



Assinalamento Completo e Avaliação do Perfil Farmacocinético e Toxicológico do 3-butin-1-il 4,6-di-*O*-acetil-2,3-didesoxi- α -D-*eritro*-hex-2-enopiranosídeo

Completed Assignment and Evaluation of the Pharmacokinetic and Toxicological Profile of 3-Butin-1-yl 4,6-di-*O*-acetyl-2,3-dideoxy- α -D-*erythro*-hex-2-enopyranoside

J. F. Silva¹; H. I. R. Medeiros²; J. A. C. Lima¹; J. R. Freitas Filho¹; J. C. R. Freitas^{1,2*}

¹ Departamento de Química, Univesidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife-PE, Brasil

² Centro de Educação e Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, 58175-000, Cuité-PB, Brasil

*julianocrufino@pq.cnpq.br

(Recebido em 13 dezembro de 2019; aceito em 06 de março de 2020)

O desenvolvimento de novos fármacos que exibam baixa toxicidade é de grande importância, uma vez que inúmeros candidatos são descartados devido a não atenderem a esse pré-requisito. Neste sentido, o trabalho descreve o assinalamento completo dos núcleos de hidrogênio e carbono, bem como a avaliação do perfil farmacocinético e toxicológico do 3-butin-1-il 4,6-di-*O*-acetil-2,3-didesoxi- α -D-*eritro*-hex-2-enopiranosídeo. O assinalamento completo, o estudo toxicológico frente às larvas da *Artemia salina* e a estudo farmacocinético *in silico* para este composto são descritos pela primeira vez. Este composto foi obtido com ótimo rendimento e o experimento de *NOESY* permitiu confirmar a estrutura do anômero majoritário da reação de glicosilação. A avaliação do perfil farmacocinético e toxicológico confirmou que este composto apresenta ótima biodisponibilidade e absorção pela via oral, além de baixa toxicidade.

Palavras-chave: *O*-glicosídeos, Assinalamento completo, *Artemia salina*.

The development of new drugs that exhibit low toxicity is of great importance as numerous candidates are discarded because they do not meet this precondition. In this sense, the work describes the complete hydrogen and carbon nucleus assignment as well as the pharmacokinetic and toxicological evaluation of the 3-butin-1-yl 4,6-di-*O*-acetyl-2,3-dideoxy- α -D-*erythro*-hex-2-enopyranoside. The complete assignment, the toxicological study against *Artemia salina* larvae and the *in silico* pharmacokinetic study for this compound are described for the first time. This compound was obtained with excellent yield and the *NOESY* experiment confirmed the structure of the major anomer of the glycosylation reaction. The pharmacokinetic and toxicological profile evaluation confirmed that this compound has excellent oral bioavailability and absorption, as well as low toxicity.

Keywords: *O*-glycosides, Completed assignment, *Artemia salina*.

1. INTRODUÇÃO

Durante o processo de desenvolvimento de novos fármacos, os ensaios toxicológicos são fundamentais, uma vez que possibilitam avaliar os efeitos de uma exposição curta (de 24 a 48 horas) dos candidatos a fármacos frente ao organismo bioindicador. Contudo, devido aos problemas inerentes dos testes *in vivo*, tais como: uso de animais vertebrados, custos elevados e a necessidade de grande quantidade de amostras, a busca por métodos alternativos é imprescindível [1, 2].

Uma alternativa a essa problemática são os bioensaios *in vitro* utilizando o microcrustáceo *Artemia salina* Leach, devido sua praticidade, sensibilidade, reprodutibilidade e baixo custo [3], características essas essenciais para uma análise preliminar da toxicidade geral [4, 5]. Além disso, este bioensaio toxicológico não necessita da utilização de soro animal [3].

Em consonância, outra alternativa que facilita o processo de descoberta de novos fármacos, são as análises *in silico*, ferramentas que utilizam métodos computacionais e matemáticos com comprovada efetividade para prever uma grande diversidade de características biológicas de uma molécula em um menor tempo e com custo reduzido [6].

Estas metodologias possuem diferentes estratégias para a obtenção de novas moléculas, em que se destacam as modificações moleculares, uma vez que objetivam o desenvolvimento de agentes

com características de eficácia e segurança [7]. Adicionalmente, os produtos naturais são fonte de inspiração e estruturas passíveis de serem modificadas, tendo em vista suas propriedades biológicas. Neste horizonte, os *O*-glicosídeos constituem uma importante classe de produtos naturais [8, 9, 10, 11]

Estes compostos apresentam várias atividades biológicas, tais como ação antifúngica [12, 13], antibacteriana [14], antipirética [15], anti-inflamatória [16], antibiótica [17, 18], antitumoral [19, 20], antiviral [21], anti-hipertensiva [22], inibidora do 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase [23], dentre outras [24, 25, 26] (Figura 1).

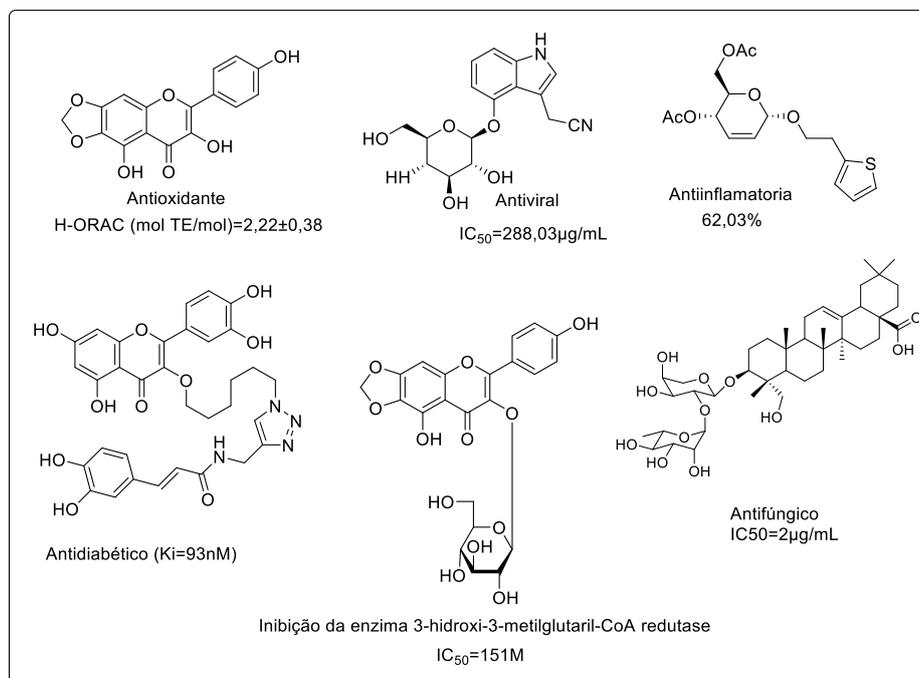


Figura 1: Exemplos de produtos naturais (glicosídeos) versus suas atividades biológicas.

Devido essas e outras aplicações dos *O*-glicosídeos, nosso grupo de pesquisa vem dedicando esforços, nos últimos anos, no desenvolvimento de novas estratégias sintéticas e na avaliação biológica desses compostos [10, 27, 28, 29]. Contudo, o assinalamento inequívoco desses compostos continua sendo um desafio, uma vez que suas estruturas são complexas e bem diversificadas [16].

Embora este tipo de assinalamento estrutural demande muito tempo de equipamento e de análise dos dados, ela possibilita um mapeamento preciso e inequívoco quando comparado a uma simples análise utilizando somente as técnicas rotineiras de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (RMN ¹H e ¹³C), ou seja, as técnicas unidimensionais (1D) [30]. É indubitável que a RMN é um método analítico imprescindível para o estudo de aspectos estruturais e dinâmicos de moléculas orgânicas, mas isso só foi possível com o desenvolvimento de novas sequências de pulso e o aprimoramento dos equipamentos de RMN nas últimas décadas [31].

Especificamente, as técnicas de correlação bidimensionais (2D) são fundamentais neste assinalamento, uma vez que permitem correlacionar hidrogênios e/ou carbonos que possuam alguma relação espacial (H,H-NOESY ou H,C-NOESY) ou escalar (ⁿJ_{H,H}, ⁿJ_{C,H}, ⁿJ_{C,C}), possibilitando uma análise mais detalhada, completa e confiável de substâncias com estruturas complexas [32, 33]

Diante da importância das diferentes técnicas de RMN no assinalamento de moléculas complexas e das diversas atividades farmacológicas e biológicas dos *O*-glicosídeos, o trabalho descreve o assinalamento completo dos núcleos de hidrogênio e carbono presentes na estrutura do but-3-in-1-il 4,6-di-*O*-acetil-2,3-didesoxi- α -D-*eritro*-hex-2-enopiranosídeo, a estereoquímica do anômero majoritário da reação de glicosilação e a avaliação do seu perfil farmacocinético e toxicológica frente a métodos *in silico* e ao microcrustáceo *Artemia salina* Leach, respectivamente.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Materiais

Os solventes comerciais foram purificados de acordo com os protocolos descritos na literatura [34]. O hexano e o acetato de etila foram destilados com coluna de *Vigreux*, o diclorometano foi destilado sob hidreto de cálcio. Os reagentes 3,4,6-tri-*O*-acetil-D-glucal e o álcool 3-butin-1-ol foram adquiridos da empresa Sigma Aldrich. O monitoramento das reações foi realizado através da cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando placas de sílica-gel contendo indicador fluorescente F₂₅₄ da Merck. Para visualização, a CCD foi molhada com solução ácida (EtOH/H₂SO₄ na proporção 95/5, respectivamente) seguido de aquecimento (60 °C).

A purificação ocorreu através da cromatografia líquida em coluna utilizando sílica-gel 60 da Merck (70-230 *mesh*) como fase estacionária e sistemas de hexano:acetato de etila como fase móvel numa coluna de vidro em diferentes proporções.

2.2 Equipamentos

A chapa de agitação com aquecimento e a manta aquecedora foram da marca Fisaton modelo 754A e 102E, respectivamente. O solvente foi removido utilizando um evaporador rotativo da Büchi modelo R-114 conectado a uma bomba de vácuo modelo KNF-Neuberg, e o solvente remanescente foi removido utilizando uma bomba de alto vácuo da Edwards modelo RV3. A rotação específica foi determinada em um polarímetro digital da marca JASCO® P-2000 equipado com a luz de sódio em comprimento de onda 589 nm. A amostra foi preparada em concentração de 1 g/mL (em MeOH) em uma cubeta de 1 mL.

O infravermelho (IV) foi realizado em um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier Spectrum 400 FT-IR/FT-NIR Spectrometer modelo PerkinElmer. O espectro IV de transmissão foram obtidos com resolução 4 cm⁻¹, ganho 1, região espectral 4000 a 400 cm⁻¹ e 40 varreduras. A amostra foi submetida a análise de IV preparada como pastilhas de KBr.

Os dados de ressonância magnética nuclear (RMN) foram obtidos em um espectrômetro VARIAN® modelo Unity Plus-300. O clorofórmio deuterado (CDCl₃) foi utilizado como solvente e o tetrametilsilano (0,00 ppm) como referência interna para os núcleos de ¹H e ¹³C. Todas as constantes de acoplamento (*J*) foram descritas em hertz (Hz).

2.3 Medições de RMN

Para as medições, a concentração da amostra foi mantida em 20 mg/mL em CDCl₃ com TMS a 0,03%. A temperatura da amostra foi de 300 K. O espectro RMN ¹H foi adquirido com largura espectral igual a 5,48 kHz, 64 k pontos de dados e 16 varreduras - fornecendo resolução digital de 0,083 Hz (largura do pulso de ¹H 30° = 8,5 μs). Para o espectro RMN ¹³C foi adquirido com largura espectral igual a 23,98 kHz, 32 k pontos de dados e 1024 varreduras - fornecendo resolução digital de 0,732 Hz (¹³C largura de pulso de 30° = 14,25 μs). As correlações de deslocamento químico 2D foram realizadas usando sequências de pulsos padrão fornecidas pelo fabricante do espectrômetro.

As correlações de desvio químico de ¹³C/¹H de longo alcance foram obtidas em experimentos com valores de atraso otimizados para ²*J*(C, H) = 8 Hz.

2.4 Síntese do 3-butin-1-il 4,6-di-*O*-acetil-2,3-didesoxi- α -D-*eritro*-hex-2-enopiranosídeo

O 3-butin-1-il 4,6-di-*O*-acetil-2,3-didesoxi- α -D-*eritro*-hex-2-enopiranosídeo (**3a**) foi sintetizado a partir da reação de glicosilação através do protocolo de Toshima et al. (1995) [35] com algumas modificações. Em um balão de fundo redondo com capacidade para 50 mL foi preparada uma solução de 3,4,6-tri-*O*-acetil-D-glucal (**1**) (0,544 g; 2 mmol) e do álcool 3-butin-1-ol (**2**) (0,768 g; 2,4 mmol) em diclorometano (20 mL). Em seguida, o balão foi resfriado a 0°C e mantido sob agitação por 5 minutos. Após este intervalo de tempo foi adicionado a montmorillonita K-10

(0,4608 g; 60% M/M) e um sistema de refluxo foi acoplado ao balão. A mistura reacional foi mantida sob agitação e aquecimento ($50 \pm 5^\circ\text{C}$) por 60 minutos.

Após este intervalo de tempo o aquecimento foi interrompido e o término da reação verificado por CCD. Em seguida, a solução contida no balão foi filtrada e o solvente removido sob pressão reduzida utilizando evaporador rotativo. O produto bruto foi purificado através de cromatografia líquida em coluna. A purificação em coluna do composto **3a** iniciou usando apenas hexano, como solvente eluente, e terminou com a mistura de 95% de hexano e 5% de acetato de etila.

2.5 Análises *in silico*

Para avaliar o perfil farmacocinético do composto **3a**, foi utilizado o *software Molinspiration Online Property Calculation*. Este *software* possibilita o cálculo de importantes propriedades físico-químicas da molécula. Estes parâmetros foram utilizados para avaliar o padrão de biodisponibilidade teórica do composto, baseando-se na “Regra dos Cinco” desenvolvida por Lipinski et al. (1997) [36].

2.5 Toxicidade Frente a Larvas de *Artemia salina* Leach

O 3-butin-1-il 4,6-di-*O*-acetil-2,3-didesoxi- α -D-*eritro*-hex-2-enopiranosídeo (**3a**) foi submetido ao biensaio toxicológico com *Artemia salina* Leach, através do protocolo descrito por Meyer et al. (1982) [37]. Foram utilizados 40 mg da amostra com a adição de 50 μL de dimetilsulfóxido. Posteriormente, a solução foi homogeneizada e o volume completado para 20 mL com água salinizada filtrada (água salina artificial preparada a partir de 38 g de sal marinho Marinex® em 1 L de água destilada) em pH = 8,0.

Desta solução, foram retiradas alíquotas de 125, 625, 1000, 1125, 1250, 1312, 1375, 1500, 1625, 1750, 1875 μL que foram transferidas para tubos de ensaios de 2,5 ml e os volumes completados com o mesmo solvente, obtendo-se concentrações de 100, 500, 800, 900, 1000, 1050, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500 $\mu\text{g/mL}$ para a solução da amostra. O teste foi acompanhado por controle positivo, em que utilizou o dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) e controle negativo utilizando apenas água marinha artificial e o dimetilsulfóxido.

Os cistos da *Artemia salina* (20 mg) foram incubados sob iluminação artificial por 48 horas para eclosão das larvas (metanáuplios), e estas foram separadas e transferidas para um total de 39 tubos de ensaio, com dez artêmias cada, tendo em vista que o bioensaio foi realizado em triplicada para cada concentração e para cada controle feito (positivo e negativo).

O primeiro e o segundo grupo receberam a solução controle positivo (solvente e dicromato de potássio) e controle negativo (solvente e dimetilsulfóxido) e as onze seguintes receberam a solução aquosa do composto nas diferentes concentrações citadas. As amostras foram submetidas à iluminação artificial durante 24 horas. Após este período, foram contabilizadas as artêmias, baseando-se na mortalidade ou perda de mobilidade dos organismos.

2.6 Análise Estatística

Para obtenção dos valores da concentração letal para matar 50% das larvas (CL_{50}), foi utilizada a análise através do *software* POLO-PC.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Visando confirmar o anômero majoritário da reação de glicosilação, bem como realizar o assinalamento completo dos núcleos de H e C desse anômero, o trabalho foi iniciado com a síntese dos *O*-glicosídeos 2,3-insaturados, denominado 3-butin-1-il 4,6-di-*O*-acetil-2,3-didesoxi- α -D-*eritro*-hex-2-enopiranosídeo (**3a**) e 3-butin-1-il 4,6-di-*O*-acetil-2,3-didesoxi- β -D-*eritro*-hex-2-enopiranosídeo (**3b**), a partir da reação entre o 3,4,6-tri-*O*-acetil-D-glucal (**1**) e o 3-butin-1-ol (**2**), conforme demonstrado na Figura 1, utilizando o método descrito por Toshima et al. (1995) [35].

Este método foi escolhido devido a sua simplicidade e baixo custo quando comparado a outros métodos [38, 39, 40].

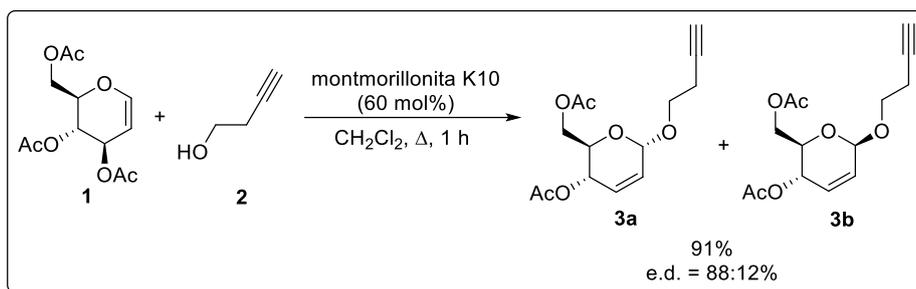


Figura 1. Esquema da reação de glicosilação.

Esta mistura anomérica **3a** e **3b** foi obtida na forma de um líquido incolor em excelente rendimento (91%, determinado a partir da relação entre a quantidade realmente obtida de produto e a quantidade teoricamente calculada, este valor depois é multiplicada por 100%) e bom excesso diastereomérico (e.d. 88:12%, valor obtido por meio de cromatografia gasosa (Figura 2). No entanto, segundo a teoria do efeito anomérico [41, 42] e o relato de Toshima et al. (1995) [35], dentre os dois anômeros formados, o anômero α (**3a**) é o produto majoritário.

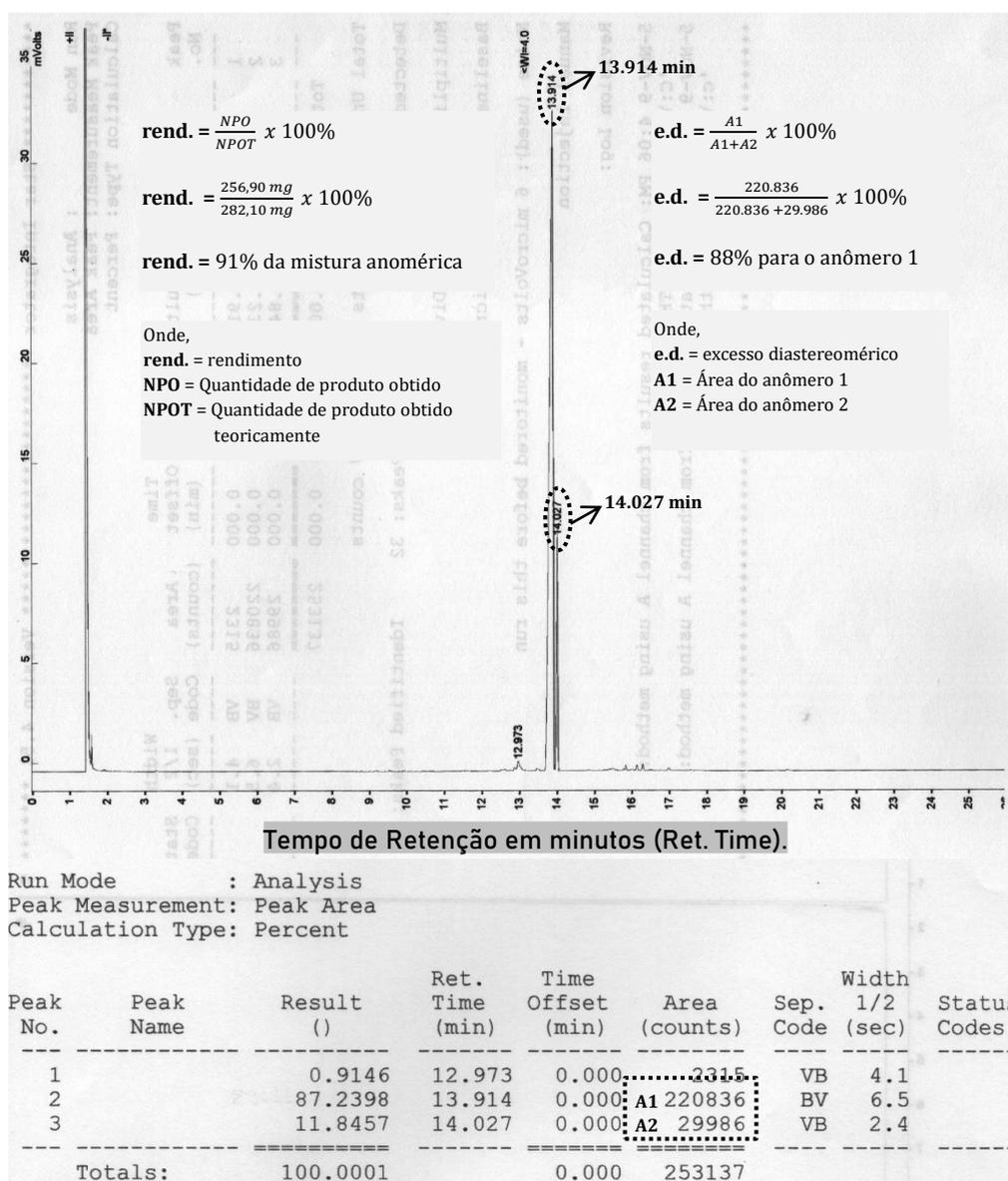


Figura 2. Determinação do excesso diastereomérico dos anômeros.

Vale ressaltar que Toshima et al. (1995) [35], confirmaram esse resultado após submeter alguns *O*-glicosídeos 2,3-insaturados a reação de hidrogenação catalisada por paládio, seguido da análise dos espectros de RMN ^1H dos respectivos *O*-glicosídeos hidrogenados (Figura 3). No entanto, este tipo de abordagem é muito dispendiosa, pois requer mais uma etapa de síntese e purificação.

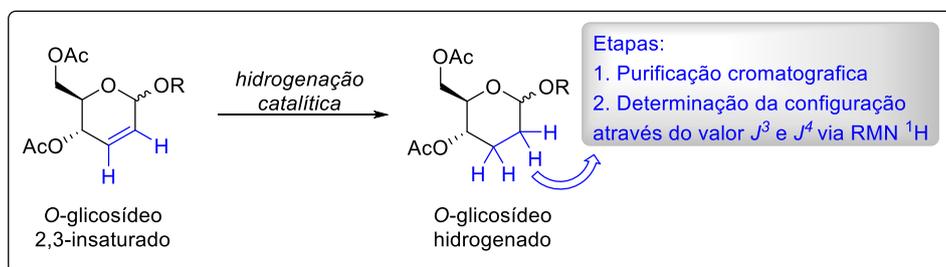


Figura 3. Reação de hidrogenação visando determinar a configuração dos *O*-glicosídeos 2,3-insaturado.

A fim de confirmar a estereosseletividade da reação de glicosilação sem a necessidade da etapa de hidrogenação proposta por Toshima et al. (1995) [35], foi idealizada a identificação do anômero

majoritário e o assinalamento completo dos núcleos de H e C utilizando diferentes técnicas 1D e 2D de RMN. Deste modo, a mistura anomérica **3a** e **3b** foi submetida a espectroscopia de infravermelho.

O espectro de infravermelho dessa mistura indicou a presença de várias bandas características para esse tipo de estrutura, a citar, as deformações em 3283, 2944, 2135, 1742 e 1645 cm^{-1} , referentes às vibrações das ligações $\text{C}\equiv\text{C}$, $\text{C}-\text{H}$, $\equiv\text{C}-\text{H}$, $\text{C}=\text{O}$ e $\text{C}=\text{C}$, respectivamente (Figura 4). Cabe destacar que as bandas em 3283 e 2135 cm^{-1} confirmam a inserção do grupo 3-butin-1-il, enquanto que as bandas em 1742 e 1645 cm^{-1} indicam a manutenção dos grupos acila ($-\text{COCH}_3$) e da dupla ligação ($\text{C}=\text{C}$).

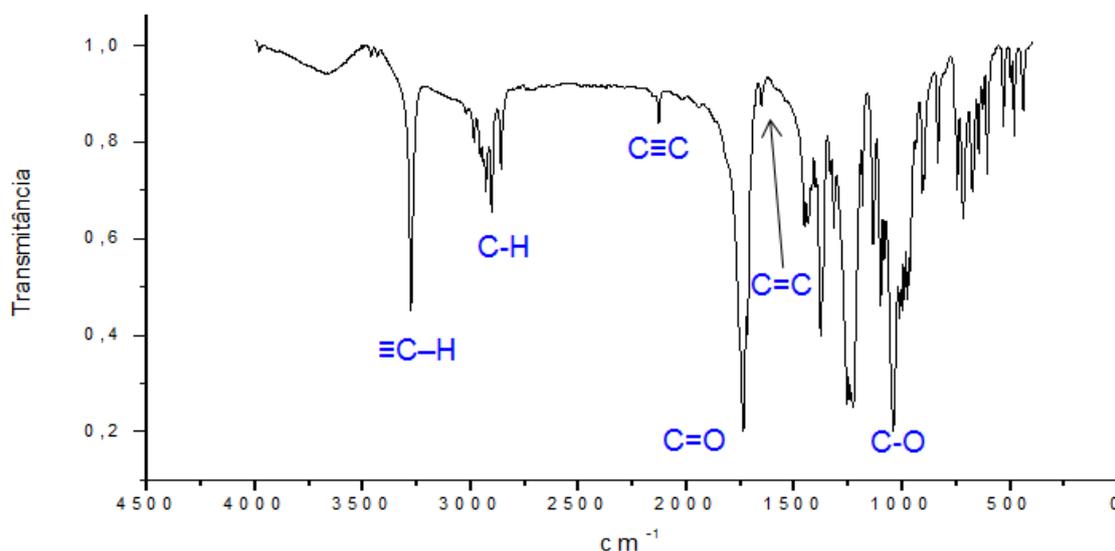


Figura 4. Espectro de IV (pastilha KBr) da mistura anomérica **3a** e **3b**.

Posteriormente, o assinalamento do núcleo de hidrogênio do anômero majoritário foi iniciado com a análise do espectro de RMN de hidrogênio (Figura 5), o qual não apresentou sobreposição de sinais permitindo assim uma análise detalhada da multiplicidade. Além disso, o somatório das áreas das integrais sob cada sinal foi igual a 18, número esse equivalente ao número de hidrogênio que a estrutura do composto **3a** ou **3b** pode apresentar. Convém ressaltar que alguns sinais apresentaram acoplamentos complexos requerendo uma maior atenção. Adicionalmente, as técnicas 2D de RMN permitiram o assinalamento completo dos deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbono do composto majoritário.

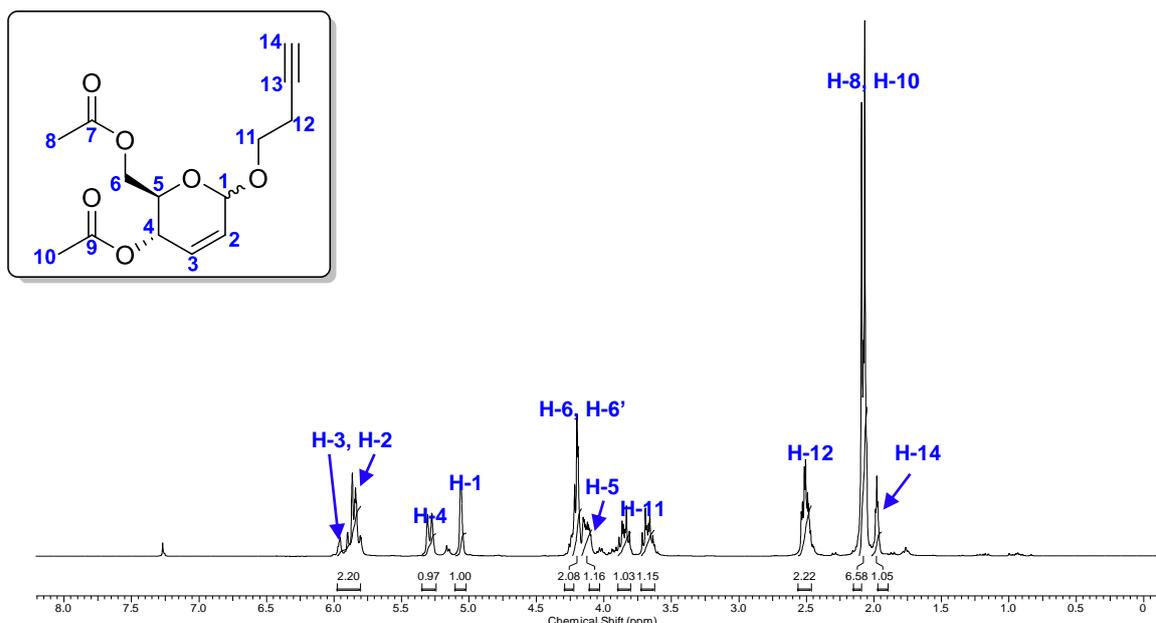


Figura 5. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **3a** ou **3b**.

Analisando minuciosamente os espectros 1D e 2D de RMN do núcleo de hidrogênio da mistura anomérica **3a** e **3b** foi possível atribuir os sinais e determinar as multiplicidades dos hidrogênios presentes no anômero majoritário. Para facilitar o entendimento, o assinalamento detalhado segue abaixo:

- ✓ O tripleto em 1,98 ppm com $J^t = 2,8$ Hz foi atribuído ao hidrogênio acetilênico (H-14), uma vez que este hidrogênio sofre o efeito anisoprótico de blindagem proveniente da tripla ligação, possui valor de integral igual a 1 e o valor de J indica acoplamento típico do hidrogênio ligado a carbono de hibridização sp (Figura 6k).
- ✓ Os dois simpletos, em 2,08 e 2,10 ppm, foram atribuídos aos hidrogênios metílicos dos grupos OAc (H-8 e H-10, respectivamente, conforme análise HSQC – material suplementar) devido não acoplarem e possuem valores de integral igual a 3 (Figura 6j).
- ✓ O sinal em 2,52 ppm, com uma multiplicidade do tipo tripleto de duplete foi atribuído ao hidrogênio metilênico (H-12), uma vez que acopla a três ligações ($J^3 = 6,8$ Hz) com o hidrogênio metilênico adjacente (H-11) e acopla a quatro ligações ($J^t = 2,8$ Hz) com o hidrogênio acetilênico (H-14), além disso, o valor de deslocamento é típico de hidrogênio ligado a carbono sp^3 (Figura 6i).
- ✓ Os sinais na região entre 3,50 a 4,00 ppm foram atribuídos aos hidrogênios H-11, devido serem diastereotópicos, possuem valores de integral igual a 1 e apresentarem valores de J típico de hidrogênios geminais. A multiplicidade desses sinais foi do tipo duplete de tripleto devido ao acoplamento geminal ($J^2 = 9,6$ Hz) que eles efetuam e o acoplamento a três ligações ($J^3 = 6,8$ Hz) com os hidrogênios metilênicos adjacente (H-12) (Figura 6h).
- ✓ O sinal em 4,14 ppm foi atribuído ao hidrogênio H-5, devido apresentar uma multiplicidade do tipo duplo duplo duplete com constantes de acoplamento de 9,6, 5,2 e 2,8 Hz, e valor de integral igual a 1. A constante (J^3) de 9,6 Hz indica manutenção da configuração *eritro* do glicol, ou seja, a relação *trans*-diaxial entre os hidrogênios H-5 e H-4, enquanto que as constantes (J^3) de 5,2 e 2,8 Hz indica o acoplamento com os hidrogênios H-6 e H-6', em que ambos apresentam ambientes químicos diferentes, uma vez que são prótons diastereotópicos (Figura 6f).
- ✓ Os sinais em 4,22 e 4,24 ppm foram atribuídos aos hidrogênios H-6 e H-6', os quais acoplam entre si e com o hidrogênio H-5, com valores de $J^2 = 11,6$ Hz e $J^3 = 5,2$ Hz, respectivamente (Figura 6e).
- ✓ O simpleto largo, em 5,07 ppm, foi atribuído ao hidrogênio anomérico (H-1), uma vez que apresenta valor de integral igual a 1 e devido suas correlações no espectro de COSY (material suplementar) (Figura 6d).

- ✓ O duplete de quarteto, em 5,31 ppm, foi atribuído ao hidrogênio H-4, devido ao seu valor de integral igual a 1, constata-se de acoplamento igual 9,6 Hz e suas correlações no espectro de COSY (Figura 6c).
- ✓ O sinal em 5,83 ppm foi atribuído ao hidrogênio H-2, o qual apresentou constantes de acoplamento de 10,4 e 2,8 Hz e multiplicidade do tipo duplete de quarteto (Figura 6b). O outro hidrogênio vinílico (H-3) situa-se na região de 5,89 ppm e apresenta multiplicidade do tipo duplete largo com constante de acoplamento de 10,4 Hz (Figura 6a). A comprovação da atribuição dos hidrogênios vinílicos (H-2 e H-3) foi confirmada através do espectro de correlação COSY (material suplementar). Desta forma, foi observado a correlação do sinal do hidrogênio H-1 (5,07 ppm) apenas com o sinal em 5,83 ppm, uma vez que o H-2 está mais próximo do H-1 (a três ligações) quando comparado ao H-3 (a quatro ligações), indicando que o sinal em 5,83 ppm refere-se ao H-2 (material suplementar).

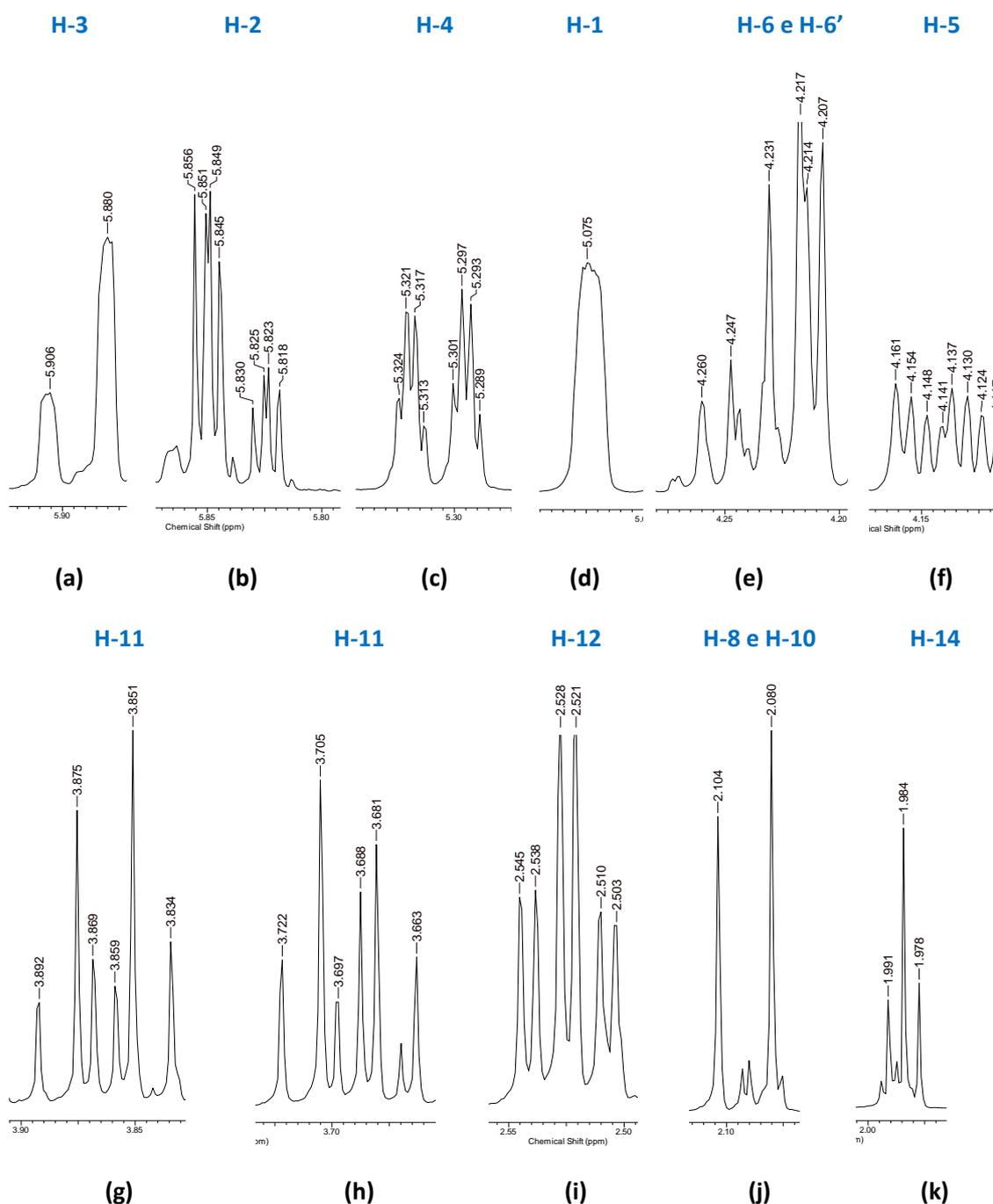


Figura 6. Ampliação do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto 3a ou 3b.

A estereoquímica relativa do anômero majoritário foi confirmada através do experimento *NOESY*, uma vez que hidrogênios espacialmente próximos são susceptíveis ao efeito *overhauser*. Desta forma, como espacialmente o hidrogênio H-1 do anômero beta está mais próximo do hidrogênio H-5, o efeito *overhauser* seria observado, enquanto este efeito não seria observado no anômero alfa (Figura 7).

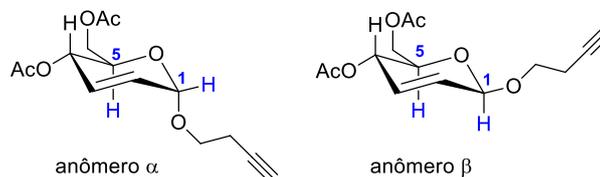


Figura 7. Conformação cadeira dos anômeros **3a** e **3b**.

Como resultado do *NOESY*, quando o H-1 (5,07 ppm) foi irradiado não foi observado o efeito *overhauser* no sinal atribuído como H-5 (4,14 ppm), confirmando que o produto majoritário dessa reação é o anômero alfa. Adicionalmente, foi observado efeito *overhauser* nos sinais atribuídos H-2 (5,83 ppm), H-11 (3,50 e 4,00 ppm) e OAc (2,08 e 2,10 ppm) devido a aproximação espacial desses hidrogênios, o que valida a análise (Figura 8).

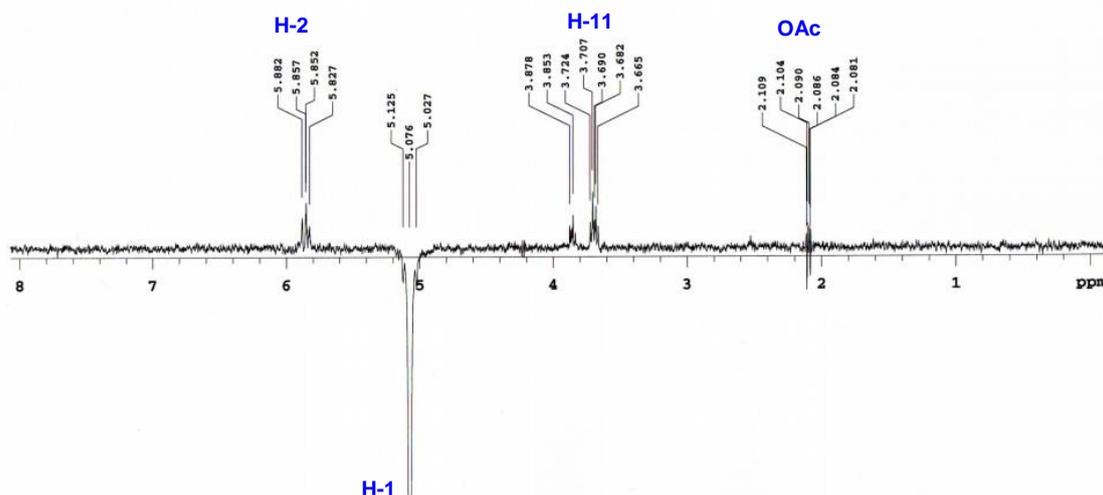


Figura 8. Espectro *NOESY* do composto **3a** (400 MHz, $CDCl_3$) irradiando o H-1 (δ 5,07 ppm).

De acordo com o espectro de RMN ^{13}C do composto **3a**, foi observado a presença de 14 carbonos quimicamente diferentes, valor este igual ao número de carbono presentes na estrutura desse composto (Figura 9). Os sinais mais desblindados em 170,74 e 170,23 ppm foram atribuídos aos carbonos carbonílicos (C-9 e C-7), já os sinais 129,34 e 127,47 ppm foram atribuídos aos carbonos olefínicos (C-3 e C-2, respectivamente). Os sinais em 94,58 e 81,00 ppm foram atribuídos aos carbonos C-1 e C-13, respectivamente.

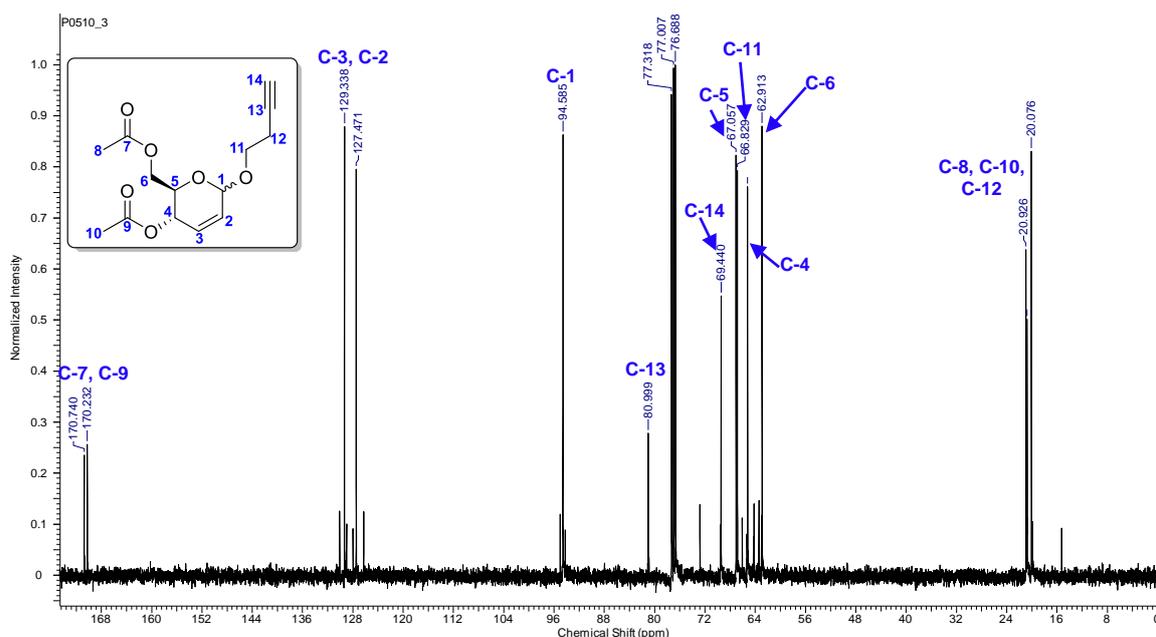


Figura 9. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **3a**.

A confirmação das atribuições dos carbonos C-3, C-2, C-1 e C-13, foi realizada através do experimento bidimensional HSQC (Figura 10 e 11). Neste espectro foi observado uma correlação entre o sinal em 129,34 ppm e o hidrogênio H-3 (5,89 ppm), enquanto que o sinal em 127,47 ppm se correlaciona com o hidrogênio H-2 (5,83 ppm). O sinal em 94,58 ppm se correlaciona com o sinal em 5,07 ppm atribuído a H-1. O sinal em 81,00 ppm foi atribuído ao carbono C-13, uma vez que este sinal não se correlaciona com nenhum sinal de hidrogênio vizinho.

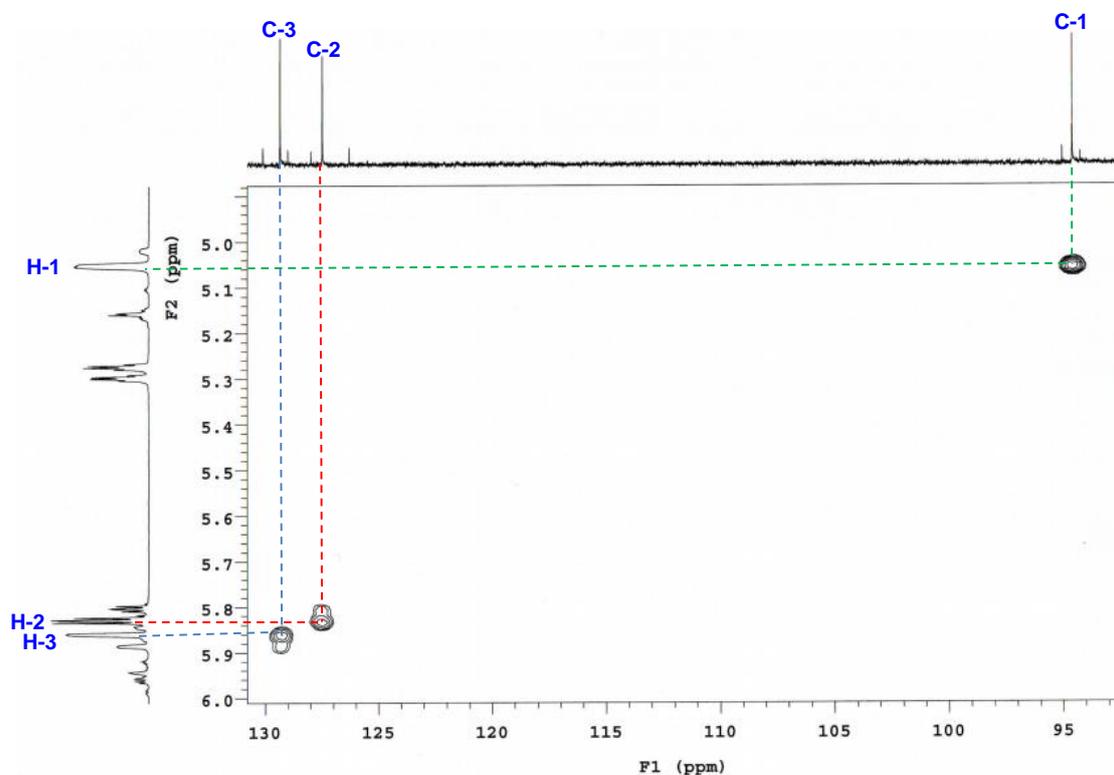


Figura 10. Ampliação do espectro de HSQC (CDCl_3) do composto **3a**.

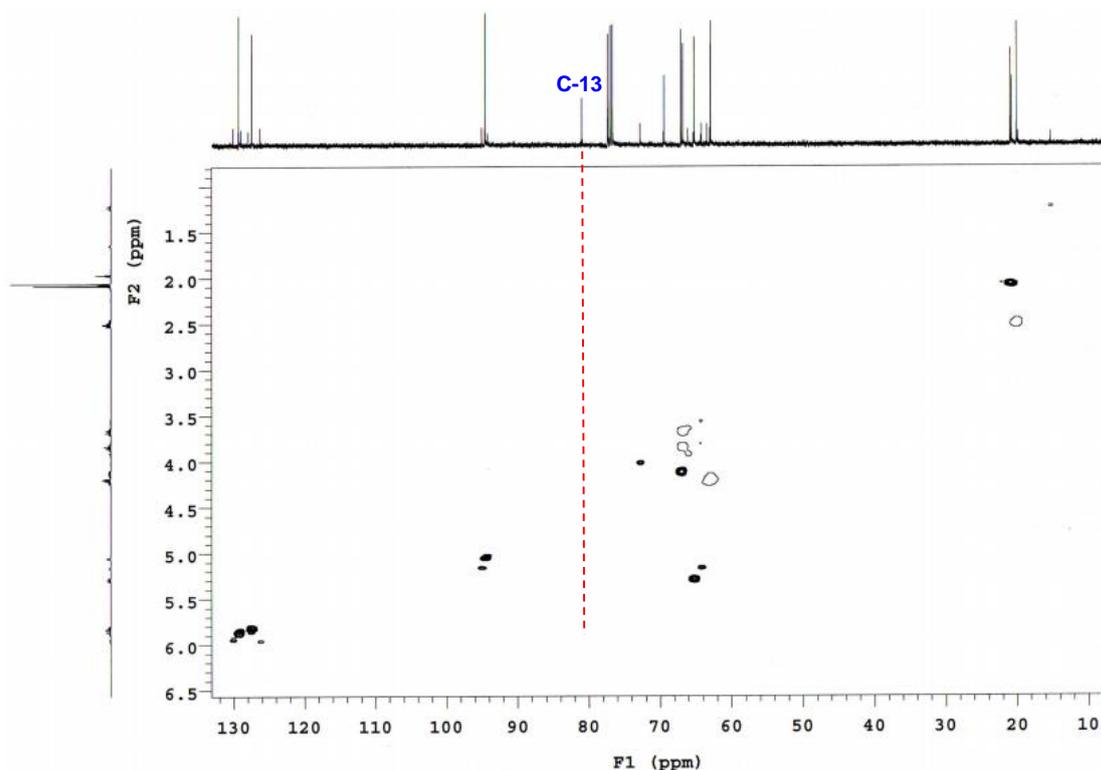


Figura 11. Ampliação do espectro de HSQC (CDCl_3) do composto **3a**.

Os sinais em 69,44, 67,06, 66,83, 65,20 e 62,91 ppm, foram atribuídos aos carbonos C-14, C-5, C-11, C-4 e C-6, respectivamente, devido suas correlações no HSQC (material suplementar). Vale ressaltar que os sinais de carbonos em 20,93, 20,76 e 20,08 ppm foram atribuídos aos sinais de carbono C-8, C-10 e C-12, respectivamente, através do espectro de HSCQ (material suplementar). Esses dados espectroscópicos confirmam a formação majoritária do 3-butin-1-il 4,6-di-*O*-acetil-2,3-didesoxi- α -D-*eritro*-hex-2-enopiranosídeo (**3a**).

Vale ressaltar que a Figura 12 descreve uma proposta mecanística para formação do composto **3a**. Desta forma, inicialmente ocorre a complexação da montmorillonita K-10 e o átomo de oxigênio das carbonilas. Especificamente, a interação da K-10 com o grupo $-\text{OAc}$, ligado a C-3, favorece a saída do complexo K-10 \cdot OAc, gerando o cátion oxônio alílico **A**, o qual é estabilizado pela ausência de grupos elétrons-retiradores em C-2 e pela conjugação entre O, C-1, C-2 e C-3. O grupo $-\text{OAc}$, ligado C-6, estabelece assistência anquimérica ao carbono anomérico formando um novo anel de sete membros (espécie **B**), bloqueando o ataque do nucleófilo pela posição β . A espécie **B** sofre ataque nucleofílico do 3-butin-1-ol (ROH) via mecanismo $\text{S}_{\text{N}}2$ gerando a espécie **C**. Posteriormente, ocorre a abstração de um próton pelo complexo de K-10 \cdot OAc da espécie **C**, fornecendo os 3-butin-1-il 4,6-di-*O*-acetil-2,3-didesoxi- α -D-*eritro*-hex-2-enopiranosídeo (**3a**).

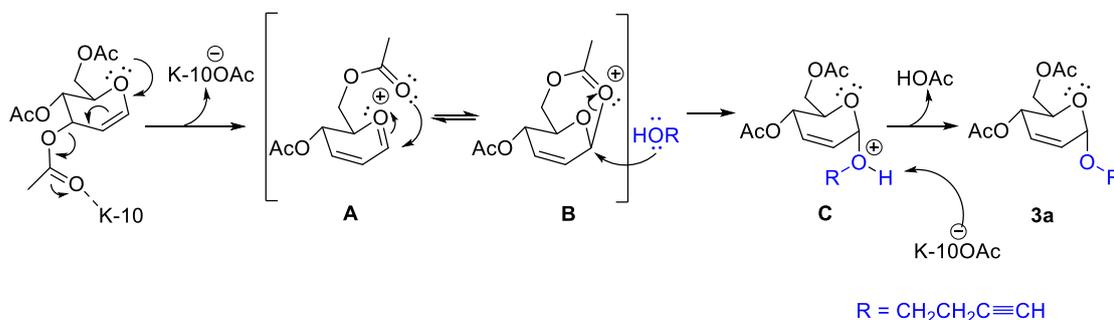
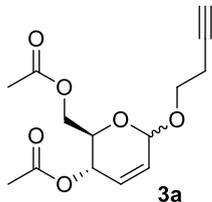


Figura 12. Proposta mecanística para a síntese do composto **3a**.

Uma vez realizado o assinalamento completo do 3-butin-1-il 4,6-di-*O*-acetil-2,3-didesoxi- α -D-*eritro*-hex-2-enopiranosídeo (**3a**), foi realizado um levantamento dos parâmetros físico-químicos desse composto utilizando o programa *Molinspiration Online Property Calculation*, para então avaliar suas propriedades farmacocinéticas baseada na “Regra dos Cinco”. Os resultados obtidos encontram-se listados na Tabela (1).

Tabela 1 - Predição do perfil farmacocinético baseado na “Regra dos cinco”.

Composto	TPSA	cLogP	MM	nDLH	nALH	%ABS
 3a	71,08	1,19	282,3	0	6	84,5 %

A “Regra dos 5” foi desenvolvida por Lipinski et al. (1997) [36] e permite conjecturar se um candidato a fármaco irá exibir uma boa biodisponibilidade oral. Para isso o candidato a fármaco deve apresentar os seguintes pré-requisitos: a) número máximo de cinco grupos doadores de ligação hidrogênio (nDLH); b) número máximo de dez grupos aceptores de ligação hidrogênio (nALH); c) apresentar massa molecular (MM) menor do que 500 Daltons; e d) coeficiente de partição (cLogP) menor que 5.

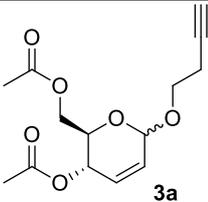
De acordo com a Tabela 1, os pré-requisitos de Lipinski et al. (1997) [36] para o composto **3a** foram todos atendidos, indicando que ele poderá apresentar um bom potencial de biodisponibilidade oral. Vale ressaltar que este dado é extremamente relevante, pois apesar de existir outras vias de administração, a via oral continua sendo a preferencial devido aos benefícios como: não é invasivo, baixo custo, possibilidade de autoadministração, menor risco de desencadear infecções sistêmicas no usuário e maior adesão ao tratamento.

A partir do valor da *Topological Polar Surface Area* (TPSA, tradução - Área da Superfície Polar Topológica) foi possível calcular o percentual de absorção oral teórico (%ABS), com auxílio da equação: $\%ABS = 109 - (0.345 \times TPSA)$. Neste sentido, o percentual de absorção oral para o composto **3a** foi de 84,5%, constatando que em teoria, ele apresentará uma boa absorção pela via oral, resultado este que corrobora com o encontrado para o perfil de biodisponibilidade oral, mediante a regra dos cinco.

Neste sentido, o composto **3a** foi submetido ao bioensaio toxicológico frente ao microcrustáceo *Artemia salina* Leach, em que o valor da taxa de mortalidade da solução variou entre 0 e 100%, visando determinar a concentração letal para matar 50% das larvas (CL_{50}). Como controle positivo foi utilizado o dicromato de potássio e controle negativo o dimetilsulfóxido, uma vez que este foi utilizado como co-solvente.

Deste modo, a CL_{50} do composto **3a** foi de 1124,618 $\mu\text{g/mL}$, com intervalo de confiança nos limites 1076,416 a 1171,839 $\mu\text{g/mL}$, como demonstra a Tabela 2.

Tabela 2. Resultado do teste de toxicidade frente a *Artemia salina*.

Experimento	Composto	CL_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Bioensaio Toxicológico	 3a	1124,618

A CL_{50} do dicromato de potássio (controle positivo) foi de 48,352 $\mu\text{g/mL}$, ($\pm 2,5$), confirmando que o bioensaio realizado não apresentou artêmias resistentes, sendo este valor semelhante ao

descrito por Belém et al. (2015) [43], enquanto que o controle negativo não apresentou valor de CL₅₀ confirmando que o dimetilsufóxido não influenciou nos resultados de toxicidade.

De acordo com, Merino et al. (2015) [44], o composto **3a** apresenta baixa toxicidade, sendo este um resultado bastante relevante, uma vez que inúmeros candidatos a fármacos são descartados devido a problemas de toxicidade [45], além disso, dependendo da terapêutica do candidato, este não pode ser tóxico para as células eucariontes.

Assim, o resultado encontrado para o composto **3a**, tendo em vista as atividades farmacológicas já existentes para esta classe de compostos, servirá como motivação para futuros estudos de atividade biológica ou farmacológica e possíveis modificações na sua estrutura, de forma a melhorar seu potencial terapêutico.

4. CONCLUSÃO

O but-3-in-1-il-4,6-di-*O*-acetil-2,3-didesoxi- α -D-*eritro*-hex-2-enopiranosídeo foi obtido em ótimo rendimento (91%) e através da combinação de técnicas unidimensional (1D) e bidimensional (2D) de RMN, foi possível realizar o assinalamento completo e a confirmação do anômero majoritário da reação de glicosilação. A avaliação do perfil farmacocinético do composto, demonstrou ótimos resultados, com uma boa biodisponibilidade e absorção pela via oral. Além disso, sua toxicidade foi determinada por meio de um método rápido e de baixo custo, apresentando uma CL₅₀ de 1124,618 μ g/mL, indicando uma baixa toxicidade. Assim, o composto é um potencial candidato a fármaco e estes resultados servirão de motivação para futuros estudos envolvendo este composto, a fim de otimizar e potencializar suas atuais propriedades.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às agências de fomento CNPq (434012/2018-1) ao PRONEM/FACEPE (APQ-04761.06/14) pelo suporte financeiro, a CAPES e FACEPE (IBPG-1331-1.06/16 e IBPG-0094-1.06/17) pelas bolsas concedidas e a Central Analítica do DQF-UFPE pelas análises do but-3-in-1-il-4,6-di-*O*-acetil-2,3-didesoxi- α -D-*eritro*-hex-2-enopiranosídeo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Santos CEM, Rodrigues AS. Toxicologia in silico: contexto de aplicação e o modelo de custo-efetividade nos testes alternativos. *RevInter*. 2011 Oct;4(3):113-92, doi :10.22280/revintervol4ed3.97.
2. Victal JC, Valério LB, Oshiro MC, Baptista SC, Pinheiro F. Métodos alternativos in vitro e in silico: métodos auxiliares e substitutivos à experimentação animal. *RevInter*. 2014 Jun;7(2):57-36, doi: 10.22280/revintervol7ed2.172.
3. Rajabi S, Ramazani A, Hamidi M, Naji T. *Artemia salina* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. *J Pharm Sci*. 2015 Feb;23(20):6-1, doi: 10.1186/s40199-015-0105-x.
4. Rocha-Filho CAA, Albuquerque LP, Silva LRS, Silva PCB, Coelho LCBB, Navarro DMAF, Albuquerque MCPA, Melo AMMA, Napoleão TH, Pontual EV, Paiva PMG. Assessment of toxicity of Moringa oleifera flower extract to *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* and *Artemia salina*. *Chemosphere*, 2015 Aug;132(1):192-188, doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.03.041.
5. Bezerra JWA, Costa AR, Silva MAP, Rocha MI, Boligon AA, Rocha JBT, Barros LM, Kamdem JP. Chemical composition and toxicological evaluation of *Hyptis suaveolens* (L.) Poiteau (LAMIACEAE) in *Drosophila melanogaster* and *Artemia salina*. *S Afr J Bot*. 2017 Nov;113(11):442-437, doi: 10.1016/j.sajb.2017.10.003.
6. Srinivas N, Sandeep KS, Anusha Y, Devendra BN. *In vitro* cytotoxic evaluation and detoxification of monocrotaline (Mct) alkaloid: an *in silico* approach. *Int Inv J Bioch Bioinf*. 2014 Mar;2(3):20-29.
7. Lucio Neto MP. Avaliação tóxica, citotóxica, genotóxica e mutagênica do composto 3-(2-cloro-6-fluorobenzil) – imidazolidina-2,4-diona em células eucarióticas (dissertação). Piauí (Teresina): Universidade Federal do Piauí; 2011. 82 p.
8. Zerbib M, Mazauric JP, Meudec E, Guerneve CL, Lepak A, Nidetzky B, Cheynier V, Terrier N, Saucier C. New flavanol O-glycosides in grape and wine. *Food Chem*. 2018 Nov;266(18):448-441, doi: 10.1016/j.foodchem.2018.06.019.
9. Kurimoto S, Okasaka M, Kashiwada Y, Kodzhimatov OK, Tahaiishi Y. A C₁₄-polyacetylenic glucoside with an α -pyrone moiety and four C₁₀-polyacetylenic glucosides from *Mediasia macrophylla*. *Phytochemistry*. 2010 Abr;71(5):692-688. doi: 10.1016/j.phytochem.2009.12.007.

10. Freitas JCR, Couto TR, Paulino AAS, Freitas Filho JR, Malvestiti I, Oliveira RA, Menezes PH. Stereoselective synthesis of pseudoglycosides catalyzed by TeCl₄ under mild conditions. *Tetrahedron Lett.* 2012 Jun;68(41):8654-8645. doi: 10.1016/j.tet.2012.07.070.
11. Moura AL, Lima LMA, Bezerra GB, Freitas JJR, Belian MF, Ramos CS, Avelino RA, Freitas filho JR. O-glicosídeos 2,3-insaturados: aplicações, rearranjo de ferrier e reações. *Quim. Nov.* 2018 Jan;41(5):566-550. doi: 10.21577/0100-4042.20170209.
12. Kim B, Han JW, Thingo M, Le Dang Q, Kim JC, Kim H, Choi GJ. Identification of novel compounds, oleanane- and ursane-type triterpene glycosides, from *Trevesia palmata*: their biocontrol activity against phytopathogenic fungi. *Sci Reports.* 2018 Sep;8(14522):1-11. doi: 10.1038/s41598-018-32956-4.
13. Pellissier H. Use of O-glycosylation in total synthesis. *Tetrahed.* 2005 Mar;61(12):2947-2993, doi: 10.1016/j.tet.2005.01.070.
14. Ganesan K, Kaveriammal S, Sridha S. An in-vitro study on anti-inflammatory and anti-bacterial activities of ethyl acetate extract from the leaves of *Cyclea peltate*. *Indo Am J P Sci.* 2017;4(12):4334-4342. doi: 10.5281/zenodo.1098076.
15. Abdallah HMI, Elshamy AI, Abd El Gendy AEG, El-Gawad AMABD, Omer EA, De Leo M, Pistelli L. Anti-inflammatory, Antipyretic, and Antinociceptive Effects of a *Cressa cretica* Aqueous Extract. *Planta Med.* 2017 Apr;83(17):1313-1320. doi: 10.1055/s-007-35339.
16. Chung I, Kim Y, Ali M, Kim S, Park I, Kim E, Yang Y, Park H, Son E. Triterpene glycosides from red ginseng marc and their anti-inflammatory activities. *Bioorg Med Chem Lett.* 2014 Sep;24(17):4203-4208. doi: 10.1016/j.bmcl.2014.07.042.
17. Xavier NM, Rauter AP. Environmentally friendly approaches to the synthesis of new antibiotics from sugars. *Pure Appl Chem.* 2012 Feb;84(3):803-816. doi: 10.1351/PAC-CON-11-11-11.
18. Matsushima Y, Itoh H, Nakayama T, Horiuchi S, Eguchi T, Kakinuma K. J. Enantioselective total synthesis of vicenistatin, a novel 20-membered macrocyclic lactam antitumor antibiotic. *Chem Soc. Perkin Trans* 2002;1(7):949-958. doi: 10.1039/B111146A.
19. Xue R, Han N, Xia M, Ye C, Hao Z, Wang L, Wang Y, Yang J, Saiki I, Yin. J. TXA₉, a cardiac glycoside from *Streptocaulon juvenas*, exerts a potent anti-tumor activity against human non-small cell lung cancer cells in vitro and in vivo. *Steroids.* 2015 Feb;94(1):51-59. doi: 10.1016/j.steroids.2014.12.015.
20. Romero-Ramírez L, García-Álvarez I, Casas J, Barreda-Manso MA, Yanguas-Casás N, Nieto-sampedro M, Fernández-Mayoralas A. New oleyl glycoside as anti-cancer agent that targets on neutral sphingomyelinase. *Biochem Pharmacol.* 2015 Jul;97(2):158-172. doi: 10.1016/j.bcp.2015.07.009.
21. Li Z, Zhao J, Zhou H, Li L, Ding Y, Li J, Zhou B, Jiang H, Zhong N, Hu W, Yang Z. Cappariloside A shows antiviral and better anti-inflammatory effects against influenza virus via regulating host IFN signaling, in vitro and vivo. *Life Scien.* 2018 Mar;200(1):115-125. doi: 10.1016/j.lfs.2018.03.033.
22. Somei M, Yamada F. The First and simple total Synthesis of Cappariloside A. *Heterocycles.* 2000 Mar;53(7):1578-1573. doi: 10.3987/COM-00-8908.
23. Kimura H, Tokuyama S, Ishihara T, Ogawa S, Yokota, K. Identification of new flavonol O-glycosides from indigo (*Polygonum tinctorium* Lour) leaves and their inhibitory activity against 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *J Pharm Biomed Anal.* 2015 Feb;108(1):112-102. doi: 10.1016/j.jpba.2015.02.005.
24. Xu R, Bai D. A Facile and convergent synthesis of Sarmentosin. *Synth Commun.* 2003 Abr;(0):33, 3363-3355.
25. Hewitt MC, Seeberger PH. Automated Solid-Phase Synthesis of a Branched Leishmania Cap Tetrasaccharide. *Org Lett.* 2001 Out;23(3):37102-3699. doi: 10.1021/ol016631v.
26. Huang JW, Niu HS, Lin MH, Cheng JT, Hsu FL. Antihyperglycemic Effect of Catalpol in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *J Na. Prod.* 2010 Jun;73(6):1172-1170. doi: 10.1021/np9008317.
27. Regueira JLLF, Dantas CR, Freitas JJR, Silva AJFS, Freitas filho JR, Menezes PH, Freitas JCR. Synthesis, 2016, 48,1069.
28. Santos JAM, Santos CS, Almeida CLA, Silva TDS, Freitas filho JR, Militão GCG, Da Silva TG, Da Cruz CHB, Freitas JCR, Menezes PH. Structure-based design, synthesis and antitumoral evaluation of enulosides. *Eur J Med Chem.* 2017 Jan;128:202-192. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.01.036.
29. Dantas CR, Freitas JJ, Barbosa QPS, Militão GCG, Silva TDS, Da Silva TG, Paulino AAS, Oliveira RA, Freitas JCR, Menezes PH. Stereoselective synthesis and antitumoral activity of Z-enyne pseudoglycosides. *Biomol Chem.* 2016 Jan;14(28):6794-6786. doi:10.1039/C6OB00945J.
30. Kaiser CR. RMN 2D: Detecção Inversa e Gradiente de Campo na Determinação Estrutural de Compostos Orgânicos. *Quím Nova.* 2000 Mar;23(2):231-236.
31. Mandal PK, Majumdar A. A Comprehensive Discussion of HSQC and HMQC Pulse Sequences. *Concepts Magn Reson. Part A.* 2004;20(1):1-23. doi: 10.1002/cmr.a.10095.
32. Pereira CF, Pasquini C. Espectroscopia de correlação bidimensional: Fundamentos, aplicações e perspectivas. *Quím Nova.* 2006 Jan;29(1):143-148.

33. Soares ACF, Silva NA, Matos PM, Silva EH, Heleno VCG, Lopes NP, Lopes JLC, Sass DC. Complete ^1H and ^{13}C NMR structural assignments for a group of four goyazensolide-type furanoheliangolides. *Quim Nova* 2012 Oct;35(11):2205-2209.
34. Armarego WLF. Purification of Laboratory Chemicals. Amsterdam: Butterworth Heinemann; 2017. 608 p.
35. Toshima K, Ishizuka T, Matsuo G, Nakata M. Practical Glycosidation Method of Glycals Using Montmorillonite K-10 as an Environmentally Acceptable and Inexpensive Industrial Catalyst. *Chem Rev*. 1995 Abr;1995(4):306-308. doi: 10.1002/chin.199538258.
36. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Del Rev*. 1997;23(1):4-25, doi: 10.1016/S0169-409X(96)00423-1.
37. Meyer BN, Ferrigne NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, Mclaughlin JE. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for active Plant Constituents. *Planta Med*. 1982 May;45(5):31-34, doi: 10.1055/s-2007-971236.
38. Gómez AM, Lobo F, Uriel C, López JC. Recent Developments in the Ferrier Rearrangement. *Eur J Org Chem*. 2013 Sep; 2013(32):7221-7262. doi: 10.1002/ejoc.201300798.
39. TAKHI M, RAHMAN AAH, SCHMIDT RR. Yb(OTf)₃-catalyzed C glycosylation: Highly stereoselective synthesis of C-pseudoglycals. *Tetrahedron Letters*. 2001 Abr;42(24):4056-4053. doi: 10.1016/S0040-4039(01)00628-1.
40. Masson C, Soto J, Bessodes M. Ferric Chloride: a New and Very Efficient Catalyst for the Ferrier Glycosylation Reaction. *Synl*. 2000 1(9):1281–1282. doi:10.1055/s-2000-7138.
41. Kirby AJ. The Anomeric Effect and Related Stereoelectronic Effects at Oxygen. New York: Springer-Verlag; 1983. 152 p.
42. Deslongchamps P. Stereoelectronic Effects in Organic Chemistry. New York: Pergamon Press - Oxford; 1983. 375.
43. Belem VA, Lima FGC, Barros LM, Duarte AE. Estudo da Toxicidade e Atividade Antifúngica de *Lantana Camara L.* (Verbenaceae) como Ferramenta de Preservação da Espécie. *Cad Cult Ciênc*. 2015;13(2):51-59. doi: 10.14295/cad.cult.cienc.v13i2.854.
44. Merino FJZ, Oliveira VB, Paula CS, Cansian FC, Souza AM, Zuchetto M, Hirota BCK, Duarte AFS, Kulik JD, Miguel MD, Miguel OG. Análise fitoquímica, potencial antioxidante e toxicidade do extrato bruto etanólico e das frações da espécie *Senecio westermanii* Dusén frente à *Artemia salina*. *Rev Bras Pl Med*. 2015 Apr;17(4):1031-1040, doi: 10.1590/1983-084x/14_137.
45. Moda TL. Modelagem In silico de propriedades farmacocinéticas para a avaliação de candidatos a novos fármacos [tese]. São Carlos (SP): Universidade de São Paulo; 2011. 216 p.