SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE A ARTEMIA SALINA DE GLICOSÍDEOS 2,3-INSATURADOS

SYNTHESIS, CHARACTERIZATION, AND EVALUATION OF TOXICITY AGAINST SALINE ARTEMIA OF 2,3-UNSATURATED GLYCOSIDES

DA SILVA, Edilma Elayne¹; BARBOSA, Maria Verônica de Sales¹; DE FREITAS, Jucleiton José Rufino³; FREITAS, Jucarlos Rufino², DE FREITAS FILHO, João Rufino^{1*}.

¹ Departamento de Química, Universidade Federal de Rural de Pernambuco. Brasil.

² Programa de Biometria e Estatística Aplicada, Universidade Federal de Rural de Pernambuco. Brasil.

³ Unidade Acadêmica do Cabo de Santo Agostinho (UACSA)/UFRPE. Brasil

* Autor correspondente

e-mail: joaoveronice@yahoo.com.br

Received 16 September 2020; received in revised form 29 October 2020; accepted 11 November 2020

RESUMO

Na química dos carboidratos, o O-glicosídeo 2,3-insaturados é uma molécula orgânica na qual a unidade sacarídica está ligado a outro grupo funcional por meio de uma ligação glicosídica. Derivados de carboidratos insaturados são intermediários úteis em transformações sintéticas que levam a uma variedade de compostos. O uso de glicosídeos 2,3-insaturados na glicosilação cresceu exponencialmente durante a última década. Por outro lado, existe pouco trabalho na literatura que descreve a síntese e atividade biológica de O-glicosídeo 2,3-insaturado contendo os 1,2,4-oxadiazóis como aglicona. Mediante o exposto, o objetivo do trabalho é sintetizar, caracterizar e avaliar a sua toxicidade utilizando *Artemia salina* Leach. Inicialmente preparou-se os precursores, o tri-O-acetil-D-glicol (7) e os 1,2,4-oxadiazóis racêmicos (6a/b). Em seguida, a reação entre o tri-O-acetil-D-glicol (7) e os álcoois (R,S)-3-aryl-[1,2,4-oxadiazol-5-yl]-propan-2-ol (6a/b) foi realizada utilizando como catalisador a montmorillonita K-10 em diclorometano seco, sob refluxo na temperatura de 45°C, fornecendo os compostos (8a/b) em excelente rendimentos (96% composto 8a e 93% composto 8b). Os compostos (8a/b) sintetizados foram caracterizados com base nas análises dos dados espectroscópicos de IV e RMN ¹H e ¹³C e posteriormente submetidos a bioensaios de toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* Leach. Com as atividades citotóxicas constataram-se que o percentual de mortalidade variou de 75-100% em todas as concentrações, o que demonstra que os compostos apresentam potenciais para testes em outros bioensaios. A DL₅₀ é observada em 77,21 (composto 8a) e 74,09 (composto 8b). Esses resultados podem contribuir para o aprofundamento do conhecimento sobre os potenciais farmacológicos e podem ser utilizados em estudos de modificação estrutural por serem possíveis pró-drogas.

Palavras-chave: Carboidratos, Glicol, Citotoxicidade, 1,2,4-Oxidazol, Bioensaio.

ABSTRACT

In the chemistry of carbohydrates, the 2,3-unsaturated O-glycoside is an organic molecule in which the saccharide unit is linked to another functional group through a glycosidic bond. Unsaturated carbohydrate derivatives are useful intermediates in synthetic transformations leading to a variety of compounds. The use of 2,3-unsaturated glycosides in glycosylation has grown exponentially during the last decade. On the other hand, there is little work in the literature that describes the synthesis and biological activity of 2,3-unsaturated O-glycoside containing the 1,2,4-oxadiazoles as aglycone. Therefore, the objective of the work is to synthesize, characterize, and evaluate its toxicity using *Artemia salina*. Initially, precursors, tri-O-acetyl-D-glicol (7), and racemic 1,2,4-oxadiazoles (6a/b) were prepared. Then, the reaction between the tri-O-acetyl-D-glicol (7) and the alcohols (R, S)-3-aryl-[1,2,4-oxadiazol-5-yl]-propan-2-ol (6a/b) was carried out using montmorillonite K-10 in dry dichloromethane as a catalyst, under reflux at a temperature of 45 °C, providing the compounds (8a/b) in excellent yields (96% compound 8a and 93% compound 8b). Compounds 8a/b synthesized were characterized based on their IR, ¹H NMR, and ¹³C, and subsequently subjected to toxicity bioassays against the microcrustacean *Artemia salina* Leach. With cytotoxic activities, it was found that the mortality rate varied from 75-100% in all

concentrations, which demonstrates that the compounds have potential for testing in other bioassays. The LD₅₀ is observed at 77.21 (compound **8a**) and 74.09 (compound **8b**). These results can contribute to the deepening of knowledge about potential pharmacological and may be used in studies of structural modification studies to be possible pro-drugs.

Keywords: Carbohydrates, Glical, Cytotoxicity, 1,2,4-Oxidazole, Bioassay.

1. INTRODUÇÃO:

Os carboidratos, também denominados de açúcares, constituem um grupo dos mais abundante de compostos encontrados em fontes naturais, estando presentes desde os mais complexos organismos, tais como, as plantas e animais (Ferreira; Rocha; Silva, 2009), até organismos mais simples, como os animais marinhos e as bactérias de acordo com Bandera *et al.*, (2014). Na química dos carboidratos o glicosídeo é uma molécula orgânica na qual a porção sacarídica está ligado a outro grupo funcional por meio de uma ligação glicosídica. Por outro lado, os açúcares insaturados constituem uma importante categoria de precursores de carboidratos utilizados em síntese. Especificamente, os glicosídeos 1,2- e 2,3-insaturados são excelentes intermediários para derivatizar monossacarídeos e usado como blocos de construção na síntese orgânica.

Glicosídeos 2,3-insaturados, também conhecidos como pseudo-glicosídeos ou enosídeos, são uma classe importante de produtos naturais com muitas atividades biológicas e capacidade de servir como substratos para reações posteriores (Domon *et al.*, 2005; Meng *et al.*, 2007). A literatura descreve uma série de derivados de açúcar *N*-ftalimidometil 2,3-didesoxi- e 2,3-insaturados que apresentaram potente atividade antiinflamatória, por apresentar redução do edema induzido pela carragenina (Durham e Miller, 2002).

De acordo com Mohammad *et al.*, (2019) na literatura é relatado um grande número de glicosídeos (O-, N-, S e C-) com importantes atividades biológicas, a saber: atividade anti-inflamatória, antibiótica, anestésico, antitumoral, antioxidante e antitrombica. Por outro lado, para que a utilização dos glicosídeos 2,3-insaturados, para os mais diversos fins, seja colocada em prática é necessário que os mesmos possuam a ausência de efeitos tóxicos. Daí a necessidade de conhecer as condições de uso seguro dos glicosídeos 2,3-insaturados para a saúde humana e ambiental, assegurando a segurança de seu uso (Barros e Davino, 2008).

Todavia, os O-glicosídeos 2,3-insaturados são intermediários sintéticos utilizados como blocos de construção de diferentes estruturas complexas, como constituintes de diversos produtos naturais e moléculas de interesse biológico (Wang *et al.*, 2000; Popiołkiewicz *et al.*, 2005). Os glicosídeos 2,3 insaturados são obtidos pela reação de glicosidação de açúcares 1,2-insaturados com diversos aceptores, tais como, álcool, tiol, aminas, em presença de um ácido de Lewis moderado, como catalisador, promovendo um deslocamento alílico no glical (Ferrier, 2001; Gómez *et al.*, 2013).

Este tipo de reação fornece uma variedade de glicosídeos como potenciais blocos de construção para a síntese de produtos naturais com atividades biológicas promissoras (Panarese e Waters, 2009). Nos últimos anos, diversas condições foram utilizadas para facilitar este tipo de síntese em alto rendimentos e alta estereoseletividade em favor do α -anômeros. Por exemplo, o uso de diferentes catalisadores, a saber montmorilonita K-10 (Toshima *et al.*, 1995), montmorilonita K-10 dopada com FeCl₃·6H₂O (Melo *et al.*, 2015); ou mesmo diferentes procedimentos de síntese, tais como irradiação de micro-ondas sob condições sem solvente (de Oliveira, 2002), reação de Mitsunobu (Michigami e Hayashi, 2012) e outros protocolos relatados fornecendo os produtos desejados com resultados satisfatórios (Zhang *et al.*, 2008; Mukherjee e Jayaraman, 2011, Drew, Wall, Kim, 2012).

Na literatura é relatada a existência de muitos C-glicosídeo e poucos O-glicosídeos contendo o anel 1,2,4-oxadiazol na parte aglicônica, sendo eles (ribo, glico, alofuranose e 1',3'-dioxolano) (Brasileiro *et al.*, 2006; Magalhães *et al.*, 2007, Costa *et al.*, 2009). Srivastava e colaboradores relataram três trabalhos de glicosídeos 2,3-insaturados com ligação do tipo O-glicosídica (Srivastava *et al.*, 2015, dos Anjos *et al.*, 2007, Freitas Filho *et al.* 2007), no trabalho de 2004 e 2015 o monossacarídeo está ligado diretamente a porção do 1,2,4-oxadiazol, já no de 2007 apresenta um espaçador triazol entre o anel piranose e o 1,2,4-oxadiazol. Dos glico-heterocíclicos sintetizados, contendo os 1,2,4-

oxadiazóis como aglicona, alguns C-glicosídeos tiveram suas atividades biológicas testadas, como exemplo podemos citar o 5-(β -D-ribofuranozil) 1,2,4-oxadiazol-3-carboxamida. Este composto, mostrou inibição da leucemia L 1210 e P 388 em cultura celular, como também atividade antiviral dando um "Vírus Rating (V.R)" de 0,33 e 0,51 contra a Vaccinia e HSV-2, respectivamente, com muito pouco oxidase celular (Costa *et al.*, 2009).

James e colaboradores (2000), destaca que a realização de estudos toxicológicos possibilita a identificação dos riscos associados de um determinado composto e determina em quais condições de exposição esses riscos são induzidos. Anda segundo Hodgson (2004), estudos viabilizam a elaboração de medidas que protejam os seres vivos e o ambiente dos efeitos deletérios causados por esses compostos, bem como facilitam o desenvolvimento de agentes químicos nocivos mais seletivos, tais como drogas clínicas e pesticidas.

A *Artemia salina* Leach, um pequeno organismo zooplânctônico, que pertence ao filo dos artrópodes, mais especificamente ao subfilo crustáceo, que pode ser encontrado em ambientes marinhos (salinas). Devido ao fato de possuir elevada adaptabilidade e uma imensa distribuição geográfica é comumente utilizada na alimentação de diversos seres aquáticos (Ates *et al.*, 2016). A avaliação da toxicidade utilizando *A. salina* também permite a não utilização de ratos e camundongos em testes *in vivo* e pode ser utilizado como parâmetro para analisar diversas atividades biológicas, a citar a atividade antioxidante (Saraiva *et al.*, 2011), atividade fototóxica (Ojala *et al.*, 1999), atividade larvívora (Luna *et al.*, 2005), atividade citotóxica (Chohan *et al.*, 2010), entre outras, relevantes (Bagheri *et al.*, 2010; Nino; Correa e Mosquera, 2006). Então, avaliação da atividade citotóxica utilizando *Artemia salina* Leach, destaca-se no meio científico pela eficiência e eficácia trazendo a vantagem de ser um procedimento prático, de fácil e rápida execução associado ao baixo custo (Meyer *et al.*, 1982), sendo, portanto, uma excelente ferramenta para a análise preliminar da toxicidade geral (Luna *et al.*, 2005).

Mediante o exposto, este trabalho tem como objetivo a síntese, caracterização estrutural de O-glicosídeos 2,3-insaturados, e avaliar a sua toxicidade frente a larvas da *Artemia salina* Leach. Convém destacar que os compostos a partir da reação de Ferrier entre o tri-O-acetil-D-glicol **1** e os álcoois **2a/b** em presença de montmorillonita

como catalisador. As estruturas dos compostos obtidos foram determinadas através das técnicas espectroscópicas de infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C .

2. PARTE EXPERIMENTAL:

2.1. Solventes e reagentes

Em geral utilizou reagentes e solventes na sua forma comercial, P.A., dos fornecedores Merck, Aldrich, Vetec e Cinética, sem nenhuma purificação adicional (só quando mencionado), como foi o caso dos solventes hexano e acetato de etila que indicavam presença de agentes contaminantes, entretanto os mesmos foram purificados através da destilação em sistema com coluna de Vigreux

O acompanhamento das reações foi feito através de cromatografia em camada delgada (CCD), onde utilizamos cromatofolhas de sílica-gel, contendo indicador fluorescente F_{254} , da Macherey/Nagel (Düren, Alemanha). Para revelação dos compostos foi utilizada luz ultravioleta, cuba contendo sistema de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{EtOH}$ e/ou vapores de iodo. Para cromatografia em coluna foi utilizada sílica gel 60 (Merck, 70-230 mesh).

2.2. Instrumentação

Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier foram obtidos com o equipamento Varian modelo 640 FTIR. Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C foram obtidos nos equipamentos da Varian modelos Unity Plus (300 MHz para hidrogênio e 75 MHz para carbono) e VNMRs (400 MHz para hidrogênio e 100 MHz para carbono), usando CDCl_3 como solvente ou o sinal residual do solvente como padrão interno de referência. Os valores de deslocamento químico (δ) estão expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). Os pontos de fusão dos compostos foram realizados no aparelho PFM II da BioSan.

2.3. Procedimentos experimentais

2.3.1. Síntese das amidoximas

Em um balão de 25 mL a nitrila (1 mmol) foi dissolvida em 5 mL de álcool etílico. Separadamente, em outro balão de 25 mL, foi dissolvido em 5 mL de água 3 mmol de cloridrato de hidroxilamina e 1,5 mmol de carbonato de sódio. Essa solução foi adicionada à primeira e o meio reacional foi levado a agitação por

aproximadamente 24 horas, até o consumo total da nitrila, acompanhado através de cromatografia em camada delgada (CCD), em sistema CH₂Cl₂:AcOEt (9:1). Após o término da reação, o etanol foi evaporado e duas fases são formadas: a fase aquosa e o produto insolúvel em água, podendo ser um óleo ou um sólido. Quando sólido, o precipitado foi filtrado e recristalizado em clorofórmio e/ou etanol. Quando o produto formado teve característica de um óleo, foi realizada uma extração com acetato de etila (2 x 10mL), à fase orgânica é adicionado Na₂SO₄. Após uma filtração, o solvente foi removido sob pressão reduzida e o produto purificado por cristalização em clorofórmio. Os produtos **3a/b** foram obtidos em bons rendimentos (90 e 85%). Os dados de IV, RMN ¹H e ¹³C, corroboram com os descritos na literatura (Andrade; Freitas Filho e Freitas, 2016).

2.3.2. Síntese dos 1,2,4-oxadiazóis

Em um frasco de vidro de 10 mL adicionou o acetatoacetato de etila (1,5 mmol) e arilamidoxima (1,0 mmol), estes foram misturados e levados para o banho de óleo em temperatura entre 100-110°C. O recipiente foi deixado em aquecimento durante 4 horas. O término da reação foi comprovada cromatografia em camada delgada (CCD), em sistema CH₂Cl₂:AcOEt (9:1). Os compostos **5a/b** foram purificados por cromatografia em coluna, utilizando um sistema eluente de hexano:AcOEt (9:1).

Composto **5a**: Sólido amarelado obtido com 88% de rendimento, R_f: 0,80 (CH₂Cl₂:AcOEt 9:1); IV (KBr): 2926, 1714, 1363, 1164 cm⁻¹; RMN¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 8,10-8,04 (m, 2H, H7e H-8II, Ph-H), 7,53-7,47 (m, 3H, H-9, H-4 e H-5, Ph-H), 4,10 (s, 2H, CH₂), 2,33(s, 3H, CH₃); RMN¹³ C (75 MHz, CDCl₃): δ 198,93(C-2); 172,97(C-5); 168,56(C-4); 131,27(C-9) 128,82(C-8); 127,36(C-7); 126,35(C-6); 41,51(C-3); 29,84(C-1).

Composto **5b**: Sólido amarelado obtido com 74% de rendimento; R_f: 0,72 R_f: 0,80 (CH₂Cl₂:AcOEt 9:1); IV (KBr): 2924, 1720, 1592, 1361, 1169 cm⁻¹; RMN¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 8,00-7,78 (d, 2H, J=8,1 Hz H7,); 7,21-7,18 (d, 2H, J=8,1 Hz H8); 4,10 (s, 2H, CH₂), 2,32(s, 3H, CH₃); 2,25(s, 3H, CH₃). RMN¹³ C (75 MHz, CDCl₃): δ 199,01(C-2); 172,79(C-5); 168,54(C-4); 141,63(C-6); 129,48(C-7); 127,27(C-8); 123,50(C-9); 41,50(C-3); 29,82(C-10); 21,34(C-1).

2.3.3. Síntese de 3-aryl-[1,2,4-oxadiazol-5-il]-propan-2-ol

Em um balão de fundo redondo de 100 mL

foi dissolvido o composto **5a/b** (1 mmol) em Metanol (15mL), em seguida foi adicionado o agente redutor boridreto de sódio à 0°C, deixando agitar por 30 minutos. Após o término da reação o solvente evaporado sob pressão reduzida. Em seguida a reação foi tratada com água (40 ml) e acetato de etila (40 mL) A fase orgânica foi adicionado sulfato de sódio anidro. O solvente foi removido sob pressão reduzida e material bruto foi cromatografia em coluna. Os produtos **6a/b** obtidos apresentaram rendimentos bons (88 e 74%).

Composto **6a**: óleo amarelado obtido com 88% de rendimento. R_f: 0,55(CH₂Cl₂:AcOEt 9:1); IV (KBr): 3406, 2973, 1595, 1367, 1117 cm⁻¹; RMN¹H(300 MHz, CDCl₃): δ 8,03-7,99 (m, 2H, H7e H-8II, Ph-H), 7,48-7,39 (m, 3H, H-9II, H-4 e H-5, Ph-H), 4,40 (m, 1H, CH), 3,41(Banda larga referente ao H do por OH), 3,08-2,95(m, 2H, CH₂); 1,32(S, 3H, CH₃); 1,30(S, 3H, CH₃); RMN¹³ C (75 MHz, CDCl₃): δ 178,12(C-5); 168,24(C-4); 131,56(C-9); 129,13(C-8); 127,67(C-7); 126,65(C-6); 65,36(C-2); 36,05(C-3); 23,07(C-1).

Composto **6b**: óleo amarelado obtido com 80% de rendimento, R_f: 0,42(CH₂Cl₂:AcOEt 9:1); IV (KBr): 3406, 2973, 1580, 1363, 1114 cm⁻¹; RMN¹H(300 MHz, CDCl₃): δ 7,84-7,82 (d, 2H, J=8,1Hz), 7,18-7,15 (d, 2H, J=8,1), 4,40 (m, 1H, CH), 3,2(Banda larga referente ao H do grupo OH), 3,08-2,95(m, 2H, CH₂); 1,32(S, 3H, CH₃); 1,30(S, 3H, CH₃); RMN¹³ C (75 MHz, CDCl₃): δ 177,11(C-5); 167,42(C-4); 141,09(C-9); 129,13(C-8); 129,02(C-7); 126,76(C-6); 64,52(C-2); 35,19(C-3); 22,79(C-10); 21,57(C-1).

2.3.4. Síntese de glicosídeos 2,3-insaturados

A um balão de fundo redondo (125 mL) foi adicionado o tri-O-acetil-D-glicol **7** (1 mmol), e os álcoois **6a/b** (1,5 mmol) e 30 mL de CH₂Cl₂ anidro. O meio reacional foi adicionado a temperatura de 0 °C a Montmorilonita K-10 (30%). A mistura foi deixada em refluxo por 3 horas, sendo a reação acompanhada por CCD em sistema CH₂Cl₂:AcOEt (9:1). Após a reação a mistura foi filtrada e o solvente removido sob pressão reduzida. Os produtos **8a/b** foram purificados por cromatografia em coluna de sílica gel, utilizando um sistema eluente de hexano:AcOEt (9:1).

Composto **8a**: óleo amarelado, rendimento 96%, R_f:0,61 (CH₂Cl₂:AcOEt 9:1); IV (KBr): 2926, 1743, 1368, 1231, 1032, 722 cm⁻¹; RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃), sinais em ppm, δ 8,1 (m, 3H, J=6,0Hz), 7,5(m, 4H, J=6,0Hz); 5,8(d, 1H, H2 e H3 J=9,5Hz);

5,2 (m, 1H, H-4), 5,1(s, 1H, H-1); 4,5(m, 1H, H-5); 4,2(dd, 2H, H6 e H6', J=1,74); 4,0 (m, 1H, H-7); 3,2(ddd, 1H, H-8); 2,1(s, 3H, OAc); 1,3 (d, 3H, CH₃ da aglicona, J=6,0Hz); RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃, sinais em ppm, δ 177,24 (C=O, OAc); 170,75(C-10); 168,27(C9); 131,29(C-3); 129,34(C-14); 128,84(C-13); 127,64(C11); 127,42(C12); 126,46(C-2); 95,05 e 92,32 (C1); 73,12(C5); 67,00(C-4); 65,26(C-6); 63,11(C-7); 34,45(C-8); 20,86 (CH₃ e OAc).

Composto **8b**: : óleo amarelado, rendimento 93%, R_f=0,59 (CH₂Cl₂:AcOEt 9:1); IV (KBr): 2926, 1743, 1368, 1231, 1032, 722 cm⁻¹; RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃), sinais em ppm, δ 7,9 (d, 2H, J=8,1Hz); 7,3(d, 2H, J=8,10Hz); 5,8(d, 1H, H2 e H3, J=10 Hz); 5,3 (m, 1H, H-4); 5,1(s, 1H, H-1); 4,2(m, 1H, H-5); 4,2(dd, 2H, H6 e H6', J=1,4); 3,9 (m, 1H, H-7); 3,2(ddd, 1H, H-8); 2,4 (s, 3H, CH₃ da aglicona, J=6,0Hz); RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃), sinais em ppm, δ 177,01(C=O, OAc); 170,74(C-10); 168,27(C9); 141,51(C-3); 129,57(C-14); 128,99(C-13); 127,55(C11); 127,30(C12); 123,85(C-2); 95,05 e 92,32(C1); 73,15(C5); 66,99(C-4); 65,26(C-6); 63,11(C-7); 34,45(C-8); 20,86 (CH₃ e OAc).

2.4. Avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* Leach

Os ovos de *Artemia salina* foram colocados para eclodirem em solução de sal marinho e iluminação artificial. Decorridas 24 horas de eclosão, 10 larvas foram adicionadas em tubos de ensaio contendo soluções dos glicosídeos 2,3-insaturados de concentrações que variaram de 100-25 µg/mL em DMSO, todas estando em triplicatas. Para grupo controle uma triplicata de solução de sal marinho e DMSO foi preparada. Após 24 horas de exposição, foi feita a contagem de artêmia vivos e mortos, sendo considerados vivos todos aqueles que apresentassem qualquer tipo de movimento quando observados próximos a uma fonte luminosa. Só foram considerados válidos os testes nos quais o controle apresentou uma mortalidade igual ou inferior a 10 % da população.

2.5. Delineamento estatístico experimental

Para análise estatística, utilizou-se o software TEAM R CORE, para obtenção das CL₅₀ e respectivos intervalos de confiança (Team, 2013).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

O Esquema 1 descreve as etapas de síntese dos precursores para reação de glicosilação. Inicialmente, em uma primeira etapa foram sintetizadas duas arilamidoximas **3a/b**. O método utilizado para obtenção das arilamidoximas, foi o clássico, ou seja, agitação em temperatura ambiente por 24 horas. As diferentes arilamidoximas **3a/b** foram sintetizadas a partir de arilnitrilas **1a-c** com o cloridrato de hidroxilamina (NH₂OH. HCl) e carbonato de sódio (Na₂CO₃), numa solução hidroalcoólica, em bons rendimentos. Posteriormente, na segunda etapa, foi realizada a síntese dos 1-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il) propano-2-ona (**5a/b**), através da reação entre as arilamidoximas (**3a/b**) e acetoacetato de etila (**4**) sob aquecimento e sem utilização de solvente, fornecendo os compostos em bons rendimentos, ou seja, variando de 88 e 80%. Finalmente na última etapa ocorreu a reação de redução dos compostos **5a/b** com borohidreto de sódio em metanol a 0 °C, que resultou na formação dos compostos **6a/b**, em bons rendimentos (90-85%).

Os 3-aril-(1,2,4-oxadiazol-5-il) propano-2-ona (**5a/b**), foram obtidos na forma de um óleo amarelado. Os dados espectroscópicos de IV, RMN ¹H e RMN ¹³C corroboram com os valores encontrados na literatura para o 1-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il) butan-2-ona descrito por Freitas *et al.*, (2007). Por outro lado, a determinação estrutural dos 3-aril-(1,2,4-oxadiazol-5-il) propan-2-ol foram realizadas através de técnicas espectroscópicas de infravermelho e RMN ¹H e RMN ¹³C. No espectro de IV é possível observar o aparecimento da banda larga de estiramento característica de álcool em 3.406 cm⁻¹ e o desaparecimento da banda característica carbonila em 1.700 cm⁻¹ dos compostos (**6a/b**). Os valores dos deslocamento e constantes de acoplamento do espectro de RMN ¹H e RMN ¹³C são sumariadas na parte experimental.

De posse dos precursores e confirmadas suas estruturas por técnicas espectroscópicas, a quarta etapa reacional consistiu na síntese dos a síntese O-glicosídeos 2,3-insaturados através do rearranjo de Ferrier. Os autores empregaram a metodologia descrita por Toshima *et al.*, (1995), Melo *et al.*, (2017), e de Freitas Filho *et al.*, (2015), devido sua eficácia, baixo custo, fácil manipulação dos reagentes e por ser realizada em condições brandas de temperatura. Sendo assim, a reação de glicosilação entre o tri-O-acetil-D-glicol (**7**) e os álcoois (*R,S*)-3-aril-[1,2,4-oxadiazol-5-il]-propan-2-ol (**6a/b**) foi realizada utilizando como catalisador a montmorillonita K-10 em

diclorometano seco, sob refluxo na temperatura de 45°C, de acordo com o Esquema 2, fornecendo os compostos (**8a/b**) em excelente rendimentos (96% composto **8a** e 93% composto **8b**) e alta estereosseletividade em favor do anômero α .

A partir da análise da mistura reacional, através de cromatografia gasosa, foi observado uma razão diastereomérica (r.d.) de 87:13 que demonstra a alta estereosseletividade da reação em favor do α -anômero. A mistura foi então submetida a cromatografia em coluna e isolado o isômero α de traços de isômeros β . Em seguida, a confirmação do α -anômero majoritário e o assinalamento completo dos núcleos de H e C foi realizado empregando diferentes técnicas espectroscópicas, tais como, IV e RMN ^1H e ^{13}C .

O espectro de RMN ^1H a 300 MHz do composto **8a** para a mistura de dois produtos (Figura 1) foi possível verificar em δ 2,0 e 2,1 ppm dois simpletos referentes aos hidrogênios das metilas do grupo OAc do anel piranosídeo. O simpleto largo em δ 5,1 ppm corresponde ao hidrogênio anomérico H-1. Em δ 5,82 ppm um par dubleto referente ao acoplamento de H-3 com H-2, por sua vez em δ 5,73 ppm outro dubleto referente ao acoplamento de H-2 com H-3. A constante de acoplamento $J=9,5\text{Hz}$. Em δ 8,1 e 7,5 podemos observar os prótons aromáticos apresentando multipeto com integração para 3 hidrogênio e 4 hidrogênios respectivamente. Por sua vez o δ 5,27 referentes a H-4 possui um constante de acoplamento com H-5 de $J=6,7$. Em δ 4,22 os prótons H6 e H-6' com esperado dubleto de dubleto com acoplamento germinal de $^2J=1,74$. O próton H-8 com δ 3,95 apresenta um par de duplos dupletos com $^2J_{ab}=14$ e $^3J_{ac}=5,9\text{Hz}$ referente ao acoplamento com H-7 característico de um acoplamento germinal diastereotópicos em sistemas alifáticos acíclicos. Na região de δ 1,30-1,45 ppm observa-se o grupo metila da aglicona que aparece na forma de dupletos, um em 1,35 ppm com $J=6\text{Hz}$ e outro em 1,45 ppm também com $J=6\text{Hz}$ na proporção 5:5 este dado ratifica o fato dos compostos ser diastereoisoméricos.

Por outro lado, o espectro de RMN ^{13}C do composto **8a** apresentou duplicidade de sinais devido à mistura diastereoisomérica (Figura 2). Em campo alto, observa-se o sinal do carbono das carbonilas dos grupos OAc bem como os carbonos do anel oxadiazólico C9 e C10 em δ 170,4 e 168,3 ppm. Sinais característicos de carbonos aromáticos C11, C12, C13, C14 aparecem entre δ 127,0 – δ 129,0 ppm. Os carbonos vinílicos do anel piranosídico C2 e C3

aparecem na faixa de δ 123,8 ppm, δ 141,5 ppm. Com dois sinais na região de δ 95,0 e 92,3 ppm encontra-se o carbono anômérico C1, fato este justificado pela presença do anômero β . Por sua vez em campo baixo ao carbono do anel piranosídico C5 com δ 73,1 ppm e δ 70,8 ppm. Os carbonos do anel piranosídico C4, C6 e C7 aparecem em δ 66,99 ppm, δ 65,2 ppm e δ 63,11 ppm respectivamente. Por fim o C8 aparece na região δ 34,6 ppm, típica de carbono sp^2 .

Uma vez sintetizado e caracterizado o (*R*-S) 3-*aril*-[1,2,4-oxadiazol-5-il]-propan-2,3-didesoxi- α -D-*eritro*-hex-2-enopiranosídeos (**8a/b**), a etapa seguinte do trabalho foi realizar o bioensaio toxicológico. Analisando o padrão de letalidade frente às larvas de *Artemia salina* Leach do composto, foi observado um bom desempenho por parte dos padrões positivos e negativos, assegurando assim a viabilidade do teste. A Tabela 1 mostra, para os compostos **8a** e **8b** os valores de DL_{50} e os limites de confiança obtidos da média das triplicatas para cada ensaio de toxicidade, assim como, a média dos valores de DL_{50} , o desvio padrão, a covariância (%) obtidos para cada composto. Conforme demonstrado na Tabela, observa-se que tanto o composto **8a** quanto **8b** apresentou $\text{DL}_{50}<100\text{ }\mu\text{g/mL}$.

Observa-se que, em geral, não houve grandes variações nos valores de DL_{50} entre as triplicadas de um mesmo composto. Os coeficientes de variação entre as triplicadas variaram entre 58,25 e 58,70%.

Segundo Nguta *et al.*, (2012) os ensaios com *A. Salina* são classificados seguindo os seguintes parâmetros: CL_{50} menor que 100 $\mu\text{g/mL}$ alta atividade toxicológica, entre 100 e 500 $\mu\text{g/mL}$ moderada atividade toxicológica, 500 a 1000 $\mu\text{g/mL}$ fraca atividade toxicológica e acima de 1000 $\mu\text{g/mL}$ não tóxicos.

Todavia, o teste de citotoxicidade avaliou o efeito de diferentes concentrações dos compostos **8a** e **8b** nos tempos de 24 horas. Os resultados do referido ensaio podem ser visualizados na Figura 3, onde a DL_{50} é observada em 77,21 (composto **8a**) e 74,09 (composto **8b**). A concentração letal média (CL_{50}) foi calculada com base na equação da reta obtida pela regressão linear, considerando a correlação das concentrações e a porcentagem de mortalidade. Ao valor de y (ordenadas) foi atribuído o número de mortes, ao resultado de x obtido (abscissas), onde foi aplicado o valor final da CL_{50} .

Finalizando, segundo Cavalcante *et al.*, (2000) a avaliação da bioatividade de compostos orgânicos, sejam eles provenientes de plantas ou de síntese, tem sido pouco viável em laboratórios tradicionais de química. Como descrito na literatura (Colegate e Molyneux, 1993), o ensaio de letalidade permite a avaliação da toxicidade geral e, portanto, é considerado essencial como bioensaio preliminar no estudo de compostos com potencial atividade biológica. Por outro lado, o bioensaio com *Artemia salina* é considerado um teste preliminar para avaliar substâncias tóxicas e possível ação antitumoral das mesmas (Carballo *et al.*, 2002).

4. CONCLUSÕES:

Neste trabalho, foi realizada a síntese dos materiais de partidas e de glicosídeos 2,3-insaturados contendo como aglicona os 1,2,4-oxadiazóis, em excelentes rendimentos (93% e 96%) e alta estereosseletividade em favor do α -anômero.

Os glicosídeos 2,3-insaturados obtidos foram purificados por cromatografia em coluna, fornecendo o anômero α e traços do anômero β . As estruturas dos compostos foram determinadas por técnicas de IV e RMN ^1H e ^{13}C . Convém destacar que para análise da atividade citotóxica foi realizada com a mistura diastereoisomérica (R e S).

As atividades citotóxicas foram realizadas frente a *Artemia salina* onde constatou que o percentual de mortalidade variou de 75-100% em todas as concentrações, o que demonstra que os compostos apresentam potenciais para testes em outros bioensaios. A DL_{50} é observada em 77,21 (composto **8a**) e 74,09 (composto **8b**).

5. AGRADECIMENTOS:

Os autores deste trabalho agradecem a todas as agências de fomento que financiaram a nossa pesquisa: CAPES, CNPq e FACEPE pelas bolsas concedidas aos estudantes de Pós-Graduação.

6. REFERÊNCIAS:

1. Ferreira, V. F.; Rocha, D. R.; Silva, F. C. (2009). Potencialidade e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. *Química Nova*, 32(3), 623- 638.
2. Bandera, D.; Sapkota, J.; Josset, S.;

- Weder, C.; Gao, X.; Foster, E. J.; Zimmermann, T. (2014). Influence of mechanical treatments on the properties of cellulose nanofibers isolated from microcrystalline cellulose. *Reactive and Functional Polymers*, 85, 134-141
3. Domon, D.; Fujiwara, K.; Ohtaniuchi, Y.; Takezawa, A.; Takeda, S.; Kawasaki, H.; Murai, A.; Kawai, H.; Suzuki, T. (2005). Synthesis of the C42-C52 part of ciguatoxin CTX3C. *Tetrahedron Letters*, 46, 8279–8283.
4. Meng, X. B.; Han, D.; Zhang, S. N.; Guo, W.; Cui, J. R.; Li, Z. J. (2007). Synthesis and anti-inflammatory activity os N-phthalimidomethyl 2,3-dideoxy- and 2,3-unsaturated glycosides. *Carbohydrate Research*, 342(9), 1169-1174.
5. Durham, T. B.; Miller, M. J. (2002). Conversion of glucuronic acid glycosides to novel bicyclic beta-lactams. *Organic Letters*, 4, 135-138.
6. Hossain, M. T.; Asadujjaman, M.; Manik, M. I. N.; Matin, M. A.; Chowdhury, R. Z.; Rashid, M. H. (2019). A study on the pharmacological effects and mechanism of action of alkaloids, glycosides and saponins. *The Pharmaceutical and Chemical Journal*, 6(2), 112-122.
7. Barros, S. B. M.; Davino, S. C. Avaliação da toxicidade. In: Oga, S.; Camargo, M. M. A.; Batistuzzo, J. A. O. Fundamentos de toxicologia. 3ª ed., São Paulo: Atheneu Editora, 2008.
8. Wang, Z. G.; Zhang, X. F.; Live, D.; Danishefsky, S. J. (2000). Toward fully synthetic homogeneous glycoproteins: A high mannose core containing glycopeptide carrying full H-type 2 human blood group specificity. *Angewandte Chemie International Edition*. 39, 3652.
9. Popiołkiewicz, J., Polkowski, K., Skierski, J.S, Mazurek A. P. (2005). In vitro toxicity evaluation in the development of new anticancer drugs-genistein glucosides. *Cancer Letters*, 229, 67-75.
10. Ferrier, R. J. (2001). Substitution-with-Allylic-Rearrangemetn reactions of glycal derivatives. *Topics in Current*

11. Gómez, A. M.; Lobo, F.; Uriel, C.; López, J. C. (2013). Recent Developments in the Ferrier Rearrangement. *European Journal of Organic Chemistry*, 32, 7221-7267.
12. Panarese, J. D.; Waters, S. P. (2009). Enantioselective formal total synthesis of (+)-aspergillide C. *Organic Letters*, 11(21), 5086-5088.
13. Toshima, K.; Ishizuka, T.; Matsuo, G.; Nakata, M. (1995). Practical glycosylation method using monmorillonite k-10 as an environmentally acceptable and inexpensive industrial catalyst. *Synlett*, 4, 306-308.
14. Melo, V. N.; Dantas, W. M.; Camara, C. A.; de Oliveira, R. N. (2015). Synthesis of 2,3-unsaturated alkynyl O-glucosides from tri-O-acetyl-D-glucal by using montmorillonite k-10/iron(III) chloride hexahydrate with subsequent copper (I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloaddition. *Synthesis*, 47, 3529–3541.
15. De Oliveira, R. N.; De Freitas Filho, J. R.; Srivastava, R. M. (2002). Microwave-induced synthesis of 2,3-unsaturated O-glycosides under solvent-free conditions. *Tetrahedron Letters*, 64, 2141-2143.
16. Michigami, K.; Hayashi, M. (2012). O- and N-glycosylation of D-glycals using Ferrier rearrangement under Mitsunobu reaction conditions. *Tetrahedron*, 68, 1092-1096.
17. Zhang, G.; Liu, Q.; Shi, L.; Wang, J. (2008). Ferric sulfate hydrate-catalyzed O-glycosylation using glycals with or without microwave irradiation. *Tetrahedron*, 64, 339-344.
18. Mukherjee, A.; Jayaraman, N. (2011). Reactivity switching and selective activation of C-1 or C-3 in 2,3-unsaturated thioglycosides. *Carbohydrate Research*, 346, 1569-575.
19. Drew, M. D.; Wall, M. C.; Kim, J. T. (2012). Stereoselective propargylation of glycals with allenyltributyltin(IV) via a Ferrier type reaction. *Tetrahedron Letters*, 53, 2833-2836.
20. Brasileiro, B. G.; Pizziolo, V. R.; Raslan, D. S.; Jamal, C. M.; Silveira, D. (2006). Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 42, 195-202.
21. Magalhães, A. F.; Tozzi, A. M. G. A.; Santos, C. C.; Serrano, D. R.; Zanotti-Magalhães, E. M.; Magalhães, E. G.; Magalhães, L. A. (2007). Saponins from *Swartzia langsdorffii*: biological activities. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98, 713-718.
22. Costa, E.S.S.; Dolabella, M. F.; Póvoa, M. M.; Oliveira, D. S.; Muller, A. H. (2009). Estudos farmacognósticos, fitoquímicos, atividade antiplasmódica e toxicidade em *Artemia salina* de extrato etanólico de folhas de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott, Araceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19(4), 834-838.
23. Dos Anjos, J. V.; Sinou, D.; Nascimento, S. C.; De Melo, S. J. (2007). Synthesis of some unusual (1,2,4-Oxadiazole)-linked hexenopyranosides and mannopyranosides. *Carbohydrate Research*, 342, 2440-2449.
24. Freitas, J. J. R.; de Freitas, J. C. R.; da Silva, L. P.; de Freitas Filho, J. R.; Kimura, G. Y.V.; Srivastava, R. M. (2007). Microwave-induced one-pot synthesis of 4-[3-(aryl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]-butan-2-ones under solvent free conditions. *Tetrahedron Letters*, 48, 6195-6198.
25. Freitas Filho, J. R.; Freitas, J. J. R.; Cottier, L.; Sinou, D.; Srivastava, R. M. (2015). Synthesis of 2,3-unsaturated O-glycosides from optically active alcohols via Ferrier rearrangement: configurational studies. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 60, 2646-2549.
26. James, R. C.; Roberts, S. M.; Williams, P. L. *Principles of Toxicology: Environmental Industrial Applications*. 2^a ed., New York: John Wiley & Sons, 2000, cap. 1.
27. Hodgson, E. A. *Textbook of Modern Toxicology*. 3^a ed., New Jersey: John Wiley & Sons, 2004, cap. 1.

28. Ates, M.; Demir, V.; Arslan, Z.; Camas, M.; Celik, F. (2016). Toxicity of engineered nickel oxide and cobalt oxide nanoparticles to *Artemia salina* in seawater. *Water, Air, & Soil Pollution*, 227, 3, 70.
29. Saraiva, A.; Castro, R.; Cordeiro, R.; Sobrinho, T.; Castro, V.; Amorim, E.(2011). Antimicrobial activity and bioautographic study of antistaphylococcal componentes from *schinopsis brasiliensis* engl. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5(14), 1724-1731.
30. Ojala, T.; Vuorela, P.; Kiviranta, J.; Vuorela, H.; Hiltunen, R. (1999). A bioassay using *Artemia salina* for detecting phototoxicity of plant coumarins. *Planta Medica*, 65(80), 715-718.
31. Luna, J.; Dos Santos, A.; De Lima, M.; De Omena, M.; De Mendonca, F.; Bieber, L. (2005). A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 97, 199-206.
32. Chohan, Z.; Sumrra, S.; Youssoufi, M.; Hadda, T. (2010).Metal based biologically active compounds: Design, synthesis, and antibacterial/antifungal/cytotoxic properties of triazole-derived Schiff bases and their oxovanadium(IV) complexes. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(7), 2739-2747.
33. Bagheri, S.; Sahebkar, A.; Gohari, A.; Saeidnia, S.; Malmir, M.; Iranshahi, M. (2010).Evaluation of cytotoxicity and anticonvulsant activity of some Iranian medicinal *Ferula* species. *Pharmaceutical Biology*, 48(3), 242-246.
34. Nino, J.; Correa, Y.; Mosquera, O. (2006). Antibacterial, Antifungal, and cytotoxic activities of 11 Solanaceae plants from Colombian biodiversity. *Pharmaceutical Biology*, 44(1), 14-18.
35. Meyer, B. N.; Ferrigni, N. R.; Putnam, J. E.; Jacobsen, L. B.; Nichols, D. E.; Mclaughlin, J. L. (1982). Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medicinal*, 45(5), 31-34.
36. Andrade, D.; Freitas Filho, J. R.; Freitas, J. C. R. (2016). Aplicação de amidoximas como catalisadores da reação de alilação por alitrifluoroborato de potássio em meio básico. *Química Nova*, 39(10), 1225-1235.
37. Team, R. C. R development core team. *RA Lang Environ Stat Comput*, 2013, 55, 275-286.
38. Melo, A. C. N.; Oliveira, R. N.; Freitas Filho, J. R.; Silva, T. G.; Srivastava, R M. (2017). Synthesis of anti-inflammatory 2,3-unsaturated O-glycosides using conventional and microwave heating techniques. *Heterocyclic Communications*, 23(3), 205-211.
39. Guta, J. M.; Mbariaa, J. M.; Gakuyab, D. W.; Gathumbic, P. K.; Kabasad, J. D.; Kiam, S. G. (2012). Evaluation of Acute toxicity of crude plant extracts from Kenyan Biodiversity using brine shrimp, *Artemia salina* L. (*Artemiidae*). *The Open Conference Proceedings Journal*, 3, 30-34.
40. Cavalcante, M. F.; Oliveira, M. C. C.; Velandia, J. R.; Echevarria, A. (2000). Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* leach. *Química Nova*, 23(1), 20-22.
41. Colegate, S. M.; Molyneux, R. J. (1993). *Bioactive Natural Products: Detection, Isolation and Structural Determination*; Colegate, S. M., Ed.; CRC Press; London, 441.
42. Carballo, J. L.; Hernández-Inda, Z. L.; Pérez, P.; García-Gravalos, M. D. (2002). A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. *Bio Med Central Biotechnology*, 2,1-10.

FIGURA 1. Espectro de RMN ^1H (300 MHz) em CDCl_3 do composto **8a**

FIGURA 3. Porcentagem de *Artemia salina* mortas em relação ao aumento de concentração dos compostos **8a** e **8b**.

TABELA 1. Avaliação da toxicidade em *A. salina* Leach (DL_{50}) dos compostos 8a e 8b e seus respectivos limites do intervalo de confiança de 95%.

Compostos	DL_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Intervalo de confiança 95%	
		Limite inferior	Limite superior
8a	77,2130		
Média $DL_{50} \pm DP$	$77,2130 \pm 6,9673$	58,1609	88,2650
CV (%)	58,70		
8b	74,0989		
Média $DL_{50} \pm DP$	$74,0989 \pm 9,0474$	54,5531	93,6447
CV (%)	58,25		

DL_{50} = dose letal para 50% da população, DP= desvio padrão, CV= Coeficiente de variação