

**ISADORA CUNHA RIBEIRO**

**AVALAÇÃO DA INIBIÇÃO DA NUCLEOSÍDIO TRIFOSFATO  
DIFOSFOHIDROLASE DE *Trypanosoma cruzi* (TcNTPDase1) POR COMPOSTOS  
SINTÉTICOS NÃO NATURAIS DERIVADOS DA ENT-ISOQUERCETINA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Juliana Lopes Rangel Fietto

Coorientador: Raphael de Souza Vasconcellos

**VIÇOSA – MINAS GERAIS  
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

R484a  
2023  
Ribeiro, Isadora Cunha, 1990-  
Avaliação da inibição da nucleosídeo trifosfato  
difosfohidrolase de *Trypanosoma cruzi* (TcNTPDase1) por  
compostos sintéticos não naturais derivados da *ent*-isoquercetina  
/ Isadora Cunha Ribeiro. – Viçosa, MG, 2023.  
1 tese eletrônica (145 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndice.

Orientador: Juliana Lopes Rangel Fietto.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2023.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.146>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Enzimas. 2. Inibidores enzimáticos. 3. *Trypanosoma  
cruzi*. 4. Chagas, Doença de. I. Fietto, Juliana Lopes Rangel,  
1971-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação  
em Bioquímica Aplicada. III. Título.

CDD 22. ed. 572.7

**ISADORA CUNHA RIBEIRO**

**AVALAÇÃO DA INIBIÇÃO DA NUCLEOSÍDIO TRIFOSFATO  
DIFOSFOHIDROLASE DE *Trypanosoma cruzi* (TcNTPDase1) POR COMPOSTOS  
SINTÉTICOS NÃO NATURAIS DERIVADOS DA ENT-ISOQUERCETINA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 12 de janeiro de 2023.

Assentimento:



Documento assinado digitalmente

ISADORA CUNHA RIBEIRO

Data: 04/05/2023 18:07:29-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Isadora Cunha Ribeiro  
Autora



Documento assinado digitalmente

JULIANA LOPES RANGEL FIETTO

Data: 04/05/2023 16:18:53-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Juliana Lopes Rangel Fietto  
Orientadora

Aos meus pais, Marilza e Ribeiro, e ao meu irmão, Gustavo, sem vocês nada disso seria possível. E ao meu sobrinho e afilhado, Théo, a sua chegada iluminou a vida de todos nós!

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me guiado até aqui, por ser a minha fortaleza e luz nos momentos cruciais da minha vida.

A toda a minha família, em especial aos meus pais e irmão, por sempre me apoiarem em todas as minhas decisões, pelo amor incondicional, dedicação, incentivo e por se fazerem presentes em todos os momentos da minha vida.

Ao Lucas, pelo amor, companheirismo, compreensão, por acreditar em mim nos momentos que não me sinto capaz e por nunca me deixar desanimar nos momentos difíceis.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Juliana Lopes Rangel Fietto, por me acolher durante esses anos em seu grupo de pesquisa, pela orientação e disponibilidade em ajudar e esclarecer dúvidas referentes a este trabalho sempre que necessário.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada e aos professores do Departamento de Bioquímica pelas oportunidades e ensinamentos.

A todos os membros do Laboratório de Infectologia Molecular Animal e do Laboratório de Bioquímica Celular e Bioprodutos, pela boa convivência e por todo o auxílio nos momentos de dúvidas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio.

Aos meus amigos e companheiros de bancada Walmir, Tatiana, Raissa, Joice, João, Nancy e Amanda! Foi um prazer ter vocês comigo durante essa caminhada, obrigada por toda ajuda, pelas reuniões na salinha do café e pelos momentos de descontração.

Ao Sr. Valdir, in memoriam, que durante a sua vida dedicou-se ao seu trabalho no LIMA, sempre auxiliando todos os alunos que por lá passaram.

Por fim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para esse trabalho assim como pela minha formação acadêmica até aqui.

Muito obrigada!

## RESUMO

RIBEIRO, Isadora Cunha, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2023. **Avaliação da inibição da nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase de *Trypanosoma cruzi* (TcNTPDase1) por compostos sintéticos não naturais derivados da *ent*-isoquercetina.** Orientadora: Juliana Lopes Rangel Fietto. Coorientador: Raphael de Souza Vasconcellos.

A Doença de Chagas é uma doença tropical negligenciada causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. O arsenal terapêutico para tratamento é muito restrito, com efeitos colaterais importantes e ação limitada dependendo da fase da doença e de variações das cepas do parasito. Sendo é importante o desenvolvimento de novos fármacos. *T. cruzi* possui em sua superfície uma Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase (E-NTPDase) denominada TcNTPDase1. Já foi demonstrado que a TcNTPDase1 possui papéis importantes para a virulência, infecciosidade e adesão do parasito à célula do hospedeiro mamífero, sendo um potencial alvo para o desenvolvimento de novos medicamentos para tratamento da Doença de Chagas. A quercetina é um flavonóide conhecido por seu papel antioxidante e anti-inflamatório e seu potencial como inibidor de E-NTPDases já foi demonstrado. Este trabalho teve como objetivo a busca de inibidores da TcNTPDase1 recombinante expressa em bactéria. Foram avaliados seis compostos sintéticos (denominados **2**, **4**, **14**, **15**, **16** e **17**) derivados não naturais da *ent*-isoquercetina, bem como a quercetina e a miquelianina (derivado natural da quercetina). No capítulo I, apresentamos o artigo que reúne os dados de síntese e de avaliação como inibidores desses compostos. A quercetina e miquelianina inibiram a enzima em cerca de 50%. Já **16** apresentou a maior capacidade de inibição (96%) e por cinética enzimática determinou-se inibição do tipo competitiva com  $K_i$  de 8,385  $\mu\text{M}$ . Por fim, analisamos a interação do composto **16**, o melhor inibidor, com a enzima por docking molecular, verificando o composto **16** interagiu no sítio ativo da enzima e apresentou interações com resíduos considerados importantes para a atividade catalítica da TcNTPDase1. No capítulo II apresentamos a patente “Compostos derivados da *ent*-isoquercetina, processos de produção e uso como inibidor de NTPDases e em medicamentos para o tratamento da doença de Chagas e Leishmanioses” depositada em maio de 2022. Este trabalho demonstra pela primeira vez que derivados da *ent*-isoquercetina possuem ação inibitória de ENTDPases podendo ser aplicados no desenvolvimento de fármacos ou de inibidores específicos para uso em terapêutica E-NTPDase alvo dependente.

Palavras-chave: Doença de Chagas. E-NTPDases. TcNTPDase1. Inibidores. Quercetina.

## ABSTRACT

RIBEIRO, Isadora Cunha, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, January 2023. **Evaluation of the inhibition of *Trypanosoma cruzi* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (TcNTPDase1) by synthetic non-natural compounds derived from *ent*-isoquercetin.** Advisor: Juliana Lopes Rangel Fietto. Co-advisor: Raphael de Souza Vasconcellos.

Chagas disease is a neglected tropical disease caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*. The therapeutic arsenal for treatment is very limited, with important side effects and limited action depending on the phase of the disease and variations of the parasite strains. Thus, the development of new drugs is important. *T. cruzi* has an Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase (E-NTPDase) called TcNTPDase1 on its surface. TcNTPDase1 has been shown to play important roles in the virulence, infectivity, and adhesion of the parasite to the mammalian host cell, and is a potential target for the development of new drugs for the treatment of Chagas disease. Quercetin is a flavonoid known for its antioxidant and anti-inflammatory role and its potential as an inhibitor of E-NTPDases has already been demonstrated. This work aimed to search for inhibitors of recombinant TcNTPase1 expressed in bacteria. Six synthetic compounds (named **2**, **4**, **14**, **15**, **16** and **17**) non-natural derivatives of *ent*-isoquercetin, as well as quercetin and miquelianin (a natural derivative of quercetin) were evaluated. In chapter I, we present the paper that brings together the synthesis and evaluation data as inhibitors of these compounds. Quercetin and miquelianin inhibited the enzyme by about 50%. The compound **16** showed the highest inhibition capacity (96%) and by enzymatic kinetics it was determined competitive inhibition with  $K_i$  of 8.385  $\mu\text{M}$ . Finally, we analyzed the interaction of compound **16**, the best inhibitor, with the enzyme by molecular docking, verifying that compound **16** interacted in the active site of the enzyme and presented interactions with residues considered important for the catalytic activity of TcNTPDase1. In chapter II we present the patent "*Ent*-isoquercetin derived compounds, production processes and use as inhibitor of NTPDases and in drugs for the treatment of Chagas disease and Leishmaniases" filed in May 2022. This work demonstrates for the first time that *ent*-isoquercetin derivatives possess ENTPDase inhibitory action and can be applied in the development of drugs or specific inhibitors for use in E-NTPDase target-dependent therapeutics.

Keywords: Chagas disease. E-NTPDases. TcNTPDase1. Inhibitors. Quercetin.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>10</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>13</b>
2.1. EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA DE CHAGAS.....	13
2.2. TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS.....	15
2.3. NTPDASES E TcNTPDASE1 .....	17
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>21</b>
3.1. OBJETIVO GERAL .....	21
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
<b>4. REFERENCIAS .....</b>	<b>22</b>
<b>CAPITULO I: ARTIGO - SÍNTESE DOS DERIVADOS NÃO NATURAIS L-GLICOSÍDICOS FLAVONÓIDES E SUA AVALIAÇÃO COMO INIBIDORES DA ECTO NUCLEOSÍDEO TRIFOSFATO DIFOSFOHIDROLASE 1 DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> (TCNTPDASE1) .....</b>	<b>32</b>
<b>5. INTRODUCTION .....</b>	<b>35</b>
<b>6. MATERIAL AND METHODS.....</b>	<b>37</b>
6.1. EXPERIMENTAL GENERAL PROCEDURES .....	37
6.2. SYNTHESIS.....	38
6.3. BACTERIAL HETEROLOGOUS EXPRESSION AND PURIFICATION OF rTcNTPDASE1 .....	41
6.4. DETERMINATION rTcNTPDASE1 CONCENTRATION .....	41
6.5. DILUTION AND STORAGE OF COMPOUNDS .....	41
6.6. ENZYMATIC ACTIVITY ASSAYS.....	41
6.7. DETERMINATION OF IC <sub>50</sub> .....	42
6.8. DETERMINATION OF THE APPARENT K <sub>M</sub> AND THE INHIBITION CONSTANT (K <sub>I</sub> ) .....	42
6.9. MOLECULAR MODELING .....	43
6.10. MOLECULAR DYNAMICS AND CLUSTERIZATION.....	43
6.11. DOCKING .....	43
6.12. PREDICTION OF PROTEIN-LIGAND INTERACTIONS AND VISUALIZATION .....	44
6.13. STATISTICAL ANALYSIS .....	44

<b>7. RESULTS.....</b>	<b>44</b>
7.1. PREPARATION OF 2,3,4,6-TETRA-O-ACETYL- $\alpha$ -L-GLUCOPYRANOSYL BROMIDE (5).....	44
7.2. SYNTHESIS OF QUERCETIN-3-O-B-L-GLUCOSIDE DERIVATIVES (12) AND (13).....	45
7.3. PREPARATION OF QUERCETIN-3-O-B-L-GLUCOSIDE (2) AND 5,7,4',5'- TETRAMETHYL- QUERCETIN-3-O-B-GLUCOSIDE DERIVATIVE (4).....	46
7.4. EVALUATION OF INHIBITION OF rTcNTPDASE1 BY QUERCETIN AND DERIVATIVE COMPOUNDS .....	48
7.5. KINETIC PARAMETERS OF rTcNTPDASE1.....	51
7.6. DETERMINATION OF THE TYPE OF INHIBITION OF 16 .....	52
7.7. MOLECULAR MODELING AND DOCKING OF TcNTPDASE1.....	54
<b>8. DISCUSSION.....</b>	<b>59</b>
<b>9. CONCLUSIONS.....</b>	<b>63</b>
<b>10. REFERENCES .....</b>	<b>64</b>
<b>11. ONLINE RESOURCE .....</b>	<b>74</b>
<b>CAPITULO II: PATENTE – COMPOSTOS DERIVADOS DA ENT- ISOQUERCETINA, PROCESSOS DE PRODUÇÃO E USO COMO INIBIDOR DE NTPDASES E EM MEDICAMENTOS PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS E LEISHMANIOSES.....</b>	<b>83</b>
<b>DADOS DOS DEPOSITANTES E DOS INVENTORES.....</b>	<b>84</b>
<b>RELATÓRO DESCRITIVO.....</b>	<b>98</b>
<b>REIVINDICAÇÕES.....</b>	<b>136</b>
<b>FIGURAS.....</b>	<b>141</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>144</b>
<b>12. CONCLUSÃO GERAL.....</b>	<b>145</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A Doença de Chagas foi descoberta em 1909, pelo médico Carlos Chagas (CHAGAS, 1909). Essa doença é causada pelo parasito protozoário *Trypanosoma cruzi*, é classificada pela Organização Mundial de Saúde (OMS/WHO) como uma doença tropical negligenciada e é responsável pela morte de 12.000 pessoas por ano na América latina, onde é considerada endêmica na maioria dos países (PAHO, 2022). Estima-se que haja entre 6 a 8 milhões de pessoas infectadas no mundo (WHO, 2022). Inicialmente confinada à América do Sul e Central, nos últimos anos, devido aos movimentos migratórios, houve uma mudança nesse cenário (NUNES et al., 2013), havendo relatos de aumento de casos em países não endêmicos na Europa, Estados Unidos, Canadá, Japão e Austrália (ANTINORI et al., 2017; BERN et al., 2020).

O patógeno que causa a doença é transmitido ao homem e a outros mamíferos através das fezes e urina de insetos fêmea de triatomíneos hematófagos contaminados. No Brasil, o principal vetor é o *Triatoma infestans*, conhecido como “barbeiro”. Contudo, a transmissão também pode ocorrer pela transfusão de sangue, transmissão congênita, transplante de órgão e consumo de alimentos contaminados (CEVALLOS; HERNÁNDEZ, 2014; RASSI et al., 2010). A Doença de Chagas possui duas fases clínicas distintas e bem definidas: a fase aguda que ocorre no início da infecção, sendo caracterizada por alta parasitemia, já a fase crônica, que começa de 2 a 3 meses após a infecção inicial é caracterizada pela infecção em taxas mais baixa e restrita a tecidos musculares específicos (RASSI et al., 2012).

O tratamento da Doença de Chagas limita-se ao uso de apenas duas drogas nifurtimox e benznidazol, sendo que no Brasil, apenas o benznidazol é indicado e comercializado para o tratamento (RODRIGUES COURA; DE CASTRO, 2002). Esses medicamentos são eficazes na fase aguda da doença, porém a eficiência diminui drasticamente na fase crônica. Além disso, os remédios são contraindicados para mulheres grávidas e para pessoas que tenham insuficiência renal ou hepática, e no caso do nifurtimox para pessoas com distúrbios neurológicos ou psiquiátricos (WHO, 2022). Outros problemas relacionados ao tratamento são a alta taxa de efeitos colaterais (40% em adultos), o alto custo do tratamento e a ineficiência da distribuição (KIRCHHOFF, 2000; KRATZ, 2019).

*T. cruzi* é um parasito protozoário hemoflagelado que pertence à família Trypanosomatidae e que possui em sua superfície celular uma enzima da família das Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase “E-NTPDase” denominada TcNTPDase1 (FIETTO et al., 2004). As NTPDases fazem são capazes de hidrolisar nucleotídeos tri e difosfatados

fazendo parte do controle do sistema de sinalização purinérgica mediado por nucleotídeos extracelulares (ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006). Já foi demonstrado que diversos parasitos possuem NTPDases e que esta enzima está relacionada com a virulência, infecciosidade, desses patógenos, bem como no controle de funções ligadas à hidrólise de ATP e ADP, como sobrevivência intracelular e modulação do sistema imune do hospedeiro vertebrado (DA SILVA et al., 2020; PAES-VIEIRA; GOMES-VIEIRA; MEYER-FERNANDES, 2021; SANSOM, 2012).

Já foi demonstrado que a TcNTPDase1 possui importante papel na infecciosidade, virulência e adesão do *T. cruzi* à célula do hospedeiro, visto que sua inibição parcial ou bloqueio por anticorpos levam à decaimentos significativos da infecção in vitro e in vivo (BISAGGIO et al., 2003; MARIOTINI-MOURA et al., 2014; SANTOS et al., 2009; SILVA-GOMES et al., 2014). O grupo de pesquisa coordenado pela Prof.<sup>a</sup> Dra. Juliana Lopes Rangel Fietto vem estudando, já há alguns anos, as E-NTPDases dos tripanossomatídeos e a relação dessas enzimas com a virulência, capacidade infecciosa, adesão e controle da resposta imune do hospedeiro (FIETTO et al., 2004; MAIOLI et al., 2004; MARIOTINI-MOURA et al., 2014; SANTOS et al., 2009; VASCONCELLOS et al., 2014). Esses resultados nos fazem supor que as E-NTPDases são um potencial alvo para a formulação de novos tratamentos para doenças causadas por tripanossomatídeos como a Doença de Chagas e as Leishmanioses.

Dessa forma, nosso grupo de pesquisa deu início à busca de possíveis inibidores da TcNTPDase-1 que possam ser usados no desenvolvimento de fármacos para o tratamento da Doença de Chagas. Durante esses anos, muitos compostos, com uma grande variedade química foram testados como os análogos de adenina, extratos florais e de microrganismos, compostos naturais purificados e alguns compostos comerciais (MARIOTINI-MOURA, 2010, 2014; RIBEIRO, 2016; SANTOS et al., 2009). Dentre os compostos previamente testados foi detectada inibição significativa por um composto derivado da quercetina e da própria quercetina. Entretanto, o composto mais ativo se mostrou instável ao longo do tempo e não pode ser produzido novamente por purificação do extrato originário pelos pesquisadores colaboradores. Assim, surgiu o interesse de focarmos na quercetina e seus derivados glicosídicos, por serem conhecidos por suas propriedades anti-inflamatórias, antivirais e antitumorais (KOWALSKI et al., 2020; LI et al., 2016; SALEHI et al., 2020). Além disso, há na literatura estudos que mostram que a quercetina pode atuar como inibidor parcial de E-NTPDases (BALDISSARELLI et al., 2016; SACCOL et al., 2019). Logo, em parceria com o

Professor Dr. Gaspar Diaz Muñoz (UFMG), foi proposta a síntese de um composto derivado não natural da quercetina, quercetina-3-O-L-glicopiranosídeo ou *ent*-isoquercetina.

Assim, neste trabalho este composto e alguns intermediários da síntese a partir da rotina foram testados quanto à capacidade de inibir a TcNTPDase1 recombinante (rTcNTPDase1) expressa em bactéria. Os resultados desta pesquisa fazem parte do capítulo 1 desta Tese de doutorado, o qual apresenta um artigo científico a ser submetido para publicação. O segundo capítulo desta Tese apresenta a patente depositada no INPI que demonstra que os inibidores desenvolvidos podem também ser aplicados na inibição de outras NTPDases como a NTPDase2 de *Leishmania braziliensis* e NTPDase2 de *Leishmania infantum*, patógenos causadores de Leishmaniose em humanos e outros mamíferos. Na patente o uso dos inibidores para a família das E-NTPDases é expandido e o uso como medicamentos é previsto, uma vez que os inibidores também foram capazes de inibir a infecção *in vitro* de *T. cruzi* e de *Leishmania*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Epidemiologia da Doença de Chagas

A Doença de Chagas é uma doença tropical negligenciada causada pelo parasito protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909). Assim como outros protozoários desta família, é um parasito obrigatório que possui ciclo de vida heteroxênico, ou seja, o ciclo de vida é dividido entre o hospedeiro invertebrado e o hospedeiro vertebrado (MORILLO et al., 2013; RASSI et al., 2012). Estima-se que 6 a 8 milhões de pessoas estejam infectadas com a doença em todo o mundo (WHO, 2022).

Durante seu ciclo de vida, *T. cruzi* apresenta três morfologias: a forma epimastigota que é encontrada no intestino do hospedeiro invertebrado, onde o parasito se divide ativamente por fissão binária; a forma amastigota que é responsável pela multiplicação intracelular no hospedeiro vertebrado, e a forma tripomastigota que é a forma infecciosa do parasito para os hospedeiros mamíferos e podem ser encontrados como tripomastigota sanguíneo e tripomastigota metacíclico (DE SOUZA et al., 2010; TYLER; ENGMAN, 2001). A infecção é transmitida ao homem e a outros animais vertebrados através das fezes e urina de insetos fêmea de triatomíneos hematófagos contaminados. No Brasil, assim com na maioria dos países da América do Sul, o principal vetor é o *Triatoma infestans*, popularmente conhecido como “barbeiro”. No entanto, a infecção também pode acontecer via outras espécies do vetor, bem como por transfusão de sangue, transmissão congênita, transplante de órgão e consumo de alimentos contaminados com formas infecciosas do parasito (CEVALLOS; HERNÁNDEZ, 2014; RASSI et al., 2010).

A Doença de Chagas possui duas fases clínicas distintas e bem definidas: a fase aguda que é caracterizada por alta parasitemia, na qual todos os tipos de células nucleadas do hospedeiro humano podem ser infectados. E a fase crônica, que começa de 2 a 3 meses após a infecção inicial e é caracterizada pela infecção em taxas mais baixas e de tecidos musculares específicos (RASSI et al., 2012). Na fase aguda a maioria dos casos são oligossintomáticos ou assintomáticos. Havendo manifestação de sinais clínicos no local de inoculação do parasito, como o inchaço das pálpebras (Sinal de Romana) ou lesões na pele (Chagoma de inoculação) (WHO, 2018). No caso da fase crônica podemos observar diferentes formas clínicas, a forma assintomática ou indeterminada que permanece ao longo da vida na maioria dos pacientes, forma cardíaca que afeta músculo do miocárdio levando a complicações cardíacas, forma digestiva que leva a lesões localizadas e alargamento do esôfago e a forma mista (STEVERDING, 2014).

Historicamente, a doença estava limitada a América do Sul e Central, uma vez que a presença dos insetos vetores, as condições precárias de moradias nas áreas rurais e os fatores ambientais favoreciam a transmissão natural. No entanto, houve uma mudança no perfil epidemiológico nas últimas décadas, devido a movimentos migratórios e a globalização que levaram a doença para além da América Latina (NUNES et al., 2013). Países da Europa, América do Norte, o Japão e a Austrália vêm relatando o aumento no número de casos, sendo que nesses países as principais formas de transmissão são por transplante de órgão, transfusão de sangue e transmissão congênita (ANTINORI et al., 2017; BERN et al., 2011; CEVALLOS; HERNÁNDEZ, 2014). O CDC estima que, atualmente há 300.000 pessoas infectadas com *T. cruzi* vivendo nos Estados Unidos, a maioria dessas pessoas é imigrante e adquiriram a doença em seus países de origem (CDC, 2022).

A Doença de Chagas é endêmica em 21 países da América Latina, havendo uma incidência anual de 30.000 novos casos e cerca de 12.000 mortes por ano. Além disso, 70 milhões de pessoas moram em regiões endêmicas e estão sob-risco de contrair a doença (PAHO, 2022; WHO, 2022). No Brasil, houve uma redução no número de novos casos, devido às políticas de controle da transmissão vetorial e por transfusão de sangue, que se iniciou na década de 80. Em 2006, o país recebeu certificação internacional pela interrupção da transmissão de Doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* (FERREIRA; SILVA, 2006; FIOCRUZ, 2013).

No entanto, o Brasil voltou a registrar novos casos da doença, entre 2007 e 2016 o Ministério da Saúde confirmou casos da fase aguda da doença na maioria dos estados brasileiros, havendo uma maior concentração dos casos na região norte do país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). A transmissão oral foi a grande responsável pelo aumento de novos casos havendo registro de surtos da doença pelo consumo de alimentos contaminados não só no Brasil na Amazônia legal, mas também na Venezuela (NOYA et al., 2010; RUEDA et al., 2014).

Em 2020, foram confirmados 146 casos de Doença de Chagas aguda no Brasil, sendo que 2% dos casos foram letais e ocorreram no Pará. A região norte apresentou a maior taxa de incidência, 95% seguida pela região sudeste com 2,74%, nordeste com 2,05% e sul com 0,68%. Não houve confirmação de casos na região centro-oeste. A forma de transmissão oral foi a mais frequentemente registrada, seguida da sem identificação da provável fonte de infecção (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

Outro ponto importante a se observar, é o número de óbitos registrados por COVID-19 em 2020, que faziam menção à doença de Chagas enquanto comorbidade que contribuiu para a morte dos pacientes: foram relatados 125.691 óbitos por covid19 entre março e Agosto de 2020 dos quais 0,2% relataram a comorbidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021). Por seu potencial de causar problemas cardíacos, a Doença de Chagas torna-se um importante fator de risco, aumentando a suscetibilidade às complicações da COVID-19. Além dos cuidados especiais que as pessoas portadoras de cardiomiopatia chagásica crônica requerem, a pandemia também afetou a notificação de casos e o fornecimento de tratamento adequado às pessoas com Doença de Chagas (ZAIDEL et al., 2020).

## **2.2. Tratamento da Doença de Chagas**

A Doença de Chagas foi descoberta há mais de 100 anos e junto com a sua descoberta, iniciou-se a busca por compostos para serem usados no tratamento da doença. Apenas na década de 70, foi possível o uso de dois compostos Nifurtimox e Benznidazol (RODRIGUES COURA; DE CASTRO, 2002). Atualmente, esses dois compostos continuam sendo os únicos utilizados no tratamento da Doença de Chagas (WHO, 2022). No Brasil, o uso do Nifurtimox foi suspenso desde a década de 80, por apresentar um mecanismo de ação ineficiente contra *T. cruzi*, além de alta toxicidade (RODRIGUES COURA; DE CASTRO, 2002), logo apenas o Benznidazol é utilizado e comercializado para o tratamento da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

O tratamento com Nifurtimox e Benznidazol é longo, entre 60 a 90 dias, e deve ser feito em ambiente ambulatorial sendo indicado em casos de infecções na fase aguda (incluindo recém-nascidos ou lactentes com transmissão congênita), caso de reativação durante a fase crônica, pacientes crônicos até 18 anos e mulheres infectadas em idade fértil (com uso conjunto de anticoncepcionais) (KRATZ, 2019). No entanto a OMS, não indica o tratamento com Nifurtimox e Benznidazol para mulheres grávidas e para pacientes que possuem outras doenças graves associadas à Doença de Chagas (WHO, 2018).

Ambos os medicamentos são mais eficazes quando administrados nas fases iniciais da infecção, havendo diminuição de sua eficácia quanto mais tempo tenha passado da infecção. Além disso, podem ocorrer efeitos colaterais em 40% dos adultos tratados, sendo mais frequentes em pessoas de idade avançada (WHO, 2022). Os efeitos colaterais mais comuns durante o tratamento são anorexia, náuseas, vômitos, dor de cabeça, depressão do sistema

nervoso central ou sintomas maníacos, convulsões, vertigem, parestesias, polineuropatias periféricas e dermatite (KIRCHHOFF, 2000).

Muito se discute sobre a eficácia do tratamento durante a fase crônica, isso porque mesmo havendo uma redução da carga parasitária, em alguns casos, os parasitos persistem e podem ser detectados por testes, como PCR e de soroconversão, o que dificulta a comprovação da cura desses pacientes (CHATELAIN, 2015; KRATZ, 2019). Além disso, mesmo havendo uma diminuição da carga parasitária e indicações de uma diminuição da morbidade e mortalidade, não há evidências de uma melhora clínica dos pacientes com cardiomiopatia chagásica estabelecida (CARDOSO et al., 2018; MORILLO et al., 2015).

O fator econômico também impõe limitações aos tratamentos atuais, uma vez que são caros e a maioria da população afetada pela doença não possuem recursos para adquiri-los. Mesmo que a OMS e que alguns países como o Brasil façam a distribuição gratuita dos medicamentos para os pacientes, a oferta e distribuição dos medicamentos são na maioria das vezes insuficientes (KRATZ, 2019; MENDES et al., 2022). A pandemia de COVID-19 fez esse cenário piorar, pois os pacientes com Doença de Chagas estão no grupo de risco e necessitam de cuidados especiais, a dificuldade de diagnóstico e o impacto econômico da pandemia afetaram principalmente aqueles com menos recursos, dificultando ainda mais o acesso aos cuidados. Além disso, os recursos enviados por instituições filantrópicas e indústrias para pesquisa, desenvolvimento e/ou fornecimento dos tratamentos diminuiram ainda mais nesse novo cenário (ZAIDEL et al., 2020; ZAIDEL; LIPRADI, 2021, 2022).

Dessa forma, a busca por novos compostos que possam ser usados no tratamento da doença de chagas de forma segura e acessível é extremamente necessária. Essa busca passa pela triagem e seleção de compostos que sejam eficientes contra uma molécula alvo. Além disso, a caracterização e estudos de validação das moléculas alvos também são importantes, assim como a abordagem escolhida para o desenvolvimento de medicamentos de forma racional (GUIDO et al., 2010; KRATZ, 2019).

Em 2017 Sueth-Santiago e colaboradores (2017), mostraram em uma revisão os desafios na quimioterapia da Doença de Chagas e como o aprofundamento no conhecimento, tanto do parasito como dos alvos bioquímicos do hospedeiro, podem fazer a diferença para o desenvolvimento de novos medicamentos. Em seu levantamento, apenas quatro moléculas alvos aparecem como as mais estudadas e com o maior número de artigos publicados: a Tripanotiona, a cruzipaina, a tubulina e a estero1-14- $\alpha$ -desmetilase (CYP51) (SUETH-SANTIAGO et al., 2017). Mesmo que nos últimos anos muitos estudos tenham sido

desenvolvidos, infelizmente, poucas drogas testadas até os dias atuais chegaram à fase de testes pré-clínicos e apresentam pouca variabilidade química (DNNDI, 2022).

Sendo assim, a busca por novos tratamentos para a Doença de Chagas, ainda se faz necessária. O estudo mais abrangente de possíveis moléculas-alvo e o uso de ferramentas e abordagens adequadas, além do maior entendimento sobre *T. cruzi* e o estabelecimento da infecção, principalmente no que diz respeito à modulação da resposta imune do hospedeiro podem fazer a diferença e são os principais pontos a serem observados (GOLDENBERG, 2022; KRATZ, 2019).

### 2.3. NTPDases E TcNTPDase1

As ectonucleotidases são enzimas localizadas na superfície celular que são capazes de hidrolisar nucleotídeos extracelulares. O controle dos níveis de nucleotídeos em especial do ATP, ADP, UTP e UDP é de grande importância, uma vez que estes nucleotídeos controlam várias respostas celulares via modulação direta da sinalização via receptores purinérgicos. O ATP ativa a sinalização por P2X, já os receptores P2Y são ativados por ATP, UTP, ADP, UDP, ITP e seus açúcares e a adenosina ativa a sinalização de receptores P1 (LAZAROWSKI, 2003; MÜLLER, 2002; NORTH, 2022).

As Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (E-NTPDases) são ectonucleotidases capazes de hidrolisar nucleotídeos tri e/ou difosfatados a seus componentes monofosfatados, (ROBSON et al., 2006; ZIMMERMANN, 2000). Essas enzimas são também conhecidas como apirases da família do marcador de linfócitos CD39 e compartilham cinco regiões de domínio conservado, conhecidos como “Apyrase Conserved Regions” (ACRs) (HANDA; GUIDOTTI, 1996; SCHULTE et al., 1999). As ACRs são importantes para a formação do sítio catalítico dessas enzimas (SMITH; KIRLEY, 1999) e já foi demonstrado que deleções e mutações nas ACR afetam a hidrólise e especificidade pelo substrato (DROSPOULOS et al., 2000; GRINTHAL; GUIDOTTI, 2000; SMITH et al., 1999).

Em mamíferos, as E-NTPDases compreendem pelo menos oito diferentes membros. Quatro dessas enzimas (NTPDase1, 2, 3, 8) são E-NTPDases localizadas na superfície celular e possuem seu sítio catalítico no espaço extracelular. As NTPDases 5 e 6 exibem localização intracelular e podem sofrer secreção após expressão heteróloga. As NTPDases 4 e 7 possuem uma localização inteiramente intracelular (ZIMMERMANN, 2021; ZIMMERMANN et al., 2012).

Já foi demonstrado por evidências bioquímicas e/ou moleculares que as E-NTPDases estão presentes em diversos parasitos como *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma ssp.*, *Leishmania ssp.*, *Trichomonas vaginalis*, *Plasmodium falciparum* e *Schistosoma mansoni* (SANSOM, 2012). Essas enzimas desempenham um importante papel na nutrição, virulência, infecciosidade e adesão à célula hospedeira. Observa-se também que a hidrólise de ATP e ADP por estas enzimas tem o potencial para subverter e evitar os mecanismos de defesa da sinalização purinérgica do hospedeiro (DA SILVA et al., 2020, 2023; FIGUEIREDO et al., 2016; MORROT et al., 2016; PAES-VIEIRA et al., 2022; PAES-VIEIRA et al., 2021; PERES et al., 2018; SANSOM, 2012; SANSOM et al., 2008; SILVA-GOMES et al., 2020)

*T. cruzi* possui em seu genoma apenas um gene que codifica para uma E-NTPDase, denominada TcNTPDase1, que foi identificada, caracterizada e logo após expressa em sistema bacteriano a partir de seu mRNA (FIETTO et al., 2004; SANTOS et al., 2009). Estudos demonstraram que a TcNTPDase1 tem papel importante na virulência, infecciosidade, na adaptação às condições de estresse e na adesão do parasito à célula do hospedeiro mamífero (LEITE et al., 2020; MARIOTINI-MOURA et al., 2014; SANTOS et al., 2009; SILVA-GOMES et al., 2014, 2020).

Em 2004, Fietto e colaboradores identificaram e caracterizaram a atividade da TcNTPDase1 na superfície de parasitos vivos intactos. A enzima demonstrou ser resistente aos inibidores de ATPases e fosfatases e apresentou ampla especificidade de substrato, hidrolisando ATP, ADP, UTP, UDP, GTP e GDP. Além disso, foi demonstrado que a forma infecciosa (tripomastigota) apresentava uma razão de hidrólise ATP/ADP maior que a forma não infecciosa (epimastigota), o que sugeriu um possível papel da enzima nos mecanismos de virulência do parasito (FIETTO et al., 2004).

Posteriormente, foi demonstrada relação entre a hidrólise de ATP extracelular e a infecciosidade e virulência de *T. cruzi*. Para avaliar a importância da atividade da TcNTPDase1 na infecciosidade de *T. cruzi* foram utilizados três inibidores parciais de ecto-NTPDase conhecidos: ARL67156, Gadolinium e Suramina. Observou-se que tripomastigotas de primeira passagem tratados com esses inibidores, especialmente a Suramina, mostraram redução significativa da infecciosidade in vitro e da virulência in vivo (em modelo murino). A suramina também inibiu a TcNTPDase1 recombinante de *T. cruzi*. Foi sugerido que a TcNTPDase1 seria um bom alvo molecular para a formulação de novos tratamentos para a Doença de Chagas (SANTOS et al., 2009).

No entanto, a aplicabilidade da suramina quanto à sua capacidade farmacológica foi reconsiderada nos últimos anos. Isso porque a suramina não é um inibidor específico da TcNTPdase1, atuando também como antagonista de receptores P2 em células de mamíferos (LAMBRECHT et al., 2002). Estudos demonstraram que o uso da suramina para tratar camundongos infectados com *T. cruzi* aumentou a parasitemia, o conteúdo de DNA de parasita no tecido cardíaco, a inflamação, o dano tecidual oxidativo e a mortalidade (NOVAES et al., 2018; SANTOS et al., 2015). Além disso, ao ser combinada com o benznidazol, a gravidade da infecção foi atenuada, no entanto a terapia com suramina teve um efeito mais prejudicial no hospedeiro do que no parasita, além de reduzir a eficácia do benznidazol contra a infecção pelo *T. cruzi* (SANTOS et al., 2015).

Com relação à adesão, Mariotini-Moura e colaboradores (2014) demonstraram a importância da TcNTPDase1 na adesão do parasito na célula hospedeira. Os ensaios de adesão foram feitos utilizando anticorpos policlonais anti-TcNTPDase-1 como um bloqueador ou a proteína purificada TcNTPDase-1 recombinante como um competidor para tratar os parasitos havendo diminuição da adesão desses parasitos tratados em relação aos não tratados.

Silva-Gomes e colaboradores (2020) demonstraram através do *Knocking down* do gene TcNTPDase1, que a TcNTPDase1 tem papel crucial na infecciosidade do *T. cruzi*. Isso porque parasitos com o silenciamento parcial do gene apresentaram taxa de infecção mais baixa, enquanto parasitos superexpressando o gene TcNTPDase1 apresentaram aumento na taxa de infecção. Além disso, houve diminuição dos níveis de expressão do gene tanto nos epimastigotas quanto nos tripomastigotas com deleção de um único alelo. Vale mencionar que, os autores não conseguiram obter epimastigotas de *T. cruzi* viáveis quando realizaram o knockout do gene, o que evidencia que o gene da TcNTPDase1 é essencial para a sobrevivência do parasito, muito provavelmente devido a sua importância na via de salvação de purinas e outras vias que dependam dos produtos da ação da enzima (SILVA-GOMES et al., 2020).

Todos esses dados mostram que a TcNTPdase1 seria um bom alvo para a busca racional de inibidores, que possam ser usados na concepção de novos medicamentos para o tratamento da doença de Chagas. Além disso, a especificidade destes inibidores é importante, uma vez que, inibidores não específicos, como a suramina, também afetam a sinalização purinérgica do hospedeiro o que pode levar a resultados indesejados e/ou agravamento da infecção causada por *T. cruzi*.

Por fim, o uso da TcNTPDase1 para o desenvolvimento de biofármacos com potencial profilático para a doença de Chagas também deve ser potencialmente considerado. Recentemente, tanto a proteína recombinante quanto o gene que codifica para a TcNTPDase1 foram utilizados como biofármacos e demonstraram resultados promissores, levando ao aumento da resposta protetora do hospedeiro (resposta Th17) e a uma diminuição na presença de parasito (PAULA et al., 2022).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Este trabalho teve como objetivo a busca racional de compostos que possam ser usados como inibidores da NTPDase1 de *T. cruzi* para serem aplicados no desenvolvimento de novos tratamentos para a doença de Chagas.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Expressar a TcNTPDase1 recombinante ativa em sistema bacteriano;
- Avaliar a capacidade inibitória dos compostos obtidos na síntese em relação à atividade enzimática da TcNTPDase1 recombinante (rTCNTPDase);
- Analisar a cinética enzimática da rTcNTPDase1 tendo como substrato o UDP, na ausência e presença de possíveis inibidores;
- Caracterizar o tipo de inibição do composto mais promissor;
- Analisar por docking a interação do inibidor com a TcNTPDase1;
- Realizar a escrita do relatório descritivo usado no depósito do pedido de patente dos compostos sintéticos.

#### 4. REFERENCIAS

- ABBASZADEH, S. et al. Biocompatibility, cytotoxicity, antimicrobial and epigenetic effects of novel chitosan-based quercetin nanohydrogel in human cancer cells. **International Journal of Nanomedicine**, v. 15, p. 5963–5975, 2020.
- ANTINORI, S. et al. Chagas disease in Europe: A review for the internist in the globalized world. **European Journal of Internal Medicine**, v. 43, p. 6–15, 2017.
- BALDISSARELLI, J. et al. Quercetin changes purinergic enzyme activities and oxidative profile in platelets of rats with hypothyroidism. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 84, p. 1849–1857, 2016.
- BERN, C. et al. *Trypanosoma cruzi* and Chagas ' Disease in the United States. **CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS**, v. 24, n. 4, p. 655–681, 2011.
- BERN, C. et al. crossm Chagas Disease in the United States : a Public Health Approach. **CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS**, v. 33, n. 1, p. 1–42, 2020.
- BIANCATELLI, R. M. L. C. et al. Quercetin and Vitamin C: An Experimental, Synergistic Therapy for the Prevention and Treatment of SARS-CoV-2 Related Disease (COVID-19). **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. June, p. 1–11, 2020.
- BISAGGIO, D. F. R. et al. Ecto-ATPase activity on the surface of *Trypanosoma cruzi* and its possible role in the parasite-host cell interaction. **Parasitology Research**, v. 91, n. 4, p. 273–282, 2003.
- BOUKTAIB, M.; ATMANI, A.; ROLANDO, C. **Tetrahedron Letters**. [s.l: s.n.]. v. 43.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248–254, 1976.
- CALIL, F. A. et al. Immobilization of NTPDase-1 from *trypanosoma cruzi* and development of an online label-free assay. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2016, 2016.
- CARDOSO, C. S. et al. Beneficial effects of benznidazole in Chagas disease : NIH SaMi-Trop cohort study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 37, p. 1–12, 2018.
- CDC, C. FOR D. C. Parasites - American Trypanosomiasis ( also known as Chagas Disease ) Epidemiology & Risk Factors. Disponível em: < <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/epi.html#print>>. Acesso em: 3 nov. 2022.
- CEVALLOS, A. M.; HERNÁNDEZ, R. Chagas ' Disease: Pregnancy and Congenital Transmission. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–10, 2014.
- CHAGAS, C. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiolojico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 2, p. 159–218, ago. 1909.

CHATELAIN, E. Chagas disease drug discovery: Toward a new era. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 20, n. 1, p. 22–35, 2015.

CHEN, Z. et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Synthesis and biological evaluation of flavonoids as vasorelaxant agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 15, p. 3949–3952, [s.d.].

CHIUW, K. H. et al. Evaluation of antiviral activities of *Houttuynia cordata* Thunb. extract, quercetin, quercetrin and cinanserin on murine coronavirus and dengue virus infection. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, n. 1, p. 1–7, jan. 2016.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, n. 5, p. 343–356, 2005.

D'ANDREA, G. Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications? **Fitoterapia**, v. 106, p. 256–271, 2015.

DA SILVA, W. et al. ENTPDases from Pathogenic Trypanosomatids and Purinergic Signaling: shedding light towards Biotechnological Applications. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 1–14, 2020.

DA SILVA, W. et al. *Leishmania infantum* NTPDase1 and NTPDase2 play an important role in infection and nitric oxide production in macrophages. **Acta Tropica**, v. 237, n. 106732, 2023.

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M. U.; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host cell interaction. **International Journal of Cell Biology**, v. 2010, 2010.

DEROSA, G. et al. A role for quercetin in coronavirus disease 2019 (COVID-19). **Phytotherapy Research**, n. September, p. 1–7, 2020

DNDI, P. DNDi, **Drugs for Neglected Diseases Initiative Research and Development Portfolio**.

DROSOPOULOS, J. H. F. et al. Site-Directed Mutagenesis of Human Endothelial Cell Ecto-ADPase / Soluble CD39 : Requirement of Glutamate 174 and Serine 218 for Enzyme Activity and Inhibition of Platelet Recruitment †. **Biochemistry**, v. 39, p. 6936–6943, 2000.

DU, Y.; WEI, G.; LINHARDT, R. J. Total Synthesis of Quercetin 3-Sophorotrioside. **J. Org. Chem**, v. 69, n. 6, p. 2206–2209, 2004.

ENDO, Y.; SAWASAKI, T. Cell-free expression systems for eukaryotic protein production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 17, n. 4, p. 373–380, 2006.

ENOMOTO, S. et al. In Vitro Enzyme Inhibitory Activity of Ten *Ferulago* W . Koch Species Growing in Turkey . **Biol Pharm Bull**, v. 7, p. 1140–1143, 2004.

FERENCZYOVA, K.; KALOCAYOVA, B.; BARTEKOVA, M. Potential implications of quercetin and its derivatives in cardioprotection. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 5, 2020.

FERREIRA, I. L. M.; SILVA, T. P. T. Eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* no Brasil : um fato histórico Transmission elimination of Chagas ' disease by *Triatoma infestans* in Brazil : an historical fact. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 39, n. 5, p. 507–509, 2006.

FIETTO, J. L. R. et al. Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 316, n. 2, p. 454–460, 2004.

FIGUEIREDO, A. B. DE; SOUZA-TESTASICCA, M. C.; AFONSO, L. C. C. ScienceDirect Review Article : Special Edition Purinergic signaling and infection by *Leishmania* : A new approach to evasion of the immune response. **Biomedical Journal**, v. 39, n. 4, p. 244–250, 2016.

FIOCRUZ. **Doença de Chagas**. Disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7a-de-chagas>> Acesso em: 20 de nov. 2022

GATTO, M. T. et al. Antimicrobial and Anti-Lipase Activity of Quercetin and its. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 2, p. 269–272, 2002.

GLINSKY, G. V. Tripartite combination of candidate pandemic mitigation agents: Vitamin D, Quercetin, and Estradiol Manifest properties of medicinal agents for targeted mitigation of the COVID-19 pandemic defined by genomics-guided tracing of SARS-CoV-2 targets in human. **Biomedicines**, v. 8, n. 5, 2020.

GOLDENBERG, S. Chagas disease treatment : a 120-year-old challenge to public health. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 117, p. 210501, 2022.

GRINTHAL, A.; GUIDOTTI, G. Articles Substitution of His59 Converts CD39 Apyrase into an ADPase in a Quaternary Structure Dependent Manner †. **Biochemistry**, v. 39, p. 9–16, 2000.

GUARNER, J. Chagas disease as example of a reemerging parasite. **Seminars in Diagnostic Pathology**, v. 36, n. 3, p. 164–169, 2019.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Drug design, biotechnology and medicinal chemistry: applications to infectious diseases. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 81–98, 2010.

HALGREN, T. A. Merck Molecular Force Field. I. Basis, Form, Scope, Parameterization, and Performance of MMFF94\*. **Journal of computational chemistry**, v. 17, n. 5–6, p. 490–519, 1996.

HANDA, M.; GUIDOTTI, G. Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (Apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 218, n. 3, p. 916–923, 1996.

HANWELL, M. D. et al. Avogadro : an advanced semantic chemical editor , visualization , and analysis platform. **Journal of Cheminformatics**, v. 4, n. 1, p. 1–17, 2012.

HARBORNE. **The Flavonoids**. First ed. London: Chapman and Hall, 1998.

HUANG, J. et al. CHARMM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins. **Nature methods**, v. 14, n. 1, p. 71–73, 2017.

KELLEY, L. A. et al. The Phyre2 web portal for protein modeling , prediction and analysis. **Nature Protocols**, v. 10, n. 6, p. 845–858, 2015.

KIM, C. H.; KIM, J. E.; SONG, Y. J. Antiviral activities of quercetin and isoquercitrin against human herpesviruses. **Molecules**, v. 25, n. 10, 2020.

KIRCHHOFF, L. V. AMERICAN TRYPANOSOMIASIS (CHAGAS' DISEASE). **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 25, n. 3, p. 517–533, 2000.

KIRLEY, T. L.; CRAWFORD, P. A.; SMITH, T. M. The structure of the nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (NTPDases ) as revealed by mutagenic and computational modeling analyses. **Purinergic Signalling**, v. 2, p. 379–389, 2006.

KNOWLES, A. F. The GDA1 \_ CD39 superfamily: NTPDases with diverse functions. **Purinergic Signalling**, v. 7, p. 21–45, 2011.

KOWALSKI, L. et al. Atividade Antimicrobiana de Flavonoides: uma Revisão de Literatura. **Revista Interdisciplinar em Ciências da Saúde e Biológicas**, v. 4, n. 1, p. 51–65, 2020.

KRATZ, J. M. et al. Expert Review of Clinical Pharmacology Clinical and pharmacological profile of benznidazole for treatment of Chagas disease. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 11, n. 10, p. 943–957, 2018.

KRATZ, J. M. Acta Tropica Drug discovery for chagas disease : A viewpoint. **Acta Tropica**, v. 198, n. 105107, p. 1–5, 2019.

KRIEGER, E. et al. Improving physical realism, stereochemistry, and side-chain accuracy in homology modeling: Four approaches that performed well in CASP8. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 77, n. S9, p. 114–122, 2009.

KÜHNAU, J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. **World Rev Nutr Diet**, v. 24, p. 117–91, 1976.

LAMBRECHT, G. et al. Structure-Activity Relationships of Suramin and Pyridoxal-5 ' -phosphate Derivatives as P2 Receptor Antagonists. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, n. 26, p. 2371–2399, 2002.

LAMSON, D.; BRIGNALL, M. Antioxidants and Cancer III: Quercetin. **Alternative Medicine Review**, v. 5, p. 196–208, 2000.

LASKOWSKI, R. A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **J. App. Cryst**, v. 26, n. 2, p. 283–291, 1993.

LAZAROWSKI, E. R. Molecular and Biological Properties of P2Y Receptors. **Current Topics in Membranes**, v. 54, p. 59–96, 2003.

LEE, H. et al. Isolation and Identification of Antioxidative Phenolic Acids and Flavonoid Glycosides from *Camellia japonica* Flowers. **Hort. Environ. Biotechnol.**, v. 52, n. 3, p. 270–277, 2011.

LEE, J. et al. CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field. **J. Chem. Theory Comput.**, v. 12, p. 405–413, 2016.

LEITE, A. L. J. et al. Ectonucleotidases from trypomastigotes from different sources and various genetic backgrounds of *Trypanosoma cruzi* potentiate their infectivity and host inflammation. **Cytokine**, v. 136, n. March, p. 155255, 2020.

LEMEIUX, R. U.; LINEBACK, D. R. CHEMISTRY OF THE CARBOHYDRATES. **Physical Methods**, v. 32, p. 155–184, 1962.

LI, M.; HAN, X. W.; YU, B. **Tetrahedron Letters**. [s.l: s.n.]. v. 43.

LI, Y. et al. Quercetin, inflammation and immunity. **Nutrients**, v. 8, n. 3, p. 1–14, 2016.

LINEWEAVER, H.; BURK, D. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 56, p. 658–666, 1934.

MAIOLI, T. U. et al. Immune response induced by New World *Leishmania* species in C57BL/6 mice. **Parasitology Research**, v. 94, n. 3, p. 207–212, 2004.

MARIOTINI-MOURA, C. **EXPRESÃO HETEROOGA, PURIFICAÇÃO E BUSCA DE INIBIDORES DA NTPDase-1 DE *Trypanosoma cruzi***. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2010.

MARIOTINI-MOURA, C. et al. *Trypanosoma cruzi* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (TcNTPDase-1) biochemical characterization, immunolocalization and possible role in host cell adhesion. **Acta Tropica**, v. 130, n. 1, p. 140–147, 2014.

MARIOTINI-MOURA, C. **ESTUDO BIOLÓGICO E BIOQUÍMICO DAS NTPDASES de *Trypanosoma cruzi* E *Leishmania infantum chagasi* E BUSCA POR NOVOS COMPOSTOS PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS**. Tese. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2014.

MARUNAKA, Y. et al. Actions of quercetin, a polyphenol, on blood pressure. **Molecules**, v. 22, n. 2, p. 5–8, 2017.

MENDES, F. DE S. N. S. et al. Critical analysis of Chagas disease treatment in different countries. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 117, p. 1–9, 2022.

MEYER-FERNANDES, J. R. et al. A Mg-dependent ecto-ATPase is increased in the infective stages of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research**, v. 93, n. 1, p. 41–50, 2004.

MICHAELIS, L.; MENTEN, M. L. Die Kinetik der Invertinwirkung - The Kinetics of Invertase Action translated by. **Biochemische Zeitschrift**, v. 49, p. 333–369, 1913.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico Doença de Chagas Doença de Chagas**. Brasília/DF, 2021.

MORILLO, C. A. et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. **The New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 14, p. 1295–1306, 2015.

MORROT, A. et al. Evasion and immuno-endocrine regulation in parasite infection: Two sides of the same coin in chagas disease? **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. MAY, p. 1–10, 2016.

MÜLLER, C. E. P2-Pyrimidinergic Receptors and Their Ligands. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, p. 2353–2369, 2002.

NEEDS, P. W.; KROON, P. A. Convenient syntheses of metabolically important quercetin glucuronides and sulfates. **Tetrahedron** 62, v. 62, p. 6862–6868, 2006.

NGUYEN, T.; WASEEM, M. Chagas Disease. 1. ed. New York: StatPearls Publishing, 2020.  
NORTH, R. A. Molecular Physiology of P2X Receptors. **Physiol Rev**, v. 82, p. 1013–1067, 2022.

NOVAES, R. D. et al. Purinergic Antagonist Suramin Aggravates Myocarditis and Increases Mortality by Enhancing Parasitism , Inflammation , and Reactive Tissue Damage in Trypanosoma cruzi -Infected Mice. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, p. 1–11, 2018.

NOYA, D. et al. Large Urban Outbreak of Orally Acquired Acute Chagas Disease at a School in Caracas , Venezuela. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 201, n. 9, p. 1308–1315, 2010.

NUNES, M. C. P. et al. Chagas disease: An overview of clinical and epidemiological aspects. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, n. 9, p. 767–776, 2013.

PAES-VIEIRA, L. et al. Differential regulation of E-NTPdases during Leishmania amazonensis lifecycle and effect of their overexpression on parasite infectivity and virulence. **Parasitol Int.**, v. 85, n. 102423, 2022.

PAES-VIEIRA, L.; GOMES-VIEIRA, L. A.; MEYER-FERNANDES, J. R. E-NTPDases : Possible Roles on Host-Parasite Interactions and Therapeutic Opportunities. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 1–11, 2021.

PAHO. **Doença de chagas**. Disponível em: <<https://www.paho.org/en/topics/chagas-disease>>. Acesso em: 2 nov. 2022.

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: An overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, 2016.

PAULA, A. T. et al. Protective immunity triggered by ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-based biopharmaceuticals attenuates cardiac parasitism and prevents

mortality in *Trypanosoma cruzi* infection. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 72, n. 116966, p. 0968–0896, 2022.

PERES, N. T. DE A. et al. Infection of human macrophages by *Leishmania infantum* is influenced by ecto-nucleotidases. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. JAN, p. 1–8, 2018.

PICQ, M. et al. O-alkylation de la Quercetine et synthese de la tetra o-ethyl-3,7,3',4' O-ethyl [3H]-5 quercetine. **Tetrahedron Letters**, v. 25, n. 21, p. 2227–2230, 1984.

RAO, KOPPAKA V.; OWOYALE, J. A. Partial methylation of Quercetin: Direct synthesis of Tamarixetin, Ombuin and Ayanin. **J. Heterocyclic Chem.** v. 13, p. 1293–1295, 1976.

RASSI, A. J.; RASSI, A.; DE REZENDE, J. M. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infect Dis Clin N Am**, v. 26, p. 275–291, 2012.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, 2010.

RIBEIRO, I. C. **BUSCA POR INIBIDORES DA NTPDase-1 DE *Trypanosoma cruzi* COMO ESTRATEGIA NO DESENVOLVIMENTO RACIONAL DE NOVAS DROGAS PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS.** [s.l.] Universidade federal de Viçosa, 2016.

RIBEIRO, V. et al. Current trends in the pharmacological management of Chagas disease. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 12, n. August 2019, p. 7–17, 2020.

ROBSON, S. C.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signalling**, v. 2, n. 2, p. 409–430, 2006.

ROCKENBACH, L. et al. Alterations in the extracellular catabolism of nucleotides are involved in the antiproliferative effect of quercetin in human bladder cancer T24 cells. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 31, n. 7, p. 1204–1211, 2013.

RODRIGUES COURA, J.; DE CASTRO, S. L. A critical review on chagas disease chemotherapy. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 3–24, 2002.

RUEDA, K. et al. Oral transmission of *Trypanosoma cruzi*: A new epidemiological scenario for Chagas' disease in Colombia and other South American countries. **Biomedica**, v. 34, n. 4, p. 631–641, 2014.

SACCOL, R. DA S. P. et al. Effect of quercetin on E-NTPDase/E-ADA activities and cytokine secretion of complete Freund adjuvant-induced arthritic rats. **Cell Biochemistry and Function**, v. 37, n. 7, p. 474–485, 2019.

SALEHI, B. et al. Therapeutic Potential of Quercetin: New Insights and Perspectives for Human Health. **ACS Omega**, v. 5, n. 20, p. 11849–11872, 26 maio 2020.

SANSOM, F. M. The role of the NTPDase enzyme family in parasites : what do we know , and where to from here ? **Parasitology**, v. 139, n. 8, p. 963–980, 2012.

SANSOM, F. M.; ROBSON, S. C.; HARTLAND, E. L. Possible Effects of Microbial Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolases on Host-Pathogen Interactions. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 72, n. 4, p. 765–781, 2008.

SANTOS, E. C. et al. Concomitant Benznidazole and Suramin Chemotherapy in Mice Infected with a Virulent Strain of *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 10, p. 5999–6006, 2015.

SANTOS, K. B. et al. Highly Flexible Ligand Docking : Benchmarking of the DockThor Program on the LEADS-PEP Protein – Peptide Data Set. **J. Chem. Inf. Model**, v. 60, p. 667–683, 2020.

SANTOS, R. F. et al. Influence of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity on *Trypanosoma cruzi* infectivity and virulence. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 3, 2009.

Schrödinger Release 2022-3: **Canvas**, Schrödinger, LLC., New York, 2021.

SCHULTE, J. et al. Structural Elements and Limited Proteolysis of CD39 Influence ATP Diphosphohydrolase Activity †. **Biochemistry**, v. 38, p. 2248–2258, 1999.

SERBAN, M. C. et al. Effects of Quercetin on Blood Pressure: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **Journal of the American Heart Association**, v. 5, n. 7, p. 1–15, 2016.

SHAFABAKHSH, R.; ASEMI, Z. Quercetin: A natural compound for ovarian cancer treatment. **Journal of Ovarian Research**, v. 12, n. 1, p. 1–9, 2019.

SILVA-GOMES, N. L. et al. Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase1 (TcNTPDase-1) gene expression is increased due to heat shock and in infective forms of *Trypanosoma cruzi*. **Parasites and Vectors**, v. 7, n. 1, p. 1–6, 2014.

SILVA-GOMES, N. L. et al. Knocking Down TcNTPDase-1 Gene Reduces in vitro Infectivity of *Trypanosoma cruzi* Knockout and Overexpression of the. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1–12, 2020.

SLABBERT, N. P. Ionisation of some flavanols and hydroflavonoids. **Tetrahedron**, v. 33, p. 821–824, 1976.

SMITH, T. M.; CARL, S. A. L.; KIRLEY, T. L. Mutagenesis of Two Conserved Tryptophan Residues of the E-Type ATPases : Inactivation and Conversion of an Ecto-Apyrase to an Ecto-NTPase †. **Biochemistry**, v. 38, p. 5849–5857, 1999.

SMITH, T. M.; KIRLEY, T. L. Site-Directed Mutagenesis of a Human Brain Ecto-Apyrase : Evidence That the E-Type ATPases Are Related to the Actin / Heat Shock 70 / Sugar Kinase. **Biochemistry**, v. 38, p. 321–328, 1999.

STEVERDING, D. The history of Chagas disease. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 317, p. 1–8, 2014.

SUETH-SANTIAGO, V. et al. Challenges in the chemotherapy of Chagas disease: Looking for possibilities related to the differences and similarities between the parasite and host. **World Journal of Biological Chemistry**, v. 8, n. 1, p. 57, 2017.

SUKITO, A.; TACHIBANA, S. Isolation of hyperoside and isoquercitrin from *Camellia sasanqua* as antioxidant agents. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 17, n. 8, p. 999–106, 2014.

TANG, S. M. et al. Pharmacological basis and new insights of quercetin action in respect to its anti-cancer effects. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 121, n. October 2019, p. 109604, 2020.

TAUSSKY, H. H.; SHORR, E. A MICROCOLORIMETRIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF INORGANIC PHOSPHORUS. **J. Biol. Chem.**, v. 202, p. 675–685, 1953.

TRÄGER, S. et al. CLoNe: Automated clustering based on local density neighborhoods for application to biomolecular structural ensembles. **Bioinformatics**, v. 37, n. 7, p. 921–928, 2021.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 5–6, p. 472–481, 2001.

VAN DER SPOEL, D. et al. GROMACS: Fast, Flexible, and Free. **J Comput Chem**, v. 26, p. 1701–1718, 2005.

VARGAS, A. J. et al. Exploiting tyrosinase expression and activity in melanocytic tumors: Quercetin and the central role of p53. **Integrative Cancer Therapies**, v. 10, n. 4, p. 328–340, 2011.

VASCONCELLOS, R. D. S. et al. Leishmania infantum Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-2 is an Apyrase Involved in Macrophage Infection and Expressed in Infected Dogs. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 11, 2014.

WANG, H. . The Therapeutic Potential of Flavonoids. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 9, n. 1, p. 2021–2023, 2000.

WHO. **Doença de Chagas** (também conhecida como tripanossomíase americana ). Disponível em: <[https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab_1)>. Acesso em: 19 jan. 2021.

WHO. **Tratament of Chagas disease**. Disponível em: <<http://www.who.int/chagas/disease/treatment/>>. Acesso em: 4 ago. 2020.

WHO. **Doença de Chagas** ( também conhecida como tripanossomíase americana ). Disponível em: <[https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab_1)>. Acesso em: 1 nov. 2022.

WONG, G. et al. Antiviral activity of quercetin-3- $\beta$ -O-D-glucoside against Zika virus infection. **Virologica Sinica**, v. 32, n. 6, p. 545–547, 2017.

WU, W. et al. Quercetin as an antiviral agent inhibits influenza A virus (IAV) Entry. **Viruses**, v. 8, n. 1, 2015.

XU, D. et al. Antioxidant activities of quercetin and its complexes for medicinal application. **Molecules**, v. 24, n. 6, 2019.

ZAIDEL, E. J. et al. COVID-19: Implications for People with Chagas Disease. **Global Heart.**, v. 15, n. 1, p. 1–15, 2020.

ZAIDEL, E. J.; LIPRADI, A. Neglected of the neglected: Crude reality of Chagas Disease. **medicine**, v. 81, n. 4, p. 675–676, 2021.

ZAIDEL, E. J.; LIPRADI, A. S. Direct economic impact of Chagas disease treatment. **Therapeutic advances in infectious disease**, v. 9, p. 1–3, 2022.

ZEBISCH, M.; STRA, N. Structural insight into signal conversion and inactivation by NTPDase2 in purinergic signaling. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 105, n. 9, p. 6882–6887, 2008.

ZIMMERMANN, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 362, n. 4–5, p. 299–309, 2000.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolases and ecto-5'-nucleotidase in purinergic signaling: how the field developed and where we are now. **Purinergic Signalling**, v. 17, p. 117–125, 2021.

ZIMMERMANN, H.; ZEBISCH, M.; STRÄTER, N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. **Purinergic Signalling**, v. 8, n. 3, p. 437–502, 2012.

## CAPITULO I

**ARTIGO - SÍNTESE DOS DERIVADOS NÃO NATURAIS L-GLICOSÍDICOS  
FLAVONÓIDES E SUA AVALIAÇÃO COMO INIBIDORES DA ECTO  
NUCLEOSÍDEO TRIFOSFATO DIFOSFOHIDROLASE 1 DE *Trypanosoma cruzi*  
(TcNTPDase1)**

**Synthesis of the non-natural L-glycosidic flavonoid derivatives and their evaluation as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* Ecto Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase 1 (TcNTPDase1)**

Isadora Cunha Ribeiro<sup>1</sup>, João Victor Badaró de Moraes<sup>2</sup>, Christiane Mariotini-Moura<sup>2</sup>, Marcelo Depolo Polêto<sup>1</sup>, Nancy da Rocha Torres Pavione<sup>2</sup>, Raissa Barbosa de Castro<sup>1</sup>, Gustavo Costa Bressan<sup>1</sup>, Raphael de Souza Vasconcellos<sup>1</sup>, Izabel Luzia Miranda<sup>3</sup>, Suélen Karine Sartori<sup>3</sup>, Kryssia Lohayne Santos Alves<sup>3</sup>, José Roberto Meyer-Fernandes<sup>4</sup>, Gaspar Diaz-Muñoz<sup>3,\*</sup> and Juliana Lopes Rangel Fietto<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Biochemistry and Molecular Biology Department, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brazil

<sup>2</sup>General Biology Department, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

<sup>3</sup>Exact Science Institute, Chemistry Department, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil

<sup>4</sup>Laboratory of Cellular Biochemistry, Institute of Medical Biochemistry Leopoldo de Meis, Health Sciences Center, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

**Corresponding authors\*:** Juliana Lopes Rangel Fietto ([jufietto@ufv.br](mailto:jufietto@ufv.br)), Gaspar Diaz-Muñoz ([gaspardm@qui.ufmg.br](mailto:gaspardm@qui.ufmg.br)).

All authors contributed to the conception and design of the study. Material preparation, data collection and analysis were performed by Isadora Cunha Ribeiro, João Victor Badaró de Moraes, Christiane Mariotini-Moura, Marcelo Depolo Polêto, Nancy da Rocha Torres Pavione, Raissa Barbosa de Castro, Izabel Luzia Miranda, Suélen Karine Sartori, Kryssia Lohayne Santos Alves and Gaspar Diaz-Muñoz. The first draft of the manuscript was written by Isadora Cunha Ribeiro and all authors commented on previous versions of the manuscript. The data and analyses were reviewed by Gaspar Diaz-Muñoz and Juliana Lopes Rangel Fietto. All authors read and approved the final manuscript.

## ABSTRACT

*Trypanosoma cruzi* is the pathogen of Chagas disease, a neglected tropical disease that affects more than 6 million people worldwide. There are no vaccines to prevent infection, and the therapeutic arsenal is very limited and toxic. The unique E-NTPDase of *T. cruzi* (TcNTPDase1) plays important roles in adhesion and infection and is known as a virulence factor. Quercetin is a flavonoid with antimicrobial, antiviral and antitumor activities. Its potential as a partial inhibitor of NTPDases has also been demonstrated. In this work, we synthesized the non-natural L-glycoside derivatives of quercetin, and evaluated them as inhibitors of recombinant TcNTPDase1 (rTcNTPDase1). These compounds, as well as quercetin and miquelianin, a natural derivative of quercetin, were also tested. Compound **16** showed the greatest inhibitory effect (94%). Quercetin, miquelianin and compound **14** showed inhibition close to 50%. We thoroughly investigated the inhibitory effect of **16**. Our data suggested a competitive inhibition with a  $K_i$  of 8.385  $\mu\text{M}$  ( $\pm 0.8952$ ). To better understand the interaction of compound **16** and rTcNTPDase1, molecular dynamics simulations and docking analyses were performed. Our predictions show that compound **16** binds to the catalytic site of the enzyme and interacts with important residues for NTPDase activity. As an inhibitor of an important *T. cruzi* enzyme, (**16**) could be useful as a starting point in the development of a future treatment for Chagas disease. Furthermore, the discovery of (**16**) as an inhibitor of TcNTPDase1 may open new avenues in the study and development of inhibitors of E-NTPDases.

Key-words: E-NTPDase, TcNTPDase-1, inhibitors, *ent*-quercetin derivatives, Chagas Disease, molecular docking.

## 5. INTRODUCTION

Chagas Disease (CD) is an anthrozoosis caused by *Trypanosoma cruzi*, a hemoflagellate protozoan parasite belonging to the Kinetoplastida order and the Trypanosomatidae family [1]. *T. cruzi* is transmitted to man through the feces and urine of contaminated hematophagous triatomine insects during the blood-meal. Infection can also occur through blood transfusion, congenital transmission, organ transplantation, and consumption of fresh food contaminated with infectious forms of the parasite [2, 3]. In the past, CD was limited to South and Central America [3], but in recent years, due to increased migratory movements, the distribution of the disease is changing, reaching North America and Europe [4, 5]. The World Health Organization (WHO) estimates that 6 to 7 million people are infected with *T. cruzi* worldwide, mainly in Latin America, where the disease is considered endemic. There are no vaccines to prevent infection, and the therapeutic arsenal is very limited and toxic [6, 7].

In the chronic phase the disease can affect muscles from heart and digestive tract leading to disorders in those organs in 30% and 10% of the cases respectively [7]. Introduced in the 70s, nifurtimox and benznidazole are the only drugs available for treatment [8]. However, the use of nifurtimox for CD has been discontinued in many Latin American countries due to its high toxicity. Currently, the only drug used in most endemic countries is benznidazole [8, 9]. In general, the treatment of CD is not effective, especially in the chronic phase of the disease. In addition, there are undesirable side effects especially for pregnant patients [10, 11]. In recent years, several strategies and target molecules have been studied, aiming at the search and development of new drugs that could improve the treatment and quality of life of patients affected by this disease [12–15].

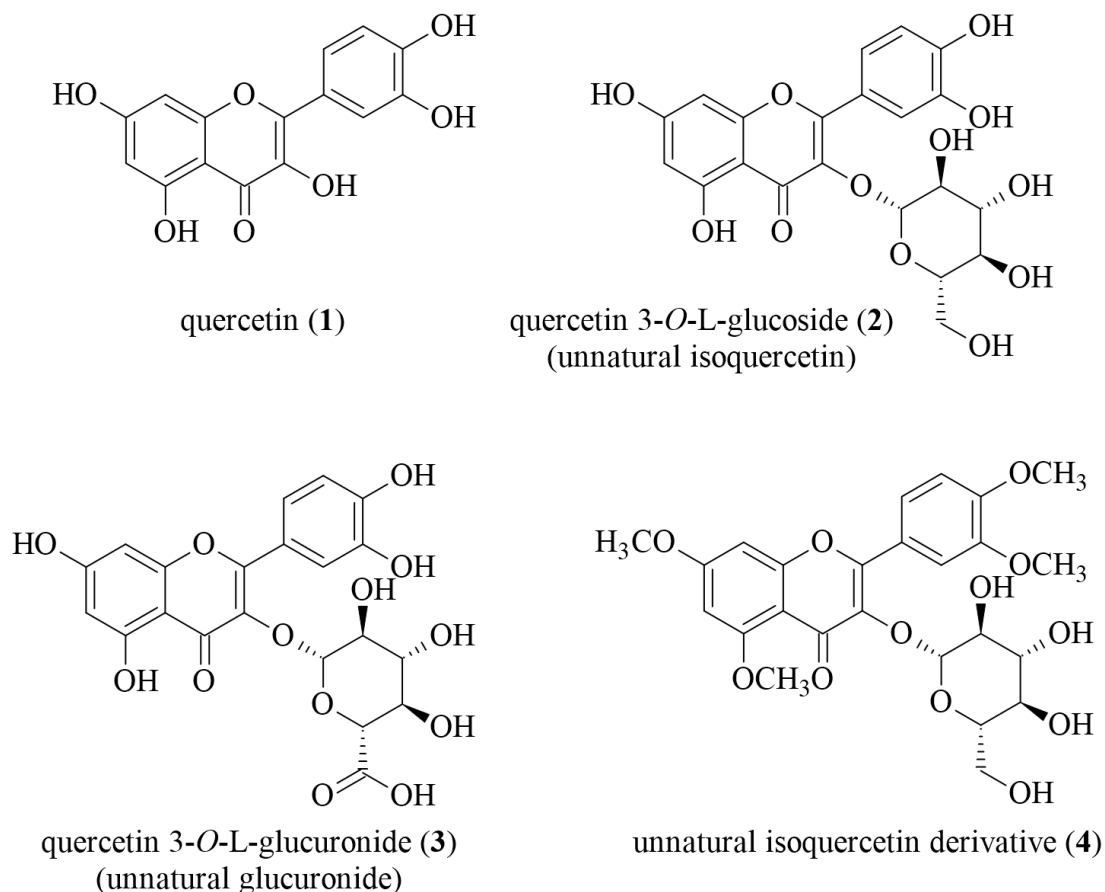
*T. cruzi* has on its cell surface an enzyme belonging to the family of Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolases (E-NTPDases), named TcNTPDase1 [16]. The ectonucleotidases of the E-NTPDases family are enzymes capable of hydrolyzing tri and/or diphosphate nucleotides in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  and/or  $\text{Mg}^{2+}$  acting as a cofactor [17]. E-NTPDases are apyrases and, as such, have five conserved regions, called Apyrase Conserved Regions (ACRs) [18, 19]. These regions are important for the formation of the catalytic site of these enzymes and are related to the hydrolytic capacity and affinity of the enzyme for substrates [20–23]. Extracellular nucleotides act as signals in various cellular processes, such as modulating the immune response of mammalian hosts [24, 25] and it's been shown that E-NTPDases from pathogenic parasites can modulate the host immune system [26–28].

TcNTPDase1 plays important roles in infectivity and virulence of *T. cruzi*. The trypomastigote infectious form has higher expression and ecto-ATPase activity than the epimastigote non-infectious form of the parasite [16, 29–31]. In addition, this enzyme participates in the purine acquisition, adhesion, infection and virulence of the parasite [30, 32, 33], as a consequence of the important roles of TcNTPDase1 it is highlighted as a target to the development of new drugs to treat CD [28, 34].

Flavonoids are an important class of natural products with a wide variety of biological activities in plants, animals, and bacteria [35]. Among the different classes and types of flavonoids, quercetin has been widely studied in recent years [35–37]. Quercetin and many D-glycoside derivatives are known to have antioxidation and anti-inflammatory functions, acting as cell protectors [36, 38]. In addition, many studies show that these compounds have activities as antimicrobial [39–41], antiviral [42–48], cardioprotective [49–51] and antitumor [52–54].

Furthermore, quercetin has inhibitory potential for many enzymes and signaling pathways [55]. It has been shown that quercetin can alter the activity of purinergic enzymes, modulating the hydrolysis of nucleotides and nucleosides and, consequently, altering the oxidative profile in platelets [56]. In another study, quercetin was able to inhibit the activity of ecto-5'-nucleotidase/CD73 and demonstrated an effect on tumor cell proliferation through changes in extracellular nucleotide metabolism [57]. However, many questions are still open about the origin of these activities [58, 59]. During the last decades there is increased interest in the synthesis [60–62], functional elucidation [63] and biological evaluation of quercetin and their heterosides derivatives [64, 65]. The majority of the studies focus on the O-glycosylated quercetin in the position of 3-OH. Although the *ent*-isoquercetin (quercetin-3-O- $\beta$ -L-glycoside) and the glucuronic form (quercetin-3-O- $\beta$ -L-glucuronide) are not discovered as natural products and there are not described studies of their synthesis or biological activities.

In this context, based on the various biological activities associated with its structural complexity, we believe that quercetin and its glycosylated derivatives have potential for studies that aim to search for inhibitors of therapeutic targets, such as TcNTPDase1. Thus, in this work we show the synthesis of non-natural quercetin-derived compounds by a new approach of short, regioselective and stereoselective synthesis, having as final product the *ent*-isoquercetin (2) (Fig 1). Moreover, we tested the potential of inhibition on rTcNTPDase1 of *ent*-isoquercetin and many of its intermediates.



**Fig 1** – Structures of quercetin and its unnatural glycosylated derivatives

## 6. MATERIAL AND METHODS

### 6.1. Experimental General procedures

The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR (nuclear magnetic resonance) spectra were recorded on a Bruker Avance spectrometer at 400 and 100 MHz, respectively. The LC-MS/MS analyses were performed in a Nexera UHPLC-system (Shimadzu) hyphenated to a maXis ETD high-resolution ESI-QTOF mass spectrometer (Bruker). The IR spectra were recorded on a FTIR spectrometer with a diamond ATR (attenuated total reflectance) accessory as a thin film. The melting points were measured in open capillary tubes using an electrothermal apparatus, model 9100, and remained uncorrected. Purifications by column chromatography were performed on silica gel, using normal or flash chromatography. THF were distilled from sodium metal and benzophenone ketyl under nitrogen. DMF and dichloromethane was distilled from  $\text{CaH}_2$ .

TLC visualization was achieved by spraying with 5% ethanolic phosphomolybdic acid and heating. All of the chemicals were used as received unless otherwise stated. The NMR data of all compounds obtained during the synthesis can be seen in the Online resource (Online resource 1).

## 6.2. Synthesis

1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl-L-glycopyranose (**7**): A suspension of L-glucose (**6**) (1.0 g, 5.5 mmol) in acetic anhydride (5 mL) was treated with iodine (0.05 g, 0.47 mmol) and stirred at room temperature. After two hours of stirring, the reaction mixture was diluted in dichloromethane and extracted with 5% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> solution and crushed ice. The organic phase was separated and dried with anhydrous sodium sulfate and concentrated under reduced pressure, providing the per-acetylated glucose (**7**) as yellow viscous oil in quantitative yield. This crystallized when stored in the refrigerator, being observed the formation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -anomers in the proportion of (1.0:0.6).

2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- $\alpha$ -L-glucofuranosyl bromide (**5**): A solution of penta-O-acetyl-L-glucofuranose (**7**) (2.16 g, 5.5 mmol) in glacial acetic acid (11.42 mL) was cooled in an ice bath and then a solution of HBr/acetic acid 30% m/v (9.12 mL) (purchased from Sigma-Aldrich) was slowly added. The solution was stirred for three hours at room temperature and stored in the refrigerator for 12 hours. The reaction mixture was diluted with dichloromethane (50 mL) and poured into a mixture of crushed ice and water. The aqueous phase was separated and extracted with dichloromethane (3x 50 mL). The pooled organic fractions were washed with 5% aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub>, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure, resulting in viscous yellowish oil. This oil was crystallized from ethyl ether/petroleum ether (1:1) and allowed to stand in the refrigerator for 24 hours to produce the bromide (**5**) as white needle-like crystals (1.76 g, 4.3 mmol) in 78% yield.

7-(Benzyloxy)-2-(3,4-bis(benzyloxy)phenyl)-3,5-dihydroxy-4H-chromen-4-one (**9**): The mixture of rutin **8** (2.44 g, 4.0 mmol) and dry K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.83 g, 10 mmol) in anhydrous DMF (20 mL) was stirred under a nitrogen atmosphere at room temperature for 0.5 h until the reagents were dissolved. Benzyl bromide (1.6 mL, 13.4 mmol) was then added. After stirring for 24 hours at 60 ° C, the mixture was acidified to pH 5.0 with 10% acetic acid (20 mL) and

allowed to stand for 24 hours at room temperature. The resulting yellow precipitate was collected, washed with distilled water (25 mL) and placed in the rotary evaporator under reduced pressure to remove traces of water. The crude residue was dissolved in ethanol (60 mL) and treated with concentrated HCl (9 mL), added in small portions and stirred for three hours at 70 °C. The mixture was cooled to room temperature and allowed to stand for 24 hours. The yellow precipitate formed was collected, washed and filtered with ice-cold distilled water. The crude residue was purified by column chromatography with hexane/EtOAc (8:2) to afford the tri- and di-benzylated compounds **9** and **10** in 74% and 6% yields, respectively.

2-(3,4-Dimethoxy-phenyl)-3,5-dihydroxy-7-methoxy-chromen-4-one (**11**): Trimethoxylated quercetin aglycone **11** was prepared in a similar manner to compound **9** in 80% yield.

Acetic acid 3,5-diacetoxy-2-acetoxymethyl-6-[7-benzyloxy-2-(3,4-bis-benzyloxy-phenyl)-5-hydroxy-4-oxo-4H-chromen-3-yloxy]-tetrahydro-pyran-4-yl ester (**12**): The mixture of aglycone **9** (573 mg, 1.0 mmol), 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\alpha$ -L-glucopyranosyl bromide (**5**) (452 mg, 1.1 mmol) and dry K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (304 mg, 2.2 mmol) in DMF (10 mL) was stirred under argon atmosphere at room temperature for 48 hours. Distilled water (30 mL) and 15% aqueous HCl cool solution (30 mL) were then added and extracted with ethyl acetate (3x 50 mL). The organic phase was washed with saturated NaHCO<sub>3</sub> solution, brine, dried over anhydrous sodium sulfate and evaporated under reduced pressure. The crude residue was purified by column chromatography with hexane/AcOEt 30% and 40%, giving glycoside **12** as light-yellow oil (744.4 mg, 0.827 mmol, 84% yield).

Acetic acid 4,5-diacetoxy-6-acetoxymethyl-2-[2-(3,4-dimethoxy-phenyl)-5-hydroxy-7-methoxy-4-oxo-4H-chromen-3-yloxy]-tetrahydro-pyran-4-yl ester (**13**): Glycoside **13** was obtained in a similar manner to that described for glycoside **12** in 80% yield (1.03 g, 1.5 mmol).

Acetic acid 4,5-diacetoxy-2-acetoxymethyl-6-[5,7-bis-benzyloxy-2-(3,4-bis-benzyloxy-phenyl)-4-oxo-4H-chromen-3-yloxy]-tetrahydro-pyran-3-ylmethyl ester (**14**): To a mixture of glycoside **12** (463 mg, 0.51 mmol) and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (284 mg, 2.05 mmol) in anhydrous DMF (3 mL) was added benzyl bromide (235  $\mu$ L, 2.05 mmol) and kept under stirring at 60 °C for 48 h under an argon atmosphere. Distilled water (30 mL) and ice-cold 15% HCl solution were then added and extracted with ethyl acetate (3x 50 mL). The organic phase was washed with

saturated NaHCO<sub>3</sub> solution, brine and dried with anhydrous sodium sulfate. The solvent was evaporated under reduced pressure. The crude residue was purified by column chromatography employing 30% and 40% of mixture of hexane/AcOEt to afford the full benzylated glycoside **14** as a yellow solid (744.4 mg, 0.827 mmol, 84% yield).

Acetic acid 4,5-diacetoxy-6-acetoxymethyl-2-[2-(3,4-dimethoxy-phenyl)-5,7-dimethoxy-4-oxo-4H-chromen-3-yloxy]-tetrahydro-pyran-3-yl ester (**15**): Glycoside **15** was obtained in a manner similar to that described for glycoside **14** in 85% yield.

5,7-Bis-benzyloxy-2-(3,4-bis-benzyloxy-phenyl)-3-(3,4,5-trihydroxy-6-hydroxymethyl-tetrahydro-pyran-2-yloxy)-chromen-4-one (**16**): To a flask containing acetic acid 4,5-diacetoxy-2-acetoxymethyl-6-[5,7-bis-benzyloxy-2-(3,4-bis-benzyloxy-phenyl)-4-oxo-4H-3-yloxy]-tetrahydro-pyran-3-ylmethyl ester (**14**) (365 mg, 0.37 mmol) in anhydrous ethanol (4 mL) stirred at 0 °C under an argon atmosphere, a methanolic solution of NaOMe (5 mL) was added (prepared in situ from Na metallic, 24 mg in anhydrous ethanol, 5 mL). Thereafter, the ice bath was removed, and the stirring was continued for 2 hours. Thereafter, anhydrous THF (9 mL) was added and stirred for an additional 1 hour. Then, amberlite 120 H+ was slowly added to pH 6. The crude residue was filtered under anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (9.5: 0.5) giving **16** as a yellow solid in 80% yield (242 mg, 0.29 mmol).

2-(3,4-Dimethoxy-phenyl)-5,7-dimethoxy-3-(3,4,5-trihydroxy-6-hydroxymethyl-tetrahydro-pyran-2-yloxy)-chromen-4-one (**4**): The 5,7,4',5'-tetramethyl-quercetin-3-O-β-L-glucoside derivative (**4**) was prepared in a similar manner to the deacetylated compound **16** as a yellowish solid in 81% yield.

2-(3,4-Dihydroxy-phenyl)-5,7-dihydroxy-3-(3,4,5-trihydroxy-6-hydroxymethyl-tetrahydro-pyran-2-yloxy)-chromen-4-one (**2**): Glycoside **16** (93 mg, 0.11 mmol), dissolved in ethanol (10 mL) was treated with Pd/C 10% (20 mg) under a hydrogen atmosphere. The mixture was stirred for 8 hours at room temperature. The mixture was filtered through celite, and the solvent evaporated under reduced pressure. The crude residue was purified by column chromatography using sephadex LH-20, eluted with a H<sub>2</sub>O/MeOH (1:1) to produce the *ent*-isoquercetin (**2**) as a light-yellow solid in 90% yield (46 mg).

### **6.3. Bacterial heterologous expression and purification of rTcNTPDase1**

The ecto-domain of TcNTPDase1 (from amino acid 37 to 636) [16] was previously subcloned in pET21b and expressed in the bacterial system *Escherichia coli* strain BL21-DE3-RIL [30]. Expression and purification followed the protocols described previously [30, 33].

### **6.4. Determination rTcNTPDase1 concentration**

The Bradford microplate method [66] was used to determine the protein concentration, according to the manufacturer's instructions (Biorad®). Standard curve was determined with bovine serum albumin, BSA (Sigma®).

### **6.5. Dilution and storage of compounds**

DMSO, Quercetin and miquelianin were purchased from Sigma (St. Louis MO). All compounds used were diluted in DMSO (dimethyl sulfoxide) P.A. to a concentration of 10 mM and frozen at -20°C in the dark. For use, a 10 mM aliquot of compound was diluted 10 times in DMSO P.A., due to the high hydrophobicity of these compounds. For all assays, the final concentration in the reaction was 100 µM of compound in 10% DMSO. To minimize the effects of DMSO on enzyme activity, all reaction controls contained only DMSO at the final concentration of 10%. The data and structure of the compounds used in this work can be seen in Table 1.

### **6.6. Enzymatic activity assays**

For the enzyme activity assays we used the Malachite Green method [67, 68] to measure diphosphate nucleotide hydrolysis by dosing the free orthophosphate. The assays were performed as described in [33], with modifications. The enzyme activity reaction was performed in activity buffer containing 50 mM Tris pH 8.0; 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>; 116 mM NaCl; 5.4 mM KCl and 2500 µM or 100 µM nucleotide, in 80 µL reaction, including the protein. The reaction was triggered with 0.5 µg of purified protein (rTcNTPDase1) and occurred for 10 minutes at 37°C until stopped with 80 µL of 0.2 M HCl. Immediately after, 40 µL of colorimetric reagent (0.2% malachite green and 10% ammonium molybdate 1:3, both diluted in 4M HCl) was added. The readings were performed at 650 nm on a microplate reader (BioTek). The reaction blanks contained all the reagents except the protein, which was added

after the reaction was stopped by the addition of hydrochloric acid (0.2 M). For all assays control reactions were performed, containing all buffer components and 10% DMSO. To quantify the hydrolysis, we obtained the linear regression through the standard curve that relates known phosphate concentrations with the absorbance, for this we used sodium phosphate ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ) as standard. The specific activity was obtained by dividing the hydrolyzed phosphate concentration (Pi) by the protein concentration and the reaction time, thus, the specific activity =  $(\text{nmol Pi} \times \mu\text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1})$ . In the inhibition assays, the final activity was calculated in relation to the activity of the control as follows: [% activity =  $[(\text{nmol Pi} \times \mu\text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}) \text{ of the compound}] / (\text{nmol Pi} \times \mu\text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}) \text{ of the control}] \times 100$ ].

### 6.7. Determination of $\text{IC}_{50}$

For each assay a control was made containing the same concentration of DMSO present in the inhibitor suspension. The inhibitor concentration curve ranged from 0.1 to 150  $\mu\text{M}$ . The inhibitory activity was calculated as follows: [% inhibitory activity =  $[(\text{nmol Pi} \times \mu\text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1} \text{ of control} - \text{nmol Pi} \times \mu\text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1} \text{ of compound}) / (\text{nmol Pi} \times \mu\text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1} \text{ of control})] \times 100$ ].

### 6.8. Determination of the apparent $K_m$ and the inhibition constant ( $K_i$ )

To evaluate the enzyme kinetics of rTcNTPDase1 using UDP as a substrate, we performed enzyme activity assays by varying the substrate (UDP) concentration between 15 and 2000  $\mu\text{M}$  (15, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 500, 1000 and 2000  $\mu\text{M}$ ). For the kinetic analyses in the presence of the inhibitors, we chose four inhibitor concentrations that remained fixed during all activity assays - 0  $\mu\text{M}$  (no inhibitor/control), 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , and 100  $\mu\text{M}$  of inhibitor. Substrate concentrations were varied between 300 and 2000  $\mu\text{M}$  (300, 500, 1000, and 2000  $\mu\text{M}$ ). In the curves without inhibitors (Control), DMSO was added at a final concentration equal to those in the reactions with inhibitors (10%). The initial velocity ( $V_0$ ) was defined as  $\text{nmol Pi} / \text{min} \times \mu\text{g}^{-1}$ . GraphPad Prism 7.0 software was used to generate the Michaelis-Menten and Lineweaver-Burk plots, as well as for the calculation of  $K_i$ .

## 6.9. Molecular Modeling

The three-dimensional (3D) structure of the TcNTPDase1 catalytic ectodomain was built using the Phyre2 server [69] by comparative modeling using the *Rattus norvegicus* NTPDase2 (RnNTPDase2) structure as reference (PDB: 3CJA, sequence similarity 24.57%). The structure energy minimization was performed on the YASSARA Energy Minimization web server [70]. The model's quality was evaluated by PROCHEK [71].

## 6.10. Molecular Dynamics and Clusterization

Molecular dynamics (MD) simulations were performed using the GRONingen MACHine for Chemical Simulations (GROMACS) 2019 software [72], applying the CHARMM36m force field [73]. Input files were generated on the CHARMM-GUI web server [74]. The system was solvated with TIP3P water type, neutralized with K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> to a final concentration of 0.15 M KCl, and then minimized. The equilibration step was performed for all three replicates using NVT and NPT ensembles for a total of 2 ns while restraining the protein-heavy atoms with a force of 1000 kJ/mol\*nm<sup>2</sup>. Finally, unrestrained production simulations at 298K and 1 bar for 100 ns were obtained for each replica. The root mean square deviation (RMSD), distances and angles presented in this work were calculated using the analysis module of GROMACS. Conformational clustering was performed using the CLoNe algorithm [75], based on the variation of both the distance between the V251 and F532 C $\alpha$  atoms and their angles with the OE1 atom of the Q373 residue. The last residue belongs to the fourth Apyrase Conserved Regions (ACR) found in this enzyme, which is part of the active site. The other two are located surrounding the active site. Since the focus of this study was to find alternative conformations for the active site, the residues used were well-positioned to capture moments that could lead to different conformations of this region.

## 6.11. Docking

The three-dimensional structure compounds quercetin (**1**), **2**, **14** and **16** were constructed using the AVOGADRO software [76], protonated based on the results generated by MolGpka web server [77], optimized using the MMFF94 force field [78], and saved in PDB format. From the structures obtained through clusterization we chose the Center 2 for the dockings calculations, which were performed using the DockThor Web server [79]. The discretization parameter was set to 0.5 and the box dimension to 40 Å for all the axis. The residue E340 of

the binding site was used as a reference for box centering due to the competitive nature of the compound **16** x, y and z coordinates were 92, 95, and 34, respectively.

### 6.12. Prediction of Protein-ligand interactions and visualization

The protein-ligand interactions were evaluated by using the Protein-ligand Interaction Profile (PLIP) web server [80]. The PLIP output file was visualized with PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC. The same software was used to create all 3D images of the protein-ligand complex.

### 6.13. Statistical analysis

All data were analyzed by GraphPad Prism software version 7.01. For the inhibition assays, the data were subjected to one way ANOVA and two way ANOVA. The Michaelis-Menten plot was obtained from non-linear regression (Michaelis-Menten). For the Lineweaver-Burk plot, substrate and velocity values were transformed using Pharmacology and biochemistry Lineweaver-Burk transformations and analyzed by linear regression by GraphPad Prism 7.01.

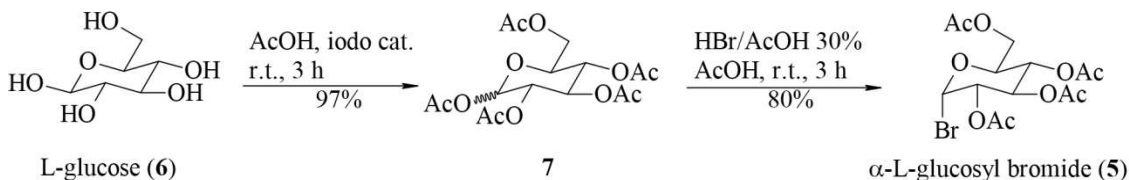
## 7. RESULTS

### 7.1. Preparation of 2,3,4,6-tetra-*o*-acetyl- $\alpha$ -L-glucopyranosyl bromide (**5**)

The synthesis of *ent*-isoquercetin (**2**) begins with the preparation of the glucosyl bromide **5** (2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -L-glucopyranosyl bromide) from commercially available L-glucose using the protocol of Lemieux and Lineback [81] (Fig 2). Acetylation of L-glucose (**6**) led to the formation of per-acetylated glucose (**7**) as a mixture (4:1) of  $\alpha$ - and  $\beta$ -anomers **7** based on the integration of the signals into the <sup>1</sup>H NMR spectrum. The desired  $\alpha$ -glucosyl bromide **5** was prepared as a single anomer by treatment of **7** with HBr/AcOH (30% solution) in 78% overall yield (2 steps), after recrystallization from ethyl ether/petroleum ether (1:1), [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> -96.60 (c 10.15x10<sup>-3</sup>, CH<sub>3</sub>OH).

The stereochemistry of  $\alpha$ -anomer **5** was determined by analyzing its <sup>1</sup>H NMR spectrum, based on the small coupling constant [82] J<sub>1,2</sub>=3.2 Hz, between the anomeric proton and the neighboring 2-hydrogen atom, indicating that these are in a cis ratio. The absence of signals

from its stereoisomer in the  $^1\text{H}$  NMR spectrum corroborates the stereospecificity of the reaction.



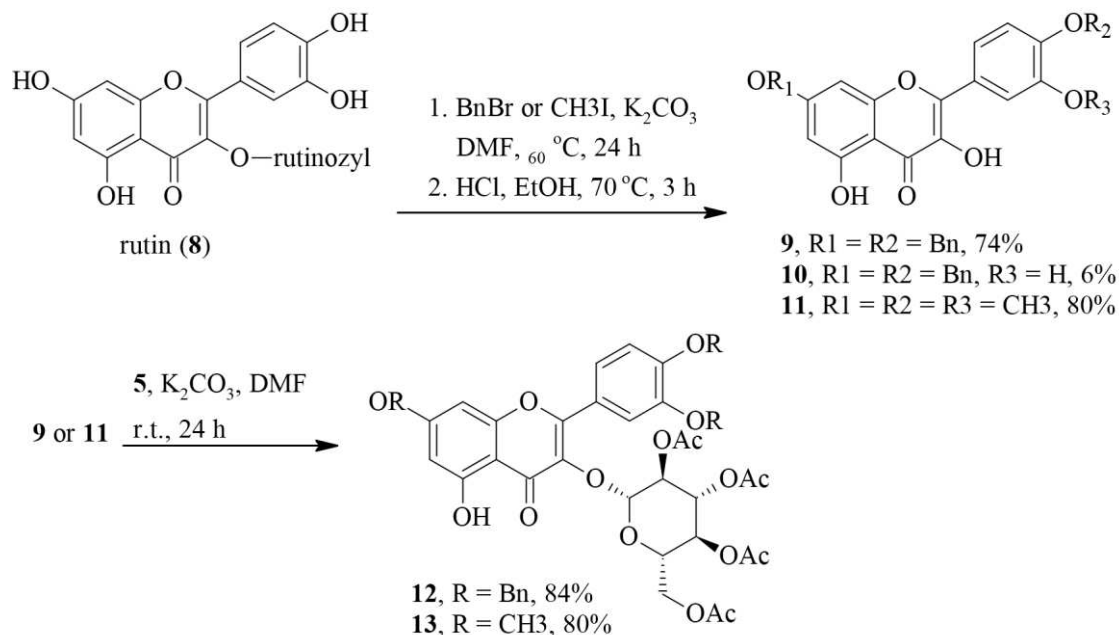
**Fig 2** – Synthesis of  $\alpha$ -glucosyl bromide **5**

## 7.2. Synthesis of quercetin-3-O- $\beta$ -L-glucoside derivatives (**12**) and (**13**)

In turn, an efficient approach to regio and stereoselective glycosylation has been developed to prepare quercetin-3-O- $\beta$ -L-glucoside derivatives (**12**) and (**13**) as shown in Fig 3. The commercially available rutin (**8**) was employed as starting material in this work. Protection of the free hydroxyl groups at **8** by treatment with BnBr and  $\text{K}_2\text{CO}_3$  and acid hydrolysis of the rutinozyl moiety produced a mixture of the aglycone di- and tri-benzylated derivatives **9** and **10** (74% and 6% yield, respectively), which were easily separated on a silica gel chromatographic column. It was not possible to obtain tetra-benzylated compounds, regardless of the excess of BnBr and  $\text{K}_2\text{CO}_3$  used.

It is well known that the hydroxyl function at the 5-position resists benzylation under these conditions. This group is, in fact, less acidic than the other quercetinic phenolic functions, which can be explained by a weakening effect of the acid from the intramolecular hydrogen bond between the 5-hydroxyl group and the 4-keto group [83, 84].

In contrast, treatment of rutin (**8**) with excess  $\text{CH}_3\text{I}$  and  $\text{K}_2\text{CO}_3$  followed by deglycosylation in an acidic medium, produced quercetin O-trimethylated aglycone **11** in 80% yield (2 steps), as a single product (Fig. 3). The glycosylation reaction between aglycones **9** and **11**, respectively, and glucosyl bromide **5**, regioselectively produced glycosides **12** and **13** in yields of 84% and 80% (Fig. 3).



**Fig 3** – Synthesis of quercetin-3-O- $\beta$ -L-glucoside derivatives (**12**) and (**13**)

The higher reactivity of the hydroxyl groups at 3-position [85] in aglycones **9** and **11** allowed the regioselective glycosylation with bromide **5** at that position. Analysis of the <sup>1</sup>H NMR spectra of glycosides **12** and **13** showed signals at 12.40 and 12.44 ppm characteristic of phenolic chelatogenic protons at position 5 of flavonoids; [86] which signals also were observed in precursors **9** and **11**, suggesting that the reaction of glycosylation occurred in the hydroxyl linked to C-3. The confirmation of this regioselectivity was based on the HMBC contour map of **12** that showed a correlation stain between H-1" (5.64 ppm) and C-3 (136.6 ppm), which corroborates the fact that glycosylation occurred in that position. The same conclusion was reached from the analysis of the HMBC contour map of glycoside **13**. Conversely, the large scalar coupling constant ( $J=7.9$  Hz) observed in the <sup>1</sup>H NMR spectrum for the anomeric proton signal in 5.64 ppm in glycoside **12** confirms that it has the expected  $\beta$ -configuration.

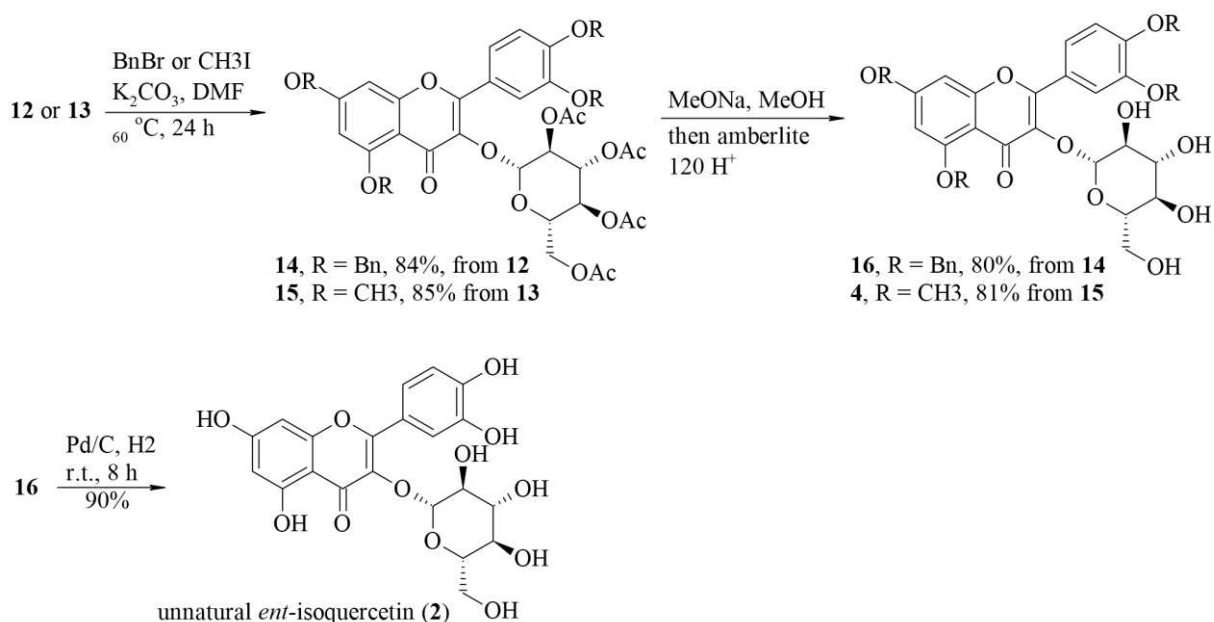
### 7.3. Preparation of quercetin-3-O- $\beta$ -L-glucoside (**2**) and 5,7,4',5'- tetramethyl-quercetin-3-O- $\beta$ -glucoside derivative (**4**)

For the synthesis of quercetin-3-O- $\beta$ -L-glucoside (**2**) and 5,7,4',5'-tetramethoxylated glucoside derivative (**4**), additional protections of free hydroxyls at position 5 in precursors **12** and **13** were required (Fig 4). The direct debenzoylation and deacetylation sequence from **12** to

produce the *ent*-isoquercetin (**2**) was not possible since degradation by-products were always obtained under these conditions.

The free 5-OH is believed to be reactive in the deacetylation step by transesterification employing CH<sub>3</sub>ONa. Thus, their re-protection by treatment with BnBr or CH<sub>3</sub>I and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in glycosides **12** and **13**, respectively, led to the all-protected isoquercetin derivatives **14** and **15** in 84% and 85% yields (Fig 3). Classical deacetylation in the sugar moiety from **14** and **15** by treatment with CH<sub>3</sub>ONa (prepared in situ, from CH<sub>3</sub>OH and sodium metal) and neutralization with anionic resin in the protonated form, produced glycoside **16** and 5,7,4',5'-tetramethyl-quercetin-3-O-β-L-glucoside derivative (**4**) in 80 and 81% yields, respectively, after column chromatographic purification.

Finally, debenzoylation of glycoside **16** with Pd/C and hydrogen atmosphere and purification of the crude residue using a column filled with sephadex LH-20 chromatography resin eluted with a water/methanol (1:1) mixture afforded, analytically pure, *ent*-isoquercetin (**2**), as a pale yellow solid in 90% yield, [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> +2.00 (c 0.01, MeOH). Characterizations of compounds **2** and **4** were made from the analysis of IR, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra and mass spectra. The spectral data of *ent*-quercetin-3-O-β-L-glucoside (**2**) were in agreement with those described for the natural product quercetin-3-O-β-D-glucoside [87, 88].

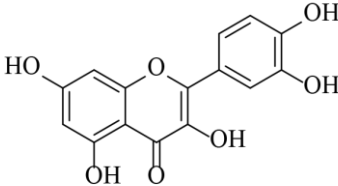
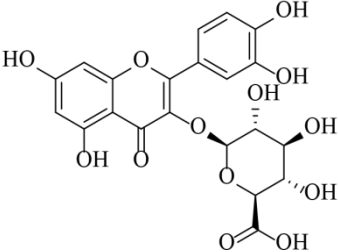
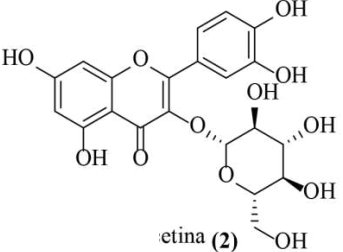
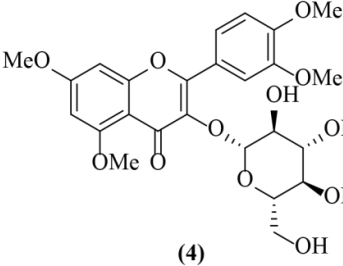


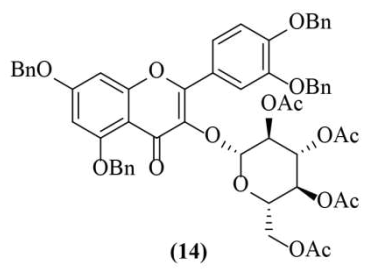
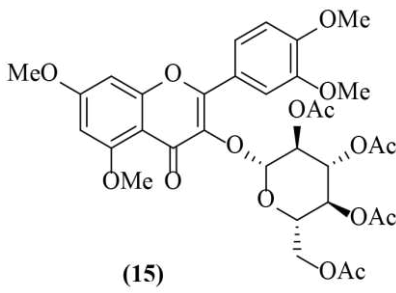
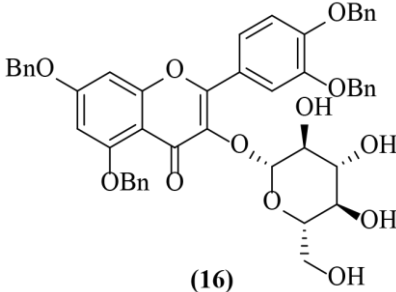
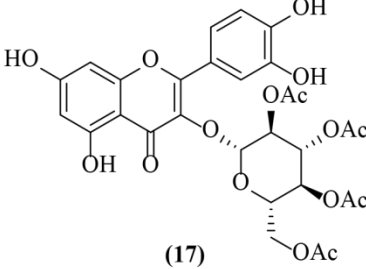
**Fig 4** – Synthesis of *ent*-isoquercetin (**2**) and 5,7,4',5'-tetramethoxylated glucoside derivative (**4**)

#### 7.4. Evaluation of inhibition of rTcNTPDase1 by quercetin and derivative compounds

In this work we tested six new synthetic compounds and two commercial flavonoids (quercetin and miquelianin), this last one is a natural glycosidic derivative of quercetin (quercetin 3-glucuronide). The structure of all compounds is shown in Table 1.

**Table 1: Quercetin derivative compounds used in this study**

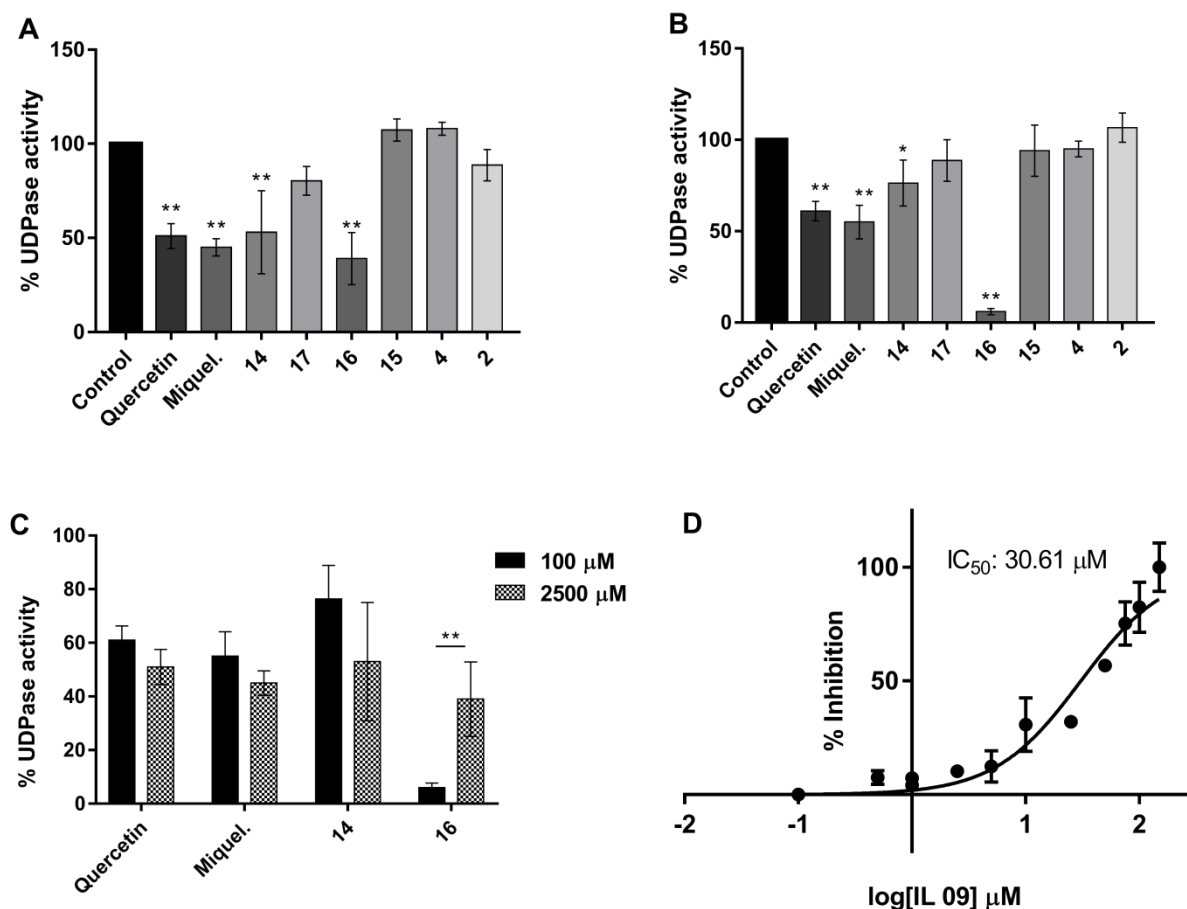
Name	Empirical formula	Molar Mass (g/mol)	Chemical structure <sup>a</sup>
Quercetin (1)	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	302.24	
Quercetin 3-glucuronide (Miquelianin)	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>13</sub>	478.36	
<b>2</b> ( <i>ent</i> -isoquercetin)	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	464.10	
<b>4</b>	C <sub>25</sub> H <sub>28</sub> O <sub>12</sub>	520.16	

<b>14</b>	$C_{57}H_{52}O_{16}$	992.23	 <p style="text-align: center;"><b>(14)</b></p>
<b>15</b>	$C_{33}H_{36}O_{16}$	688.20	 <p style="text-align: center;"><b>(15)</b></p>
<b>16</b>	$C_{49}H_{44}O_{12}$	824.86	 <p style="text-align: center;"><b>(16)</b></p>
<b>17</b>	$C_{29}H_{28}O_{16}$	632.52	 <p style="text-align: center;"><b>(17)</b></p>

<sup>a</sup>Ac: acetyl; Bn: benzyl, Me: methyl.

To evaluate the potential of the compounds as inhibitors of rTcNTPDase1, we expressed the recombinant enzyme and performed inhibition assays. These assays were performed using UDP as substrate because it is a good substrate for rTcNTPDase1 [26]. We used two substrate concentrations (100  $\mu$ M and 2500  $\mu$ M) and only one concentration of the compounds (100  $\mu$ M), so that we could get an initial idea of the possible type of inhibition. In the assays with the highest substrate concentration of 2500  $\mu$ M (Fig 5A), we observed that four compounds showed significant inhibitory activity, quercetin (49%), miquelianin (55%), **14** (47%) and **16** (61%); the other compounds showed no significant inhibitory activity. For the lower substrate concentration assays, 100  $\mu$ M UDP (Fig 5B), we observed that only the same compounds

showed significant inhibitory activity, quercetin (39%), miquelianin (45%), **14** (24%) and **16** (94%).



**Fig 5** – Evaluation of rTcNTPDase1 activity in the presence of synthetic compounds derived from entisoquercetin. In all assays the final concentration of the compounds was always 100 μM. UDP was used as substrate in two concentrations: A) high substrate concentration of 2500 μM UDP and B) low substrate concentration of 100 μM UDP. The controls contained 10% DMSO, the same concentration present in the reactions with the compounds. The graphs were constructed with the activity data normalized against the control (100%). The data were submitted to 1 way ANOVA, using GraphPad Prism software version 7.01 (\*\*(p < 0,001) and \*(p < 0.05). C) Comparison of the inhibition capability of the most promising compounds at the two substrate concentrations, the data was submitted to 2 way ANOVA, using GraphPad Prism software version 7.01 (\*\*(p < 0,001). D) IC<sub>50</sub> assay of **16** using UDP as substrate, the graph was constructed with the activity data transformed (log[inhibitor] x response) and normalized, using GraphPad Prism software version 7.01. All assays were performed in at least three independent biological assays

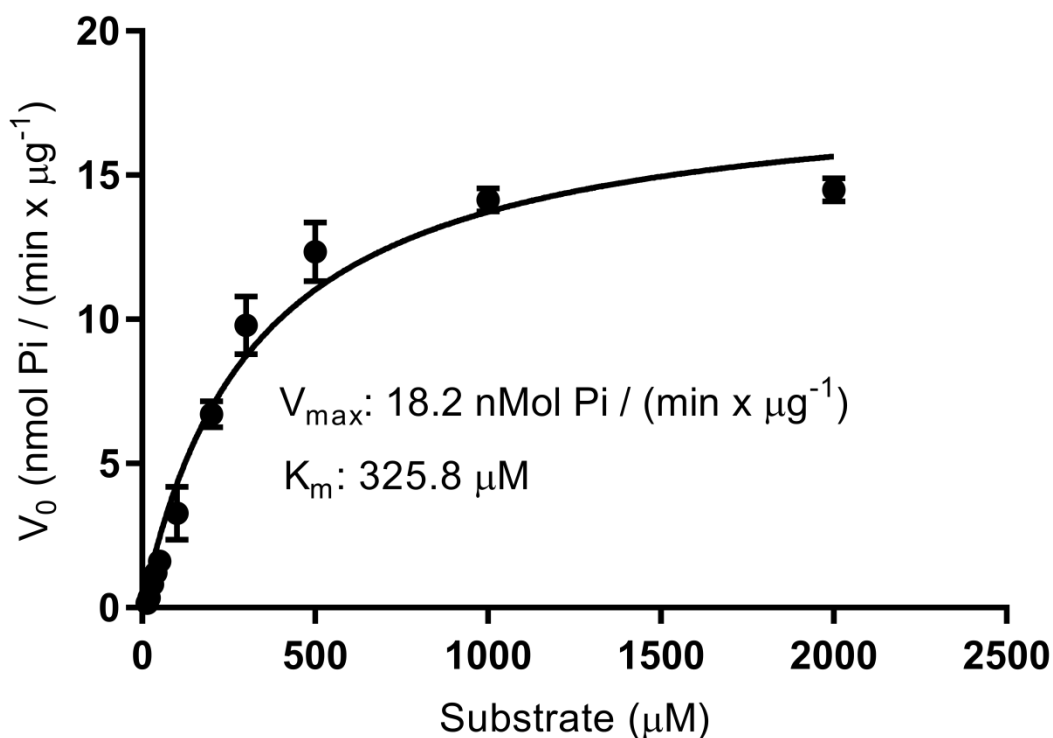
Compound **16** showed a significant decrease in its inhibitory ability when we compared the assays at 100 μM UDP and 2500 μM UDP, this gives us an indication that increasing

substrate interferes with the interaction of the compound with the enzyme, affecting inhibition (Fig 5C). By showing the most promising inhibitory activity compound **16** had its  $IC_{50}$  determined as 30.61  $\mu\text{M}$  (Fig 5D). Furthermore, contrary to what we expected when we started this work, compound 2 did not show inhibitory activity. This compound is the end product of the synthesis pathway, and its phenolic hydroxyls and the hydroxyls of the glycosidic unit are unprotected.

### 7.5. Kinetic parameters of rTcNTPDase1

In the interest of furthering studies on the kinetics of rTcNTPDase1, we sought to determine the kinetic parameters of the recombinant enzyme using UDP as a substrate. After obtaining the activity values by varying the substrate concentrations, we plotted the data that generated the graph of initial velocity per substrate concentration,  $V_0 \times [\text{UDP}]$ . As we can observe in Fig 6, the graph obtained is characteristic of Michaelis-Menten kinetics [89].

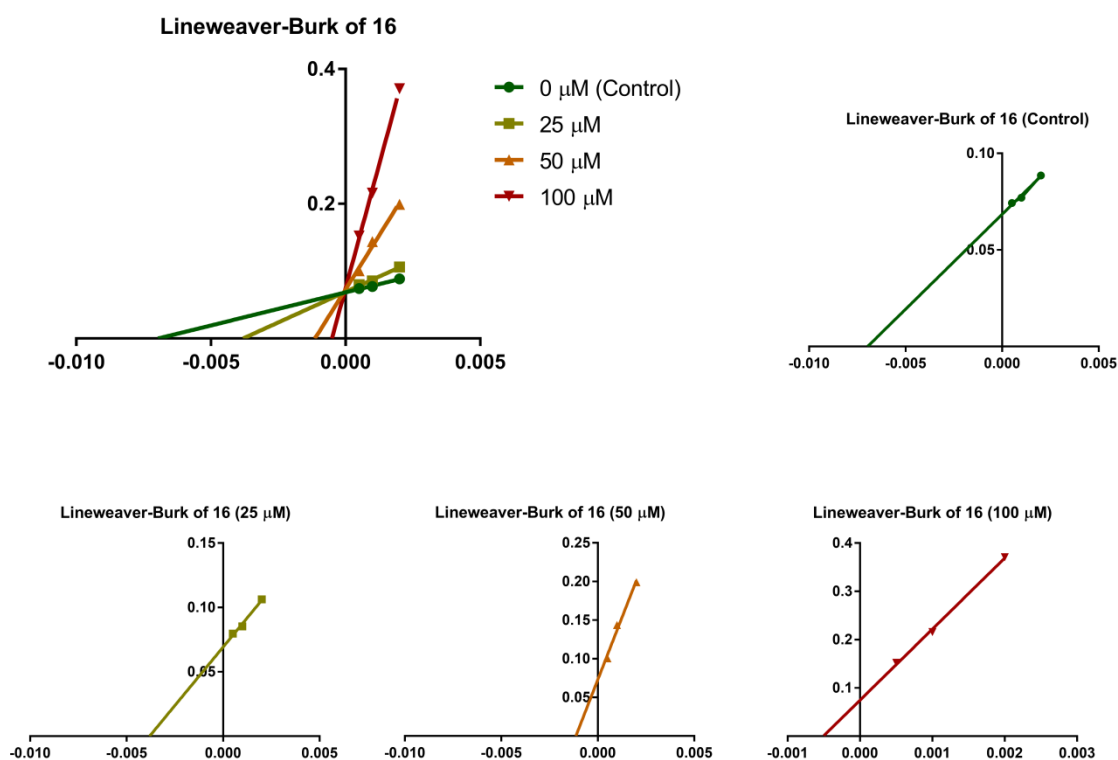
The maximum velocity ( $V_{\text{max}}$ ) and  $K_m$  values for rTcNTPDase1 were 18.2 nmol Pi/ (min  $\times$   $\mu\text{g}^{-1}$ ) ( $\pm 0.778$ ) and 325.8  $\mu\text{M}$  ( $\pm 37.93$ ), respectively. The R square of the curve was 0.9688. To our knowledge, this is the first time that the kinetics of rTcNTPDase1 have been studied using UDP as a substrate, and our data (Fig. 6), show that rTcNTPDase1 follows Michaelis-Menten kinetics. It is known that rTcNTPDase1 has a higher total UDP hydrolysis capacity under conditions of high substrate concentration and final reaction time. Under these conditions, the substrate preference follows the following order: GDP = UDP > GTP = UTP > ADP = ATP [19]. The literature reports variations in  $K_m$  values depending on the methodology used for activity assays. When ATP was used as a substrate in assays using radioactive phosphate [ $\gamma$ -  $^{32}\text{P}$ ], the obtained value was 96  $\mu\text{M}$  [33]. The  $K_m$  value was also determined using IMERs (Immobilized Enzyme Reactors), and by this methodology, the value found was 317  $\mu\text{M}$  for ATP [90].



**Fig 6** – Enzyme kinetics of rTcNTPDase1 with UDP as substrate - the Michaelis-Menten plot was obtained by activity assays determined by the Malachite Green method. The assays were performed in independent biological triplicate. Substrate concentrations ranged from 15  $\mu\text{M}$  to 2000  $\mu\text{M}$ . The graph and  $V_{\text{max}}$  and  $K_m$  values were obtained in GraphPad Prism 7.00 using nonlinear regression parameters

### 7.6. Determination of the type of inhibition of **16**

In order to determine the type of inhibition of compound **16**, which showed the best capacity to inhibit rTcNTPDase1, we performed the enzyme kinetics assays to determine the  $V_{\text{max}}$  and  $K_m$  in four different conditions: without inhibitor (control curve), with 25  $\mu\text{M}$ , with 50  $\mu\text{M}$ , and with 100  $\mu\text{M}$  of inhibitor. The enzyme activity values were used to plot the Lineweaver-Burk plot ( $1/V_0$  x  $1/[\text{UDP}]$ ) (Fig 7). The values of apparent Michaelis-Menten constant ( $K_m$ ), maximum speed ( $V_{\text{max}}$ ) and inhibition constant ( $K_i$ ) were calculated by GraphPad Prism version 7.01 using linear regression.



**Fig 7** – Enzyme kinetics of rTcNTPDase1 in the presence of different concentrations of **16**. Lineweaver-Burk plots were obtained by activity assays determined by the malachite green method. Substrate concentrations ranged from 300  $\mu\text{M}$  to 2000  $\mu\text{M}$ , the control curve without inhibitor, has 10% DMSO, the same concentration present in the reactions with inhibitor. The graphs were obtained in GraphPad Prism 7.00, for this the obtained velocity values and substrate values were transformed (Pharmacology and biochemistry transforms: Lineweaver-Burk) and analyzed by linear regression. Data represent the mean  $\pm$  standard deviations for at least three independent assays for each condition

The Lineweaver-Burk plot (Fig 7), also known as the double-reciprocal plot, allows us to assess the type of inhibition that a compound has. The intersection with the x-axis indicates the double-reciprocal ( $-1/K_m$ ) values for apparent  $K_m$ , and the intersection with the y-axis indicates the double reciprocal values of the maximum velocity ( $1/V_{\text{max}}$ ). The graph profile shown in Figure 7 is characteristic of competitive inhibition, where there is a variation only in  $K_m$  values while  $V_{\text{max}}$  remains the same. The maximum velocity decreases while the apparent  $K_m$  increases. From the graph, we can observe that the straight lines for each substrate concentration cut the y-axis at the same point and cut the x-axis at different points. It was also possible to calculate the  $K_i$  value for compound **16**, which was 8.385  $\mu\text{M}$  ( $\pm 0.8952$ ). This value was lower than that obtained for  $\text{IC}_{50}$ .

**Table 2: Kinetic of compound 16 inhibition on rTcNTPDase1**

<b>Inhibitor concentration</b>	<b>Vmax (nmol Pi/min-1.µg-1)</b>	<b>K<sub>m</sub> (µM)</b>	<b>R square</b>
DMSO Control (No inhibitor)	14.6028 ± 0.41	143.47	0.9773
25	14.3843 ± 0.63	262.33	0.9828
50	13.7193 ± 2.20	881.05	0.9860
100	13.4012 ± 1.82	1972.39	0.9979

V<sub>max</sub> and K<sub>m</sub> values were calculated from the equation obtained by double-reciprocal (Lineweaver-Burk) data represent the mean and standard error for at least three independent assays for each condition

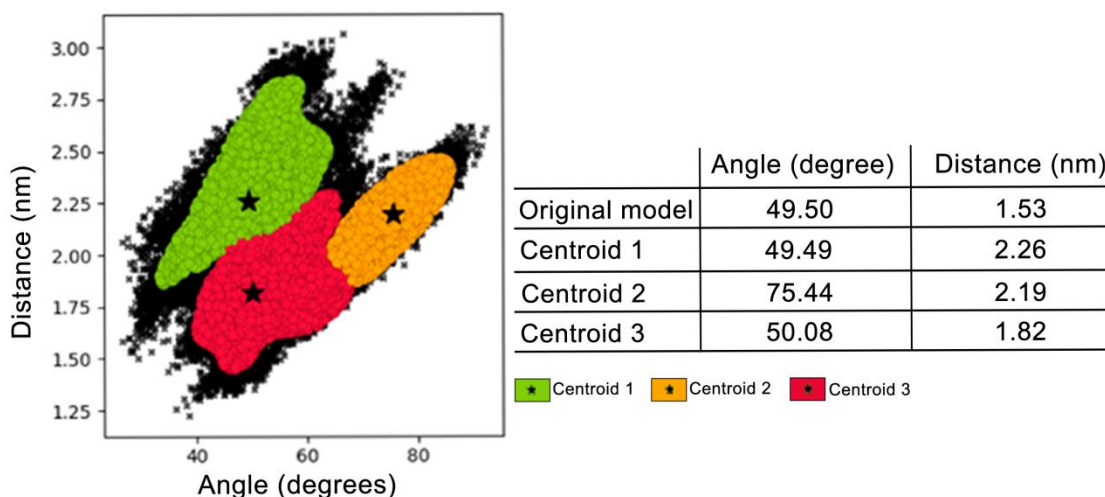
Table 2 shows the values obtained for V<sub>max</sub> and apparent K<sub>m</sub> for each condition. The K<sub>m</sub> values increased considerably, while the V<sub>max</sub> values remained statistically the same. From these values, we can confirm the type of inhibition for compound **16** as competitive. Thus, the presence of the inhibitor affects the enzyme's affinity for the substrate, leading to inhibition of its activity. This inhibition can be reversed by increasing the substrate, as the enzyme reaches its maximum speed even in the presence of the inhibitor. In the case of competitive inhibitors, the inhibitor binds in the same region as the substrate, leading to competition for the active site. Thus, the competitive inhibitor affects the reaction rate by slowing down the formation of the enzyme-substrate complex. However, the maximum rate remains the same because increasing the substrate concentration shifts the reaction, reversing the inhibition. The K<sub>m</sub>, on the other hand, will be affected by a factor  $\alpha$  that can be calculated [91]. Thus, the apparent K<sub>m</sub> increases, while the maximum rate of the enzyme remains the same.

### **7.7. Molecular modeling and docking of TcNTPDase1**

The three-dimensional (3D) structure of the TcNTPDase1 catalytic ectodomain was built using comparative modeling based on the *Rattus norvegicus* NTPDase2 (RnNTPDase2) structure as reference (PDB: 3CJA) (Online resource 2). After energy minimization, the obtained 3D structure of the TcNTPDase1 had a satisfactory overall quality, with 99.7% of residues in allowed regions on Ramachandran plot (Online resource 3). Despite the structural

quality, this model represents just a snapshot of all the possible conformations that TcNTPDase1 can assume based on the conformational changes observed for the NTPDases family [25, 92]. To overcome this limitation, we carried out a 300 ns MD simulation (three replicates of 100 ns each) of the TcNTPDase1. The Root-mean-square deviation (RMSD) measures were calculated based on the  $\alpha$  carbons of the protein, with the first frame of the simulation serving as the reference structure. The graph (Online resource 4) shows that each replicate had a different pattern of fluctuation in RMSD. Furthermore, for the majority of the simulation time, the fluctuations in RMSD of all replicates were above 0.5 nanometers (ns), ranging up to 1 nm for replicates 2 and 3. These results suggest that the protein undergoes some degree of conformational changes during the simulations. After the MD simulation, we clustered the sampled conformations based on the variation of the distance between  $\alpha$  Carbon VAL251 and PHE532, and their angles with the OE1 atom of the GLN373 residue. The fluctuations of these measurements over the simulation time can be seen on online resource 5.

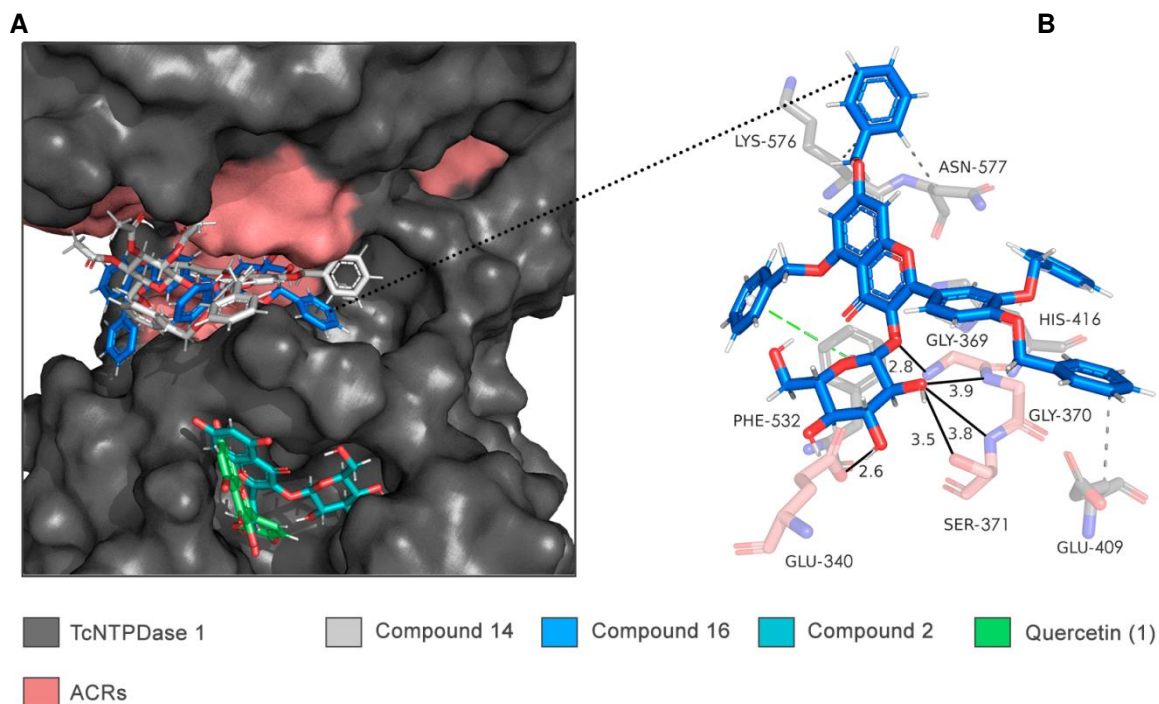
In the initial model, the distance between the  $\alpha$  carbons of the residues of VAL251 and PHE532 and the angle formed with the OE1 atom of the GLN373 residue were 1.53 nm and  $49.50^\circ$ , respectively. Figure 8 shows the values of distance and angle formed between the above atoms in the structure obtained for each centroid. Among the three conformations found (centroid 1, 2 and 3), conformation 2 showed the highest degree of openness between the angle formed with the OE1 atom of residue GLN373 of  $75.44^\circ$  and distance between the  $\alpha$  carbons of residues of VAL251 and PHE532 of 2.19 nm . Thus, since the interaction between the enzyme and the inhibitor is more likely to occur in the open state of the enzyme, we chose to proceed with conformation 2.



**Fig 8** – Clustering of the structural model of TcNTPDase1. In the graph we see the clustering and the representation of each centroid - centroid 1 (green), centroid 2 (yellow) and centroid 3 (red). The angle and distance values for the original model and for the three centroids are shown in the table. Clustering was done based on the variation of the distance between the  $\alpha$ -carbon VAL251 and PHE532 and their angles with the OE1 atom of the GLN373 residue

Figure 9 shows the surface representation of the 3D structure of TcNTPDase1. In dark gray we can see the protein chain and in light red we see the sequences of ACRs that form the active site. We can see that the interactions of compounds **14** (white) and **16** (blue) occurred at the active site of TcNTPDase1 with energies of  $-9.67 \text{ kcal.mol}^{-1}$  and  $-10.13 \text{ kcal.mol}^{-1}$ , respectively, according to the coupling server. In turn, quercetin (green) and compound **2** (cyan) interacted in a region not belonging to the active site and with binding energies of  $-7.50 \text{ kcal.mol}^{-1}$  and  $-8.27 \text{ kcal.mol}^{-1}$ , respectively (Fig. 9A).

In figure 9B, we see the 3D structure of compound **16** interacting with TcNTPDase1. The compound **16** has been rotated to better observe the interactions of the glycoside portion. The 3D structures of compounds **2**, **14** and quercetin and their respective interactions with TcNTPDase1 can be seen in the online resource 6. In Table 3, we can see the predicted molecular docking interactions of the compounds with the enzyme. The table shows the TcNTPDase1 residues that are interacting with the compound, the type of interaction, the number of interactions made by each residue, and the distance. In addition, we can observe the corresponding residue in RnNTPDase2.



**Fig 9** – Docking of compounds quercetin, compound 2, **14** and **16** with TcNTPDase1. (A) In dark gray, the protein chain and the region in light red represents the ACRs, which form the active site of the enzyme. Compounds **14** (light gray) and **16** (blue) interacted in the active site of TcNTPDase1, -9.67 kcal.mol<sup>-1</sup> and -10.13 kcal.mol<sup>-1</sup>. Quercetin (green) and compound 2 (cyan) interacted outside the active site of the enzyme, -7.50 kcal.mol<sup>-1</sup> and -8.27 kcal.mol<sup>-1</sup>. (B) In highlight, we see the 3D structure of compound **16** interacting with TcNTPDase1, which was rotated to better observe the interactions of the glycosidic portion

For compound **16**, hydrophobic interactions were predicted between the benzyl rings attached to the quercetin portion and residues GLU 409, HIS 414, LYS 576 and ASN 577. A  $\pi$ -Cation interaction occurs with residue PHE 532. And hydrogen bonds were also predicted between the glycoside portion and residues GLU 340, SER 371, GLY 369 and 370. In the case of compound **14**, hydrophobic interactions occur only with residues LYS 576 and ASN 577. A  $\pi$ -Cation interaction occurs with residue LYS 576. And hydrogen bonds occur with residues SER 209 and ASN 577 (Table 3). As we can see, compound **16** interacts with the active site differently from compound **14**. The spatial arrangement of compound **16** allows the glycoside portion to interact in the innermost region of the catalytic site, which allows for a greater number of interactions. Meanwhile, compound **14**, which has Ac groups protecting the hydroxyls of the glycoside portion, has a spatial arrangement where the interaction of the glycoside portion occurs in the outermost portion of the catalytic site (Fig 9A).

**Table 3: Result of the interaction of TcNTPDase1 with quercetin, compound 2, 14 and 16 by molecular docking**

Compounds	Interaction type	AA residue in TcNTPDase1	Number of interactions	Distance <sup>b</sup> (Å)	Corresponding AA residue in RnNTPDase2
Quercetin (1)	$\pi$ – Cation	LYS 578	1	3.46	THR 393
	Hydrophobic	LYS 578	1	3.44	THR 393
	Hydrogen Bond	ARG 536	2	3.52 2.88	TYR 351
		ASN 577	1	3.08	LYS 392
		LYS 578	1	3.61	THR 393
		GLU 584	1	3.49	No match
		MET 585	1	3.34	No match
		GLU 586	1	3.73	No match
<i>ent</i> -isoquercetin (2)	$\pi$ – Cation	-	-	-	-
	Hydrophobic	LYS 578	1	3.28	THR 393
	Hydrogen Bond	ARG 536	1	3.38	TYR 351
		LEU 568	1	3.39	GLU 383
		THR 574	1	2.89	PRO 389
		LYS 575	1	3.61	GLY 390
		ASN 577	1	3.58	LYS 392
		GLU 584	1	2.94	No match
MET 585	1	3.14	No match		
14	$\pi$ – Cation	LYS 576	1	3.82	GLN 391
	Hydrophobic	LYS 576	2	3.49 3.83	GLN 391
		ASN 577	1	4.00	LYS 392
	Hydrogen Bond	SER 209	1	2.62	SER 48
		ASN 577	1	2.90	LYS 392
16	$\pi$ – Cation	PHE 532	1	5.17	ALA 347
	Hydrophobic	GLU 409	1	3.72	LEU 241
		HIS 414	1	3.62	ASP 246
		LYS 576	1	3.85	GLN 391
		ASN 577	1	3.99	LYS 392
		GLU 340	1	2.61	GLU 165
	Hydrogen Bond	GLY 369	1	2.78	GLY 204
		GLY 370	1	3.93	ALA 205
		SER 371	3	3.81 3.49 3.49	SER 206

AA - amino acid. <sup>b</sup>For hydrophobic and  $\pi$ -type interactions the distances have the protein chain as reference. For hydrogen bonds the distances were measured between donor and acceptor.

For compound **2** (*ent*-isoquercetin), hydrophobic interactions were predicted only with residue LYS 578 and the aromatic ring of the quercetin portion. And hydrogen bonds between the phenolic hydroxyls of the quercetin portion and the hydroxyls of the glycoside portion with residues ARG 536, LEU 568, THR 574, LYS 575, ASN 577, GLU 584 and MET 585. For quercetin, hydrophobic interactions were also predicted only with residue LYS 578 and a  $\pi$ -Cation interaction with the same residue. Hydrogen bonds also occurred between the phenolic hydroxyls and residues ARG 536, ASN 577, LYS 578, GLU 584, MET 585 and GLU 586 (Table 3). In this work, molecular docking simulations show that both compounds interacted outside the active site of the enzyme (Fig 9A).

## 8. DISCUSSION

This work described the search for new inhibitors of rTcNTPDase1, an important enzyme in the context of the infection by the parasite *T. cruzi* which is the aetiological agent of the tropical neglected disease Chagas's Disease. In this work we tested the flavonoid quercetin, the commercial glycoside derivative miquelianin (that has the sugar in D configuration) and six new synthetic compounds with sugar in the nonnatural L configuration.

The quercetin is a flavonoid from the flavonol group [37]. The flavonoids have specific characteristics: two aromatic rings (A e B) and a pyran ring (C). The quercetin has two OH groups one at C7 and another at C5 in the ring A; at the ring C there is an OH in the C3 and another two OH in the C3`e C4`, at ring B. There are glycosylated derivatives of quercetin, the isoquercetin (quercetin-3-O- $\beta$ -D-glucoside) and the *ent*-isoquercetin (quercetin-3-O- $\beta$ -L-glucoside) that is a non-natural derivative of quercetin. The compounds we produced in this work were intermediates of the synthesis of *ent*-isoquercetin (**2**). In this way, all of the synthetic intermediates are non-natural L-glycosylated derivatives of *ent*-isoquercetin.

Our enzyme activity data (Fig 5) showed that quercetin and its commercial D-glucoside derivative miquelianin inhibits rTcNTPDase1 by ~50%. Quercetin has been shown to have partial inhibitory effect on ectonucleotidases and purinergic enzymes [56, 57], to our knowledge, our work shows the first direct evidence that quercetin could be a partial inhibitor of ENTPDase family of ectonucleotidases because TcNTPDase1 is a member of this enzyme family [16, 30, 33] and is inhibited by quercetin by ~50% as well.

Regarding the new synthetic compounds presented in Table 1, the results of the inhibition assays indicate that compounds **14** and **16** were shown to be able to inhibit rTcNTPDase1 by

24% and 94%, respectively. The other compounds, as well as *ent*-isoquercetin (**2**), showed no inhibitory activity (Figure 5A and 5B). The IC<sub>50</sub> of compound **16** was determined in 30.61  $\mu$ M. Knowing that rTcNTPDase follows Michaelis-Menten kinetics (Fig 6), we determined the type of inhibition of **16** (Fig 7) as competitive with K<sub>i</sub> of 8.385 $\mu$ M ( $\pm$  0.8952). Another important point, was to note that in the inhibition and kinetics assays the DMSO contained in the reactions (10% DMSO) affected the activity of TcNTPDase1, leading to an apparent increase in enzyme activity. However, the presence of DMSO in the control reactions allowed us to compare the apparent K<sub>m</sub> and V<sub>max</sub> values of the kinetics assays with the inhibitor **16** (Table 2).

Initially, it aroused our interest to investigate the structural differences between these compounds. The synthetic compounds can be divided into their quercetin portion, which contains the two aromatic rings and the pyran ring, and the glycoside portion, which is formed by the L-glucose radical. In this way, it becomes easier to visualize the structural differences between them. In relation to the quercetin portion, it is important to highlight that compounds **14** and **16**, which presented inhibitory effects, have the phenolic hydroxyls (present in the quercetin portion) protected by benzyl groups (Bn), while none of the other compounds present these benzyl groups in their structure. In addition, compounds **4** and **15** have the phenolic hydroxyls protected by methyl groups (Me), while compounds **2** and **17** have the phenolic hydroxyls free. Regarding the glycosidic portion, it can be observed that compounds **14**, **15**, and **17** have the hydroxyls protected by acetate groups (Ac), while compounds **2**, **4** and **16** have these free hydroxyls.

Considering only these structural differences, it is possible to assume that the benzyl groups are important for the interaction with the enzyme, since the synthetic compounds that do not possess this group were not able to inhibit rTcNTPDase1. However, it is important to note that the benzyl groups have a larger radius than the hydroxyl and methyl groups, which could affect the spatial arrangement and interactions with the active site of the enzyme in case of a competitive inhibition, as is the case of compound **16**. Moreover, the glycoside portion, either free or protected by acetates, also affects the spatial arrangement of the compounds and, consequently, the interaction with the enzyme. In this sense, it is worth noting that compounds **14** and **16** differ only in their glycosidic portion, which could explain the difference in the inhibitory capacity of these compounds. However, it was necessary to perform analyses that would allow us to confirm our hypotheses.

Molecular docking of the compounds with TcNTPDase1 could elucidate the molecular interactions and predict the behavior of the selected compounds (quercetin, **2**, **14** and **16**) in the binding site of the enzyme. Thus, the structure of TcNTPDase1 was modeled from a structure of RnNTPDase2 crystallized with the ATP analog AMPPNP [93]. Molecular dynamics simulations indicated that the structure of TcNTPDase1 undergoes a certain degree of conformational changes, and it is predicted that this enzyme may assume a more open conformation (Fig 8). We know that, structural studies of the crystals of NTPDases from *Rattus norvegicus* [93] and *Legionella pneumophila* [94], revealed the presence of two structural domains ( $\alpha$  and  $\beta$ ) in addition to identifying the catalytic site of the enzyme and proposing a mechanism of action. The crystal of LpNTPDase1 was obtained both in the presence and absence of ligand, and showed a more open conformation without the ligand [94]. More recently, the crystal structure of human NTPDase4 was also obtained and showed a more open conformation in the absence of ligand [95].

Furthermore, studies of the mechanism of action of these enzymes suggest that during hydrolysis there is rotational movement between the domains, which modifies the openness of the catalytic site; this movement is important for catalysis and substrate specificity [92, 95, 96]. Thus, after clustering the model obtained for TcNTPDase1, we chose conformation 2, which presents greater opening angles of the active site, i.e., in this conformation the structure of TcNTPDase1 is more open and we believe that it can simulate the best structural state of the enzyme without ligand or before hydrolysis.

The docking data for compounds **14** and **16** demonstrated their ability to interact with the residues in the active site of TcNTPDase1, but with significant differences between them. The spatial arrangement of compound **14** resulted in its interaction occurring at the outermost part of the active site, while compound **16** was able to interact with internal residues (Fig 9). For compound **14**, it was predicted that the Bn groups engage in hydrophobic interactions with LYS 576 and ASN 577 residues, as well as  $\pi$ -Cation interaction with LYS 576. The glycosidic portion of the compound, protected by Ac groups, interacts via hydrogen bonds with residues ASN 576 and SER 209. SER 209 is the only other residue belonging to an ACR (Online Resource 6).

For compound **16**, the Bn groups were predicted to establish hydrophobic interactions with residues GLU 409, HIS 414, LYS 576, and ASN 577, and a  $\pi$ -cation interaction with PHE 532, all of which are outside the ACRs. Hydrogen bonds were predicted between the L-

glycosidic portion and residues GLU 340, SER 371 and GLY 369 and 370 (Fig 9B), and all these residues are in ACRs. It is clear that, when compared with compound **14**, compound **16** has a higher number of hydrophobic interactions with the Bn groups of the quercetin portion, as well as a higher number of hydrogen bonds with the L-glycosidic portion, which would explain a higher binding stability between compound **16** and TcNTPDase1 (Table 3).

Furthermore, our results suggest that compound **16** makes hydrogen bonds with residues GLU 340 and SER 371, residues that correspond to GLU165 and SER 206 of RnNTPDase2 (Table 3). It has been proposed that these residues are important in the mechanism of catalysis, since they are involved in the activation and positioning of a water molecule that will make the nucleophilic attack on the last phosphate of the nucleotide [93]. These residues are part of ACR3 (GLU 340) and ACR4 (SER 371) and it has been shown that replacing these residues with alanine (A) leads to the inactivation of the enzyme [92, 97]. Hydrogen bonding also occurs with the glycine residues, GLY 369 and GLY 370. These residues are part of ACR4 of TcNTPDase1 and are close to the motifs known as DXG, in the case of TcNTPDase1, DLG (ASP 366, LYS367 and GLY368). Mutations in the aspartic acid or glycine of this sequence have led to inactivation of the NTPDases [23]. However, no data were found involving alterations demonstrating the direct importance of residues near this region.

Although both compounds were able to inhibit TcNTPDase1, compound **16** showed close to 100% inhibition, while compound **14** inhibited between 45 and 24%. Making a parallel with the docking data and taking into consideration the chemical structure of these compounds, we can assume that structural differences in the L-glycosidic portion are determinant for the interaction process. The Ac groups that are present only in compound **14** (see structure in Table 1) lead this compound to acquire a different spatial arrangement than compound **16**. This reflects directly in the interaction between these compounds and TcNTPDase1, therefore compound **14** interacts with residues more external to the active site, having a lower number of interactions of both the quercetin portion and the L-glycoside portion (Fig 9A). The spatial arrangement of compound **16**, on the other hand, allows it to perform a higher number of hydrophobic interactions with the quercetin portion and a higher number of hydrogen bonds between the glycoside portion, which has its free hydroxyls, and the residues in the innermost part of the active site. In addition, these interactions occur with residues described as important for the activity of NTPDases, such as GLU 340 and SER 371[92, 97].

Different from **14** and **16**, quercetin and compounds **2** bind to a different region of the catalytic site. However, while compound **2** showed no ability to inhibit TcNTPDase1, quercetin inhibited enzyme activity by approximately 50%. This fact does not eliminate the possible interaction of quercetin with the active site, but shows that it can bind to another region of the protein. We must emphasize that, although molecular docking is one of the most used tools in the search for new drugs it has its limitations [98–100]. The accuracy of the results depends on the strategy used, since docking is tied to several variables, among them the quality of the structures and the input parameters, such as protonation states, tautomers and solvation effects, which can introduce errors and uncertainties. In addition, molecular docking does not take into account the conformational flexibility and dynamic nature of the ligand and receptor, which can affect the binding process. For this reason, docking should be used in conjunction with other experimental and computational methods to validate the results [101–103].

Our data has new important knowledge about rTcNTPDase1 activity and the new inhibitor **16**, considering that one of the goals of this work in the future is to try to find specific inhibitors that could be used as a prototype of new chemotherapy for CD it is important in the future to evaluate the specificity of **16** in relation to the mammalian ENTPDases.

## 9. CONCLUSIONS

This study aimed to search for new inhibitors of rTcNTPDase1, an important enzyme in the context of *T. cruzi* infection, which is the aetiological agent of Chagas's Disease. We tested several compounds, including the flavonoid quercetin, the commercial glycoside derivative miquelianin (with the sugar in D configuration), and six new synthetic compounds (with the sugar in the L configuration). Our results showed that compound **16** had high inhibitory activity against rTcNTPDase1, with an  $IC_{50}$  of 30.61  $\mu$ M and a  $K_i$  of 8.358. Structural analyses validated the competitive mode of inhibition of compound **16** and highlighted possible molecular interactions between the inhibitor and the enzyme. Additionally, we identified three partial inhibitors of rTcNTPDase1: quercetin, miquelianin, and compound **14**. These findings could contribute to future studies of TcNTPDase1 and the development of new therapies for Chagas's Disease based on TcNTPDase1 inhibitors. Furthermore, we believe that our results can help in a new venue of ENTPDase development of inhibitors that can be useful for other purinergic signaling applications.

## 10. REFERENCES

1. Chagas C (1909) Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiologico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1:159–218. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761909000200008>
2. Nguyen T, Waseem M (2020) *Chagas Disease*, 1st ed. StatPearls Publishing, New York
3. Rassi A, Rassi A, Marin-Neto JA (2010) Chagas disease. *Lancet* 375:1388–1402. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X)
4. Guarner J (2019) Chagas disease as example of a reemerging parasite. *Semin Diagn Pathol* 36:164–169. <https://doi.org/10.1053/j.semdp.2019.04.008>
5. Antinori S, Galimberti L, Bianco R, et al (2017) Chagas disease in Europe: A review for the internist in the globalized world. *Eur J Intern Med* 43:6–15. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2017.05.001>
6. WHO (2022) Doença de Chagas ( também conhecida como tripanossomíase americana ). [https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab_1). Accessed 1 Nov 2022
7. WHO (2020) Tratament of Chagas disease. In: *World Heal. Organ.* <http://www.who.int/chagas/disease/treatment/>. Accessed 4 Aug 2020
8. Rodrigues Coura J, De Castro SL (2002) A critical review on chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97:3–24. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000100001>
9. Ribeiro V, Dias N, Paiva T, et al (2020) Current trends in the pharmacological management of Chagas disease. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 12:7–17. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2019.11.004>
10. Kirchhoff L V (2000) AMERICAN TRYPANOSOMIASIS (CHAGAS' DISEASE). *Gastroenterol Clin North Am* 25:517–533. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0889-8553\(05\)70261-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0889-8553(05)70261-2)

11. Kratz JM (2019) Acta Tropica Drug discovery for chagas disease : A viewpoint. *Acta Trop* 198:1–5. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105107>
12. Kratz JM, Bournissen FG, Forsyth CJ, Forsyth CJ (2018) Expert Review of Clinical Pharmacology Clinical and pharmacological profile of benznidazole for treatment of Chagas disease. *Expert Rev Clin Pharmacol* 11:943–957. <https://doi.org/10.1080/17512433.2018.1509704>
13. Sueth-Santiago V, Decote-Ricardo D, Morrot A, et al (2017) Challenges in the chemotherapy of Chagas disease: Looking for possibilities related to the differences and similarities between the parasite and host. *World J Biol Chem* 8:57. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v8.i1.57>
14. Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, et al (2015) Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N Engl J Med* 373:1295–1306. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1507574>
15. Cardoso CS, Ribeiro ALP, Oliveira CDL, et al (2018) Beneficial effects of benznidazole in Chagas disease : NIH SaMi-Trop cohort study. *PLoS Negl Trop Dis* 37:1–12. <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006814> Editor:
16. Fietto JLR, DeMarco R, Nascimento IP, et al (2004) Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun* 316:454–460. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.02.071>
17. Robson SC, Sévigny J, Zimmermann H (2006) The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal* 2:409–430. <https://doi.org/10.1007/s11302-006-9003-5>
18. Handa M, Guidotti G (1996) Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (Apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Biochem Biophys Res Commun* 218:916–923. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.0162>
19. Vasconcellos RDS, Mariotini-Moura C, Gomes RS, et al (2014) *Leishmania infantum* Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-2 is an Apyrase Involved in Macrophage Infection and Expressed in Infected Dogs. *PLoS Negl Trop Dis* 8:. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003309>

20. Drosopoulos JHF, Broekman MJ, Islam N, et al (2000) Site-Directed Mutagenesis of Human Endothelial Cell Ecto-ADPase / Soluble CD39 : Requirement of Glutamate 174 and Serine 218 for Enzyme Activity and Inhibition of Platelet Recruitment †. *Biochemistry* 39:6936–6943
21. Grinthal A, Guidotti G (2000) Articles Substitution of His59 Converts CD39 Apyrase into an ADPase in a Quaternary Structure Dependent Manner †. *Biochemistry* 39:9–16
22. Smith TM, Carl SAL, Kirley TL (1999) Mutagenesis of Two Conserved Tryptophan Residues of the E-Type ATPases : Inactivation and Conversion of an Ecto-Apyrase to an Ecto-NTPase †. *Biochemistry* 38:5849–5857
23. Smith TM, Kirley TL (1999) Site-Directed Mutagenesis of a Human Brain Ecto-Apyrase : Evidence That the E-Type ATPases Are Related to the Actin / Heat Shock 70 / Sugar Kinase. *Biochemistry* 38:321–328
24. Zimmermann H (2000) Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362:299–309. <https://doi.org/10.1007/s002100000309>
25. Zimmermann H (2021) Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolases and ecto-5' - nucleotidase in purinergic signaling : how the field developed and where we are now. *Purinergic Signal* 17:117–125
26. Sansom FM, Robson SC, Hartland EL (2008) Possible Effects of Microbial Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolases on Host-Pathogen Interactions. *Microbiol Mol Biol Rev* 72:765–781. <https://doi.org/10.1128/membr.00013-08>
27. Sansom FM (2012) The role of the NTPDase enzyme family in parasites : what do we know , and where to from here? *Parasitology* 139:963–980. <https://doi.org/10.1017/S003118201200025X>
28. Silva W da, Torres N da R, de Melo Agripino J, et al (2020) ENTPDases from Pathogenic Trypanosomatids and Purinergic Signaling: shedding light towards Biotechnological Applications. *Curr Top Med Chem* 20:1–14. <https://doi.org/10.2174/1568026620666201005125146>
29. Meyer-Fernandes JR, Saad-Nehme J, Peres-Sampaio CE, et al (2004) A Mg-dependent

- ecto-ATPase is increased in the infective stages of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res* 93:41–50. <https://doi.org/10.1007/s00436-003-1066-4>
30. Santos RF, Pôssa MAS, Bastos MS, et al (2009) Influence of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity on *Trypanosoma cruzi* infectivity and virulence. *PLoS Negl Trop Dis* 3:. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000387>
  31. Silva-Gomes NL, Ennes-Vidal V, Carolo JCF, et al (2014) Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase1 (TcNTPDase-1) gene expression is increased due to heat shock and in infective forms of *Trypanosoma cruzi*. *Parasites and Vectors* 7:1–6. <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0463-0>
  32. Silva-gomes NL, Cássia R De, Rampazzo P, et al (2020) Knocking Down TcNTPDase-1 Gene Reduces in vitro Infectivity of *Trypanosoma cruzi* Knockout and Overexpression of the. *Front Microbiol* 11:1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00434>
  33. Mariotini-Moura C, Bastos MS e., de Castro FF, et al (2014) *Trypanosoma cruzi* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (TcNTPDase-1) biochemical characterization, immunolocalization and possible role in host cell adhesion. *Acta Trop* 130:140–147. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.11.008>
  34. Paes-vieira L, Gomes-vieira LA, Meyer-Fernandes JR (2021) E-NTPDases : Possible Roles on Host-Parasite Interactions and Therapeutic Opportunities. *Front Cell Infect Microbiol* 11:1–11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.769922>
  35. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR (2016) Flavonoids: An overview. *J Nutr Sci* 5:. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
  36. Salehi B, Machin L, Monzote L, et al (2020) Therapeutic Potential of Quercetin: New Insights and Perspectives for Human Health. *ACS Omega* 5:11849–11872. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c01818>
  37. D’Andrea G (2015) Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications? *Fitoterapia* 106:256–271. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2015.09.018>
  38. Li Y, Yao J, Han C, et al (2016) Quercetin, inflammation and immunity. *Nutrients* 8:1–14. <https://doi.org/10.3390/nu8030167>

39. Cushnie TPT, Lamb AJ (2005) Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents* 26:343–356. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002>
40. Abbaszadeh S, Rashidipour M, Khosravi P, et al (2020) Biocompatibility, cytotoxicity, antimicrobial and epigenetic effects of novel chitosan-based quercetin nanohydrogel in human cancer cells. *Int J Nanomedicine* 15:5963–5975. <https://doi.org/10.2147/IJN.S263013>
41. Kowalski L, Dias da Silva A, Rodrigues Pagno A, Piana M (2020) Atividade Antimicrobiana de Flavonoides: uma Revisão de Literatura. *Rev Interdiscip em Ciências da Saúde e Biológicas* 4:51–65. <https://doi.org/10.31512/ricsb.v4i1.119>
42. Chiow KH, Phoon MC, Putti T, et al (2016) Evaluation of antiviral activities of *Houttuynia cordata* Thunb. extract, quercetin, quercetrin and cinanserin on murine coronavirus and dengue virus infection. *Asian Pac J Trop Med* 9:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2015.12.002>
43. Wu W, Li R, Li X, et al (2015) Quercetin as an antiviral agent inhibits influenza A virus (IAV) Entry. *Viruses* 8:. <https://doi.org/10.3390/v8010006>
44. Wong G, He S, Siragam V, et al (2017) Antiviral activity of quercetin-3- $\beta$ -O-D-glucoside against Zika virus infection. *Virol Sin* 32:545–547. <https://doi.org/10.1007/s12250-017-4057-9>
45. Kim CH, Kim JE, Song YJ (2020) Antiviral activities of quercetin and isoquercitrin against human herpesviruses. *Molecules* 25:. <https://doi.org/10.3390/molecules25102379>
46. Glinsky G V. (2020) Tripartite combination of candidate pandemic mitigation agents: Vitamin D, Quercetin, and Estradiol Manifest properties of medicinal agents for targeted mitigation of the COVID-19 pandemic defined by genomics-guided tracing of SARS-CoV-2 targets in human . *Biomedicines* 8:. <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES8050129>
47. Derosa G, Maffioli P, D'Angelo A, Di Pierro F (2020) A role for quercetin in coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Phyther Res* 1–7. <https://doi.org/10.1002/ptr.6887>

48. Biancatelli RMLC, Berrill M, Catravas JD, Marik PE (2020) Quercetin and Vitamin C: An Experimental, Synergistic Therapy for the Prevention and Treatment of SARS-CoV-2 Related Disease (COVID-19). *Front Immunol* 11:1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01451>
49. Serban MC, Sahebkar A, Zanchetti A, et al (2016) Effects of Quercetin on Blood Pressure: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J Am Heart Assoc* 5:1–15. <https://doi.org/10.1161/JAHA.115.002713>
50. Marunaka Y, Marunaka R, Sun H, et al (2017) Actions of quercetin, a polyphenol, on blood pressure. *Molecules* 22:5–8. <https://doi.org/10.3390/molecules22020209>
51. Ferenczyova K, Kalocayova B, Bartekova M (2020) Potential implications of quercetin and its derivatives in cardioprotection. *Int J Mol Sci* 21:. <https://doi.org/10.3390/ijms21051585>
52. Vargas AJ, Sittadjody S, Thangasamy T, et al (2011) Exploiting tyrosinase expression and activity in melanocytic tumors: Quercetin and the central role of p53. *Integr Cancer Ther* 10:328–340. <https://doi.org/10.1177/1534735410391661>
53. Shafabakhsh R, Asemi Z (2019) Quercetin: A natural compound for ovarian cancer treatment. *J Ovarian Res* 12:1–9. <https://doi.org/10.1186/s13048-019-0530-4>
54. Tang SM, Deng XT, Zhou J, et al (2020) Pharmacological basis and new insights of quercetin action in respect to its anti-cancer effects. *Biomed Pharmacother* 121:109604. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109604>
55. Xu D, Hu MJ, Wang YQ, Cui YL (2019) Antioxidant activities of quercetin and its complexes for medicinal application. *Molecules* 24:. <https://doi.org/10.3390/molecules24061123>
56. Baldissarelli J, Santi A, Schmatz R, et al (2016) Quercetin changes purinergic enzyme activities and oxidative profile in platelets of rats with hypothyroidism. *Biomed Pharmacother* 84:1849–1857. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.10.109>
57. Rockenbach L, Bavaresco L, Fernandes Farias P, et al (2013) Alterations in the extracellular catabolism of nucleotides are involved in the antiproliferative effect of quercetin in human bladder cancer T24 cells. *Urol Oncol Semin Orig Investig*

- 31:1204–1211. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2011.10.009>
58. Lamson D, Brignall M (2000) Antioxidants and Cancer III: Quercetin. *Altern Med Rev* 5:196–208
59. Wang H. (2000) The Therapeutic Potential of Flavonoids. *Expert Opin Investig Drugs* 9:2021–2023. <https://doi.org/https://doi.org/10.1517/13543784.9.9.2103>
60. Bouktaib M, Atmani A, Rolando C (2002) *Tetrahedron Letters*
61. Li M, Han XW, Yu B (2002) *Tetrahedron Letters*
62. Du Y, Wei G, Linhardt RJ (2004) Total Synthesis of Quercetin 3-Sophorotrioside. *J Org Chem* 69:2206–2209. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jo035722y>
63. Needs PW, Kroon PA (2006) Convenient syntheses of metabolically important quercetin glucuronides and sulfates. *Tetrahedron* 62 62:6862–6868. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2006.04.102>
64. Gatto MT, Falcocchio S, Grippa E, et al (2002) Antimicrobial and Anti-Lipase Activity of Quercetin and its. *Bioorg Med Chem* 10:269–272. [https://doi.org/10.1016/s0968-0896\(01\)00275-9](https://doi.org/10.1016/s0968-0896(01)00275-9).
65. Chen Z, Hu Y, Wu H, Jiang H (2004) Synthesis and biological evaluation of flavonoids as vasorelaxant agents. *Bioorg Med Chem* 14:3949–3952. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.05.061>
66. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
67. Endo Y, Sawasaki T (2006) Cell-free expression systems for eukaryotic protein production. *Curr Opin Biotechnol* 17:373–380. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2006.06.009>
68. Taussky HH, Shorr E (1953) A MICROCOLORIMETRIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF INORGANIC PHOSPHORUS. *J Biol Chem* 202:675–685. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
69. Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, et al (2015) The Phyre2 web portal for protein

- modeling , prediction and analysis. *Nat Protoc* 10:845–858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015-053>
70. Krieger E, Joo K, Lee J, et al (2009) No Title. *Proteins Struct Funct Bioinforma* 77:114–122. <https://doi.org/10.1002/prot.22570>
71. Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J App Cryst* 26:283–291. <https://doi.org/10.1107/S0021889892009944>
72. Van der Spoel D, Lindahl E, Hess B, et al (2005) GROMACS: Fast, Flexible, and Free. *J Comput Chem* 26:1701–1718. <https://doi.org/10.1002/jcc.20291>
73. Huang J, Rauscher S, Nawrocki G, et al (2017) CHARMM36m : an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins. *Nat Methods* 14:71–73. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4067>
74. Lee J, Cheng X, Swails JM, et al (2016) CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field. *J Chem Theory Comput* 12:405–413. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00935>
75. Träger S, Tamò G, Aydin D, et al (2021) CLoNe : Automated clustering based on local density neighborhoods for application to biomolecular structural ensembles. *Bioinformatics* 37:921–928. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa742>
76. Hanwell MD, Curtis DE, Lonie DC, et al (2012) Avogadro : an advanced semantic chemical editor , visualization , and analysis platform. *J Cheminform* 4:1–17
77. Pan X, Wang H, Li C, et al (2021) MolGpka: A Web Server for Small Molecule pKa Prediction Using a Graph-Convolutional Neural Network. *J Chem Inf Model* 61:3159–3165. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00075>
78. Halgren TA (1996) Merck Molecular Force Field. I. Basis, Form, Scope, Parameterization, and Performance of MMFF94\*. *J Comput Chem* 17:490–519. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199604\)17:5/6<490::AID-JCC1>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199604)17:5/6<490::AID-JCC1>3.0.CO;2-P)
79. Santos KB, Guedes IA, Karl ALM, Dardenne LE (2020) Highly Flexible Ligand

- Docking: Benchmarking of the DockThor Program on the LEADS-PEP Protein – Peptide Data Set. *J Chem Inf Model* 60:667–683. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00905>
80. Salentin S, Schreiber S, Haupt VJ, et al (2015) PLIP: fully automated protein–ligand interaction profiler. *Nucleic Acids Res* 43:W443–W447. <https://doi.org/doi:10.1093/nar/gkv315>
  81. Lemeiux RU, Lineback DR (1962) CHEMISTRY OF THE CARBOHYDRATES. *Phys Methods* 32:155–184
  82. Kühnau J (1976) The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet* 24:117–91
  83. Slabbert NP (1976) Ionisation of some flavanols and hydroflavonoids. *Tetrahedron* 33:821–824
  84. Picq M, Prigent AF, Chabannes B, et al (1984) O-alkylation de la Quercetine et synthese de la tetra o-ethyl-3,7,3',4' O-ethyl [3H]-5 quercetine. *Tetrahedron Lett* 25:2227–2230. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)80217-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)80217-3)
  85. Rao koppaka V., Owoyale JA (1976) Partial methylation of Quercetin: Direct synthesis of Tamarixetin, Ombuin and Ayanin. *J Heterocycl Chem* 13:1293–1295
  86. Harborne (1998) *The Flavonoids*, First. Chapman and Hall, London
  87. Lee H, Cho J, Moon J, Park K (2011) Isolation and Identification of Antioxidative Phenolic Acids and Flavonoid Glycosides from *Camellia japonica* Flowers. *Hort Environ Biotechnol* 52:270–277. <https://doi.org/10.1007/s13580-011-0157-x>
  88. Sukito A, Tachibana S (2014) Isolation of hyperoside and isoquercitrin from *Camellia sasanqua* as antioxidant agents. *Pakistan J Biol Sci* 17:999–106
  89. Michaelis L, Menten ML (1913) Die Kinetik der Invertinwirkung - The Kinetics of Invertase Action translated by. *Biochem Z* 49:333–369
  90. Calil FA, Lima JM, De Oliveira AHC, et al (2016) Immobilization of NTPDase-1 from *trypanosoma cruzi* and development of an online label-free assay. *J Anal Methods Chem* 2016:. <https://doi.org/10.1155/2016/9846731>

91. Lineweaver H, Burk D (1934) The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J Am Chem Soc* 56:658–666. <https://doi.org/10.1021/ja01318a036>
92. Zebisch M, Krauss M, Schäfer P, Sträter N (2012) Crystallographic Evidence for a Domain Motion in Rat Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase ( NTPDase ) 1. *J Mol Biol* 415:288–306. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.10.050>
93. Zebisch M, Stra N (2008) Structural insight into signal conversion and inactivation by NTPDase2 in purinergic signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:6882–6887
94. Vivian JP, Riedmaier P, Ge H, et al (2010) Crystal Structure of a Legionella pneumophila Ecto -Triphosphate Diphosphohydrolase , A Structural and Functional Homolog of the Eukaryotic NTPDases. *Cell Press* 18:228–238. <https://doi.org/10.1016/j.str.2009.11.014>
95. Gorelik A, Labriola JM, Illes K, Nagar B (2020) Crystal structure of the nucleotide-metabolizing enzyme NTPDase4. *PROTEIN Sci* 29:2054–2061. <https://doi.org/10.1002/pro.3926>
96. Zebisch M, Krauss M, Schäfer P, et al (2013) Crystallographic Snapshots along the Reaction Pathway of Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolases. *Structure* 21:1460–1475. <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.05.016>
97. Kirley TL, Crawford PA, Smith TM (2006) The structure of the nucleoside triphosphate diphosphohydrolases ( NTPDases ) as revealed by mutagenic and computational modeling analyses. *Purinergic Signal* 2:379–389. <https://doi.org/10.1007/s11302-005-5301-6>
98. Pinzi L, Rastelli G (2019) Molecular Docking : Shifting Paradigms in Drug Discovery. *Int J Mol Sci* 20:1–23. <https://doi.org/doi:10.3390/ijms20184331>
99. Aghajani J, Farnia P (2022) Molecular Dynamic Simulations and Molecular Docking as a Potential Way for Designed New Inhibitor Drug without Resistance. *Tanaffos* 21:1–14
100. Ferreira LG, Santos RN, Oliva G, Andricopulo AD (2015) Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. *Molecules* 20:13384–13421. <https://doi.org/10.3390/molecules200713384>

101. Meng X-Y, Zhang H-X, Mezei M, Cui M (2012) Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr Comput Aided Drug Des* 7:146–157
102. Mathai N, Chen Y, Kirchmair J (2020) Validation strategies for target prediction methods. *Brief Bioinform* 21:791–802. <https://doi.org/10.1093/bib/bbz026>
103. Fukunishi Y, Higo J, Kasahara K (2022) Computer simulation of molecular recognition in biomolecular system: from in silico screening to generalized ensembles. *Biophys Rev* 14:1423–1447. <https://doi.org/10.1007/s12551-022-01015-8>

## 11. ONLINE RESOURCE

1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl-L-glycopyranose (7) - Rf 0.74 (hexane/EtOAc 6:4). mp: 94.6-95.1 oC. IR (neat)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  2925, 1738, 1648, 1592, 1218, 1034, 1020.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) d ( $\alpha,\beta$ -anomers) 6.33 (1H, d, J 6.9 Hz, H-1) 5.69 (1H, d, J 15.7 Hz, H-1), 5.48 (1H, dd, J 19.6, 19.6 Hz, H-3), 5.31-5.06 (4H, m, H-4/H-2), 4.32-4.24 (2H, m, Ha-6), 4.13-4.09 (2H, m, Hb-6), 3.88-3.83 (1H, m, H-5), 2.18-2.02 (s, 6xCH<sub>3</sub>).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) d ( $\alpha,\beta$ -anomers) 170.5-168.7 (C=O), 91.8 (CH), 89.1 (CH), 72.9 (CH), 72.8 (CH), 70.4 (CH), 69.9 (CH) 69.3 (CH), 68.1 (CH), 67.9 (CH), 61.6 (CH), 20.8-20.4 (C(O)CH<sub>3</sub>). HRMS (ESI+) calcd. for C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>O<sub>9</sub> (M-OAc)<sup>+</sup> 331.1029, found 331.1033.

2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- $\alpha$ -L-glucopyranosyl bromide (5) - Rf 0.62 (hexane/EtOAc 6:4). mp: 86.6-87.3 oC. [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> -96.6o (c 10.2x10<sup>-3</sup>, CH<sub>3</sub>OH). IR (neat)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  2964, 1738, 1362, 1241, 1204, 1037, 668.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) d 6.61 (1H, d, J 3.5 Hz, H-1), 5.56 (1H, dd, J 9.7, 9.7 Hz, H-3) 5.16 (1H, dd, J 9.6, 9.6 Hz, H-4), 4.84 (1H, dd, J 10.0, 3.7 Hz, H-2), 4.33 (1H, d, J 11.6 Hz, H-6), 4.29 (1H, ls, H-5), 4.13 (1H, d, J 11.6 Hz, H-6), 2.10 (6H, ls, CH<sub>3</sub>), 2.06 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 2.04 (3H, s, CH<sub>3</sub>).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) d 170.6 (C=O), 169.8 (C=O), 169.8 (C=O), 169.4 (C=O), 86.6 (C-1), 72.2 (C-3), 70.6 (C-2), 70.2 (C-5), 67.2 (C-4), 61.0 (C-6), 20.6 (CH<sub>3</sub>), 20.6 (CH<sub>3</sub>), 20.6 (CH<sub>3</sub>), 20.5 (CH<sub>3</sub>). HRMS (ESI+) calcd. for C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>O<sub>9</sub> (M-Br)<sup>+</sup> 331.1029, found 331.1030.

7-(Benzyloxy)-2-(3,4-bis(benzyloxy)phenyl)-3,5-dihydroxy-4H-chromen-4-one (9) - Rf 0.85 (hexane/EtOAc 6:4). mp: 191.8-194.0 oC. IR (neat)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  3288, 3064, 3029, 2928, 2871, 1650, 1615, 1592, 1504, 1323, 1165, 1119, 747, 693.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) d 12.44 (1H, s, OH), 9.69 (1H, s, OH), 7.91 (1H, d, J 1.7 Hz, H-Ar), 7.86 (1H, dd, J 8.8, 1.6 Hz, H-Ar), 7.53-7.25 (15H, m, H-Ar), 7.26 (1H, d, J 8.8 Hz, H-Ar), 6.84 (1H, d, J 1.8 Hz, H-

Ar), 6.45 (1H, d, J 1.9 Hz, H-Ar), 5.25 (2H, s, CH<sub>2</sub>Ph), 5.24 (2H, s, CH<sub>2</sub>Ph), 5.22 (2H, s, CH<sub>2</sub>Ph). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 176.5 (C=O), 164.5 (Co), 160.9 (Co), 156.5 (Co), 150.5 (Co), 148.3 (Co), 146.8 (Co), 137.5 (Co), 137.3 (Co), 137.1 (Co), 136.6 (Co), 129.0 (CH), 128.9 (CH), 128.6 (CH), 128.4 (CH), 128.3 (CH), 128.3 (CH), 128.1 (CH), 124.1 (Co), 122.5 (CH), 114.2 (CH), 104.7 (Co), 98.4 (CH), 93.5 (CH), 71.0 (CH<sub>2</sub>), 70.5 (CH<sub>2</sub>), 70.4 (CH<sub>2</sub>). HRMS (ESI+) calcd. for C<sub>36</sub>H<sub>29</sub>O<sub>7</sub> (M+H)<sup>+</sup> 573.1913, found 573.1901.

7-(Benzyloxy)-2-(4-benzyloxy-3-hydroxy-phenyl)-3,5-dihydroxy-4H-chromen-4-one (10). R<sub>f</sub> 0.80 (hexane/EtOAc 6:4). mp: 190.1-191.9 oC. IR (neat) ν<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup> 3287, 3029, 2871, 1650, 1614, 1592, 1504, 1322, 1165, 1119, 993, 747, 692. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 12.45 (1H, s, OH), 9.58 (1H, s, OH), 9.42 (1H, s, OH), 7.76 (1H, d, J 1.6 Hz, H-Ar), 7.63 (1H, dd, J 8.8, 1.6 Hz, H-Ar), 7.52-7.31 (10H, m, H-Ar), 7.16 (1H, d, J 8.7 Hz, H-Ar), 6.78 (1H, d, J 1.5 Hz, H-Ar), 6.42 (1H, d, J 1.5 Hz, H-Ar), 5.22 (2H, s, CH<sub>2</sub>Ph), 5.21 (2H, s, CH<sub>2</sub>Ph). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 176.5 (C=O), 164.4 (Co), 160.9 (Co), 156.5 (Co), 148.8 (Co), 147.2 (Co), 147.1 (Co), 137.4 (Co), 137.0 (Co), 136.6 (Co), 129.0 (CH), 128.8 (CH), 128.6 (CH), 128.3 (CH), 128.2 (CH), 124.1 (Co), 120.1 (CH), 115.6 (CH), 114.1 (CH), 104.7 (Co), 98.5 (CH), 93.3 (CH), 70.4 (CH<sub>2</sub>), 70.2 (CH<sub>2</sub>). HRMS (ESI+) calcd. for C<sub>29</sub>H<sub>22</sub>O<sub>7</sub> (M+H)<sup>+</sup> 483.1444, found 483.1439.

2-(3,4-Dimethoxy-phenyl)-3,5-dihydroxy-7-methoxy-chromen-4-one (11) - R<sub>f</sub> 0.70 (hexane/EtOAc 6:4). mp: 184.2-185.6 oC. IR (neat) ν<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup> 3363, 3087, 3004, 2974, 2937, 2841, 1646, 1622, 1591, 1499, 1205, 1174, 1140, 815, 707. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 11.67 (1H, s, OH), 7.77 (1H, d, J 8.3 Hz, H-Ar), 7.73 (1H, s, OH), 6.95 (1H, d, J 8.4 Hz, H-Ar), 6.65 (1H, s, H-Ar), 6.43 (1H, s, H-Ar), 6.33 (1H, s, H-Ar), 3.95 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.93 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.85 (3H, s, OCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 175.1 (C=O), 165.8 (Co), 160.8 (Co), 156.8 (Co), 150.9 (Co), 148.9 (Co), 145.5 (Co), 135.8 (Co), 123.4 (Co), 121.4 (CH), 110.9 (CH), 110.6 (CH), 103.9 (Co), 97.9 (CH), 92.2 (CH), 56.0 (OCH<sub>3</sub>), 56.0 (OCH<sub>3</sub>), 55.9 (OCH<sub>3</sub>). HRMS (ESI+) calcd. for C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>O<sub>7</sub> (M+H)<sup>+</sup> 345.0974, found 345.0974.

Acetic acid 3,5-diacetoxy-2-acetoxymethyl-6-[7-benzyloxy-2-(3,4-bis-benzyloxy-phenyl)-5-hydroxy-4-oxo-4H-chromen-3-yloxy]-tetrahydro-pyran-4-yl ester (12) - R<sub>f</sub> 0.80 (hexane/EtOAc 1:1). [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> -12.50 (c 8x10<sup>-4</sup>, MeOH). IR (neat) ν<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup> 3461, 3032, 2922, 2853, 1742, 1656, 1598, 1367, 1205, 1165, 1031, 909, 807, 737, 696. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 12.40 (1H, s, OH), 7.75 (1H, d, J 2.0 Hz, H-Ar), 7.63 (1H, dd, J 8.4, 2.0 Hz,

H-Ar), 7.54 (2H, d, J 7.2 Hz, H-Ar), 7.46 (2H, d, J 7.2 Hz, H-Ar), 7.40-7.29 (11H, m, H-Ar), 6.98 (1H, d, J 8.7 Hz, H-Ar), 6.40 (1H, d, J 2.1 Hz, H-Ar), 6.34 (1H, d, J 2.0 Hz, H-Ar), 5.64 (1H, d, J 8.0 Hz, CH), 5.33-5.05 (9H, m, 3xCH<sub>2</sub>Ph and 3xCH), 4.03-3.94 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 3.69 (1H, td, J 10.0, 3.0 Hz, CH), 2.12 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 2.02 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.99 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.81 (3H, s, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 177.3 (C=O), 170.2 (C=O), 169.8 (C=O), 169.7 (C=O), 169.3 (C=O), 164.4 (Co), 161.7 (Co), 157.2 (Co), 156.4 (Co), 151.3 (Co), 148.0 (Co), 137.0 (Co), 136.6 (Co), 135.6 (Co), 133.7 (Co), 128.6 (CH), 128.5 (CH), 128.4 (CH), 128.2 (CH), 127.8 (CH), 127.7 (CH), 127.3 (CH), 127.2 (CH), 127.0 (CH), 123.1 (CH), 123.0 (Co), 115.7 (CH), 113.3 (CH), 105.7 (Co), 99.1 (CH), 98.5 (CH), 93.0 (CH), 72.6 (CH), 71.6 (CH), 71.4 (CH), 71.2 (CH<sub>2</sub>), 70.7 (CH<sub>2</sub>), 70.3 (CH<sub>2</sub>), 68.3 (CH), 61.3 (CH<sub>2</sub>), 20.7 (CH<sub>3</sub>), 20.4 (CH<sub>3</sub>), 20.4 (CH<sub>3</sub>), 20.2 (CH<sub>3</sub>). HRMS (ESI<sup>+</sup>) calcd. for [M+H-Ac-glucose]<sup>+</sup>+ C<sub>36</sub>H<sub>29</sub>O<sub>7</sub> 573.1913, found 573.1907.

Acetic acid 4,5-diacetoxy-6-acetoxymethyl-2-[2-(3,4-dimethoxy-phenyl)-5-hydroxy-7-methoxy-4-oxo-4H-chromen-3-yloxy]-tetrahydro-pyran-4-yl ester (13) - R<sub>f</sub> 0.30 (hexane/EtOAc 1:1). mp: 86.4-87.1 °C. [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> +26.0 (c 1.0, CHCl<sub>3</sub>). IR (neat) ν<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup> 3288, 2930, 1748, 1650, 1591, 1497, 1210, 1164, 1021, 804. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 12.44 (1H, s, OH), 7.70 (1H, s, H-Ar), 7.66 (1H, d, J 8.6 Hz, H-Ar), 6.96 (1H, d, J 8.6 Hz, H-Ar), 6.43 (1H, d, J 1.3 Hz, H-Ar), 6.32 (1H, d, J 1.4 Hz, H-Ar), 5.64 (1H, d, J 7.9 Hz, CH), 5.32 (1H, t, J 9.5 Hz, CH), 5.21 (1H, t, J 8.8 Hz, CH), 5.07 (1H, t, J 9.6 Hz, CH), 4.07-3.93 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 4.02 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.97 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.87 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.70-3.68 (1H, m, CH), 2.13 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 2.02 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 2.00 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.90 (3H, s, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 177.7 (C=O), 170.5 (C=O), 170.2 (C=O), 170.1 (C=O), 169.6 (C=O), 165.7 (Co), 162.1 (Co), 157.7 (Co), 156.9 (Co), 151.7 (Co), 148.6 (Co), 133.9 (Co), 122.9 (Co), 122.8 (CH), 112.6 (CH), 110.7 (CH), (CH), 105.9 (Co), 99.5 (CH), 98.2 (CH), 72.9 (CH), 72.0 (CH), 71.7 (CH), 68.5 (CH), 61.5 (CH<sub>2</sub>), 56.4 (OCH<sub>3</sub>), 56.1 (OCH<sub>3</sub>), 56.0 (OCH<sub>3</sub>), 21.0 (CH<sub>3</sub>), 20.7 (CH<sub>3</sub>), 20.7 (CH<sub>3</sub>), 20.5 (CH<sub>3</sub>). HRMS (ESI<sup>+</sup>) calcd. for [M+H]<sup>+</sup>+ C<sub>32</sub>H<sub>35</sub>O<sub>16</sub> 675.1925, found 675.1917.

Acetic acid 4,5-diacetoxy-2-acetoxymethyl-6-[5,7-bis-benzyloxy-2-(3,4-bis-benzyloxy-phenyl)-4-oxo-4H-chromen-3-yloxy]-tetrahydro-pyran-3-ylmethyl ester (14) - R<sub>f</sub> 0.60 (hexane/EtOAc 1:1). mp: 75.5-76.6 °C. [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> +25.0 (c 1.1, CHCl<sub>3</sub>). IR (neat) ν<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup> 3030, 1749, 1629, 1602, 1208, 1030, 737, 695. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.77 (1H, d, J 2.0 Hz, H-Ar), 7.61 (1H, dd, J 8.8, 2.0 Hz, H-Ar), 7.57 (2H, d, J 7.6 Hz, H-Ar), 7.55 (2H, d, J

7.6 Hz, H-Ar), 7.46 (2H, d, J 7.2 Hz, H-Ar), 7.40-7.28 (14H, m, H-Ar), 6.97 (1H, d, J 8.7 Hz, H-Ar), 6.48 (1H, d, J 2.2 Hz, H-Ar), 6.42 (1H, d, J 2.2 Hz, H-Ar), 5.77 (1H, d, J 7.8 Hz, CH), 5.32-5.01 (11H, m, 4xCH<sub>2</sub>Ph and 3xCH), 4.00 (1H, dd, J 12.2, 3.8 Hz, CH<sub>2</sub>), 3.93 (1H, dd, J 12.3, 2.4 Hz, CH<sub>2</sub>), 3.59 (1H, td, J 10.0, 3.0 Hz, CH), 2.11 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 2.01 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.98 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.79 (3H, s, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 172.4 (C=O), 170.2 (C=O), 169.8 (C=O), 169.8 (C=O), 169.3 (C=O), 162.7 (Co), 159.5 (Co), 158.4 (Co), 154.1 (Co), 150.7 (Co), 148.0 (Co), 137.1 (Co), 136.7 (Co), 136.2 (Co), 135.7 (Co), 135.5 (Co), 128.6-126.5 (12CH), 123.4 (Co), 122.6 (CH), 115.6 (CH), 113.3 (CH), 109.6 (Co), 98.7 (CH), 97.9 (CH), 93.6 (CH), 72.7 (CH), 71.6 (CH), 71.4 (CH), 71.2 (CH<sub>2</sub>), 70.6 (CH<sub>2</sub>), 70.6 (CH<sub>2</sub>), 70.3 (CH<sub>2</sub>), 68.3 (CH), 61.2 (CH<sub>2</sub>), 20.7 (CH<sub>3</sub>), 20.4 (CH<sub>3</sub>), 20.4 (CH<sub>3</sub>), 20.2 (CH<sub>3</sub>). HRMS (ESI<sup>+</sup>) calcd. for [M+H-Ac-glucose]<sup>+</sup> C<sub>43</sub>H<sub>35</sub>O<sub>7</sub> 663.2383, found 663.2380.

Acetic acid 4,5-diacetoxy-6-acetoxymethyl-2-[2-(3,4-dimethoxy-phenyl)-5,7-dimethoxy-4-oxo-4H-chromen-3-yloxy]-tetrahydro-pyran-3-yl ester (15) - R<sub>f</sub> 0.3 (hexane/EtOAc 3:7). mp: 185.4-186.3 °C. IR (neat) ν<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup> 3102, 2959, 2842, 1747, 1626, 1605, 1423, 1208, 1066, 1034, 827. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.75 (1H, d, J 1.5 Hz, H-Ar), 7.64 (1H, dd, J 8.5, 1.6 Hz, H-Ar), 6.95 (1H, d, J 8.6 Hz, H-Ar), 6.51 (1H, d, J 1.8 Hz, H-Ar), 6.35 (1H, d, J 1.8 Hz, H-Ar), 5.80 (1H, d, J 7.7 Hz, CH), 5.30-5.17 (2H, m, CH), 5.07 (1H, t, J 9.5 Hz, CH), 4.06-3.85 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 4.03 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.96 (6H, s, 2xOCH<sub>3</sub>), 3.90 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.66-3.64 (1H, m, CH), 2.11 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 2.01 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 2.00 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.88 (3H, s, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 173.2 (C=O), 170.5 (C=O), 170.2 (C=O), 170.1 (C=O), 169.7 (C=O), 164.3 (Co), 161.2 (Co), 159.0 (Co), 154.8 (Co), 151.2 (Co), 148.6 (Co), 135.8 (Co), 123.3 (Co), 122.2 (CH), 112.6 (CH), 110.7 (CH), 109.4 (Co), 98.8 (CH), 96.2 (CH), 92.7 (CH), 73.0 (CH), 71.8 (CH), 71.8 (CH), 68.6 (CH), 61.5 (CH<sub>2</sub>), 56.6 (OCH<sub>3</sub>), 56.4 (OCH<sub>3</sub>), 56.1 (OCH<sub>3</sub>), 56.0 (OCH<sub>3</sub>), 21.1 (CH<sub>3</sub>), 20.8 (2xCH<sub>3</sub>), 20.6 (CH<sub>3</sub>). HRMS (ESI<sup>+</sup>) calcd. for [M+H]<sup>+</sup> C<sub>33</sub>H<sub>37</sub>O<sub>16</sub> 689.2082, found 689.2066.

5,7-Bis-benzyloxy-2-(3,4-bis-benzyloxy-phenyl)-3-(3,4,5-trihydroxy-6-hydroxymethyl-tetrahydro-pyran-2-yloxy)-chromen-4-one (16) - R<sub>f</sub> 0.4 (EtOAc 100%). mp: 174.1-174.8 °C. [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> +120° (c 5x10<sup>-3</sup>, MeOH). IR (neat) ν<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup> 3404, 3244, 2919, 1628, 1599, 1272, 1195, 1059, 1008, 730, 693. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.18 (1H, d, J 1.5 Hz, H-Ar), 7.67 (1H, dd, J 8.6, 1.6 Hz, H-Ar), 7.62-7.31 (20H, m, H-Ar), 7.21 (1H, d, J 8.7 Hz, H-Ar), 6.90 (1H, d, J 1.6 Hz, H-Ar), 6.71 (1H, d, J 1.6 Hz, H-Ar), 5.53 (1H, d, J 7.0 Hz, CH), 5.33-5.12 (2H, m, CH), 5.24 (8H, ls, 4xCH<sub>2</sub>Ph), 4.45 (1H, br, OH), 3.62-3.16 (4H, m, CH), 1.22

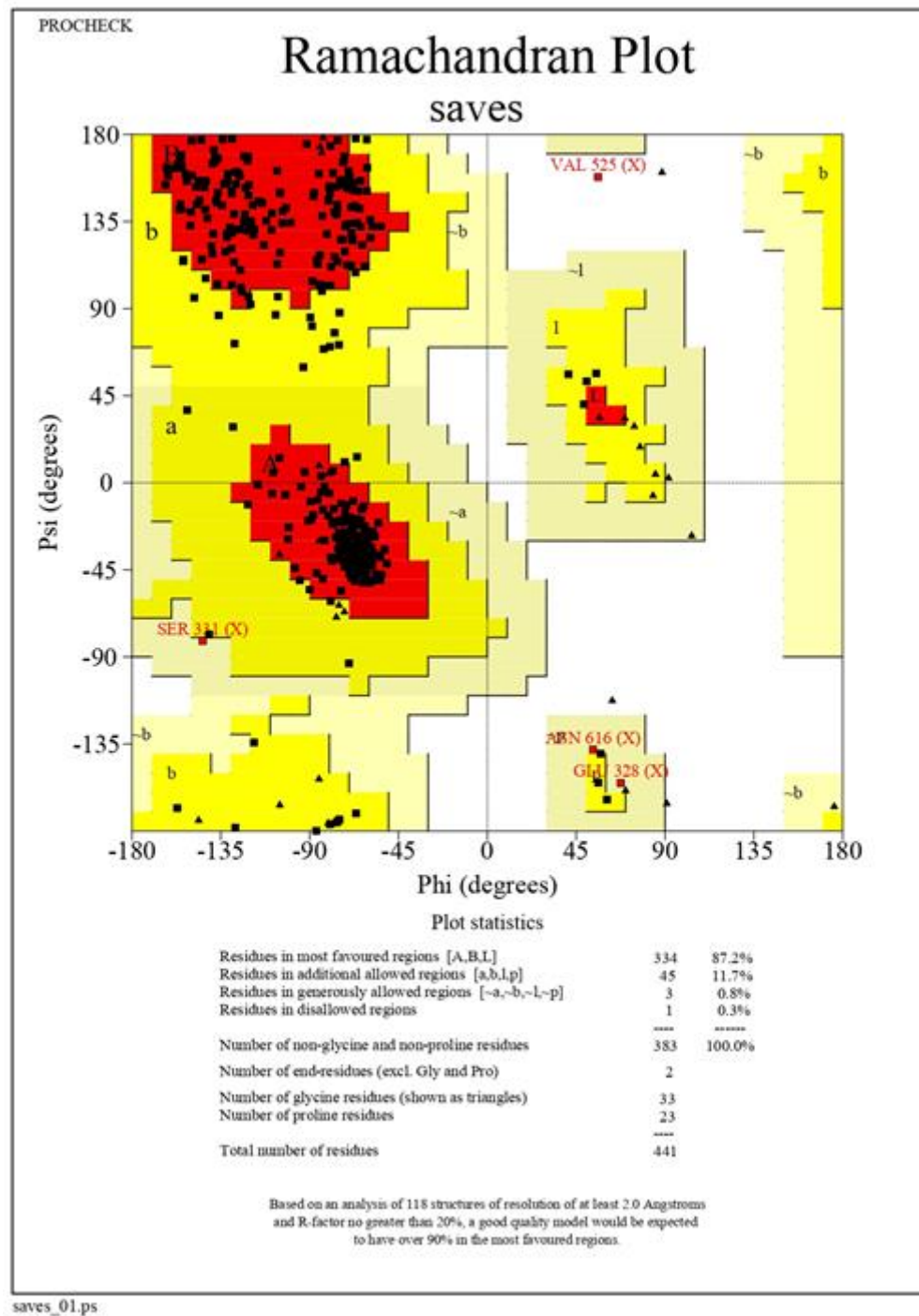
(3H, ls, 3xOH). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 172.3 (C=O), 137.1 (Co), 137.0 (Co), 136.7 (Co), 136.1 (Co), 136.0 (Co), 128.6-127.0 (12xCH), 123.2 (Co), 121.9 (CH), 115.1 (CH), 113.6 (CH), 108.8 (Co), 101.2 (CH), 98.1 (CH), 94.2 (CH), 77.4 (CH), 76.6 (CH), 74.5 (CH), 70.5 (CH<sub>2</sub>), 70.1 (2xCH<sub>2</sub>), 70.0 (CH<sub>2</sub>), 69.9 (CH), 60.6 (CH<sub>2</sub>). HRMS (ESI<sup>+</sup>) calcd. for [M+H]<sup>+</sup> C<sub>49</sub>H<sub>45</sub>O<sub>12</sub> 825.2911, found 825.2865.

2-(3,4-Dimethoxy-phenyl)-5,7-dimethoxy-3-(3,4,5-trihydroxy-6-hydroxymethyl-tetrahydropyran-2-yloxy)-chromen-4-one (4) - R<sub>f</sub> 0.4 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 8:2). mp: 176.2-177.5 °C. IR (neat) ν<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup> 3242, 2919, 2850, 1731, 1600, 1459, 1253, 1210, 1148, 1007, 810, 768. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.96 (1H, s, H-Ar), 7.65 (1H, d, J 8.4 Hz, H-Ar), 7.08 (1H, d, J 8.3 Hz, H-Ar), 6.76 (1H, s, H-Ar), 6.47 (1H, s, H-Ar), 5.43 (1H, d, J 6.6 Hz, CH), 3.88 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.84 (9H, s, 3xOCH<sub>3</sub>), 3.59 (1H, ld, J 11.6 Hz, CH), 3.42-3.29 (1H m, CH), 3.28-3.22 (1H m, CH), 3.13 (2H, br, CH). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 172.3 (C=O), 163.9 (Co), 160.4 (Co), 158.2 (Co), 152.9 (Co), 150.7 (Co), 148.0 (Co), 136.0 (Co), 122.7 (Co), 121.4 (CH), 112.8 (CH), 111.2 (CH), 108.3 (Co), 101.4 (CH), 96.1 (CH), 93.0 (CH), 77.4 (CH), 76.7 (CH), 74.5 (CH), 69.9 (CH), 60.8 (CH<sub>2</sub>), 56.2 (OCH<sub>3</sub>), 56.1 (OCH<sub>3</sub>), 55.7 (OCH<sub>3</sub>), 55.6 (OCH<sub>3</sub>). HRMS (ESI<sup>+</sup>) calcd. for C<sub>25</sub>H<sub>28</sub>O<sub>12</sub> (M+H)<sup>+</sup> 521.1659, found 521.1657.

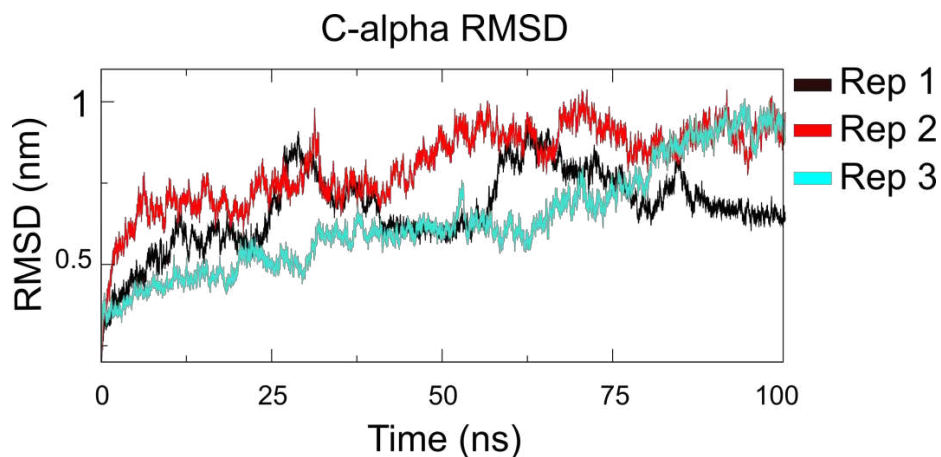
2-(3,4-Dihydroxy-phenyl)-5,7-dihydroxy-3-(3,4,5-trihydroxy-6-hydroxymethyl-tetrahydropyran-2-yloxy)-chromen-4-one (2) - R<sub>f</sub> 0.3 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 8:2). mp: 168.0-168.5 °C. [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> +2.0° (c 0.01, MeOH). IR (neat) ν<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup> 3336, 3134, 2918, 2851, 1661, 1604, 1358, 1300, 1195, 1058, 1010, 798. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.71 (1H, d, J 1.8 Hz, H-Ar), 7.57 (1H, dd, J 8.5, 1.9 Hz, H-Ar), 6.86 (1H, d, J 8.5 Hz, H-Ar), 6.36 (1H, s, H-Ar), 6.18 (1H, d, J 1.5 Hz, H-Ar), 5.23 (1H, d, J 7.4 Hz, CH), 3.72 (1H, dd, J 11.8, 2.0 Hz, CH<sub>a</sub>), 3.58 (1H, dd, J 11.9, 5.2 Hz, CH<sub>b</sub>), 3.49 (1H, t, J 8.3 Hz, CH), 3.44 (1H, t, J 8.7 Hz, CH), 3.36 (1H, t, J 9.0 Hz, CH), 3.26 (1H, m, CH). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 179.6 (C=O), 166.2 (Co), 163.1 (Co), 159.1 (Co), 158.6 (Co), 150.0 (Co), 146.0 (Co), 135.8 (Co), 123.3 (CH), 123.2 (Co), 117.7 (CH), 116.1 (CH), 105.8 (Co), 104.6 (CH), 100.1 (CH), 94.9 (CH), 78.5 (CH), 78.2 (CH), 75.9 (CH), 71.3 (CH), 62.7 (CH<sub>2</sub>). HRMS (ESI<sup>+</sup>) calcd. for C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub> (M+H)<sup>+</sup> 465.1033, found 465.1040.

**Online Resource 1** – <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data of compounds obtained from the *ent*-isoquercetin synthesis pathway.

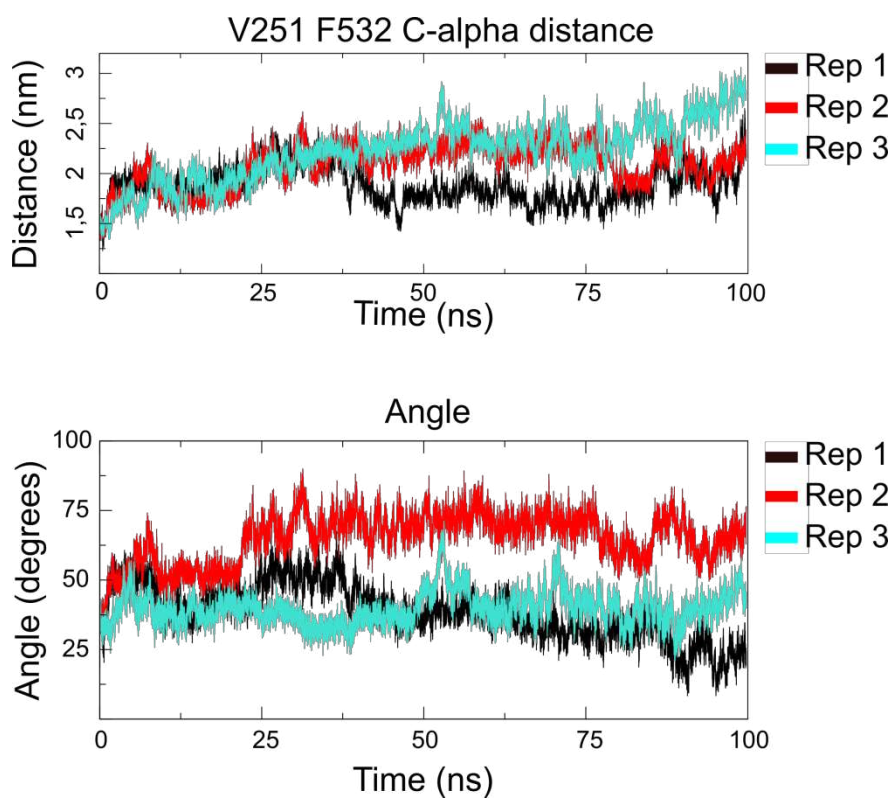




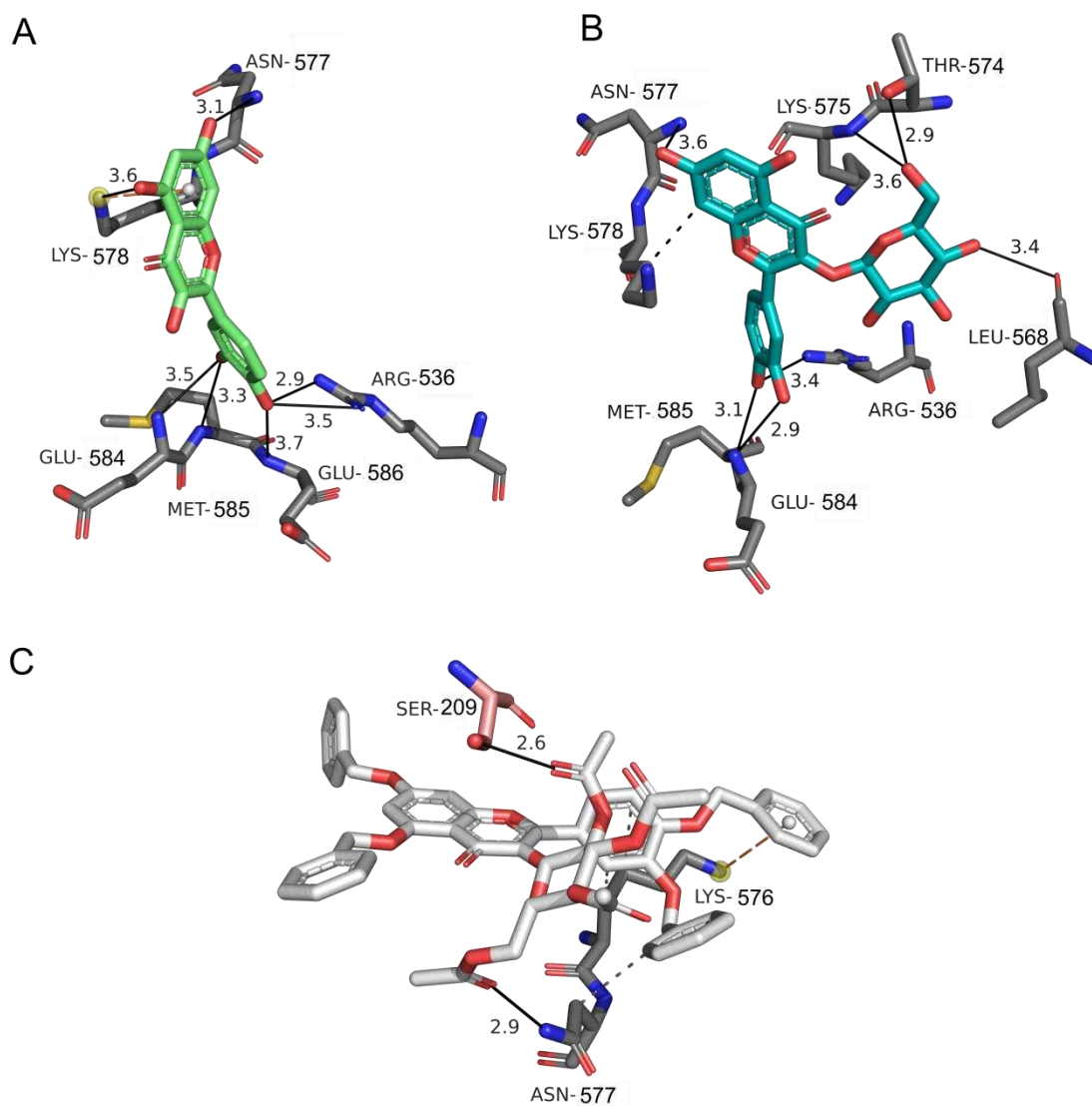
**Online resource 3** - Ramachandran plot. In the model obtained for TcNTPDase1, most of the residuals are in the favorable region of the plot, only one residual is in the disallowed region, resulting in 99.7% reliability of the model.



**Online resource 4** - Root Mean Square Deviation, 100 ns simulation trajectory. Each curve represents a simulation replicate



**Online resource 5** – MD simulation of TcNTPDase1. Variation of distance measurements between the  $\alpha$ C of residues VAL 251 and PHE 532 and their angles with the OE1 atom of residue GLN 373. Each curve represents a replicate of the simulation



**Online resource 6** - Interaction of TcNTPDase1 with quercetin (A), compound 2 (B) and 14 (C). In dark gray, the protein chain and in light red ACR's regions.

## **CAPITULO II**

**PATENTE – COMPOSTOS DERIVADOS DA ENT-ISOQUERCETINA, PROCESSOS DE PRODUÇÃO E USO COMO INIBIDOR DE NTPDases E EM MEDICAMENTOS PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS E LEISHMANIOSES**

11/05/2022 870220040672  
09:11

29409161946878579

## Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2022 009102 1

### Dados do Depositante (71)

---

Depositante 1 de 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 25944455000196

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Campus UFV, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação, sala 04.

Cidade: Vicosá

Estado: MG

CEP: 36570-900

País: Brasil

Telefone: (31) 3612 2334

Fax:

Email: [propriedadeintelectual@ufv.br](mailto:propriedadeintelectual@ufv.br)

Depositante 2 de 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 17217985000104

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha

Cidade: Belo Horizonte

Estado: MG

CEP: 31270-901

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: patentes@ctit.ufmg.br

#### Dados do Pedido

---

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Compostos derivados da ent-isoquercetina, processos de produção e uso como inibidor de NTPDases e em medicamentos para o tratamento da doença de Chagas e Leishmanioses

Resumo: A presente invenção refere-se aos compostos 2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-3-(((2R,3S,4R,5R,6S)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahydro-2H-pirano-2-il)oxi)-4H-cromen-4-ona (2), 2-(3,4-dimetoxifenil)-5,7-dimetoxi-3-(((2R,3S,4R,5R,6S)-3,4,5-triidroxi-6-(hidroximetil)tetrahydro-2H-piran-2-il)oxi)-4H-cromen-4-ona (4), (2S,3S,4R,5S,6R)-2-(acetoximetil)-6-((5,7-bis(benziloxi)-2-(3,4-bis(benziloxi)fenil)-4-oxo-4H-cromen-3-il)oxi)tetrahydro-2H-piran-3,4,5-triiltriacetato (14), (2S,3S,4R,5S,6R)-2-(acetoximetil)-6-((2-(3,4-dimetoxifenil)-5,7-dimetoxi-4-oxo-4H-cromen-3-il)oxi)tetrahydro-2H-piran-3,4,5-triil triacetato (15), 5,7-bis(Benziloxi)-2-(3,4-bis(benziloxi)fenil)-3-(((2R,3S,4R,5R,6S)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahydro-2H-piran-2-il)oxi)-4H-cromen-4-ona (16) e (2S,3S,4R,5S,6R)-2-(acetoximetil)-6-((2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-4-oxo-4H-cromen-3-il)oxi)tetrahydro-2H-piran-3,4,5-triiltriacetato (17), ao seu processo de produção e ao seu uso como agentes inibidores de NTPDases e para preparar um medicamento para a doença de Chagas e Leishmanioses. Todos os compostos foram obtidos durante a síntese da ent-isoquercetina (2), que geraram glicosídeos não naturais da quercetina. O ramo técnico da invenção se enquadra em indústrias do setor farmacêutico e

Figura a publicar: 3

**Dados do Inventor (72)**

---

Inventor 1 de 15

Nome: JULIANA LOPES RANGEL FIETTO

CPF: 88979881649

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua João Lopes Rosado, 176, Bairro Quintas dos Guimarães

Cidade: Viçosa.

Estado: MG

CEP: 36570-000

País: BRASIL

Telefone: (31) 987 442347

Fax:

Email: jufietto@ufv.br

Inventor 2 de 15

Nome: ISADORA CUNHA RIBEIRO

CPF: 10060291680

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua Gomes Barbosa, 119/201.

Cidade: Viçosa

Estado: MG

CEP: 36570-101

País: BRASIL

Telefone: (31) 999 467473

Fax:

Email: isadora.cunha@ufv.br

Inventor 3 de 15

Nome: CHRISTIANE MARIOTINI MOURA

CPF: 05233285673

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Graduação

Endereço: Rua Porto Firme, 13 102 João Braz

Cidade: Viçosa

Estado: MG  
CEP:  
País: BRASIL  
Telefone: (31) 999 424843  
Fax:  
Email: chrisbiomed@gmail.com

Inventor 4 de 15

Nome: LUCIANA ÂNGELO DE SOUZA  
CPF: 08645420627  
Nacionalidade: Brasileira  
Qualificação Física: Doutorando  
Endereço: Rua dos Estudantes, número 270, apto 401, Centro  
Cidade: Viçosa  
Estado: MG  
CEP: 36570-081  
País: BRASIL  
Telefone: (31) 993699115  
Fax:  
Email: luciana.angelosz@gmail.com

Inventor 5 de 15

Nome: NANCY DA ROCHA TORRES PAVIONE  
CPF: 09470217608  
Nacionalidade: Brasileira  
Qualificação Física: Doutorando  
Endereço: Rua Augusta Siqueira 175, apartamento 401. Centro  
Cidade: Viçosa  
Estado: MG  
CEP:  
País: BRASIL  
Telefone:  
Fax:  
Email: nancy.torres@ufv.br

Inventor 6 de 15

Nome: JOÃO VICTOR BADARÓ DE MORAES

CPF: 15599935701

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Mestrando

Endereço: Rua Nasser Simão Muanis 411/201, Santo Antônio

Cidade: Viçosa.

Estado: MG

CEP:

País: BRASIL

Telefone: (31) 971 551822

Fax:

Email:

Inventor 7 de 15

Nome: VICTOR HUGO FERRAZ DA SILVA

CPF: 09629054612

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Doutorando

Endereço: Rua Nasser Simão Muanis, 411 apto 201

Cidade: Viçosa

Estado: MG

CEP: 36576-026

País: BRASIL

Telefone: (31) 99956847

Fax:

Email: vhferraz@gmail.com

Inventor 8 de 15

Nome: RAISSA BARBOSA DE CASTRO

CPF: 11356692605

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Doutorando

Endereço: Rua dos Estudantes 240/701, centro

Cidade: Viçosa.

Estado: MG

CEP: 36570-081

País: BRASIL

Telefone: (32) 988581391

Fax:

Email:

Inventor 9 de 15

Nome: ANNA CLÁUDIA ALVES DE SOUZA

CPF: 09913918618

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua dos estudantes 200/303, centro.

Cidade: Viçosa.

Estado: MG

CEP: 36570-081

País: BRASIL

Telefone: (32) 998424741

Fax:

Email:

Inventor 10 de 15

Nome: GUSTAVO COSTA BRESSAN

CPF: 05653437697

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Olinda Martins D'Antonino, 324, apto 302, Bairro Liberdade

Cidade: Viçosa

Estado: MG

CEP: 36576-264

País: BRASIL

Telefone: (31) 991817517

Fax:

Email: gustavo.bressan@ufv.br

Inventor 11 de 15

Nome: RAPHAEL DE SOUZA

VASCONCELLOSCPF: 05983387642

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Porto Firme, 13/102. João Brás

Cidade: Viçosa

Estado: MG

CEP: 36576-160

País: BRASIL

Telefone: (31) 997

173629Fax:

Email: raphael.vasconcellos@ufv.br

Inventor 12 de 15

Nome: GASPAR DIAZ MUÑOZ

CPF: 50819690287

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Beira Alta, 123 apto 701 bl.1, São Francisco

Cidade: Belo Horizonte

Estado: MG

CEP: 31255-240

País: BRASIL

Telefone: (31) 986970789

Fax:

Email: gaspardm@qui.ufmg.br

Inventor 13 de 15

Nome: IZABEL LUZIA MIRANDA

CPF: 10312786646

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Doutorando

Endereço: Rua Conceição do Mato Dentro, 297, apto 02, bairro Ouro Preto

Cidade: Belo Horizonte

Estado: MG

CEP: 31310-240

País: BRASIL

Telefone: (31) 992662217

Fax:

Email: izabelmirandaqui@gmail.com

Inventor 14 de 15

Nome: SUÉLEN KARINE SARTORI

CPF: 09888270699

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Doutorando

Endereço: Rua Flor de Índio, 100, apto 201M, bairro Liberdade

Cidade: Belo Horizonte.

Estado: MG

CEP: 31270-215

País: BRASIL

Telefone: (31) 992103384

Fax:

Email: suelen.sartori@hotmail.com

Inventor 15 de 15

Nome: KRYSSIA LOHAYNE SANTOS ALVES

CPF: 09304044677

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Doutorando

Endereço: Rua Otacílio Negrão de Lima 15, apto 202, Bairro Centro

Cidade: Paraopeba

Estado: MG

CEP: 35774-000

País: BRASIL

Telefone: (31) 971655281

Fax:

Email: kryssia.alves@ecolab.com

Documentos anexados

---

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	comprovante de
pagamento.pdf	Procuração Profa.
Andrea.pdf	
Relatório Descritivo	RELATORIO

---

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 11/05/2022 às 09:11, Petição 870220040672

DESCRITIVO.pdfReivindicação

Reivindicações.pdf

Desenho

FIGURAS.pdf

Resumo

RESUMO.pdf

#### Acesso ao Patrimônio Genético

---

- Declaração Positiva de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, realizado a partir de 30 de junho de 2000, e que foram cumpridas as determinações da Lei 13.123 de 20 de maio de 2015, informando ainda:

Número da Autorização de Acesso: A36EAF0

Acesso:

Data da Autorização de Acesso: 11/03/2022

#### Declaração de veracidade

---

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

[bb.com.br] - Boleto gerado pelo sistema MPAG. 23/02/2022 09:34:03

**INSTRUÇÕES:**

A data de vencimento não prevalece sobre o prazo legal. O pagamento deve ser efetuado antes do protocolo. Órgãos públicos que utilizam o sistema SIAFI devem utilizar o número da GRU no campo Número de Referência na emissão do pagamento. Serviço: 200-Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

[Clique aqui e pague este boleto através do Auto Atendimento Pessoa Física.](#)

[Clique aqui e pague este boleto através do Auto Atendimento Pessoa Jurídica.](#)

BANCO DO BRASIL					001-9	00190.00009 02940.916196 46878.579179 1 89340000007000				
Recibo do Pagador										
Nome do Pagador/CPF/CNPJ/Endereço										
UNIVERSIDADE FEDERAL DE VICOSA CPF/CNPJ: 25944455000196										
CAMPUS UFV PRO REITORIA DE PESQUISA E POS GRADUACAO SALA 04 , VICOSA -MG CEP:36570900										
Sacador/Avalista										
Nosso-Número		Nr. Documento		Data de Vencimento		Valor do Documento		(=) Valor Pago		
29409161946878579		29409161946878579		24/03/2022		70,00				
Nome do Beneficiário/CPF/CNPJ/Endereço										
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUST CPF/CNPJ: 42.521.088/0001-37										
RUA MAYRINK VEIGA 9 24 ANDAR ED WHITE MARTINS , RIO DE JANEIRO - RJ CEP: 20090910										
Agência/Código do Beneficiário						Autenticação Mecânica				
2234-9 / 333028-1										

BANCO DO BRASIL					001-9	00190.00009 02940.916196 46878.579179 1 89340000007000				
Local de Pagamento										
<b>PAGÁVEL EM QUALQUER BANCO ATÉ O VENCIMENTO</b>										
Data de Vencimento						24/03/2022				
Nome do Beneficiário/CPF/CNPJ										
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUST CPF/CNPJ: 42.521.088/0001-37										
Agência/Código do Beneficiário						2234-9 / 333028-1				
Data do Documento		Nr. Documento		Espécie DOC		Aceite		Data do Processamento		Nosso-Número
23/02/2022		29409161946878579		DS		N		23/02/2022		29409161946878579
Uso do Banco		Carteira		Espécie		Quantidade		xValor		(=) Valor do Documento
29409161946878579		17		R\$						70,00
Informações de Responsabilidade do Beneficiário										(-) Desconto/Abatimento
A data de vencimento não prevalece sobre o prazo legal.										
O pagamento deve ser efetuado antes do protocolo.										
Órgãos públicos que utilizam o sistema SIAFI devem utilizar o número da GRU n										(+ ) Juros/Multa
o campo Número de Referência na emissão do pagamento.										
Serviço: 200-Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de										
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT										(-) Valor Cobrado

Nome do Pagador/CPF/CNPJ/Endereço  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE VICOSA CPF/CNPJ: 25944455000196  
CAMPUS UFV PRO REITORIA DE PESQUISA E POS GRADUACAO SALA 04 ,  
VICOSA-MG CEP:36570900

Sacador/Avalista

Código de Baixa

Autenticação Mecânica

Ficha de Compensação



**SIAFI2022-DOCUMENTO-CONSULTA-CONGRU (CONSULTA GUIA DE RECOLHIMENTO DA UNIAO**

**21/03/22 10:29**

DATA EMISSAO : **16Mar22** TIPO : **1 - PAGAMENTO** USUARIO : **MARILUCE**  
 UG/GESTAO EMITENTE : **154051 / 15268 - UNIVERSIDADE FEDERAL DE VICOSA** NUMERO : **2022GR8000034**

UG/GESTAO FAVORECIDA : **183038 / 18801 - INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDU**  
 RECOLHEDOR : **154051** GESTAO : **15268**

CODIGO RECOLHIMENTO : **72200 - 6 COMPETENCIA: FEV22** VENCIMENTO: **10Mar22**

DOC. ORIGEM: **154051 / 15268 / 2022NP000453** PROCESSO : **902701/2022-17**

RECURSO : **1**

(=) VALOR DOCUMENTO : **70,00**

(-) DESCONTO/ABATIMENTO :

(-) OUTRAS DEDUCOES :

(+) MORA/MULTA :

(+) JUROS/ENCARGOS :

(+) OUTROS ACRESCIMOS :

(=) VALOR TOTAL : **70,00**

NOSSO NUMERO/NUMERO REFERENCIA : **00029409161946878579**

CODIGO DE BARRAS : **8961000000 0 70000001010 3 95523127220 9 00360640000 4**

OBSERVACAO

**PAGAMENTO DE TAXA (PEDIDO NACIONAL DE INVENÇÃO, PI 1, NOSSO NUMERO 294091619468**

**78579, PROCESSO 902701/2022-17.**

**LANCADO POR : 07787438614 - MARA**

PF1=AJUUDA PF3=SAI PF2=DADOS ORC/FIN PF4=ESPELHO PF12=RETORNA UG : **154051** **16Mar2022** **09:13**



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA  
REITORIA

Campus Universitário - Viçosa, MG - 36570-900 - Tel (31) 3612-1001 - E-mail: reitoria@ufv.br

## PROCURAÇÃO

**OUTORGANTE: UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA**, pessoa jurídica de direito público, criada pelo Poder Público Federal, na forma de fundação pública de cunho educacional, com sede na Avenida P. H. Rolfs, s/nº, *Campus Universitário*, Viçosa, Minas Gerais, inscrita no CNPJ/MF sob o nº 25.944.455/0001-96, neste ato representada por seu Reitor, Professor Demetrius David da Silva, brasileiro, casado, portador da Carteira de identidade de nº 606795-ES, inscrito no CPF sob o nº 542.934.726-49;

**OUTORGADA: ANDREA DE OLIVEIRA BARROS RIBON**, brasileira, casada, professora universitária, portadora da carteira de identidade nº MG-4.324.867, inscrita no CPF sob o nº 830.354.866-20, com domicílio legal na Universidade Federal de Viçosa, localizada a Avenida P. H. Rolfs, s/nº, *Campus Universitário*, Viçosa, Minas Gerais, CEP 36570-900;

**PODERES: A OUTORGANTE** confere à **OUTORGADA** os poderes contidos na cláusula "AD NEGOTIA", objetivando representar a Universidade Federal de Viçosa junto ao **INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL - INPI**, com poderes amplos e gerais, podendo a **OUTORGADA**: assinar formulários e termos de autorização para cópia, promover, perante autoridade competente, prova ou contraprova pertinentes à titularidade de direitos de propriedade industrial e, ainda, tudo o mais que se fizer necessário para o bom e fiel cumprimento do presente mandato, podendo substabelecer, no todo ou em parte, a presente procuração, que terá a validade de 3 (três) anos.

Viçosa, 03 de maio de 2022.

  
\_\_\_\_\_  
Demetrius David da Silva  
Reitor



Ministério da Educação  
Universidade Federal de Viçosa  
Campus Viçosa  
Reitoria

**PORTARIA Nº 0300/2022, DE 03/05/2022**

O Reitor da Universidade Federal de Viçosa, no uso de suas atribuições, conferidas pelo Decreto de 23/05/2019, publicado no Diário Oficial da União de 24/05/2019, considerando o que consta do Processo SEI 23114.906696/2022-11, resolve

1. revogar a Portaria nº 0162/2021, de 24/03/2021;

2. delegar competência à Presidente da Comissão Permanente de Propriedade Intelectual, e do Núcleo de Inovação Tecnológica da Universidade Federal de Viçosa, ANDRÉA DE OLIVEIRA BARROS RIBON, matrículas 8331-3/UFV e 2381125-3/Siape, para representar a instituição junto aos seguintes órgãos: Instituto Nacional de Propriedade Industrial – INPI; Registro Nacional de Cultivares – RNC, e ao Serviço Nacional de Proteção de Cultivares - SNPC, podendo assinar formulários e termos de autorização para cópia; promover, perante autoridade competente, prova ou contraprova concernentes à titularidade de direitos de propriedade intelectual; realizar peticionamentos, eletrônicos ou não; e realizar outras ações pertinentes ao desempenho da presente representação.

Publique-se e cumpra-se.

***Demetrius David da Silva***

***Reitor***



Documento assinado eletronicamente por **DEMETRIUS DAVID DA SILVA, Reitor**, em 03/05/2022, às 14:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[http://sei.dti.ufv.br/sei/controlador\\_externo.php?](http://sei.dti.ufv.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.dti.ufv.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0695136** e o código CRC **96678CA5**.

---

**Referência:** Processo nº 23114.906696/2022-11

SEI nº 0695136

*Campus Viçosa*

Av. Peter Henry Rolfs, s/nº, *Campus* Universitário  
36570-900 Viçosa/MG

*Campus Florestal*

Rodovia LMG-818, km 6  
35690-000 Florestal/MG

*Campus Rio Paranaíba*

Rodovia MG-230, Km 7, Zona Rural, Rodoviário  
38810-000 Rio Paranaíba/MG

## RELATÓRIO DESCRITIVO

### Compostos derivados da *ent*-isoquercetina, processos de produção e uso como inibidor de NTPDases e em medicamentos para o tratamento da doença de Chagas e Leishmanioses

#### CAMPO TÉCNICO DA INVENÇÃO

1. A presente invenção refere-se aos compostos 2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-3-(((2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahydro-2*H*-pirano-2-il)oxi)-4*H*-cromen-4-ona (**2**), 2-(3,4-dimetoxifenil)-5,7-dimetoxi-3-(((2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-triidroxi-6-(hidroximetil)tetrahydro-2*H*-piran-2-il)oxi)-4*H*-cromen-4-ona (**4**), (2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*R*)-2-(acetoximetil)-6-((5,7-bis(benziloxi)-2-(3,4-bis(benziloxi)fenil)-4-oxo-4*H*-cromen-3-il)oxi)tetrahydro-2*H*-piran-3,4,5-triiltriacetato (**14**), (2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*R*)-2-(acetoximetil)-6-((2-(3,4-dimetoxifenil)-5,7-dimetoxi-4-oxo-4*H*-cromen-3-il)oxi)tetrahydro-2*H*-piran-3,4,5-triil triacetato (**15**), 5,7-bis(Benziloxi)-2-(3,4-bis(benziloxi)fenil)-3-(((2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahydro-2*H*-piran-2-il)oxi)-4*H*-cromen-4-ona (**16**) e (2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*R*)-2-(acetoximetil)-6-((2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-4-oxo-4*H*-cromen-3-il)oxi)tetrahydro-2*H*-piran-3,4,5-triiltriacetato (**17**), aos processos de produção e ao uso como inibidores de NTPDases e para o tratamento da doença de Chagas e Leishmanioses. Todos os compostos foram obtidos durante a síntese da *ent*-isoquercetina (**2**), que geraram glicosídeos não naturais da quercetina, por uma rota sintética curta, régio e estereosseletiva, a partir da rutinae da L-glicose (açúcar não natural).

2. Esses intermediários e o composto final da síntese (Figura 1) foram testados como potenciais inibidores de NTPDases (Ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolases, EC:3.6.1.5, família NTPDase/CD39), onde foram usadas como exemplos de NPTDases as proteínas recombinantes de *Trypanosoma cruzi*, TcNTPDase-1 e de *Leishmania infantum*, LiNTPDase-2. Alguns compostos demonstraram atividade inibitória, em especial o composto 5,7-bis(Benziloxi)-2-(3,4-bis(benziloxi)fenil)-3-(((2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahydro-2*H*-piran-2-il)oxi)-4*H*-cromen-4-ona (**16**) que demonstrou capacidade inibitória próxima à cem por cento (100%) para a TcNTPDase-1, e de aproximadamente, setenta e cinco por cento (~75%) para a LiNTPDase-2. Além disso, o composto também foi capaz de inibir a atividade da NTPDase-2 de *Leishmania braziliensis*

(LbNTPDase-2), aproximadamente noventa e três por cento (~93%), e de diminuir significativamente a infecção em macrófagos, demonstrando também, baixa citotoxicidade para macrófago. Os outros compostos intermediários da síntese também foram testados e alguns mostraram efeitos intermediários.

**3.** Tendo em vista também que as ENTPDases são comuns em outros organismos incluindo mamíferos e seres humanos, que estas enzimas têm diversas funções importantes e que os compostos deste estudo foram capazes de inibir NTPDases de diferentes organismos, este pedido inclui também a proteção do uso dos compostos como inibidores de NTPDases em geral.

**4.** Tendo em vista o uso destes compostos para a produção de fármacos inibidores de NTPDases e que possam ser usados na produção de medicamentos para o tratamento de doenças infecciosas negligenciadas causadas por *T. cruzi* e *Leishmania*, o ramo técnico da invenção se enquadra em indústrias do setor farmacêutico e biotecnológico.

## **ESTADO DA TÉCNICA**

**5.** A doença de Chagas e as Leishmanioses são doenças infecciosas parasitárias causadas, respectivamente, por *Trypanosoma cruzi* e por diferentes espécies do gênero *Leishmania*. Estas doenças pertencem à lista de doenças negligenciadas da Organização Mundial de Saúde (OMS), por serem doenças tropicais endêmicas, principalmente entre as populações de baixa renda da África, Ásia e América Latina (FIOCRUZ. Doença de Chagas. Disponível em: [agencia.fiocruz.br](http://agencia.fiocruz.br). Acesso em: 3 ago. 2020; WHO. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. Weekly Epidemiological Record, v. 90, n. 6, p. 33–43, 2015). A OMS estima que cerca de 6 a 7 milhões de pessoas estejam infectadas no mundo por *T. cruzi* e que cerca de 10 mil pessoas morram ao ano pela doença de Chagas (WHO. Chagas Disease (American trypanosomiasis). Disponível em: [who.int](http://who.int). Acesso em: 30 jul. 2020). No caso das Leishmanioses, estima-se que, dos países que reportam à OMS, 98 sejam endêmicos, sendo 68 deles endêmicos para Leishmaniose Visceral (LV) e Leishmaniose Cutânea (LC), 9 países endêmicos apenas para LV e 21 apenas para LC. No mundo, estima-se que ocorram anualmente 30.000 novos casos de LV e 1 milhão de novos casos de LC anualmente. Em 2018, foram notificados no Brasil 16.432 casos de LC e 3.460 casos de LV, o que coloca o país entre os países endêmicos (WHO, Leishmaniasis. Disponível em: [who.int](http://who.int). Acesso em: 4 ago. 2020). É importante ressaltar que essas doenças são subnotificadas e que afligem milhões de pessoas no mundo todo, sendo que os poucos

tratamentos existentes são, de maneira geral, caros e com muitos efeitos adversos. Logo, um novo composto que possa ser usado no tratamento dessas doenças de maneira mais eficaz e com menos efeitos colaterais é promissor e de interesse comercial.

**6.** Devemos citar que, *T. cruzi* e *Leishmania* possuem em sua superfície enzimas que pertencem à família das NTPDases ou ENTPDases. Esta família é caracterizada por enzimas capazes de hidrolisar nucleotídeos intra e extracelulares tri e difosfatados (ZIMMERMANN, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 362, n. 4–5, p. 299–309, 2000), os quais exercem diversas funções como sinalizadores celulares, via receptores purinérgicos e pirimidinérgicos, e têm sido apontadas como fatores de virulência de patógenos (DA SILVA, et al., “ENTPDases from Pathogenic Trypanosomatids and Purinergic Signaling: Shedding Light towards Biotechnological Applications”, *Current Topics in Medicinal Chemistry* ; 21(3), 2021).

**7.** As NTPDases são enzimas dependentes de cátions divalentes e estão presentes ubiquamente nos diferentes reinos da natureza (de bactérias aos mamíferos e plantas). As NTPDases controlam a sinalização purinérgica através da modulação da concentração de nucleotídeos tri e difosfatados extra e intracelulares que são os ligantes dos receptores purinérgicos do tipo P2X e P2Y (BURNSTOCK, G. The therapeutic potential of purinergic signalling. *Biochem. Pharmacol.* 151, 157–165, 2018). O sistema purinérgico por sua vez controla vários processos celulares e por controlarem e influenciarem várias funções importantes. Em mamíferos essas enzimas são alvo para desenvolvimento de inibidores com potencial farmacológico (BAQI, Y. Ecto-nucleotidase inhibitors: recent developments in drug discovery. *Mini Rev. Med. Chem.* 15, 21–33, 2015; BURNSTOCK, G. The therapeutic potential of purinergic signalling. *Biochem. Pharmacol.* 151, 157–165, 2018).

**8.** Há alguns anos, o grupo de pesquisa dos inventores do atual pedido de patente, vem estudando as E-NTPDases dos parasitos do gênero *Leishmania* e de *Trypanosoma cruzi* e a relação dessas enzimas com a virulência, capacidade infecciosa, adesão celular e controle da resposta imune do hospedeiro (DE SOUZA, R. F. et al. Recombinant *Leishmania (Leishmania) infantum* Ecto- Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase NTPDase-2 as a new antigen in canine visceral leishmaniasis diagnosis. *Acta Tropica*, v. 125, n. 1, p. 60–66, 2013; MAIOLI, T. U. et al. Immune response induced by New World *Leishmania* species in C57BL/6 mice. *Parasitology Research*, v. 94, n. 3, p. 207–212, 2004; MARIOTINI-MOURA, C. et al. *Trypanosoma cruzi* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (TcNTPDase-1) biochemical characterization, immunolocalization and possible role in host cell adhesion.

Acta Tropica, v. 130, n. 1, p. 140–147, 2014; SANTOS, R. F. et al. Influence of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity on *Trypanosoma cruzi* infectivity and virulence. PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 3, n. 3, 2009; VASCONCELLOS, R. D. S. et al. Leishmania infantum Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-2 is an Apyrase Involved in Macrophage Infection and Expressed in Infected Dogs. PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 8, n. 11, 2014; DA SILVA, W. et al. ENTPDases from Pathogenic Trypanosomatids and Purinergic Signaling: shedding light towards Biotechnological Applications. Current Topics in Medicinal Chemistry, v. 20, p. 1–14, 2020).

**9.** Uma questão preocupante é a falta de tratamentos eficientes, de fácil uso, baixa toxicidade e de maior acessibilidade para as pessoas afetadas por essas doenças. No caso das Leishmanioses na doença humana, o tratamento pode ser feito pelo antimoniato de N-metilglucamina (derivado antimonial pentavalente) e pela anfotericina B. Os antimoniais pentavalentes são as drogas mais indicadas para o tratamento e administrados via endovenosa, logo devem ser aplicados em ambulatórios, o que dificulta a continuidade do tratamento. Além disso, ocorrem diversos efeitos colaterais, como alta cardiotoxicidade e nem sempre são efetivos, uma vez que, muitos pacientes demonstram resistência ao tratamento. A anfotericina B é uma alternativa ao uso dos antimoniais, por possuírem efeitos adversos mais brandos especialmente em sua forma lipossomal, no entanto, esse medicamento possui alto custo. Existem outros poucos fármacos disponíveis para uso, porém são considerados pouco eficientes demonstrando que é necessário o desenvolvimento de novos fármacos (MINISTÉRIO DA SAÚDE. Leishmaniose Visceral. 1. ed. Brasília/DF: [s.n.]; RATH, S. et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: Estado da arte. Química Nova, v. 26, n. 4, p. 550–555, 2003; SANTOS, S. S. et al. Searching for drugs for Chagas disease, leishmaniasis and schistosomiasis: a review. International Journal of Antimicrobial Agents, v. 55, n. 4, p. 105906, 2020).

**10.** No caso da doença de Chagas, são utilizados apenas dois medicamentos no tratamento, Nifurtimox e Benznidazol. Sendo que, no Brasil, apenas o Benznidazol é comercializado, já que, o uso do Nifurtimox foi suspenso desde a década de 80 (RODRIGUES COURA, J.; DE CASTRO, S. L. A critical review on chagas disease chemotherapy. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 97, n. 1, p. 3–24, 2002). Além disso, o tratamento, com ambos os medicamentos, é mais eficaz na fase aguda da doença, e na fase crônica a eficiência desses medicamentos é menor que 20% (WHO. Treatment of Chagas disease. Disponível em: who.int. Acesso em: 4 ago. 2020c). Outro problema são os efeitos colaterais que surgem durante o tratamento, que incluem anorexia, náuseas, vômitos, dor de cabeça, depressão do

sistema nervoso central ou sintomas maníacos, convulsões, vertigem, parestesias, polineuropatias periféricas e dermatite (KIRCHHOFF, L. V. American Trypanosomiasis Chagas' disease, Gastroenterology Clinics of North America, v. 25, n. 3, p. 517–533, 2000). Além disso, o tratamento com Nifurtimox e Benznidazol é contraindicado para mulheres grávidas e para pacientes que possuem outras doenças graves associadas à doença de Chagas (FIOCRUZ. Doença de chagas. Disponível em: [agencia.fiocruz.br](http://agencia.fiocruz.br). Acesso em: 3 ago. 2020; WHO. Treatment of Chagas disease. Disponível em: [who.int](http://who.int). Acesso em: 4 ago. 2020c). Infelizmente, apesar dos avanços, nenhum novo fármaco testado até os dias atuais mostrou-se eficiente a ponto de substituir o uso dos fármacos já utilizados (CHATELAIN, E. Chagas disease drug discovery: Toward a new era. Journal of Biomolecular Screening, v. 20, n. 1, p. 22–35, 2015; GASPAR, L. et al. Inhibitors of *Trypanosoma cruzi* Sir2 related protein 1 as potential drugs against Chagas disease. PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 12, n. 1, p. 1–30, 2018; SBARAGLINI, M. L. et al. Novel cruzipain inhibitors for the chemotherapy of chronic Chagas disease. International Journal of Antimicrobial Agents, v. 48, n. 1, p. 91–95, 2016; SUETH-SANTIAGO, V. et al. Challenges in the chemotherapy of Chagas disease: Looking for possibilities related to the differences and similarities between the parasite and host. World Journal of Biological Chemistry, v. 8, n. 1, p. 57, 2017).

**11.** No geral, as formas de tratamento, para ambas as doenças, são ineficientes, com alta toxicidade, caras e de difícil acesso (FIOCRUZ. Doença de chagas. Disponível em: [agencia.fiocruz.br](http://agencia.fiocruz.br). Acesso em: 3 ago. 2020; SANTOS, et al. Searching for drugs for Chagas disease, leishmaniasis and schistosomiasis: a review. International Journal of Antimicrobial Agents, v. 55, n. 4, p. 105906, 2020.; WHO. Status of endemicity of leishmaniasis worldwide, 2018. Disponível em: [apps.who.int](http://apps.who.int). Acesso em: 22 jul. 2020; WHO. Treatment of Chagas disease. Disponível em: [who.int](http://who.int). Acesso em: 4 ago. 2020c). Logo, há necessidade de novas drogas ou moléculas que possam gerar novos tratamentos para a doença de Chagas e Leishmanioses.

**12.** Sendo assim, o grupo de pesquisa dos inventores do atual pedido de patente deu início à busca de possíveis inibidores de NTPDases de *T. cruzi* e *Leishmania* que pudessem ser usados no desenvolvimento de novas drogas para o tratamento das doenças. Inicialmente, foram testados para TcNTPDase-1 e LiNTPDase-2 diversos extratos e compostos, com grande variedade química. No entanto, os compostos derivados de quercetina se destacaram, por apresentarem atividade inibitória parcial e por alguns serem comercializados (MARIOTINI-MOURA, C. Estudo biológico e bioquímico das NTPDases de *Trypanosoma*

*cruzi* e *Leishmania infantum chagasi* e busca por novos compostos para o tratamento da Doença de Chagas. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2014; MARIOTINI-MOURA, C. et al. *Trypanosoma cruzi* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (TcNTPDase-1) biochemical characterization, immunolocalization and possible role in host cell adhesion. *Acta Tropica*, v. 130, n. 1, p. 140–147, 2014; VASCONCELLOS, R. D. S. Estudo bioquímico, biológico e busca por inibidores da nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase-2 (LicNTPDase-2) de *Leishmania infantum chagasi* com estratégia para o desenho racional de drogas. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2014). Além disso, já está bem descrito na literatura que a quercetina e seus derivados heterosídeos têm efeitos benéficos contra diversos distúrbios que incluem o câncer, doenças cardiovasculares, doenças renais, além, de seu papel antimicrobiano e antiviral (D'ANDREA, G. Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications? *Fitoterapia*, v. 106, p. 256–271, 2015; SALEHI, B. et al. Therapeutic Potential of Quercetin: New Insights and Perspectives for Human Health. *ACS Omega*, v. 5, n. 20, p. 11849– 11872, 2020).

**13.** Contudo, alguns desses derivados glicosídeos mostraram-se pouco estáveis durante o armazenamento, gerando a necessidade de síntese de um novo composto derivado de quercetina, mais estável e que possuísse atividade inibitória. E assim, o composto não natural derivado da quercetina, a *ent*-isoquercetina, foi sintetizado e testado como possível inibidor, assim como seus intermediários de síntese. Sendo que, o composto (**16**) demonstrou-se o mais promissor, por apresentar capacidade de inibição bem próxima a 100%. Além disso, mostrou-se capaz de matar de forma eficiente e diminuir a infecção por *Leishmania* em ensaios de infecção *in vitro* usando macrófago murino como célula hospedeira.

**14.** Devemos enfatizar que, diferentemente de outros compostos derivados heteroglicosídeos da quercetina, os compostos sintetizados, objetos do atual pedido de patente, são derivados não naturais, ou seja, esses derivados possui a porção glicídica derivada de uma L-glicose (açúcar não natural), conseqüentemente, os produtos obtidos via síntese orgânica são produtos não naturais e inéditos. Durante a busca de anterioridade, os trabalhos encontrados relatam compostos que foram resultados do isolamento ou da síntese do produto natural, isoquercetina e seus derivados naturais possuindo a unidade glicosil vinda da D-Glicose (açúcar natural). Os resultados da busca bibliográfica encontrados nos bancos de dados referem-se sempre aos produtos conhecidos como naturais (isoquercetina e derivados). Não foram encontrados compostos como os sintetizados neste pedido de patente e seus derivados, indicados como produtos não-naturais (*ent*- isoquercetina e derivados).

**15.** O documento de patente WO2000012085 “Ascorbate-isoquercetin compositions” apresenta uma composição contendo ácido ascórbico ou ascorbato ou seu derivado em combinação com um ou mais derivados da isoquercetina, sendo quercetina-3-O-glucosídeo, quercetina-4'-glucosídeo, quercetina-3'-glucosídeo e quercetina-7-glucosídeo, com emprego como suplemento alimentar, a fim de promover propriedades preventivas contra danos em tecidos humanos, incluindo as células da pele, causado por estresse oxidativo. Difere do pedido atual pela estrutura química e aplicação biológica.

**16.** O documento de patente CN1483825 “Method for preparing isoquercetin and quercetin by enzymatic method and hydrolyzing rutin” refere-se à obtenção da isoquercetina e da quercetina por meio da hidrólise enzimática da glicosil rutina em presença de uma solução tampão (pH 4-8) e álcool etílico, com tempo reacional de 2 a 24 horas em temperatura de 15 a 70 °C, fornecendo a isoquercetina e a quercetina com pureza superior a 90%. Esta invenção não relata nenhuma atividade biológica para esses compostos.

**17.** O documento de patente CN101260133 “Method for preparing hyperoside and isoquercetin from cotton petal” refere-se a um método de extração da hiperina e da isoquercetina a partir de pétalas de algodão, empregando solvente orgânico. Os extratos obtidos foram submetidos a processos de purificação empregando coluna cromatográfica com resinas macroporosas e posteriormente cromatografia em coluna de sílica gel, representando um método simples e de baixo custo para obtenção desses compostos. O documento de patente não relata nenhuma atividade biológica para os mesmos.

**18.** O documento de patente DE19809304 “Formulations with antiviral activity” refere-se a formulações em forma sólida contendo a isoquercetina com aplicações farmacêuticas, atuando como filtro de proteção à luz solar e/ou como substância de ação antiviral. Difere-se do pedido atual pela estrutura química e aplicação biológica.

**19.** O documento de patente WO2014038873 “Composition for inhibiting cellular senescence comprising quercetin-3-O- $\beta$ -D-glucuronide” refere-se ao emprego de uma composição contendo quercetina-3-O- $\beta$ -D-glucuronídeo (Q3GA) como ingrediente ativo para inibição da senescência celular de fibroblastos, de células endoteliais da veia umbilical ou uma senescência replicativa, que são induzidas por adriamicina com emprego no tratamento de doenças relacionadas à senescência, como envelhecimento da pele, artrite reumatoide, artrite degenerativa, hepatite crônica, tecido lesionado da pele, arteriosclerose, entre outras. Difere-se do pedido atual pela estrutura química e sua forma de aplicação.

**20.** O documento de patente KR20170038214 “Antimicrobial composition comprising sugar

acids and flavonoid” refere-se à aplicação antimicrobiana de uma composição contendo um ácido sacárico e flavonoides como ingredientes ativos. A composição contendo mistura desses compostos provoca melhor sinergia na inibição do crescimento de vários microrganismos, incluindo bactérias, ou provoca mortalidade dos mesmos. Difere-se do pedido atual pela estrutura química e sua forma de aplicação.

**21.** O documento de patente US3888842 “Quercetin derivatives” refere-se a um método sintético para preparação de um derivado da quercetina contendo o grupo vicianosil como substituto em pelo menos uma das posições 3,7 e 4’ deste núcleo. Relata ainda, o emprego desse derivado em terapia humana em todas as condições patológicas, devido às suas propriedades de proteção dos capilares. Difere-se do pedido atual pela estrutura química e forma de aplicação.

**22.** O documento de patente US20170216246 “Method for treating zika virus infection with quercetin-containing compositions” relata um método para tratamento de infecção causada pelo Zika vírus empregando composição contendo quercetina ou isoquercetina, juntamente com a vitamina B3, vitamina C e um composto folato. Além de descrever métodos de prevenção da microcefalia, tratamento e prevenção de outras infecções causadas por vírus Flaviridae. Difere-se do pedido atual pela estrutura química e forma de aplicação.

**23.** O documento de patente KR20180058411 “Cosmetic composition for antioxidant comprising Alnus firma extract as active ingredients” refere-se a uma formulação, contendo como ingrediente ativo a quercetina-3-O-β-D-glicosídeo, para inibição da senescência celular e envelhecimento da pele de maneira eficiente. Difere-se do pedido atual pela estrutura química e forma de aplicação.

**24.** O documento de patente US20150190369 “Quercetin-3-glucoside and uses thereof” descreve o emprego da quercetina-3-O-β-D-glicosídeo para aumento da quantidade de receptores de lipoproteína de baixa densidade de superfície celular numa célula, levando à redução da quantidade subtilisina convertase/kexina tipo 9. A utilização pode, opcionalmente, incluir o tratamento de uma estatina. É descrito também o emprego para tratamento dos níveis de colesterol no plasma. O método inclui o tratamento do paciente com quantidade terapêuticamente eficiente de quercetina-3-O-β-D-glicosídeo e, opcionalmente, uma quantidade terapêutica eficiente de estatina. Difere-se do pedido atual pela estrutura química e forma de aplicação.

**25.** O documento de patente WO2015169121 “Use of quercetin-O-glycoside derivatives in treating lipid metabolism disorders” refere-se a um método de preparação e uso de

derivados da classe da quercetina-O-glicosídeo para tratamentos de distúrbios de metabolismo lipídico. A partir do design, síntese e estudos de atividade farmacológica *in vitro* e *in vivo*, verificou-se que os derivados quercetin-O-glicosídeos podem exercer um papel redutor de lipídios. Além disso, esse documento de patente fornece uma composição farmacêutica para tratamento de desordens metabólicas de lipídeos. Difere-se do pedido atual pela estrutura química e forma de aplicação.

**26.** O documento de patente CN105968152 “Method for extracting, separating and purifying blood fat reducing active compound quercetin-3-O- $\beta$ -D-glucoside from Jun jujubes in southern Xinjiang” descreve um método para extração, separação e purificação da quercetin-3-O- $\beta$ -D-glicosídeo, um composto redutor de gordura no sangue, a partir de Jun Jujubes no Sul de Xinjiang. Ensaio realizados em ratos indicaram certa atividade redutora de gordura no sangue. Difere-se do pedido atual pela estrutura química e forma de aplicação.

**27.** O documento de patente DE19850570 “Production of new or known tri-O-hydroxyalkyl quercetin or isoquercetin derivatives, e. g. useful as food supplements, comprises enzymatic hydrolysis of tri-O-hydroxyalkyl rutin derivatives in an aqueous medium” refere-se a um processo de preparo de compostos derivados da isoquercetina e da rutina, sendo os compostos derivados de isoquercetina, com propriedades antioxidantes, cardiovasculares, antivirais e/ou propriedades espasmolíticas. Em mistura, com outros flavonoides, eles também possuem propriedades sinérgicas, como purgativas. O documento de patente refere-se também a alimentos que foram enriquecidos com um ou mais compostos derivados de isoquercetina, e utilização desses compostos como suplementos dietéticos. Difere-se do pedido atual pela estrutura química e forma de aplicação.

**28.** O documento de patente CN101260133 “Method for preparing hyperoside and isoquercetin from cotton petal” descreve um método de baixo custo e de simples operação para o preparo de hiperosídeo e isoquercetina (flavonoides glicosídeos) a partir de pétalas de algodão (matéria-prima). Os flavonoides são extraídos dessa planta por emprego de solvente orgânico e submetidos à purificação por coluna cromatográfica. Eles possuem efeitos farmacológicos como analgésicos e protetores sobre doenças cardiovasculares e cerebrovasculares. Difere-se do pedido atual na estrutura química e aplicação dos mesmos.

**29.** O artigo “Kajjout, M.; Zemmouri, R. Rolando, C. An expeditious synthesis of quercetin 3-O- $\beta$ -D-glucuronide from rutin. *Tetrahedron Lett.* 2011, 52, 4738- 4740” retrata a síntese da quercetina 3-O- $\beta$ -D-glucuronídeo a partir da rutina, sendo obtido 5,7-bis-benziloxi-2-(3,4-bis-benziloxifenil)-3-O- $\beta$ -D- glucopiranosiloxi-4H-cromen-4-ona como um intermediário

sintético. Difere do presente pedido de patente pela estrutura química (o produto é um enantiômero do composto abordado neste documento) e não menciona aplicação para os mesmos.

**30.** Como resultado dessa conferência bibliográfica pode-se afirmar que os produtos sintéticos do presente pedido de patente, conhecidos como não naturais, *ent*-isoquercetina e derivados são inéditos. E os resultados, até então obtidos, em ensaios de inibição e ensaios biológicos, mostram que os compostos 5,7- bis(Benziloxi)-2-(3,4-bis(benziloxi)fenil) -3-(((2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-trihidroxi- 6-(hidroximetil)tetrahydro-2*H*-piran-2-il)oxi)-4*H*-cromen-4-ona (**16**), (2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*R*)-2-(acetoximetil)-6-((5,7-bis(benziloxi)-2- (3,4-bis(benziloxi)fenil)-4-oxo-4*H*-cromen-3-il)oxi)tetrahydro-2*H*-piran-3,4,5- triiltriacetato (**14**), (2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*R*)-2-(acetoximetil)-6-((2-(3,4-dihidroxifenil)- 5,7-dihidroxi -4-oxo-4*H*-cromen-3-il)oxi)tetrahydro-2*H*-piran-3,4,5-triiltriacetato (**17**), 2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-3-(((2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-trihidroxi-6 (hidroximetil)tetrahydro-2*H*-pirano-2-il)oxi)-4*H*-cromen-4-ona(**2**), (2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*R*)-2-(acetoximetil)-6-((2-(3,4-dimetoxifenil)-5,7-dimetoxi-4-oxo- 4*H*-cromen-3-il)oxi)tetrahydro-2*H*-piran-3,4,5-triil triacetato (**15**) e 2-(3,4-dimetoxifenil)-5,7-dimetoxi-3-(((2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-triidroxi-6-(hidroximetil)tetrahydro-2*H*-piran-2-il)oxi)-4*H*-cromen-4-ona (**4**) apresentam grande possibilidade de serem aplicados no desenvolvimento de um novo fármaco para o tratamentos da doença de Chagas e leishmaniose, tendo como alvo terapêutico a inibição das NTPDases. Sendo que, os compostos mais promissores foram o (**14**) e (**16**).

**31.** Além disso, esses compostos têm a vantagem de terem sido desenvolvidos como uma droga racional. Logo, os mesmos (**14** e/ou **16**) atuam em uma molécula alvo específica, o que é mais eficiente e evita um grande número de danos colaterais. Além disso, já foi descrito que, existem poucos medicamentos que são utilizados no tratamento tanto da doença de Chagas e Leishmanioses, sendo que, os medicamentos existentes possuem restrições, são caros, tem eficiência variável, são de difícil acesso, possuem alta toxicidade e alguns vêm apresentando baixa eficiência devido à resistência dos parasitos.

**32.** Nesse sentido, os compostos do presente pedido de patente surgem como uma possível alternativa para melhorar o quadro de tratamento dessas doenças, visando o melhor acesso ao tratamento, bem como a qualidade de vida dos pacientes. Isso porque, um novo composto, além de dar alternativas para o tratamento, também poderia diminuir os custos e os efeitos colaterais ocorridos no tratamentos atualmente existentes.

## DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

**33.** As Figuras anexas exemplificam a invenção objeto do atual pedido de patente:

**34. Figura 1: Estrutura química dos compostos:** Compostos sintéticos obtidos no presente pedido de patente: 2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-3-(((2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahydro-2*H*-pirano-2-il)oxi)-4*H*-cromen-4-ona (**2**), 2-(3,4-dimetoxifenil)-5,7-dimetoxi-3-(((2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-triidroxi-6-(hidroximetil)tetrahydro-2*H*-piran-2-il)oxi)-4*H*-cromen-4-ona (**4**), (2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*R*)-2-(acetoximetil)-6-((5,7-bis(benziloxi)-2-(3,4-bis(benziloxi)fenil)-4-oxo-4*H*-cromen-3-il)oxi)tetrahydro-2*H*-piran-3,4,5-triiltriacetato (**14**), (2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*R*)-2-(acetoximetil)-6-((2-(3,4-dimetoxifenil)-5,7-dimetoxi-4-oxo-4*H*-cromen-3-il)oxi)tetrahydro-2*H*-piran-3,4,5-triil triacetato (**15**), 5,7-bis(Benziloxi)-2-(3,4-bis(benziloxi)fenil)-3-(((2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahydro-2*H*-piran-2-il)oxi)-4*H*-cromen-4-ona (**16**) e (2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*R*)-2-(acetoximetil)-6-((2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-4-oxo-4*H*-cromen-3-il)oxi)tetrahydro-2*H*-piran-3,4,5-triiltriacetato (**17**), no qual Ac é o grupo acetila, Bn é o grupo benzila e Me é o grupo metila. Compostos comerciais/não sintetizados: quercetina, quercetina-3- glucoronídeo(Miquelianina) e isoquercetina.

**35. Figura 2: Ensaios de inibição da TcNTPDase-1 na presença de compostos derivado da quercetina e intermediários de síntese da *ent*- isoquercetina:** Foram utilizadas duas concentrações de substrato uridina difosfato (UDP) 2,5 mM e 0,1 mM, e a concentração dos compostos foram as mesmas em todos os ensaios, 0,1 mM. Os controles continham 10% DMSO, mesma concentração presente nas outras reações. Os ensaios foram feitos em triplicatas biológicas independentes. Os gráficos foram construídos com os dados de atividade normalizados e submetidos a one way ANOVA, utilizando o software GraphPad Prisma versão 7.00 \*( $P < 0,05$ ) \*\*( $P < 0,001$ ).

**36. Figura 3: Ensaios de inibição da LiNTPDase-2 recombinante na presença da quercetina e do composto (16) –** Foram utilizadas duas concentrações de substrato adenosina difosfato (ADP) 2,5 mM e 0,1 mM, a concentração dos compostos foram as mesmas em todos os ensaios, 0,1 mM. Os controles continham 10% DMSO, mesma concentração presente nas outras reações. Os ensaios foram feitos em triplicatas biológicas independentes. Os gráficos foram construídos com os dados de atividade normalizados e submetidos a two way ANOVA, utilizando o software GraphPad Prisma versão 8.00 \*\*( $P < 0,001$ ) \*\*\*( $P < 0,0001$ ).

**37. Figura 4: Ensaio de inibição da Lb-NTPDase-2 recombinante na presença da quercetina e dos compostos sintéticos derivados da *ent*-isoquercetina:** A atividade da proteína, purificada e renaturada, foi avaliada na ausência (controle) e na presença dos inibidores: quercetina, (2), (4), (14), (15),

(16) e (17). A concentração final dos inibidores foi de 100 µM e UDP foi utilizado como substrato na concentração final de 2,5 mM. Os valores de atividade estão representados como % de inibição. As barras representam os desvios (SD) de experimentos independentes realizados em triplicata. A atividade de hidrólise foi avaliada pelo método do verde malaquita. A análise estatística foi performada utilizando ANOVA e as diferenças significativas entre o controle e os inibidores são mostradas com asteriscos ( $p < 0,05$ ).

**38. Figura 5: Ensaio de ação tripanocida em epimastigota de *T. cruzi*.** Formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* ( $1 \times 10^8$  parasitos) foram tratados com os compostos (14) e (16) por 10 minutos, observados em microscópio ótico e sua mobilidade, assim como densidade populacional foram comparados com o controle (sem inibidores). A) tratado com o composto (16), houve formação de aglomerados, diminuição da densidade celular e perda da mobilidade. B) tratado com o composto (14), observou-se diminuição da densidade celular, baixa mobilidade e início de pequenos aglomerados. C) Controle, observa-se maior densidade celular, ausência de aglomerados e observou-se alta mobilidade celular.

## DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

**39.** A presente invenção refere-se à *ent*-quercetina e intermediários de síntese, aos processos de produção e ao uso como inibidores de NTPDases e para produzir medicamentos para o tratamento da doença de Chagas e Leishmanioses.

**40.** Os compostos obtidos a partir da síntese da *ent*-quercetina foram: 5,7-bis(Benziloxi)-2-(3,4-bis (benziloxi)fenil)-3-(((2R,3S,4R,5R,6S)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahydro-2H-piran-2-il)oxi)-4H-cromen-4-ona (16), fórmula empírica:

C<sub>49</sub>H<sub>44</sub>O<sub>12</sub>, massa molar 824,86 g/mol; (2S,3S,4R,5S,6R)-2-(acetoximetil)-6-((5,7-bis(benziloxi)-2-(3,4-bis(benziloxi)fenil)-4-oxo-4H-cromen-3-il)oxi)tetrahydro-2H-piran-3,4,5-triil triacetato (14), fórmula empírica: C<sub>57</sub>H<sub>52</sub>O<sub>16</sub>, massa molar 992,325 g/mol; (2S,3S,4R,5S,6R)-2-(acetoximetil)-6-((2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-

dihidroxi-4-oxo-4H-cromen-3-il)oxi)tetrahydro-2H-piran-3,4,5-triil triacetato (17), fórmula empírica: C<sub>29</sub>H<sub>28</sub>O<sub>16</sub>, massa molar 632,52g/mol; 2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-3-(((2R,3S,4R,5R,6S)-3,4,5-trihidroxi-6-

(hidroximetil)tetrahydro-2*H*-pirano-2-il)oxi)-4*H*-cromen-4-ona (**2**), fórmula empírica: C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub>, massa molar 464,095 g/mol; (2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*R*)-2-(acetoximetil)-6-((2-(3,4-dimetoxifenil)-5,7-dimetoxi-4-oxo-4*H*-cromen-3-il)oxi)tetrahydro-2*H*-piran-3,4,5-triil triacetato (**15**), fórmula empírica: C<sub>33</sub>H<sub>36</sub>O<sub>16</sub>, massa molar 688,2 g/mol e 2-(3,4-dimetoxifenil)-5,7-dimetoxi-3-(((2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-triidroxi-6-(hidroximetil)tetrahydro-2*H*-pirano-2-il)oxi)-4*H*-cromen-4-ona (**4**), fórmula empírica: C<sub>25</sub>H<sub>28</sub>O<sub>12</sub>, massa molar 520,16 g/mol. Como aplicações dos compostos temos: a ação como inibidores de NTPDases, e utilização na produção de medicamentos para o tratamento da doença de Chagas e Leishmanioses. Na Figura 1 podemos ver as estruturas químicas de todos os compostos obtidos na síntese.

**41.** O processo de produção dos derivados da *ent*-isoquercetina compreende as seguintes etapas:

- a. Conversão da L-glicose (**6**) no β-glucosil brometo (**5**) por meio de etapas de acetilação, formando a glicose *per*-acetilada (**7**) como um intermediário, seguido por tratamento de (**7**) com solução de HBr/AcOH 20-40% (v/v);
- b. Proteção dos grupos hidroxilas da rutina com grupos benzila, seguido por etapa de clivagem do grupo rutinol para a formação dos compostos (**9**) e (**10**), e consecutivo tratamento desses com o β-glucosil brometo (**5**) gerando o glicosídeo (**12**);
- c. Completa proteção da hidroxila presente em (**12**) com brometo de benzila para a formação do glicosídeo todo benzilado (**14**);
- d. Remoção dos grupos benzilas presentes em (**12**), seguido por reprotção das hidroxilas com iodometano para a formação do glicosídeo metoxilado (**15**);
- e. Tratamento dos glicosídeos (**14**) e (**15**) com metóxido de sódio em metanol para a remoção dos grupos acetilas presentes nesses, e concomitante formação dos compostos (**16**) e (**4**), respectivamente;
- f. Remoção dos grupos benzilas presentes em (**16**) com Pd/C para a formação da *ent*-isoquercetina (**2**);
- g. Purificação e caracterização.

**42.** O processo de produção do composto 2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-3-(((2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-triidroxi-6-(hidroximetil)tetrahydro-2*H*-pirano-2-il)oxi)-4*H*-cromen-4-ona (**2**) compreende as seguintes etapas:

- (a) Pesar 0,1 a 0,8 mmol do composto 5,7-bis(Benziloxi)-2-(3,4-bis(benziloxi)fenil)-3-(((2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)oxi)-4*H*-cromen-4-ona (**16**), e diluir em 5 a 15 mL de etanol;
- (b) Tratar 0,1 a 0,8 mmol do composto (**16**) com Pd/C 10% (0,05 a 0,4 mmol) sob atmosfera de hidrogênio e agitar a solução por 4 a 18 h à temperatura ambiente;
- (c) Filtrar a solução obtida em (b) através de celite e evaporar o solvente sob pressão reduzida;
- (d) Purificar o resíduo bruto por coluna cromatográfica utilizando resina, à base de dextrana reticulada, eluído com um sistema H<sub>2</sub>O/MeOH (1:1), em volume de 100 a 400 mL, e obter o composto *ent*- isoquercetina (**2**).

**43.** O processo de produção do composto 2-(3,4-dimetoxifenil)-5,7-dimetoxi-3-(((2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-triidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)oxi)-4*H*-cromen-4-ona (**4**) compreende as seguintes etapas:

- (a) Pesar 0,1 a 0,8 mmol do composto ácido acético 4,5-diacetoxi-6-acetoximetil-2-[2-(3,4-dimetoxi-fenil)-5,7-dimetoxi-4-oxo-4*H*-cromen-3-iloxi]-tetrahidro-piran-3-il éster (**15**) e diluir em 2 a 8 mL de metanol anidro em agitação sob banho de gelo e sob atmosfera de argônio;
- (b) Adicionar 2 a 10 mL de uma solução metanólica de NaOMe;
- (c) Remover o banho de gelo e agitar por 1 a 4 horas;
- (d) Adicionar 5 a 15 mL de THF anidro e agitar por 0,5 a 3 horas;
- (e) Adicionar a resina catiônica até pH 6;
- (f) Filtrar o resíduo bruto sob Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrar sob pressão reduzida;
- (g) Purificar o resíduo da etapa anterior em coluna cromatográfica com 200 a 400 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9,5:0,5 v/v e obter o composto (**4**).

**44.** O processo de produção do composto ácido acético 4,5-diacetoxi-2-acetoximetil-6-[5,7-bis-benziloxi-2-(3,4-bis-benziloxi-fenil)-4-oxo-4*H*-cromen-3-iloxi]-tetrahidro-piran-3-ilmetil éster (**14**) compreende as seguintes etapas:

- (a) Pesar 0,2 a 0,9 mmol do ácido acético 3,5-diacetoxi-2-acetoximetil-6-[7-benziloxi-2-(3,4-bis-benziloxi-fenil)-5-hidroxi-4-oxo-4*H*-cromen-3-iloxi]-tetrahidro-piran-4-il éster (**12**) e misturar com 1 a 8 mmol de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> em

1 a 10 mL de dimetilformamida anidro e adicionar 1 a 4 mmol de brometo de benzila mantida sob agitação a 40 a 80 °C por 24 a 72 h sob atmosfera de argônio;

**(b)** Adicionar água destilada 20 a 40 mL e uma solução gelada de 5 a 20 mL de HCl 15%;

**(c)** Extrair a solução da etapa (b) com acetato de etila;

**(d)** Lavar a fase orgânica em solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> e solução saturada de cloreto de sódio;

**(e)** Secar com sulfato de sódio anidro e evaporar o solvente sob pressão reduzida;

**(f)** Purificar o resíduo bruto em coluna cromatográfica empregando misturas de hexano/acetato de etila 15 a 35% e 36 a 50% e obter o glicosídeo todo benzilado **(14)**.

**45.** O processo de produção do composto ácido acético 4,5-diacetoxi-6-acetoximetil-2-[2-(3,4-dimetoxi-fenil)-5,7-dimetoxi-4-oxo-4H-cromen-3-iloxi]-tetrahydro-piran-3-il éster **(15)** compreende as seguintes etapas:

**(a)** Pesar 0,3 a 1 mmol do ácido acético 3,5-diacetoxi-2-acetoximetil- 6-[7-benziloxi-2-(3,4-bis-benziloxi- fenil)-5-hidroxi-4-oxo-4H-cromen-3-iloxi]- tetrahydro-piran-4-il éster **(12)** e misturar 1 a 8 mmol de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> em 1 a 10 mL de dimetilformamida anidro e adicionar 1 a 8 mmol de iodometano mantida sob agitação a 40 a 80 °C por 24 a 72 h sob atmosfera de argônio;

**(b)** Adicionar água destilada e uma solução gelada de 5 a 20 mL de HCl 15%;

**(c)** Extrair a solução da etapa **(b)** com acetato de etila;

**(d)** Lavar a fase orgânica em solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> e solução saturada de cloreto de sódio;

**(e)** Secar com sulfato de sódio anidro e evaporar o solvente sob pressão reduzida;

(f) Purificar o resíduo bruto em coluna cromatográfica empregando misturas de hexano/acetato de etila 15 a 35% e 36 a 50% e obter o glicosídeo todo metoxilado (15).

46. O processo de produção do composto 5,7-bis(Benziloxi)-2-(3,4-bis(benziloxi)fenil)-3-(((2R,3S,4R,5R,6S)-3,4,5-trihidroxi-6 (hidroximetil)tetrahydro-2H-piran-2-il)oxi)-4H-cromen-4-ona (16) compreende as seguintes etapas:

(a) Pesar 0,1 a 0,7 mmol do ácido acético 4,5-diacetoxi-2-acetoximetil-6-[5,7-bis-benziloxi-2-(3,4-bis-benziloxi-fenil)-4-oxo-4H-cromen-3-iloxi]-tetrahydro-piran-3-ilmetil éster (14) e diluir em metanol anidro em volume de 1 a 10 mL e agitar sob banho de gelo e sob atmosfera de argônio;

(b) Adicionar 1 a 10 mL de uma solução metanólica de NaOMe;

(c) Remover o banho de gelo e manter a agitação por mais 1 a 3 h;

(d) Adicionar 5 a 15 mL de THF anidro e manter a agitação por mais 0,5 a 2 h;

(e) Adicionar resina catiônica até pH 6;

(f) Filtrar o resíduo bruto sob Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrar sob pressão reduzida;

(g) Purificar em coluna cromatográfica com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9,5:0,5 v/v em volume de 200 a 400 mL e obter o composto (16).

47. O processo de produção do composto (2S,3S,4R,5S,6R)-2-(acetoximetil)-6-(((2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-4-oxo-4H-cromen-3-il)oxi)tetrahydro-2H-piran-3,4,5-triiltriacetato (17) compreende as seguintes etapas:

(a) Pesar 0,2 a 0,7 mmol do ácido acético 3,5-diacetoxi-2-acetoximetil-6-[7-benziloxi-2-(3,4-bis-benziloxi-fenil)-5-hidroxi-4-oxo-4H-cromen-3-iloxi]-tetrahydro-piran-4-il éster (12) e diluir em etanol (5 a 12 mL);

(b) Tratar 0,2 a 0,7 mmol do composto (12) com de Pd/C 10% na quantidade de 0,05 a 0,4 mmol sob atmosfera de hidrogênio, e agitar a solução por 6 a 18 h à temperatura ambiente;

(c) Filtrar a mistura através de celite e evaporar o solvente sob pressão reduzida;

**d)** Purificar o resíduo bruto por coluna cromatográfica utilizando  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9,5:0,5 v/v em volume de 100 a 500 mL e obter o composto (17).

**48.** Os usos pretendidos dos compostos são como inibidores de enzimas da família das NTPDases e para produzir medicamentos para o tratamento de doenças infecciosas negligenciadas causadas por *T. cruzi* e Leishmania.

**49.** A presente tecnologia pode ser mais bem compreendida através dos exemplos a seguir, que apresentam formas de concretização não limitantes da mesma.

#### **EXEMPLO 1 - Síntese da 1,2,3,4,6-penta-O-acetil-L-glicopiranosose (7)**

**50.** Uma suspensão do L-glicose (6) (1,0 g; 5,5 mmol) em anidrido acético (5 mL) foi tratada com iodo (0,05 g, 0,47 mmol) e agitada à temperatura ambiente. Após duas horas de agitação, a mistura reacional adotou uma coloração castanha escura que foi diluída em diclorometano e extraída com solução de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ , 5% e gelo picado. A fase orgânica foi separada e seca com sulfato de sódio anidro e concentrada em rotaevaporador sob pressão reduzida, fornecendo a glicose *per*- acetilada (7) em rendimento quantitativo (2,16 g; 5,5 mmol) como um óleo viscoso amarelo. Essa cristalizou quando armazenado na geladeira, sendo observado a formação de isômeros  $\alpha:\beta$  na proporção de (1.0:0.6).

**51. CCD (cromatografia em camada delgada):**  $R_f = 0,74$  (hexano/AcOEt 6:4v/v).

**52. Tf (Temperatura de Fusão):** 94,6-95,1 °C.

**53. IV (ATR)  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ :** 2925, 1738, 1648, 1592, 1218, 1034, 1020.

**54. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** ( $\alpha,\beta$ -anômeros) 6,33 ( $^1\text{H}$ , d,  $J$  6,9 Hz, H-1) 5,69 (1H, d,  $J$  15,7 Hz, H-1), 5,48 (1H, dd,  $J$  19,6 e 19,6 Hz, H-3), 5,31-5,06 (4H, m, H-4/H-2), 4,32-4,24 (2H, m,  $\text{H}_a$ -6), 4,13-4,09 (2H, m,  $\text{H}_b$ -6), 3,88-3,83 (1H, m, H-5), 2,18-2,02 (s,  $6\times\text{CH}_3$ ).

**55. RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** ( $\alpha,\beta$ -anômeros) 170,5-168,7 (C=O), 91,8 (CH), 89,1 (CH), 72,9 (CH), 72,8 (CH), 70,4 (CH), 69,9 (CH) 69,3 (CH), 68,1(CH), 67,9 (CH), 61,6 (CH), 20,8-20,4 (C(O)CH<sub>3</sub>).

**56. Espectro de massas de ionização por eletropulverização HRMS (ESI<sup>+</sup>)** calculado para  $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{O}_9$  ( $\text{M}^+\text{OAc}$ )<sup>+</sup> 331,1029, encontrado 331,1033.

#### **EXEMPLO 2 - Síntese do Brometo de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -L-glicopiranosila (5)**

**57.** Uma solução da mistura dos anômeros  $\alpha:\beta$  penta-O-acetil-L-glicopiranosose (7) (2,16 g; 5,5 mmol) em ácido acético glacial (11,42 mL) foi resfriada em banho de gelo e em seguida adicionou-se lentamente a solução de HBr em 30% de ácido acético m/v (9,12 mL). A

solução foi agitada por 3 horas à temperatura ambiente e armazenada na geladeira por 12 h. A mistura reacional foi diluída com diclorometano (50 mL) e vertida em mistura de gelo picado e água. A fase aquosa foi separada e extraída com diclorometano (3x 50 mL). As frações orgânicas reunidas foram lavadas com solução resfriada a 0 °C de NaHCO<sub>3</sub> 5%, secas com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e concentradas sob pressão reduzida, resultando em um óleo amarelado viscoso. Este óleo foi cristalizado a partir da mistura de éter etílico e éter de petróleo (1:1) deixando-o em repouso na geladeira por 24 h. O produto (**5**) foi obtido como cristais brancos em forma de agulhas (1,76 g; 4,3 mmol) com 78% de rendimento.

**58. CCD (cromatografia em camada delgada):**  $R_f = 0,62$  (hexano/AcOEt 6:4v/v).

**59. Tf (Temperatura de Fusão):** 86,6-87,3 °C.

**60. Rotação específica (alfa-D) [ $\alpha$ ]<sub>D</sub>** -96,6 ( $c$  10,2 x 10<sup>-3</sup>, CH<sub>3</sub>OH).

**61. IV (ATR)  $\nu_{max}/cm^{-1}$ :** 2964, 1738, 1362, 1241, 1204, 1037, 668.

**62. RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  6,61 (1H, d,  $J$  3, Hz, H-1), 5,56 (1H, dd,  $J$  9,7, 9,7 Hz, H-3) 5,16 (1H, dd,  $J$  9,6, 9,6 Hz, H-4), 4,84 (1H, dd,  $J$  10,0, 3,7 Hz, H-2), 4,33 (1H, d,  $J$  11,6 Hz, H-6), 4,29 (1H, ls, H-5), 4,13 (1H, d,  $J$  11,6 Hz, H-6), 2,10 (6H, ls, CH<sub>3</sub>), 2,06 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 2,04 (3H, s, CH<sub>3</sub>).

**63. RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  170,6 (C=O), 169,8 (C=O), 169,8 (C=O), 169,4 (C=O), 86,6 (C-1), 72,2 (C-3), 70,6 (C-2), 70,2 (C-5), 67,2 (C-4), 61,0 (C-6), 20,6 (CH<sub>3</sub>), 20,6 (CH<sub>3</sub>), 20,6 (CH<sub>3</sub>), 20,5 (CH<sub>3</sub>).

**64. Espectro de massas de ionização por eletropulverização HRMS (ESI<sup>+</sup>)**

calculado para C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>O<sub>9</sub> (M<sup>+</sup>Br)<sup>+</sup> 331,1029, encontrado 331,1030.

**EXEMPLO 3 - Síntese do 7-(Benziloxi)-2-(3,4-bis(benziloxi)fenil)-3,5- dihidroxi-4H-cromen-4-ona (9) e 7-(Benziloxi)-2-(4-benziloxi-3-hidroxi- fenil)-3,5-dihidroxi-4H-cromen-4-ona (10)**

**65.** A mistura da rutina (**8**) (2,44 g, 4,0 mmol) e K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> seco (1,83 g, 10 mmol) em DMF anidro (20 mL) foi agitada sob atmosfera de nitrogênio a temperatura ambiente por 0,5 h até dissolução dos reagentes. A seguir, adicionou-se brometo de benzila (1,6 mL, 13,4 mmol). Após agitação por 24 h a 60 °C, a mistura foi acidificada até pH 5,0 com ácido acético 10% (20 mL) e deixado em repouso por 24 h, à temperatura ambiente. O precipitado amarelo resultante foi coletado, lavado com água destilada (25 mL) e colocado no rotaevaporador sob pressão reduzida para remoção de traços de água. O resíduo bruto foi dissolvido em etanol (60 mL) e tratado com HCl concentrado (9 mL), adicionado em pequenas porções e agitado por 3 h

a 70 °C. A mistura foi resfriada a temperatura ambiente e deixada em repouso por 24 h. O precipitado amarelo formado foi coletado, lavado e filtrado com água destilada gelada. O resíduo bruto foi purificado em coluna cromatográfica com hexano/AcOEt (8:2) para produzir os compostos tri- e di- benzilado (**9**) e (**10**) em 74% e 6% de rendimento, respectivamente.

**Dados do 7-(Benziloxi)-2-(3,4-bis(benziloxi)fenil)-3,5-dihidroxi-4H-cromen-4-ona (9)**

**66. CCD (cromatografia em camada delgada):**  $R_f = 0,85$  (hexano/AcOEt 6:4v/v).

**67. Tf (Temperatura de Fusão)=** 191,8-194,0 °C.

**68. IV (ATR)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ :** 3288, 3064, 3029, 2928, 2871, 1650, 1615, 1592, 1504, 1323, 1165, 1119, 747, 693.

**69. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$ :** 12,44 (1H, s, OH), 9,69 (1H, s, OH), 7,91 (1H, d,  $J$  1,7 Hz, H-Ar), 7,86 (1H, dd,  $J$  8,8 e 1,6 Hz, H-Ar), 7,53-7,25 (15H, m, H-Ar), 7,26 (1H, d,  $J$  8,8 Hz, H-Ar), 6,84 (1H, d,  $J$  1,8 Hz, H-Ar), 6,45 (1H, d,  $J$  1,9 Hz, H-Ar), 5,25 (2H, s, CH<sub>2</sub>Ph), 5,24 (2H, s, CH<sub>2</sub>Ph), 5,22 (2H, s, CH<sub>2</sub>Ph).

**70. RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$ :** 176,54 (C=O), 164,46 (C<sub>O</sub>), 160,91 (C<sub>O</sub>), 156,45 (C<sub>O</sub>), 150,50 (C<sub>O</sub>), 148,25 (C<sub>O</sub>), 146,76 (C<sub>O</sub>), 137,47 (C<sub>O</sub>), 137,28 (C<sub>O</sub>), 137,11 (C<sub>O</sub>), 136,60 (C<sub>O</sub>), 129,00 (CH), 128,90 (CH), 128,60 (CH), 128,37 (CH), 128,31 (CH), 128,28 (CH), 128,10 (CH), 124,06 (C<sub>O</sub>), 122,45 (CH), 114,22 (CH), 104,65 (C<sub>O</sub>), 98,44 (CH), 93,48 (CH), 71,00 (CH<sub>2</sub>), 70,47 (CH<sub>2</sub>), 70,41 (CH<sub>2</sub>).

**71. Espectro de massas de ionização por eletropulverização HRMS (ESI<sup>+</sup>)** calculado para C<sub>36</sub>H<sub>29</sub>O<sub>7</sub> (M+H)<sup>+</sup> 573,1913, encontrado 573,1901.

**Dados do 7-(Benziloxi)-2-(4-benziloxi-3-hidroxi-fenil)-3,5-dihidroxi-4H-cromen-4-ona (10).**

**72. CCD (cromatografia em camada delgada):**  $R_f$  0,80 (hexano/AcOEt 6:4v/v).

**73. Tf (Temperatura de Fusão) =** 190,1-191,9 °C.

**74. EXEMPLO 4 - Síntese do ácido acético 3,5-diacetoxi-2-acetoximetil-6-[7-benziloxi-2-(3,4-bis-benziloxi-fenil)-5-hidroxi-4-oxo-4H-cromen-3-iloxi]- tetrahidropiran-4-il éster (12)**

**IV (ATR)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ :** 3288, 3064, 3029, 2928, 2871, 1650, 1615, 1592, 1504, 747, 693.

**75. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$ :** 12,45 (1H, s, OH), 9,58 (1H, s, OH), 9,42 (1H, s, OH), 7,76 (1H, d,  $J$  1,6 Hz, H-Ar), 7,63 (1H, dd,  $J$  8,8 e 1,6 Hz, H-Ar), 7,52-7,31 (10H, m, H-Ar), 7,16 (1H, d,  $J$  8,7 Hz, H-Ar), 6,78 (1H, d,  $J$  1,5 Hz, H-Ar), 6,42 (1H, d,  $J$  1,5 Hz, H-Ar), 5,22 (2H, s, CH<sub>2</sub>Ph), 5,21 (2H, s, CH<sub>2</sub>Ph).

**76. RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$ :** 176,5 (C=O), 164,4 (C<sub>O</sub>), 160,9 (C<sub>O</sub>),

156,5 (C<sub>o</sub>), 148,8 (C<sub>o</sub>), 147,2 (C<sub>o</sub>), 147,1 (C<sub>o</sub>), 137,4 (C<sub>o</sub>), 137,0 (C<sub>o</sub>), 136,6 (C<sub>o</sub>), 129,0 (CH), 128,8 (CH), 128,6 (CH), 128,3 (CH), 128,2 (CH), 124,1 (C<sub>o</sub>), 120,1 (CH), 115,6 (CH), 114,1 (CH), 104,7 (C<sub>o</sub>), 98,5 (CH), 93,3 (CH), 70,4 (CH<sub>2</sub>), 70,2 (CH<sub>2</sub>).

**77. Espectro de massas de ionização por eletropulverização HRMS (ESI<sup>+</sup>)** calculado para C<sub>29</sub>H<sub>22</sub>O<sub>7</sub> (M+H)<sup>+</sup> 483,1444, encontrado 483,1439.

**78.** A mistura da aglicona (**9**) (573 mg, 1,0 mmol), brometo 2,3,4,6-tetra-*O*- acetil- $\alpha$ -L-glicopiranosila (**5**) (452 mg, 1,1 mmol) e K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anidro (304 mg, 2,2 mmol) em DMF (10 mL) foi agitada sob atmosfera de nitrogênio à temperatura ambiente por 48 h. A seguir, adicionou-se água destilada (30 mL) e solução aquosa gelada de HCl 15% (30 mL), e extraiu-se com acetato de etila (3x 50 mL). A fase orgânica foi lavada com solução saturada de NaHCO<sub>3</sub>, solução saturada de NaCl, seca com sulfato de sódio anidro e evaporada sob pressão reduzida. O resíduo bruto foi purificado em coluna cromatográfica com hexano/AcOEt 30% e 40%, fornecendo o glicosídeo (**12**) (744,4 mg, 0,827 mmol, 84% de rendimento) como um óleo amarelo claro.

**79. Rotação específica (alfa-D) [ $\alpha$ ]D** -12,5° (*c* 8x10<sup>-4</sup>, MeOH).

**80. CCD (cromatografia em camada delgada):** R<sub>f</sub>= 0,80 (hexano/AcOEt 1:1v/v).

**81. IV (ATR)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ :** 3461, 3032, 2922, 2853, 1742, 1656, 1598, 1367, 1205, 1165, 1031, 909, 807, 737, 696.

**82. RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ :** 12,40 (1H, s, OH), 7,75 (1H, d, *J* 2,0 Hz, H-Ar), 7,63 (1H, dd, *J* 8,4 e 2,0 Hz, H-Ar), 7,54 (2H, d, *J* 7,2 Hz, H-Ar), 7,46 (2H, d, *J* 7,2 Hz, H-Ar), 7,40-7,29 (11H, m, H-Ar), 6,98 (1H, d, *J* 8,7 Hz, H-Ar), 6,40 (1H, d, *J* 2,1 Hz, H-Ar), 6,34 (1H, d, *J* 2,0 Hz, H-Ar), 5,64 (1H, d, *J* 8,0 Hz, CH), 5,33-5,05 (9H, m, 3xCH<sub>2</sub>Ph e 3xCH), 4,03-3,94 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 3,69 (1H, td, *J* 10,0 e 3,0 Hz, CH), 2,12 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 2,02 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1,99 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1,81(3H, s, CH<sub>3</sub>).

**83. RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ :** 177,3 (C=O), 170,2 (C=O), 169,8 (C=O), 169,7 (C=O), 169,3 (C=O), 164,4 (C<sub>o</sub>), 161,7 (C<sub>o</sub>), 157,2 (C<sub>o</sub>), 156,4 (C<sub>o</sub>), 151,3 (C<sub>o</sub>), 148,0 (C<sub>o</sub>), 137,0 (C<sub>o</sub>), 136,6 (C<sub>o</sub>), 135,6 (C<sub>o</sub>), 133,7 (C<sub>o</sub>), 128,6 (CH), 128,5 (CH), 128,4 (CH), 128,2 (CH), 127,8 (CH), 127,7 (CH), 127,3 (CH), 127,2 (CH), 127,0 (CH), 123,1 (CH), 123,0 (C<sub>o</sub>), 115,7 (CH), 113,3 (CH), 105,7 (C<sub>o</sub>), 99,1 (CH), 98,5 (CH), 93,0 (CH), 72,6 (CH), 71,6 (CH), 71,4 (CH), 71,2 (CH<sub>2</sub>), 70,7 (CH<sub>2</sub>), 70,3 (CH<sub>2</sub>), 68,3 (CH), 61,3 (CH<sub>2</sub>), 20,7 (CH<sub>3</sub>), 20,4 (CH<sub>3</sub>), 20,4 (CH<sub>3</sub>), 20,2 (CH<sub>3</sub>).

**84. Espectro de massas de ionização por eletropulverização HRMS (ESI<sup>+</sup>)**

calculado para  $[M+H \square \text{Ac-glucose}]^+$  C<sub>36</sub>H<sub>29</sub>O<sub>7</sub> 573,1913, encontrado 573,1907.

**EXEMPLO 5 - Síntese do ácido acético 4,5-diacetoxi-2-acetoximetil-6-[5,7- bis-benziloxi-2-(3,4-bis-benziloxi-fenil)-4-oxo-4H-cromen-3-iloxi]-tetrahidro-piran-3-ilmetil éster (14)**

**85.** A uma mistura do glicosídeo (**12**) (463 mg, 0,51 mmol, podendo variar de 0,2 a 0,9 mmol) e K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (284 mg, 2,05 mmol, podendo variar de 1 a 8 mmol) em 3 mL (podendo variar de 1 a 10 mL) de dimetilformamida (DMF) anidro, adicionou-se brometo de benzila (235 µL, 2,05 mmol, podendo variar de 1 a 4 mmol) e mantida sob agitação a 60 °C por 48 h (podendo variar de 40 a 80°C por 24 a 72 h) sob atmosfera de argônio. A seguir, adicionou-se água destilada (30 mL, podendo variar de 20 a 40 mL) e solução gelada de 5 a 20 mL de HCl 15% e a mesma foi extraída com acetato de etila (3x 50 mL). A fase orgânica foi lavada com solução saturada de NaHCO<sub>3</sub>, solução saturada de cloreto de sódio e seca com sulfato de sódio anidro. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida. O resíduo bruto foi purificado em coluna cromatográfica empregando misturas de hexano/acetato de etila 30% e 40% v/v, fornecendo o glicosídeo todo benzilado (744,4 mg, 0,827 mmol, 84% de rendimento) como um sólido amarelo. Fórmula empírica: C<sub>57</sub>H<sub>52</sub>O<sub>16</sub>, massa molar 992,325 g/mol.

**86. Rotação específica (alfa-D) [α]<sub>D</sub>: +25° (c 1,1, CHCl<sub>3</sub>).**

**87. CCD (cromatografia em camada delgada): R<sub>f</sub> = 0,60 (hexano/AcOEt 1:1v/v)**

**88. Tf (Temperatura de Fusão) = 75,5-76,6 °C.**

**89. IV (ATR) ν<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup>: 3030, 1749, 1629, 1602, 1208, 1030, 737, 695.**

**90. RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 7,77 (1H, d, *J* 2,0 Hz, H-Ar), 7,61 (1H, dd, *J* 8,8 e 2,0 Hz, H-Ar), 7,57 (2H, d, *J* 7,6 Hz, H-Ar), 7,55 (2H, d, *J* 7,6 Hz, H-Ar), 7,46 (2H, d, *J* 7,2 Hz, H-Ar), 7,40-7,28 (14H, m, H-Ar), 6,97 (1H, d, *J* 8,7 Hz, H-Ar), 6,48 (1H, d, *J* 2,2 Hz, H-Ar), 6,42 (1H, d, *J* 2,2 Hz, H-Ar), 5,77 (1H, d, *J* 7,8 Hz, CH), 5,32-5,01 (11H, m, 4CH<sub>2</sub>Ph e 3CH), 4,0 (1H, dd, *J* 12,2 e 3,8 Hz, CH<sub>2</sub>), 3,93 (1H, dd, *J* 12,3 e 2,4 Hz, CH<sub>2</sub>), 3,59 (1H, d, *J* 10 e 3 Hz, CH), 2,11 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 2,01 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1,98 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1,79 (3H, s, CH<sub>3</sub>).

**91. RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 172,4 (C=O), 170,2 (C=O), 169,8 (C=O),

169,8 (C=O), 169,3 (C=O), 162,7 (C<sub>o</sub>), 159,5 (C<sub>o</sub>), 158,4 (C<sub>o</sub>), 154,1 (C<sub>o</sub>), 150,7 (C<sub>o</sub>), 148,0 (C<sub>o</sub>), 137,1 (C<sub>o</sub>), 136,7 (C<sub>o</sub>), 136,2 (C<sub>o</sub>), 135,7 (C<sub>o</sub>), 135,5 (C<sub>o</sub>), 128,6-126,5 (12CH), 123,4 (C<sub>o</sub>), 122,6 (CH), 115,6 (CH), 113,3 (CH), 109,6 (C<sub>o</sub>), 98,7 (CH), 97,9 (CH), 93,6 (CH), 72,7 (CH), 71,6 (CH), 71,4 (CH), 71,2 (CH<sub>2</sub>), 70,6 (CH<sub>2</sub>), 70,6 (CH<sub>2</sub>), 70,3 (CH<sub>2</sub>), 68,3 (CH), 61,2 (CH<sub>2</sub>), 20,7 (CH<sub>3</sub>), 20,4 (CH<sub>3</sub>), 20,4 (CH<sub>3</sub>), 20,2 (CH<sub>3</sub>).

**92. Espectro de massas de ionização por eletropulverização HRMS (ESI<sup>+</sup>)**

calculado para [M+H–Ac-glicose]<sup>+</sup> C<sub>43</sub>H<sub>35</sub>O<sub>7</sub> 663,2383, encontrado 663,2380.

**EXEMPLO 6 - Síntese do ácido acético 4,5-diacetoxi-6-acetoximetil-2-[2-(3,4- dimetoxi-fenil)-5,7-dimetoxi-4-oxo-4H-cromen-3-iloxi]-tetrahidro-piran-3-il éster (15)**

**93.** A uma mistura do glicosídeo (**12**) (463 mg, 0,51 mmol, podendo variar de 0,3 a 1 mmol) e K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (284 mg, 2,05 mmol, podendo variar de 1 a 8 mmol) em 3 mL (podendo variar de 1 a 10 mL) de dimetilformamida (DMF) anidro adicionou-se iodometano (128 µL, 2,05 mmol, podendo variar de 1 a 8 mmol) e mantida sob agitação a 60 °C por 48 h (podendo variar de 40 a 80°C por 24 a 72 h) sob atmosfera de argônio. A seguir, adicionou-se água destilada (30 mL) e solução gelada de 5 a 20 mL de HCl 15% e a mesma foi extraída com acetato de etila (3x 50 mL). A fase orgânica foi lavada com solução saturada de NaHCO<sub>3</sub>, solução saturada de cloreto de sódio e seca com sulfato de sódio anidro. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida. O resíduo bruto foi purificado em coluna cromatográfica empregando misturas de hexano/acetato de etila 30 e 40% v/v (podendo variar de 15 a 35% e 36 a 50%), fornecendo o glicosídeo todo metoxilado (298,5 mg, 0,43 mmol, 85% de rendimento) como um sólido branco. Fórmula empírica: C<sub>33</sub>H<sub>36</sub>O<sub>16</sub>, massa molar 688,64 g/mol.

**94. CCD (cromatografia em camada delgada):** R<sub>f</sub> 0,3 (hexano/AcOEt 3:7).

**95. Tf (Temperatura de Fusão)=** 185,4-186,3 °C.

**96. IV (ATR) ν<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup>:** 3102, 2959, 2842, 1747, 1626, 1605, 1423, 1208, 1066, 1034, 827.

**97. RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** □□ 7,75 (1H, d, *J* 1,5 Hz, H-Ar), 7,64 (1H, d, *J* 8,5, 1,6 Hz, H-Ar), 6,95 (1H, d, *J* 8,6 Hz, H-Ar), 6,51 (1H, d, *J* 1,8 Hz, H- Ar), 6,35 (1H, d, *J* 1,8 Hz, H-Ar), 5,80 (1H, d, *J* 7,7 Hz, CH), 5,30-5,17 (2H, m, CH), 5,07 (1H, t, *J* 9,5 Hz,

CH), 4,06-3,85 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 4,03 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3,96 (6H, s, xOCH<sub>3</sub>), 3,90 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3,66-3,64 (1H, m, CH), 2,11 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 2,01 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 2,0 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1,88 (3H, s, CH<sub>3</sub>).

**98. RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** □ □ 173,2 (C=O), 170,5 (C=O), 170,2 (C=O), 170,1 (C=O), 169,7 (C=O), 164,3 (C<sub>O</sub>), 161,2 (C<sub>O</sub>), 159,0 (C<sub>O</sub>), 154,8 (C<sub>O</sub>), 151,2 (C<sub>O</sub>), 148,6 (C<sub>O</sub>), 135,8 (C<sub>O</sub>), 123,3 (C<sub>O</sub>), 122,2 (CH), 112,6 (CH), 110,7 (CH), 109,4 (C<sub>O</sub>), 98,8 (CH), 96,2 (CH), 92,7 (CH), 73,0 (CH), 71,8 (CH), 71,8 (CH), 68,6 (CH), 61,5 (CH<sub>2</sub>), 56,6 (OCH<sub>3</sub>), 56,4 (OCH<sub>3</sub>), 56,1 (OCH<sub>3</sub>), 56,0 (OCH<sub>3</sub>), 21,1 (CH<sub>3</sub>), 20,8 (2xCH<sub>3</sub>), 20,6 (CH<sub>3</sub>).

**99. Espectro de massas de ionização por eletropulverização HRMS (ESI<sup>+</sup>)**

calculado para [M+H]<sup>+</sup> C<sub>33</sub>H<sub>37</sub>O<sub>16</sub> 689,2082, encontrado 689,2066.

**EXEMPLO 7 - Síntese do 5,7-bis(Benziloxi)-2-(3,4-bis(benziloxi)fenil)-3-(((2R,3S,4R,5R,6S)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahydro-2H-piran-2-il)oxi)-4H-cromen-4-ona (16)**

**100.** A um balão contendo o ácido acético 4,5-diacetoxi-2-acetoximetil-6-[5,7-bis-benziloxi-2-(3,4-bis-benziloxi-fenil)-4-oxo-4H-cromen-3-iloxi]-tetrahydro-piran-3-ilmetil éster (**14**) (365 mg, 0,37 mmol, podendo variar de 0,1 a 0,7 mmol) em metanol anidro (4 mL, podendo variar de 1 a 10 mL) agitado a 0 °C, sob atmosfera de argônio, adicionou-se uma solução metanólica de NaOMe (5 mL, podendo variar de 1 a 10 mL) (preparado *in situ* a partir de Na metálico, 24 mg em metanol anidro, 5 mL). Posteriormente, removeu-se o banho de gelo e a agitação foi mantida por 2 h (podendo variar de 1 a 3 h). A seguir, adicionou-se THF anidro (9 mL, podendo variar de 5 a 15 mL) e agitou-se por mais 1 h (podendo variar de 0,5 a 2 h). Então, adicionou-se amberlite IRA-120 (resina catiônica) aos poucos até pH 6. O resíduo bruto foi filtrado sob Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, concentrado sob pressão reduzida e purificado em coluna cromatográfica com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9,5:0,5 v/v (200 a 400 mL) produzindo (**16**) (242 mg 0,29 mmol) como um sólido amarelo com 80% de rendimento. Fórmula empírica: C<sub>49</sub>H<sub>44</sub>O<sub>12</sub>, massa molar 824,86g/mol.

**101. CCD (cromatografia em camada delgada):** R<sub>f</sub> = 0,4 (AcOEt 100%).

**102. Tf (Temperatura de Fusão)=** 174,1-174,8 °C.

**103. Rotação específica (alfa-D)  $[\alpha]_D$ : +120° ( $c$  5x10<sup>-3</sup>, MeOH).**

**104. IV (ATR)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ :** 3404, 3244, 2919, 1628, 1599, 1272, 1195, 1059, 1008, 730, 693.

**105. RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ :** 8,18 (1H, d,  $J$  1,5 Hz, H-Ar), 7,67 (1H, dd,  $J$  8,6 e 1,6 Hz, H-Ar), 7,62-7,31 (20H, m, H-Ar), 7,21 (1H, d,  $J$  8,7 Hz, H-Ar), 6,90 (1H, d,  $J$  1,6 Hz, H-Ar), 6,71 (1H, d,  $J$  1,6 Hz, H-Ar), 5,53 (1H, d,  $J$  7 Hz, CH), 5,33-5,12 (2H, m, CH), 5,24 (8H, sl, 4CH<sub>2</sub>Ph), 4,45 (1H, br, OH), 3,62-3,16 (4H, m, CH), 1,22 (3H, sl, 3OH).

**106. RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ :** 172,3 (C=O), 137,1 (C<sub>O</sub>), 137,0 (C<sub>O</sub>), 136,7 (C<sub>O</sub>), 136,1 (C<sub>O</sub>), 136,0 (C<sub>O</sub>), 128,6-127,0 (12CH), 123,2 (C<sub>O</sub>), 121,9 (CH), 115,1 (CH), 113,6 (CH), 108,8 (C<sub>O</sub>), 101,2 (CH), 98,1 (CH), 94,2 (CH), 77,4 (CH), 76,6 (CH), 74,5 (CH), 70,5 (CH<sub>2</sub>), 70,1 (2CH<sub>2</sub>), 70,0 (CH<sub>2</sub>), 69,9 (CH), 60,6(CH<sub>2</sub>).

**107. Espectro de massas de ionização por eletropulverização HRMS (ESI<sup>+</sup>)**

calculado para  $[M+H]^+$  C<sub>49</sub>H<sub>45</sub>O<sub>12</sub> 825,2911, encontrado 825,2865.

**EXEMPLO 8 - Síntese do (2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*R*)-2-(acetoximetil)-6-((2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-4-oxo-4*H*-cromen-3-il)oxi)tetrahidro-2*H*-piran- 3,4,5-triiltriacetato (17)**

**108.** O glicosídeo (12) (100 mg, 0,11 mmol, podendo variar de 0,2 a 0,7 mmol) foi dissolvido em etanol (10 mL, podendo variar de 5 a 12 mL), tratado com Pd/C 10% (20 mg, podendo variar de 0,05 a 0,4 mmol) sob atmosfera de hidrogênio e a solução foi agitada por 8 h (podendo variar de 6 a 8 h) à temperatura ambiente. A mistura foi filtrada através de celite e o solvente evaporado sob pressão reduzida. O resíduo bruto foi purificado por coluna cromatográfica utilizando com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9,5:0,5 v/v (100 a 500 mL) produzindo (17) (55,7 mg, 0,088 mmol) como um sólido amarelo com 80% de rendimento. Fórmula empírica: C<sub>29</sub>H<sub>28</sub>O<sub>16</sub>, massa molar 632,53 g/mol.

**109. CCD (cromatografia em camada delgada):**  $R_f$  = 0,3 (AcOEt 100%).

**110. T<sub>f</sub> (Temperatura de Fusão)** = 150,1-153,8 °C.

**111. IV (ATR)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ :** 3102, 2959, 2842, 1747, 1626, 1605, 1423, 1208, 1066, 1034, 827.

**112. RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ :** 7,71 (1H, d,  $J$  1,8 Hz, H-Ar), 7,57 (1H, dd,  $J$

8,5 e 1,9 Hz, H-Ar), 6,86 (1H, d, *J* 8,5 Hz, H-Ar), 6,36 (1H, s, H-Ar), 6,18 (1H, d, *J* 1,5 Hz, H-Ar), 5,80 (1H, d, *J* 7,7 Hz, CH), 5,30-5,17 (2H, m, CH), 5,07 (1H, t, *J* 9,5 Hz, CH), 4,06-3,85 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 3,66-3,64 (1H, m, CH), 2,11 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 2,01 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 2,0 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1,88 (3H, s, CH<sub>3</sub>).

**113. RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ:** 173,2 (C=O), 170,5 (C=O), 170,2 (C=O), 170,1 (C=O), 169,7 (C=O), 164,3 (C<sub>O</sub>), 161,2 (C<sub>O</sub>), 159,0 (C<sub>O</sub>), 154,8 (C<sub>O</sub>), 151,2 (C<sub>O</sub>), 148,6 (C<sub>O</sub>), 135,8 (C<sub>O</sub>), 123,3 (C<sub>O</sub>), 122,2 (CH), 112,6 (CH), 110,7 (CH), 109,4 (C<sub>O</sub>), 98,8 (CH), 96,2 (CH), 92,7 (CH), 73,0 (CH), 71,8 (CH), 71,8 (CH), 68,6 (CH), 61,5 (CH<sub>2</sub>), 21,1 (CH<sub>3</sub>), 20,8 (2xCH<sub>3</sub>), 20,6 (CH<sub>3</sub>).

**114. Espectro de massas de ionização por eletropulverização HRMS (ESI<sup>+</sup>)** calculado para C<sub>29</sub>H<sub>28</sub>O<sub>16</sub> (M+H)<sup>+</sup> 632,1377, encontrado 632,1375.

**EXEMPLO 9 - Síntese do 2-(3,4-Dimetoxi-fenil)-5,7-dimetoxi-3-(3,4,5-trihidroxi-6-hidroxi-metil-tetra-hidro-piran-2-iloxi)-cromen-4-ona (4)**

**115.** Pesou-se (200 mg, 0,29 mmol, podendo variar de 0,1 a 0,8 mmol) do composto ácido acético 4,5-diacetoxi-6-acetoximetil-2-[2-(3,4-dimetoxi-fenil)-5,7-dimetoxi-4-oxo-4H-cromen-3-iloxi]-tetra-hidro-piran-3-il éster (**15**) e diluiu-se em 3,1 mL de metanol anidro, podendo variar de 2 a 8 mL, em agitação sob banho de gelo e sob atmosfera de argônio. Adicionou 4,5 mL de uma solução metanólica de NaOMe, podendo variar de 2 a 10 mL, e removeu o banho de gelo e agitou por 2 h (podendo variar de 1 a 4 h). Adicionou-se 7 mL (podendo variar de 5 a 15 mL) de THF anidro e agitou-se por 1 h (podendo variar de 0,5 a 3 h), adicionando a resina catiônica até pH 6. O resíduo bruto foi filtrado sob Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, e concentrado sob pressão reduzida. Purificou o resíduo da etapa anterior em coluna cromatográfica com 200 a 400 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9,5:0,5 v/v e obteve-se o composto 5,7,4',5'-tetrametil-quercetin-3-*O*-β-L-glicosídeo (**4**).

**116. CCD (cromatografia em camada delgada):** R<sub>f</sub> 0,4 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 8:2v/v).

**117. Tf (Temperatura de Fusão):** 176,2-177,5 °C.

**118. IV (ATR) ν<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup>:** 3242, 2919, 2850, 1731, 1600, 1459, 1253, 1210, 1148, 1007, 810, 768.

**119. RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)** □□ 7,96 (1H, s, H-Ar), 7,65 (1H, d, *J* 8,4 Hz,

H-Ar), 7,08 (1H, d,  $J$  8,3 Hz, H-Ar), 6,76 (1H, s, H-Ar), 6,47 (1H, s, H-Ar), 5,43 (1H, d,  $J$  6,6 Hz, CH), 3,88 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3,84 (9H, s, 3xOCH<sub>3</sub>), 3,59 (1H, ld,  $J$  11,6 Hz, CH), 3,42-3,29 (1H m, CH), 3,28-3,22 (1H m, CH), 3,13 (2H,br, CH).

**120. RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)** □□ 172,3 (C=O), 163,9 (C<sub>O</sub>), 160,4 (C<sub>O</sub>), 158,2 (C<sub>O</sub>), 152,9 (C<sub>O</sub>), 150,7 (C<sub>O</sub>), 148,0 (C<sub>O</sub>), 136,0 (C<sub>O</sub>), 122,7 (C<sub>O</sub>), 121,4 (CH), 112,8 (CH), 111,2 (CH), 108,3 (C<sub>O</sub>), 101,4 (CH), 96,1 (CH), 93,0 (CH), 77,4 (CH), 76,7 (CH), 74,5 (CH), 69,9 (CH), 60,8 (CH<sub>2</sub>), 56,2 (OCH<sub>3</sub>), 56,1 (OCH<sub>3</sub>), 55,7 (OCH<sub>3</sub>), 55,6 (OCH<sub>3</sub>).

**121. Espectro de massas de ionização por eletropulverização HRMS (ESI<sup>+</sup>)** calculado para C<sub>25</sub>H<sub>28</sub>O<sub>12</sub> (M+H)<sup>+</sup> 521,659, encontrado 521,1657.

**EXEMPLO 10 - Síntese do 2-(3,4-Dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-3-(((2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahydro-2*H*-piran-2-il)oxi)-4*H*-cromen-4-ona (2)**

**122.** O glicosídeo (**16**) (93 mg, 0,11 mmol podendo variar de 0,1 a 0,8 mmol) foi dissolvido em etanol (10 mL, podendo variar de 5-15 mL), tratado com Pd/C 10% (20 mg, podendo variar de 0,05 a 0,4 mmol) sob atmosfera de hidrogênio e a solução foi agitada por 8 h (podendo variar de 4 a 18 h) à temperatura ambiente. A mistura foi filtrada através de celite e o solvente evaporado sob pressão reduzida. O resíduo bruto foi purificado por coluna cromatográfica utilizando resina sephadex LH-20, eluído com um sistema H<sub>2</sub>O/MeOH (1:1) v/v (100 a 400 mL) para fornecer 46 mg (90%) da *ent*-isoquercetina (**2**) como um sólido amarelo claro.

**123. CCD (cromatografia em camada delgada):**  $R_f = 0,3$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 8:2 v/v).

**124. Tf (Temperatura de Fusão) =** 168,0-168,5 °C.

**125. Rotação específica (alfa-D) [α]<sub>D</sub>:** +2,0 (*c* 0,01, MeOH).

**126. IV (ATR) ν<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup>:** 3336, 3134, 2918, 2851, 1661, 1604, 1358, 1300, 1195, 1058, 1010, 798.

**127. RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ:** 7,71 (1H, d,  $J$  1,8 Hz, H-Ar), 7,57 (1H, dd,  $J$  8,5 e 1,9 Hz, H-Ar), 6,86 (1H, d,  $J$  8,5 Hz, H-Ar), 6,36 (1H, s, H-Ar), 6,18 (1H, d,  $J$  1,5 Hz, H-Ar), 5,23 (1H, d,  $J$  7,4 Hz, CH), 3,72 (1H, dd,  $J$  11,8, 2,0 Hz, CH<sub>a</sub>), 3,58 (1H, dd,  $J$  11,9, 5,2 Hz, CH<sub>b</sub>), 3,49 (1H, t,  $J$  8,3 Hz, CH), 3,44 (1H, t,  $J$  8,7 Hz, CH), 3,36 (1H, t,  $J$  9,0 Hz, CH), 3,26 (1H, m, CH).

**128. RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ :** 179,6 (C=O), 166,2 (C<sub>o</sub>), 163,1 (C<sub>o</sub>), 159,1 (C<sub>o</sub>), 158,6 (C<sub>o</sub>), 150,0 (C<sub>o</sub>), 146,0 (C<sub>o</sub>), 135,8 (C<sub>o</sub>), 123,3 (CH), 123,2 (C<sub>o</sub>), 117,7 (CH), 116,1 (CH), 105,8 (C<sub>o</sub>), 104,6 (CH), 100,1 (CH), 94,9 (CH), 78,5(CH), 78,2 (CH), 75,9 (CH), 71,3 (CH), 62,7 (CH<sub>2</sub>).

**129. Espectro de massas de ionização por eletropulverização HRMS (ESI<sup>+</sup>)** calculado para C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub> (M+H)<sup>+</sup> 465,1033, encontrado 465,1040.

### **EXEMPLO 11 - Obtenção da NTPDase-1 de *T. cruzi* recombinante**

**130.** Para a realização dos ensaios de inibição foi feita atividade enzimática utilizando a TcNTPDase-1 recombinante. A porção solúvel da enzima (do aminoácido 37 a 600) já estava clonada em sistema bacteriano, no vetor de expressão pET21b (FIETTO, J. L. R. et al. Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 316, n. 2, p. 454–460, 2004; SANTOS, R. F. et al. Influence of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity on *Trypanosoma cruzi* infectivity and virulence. PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 3, n. 3, 2009). Esse plasmídeo possui fusão C-terminal de uma cauda de hexahistidina, o que possibilita a purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade por níquel.

**131.** Para a expressão da TcNTPDase-1, o plasmídeo recombinante foi purificado das células Top 10 (SAMBROOK, J.; GREEN, M. R. Molecular Cloning - A laboratory manual. New York: John Ingli, 4. ed. v. 33, 2012.) e as células BL21-DE3 RILL foram transformadas por choque térmico (30 minutos em gelo e 1 minuto e 30 segundos a 42 °C) em seguida as células cresceram em meio LB (Luria Bertani) por 40 minutos. O pré-inóculo foi feito em meio LB contendo ampicilina (50 µg mL<sup>-1</sup>) e cresceu *overnight* a 37 °C, 180 rpm. Houve a transferência da cultura na proporção de 1:20 para o meio SOC (Super Optimal Broth, 0,5% extrato de levedura, 2% tripitona, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub> 20 mM Glicose) para a expressão da forma insolúvel. As células cresceram até atingir a D.O600 entre 0,6-0,8. Logo após, foi adicionado 0,25 mM do indutor isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG), para indução da expressão em corpos de inclusão, na qual há um maior rendimento. A indução ocorreu durante uma hora a 30 °C. Em seguida, as culturas foram aliquoteadas em tubos Falcons de 50 mL e centrifugadas a 3500 rpm por 15 minutos. Os pelletes formados de 100 mL de cultura foram estocados a -80 °C.

**132.** A purificação da proteína foi feita em duas etapas: I- Preparação – Lavagem dos corpos de inclusão; II- Cromatografia de afinidade. Na primeira etapa, um pellet de células induzidas (*E. coli* BL21 DE3 RILL) foi suspenso em tampão de lise (50 mM Tris-Cl pH 8,0; 0,3 M NaCl) contendo inibidores de proteases, aprotinina (1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), pepstatina (1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), leupeptina (1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e lisozima (1 mg/mL) e mantido no gelo por 30 minutos. As células foram lisadas por sonicação em 6 pulsos de 10 segundos intercalados por 10 segundos de intervalo, e amplitude de 20 Hz por 1 minuto. Para a separação das frações solúvel e insolúvel, o lisado foi centrifugado a 12500 x g por 15 minutos. Em seguida, os corpos de inclusão foram lavados duas vezes com tampão de lavagem (50 mM de Tris-Cl pH 8,0; 500 mM de NaCl e 2 M de ureia) para retirar proteínas indesejadas e contaminantes. As centrifugações desta etapa foram realizadas a 12500 x g por 10 minutos. Por fim, o pellet lavado foi solubilizado em tampão desnaturante (50 mM de Tris pH 8; 300 mM de NaCl, 20 mM de imidazol e 8 M de ureia). Esse mesmo tampão foi usado para equilibrar a coluna de níquel usada na próxima etapa.

**133.** Na segunda etapa, realizou-se a cromatografia de afinidade por níquel. Para isso, foi utilizada uma coluna de cromatografia de afinidade à níquel de 1 mL acoplada a cromatografia líquida rápida de proteína. A eluição foi feita com o mesmo tampão desnaturante contendo 300 mM de imidazol. A fração eluída foi renaturada por diluição em 1:10 de tampão 50 mM de Tris, pH 8, 300 mM de NaCl e armazenada à 4 °C por 24 h antes de ser utilizada.

#### **EXEMPLO 12 - Obtenção da NTPDase-2 de *L. infantum* recombinante**

**134.** Para a realização dos ensaios de inibição foi feita atividade enzimática utilizando a LiNTPDase-2 recombinante previamente clonada por DE SOUZA, R. F. et al. Recombinant Leishmania (*Leishmania*) infantum Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase NTPDase-2 as a new antigen in canine visceral leishmaniasis diagnosis. *Acta Tropica*, v. 125, n. 1, p. 60–66, 2013. Células BL21- DE3 foram transformadas com o plasmídeo pET21b-rLiNTPDase2 por choque térmico (30 minutos em gelo e 1 minuto e 30 segundos a 42 °C) em seguida as células cresceram em meio LB (Luria Bertani) por 45 minutos. O pré-inoculo foi feito em meio LB contendo ampicilina (50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e cresceu *overnight* a 37 °C, 180 rpm. Houve a transferência da cultura na proporção de 2: 10 para 200 mL de meio LB. As células cresceram até atingir a D.O600 entre 0,6-0,8. Logo após, foi adicionado 0,2 mM do indutor

isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG), para indução da expressão em corpos de inclusão, na qual há um maior rendimento. A indução ocorreu durante uma hora a 37 °C. Logo após, as culturas foram aliqüotadas em tubos Falcons de 50 mL e centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos. Os pellets formados de 100 mL de cultura foram estocados a -80 °C.

**135.** A purificação da proteína foi feita em duas etapas: I- Preparação – Lavagem dos corpos de inclusão; II- Cromatografia de afinidade. Na primeira etapa, um pellet de células induzidas (*E. coli* BL21 DE3 RILL) foi suspenso em tampão de lise (50 mM Tris-Cl pH 8,0; 0,3 M NaCl, imidazol 10 mM) contendo inibidores de proteases, aprotinina (1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), pepstatina (1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), leupeptina (1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e lisozima (1 mg mL<sup>-1</sup>) e mantido no gelo por 30 minutos. As células foram lisadas por sonicação em 6 pulsos de 10 segundos intercalados por 10 segundos de intervalo, e amplitude de 20 Hz por 1 minuto. Para a separação das frações solúvel e insolúvel, o lisado foi centrifugado a 12500 x g por 15 minutos. Em seguida, os corpos de inclusão foram lavados duas vezes com tampão de lavagem (50 mM de Tris-Cl pH 8,0; 500 mM de NaCl;  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM e 2 M de ureia) para retirar proteínas indesejadas e contaminantes. As centrifugações desta etapa foram realizadas a 12500 x g por 10 minutos. Por fim, o pellet lavado foi solubilizado em tampão desnaturante (50 mM de Tris pH 8; 500 mM de NaCl e 8 M de ureia). Esse mesmo tampão foi usado para equilibrar a coluna de níquel usada na próxima etapa.

**136.** Na segunda etapa, realizou-se a cromatografia de afinidade por níquel. Para isso, foi utilizada uma coluna cromatográfica de afinidade à níquel de 1 mL acoplada a cromatografia líquida rápida de proteína. A eluição foi feita com o mesmo tampão desnaturante contendo 300 mM de imidazol. A fração eluída foi renaturada por diluição em 1:10 de tampão 100 mM de Tris pH 8, 600 mM de NaCl, 1 mM de GSSG (glutathiona oxidada), 2 mM GSH (glutathiona reduzida), 33% de glicerol e armazenada à 4 °C por 24 horas antes de ser utilizada.

### **EXEMPLO 13 - Obtenção da NTPDase-2 de *L. braziliensis* recombinante**

**137.** O gene da LbNTPDase-2 recombinante foi clonado sistema bacteriano no vetor de expressão pET21b (TORRES, N. DA R. Clonagem, avaliação de SNps e expressão heteróloga da ATP difosfohidrolase 2 (NTPDase 2) das cepas ET e NSL de *Leishmania (Viannia) braziliensis*. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2017). A construção foi utilizada para transformar células de *E. coli* BL21(DE3)RIL competentes para expressão da proteína. O pré-inóculo foi crescido com 50  $\mu\text{L mL}^{-1}$  de kanamicina por 12 a 16 horas. A cultura foi então

transferida para 400 mL de meio LB e crescida à 37 °C, 180 rpm até D.O. 600 entre 0,6 e 0,8.

**138.** A indução foi feita com 0,2 mM de isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) por 2 horas. Cada pellet de 400 mL de indução foi ressuscitado em 20 mL de tampão de lise (50 mM Tris; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol, pH 7,5) contendo inibidores de proteases e lisozima, aprotinina (1  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>), pepstatina (1  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>), leupeptina (1  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) e lisozima (1 mg mL<sup>-1</sup>). A ressuspensão foi mantida à 4°C por 30 minutos e sonicada em ciclos de 10 segundos por 2 minutos com amplitude de 30 Hz. O volume foi completado para 40 mL com tampão de lise e centrifugado a 11.627 g por 15 minutos e descartado o sobrenadante. O pellet foi novamente ressuscitado com 40 mL de tampão de lise e centrifugado a 11.627 xg por 15 minutos e descartado o sobrenadante. Este passo de lavagem foi repetido mais uma vez. O pellet contendo os corpos de inclusão foi ressuscitado em 40 mL de tampão de solubilização (Tris 50 mM pH 8, NaCl 500 mM, Ureia 8 M, pH 7,5) e centrifugado a 20.000 g por 20 minutos. A porção solubilizada foi filtrada em filtro 0,45  $\mu$ m.

**139.** A purificação foi feita por cromatografia de afinidade ao níquel, para isso foi utilizada uma coluna de cromatografia de afinidade à níquel de 1 mL acoplada cromatografia líquida rápida de proteína. Após aplicação da amostra, foi feita lavagem com tampão A (50 mM Tris pH 7,5; 500 mM NaCl; 10 mM imidazol), seguida de lavagem com *step* de 10% de tampão B (50 mM Tris pH 7,5; 500 mM NaCl; 300 mM imidazol). A eluição foi feita em 100% de tampão B (50 mM Tris pH 7,5; 500 mM NaCl; 300 mM imidazol). As proteínas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), dosadas por Bradford e depois diluídas 20 vezes em tampão de renaturação (100 mM Tris, 600 mM NaCl, 1 mM GSSG, 2 mM GSH and 33% glicerol) e estocadas a 4 °C. Os testes de atividade foram realizados 48 horas depois.

#### **EXEMPLO 14 - Ensaio de atividade enzimática**

**140.** Após a purificação e renaturação, a proteína obtida foi dosada pelo método de Bradford (BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. Analytical Biochemistry, v. 72, n. 1, p. 248–254, 1976). O composto (**16**), assim como os outros intermediários testados – (**2**), (**4**), (**14**), (**15**) e (**17**), foram diluídos em DMSO P.A. na concentração de 10 mM e congelados a -20 °C ao abrigo da luz para manter um estoque. Para

o uso, uma alíquota foi diluída 10 x em DMSO, concentração de uso do composto 1 mM e 100% de DMSO. Para os ensaios, a concentração final máxima na reação dos compostos foi de 100  $\mu$ M e 10% de DMSO.

**141.** Para os ensaios de inibição com a proteína recombinante, foi utilizado o método do Verde de Malaquita (EKMAN, P.; JAGER, O. Quantification of Subnanomolar Amounts of Phosphate Bound to Seryl and Threonyl Residues in Phosphoproteins Using Alkaline Hydrolysis and Malachite Green. *Analytical Biochemistry*, v. 214, n. 1, p. 138–141, 1993; TAUSSKY, H. H.; SHORR, E. A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J Biol Chem*, v. 202, n.1, p. 675–685, 1953) para medir a atividade enzimática através da dosagem de ortofosfato livre. A reação de atividade enzimática foi feita em tampão de atividade contendo 50 mM de Tris pH 8,0; 2,5 mM de  $MgCl_2$ ; 116 mM de NaCl; 5,4 mM de KCl e 2,5 mM ( $2,5 \times 10^3 \mu$ M) ou 0,1 mM de nucleotídeo, uridina difosfato (UDP) para TcNTPDase-1 e LbNTPDases-2 ou adenosina difosfato (ADP) para LiNTPDase-2, num total de 80  $\mu$ L de reação, incluindo a proteína. A reação foi disparada com 0,5  $\mu$ g de proteína e ocorreu por 10 minutos a 37 °C, até que fosse interrompida com 80  $\mu$ L de HCl 0,2 M. Logo após, foram adicionados 40  $\mu$ L de reagente colorimétrico (verde malaquita 0,2% e molibdato de amônio 10% 1:3, ambos ressuspensos em HCl 4M). A atividade foi calculada da seguinte forma: [% atividade = (nmol fosfato (Pi) x  $\mu$ g<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup> do composto) / nmol fosfato (Pi) x  $\mu$ g<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup> do controle) x 100].

**142.** As leituras foram realizadas a 650 nm em uma leitora de microplacas. Nos brancos da reação havia todos os reagentes, exceto o parasito que foi adicionado após a parada da reação por adição de ácido clorídrico. Para todos os ensaios foi feito um controle contendo todos os componentes do tampão e DMSO na mesma concentração usada nos compostos (10%).

#### **EXEMPLO 15 - Testes de toxicidade e de infecção em macrófagos Raw 264.7 por *Leishmania braziliensis in vitro* – determinação de CC50 e EC50**

**143.** Os macrófagos foram mantidos em meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, L-glutamina (2 mM) e penicilina (100  $\mu$ g/mL), pH 7,2 a 37 °C em estufa de CO<sub>2</sub>. Inicialmente, foram montadas placas de 96 poços com  $5 \times 10^4$  macrófagos/poço e estas foram incubadas a 37 °C em estufa de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Em seguida, o meio RPMI metabolizado foi substituído por meio novo e os compostos

foram adicionados para determinação da concentração citotóxica (CC50) nas seguintes concentrações: 100  $\mu$ M, 80  $\mu$ M, 40  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ M e 1  $\mu$ M. Posteriormente, as placas foram incubadas novamente a 37 °C por 48 h. O DMSO (concentração final de 0,5% e 0,1%) foi utilizado como controle negativo e a anfotericina B (0,625  $\mu$ g) foi utilizada como controle positivo. Após 48 h, foram adicionados 20  $\mu$ L de resazurina/poço e as placas incubadas por mais 1 hora a 37 °C. As placas foram então lidas em um leitor de microplacas à 570 nm e 600 nm em intervalos de 1 hora durante 3 horas. Todos os compostos e controles foram testados em quadruplicata interna e pelo menos três experimentos independentes foram realizados. O GraphPad Prism versão 5.03 foi usado para determinação de CC50.

**144.** Para os testes de infecção *in vitro* foram montadas placas de 96 poços com macrófagos seguindo o mesmo protocolo descrito anteriormente. A quantidade de macrófagos por poço nas placas foi de  $1 \times 10^5$  células. Após a montagem das placas, estas foram incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Posteriormente, foi feita a infecção dos macrófagos com formas promastigotas enriquecidas em formas metacíclicas de *L. braziliensis* M2904, na proporção de 15 *Leishmania* para um macrófago (15:1). Após a infecção, as placas foram incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> por mais 24 horas. Após esse tempo, as placas foram lavadas 3x com RPMI base (sem adição de antibióticos e L-glutamina), pH 7,2, foram adicionados 200  $\mu$ L de RPMI completo por poço nas placas e estas foram incubadas por mais 24 horas em estufa de CO<sub>2</sub>. Passadas as 24 horas, o meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) completo metabolizado foi substituído por meio novo e foram adicionados os compostos para determinação da concentração efetiva (EC50) nas seguintes concentrações: 100  $\mu$ M, 80  $\mu$ M, 40  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ M e 1  $\mu$ M. O DMSO (0,5% e 0,1%) foi utilizado como controle negativo e a anfotericina B (250  $\mu$ g/mL), como controle positivo. Todos os compostos e controles foram testados em quadruplicata interna e pelo menos 3 experimentos independentes foram realizados. Posteriormente à adição dos compostos e dos controles, as placas foram incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> por 48 horas.

**145.** Seguindo-se às 48 horas, as placas foram retiradas da estufa e lavadas 3x com RPMI base (sem adição de antibióticos e L-glutamina), pH 7,2. Posteriormente, foram adicionados 50  $\mu$ L por poço da solução de lise (RPMI base acrescido de detergente dodecil sulfato de sódio 0,05%) e as placas foram deixadas por cerca de 15-30 minutos em temperatura ambiente. Após esse tempo, foram adicionados 150  $\mu$ L de meio de cultura Grace completo por poço nas placas e estas foram vedadas com filme para vedação e incubadas em estufa de Demanda

Bioquímica de Oxigênio (B.O.D) a 25 °C por pelo menos 4 dias, até a completa transformação das formas amastigotas do parasito em promastigotas.

**146.** Após esse tempo, as placas foram retiradas da estufa e em cada poço foram adicionados 20 µL de resazurina, sendo as placas incubadas novamente em estufa de CO<sub>2</sub> por mais 1 hora. Posteriormente, as placas foram lidas em leitora de microplaca em 570 nm e 600 nm. A porcentagem de redução da resazurina foi calculada e os valores foram analisados pelo GraphPad Prism versão 5.03 que foi usado para determinação de EC<sub>50</sub>.

#### **EXEMPLO 16 - Ensaios de inibição da TcNTPDase-1 recombinante**

**147.** Como o composto (**2**) é um derivado glicosídico não natural da quercetina (*ent*-isoquercetina), também foi usado nos ensaios a quercetina comercial e a miquelianina, um derivado glicosídico natural da quercetina (isoquercetina). Os ensaios foram feitos usando a TcNTPDase-1 recombinante, em microplacas de 96 poços, usando o nucleotídeo uridina difosfato (UDP) como substrato e todas as reações foram feitas em triplicata. A estrutura de todos os compostos encontra-sena Figura 1.

**148.** Os ensaios de inibição foram feitos utilizando duas concentrações de substrato: 0,1 mM de UDP, mesma concentração usada de compostos, e 2,5 mM de UDP, concentração 25 vezes maior que a dos compostos (100 µM). Na Figura 2, pelo gráfico de atividade UDPásica, podemos observar os resultados dos ensaios, na condição de maior concentração de substrato (2,5 mM de UDP), quatro compostos apresentaram atividade inibitória significativa, a quercetina (49%), miquelianina (55%), o composto (**14**) (47%) e o composto (**16**) (61%). Ao analisar os resultados com 0,1 mM de UDP, observamos que só três compostos apresentaram atividade inibitória significativa, a quercetina (39%), miquelianina (45%) e o composto (**16**) (94%), sendo este o candidato mais promissor. Podemos observar que o composto (**16**), assim como a quercetina e a miquelianina, inibiram a TcNTPDase-1 em baixa concentração de substrato (0,1 mM) e mantiveram uma inibição significativa em alta concentração de substrato (2,5 mM). Além disso, o composto (**14**) também apresentou atividade inibitória em alta concentração de substrato.

**149.** Devemos observar que, entre os compostos que apresentou atividade inibitória, os derivados glicosilados de quercetina demonstraram uma porcentagem de inibição maior do que a própria quercetina, porém, de maneira geral, não foram todos os derivados que inibiram a enzima (Figura 2). O que sugere que algumas diferenças estruturais entre eles favorecem a

inibição enzimática, ou seja, melhoram a interação dos compostos com a TcNTPDase-1.

**150.** Além disso, esses resultados indicam a capacidade desses compostos em atuar como inibidores de NTPDases. Somado a isso, esses compostos são promissores para o desenvolvimento de novos tratamentos da Doença de Chagas.

#### **EXEMPLO 17- Ensaio de inibição da LiNTPDase-2 recombinante**

**151.** Os ensaios de inibição foram feitos utilizando duas concentrações de substrato: 0,1 mM de nucleotídeo adenosina difosfato (ADP), mesma concentração usada de compostos e 2,5 mM de ADP, concentração 25 vezes maior que a dos compostos (0,1 mM). Na Figura 3, pelo gráfico de atividade ADPásica, podemos observar os resultados dos ensaios, o composto **(16)** na condição de menor concentração de substrato (2,5 mM de ADP), apresentou maior inibição (75%). Ao analisarmos os resultados com 2,5 mM de ADP, observamos uma menor capacidade inibitória do composto **(16)**, porém ainda significativa (~57%) em relação ao controle. A quercetina demonstrou capacidade inibitória semelhante em ambas as concentrações de substrato (42% e 39%, respectivamente). Além disso, o composto **(14)** também apresentou atividade inibitória de aproximadamente 40%, em ensaios com 0,1 mM de ADP. No entanto, ainda não foram realizados ensaios em alta concentração de substrato (2,5 mM de ADP).

**152.** Devemos observar que o composto **(16)**, assim como a quercetina, inibiu a LiNTPDase2 em baixa concentração de substrato (0,1 mM) e mantiveram uma inibição significativa em alta concentração de substrato (2,5 mM) com o composto **(14)** apresentando maior capacidade inibitória que a quercetina ( $P > 0,001$ ) (Figura 3). O que sugere que algumas diferenças estruturais entre esses dois compostos favorecem a inibição enzimática do composto **(16)**, melhorando sua interação com a LiNTPDase-2.

#### **EXEMPLO 18- Ensaio de inibição da LbNTPDase-2 recombinante**

**153.** Assim como nos ensaios com TcNTPDase-1, os ensaios usando a LbNTPDase-2 foram realizados usando todos os compostos obtidos durante a síntese, **(14)**, **(17)**, **(16)**, **(15)**, **(4)** e **(2)** (Figura 1). Os ensaios de atividade foram feitos em microplacas de 96 poços, usando UDP como substrato e todas as reações foram feitas em triplicata. Os ensaios de inibição foram feitos utilizando 2,5 mM de UDP, concentração 25 vezes maior que a dos compostos (100  $\mu$ M).

**154.** Na Figura 4, pelo gráfico de atividade UDPásica, podemos observar os resultados dos ensaios, três compostos apresentaram atividade inibitória significativa, o composto **(17)** (23,86%), o composto **(14)** (88,41%) e o composto **(16)** (92,88%). Entre os compostos que apresentaram atividade inibitória, o composto **(14)** e o composto **(16)**, foram os que demonstraram maior capacidade de inibição, não havendo diferença significativa entre eles.

**155.** Esses resultados, corroboram com os dados já obtidos nos ensaios de inibição realizados com as outras NTPDases (TcNTPDase-1 e LiNTPDase-2) na presença dos compostos obtidos durante a síntese da *ent*-isoquercetina **(2)** (Figura 4). Sendo assim, esses compostos possuem grande capacidade no desenvolvimento de novos tratamentos das Leishmanioses e doença de Chagas.

#### **EXEMPLO 19 – Ensaio de ação tripanocida em epimastigotas de *T. cruzi***

**156.** Epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* foram cultivados em meio de Grace suplementado com 10% de soro fetal bovino. Para isso, 5 mL de cultura em fase exponencial foram transferidos para uma garrafa de cultivo estéril média, foram adicionados 15 mL de meio de cultura. As garrafas foram mantidas a 28 °C por 12 dias. Decorrido o tempo, as células foram contadas e centrifugadas para uma concentração final de  $1 \times 10^8$  parasitos/mL. O sedimento celular formado foi lavado 3 vezes em solução salina estéril, as centrifugações foram feitas por 10 min a  $2000 \times g$  a 25 °C. As células foram suspensas em solução tampão contendo 50 mM de Tris-HEPES pH 7,2, 116 mM de NaCl, 5,4 mM de KCl e 5,5 mM de glicose, submetidas ao tratamento com os compostos **(14)** e **(16)** e avaliadas em microscópio ótico. Conforme demonstrado na Figura 5 houve diminuição significativa da densidade celular, e formação de aglomerados de parasitos, refletindo também em menor mobilidade após o tratamento com os compostos **(14)** e **(16)** evidenciando sua ação tripanocida.

#### **EXEMPLO 20 - Teste de toxicidade e de infecção em macrófagos Raw 264.7 por *L. braziliensis in vitro* – determinação de CC50 e EC50**

**157.** A determinação do CC50 e do EC50 é o método mais amplamente utilizado na avaliação da eficácia de determinado composto e os seus valores indicam a quantidade de composto que é necessária para inibir um processo biológico pela metade. Assim, como pode ser observado na Tabela 1 em macrófagos, para os compostos **(15)**, **(4)** e também para o **(16)**, o CC50 é maior do que 100 µM, e para o composto **(14)**, esse valor é 98,75 µM. Isso reflete

uma baixa toxicidade desses compostos para a célula hospedeira quando comparados à quercetina, em que o CC50 é 62,04  $\mu\text{M}$ .

**Tabela 1: CC50 e EC50 dos compostos para macrófagos e amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* após 48 horas.**

Composto	CC50 Macrófagos 264,7	( $\mu\text{M}$ ) Raw	EC50 ( $\mu\text{M}$ ) <i>L. braziliensis</i> Ensaio de infecção	Índice de Seletividade (IS)
<b>15</b>	> 100		31,62	> 3,16
<b>16</b>	> 100		36,52	> 2,74
<b>14</b>	98,75		37,94	2,60
<b>QUERCETINA</b>	62,04		50,06	1,24
<b>4</b>	> 100		ND	ND

Os compostos foram testados de 100-1  $\mu\text{M}$  pelo método da resazurina após 48h. O GraphPad Prism versão 5.03 foi usado para a determinação dos CC50 e EC50 e os dados são de pelo menos três experimentos independentes com quadruplicata interna dos compostos em cada um. Os compostos estão organizados em ordem crescente de IS.  $\text{IS} = \text{CC50 (MØ)} / \text{EC50 (L. braziliensis amastigotes)}$ . ND = não determinado.

**158.** Nos ensaios de infecção, em que o objetivo foi avaliar o efeito desses compostos contra formas amastigotas intracelulares de *L. braziliensis*, é possível observar que o composto (**15**) foi o mais eficaz entre os compostos testados ( $\text{EC50} = 31,62 \mu\text{M}$ ), pois uma menor quantidade do composto foi suficiente para inibir o crescimento do parasito em 50%, em comparação aos demais compostos testados. O composto (**16**) foi o segundo composto mais eficaz ( $\text{EC50} = 36,52 \mu\text{M}$ ), enquanto a quercetina foi o composto menos eficiente, apresentando um  $\text{EC50}$  de 50,06  $\mu\text{M}$ . Dessa forma, pode-se dizer que quanto menor o  $\text{EC50}$ , mais eficaz é o composto, equanto maior o valor do  $\text{EC50}$ , menor eficácia o composto possui.

**159.** O Índice de Seletividade (IS) é utilizado em ensaios de citotoxicidade para avaliar o quanto uma droga é mais eficaz contra determinado parasito sem causar danos à viabilidade de células de mamíferos. Quanto maior o IS, mais seletiva é a droga sobre o parasito e menos efeito ela tem sobre as células de mamíferos. Os compostos (**15**) e o (**16**) foram os compostos que apresentaram maior IS (> 3,16 e > 2,74), respectivamente, enquanto a quercetina foi o composto com menor seletividade entre os compostos testados ( $\text{IS} = 1,24$ ). O IS é calculado dividindo-se o CC50 do composto para células de mamíferos pelo  $\text{EC50}$  do composto para o protozoário parasito.

#### **EXEMPLO 21 - Teste de toxicidade e de infecção em células VERO por *T. cruzi* in vitro**

– determinação de CC50 e EC50

**160.** Assim como foi feito para *L. braziliensis*, também buscamos determinar o CC50 e o EC50 em células VERO e na infecção por *T. cruzi*. Como pode ser observado na Tabela 2 em VERO, para os compostos **(14)** e **(16)**, o CC50 é maior do que 100 µM. Isso reflete uma baixa toxicidade desses compostos para a célula hospedeira quando comparados à quercetina, em que o CC50 é 20,43 µM.

**161.** Nos ensaios de infecção é possível observar que o EC50 para os compostos **(14)** e **(16)** foram de 39,43 µM e 3,33 µM, respectivamente. Ambos os compostos apresentaram capacidade de inibir o crescimento do parasito em 50%, em comparação com a quercetina, que teve seu EC50 não determinado (ND) devido à sua toxicidade para a célula hospedeira. No entanto o composto **(16)** mostrou-se muito mais eficaz, uma vez que seu EC50 foi o menor.

**Tabela 2: CC50 e EC50 dos compostos para células VERO e amastigotas intracelulares de *Trypanosoma cruzi* após 48 horas.**

Compostos	CC50 (µM) Células VERO	EC50 (µM) Ensaios de infecção <i>T. cruzi</i>	Índice de Seletividade (IS)
<b>14</b>	> 100	39,43	> 2,53
<b>16</b>	> 100	3,33	> 30,03
<b>Quercetina</b>	20,43	ND	ND

Os compostos foram testados de 100 -1 µM pelo método da resazurina após 48h. O GraphPad Prism versão 5.03 foi usado para a determinação dos CC50 e EC50 e os dados são de pelo menos três experimentos independentes com quadruplicata interna dos compostos em cada um. Os compostos estão organizados em ordem crescente de IS.  $IS = CC50 (VERO) / EC50 (T. cruzi)$ . ND = não determinado.

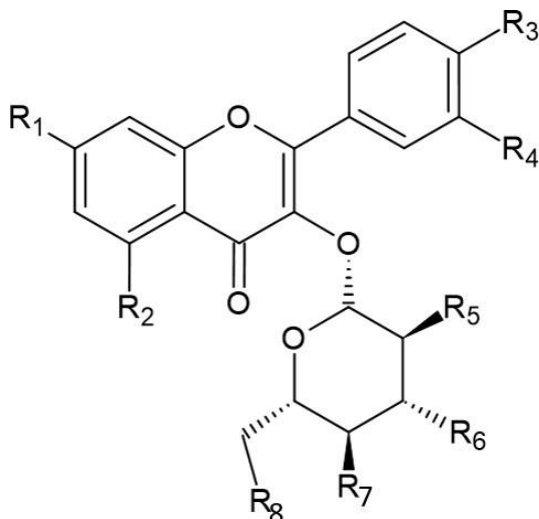
**162.** Com relação ao Índice de Seletividade (IS), o composto **(14)** apresentou IS de 2,53 enquanto o composto **(16)** apresentou um maior IS, 30,03. Como já dito, quanto maior o IS, mais seletiva é a droga sobre o parasito e menos efeito ela tem sobre as células de mamíferos. Logo o composto **(16)** foi o mais eficaz e o mais seletivo entre os compostos testados.

**163.** Por fim, conclui-se que, o processo de obtenção da *ent*-isoquercetina - **(2)**, assim como de todos os compostos obtidos durante a sua síntese, **(14)**, **(17)**, **(16)**, **(14)** e **(4)**, os próprios

compostos e o uso desses compostos para inibição de NTPDases, bem como seu possível uso no tratamento da Doença de Chagas e Leishmanioses são novidades promissoras, uma vez que não foi encontrado no estado da técnica nada parecido com os compostos e estas aplicações.

## REIVINDICAÇÕES

1. **Compostos derivados da *ent*-isoquercetina**, caracterizados por apresentarem a fórmula estrutural



Em que:

$R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = R_7 = R_8 = OH$ ;

$R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = OMe$  e  $R_5 = R_6 = R_7 = R_8 = OH$ ;  $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = OBn$  e  $R_5 = R_6 = R_7 = R_8 = OAc$ ;  $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = OMe$  e  $R_5 = R_6 = R_7 = R_8 = OAc$ ;  $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = OBn$  e  $R_5 = R_6 = R_7 = R_8 = OH$ ; ou  $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = OH$  e  $R_5 = R_6 = R_7 = R_8 = OAc$ ;

2. **Compostos derivados da *ent*-isoquercetina** de acordo com a reivindicação 1, caracterizados por serem 2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-3-(((2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahydro-2*H*-pirano-2-il)oxi)-4*H*-cromen-4-ona (**2**), 2-(3,4-dimetoxifenil)-5,7-dimetoxi-3-(((2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-triidroxi-6- (hidroximetil)tetrahydro-2*H*-piran-2-il)oxi)-4*H*-cromen-4-ona (**4**), (2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*R*)-2- (acetoximetil)-6-((5,7-bis(benziloxi)-2-(3,4-bis(benziloxi)fenil)-4-oxo-4*H*-cromen-3-il)oxi)tetrahydro-2*H*-piran-3,4,5-triiltriacetato (**14**), (2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*R*)-2-(acetoximetil)-6- ((2-(3,4-dimetoxifenil)-5,7-dimetoxi-4-oxo-4*H*-cromen-3-il)oxi)tetrahydro-2*H*-piran-3,4,5-triil triacetato (**15**), 5,7-bis(Benziloxi)-2-(3,4-bis(benziloxi)fenil)-3-(((2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahydro-2*H*-piran-2-il)oxi)-4*H*- cromen-4-ona (**16**) e (2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*R*)-2-

(acetoximetil)-6-((2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-4-oxo-4*H*-cromen-3-il)oxi)tetrahidro-2*H*-piran-3,4,5-triiltriacetato (**17**).

3. **Processo de produção do composto** 2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-3-(((2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2*H*-pirano-2-il)oxi)-4*H*-cromen-4-ona (**2**), definido nas reivindicações 1 e 2, caracterizado por compreender as seguintes etapas:

- (a) Pesar 0,1 a 0,8 mmol do composto 5,7-bis(Benziloxi)-2-(3,4-bis(benziloxi)fenil)-3-(((2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)oxi)-4*H*-cromen-4-ona (**16**), e diluir em 5 a 15 mL de etanol;
- (b) Tratar 0,1 a 0,8 mmol do composto (**16**) com Pd/C 10% (0,05 a 0,4 mmol) sob atmosfera de hidrogênio e agitar a solução por 4 a 18 h à temperatura ambiente;
- (c) Filtrar a solução obtida em (b) através de celite e evaporar o solvente sob pressão reduzida;
- (d) Purificar o resíduo bruto por coluna cromatográfica utilizando resina, à base de dextrana reticulada, eluído com um sistema H<sub>2</sub>O/MeOH (1:1), em volume de 100 a 400 mL, e obter o composto *ent*-isoquercetina (**2**).

4. **Processo de produção do composto** 2-(3,4-dimetoxifenil)-5,7-dimetoxi-3-(((2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-triidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2*H*-piran-2-il)oxi)-4*H*-cromen-4-ona (**4**), definido nas reivindicações 1 e 2, caracterizado por compreender as seguintes etapas:

- (a) Pesar 0,1 a 0,8 mmol do composto ácido acético 4,5-diacetoxi-6-acetoximetil-2-[2-(3,4-dimetoxi-fenil)-5,7-dimetoxi-4-oxo-4*H*-cromen-3-iloxi]-tetrahidro-piran-3-il éster (**15**) e diluir em 2 a 8 mL de metanol anidro em agitação sob banho de gelo e sob atmosfera de argônio;
- (b) Adicionar 2 a 10 mL de uma solução metanólica de NaOMe;
- (c) Remover o banho de gelo e agitar por 1 a 4 horas;
- (d) Adicionar 5 a 15 mL de THF anidro e agitar por 0,5 a 3 h horas;
- (e) Adicionar a resina catiônica até pH 6;
- (f) Filtrar o resíduo bruto sob Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrar sob pressão reduzida;
- (g) Purificar o resíduo da etapa anterior em coluna cromatográfica com 200 a 400 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9,5:0,5 v/v e obter o composto (**4**).

5. **Processo de produção do composto** ácido acético 4,5-diacetoxi-2-acetoximetil-6-

[5,7-bis-benziloxi-2-(3,4-bis-benziloxi-fenil)-4-oxo-4*H*-cromen-3-iloxi]-tetrahidro-piran-3-ilmetil éster (**14**), definido nas reivindicações 1 e 2, caracterizado por compreender as seguintes etapas:

- (a) Pesar 0,2 a 0,9 mmol do ácido acético 3,5-diacetoxi-2-acetoximetil-6-[7-benziloxi-2-(3,4-bis-benziloxi-fenil)-5-hidroxi-4-oxo-4*H*-cromen-3-iloxi]-tetrahidro-piran-4-il éster (**12**) e misturar com 1 a 8 mmol de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> em 1 a 10 mL de dimetilformamida anidro e adicionar 1 a 4 mmol de brometo de benzila mantida sob agitação a 40 a 80 °C por 24 a 72 h sob atmosfera de argônio;
- (b) Adicionar água destilada 20 a 40 mL e uma solução gelada de 5 a 20 mL de HCl 15%;
- (c) Extrair a solução da etapa (b) com acetato de etila;
- (d) Lavar a fase orgânica em solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> e solução saturada de cloreto de sódio;
- (e) Secar com sulfato de sódio anidro e evaporar o solvente sob pressão reduzida;
- (f) Purificar o resíduo bruto em coluna cromatográfica empregando misturas de hexano/acetato de etila 15 a 35% e 36 a 50% e obter o glicosídeo todo benzilado (**14**).

6. **Processo de produção do composto** ácido acético 4,5-diacetoxi-6-acetoximetil-2-[2-(3,4-dimetoxi-fenil)-5,7-dimetoxi-4-oxo-4*H*-cromen-3-iloxi]-tetrahidro-piran-3-il éster (**15**), definido nas reivindicações 1 e 2, caracterizado por compreender as seguintes etapas:

- (a) Pesar 0,3 a 1 mmol do ácido acético 3,5-diacetoxi-2-acetoximetil-6-[7-benziloxi-2-(3,4-bis-benziloxi-fenil)-5-hidroxi-4-oxo-4*H*-cromen-3-iloxi]-tetrahidro-piran-4-il éster
- (b) (**12**) e misturar 1 a 8 mmol de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> em 1 a 10 mL de dimetilformamida anidro e adicionar 1 a 8 mmol de iodometano, mantida sob agitação a 40 a 80 °C por 24 a 72 h sob atmosfera de argônio;
- (c) Adicionar água destilada e uma solução gelada de 5 a 20 mL de HCl 15%;
- (d) Extrair a solução da etapa (b) com acetato de etila;
- (e) Lavar a fase orgânica em solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> e solução saturada de cloreto de sódio;

- (f) Secar com sulfato de sódio anidro e evaporar o solvente sob pressão reduzida;
- (g) Purificar o resíduo bruto em coluna cromatográfica empregando misturas de hexano/acetato de etila 15 a 35% e 36 a 50% v/v e obter o glicosídeo todo metoxilado (15).

7. **Processo de produção do composto** 5,7-bis(Benziloxi)-2-(3,4-bis(benziloxi)fenil)-3-(((2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahydro-2*H*-piran-2-il)oxi)-4*H*-cromen-4-ona (16), definido nas reivindicações 1 e 2, caracterizado por compreender as seguintes etapas:

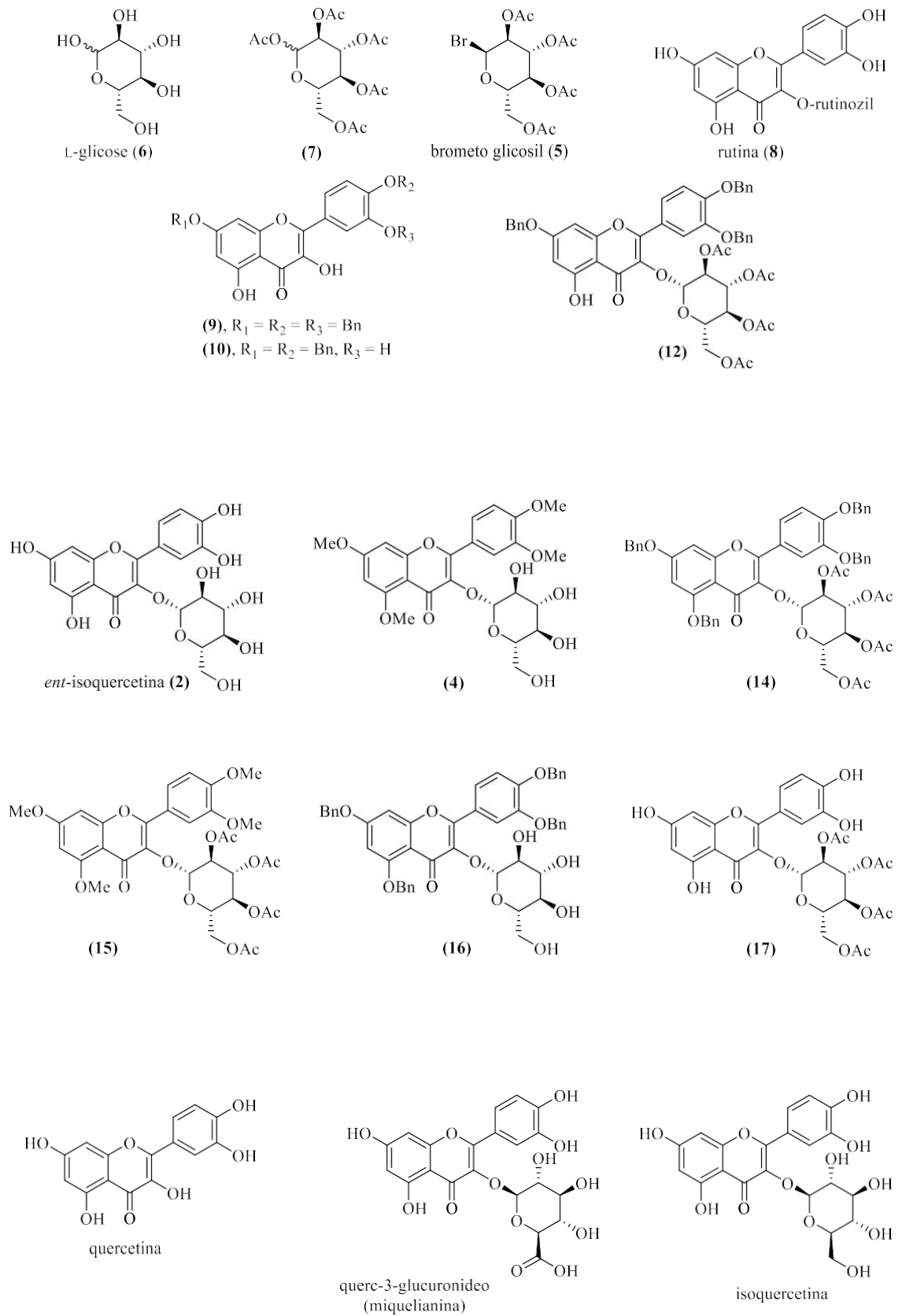
- (a) Pesar 0,1 a 0,7 mmol do ácido acético 4,5-diacetoxi-2-acetoximetil-6-[5,7-bis-benziloxi-2-(3,4-bis-benziloxi-fenil)-4-oxo-4*H*-cromen-3-iloxi]-tetrahydro-piran-3-ilmetil éster (14) e diluir em metanol anidro em volume de 1 a 10 mL e agitar a sob banhode gelo e sob atmosfera de argônio;
- (b) Adicionar 1 a 10 mL de uma solução metanólica de NaOMe;
- (c) Remover o banho de gelo e manter a agitação por mais 1 a 3 horas;
- (d) Adicionar 5 a 15 mL de THF anidro e manter a agitação por mais 0,5 a 2 horas;
- (e) Adicionar resina catiônica até pH 6;
- (f) Filtrar o resíduo bruto sob Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrar sob pressão reduzida;
- (g) Purificar em coluna cromatográfica com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9,5:0,5 v/v em volume de 200 a 400 mL e obter o composto (16).

8. **Processo de produção do composto** (2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*R*)-2-(acetoximetil)-6-((2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-4-oxo-4*H*-cromen-3-il)oxi)tetrahydro-2*H*-piran-3,4,5-triiltriacetato (17), definido nas reivindicações 1 e 2, caracterizado por compreender as seguintes etapas:

- (a) Pesar 0,2 a 0,7 mmol do ácido acético 3,5-diacetoxi-2-acetoximetil-6-[7-benziloxi-2-(3,4-bis-benziloxi-fenil)-5-hidroxi-4-oxo-4*H*-cromen-3-iloxi]-tetrahydro-piran-4-il éster (12) e diluir em etanol (5 a 12 mL);
- (b) Tratar 0,2 a 0,7 mmol do composto (12) com de Pd/C 10% na quantidade de 0,05 a 0,4 mmol sob atmosfera de hidrogênio, e agitar a solução por 6 a 18 horas à temperatura ambiente;
- (c) Filtrar a mistura através de celite e evaporar o solvente sob pressão reduzida;
- (d) Purificar o resíduo bruto por coluna cromatográfica utilizando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9,5:0,5

v/v em volume de 100 a 500 mL e obter o composto (17).

9. **Uso dos compostos derivados da *ent-isoquercetina***, definidos nas reivindicações 1 e 2, caracterizado por ser para a produção de agentes inibidores das proteínas da família das NTPDases.
10. **Uso dos compostos derivados da *ent-isoquercetina***, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por ser para a produção de agentes inibidores das proteínas de NTPDases de *Trypanosoma cruzi* e de NTPDases de espécies de Leishmania.
11. **Uso dos compostos derivados da *ent-isoquercetina***, definidos nas reivindicações 1 e 2, caracterizado por ser para preparar medicamentos para tratar doença de Chagas e leishmanioses.



**Figura 1**

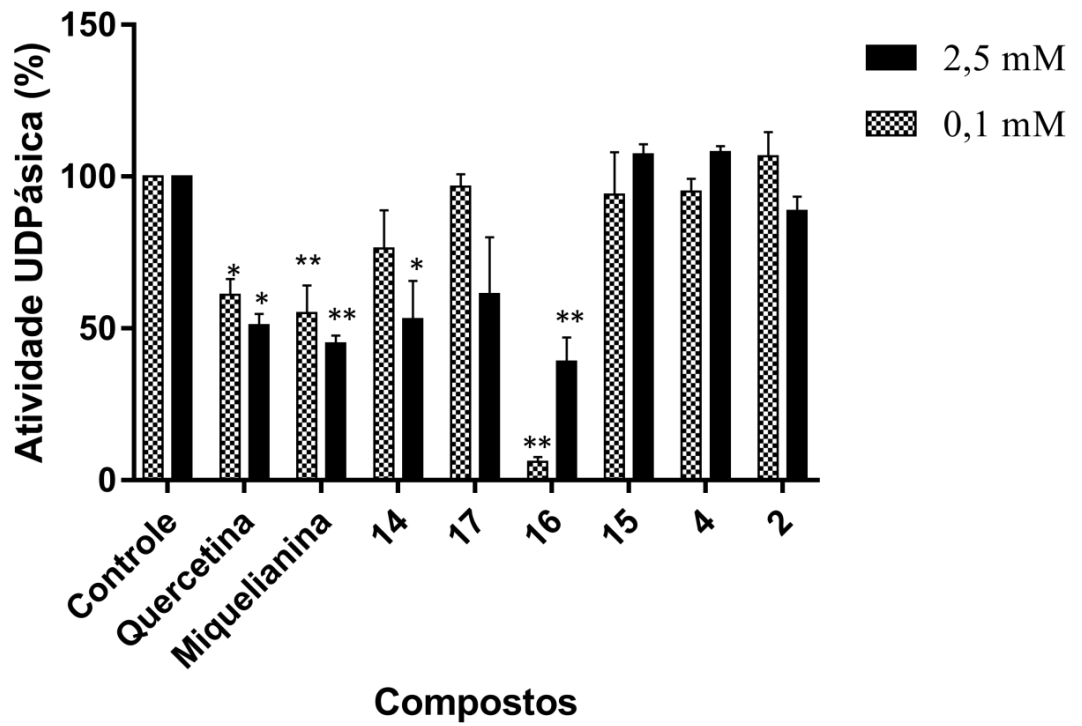


Figura 2

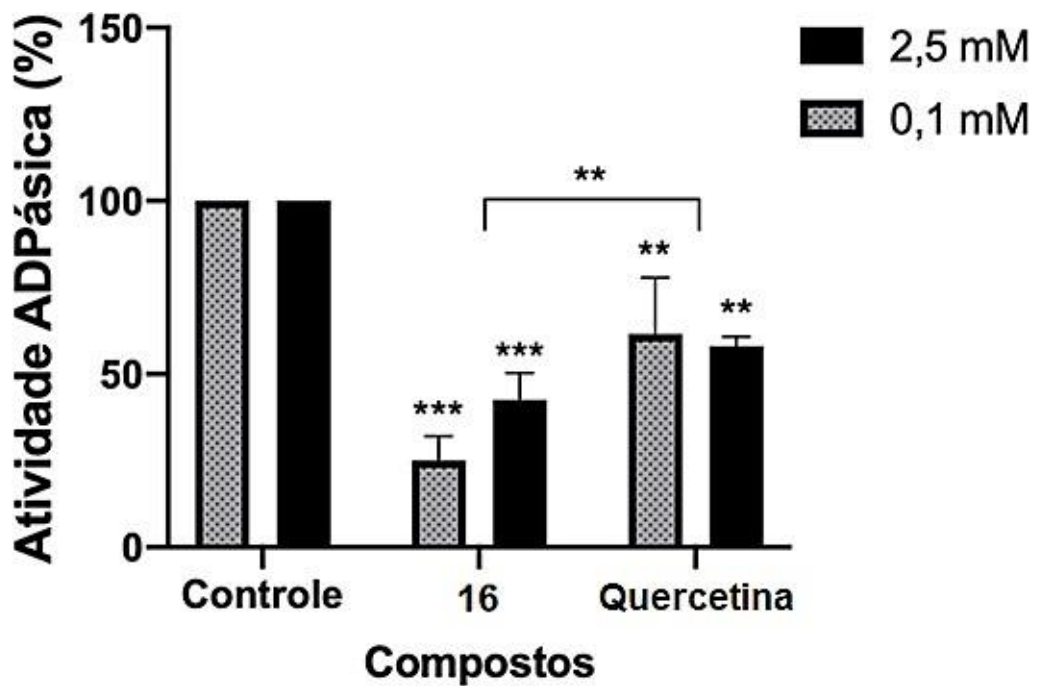


Figura 3

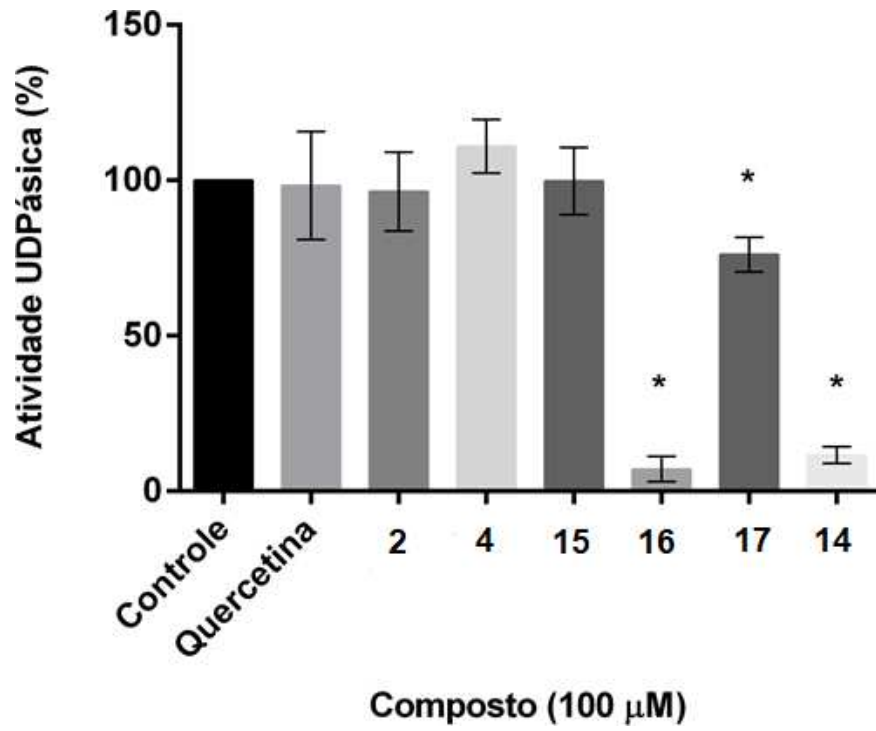


Figura 4

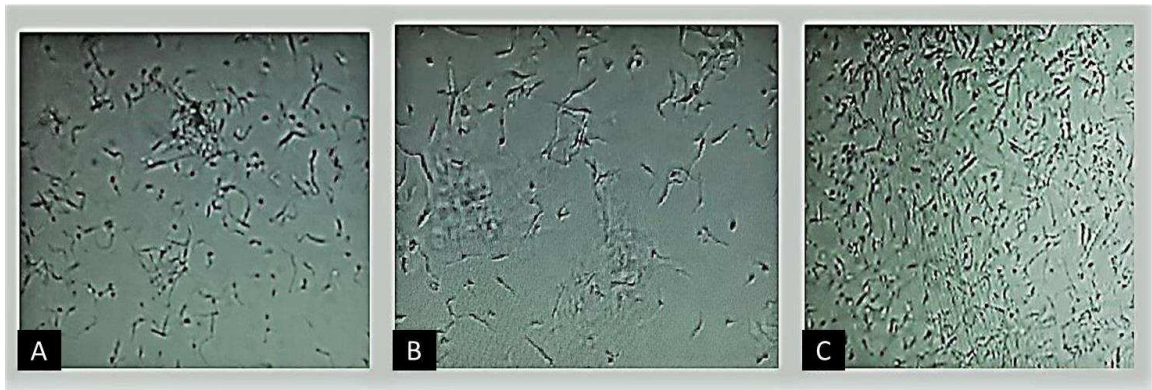


Figura 5

## RESUMO

### Compostos derivados da *ent*-isoquercetina, processos de produção e uso como inibidor de NTPDases e em medicamentos para o tratamento da doença de Chagas e Leishmanioses

A presente invenção refere-se aos compostos 2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-3-(((2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahydro-2*H*-pirano-2-il)oxi)-4*H*-cromen-4-ona (**2**), 2-(3,4-dimetoxifenil)-5,7-dimetoxi-3-(((2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-triidroxi-6-(hidroximetil)tetrahydro-2*H*-piran-2-il)oxi)-4*H*-cromen-4-ona (**4**), (2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*R*)-2-(acetoximetil)-6-((5,7-bis(benziloxi)-2-(3,4-bis(benziloxi)fenil)-4-oxo-4*H*-cromen-3-il)oxi)tetrahydro-2*H*-piran-3,4,5-triiltriacetato (**14**), (2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*R*)-2-(acetoximetil)-6-((2-(3,4-dimetoxifenil)-5,7-dimetoxi-4-oxo-4*H*-cromen-3-il)oxi)tetrahydro-2*H*-piran-3,4,5-triil triacetato (**15**), 5,7-bis(Benziloxi)-2-(3,4-bis(benziloxi)fenil)-3-(((2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahydro-2*H*-piran-2-il)oxi)-4*H*-cromen-4-ona (**16**) e (2*S*,3*S*,4*R*,5*S*,6*R*)-2-(acetoximetil)-6-((2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-4-oxo-4*H*-cromen-3-il)oxi)tetrahydro-2*H*-piran-3,4,5-triiltriacetato (**17**), ao seu processo de produção e ao seu uso como agentes inibidores de NTPDases e para preparar um medicamento para a doença de Chagas e leishmanioses. Todos os compostos foram obtidos durante a síntese da *ent*-isoquercetina (**2**), que geraram glicosídeos não naturais da quercetina. O ramo técnico da invenção se enquadra em indústrias do setor farmacêutico e biotecnológico.

## 12. CONCLUSÃO GERAL

Muitos estudos evidenciam a importância e o papel da TcNTPDase1 na virulência e infecção causada por *T. cruzi*. Isso a torna um potencial alvo molecular para o desenvolvimento racional de novos fármacos para o tratamento da Doença de Chagas. A triagem e seleção de potenciais inibidores da molécula alvo são essenciais nessa busca por novos tratamentos. Neste trabalho, demonstramos a síntese de novos compostos não naturais, derivados da quercetina e o potencial inibitório dos mesmos.

Demonstramos que dois compostos sintéticos apresentaram capacidade inibitória promissora, os compostos **14** e **16**. Sendo que, o **16** apresentou capacidade de inibição de 96% da atividade da rTcNTPDase1, enquanto o **14** apresentou capacidade inibitória próxima de 50%. Na literatura encontramos dados de que a quercetina é capaz de inibir E-NTPDases, aqui demonstramos que tanto a quercetina quanto a miquelianina (derivado natural da quercetina) foi capaz de inibir a rTcNTPDase1 em torno de 50%, não havendo variação significativa quando aumentamos a concentração de substrato. Foi possível determinar o  $K_m$  e  $V_{max}$  da rTcNTPDase1 tendo o UDP como substrato e determinamos o tipo de inibição do composto **16** como competitiva. As análises de interação por *docking* molecular da TcNTPDase1 e do composto **16** mostraram que a ligação do composto no sítio ativo da enzima pode ocorrer e que há interação com resíduo que já foi descritos como importante para a atividade da enzima (resíduo E340).

Por fim, também demonstramos que os compostos sintetizados foram capazes de inibir outras NTPDases de Leishmania, a NTPDase2 de *L. infantum* e NTPDase2 de *L. braziliensis*. Além disso, alguns dos compostos apresentaram capacidade leishmanicida e tripanomicida e afetaram a infecciosidade de *T. cruzi* e *L. braziliensis*. No entanto, seria interessante que futuramente a especificidade desses compostos seja avaliada em relação a outras NTPDases, como as de mamífero. Assim, todos os dados apresentados aqui, nos levam a acreditar no potencial desses compostos como inibidores e no possível uso dos mesmos para o desenvolvimento de novos tratamentos para a Doença de Chagas e das leishmanoses.