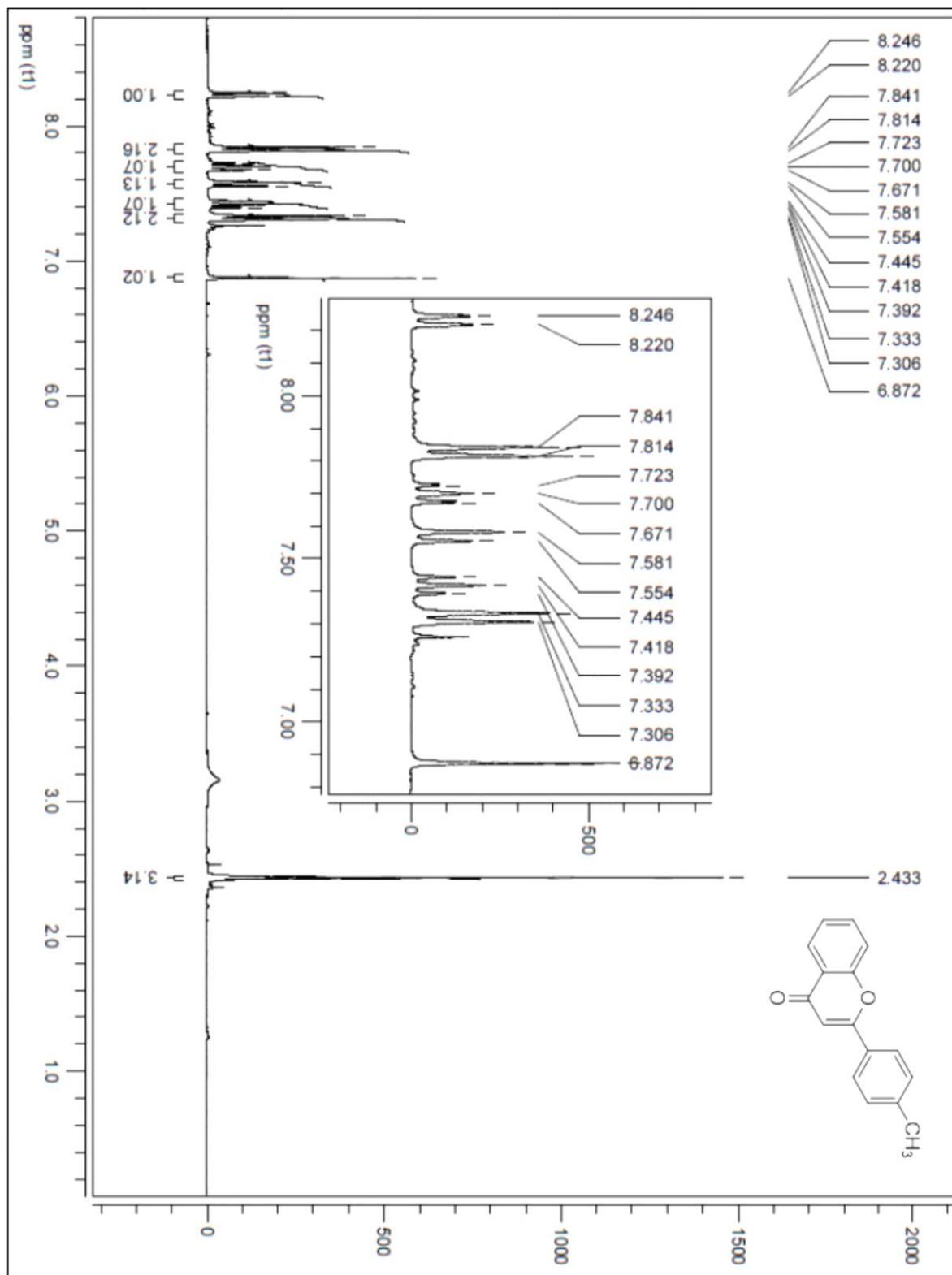
SINGH, Manjinder; KAUR, Maninder; SILAKARI, Om. Flavones: An important scaffold for medicinal chemistry, *European Journal of Medicinal Chemistry*, Volume 84, 2014, p. 206-239.

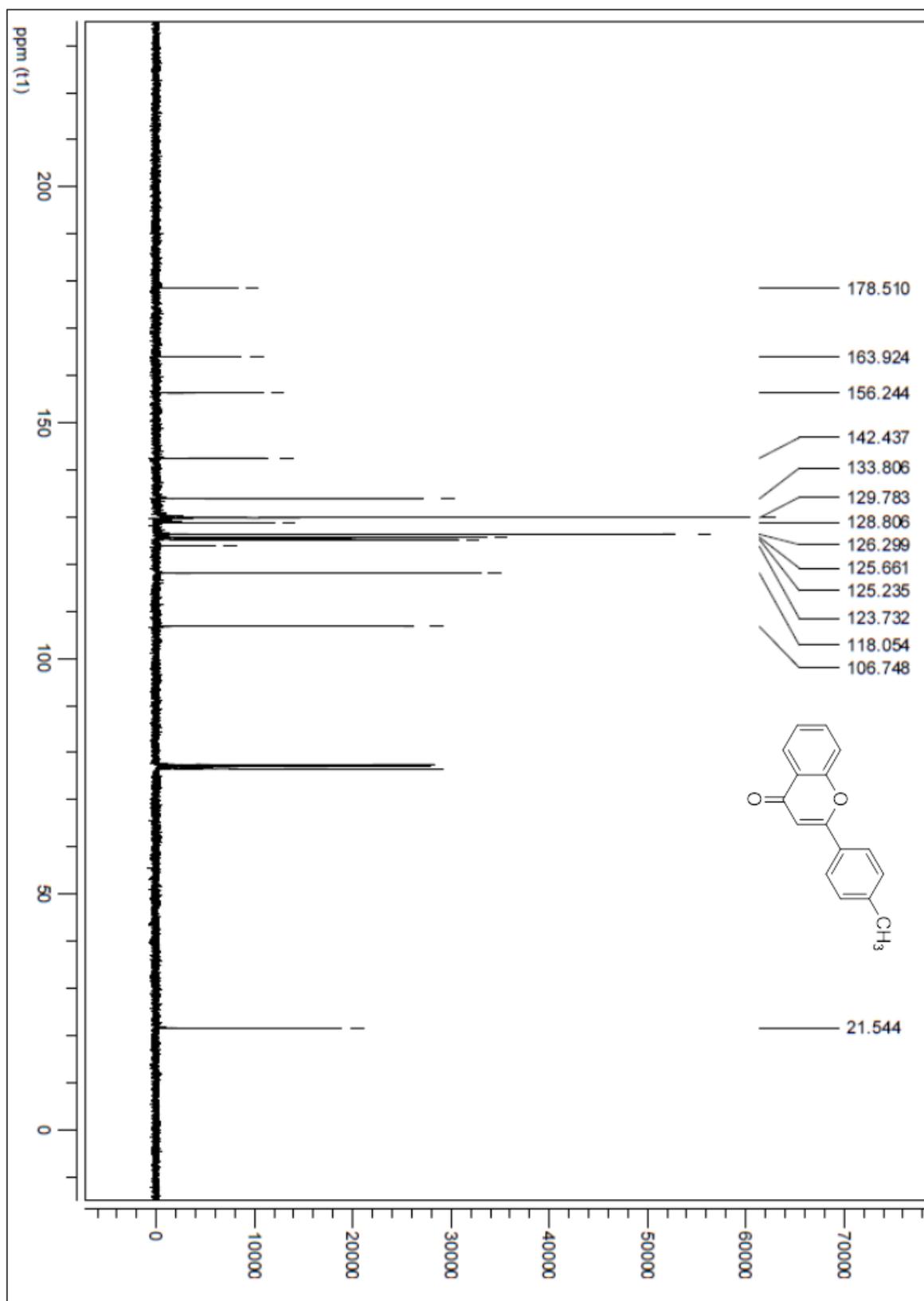
SIQUEIRA, João M de et al. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* - Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* leach. *Quím. Nova* [online]. 1998, vol.21, n.5, pp. 557-559.

TUNDIS, Rosa; DEGUIN, Brigitte; LOIZZO, Monica R.; BONESI, Marco; STATTI, Giancarlo A.; TILLEQUIN, François; MENICHINI, Francesco; Potential antitumor agents: Flavones and their derivatives from *Linaria reflexa* Desf., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Volume 15, Ed. 21, 2005, p. 4757-4760.

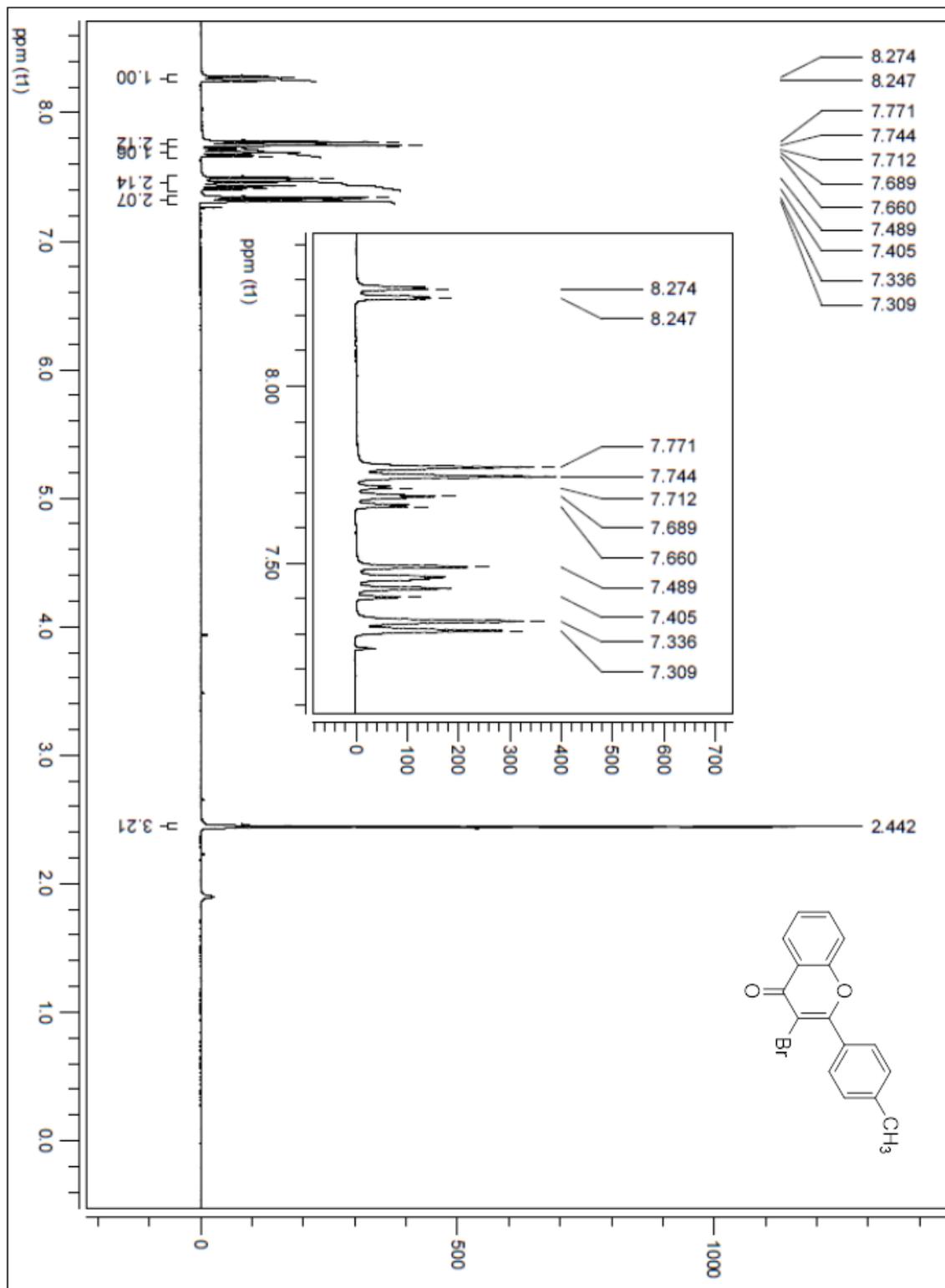
VERMA, A. K.; PRATAP, R.; The biological potencial of flavones; *Nat. Prod. Rep.*, Volume 20, 2010, p. 1571 -1593.

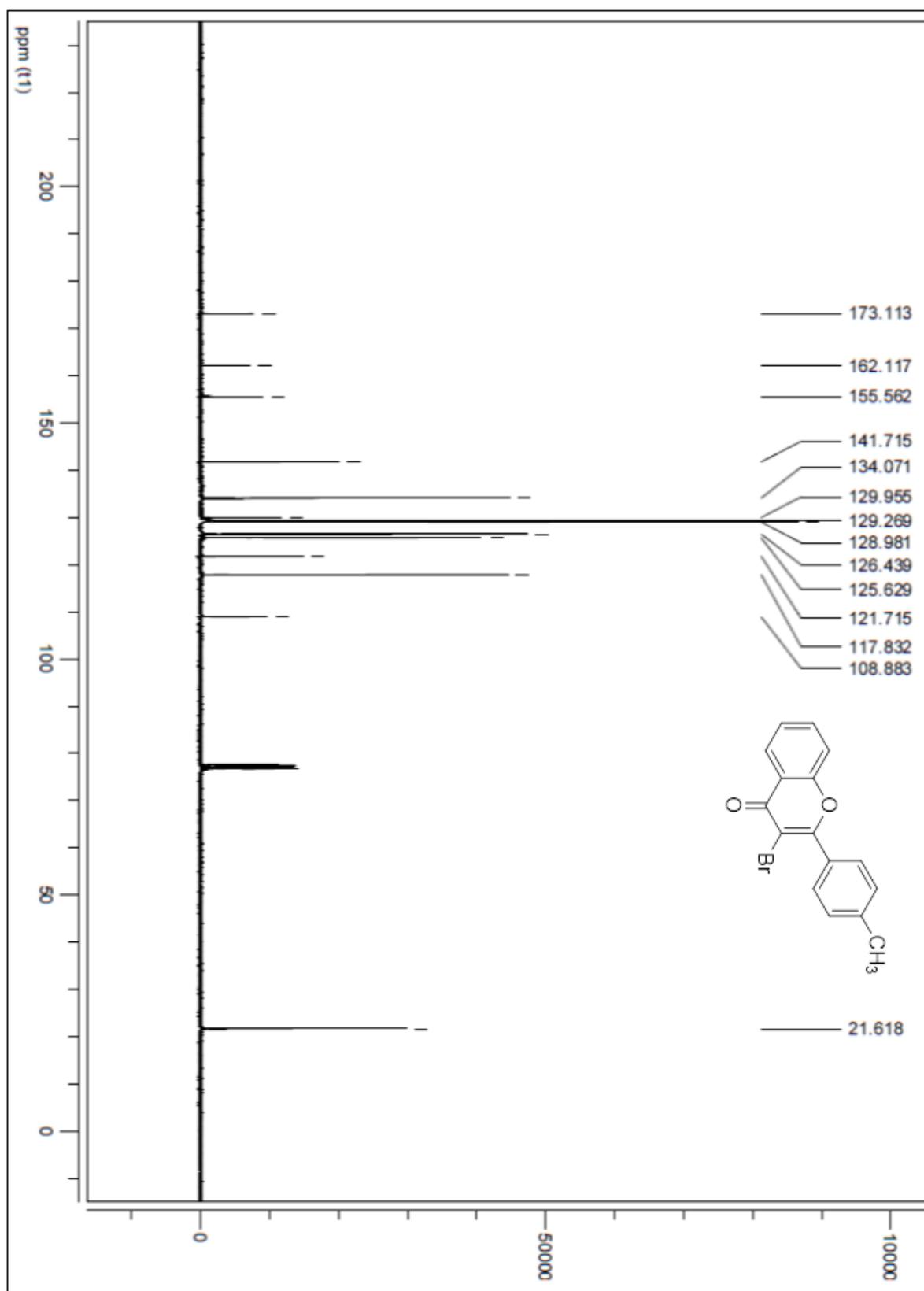
APÊNDICE A - Espectros RMN ^{13}C e ^1H do 2-(p-toluil)-cromen-4-ona



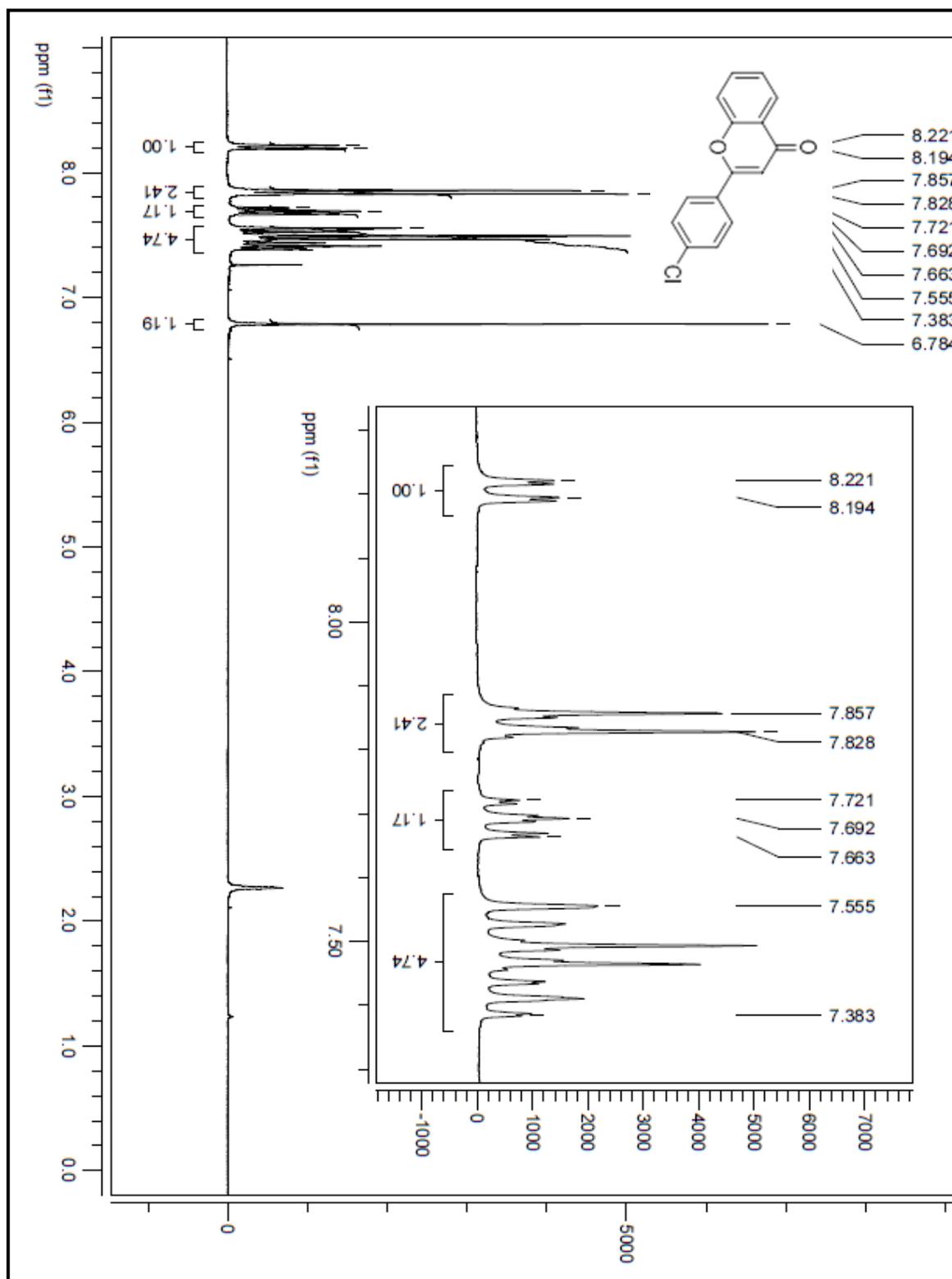


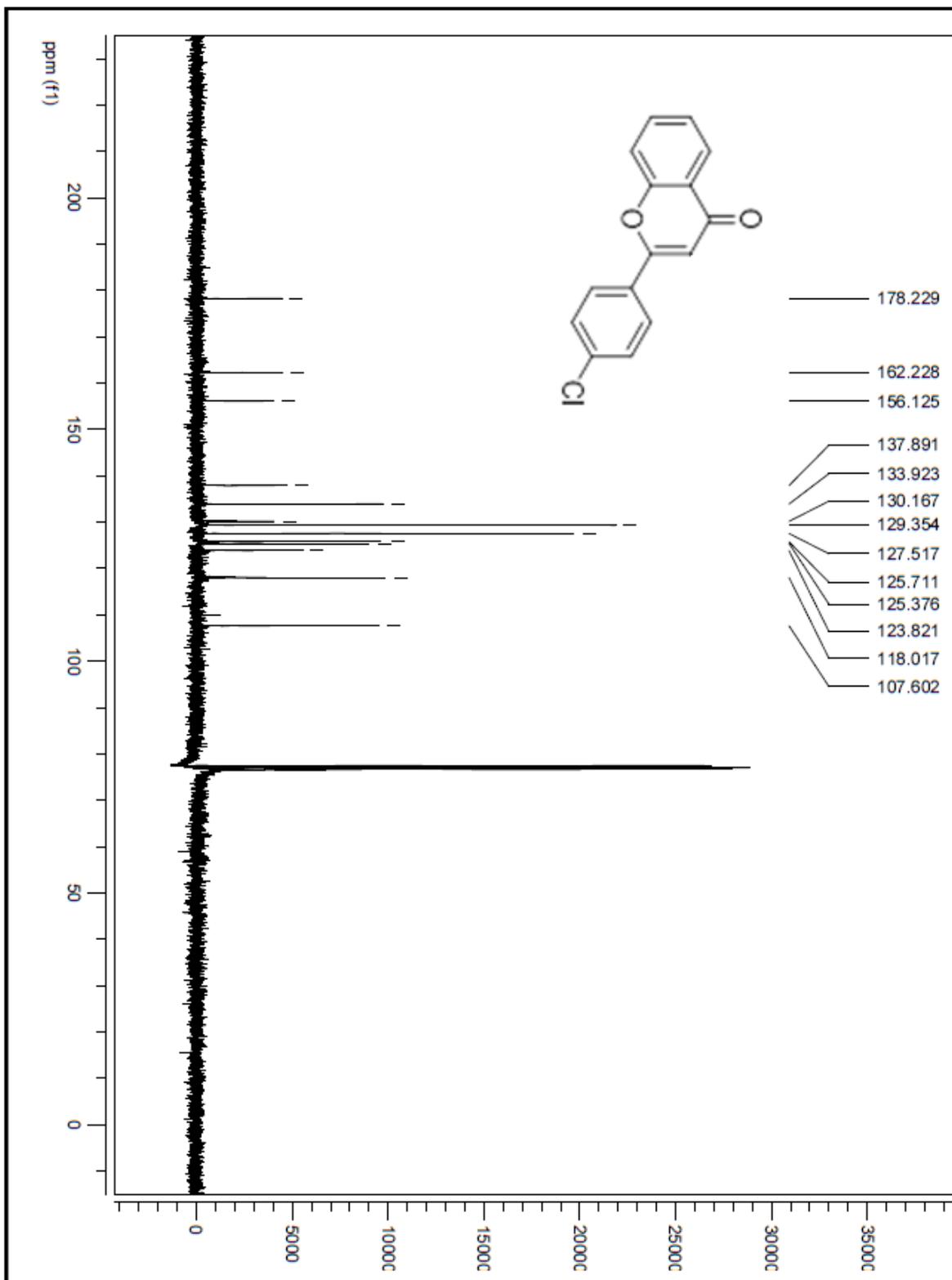
APÊNDICE B - Espectros RMN ^{13}C e ^1H e IV do 2-(4-Cloro-fenil)-cromen-4-ona



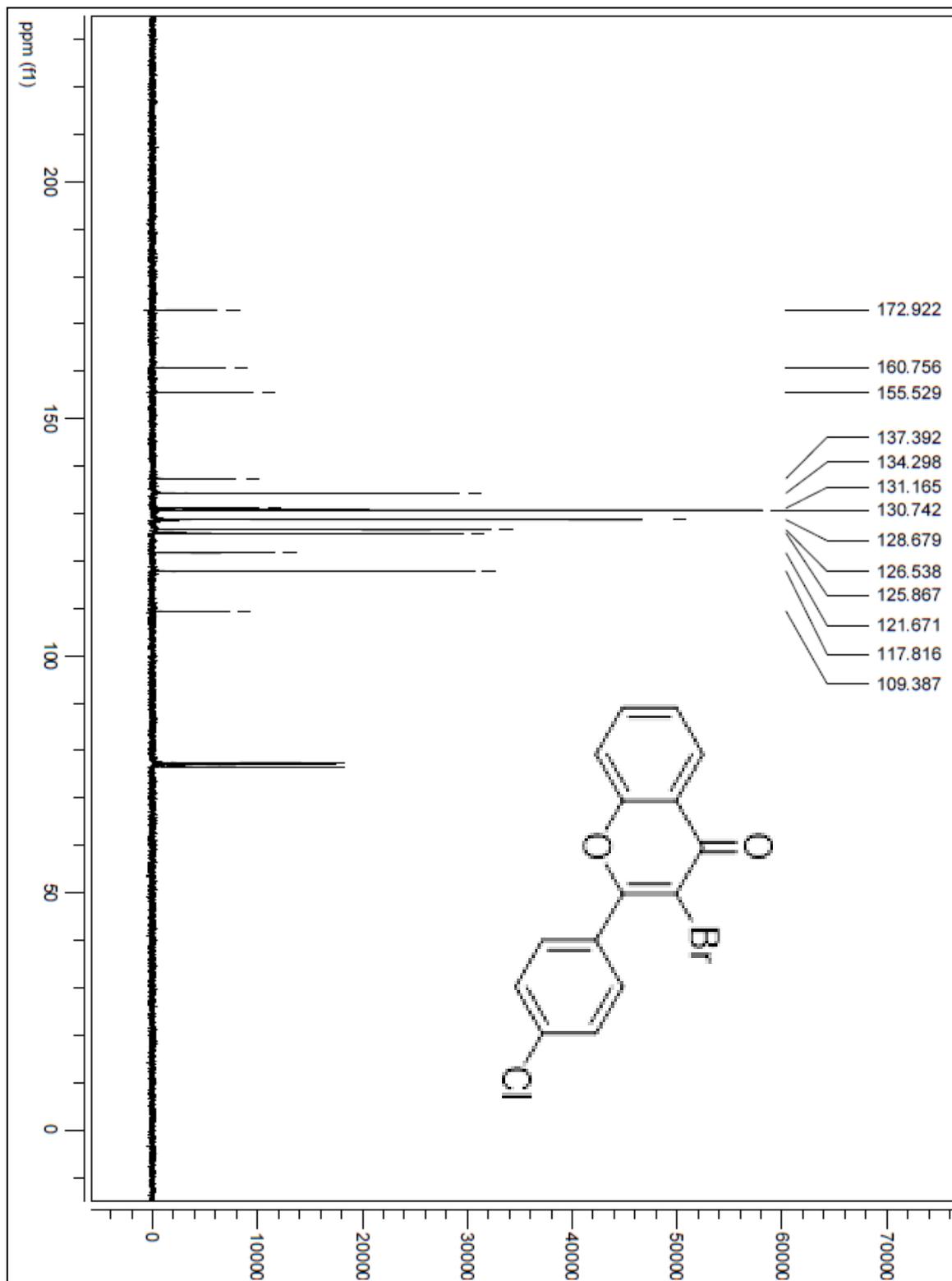


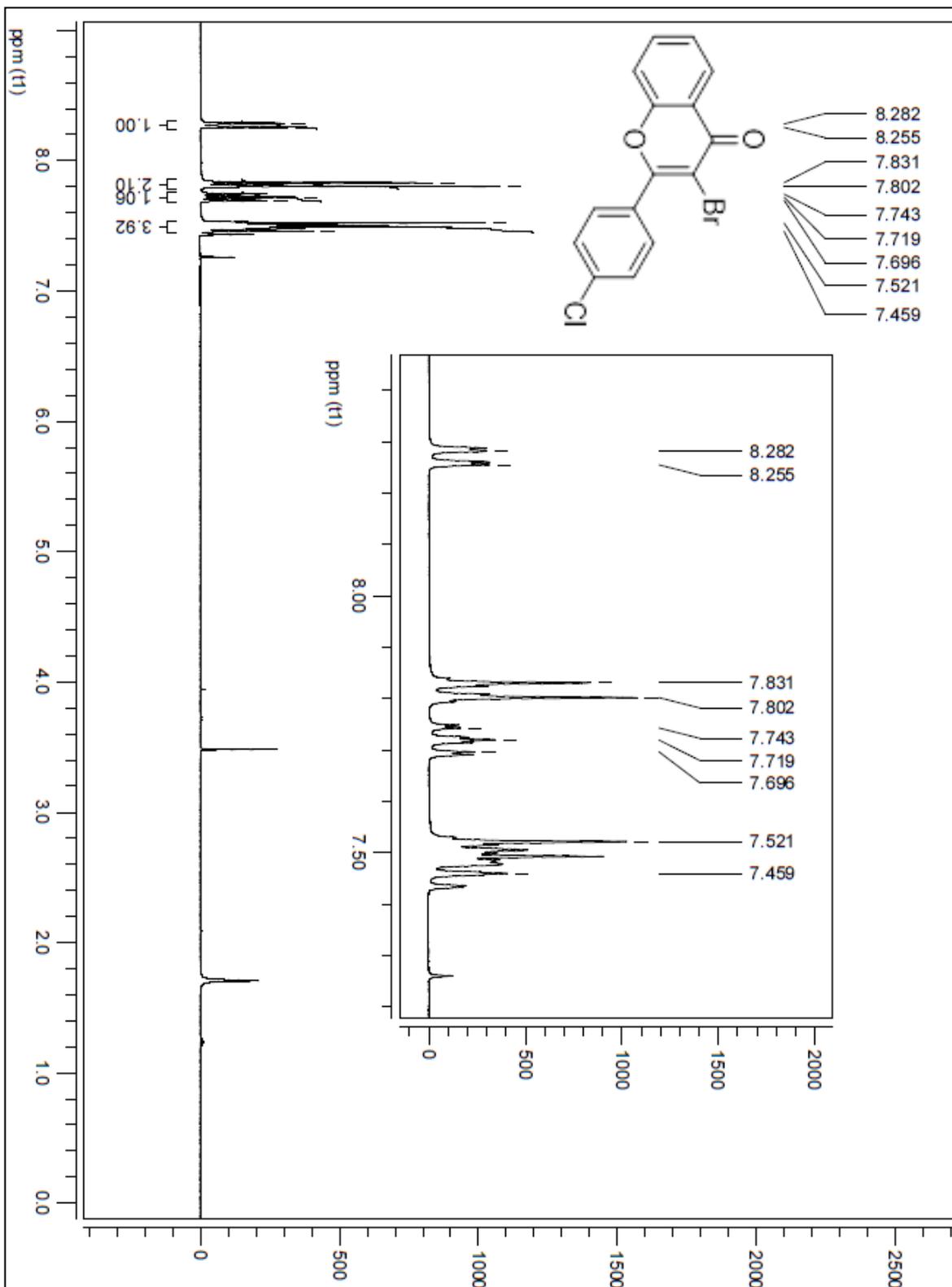
APÊNDICE C - Espectros RMN ^{13}C e ^1H e IV do 2-(4-Cloro-fenil)-cromen-4-ona



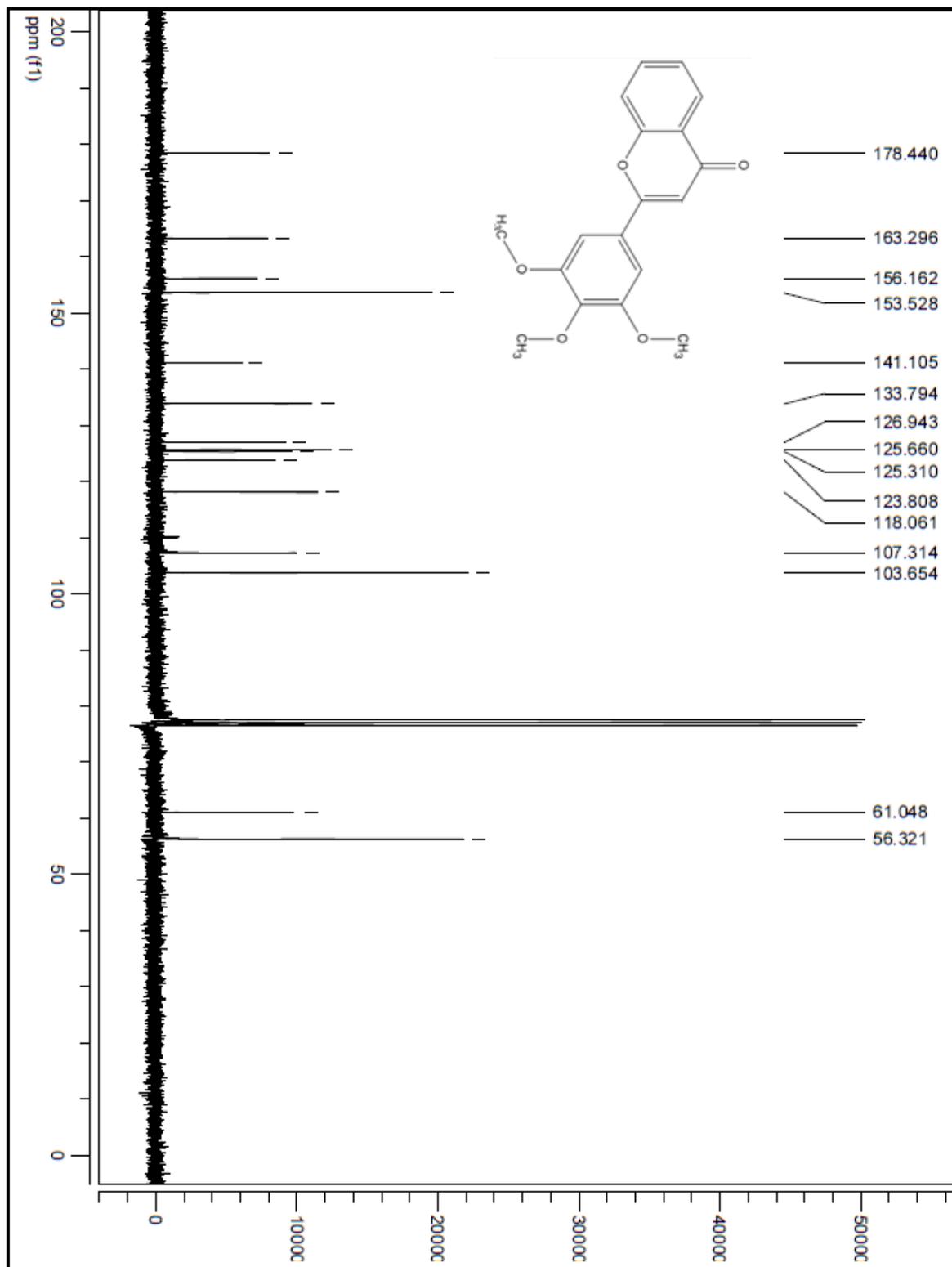


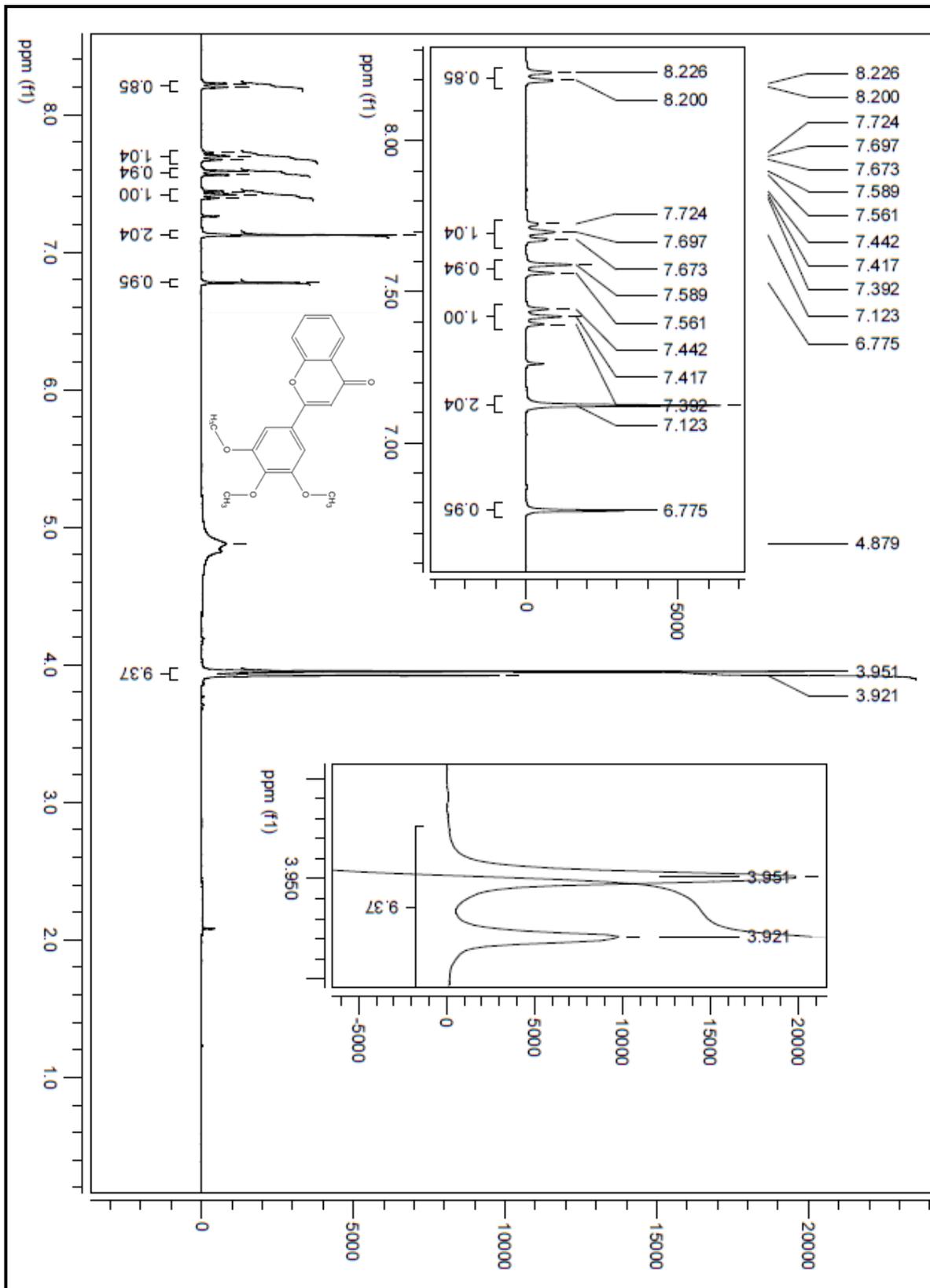
APÊNDICE D - Espectros RMN ^{13}C e ^1H do 3-Bromo 2-(4-Cloro-fenil)-cromen-4-ona



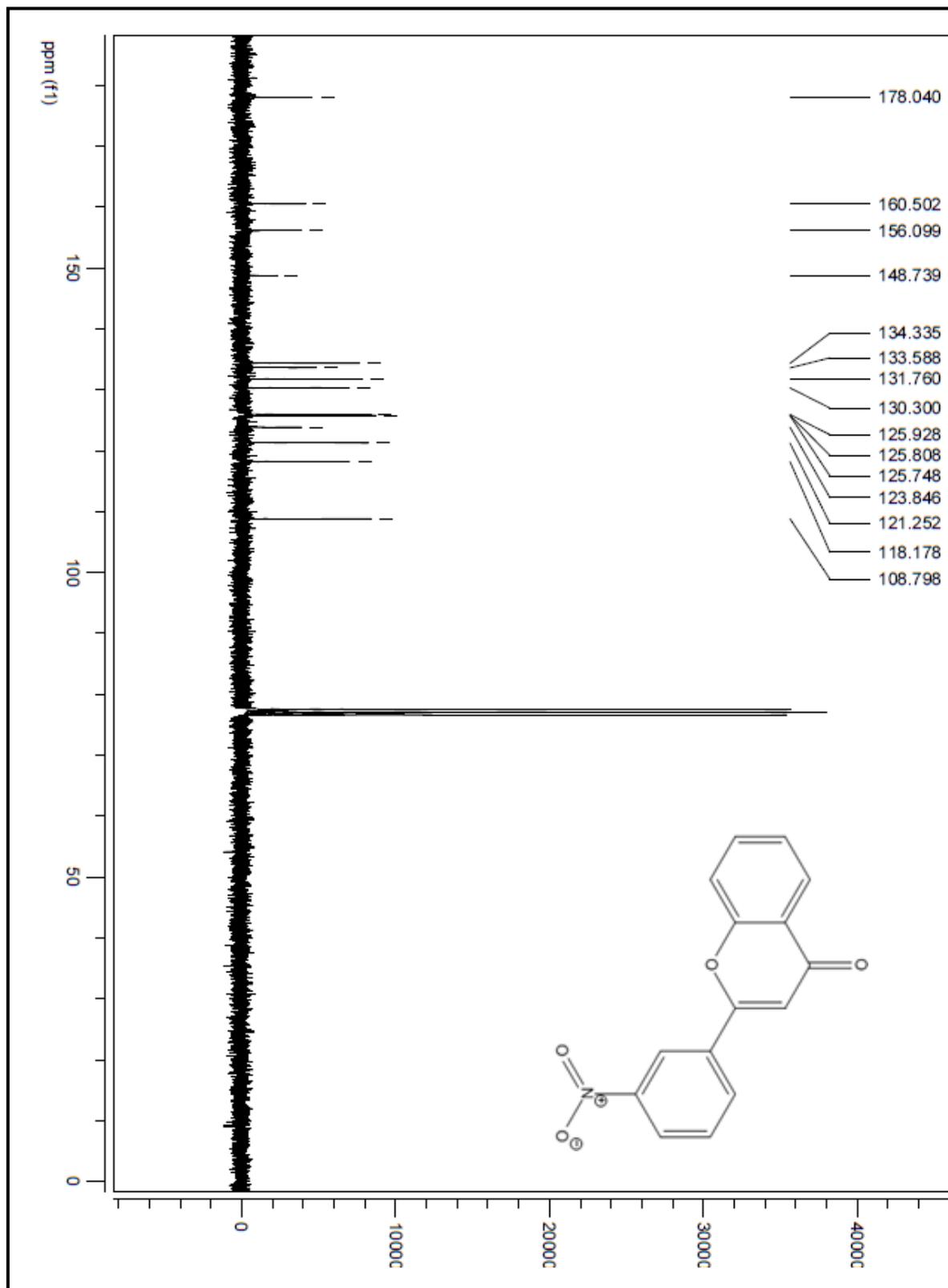


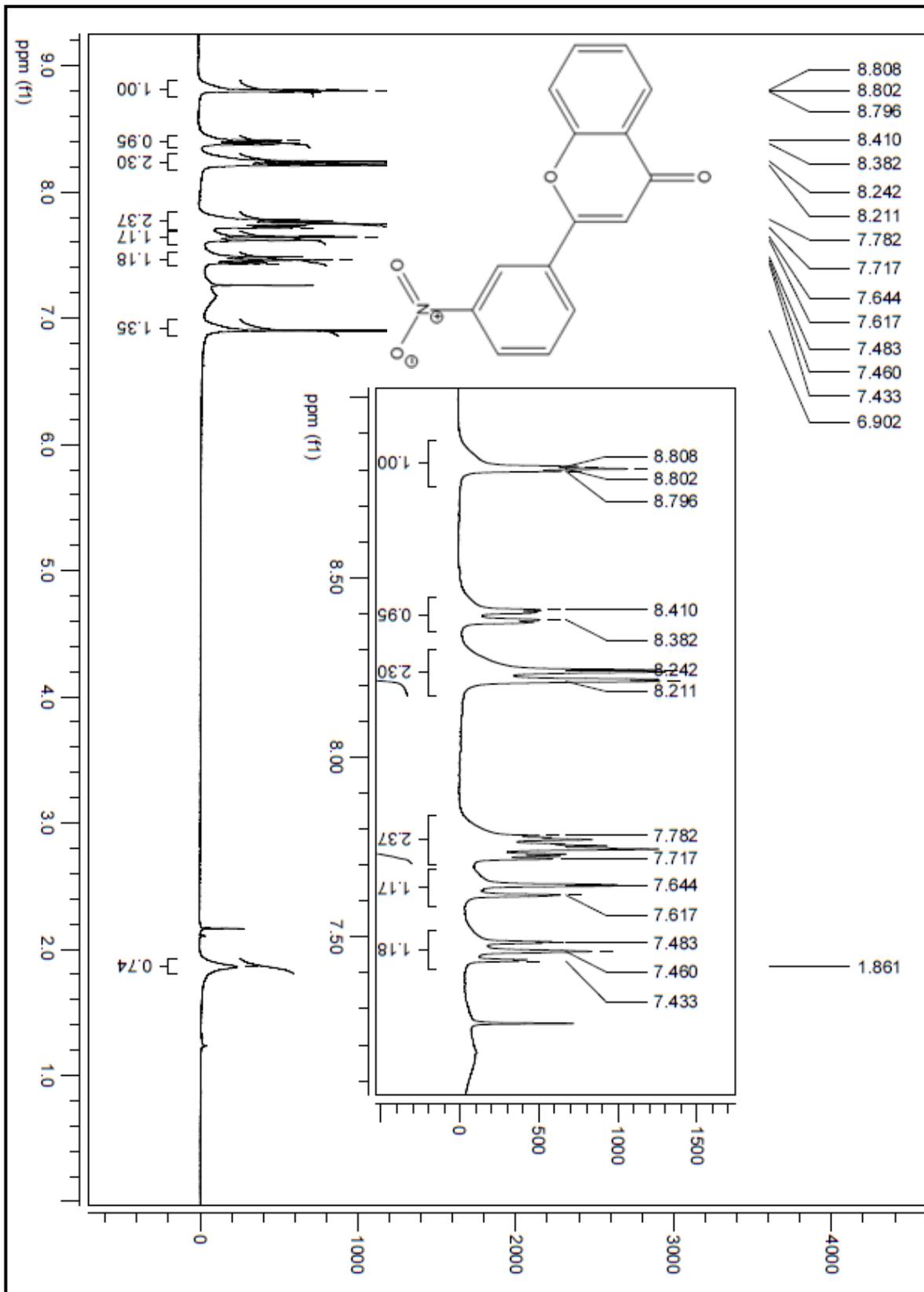
APÊNDICE E - Espectros RMN ^{13}C e ^1H do 2-(3,4,5-Trimetoxi-fenil)-cromen-4-ona



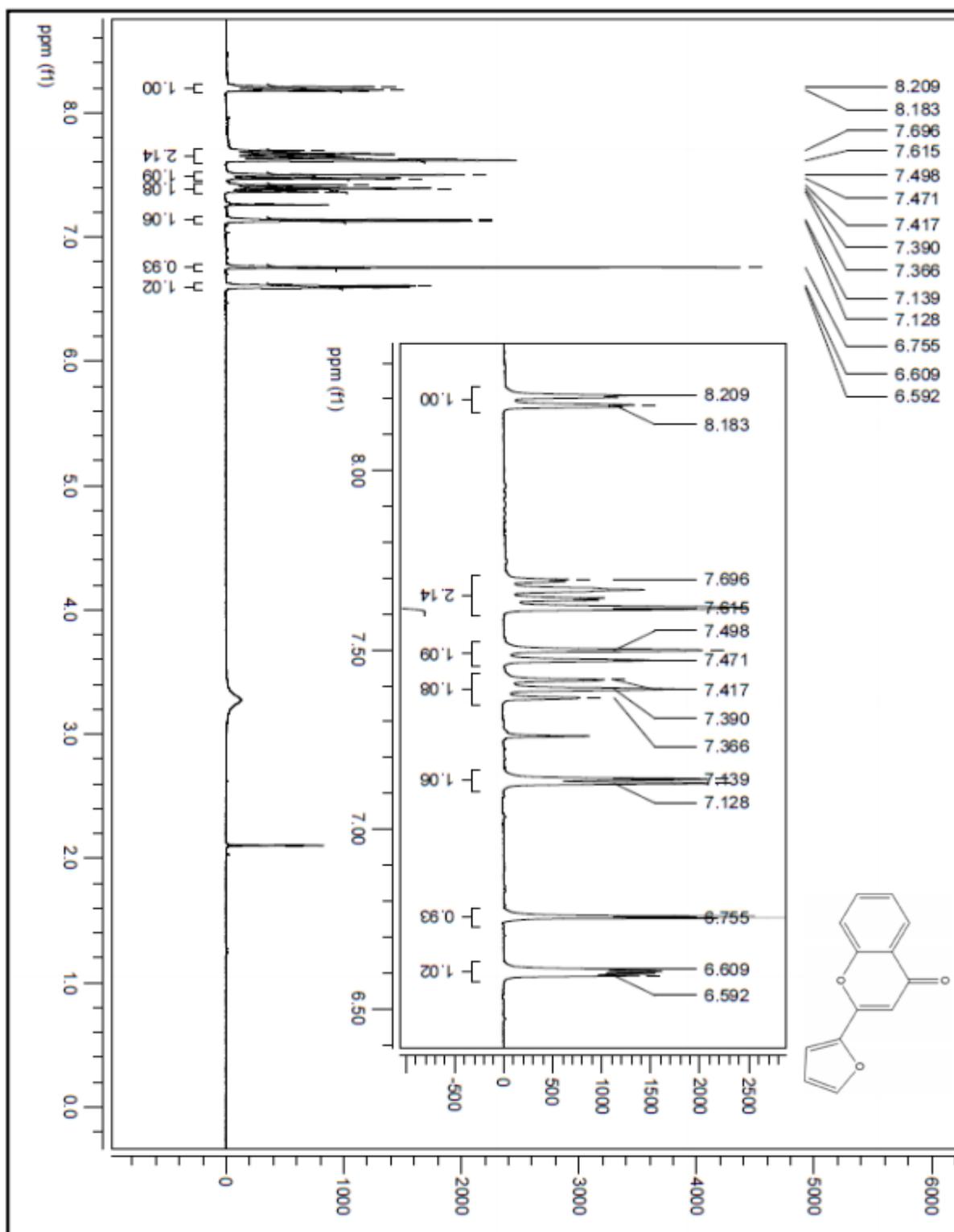


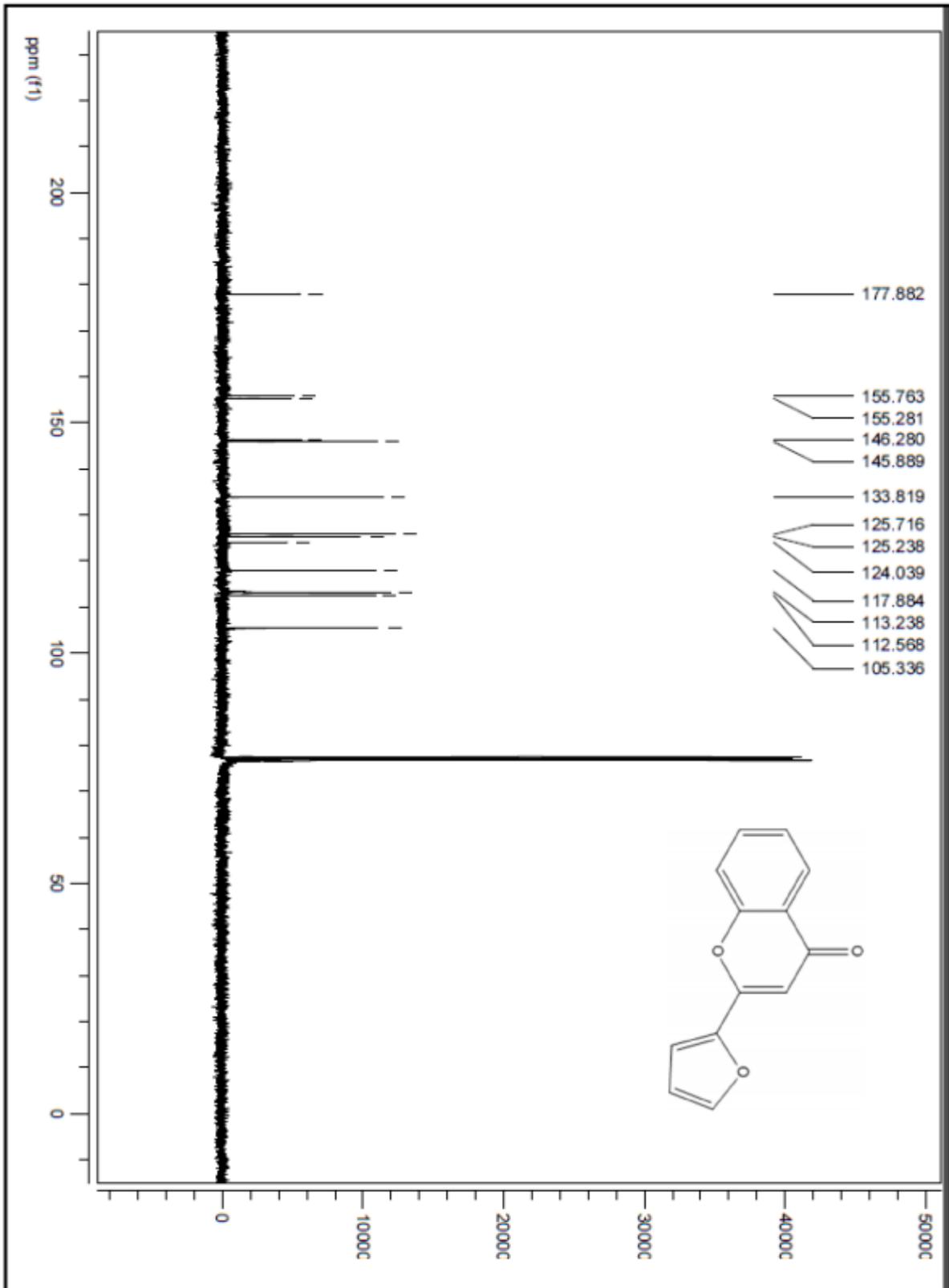
APÊNDICE F - Espectros RMN 13C e 1H do 2-(3-Nitro-fenil)-cromen-4-ona.





APÊNDICE G – Espectros RMN ^{13}C e ^1H e IV 2-Furan-2-il-cromen-4-ona







MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Escola de Farmácia

ATESTADO DE CORREÇÃO

Atesto que **VANESSA DANIELE ZACARIAS**, matrícula 11.2.2085 realizou todas as correções exigidas pela Banca examinadora no manuscrito do Trabalho de Conclusão de Curso: **SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO CITOTÓXICA DE 3-BROMO FLAVONAS**.

Ouro Preto, 20 de dezembro de 2017.

Prof. Dr. JASON GUY TAYLOR
Orientador - DEQUI-ICEB-UFOP