UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Planejamento, síntese e avaliação da atividade biológica de potenciais inibidores da enzima *trans*-sialidase de *Trypanosoma cruzi*

Peterson de Andrade

Ribeirão Preto
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Planejamento, síntese e avaliação da atividade biológica de potenciais inibidores da enzima *trans*-sialidase de *Trypanosoma cruzi*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientado: Peterson de Andrade

Orientadora: Profa. Dra. Ivone Carvalho

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em 08/05/2012. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Peterson de Andrade.

Planejamento, síntese e avaliação da atividade biológica de potenciais inibidores da enzima *trans*-sialidase de *Trypanosoma cruzi*. Ribeirão Preto, 2012.

183p. : il.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientadora: Profa. Dra. Ivone Carvalho.

1. Doença de Chagas 2.*Trypanosoma cruzi* 3.*trans*-Sialidase 4. Síntese de carboidratos 5. Modelagem molecular

FOLHA DE APROVAÇÃO

Peterson de Andrade
Planejamento, síntese e avaliação da atividade biológica de potenciais inibidores da enzima *trans*-sialidase de *Trypanosoma cruzi*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientado: Peterson de Andrade
Orientadora: Prof. Dra. Ivone Carvalho

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Assinatura _____

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos meus pais Arlindo (*in memorian*) e Leonor por terem me dado muito mais do que oportunidade e estudo;

à minha querida esposa Lívia e filha Lavínia por serem uma bênção de Deus na minha vida;

às minhas irmãs Érika e Éllen pelo convívio e incentivo

e àqueles que realmente são meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar àquele que me deu a vida, que tem sido meu refúgio nos momentos difíceis e que tem guiado meus passos dia após dia, Jesus Cristo.

Agradeço à minha família que me ensinou a lutar e a perseverar pelos meus sonhos.

Agradeço à professora doutora Ivone Carvalho a orientação durante todo esse tempo, a paciência e compreensão, as oportunidades que me ofereceu, o conhecimento que me agregou e a confiança que depositou em mim ao desenvolver esse trabalho.

Agradeço ao professor doutor Carlos Henrique Tomich de Paula da Silva a orientação durante desenvolvimento do trabalho de modelagem molecular.

Agradeço aos técnicos Luís Otávio Zamoner, Marcelo Rodrigues de Carvalho, Vinícius Palaretti, José Carlos Tomaz e à técnica Cláudia Castania todo apoio e disposição em ajudar ao longo desses anos.

Agradeço aos amigos do laboratório de Química Farmacêutica Lílian, Adriane, Vanessa, Valquíria, Milena, Carol, Mônica, Helen, Michele, Maristela, Samanta, Denise, Susimaire, Warley, Daniel, Pedro, Vinícius, Getúlio, Oswaldo, Flávio, Ricardo, Evandro, Jonathan, Armando e Thiago os momentos de alegria e de frustração que compartilhamos ao longo dos últimos anos, bem como a convivência extremamente agradável e muito divertida dentro e fora do laboratório.

Agradeço a CAPES e a FAPESP o financiamento, sem o qual não poderia ter trabalhado em tempo integral neste projeto.

Se te mostrares fraco no dia da angústia, a tua força será pequena.

Provérbios 24: 10

Dá força ao cansado, e multiplica as forças ao que não tem nenhum vigor.

Os jovens se cansarão e se fatigarão, e os moços certamente cairão;

Mas os que esperam no SENHOR renovarão as forças, subirão com asas como águias; correrão, e não se cansarão; caminharão, e não se fatigarão.

Isaías 40: 29-31

RESUMO

DE ANDRADE, P. **Planejamento, síntese e avaliação da atividade biológica de potenciais inibidores da enzima *trans*-sialidase de *Trypanosoma cruzi***. 2012. 183 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, é uma das doenças tropicais mais devastadoras e é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. O parasita expressa uma enzima de superfície, *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase (TcTS), responsável pela transferência de ácidos siálicos de células do hospedeiro para moléculas de β-galactose terminais presentes em glicoproteínas de sua superfície. As moléculas de glicoproteína sialiladas estão envolvidas na adesão e subsequente penetração do parasita em células hospedeiras. Logo, TcTS desempenha papel fundamental no reconhecimento e na invasão de células do hospedeiro. Além disso, a ausência de *trans*-sialidase em seres humanos faz de TcTS um alvo potencial a ser explorado, no entanto nenhum inibidor desta enzima (em concentração nanomolar) é conhecido até o momento. Considerando a importância da unidade de galactose e da função carboxila do ácido siálico para interações no sítio activo de TcTS, focamos na síntese de derivados de galactose com ácido succínico em diferentes posições do anel de açúcar e sua avaliação biológica em TcTS. Além disso, foi proposta uma busca por novos inibidores de TcTS através de técnicas de modelagem molecular, como triagem virtual baseada no sítio ativo da enzima. β-D-galactose e β-D-galactopiranosídeo de metila, disponíveis comercialmente, foram tratados com reagentes adequados para fornecer alguns intermediários com apenas uma hidroxila livre em poucas etapas. O tratamento destes compostos com anidrido succínico em piridina levou à formação dos respectivos derivados com ácido succínico em todas as posições do anel galactosídico. Após etapa de desproteção foi obtido apenas o derivado com ácido succínico na posição 4 (**85**), que foi testado em TcTS por ensaio fluorimétrico *in vitro* para avaliação de sua atividade inibitória. Adicionalmente, **85** foi testado em ensaios *in vitro* para avaliação de sua atividade tripanocida e citotóxica. De acordo com os ensaios biológicos, o composto **85** apresentou atividade inibitória promissora (56%) na concentração de 1,0 mM. Esse resultado preliminar foi importante para mostrar que esse tipo de derivado pode atuar como inibidor de TcTS e para orientar a síntese de novos derivados de galactose. O valor da atividade tripanocida foi inferior a 40% (0,5 mM) e não foi observada citotoxicidade na concentração de 0,5 mM. Os estudos de triagem virtual realizados neste trabalho através de simulações de “docking” resultaram na seleção das 50 melhores moléculas, baseada na orientação de maior pontuação, dentre 50.000 encontradas na base de dados diverset. O próximo passo envolve novos estudos para filtrar as moléculas mais promissoras para serem testadas em TcTS.

Palavras-chave: 1. Doença de Chagas 2. *Trypanosoma cruzi* 3. *trans*-Sialidase 3. Síntese de carboidratos 5. Modelagem molecular

ABSTRACT

DE ANDRADE, P. **Design, synthesis and biological activity evaluation of potential inhibitors of the *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase enzyme**. 2012. 183 f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Chagas' disease, also known as American trypanosomiasis, is one of the most devastating tropical diseases and it is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*. The parasite expresses a cell surface enzyme, *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase (TcTS), responsible for the transference of sialic acids from host cells to terminal β-galactose molecules present on its glycoprotein surface. The sialylated glycoprotein molecules are involved in the attachment and subsequent penetration of the parasite into host cells. As a result, TcTS plays a key role in the recognition and invasion of host cells. Moreover, the lack of *trans*-sialidase in humans makes TcTS a potential drug target to be explored, however no strong inhibitors (at nanomolar range) of this enzyme are known to date. Considering the importance of galactose unit and the carboxyl function in sialic acid for interactions in the active site of TcTS, we have focused on the synthesis of galactose derivatives containing succinic acid in different positions of the sugar ring and on their biological evaluation against TcTS. In addition, we have proposed the search for new TcTS inhibitors applying molecular modeling techniques, like virtual screening based on the enzyme´s active site. Commercially available α,β-D-galactose and methyl-β-D-galactopyranoside were treated with suitable reagents to afford some intermediates with just one free hydroxyl group in few steps. Treatment of these compounds with succinic anhydride in pyridine afforded derivatives thereof with succinic acid in all galactosidic ring positions. After deprotection step it was only obtained the derivative containing succinic acid at position 4 (**85**), which was tested in *in vitro* TcTS fluorimetric assay for evaluation of its inhibitory activity. In Addition, **85** was tested in *in vitro* assays for assessment of their trypanocidal activity and cytotoxic. According to the biological assays, compound **85** showed promising inhibitory activity (56%) at 1.0 mM concentration. This preliminary result was important both to show that this type of derivative can act as an inhibitor of TcTS and to guide the synthesis of new derivatives of galactose. The trypanocidal activity value was lower than 40% (0.5 mM) and there was no cytotoxicity at 0.5 mM concentration. The virtual screening studies performed in this work through docking simulations resulted in the selection of the 50 top-ranked molecules, based in the highest score orientation, among 50.000 found at diverset data base. The next step involves new studies to filter the most promising molecules to be tested against TcTS.

Keywords: 1. Chagas' disease 2. *Trypanosoma cruzi* 3. *trans*-Sialidase 4. Carbohydrate synthesis 5. Molecular modeling

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

1.1.1 Aspectos gerais da doença de Chagas e do parasita *Trypanosoma cruzi*

Em abril de 1909, Carlos Chagas (1878-1934) comunicou ao mundo científico a descoberta de uma nova doença, caracterizada como uma expressiva endemia rural em vários países latino-americanos (FIOCRUZ, 2009; AMATO NETO; PASTERNAK, 2009). Após 100 anos desde sua descoberta, a doença de Chagas ainda representa um grande desafio à saúde pública na América Latina e durante décadas sua localização em áreas restritas e pobres ajudou a torná-la negligenciada e não atrativa para o desenvolvimento de fármacos (RASSI et al., 2009; THE LANCET, 2009).

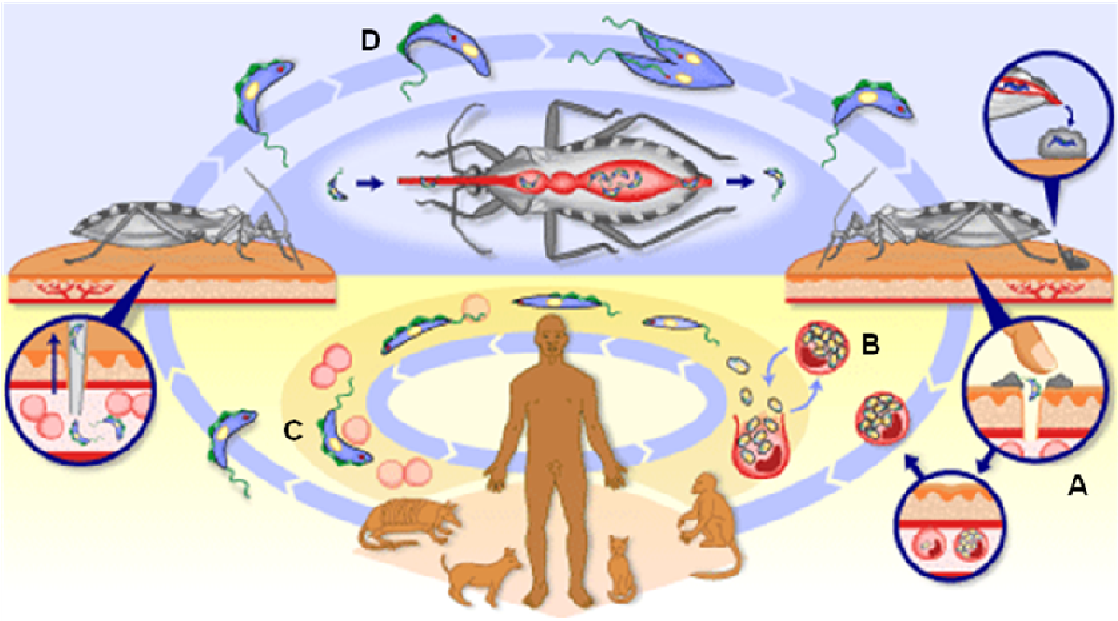
As doenças parasitárias têm sido obstáculo para o desenvolvimento social e econômico dos países mais pobres, e são frequentemente chamadas de doenças negligenciadas, uma vez que afetam populações pobres e marginalizadas e para as quais não existe tratamento satisfatório (DIAS et al., 2009; VIK, 2009). A necessidade de novas alternativas terapêuticas é evidente, mas os investimentos em pesquisa e desenvolvimento de companhias farmacêuticas e de centros de pesquisas internacionais na busca de fármacos são insuficientes, por isso a doença de Chagas é uma das principais doenças negligenciadas do mundo (DIAS et al., 2009; KRAUS, 2009).

A doença de Chagas é considerada a terceira doença parasitária tropical de maior incidência no mundo, só superada pela malária e esquistossomose, e seu agente causador é o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) (SÁNCHEZ-MORENO et al., 2011). Sua transmissão em seres humanos e em outros mamíferos ocorre, principalmente, através das fezes contaminadas do inseto vetor *Triatoma infestans*, conhecido popularmente como “barbeiro” (REMME et al., 2006). Graças a medidas de controle sanitárias, a transmissão via *Triatoma infestans* foi interrompida no Brasil em 2006 (MONCAYO; SILVEIRA, 2009).

Atualmente, existem cerca de 10-12 milhões de pessoas infectadas, com 15.000 mortes anuais, e cerca de 30 milhões de pessoas estão expostas ao risco de adquiri-la, principalmente no continente sul-americano (OMS, 2010; CLAYTON, 2010). No entanto, devido ao recente fluxo de imigrantes provenientes de países endêmicos, a doença tem se tornado problema de saúde na América do Norte e em muitas partes da Europa, Ásia e Oceania, onde foi identificado número crescente de indivíduos infectados. Como resultado, tem sido reconhecido o potencial de transmissão da doença por transfusão de sangue, transplante de órgãos e via congênita nos países não endêmicos e tem havido preocupação global em identificar e prestar assistência às pessoas já infectadas (RASSI et al., 2009).

A doença de Chagas é caracterizada pelas fases aguda e crônica. A fase aguda pode passar despercebida como também pode se iniciar com febre, edemas localizados e generalizados, miocardite aguda etc. Já a fase crônica é caracterizada pela destruição de tecidos musculares e nervosos, causando danos irreversíveis a diversos órgãos (coração, esôfago, cólon etc) (MONCAYO, 1999; DO CAMPO, 2001).

O ciclo de vida do *T. cruzi* é do tipo heteroxênico (Figura 1), no qual o parasita passa por uma fase de multiplicação intracelular no hospedeiro vertebrado (homem e outros mamíferos) e extracelular no inseto vetor (triatomíneos). O parasita tem um ciclo de vida complexo tanto no inseto como no hospedeiro mamífero, podendo ser encontrado nas formas amastigota, epimastigota, tripomastigota e tripomastigota metacíclica (NEVES et al., 1995).



http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Reinos/DoencadeChagas.php

Figura 1 - Ciclo de vida do *T. cruzi*, mostrando sua passagem pelo hospedeiro vertebrado (formas amastigota e tripomastigota) e inseto vetor (formas epimastigota e tripomastigota metacíclica).

A forma tripomastigota metacíclica (**A**), proveniente do inseto vetor, flagelada e altamente infecciosa, circula na corrente sanguínea e invade diversas células para escapar de mecanismos de defesa do hospedeiro. Após invasão, o parasita se diferencia na forma amastigota (**B**), aflagelada, que se prolifera por fissão binária e, eventualmente, se rediferencia na forma tripomastigota (**C**), destruindo as células e alcançando novamente a corrente circulatória. As formas tripomastigotas podem invadir outros tecidos ou podem ser ingeridas por um vetor. Neste último caso, são convertidas na forma epimastigota (**D**) não infecciosa, completando o ciclo de vida entre o parasita e o vetor (BRENER et al., 1973; BURLEIGH; ANDREWS, 1995).

1.1.2 Tratamento da doença de Chagas

Desde a descoberta da doença até os dias atuais, foram realizadas inúmeras tentativas de tratamento sem obter quimioterapia eficaz (MUELAS-SERRANO et al., 2002).

O tratamento atual tem sido realizado com o uso do fármaco nitro-heterocíclico benznidazol (Rochagan®). O fármaco nifurtimox (Lampit®), também utilizado no tratamento por muito tempo, teve sua produção descontinuada (Figura 2) (MUELAS et al., 2002; URBINA et al., 2003).

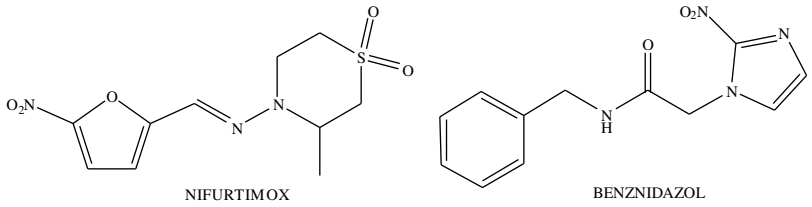


Figura 2 - Estrutura química dos fármacos Nifurtimox e Benznidazol.

Ambos os fármacos são usados na fase aguda da doença, mas suas eficácias variam de acordo com a área geográfica, provavelmente como consequência de variação de cepas do parasita. Ambos apresentam baixa eficácia e graves efeitos colaterais, sendo capazes de curar 60% das infecções recentes, o que pode ser observado pelo desaparecimento de sintomas e diminuição da parasitemia (DIAS; SCHOFIELD, 1999). O mecanismo de ação desses compostos está relacionado com a formação de espécies reativas de oxigênio (ânions radicalares), envolvidas no dano de componentes críticos celulares do parasita, a partir da redução do grupo nitroarílico (WILLIANS; LEMKE, 2002).

Algumas terapias alternativas a esses dois fármacos também têm sido testadas. O alopurinol foi utilizado para tratar fase aguda e crônica de tripanossomíases americanas, em regimes que variam consideravelmente em duração e dose, sendo a eficácia variável. Leon e colaboradores investigaram o resultado do efeito do tratamento com captopril na infecção com *T. cruzi* em ratos e concluíram que a administração de captopril reduziu de forma significativa necrose cardíaca bem como fibrose. Posteriormente, Braga e colaboradores, estudando os aspectos clínicos e terapêuticos da insuficiência cardíaca em decorrência da doença de Chagas, descobriram que a dose de alguns medicamentos utilizados para tratar insuficiência cardíaca era similar para pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica (TEMPONE et al., 2007).

Recentemente, os inibidores da biossíntese de ergosterol tais como cetoconazol, itraconazol e terbinafina, que são importantes no tratamento de doenças fúngicas, não foram suficientemente potentes para eliminar *T.cruzi* a partir de animais cronicamente infectados ou humanos. No entanto, na última década, novos derivados triazólicos, tais como os inibidores de esteróis C_{14}-α-demetilase (CYP51): posaconazol (SCH 56592, Schering-Plough Research Institute), TAK-187 (Takeda Chemical Company), e D0870 (Zeneca Farmacêutica), foram capazes de induzir cura parasitológica da doença de Chagas em modelos, tanto na fase aguda como crônica, sem efeitos colaterais tóxicos para os hospedeiros (GRAEBIN et al., 2009). É importante ressaltar que alguns desses compostos já estão em fase clínica, tais como TAK-187 (fase I completa) e posaconazol (fase II iniciada). Outros dois candidatos em avaliação clínica é o derivado azólico E12-24 (Eisai, Japão) (fase I completa) e o derivado vinil sulfona K-777 (Sandler Center for Drug Discovery, USA) (fase I em preparação), capaz de inibir a enzima cruzipaína de *T. cruzi* (CLAYTON, 2010).

A utilização de agente profilático também é uma solução desejável, devido à alta incidência de sangue contaminado em bancos de sangue (5 a 20%), sendo este mecanismo considerado como o segundo mais importante meio de transmissão em áreas endêmicas (COURA; De CASTRO, 2002). A única substância usada como agente quimioprofilático é a violeta de genciana (cloreto de N-[4-bis-[[4-(dimetilamino)-fenil]metileno]-2,5-ciclo-hexadien-1-ilideno]N-metilamônio) (Figura 3). Entretanto, seu uso é limitado devido aos efeitos colaterais e à coloração púrpura transferida à pele e às mucosas dos pacientes que recebem transfusão de sangue (WENDEL; GONZAGA, 1993).

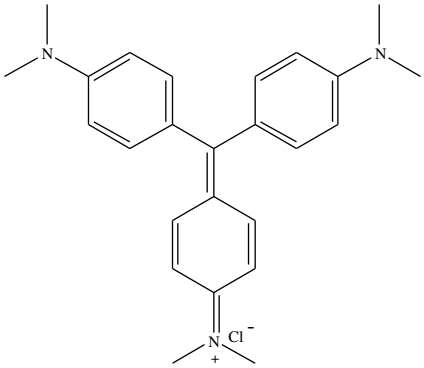


Figura 3 - Violeta de genciana: agente quimioprofilático.

1.1.3 Alvos terapêuticos

Os fatores atuais mais importantes na descoberta de novos fármacos envolvem o isolamento, identificação, e caracterização de novos compostos bem como de suas propriedades moleculares e cinéticas. A validação de um novo alvo por método químico ou genético tem conduzido, frequentemente, ao estudo da otimização das propriedades farmacológicas e toxicológicas de possíveis inibidores para o tratamento da doença de Chagas (GUHL; LAZDINS-HELDS, 2007).

A descoberta de novos alvos depende, em grande parte, da interpretação de informações contidas no genoma do *T. cruzi*. O sequenciamento e entendimento do genoma do parasita devem conduzir ao conhecimento aprofundado da relação estrutura-função de proteínas e exploração dos mecanismos de resistência a fármacos, diversidade antigênica, interação parasita-hospedeiro e patologia da doença (COURA; De CASTRO, 2002).

O sequenciamento concluído recentemente mostra que mais da metade do genoma do *Trypanosoma cruzi* (cepa CL Brener) é constituído por sequências repetidas. Estas sequências incluem genes para uma grande família de moléculas de superfície, incluindo *trans*-sialidases, proteases gp 63 e proteínas de superfície associadas à mucina (MASPs). Na superfície celular das formas tripomastigotas de *T. cruzi* são expressos vários grupos de proteínas, sendo que as moléculas de mucina e a enzima *trans*-sialidase (TS) fazem parte do grupo melhor caracterizado; as 223 unidades proteicas detectadas no genoma da TS são compostas de 15 genes capazes de codificar a enzima ativa (EL-SAYED, 2005).

Vários critérios devem ser considerados na seleção de inibidores potenciais. O alvo a ser explorado deve ser encontrado unicamente no parasita e, portanto, ausente na célula do hospedeiro; deve ser também essencial para o desenvolvimento do parasita em um dos estágios de seu ciclo replicativo. O uso de enzimas e metabólitos como alvos terapêuticos permite melhor investigação em termos mecanísticos e estruturais, além de contribuir significativamente para o planejamento racional de fármacos (FAIRLAMB, 1999).

Os alvos identificados que têm sido explorados para o planejamento racional de fármacos antichagásicos envolvem a inibição seletiva de enzimas fundamentais no desenvolvimento do parasita, entre elas vale mencionar:

- **Tripanotiona redutase** (KRAUTH-SIEGEL; COOMBS, 1999), relacionada ao estresse oxidativo.
- ***trans*-Sialidase** (PREVIATO et al., 1995; HARRISON et al., 2001), envolvida na glicosilação de mucinas de âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) para reconhecimento e adesão do parasita na célula do hospedeiro.
- **$C_{14}D^{24,25}$-esterol metiltransferase** (STTOPANI, 1999), essencial na biossíntese de ergosterol.
- **Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase** (PAVÃO et al., 2002), presente na via glicolítica.
- **Cisteína proteases (Cruzipaína)** (RAMOS et al., 2002; STEVERDING; TYLER, 2005), relacionadas à atividade proteolítica e penetração do parasita na célula do hospedeiro.
- **Diidrofolato redutase** (ZUCCOTTO et al., 1999), responsável pela geração de cofator na síntese “de novo” de timidina.
- **Prolil endopeptidase** (VENDEVILLE et al., 1999), envolvida na clivagem de pequenos peptídeos biologicamente ativos.
- **Hipoxantina-fosforibosiltransferase** (STTOPANI, 1999), essencial na síntese de nucleotídeos purínicos.
- **DNA topoisomerases I e II** (MUELAS-SERRANO et al., 2002; STEVERDING; TYLER, 2005), enzimas essenciais que catalisam alterações topológicas na molécula de DNA. Elas desempenham um papel fundamental no metabolismo do DNA, incluindo replicação, transcrição, recombinação e condensação.

- **Farnesilpirofosfato sintase** (MUELAS-SERRANO et al., 2002), envolvida na biossíntese de uma variedade de esteroides e poliisoprenoides a partir de farnesilpirofosfato.

1.2 *trans*-Sialidase

1.2.1 Invasão celular

O parasita intracelular *T. cruzi* desenvolve uma enzima regulatória de superfície, denominada *trans*-sialidase, envolvida nas interações entre célula do hospedeiro e parasita; etapa inicial no processo de infecção (PREVIATO et al., 1995). *T. cruzi* é incapaz de sintetizar ácido siálico, presente em glicoconjugados das células do hospedeiro, e através dessa enzima o parasita torna-se capaz de transferi-lo e incorporá-lo a moléculas de mucina, que estão ligadas à membrana parasitária através de âncora GPI (COREY et al., 2002; PEREIRA-CHIOCCOLA et al., 2000).

As glicoproteínas de mucina das formas tripomastigotas infectantes de *T. cruzi* possuem unidades terminais de α-galactose e β-galactose que funcionam como epítopos; sendo reconhecidos por anticorpos líticos anti-α-galactose (anti-α-gal). Dessa forma, a sialilação das moléculas de mucina pela ação da enzima *trans*-sialidase protege o parasita contra os mecanismos de defesa do hospedeiro, tornando-o resistente à ação de anticorpos líticos anti-α-gal e contribui, assim, para o tropismo tecidual exibido pelo parasita (PEREIRA-CHIOCCOLA et al., 2000).

1.2.2 Ácido siálico e mucinas

Dentre os carboidratos presentes nos glicoconjugados de membrana destacam-se os ácidos siálicos, uma família de carboidratos complexos de nove carbonos que ocorrem na natureza em cerca de 50 tipos (ANGATA et al., 2002). O ácido siálico mais abundante

existente em eucariontes é o ácido *N*-acetilneuramínico (Neu-5-Ac), que foi isolado pela primeira vez por Gottschalk e colaboradores (Figura 4) (DE NINNO, 1991).

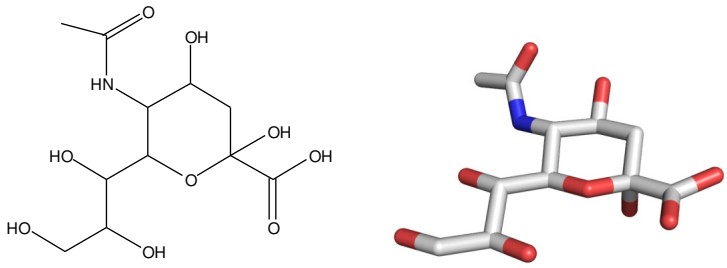


Figura 4 - Estruturas unidimensional e tridimensional do ácido *N*-acetilneuramínico.

As glicoproteínas de mucina são moléculas polianiônicas altamente glicosiladas, contendo cerca de 60% de carboidratos, e constituem uma barreira protetora na superfície parasitária (ACOSTA-SERRANO et al., 2001).

As glicoproteínas de mucina são moléculas multigalactosiladas, cujas unidades de galactose encontram-se ligadas, através de unidades de α-*N*-acetil-glicosamina (αGlcNAc), à cadeia peptídica com sequência rica em aminoácidos de Thr e Pro, como Thr-Thr-Thr-Thr-Thr-Thr-Thr-Thr-Ly-Pro-Pro ($Thr_8LysPro_2$) (Figuras 5 e 6). As moléculas de mucina sialiladas, insensíveis à ação de proteases presentes na membrana plasmática de *T. cruzi,* estão envolvidas no processo de aderência e subsequente penetração do parasita nas células do hospedeiro (AGRELLOS et al., 2003; PREVIATO et al., 1995).

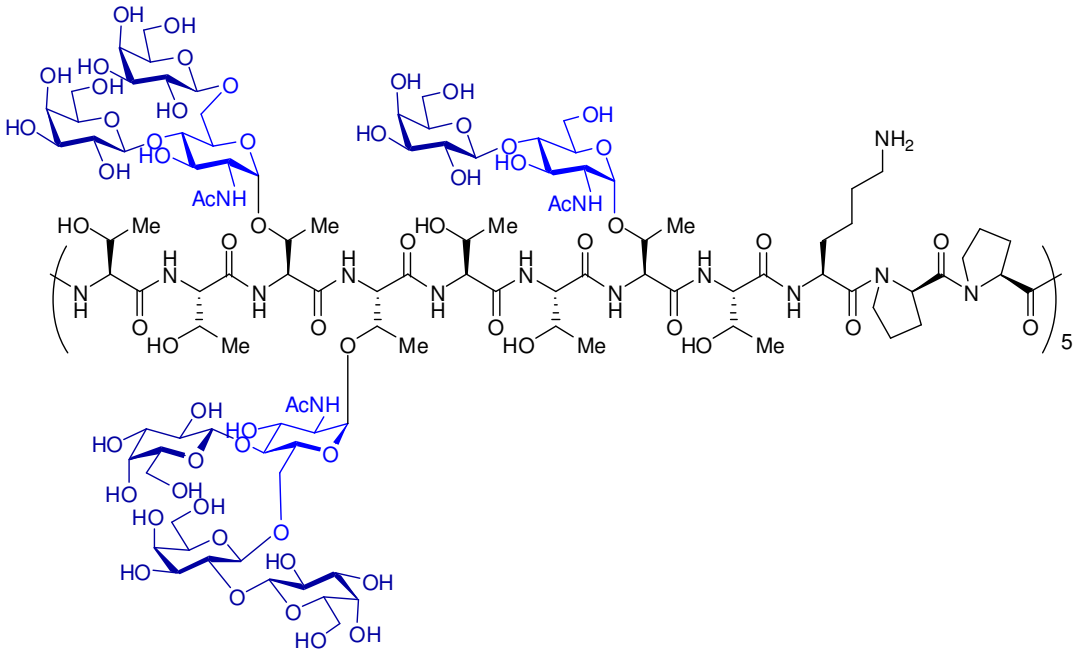


Figura 5 - Representação dos glicopeptídeos de mucina, contendo unidades multigalactosiladas ligadas à unidade repetitiva $Thr_8LysPro_2$.

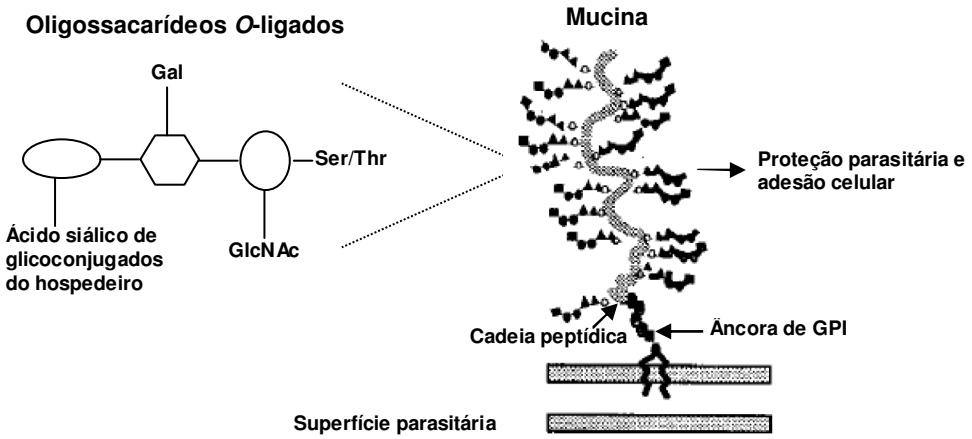


Figura 6 - Modelo estrutural de moléculas de mucina de *T. cruzi*.

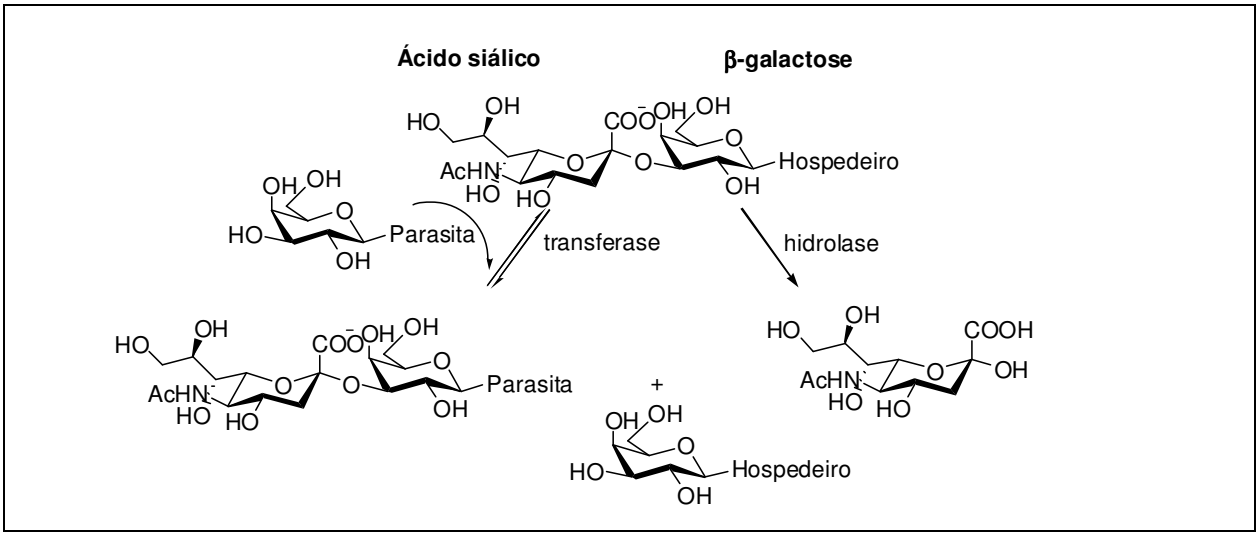
As moléculas de mucina de *T. cruzi* assemelham-se às de mamíferos, embora as unidades oligossacarídicas estejam ligadas à cadeia peptídica pela unidade de α-*N*-acetil-glicosamina (GlcNAc) e não *N*-acetil-galactosamina (GalNAc), como ocorre nos vertebrados (DI NOIA et al., 1996).

1.2.3 Atividade enzimática

A enzima *trans*-sialidase de *Trypanosoma cruzi* (TcTS) pertence à família de glicoproteínas de superfície do parasita e constitui um dos poucos exemplos naturais de glicosiltransferases superficiais encontradas em eucariontes. A enzima não pode utilizar ácido siálico livre, apenas transfere-o do hospedeiro para o parasita no sentido de controlar o nível de infecção (FRASCH et al., 1998).

trans-Sialidase tem duas atividades: uma hidrolase e outra transferase. Esta enzima é específica em catalisar, preferencialmente, a transferência de ácido siálico para moléculas de mucina, originando ligações α-2,3 com unidades de β-galactose aceptoras na superfície do parasita (RIBEIRÃO et al., 1997).

Apesar de ser primariamente classificada como transferase, promovendo reações reversíveis, *trans*-sialidase possui também ação residual hidrolítica (BUSCHIAZZO et al., 2002). Portanto, TcTS é uma sialiltransferase *in vivo* e *in vitro* na presença de substratos adequados de aceptores de açúcar, como β-galactose terminal de glicoconjugados (Esquema 1) (PARODI et al., 1992).



Esquema 1 - Reação de transferência e hidrólise de ácido siálico pela *trans*-sialidase.

1.2.4 Estrutura 3D de *trans*-Sialidase e mecanismo de ação

A clonagem do gene de *trans*-sialidase foi realizada por Schenkman e colaboradores (EGIMA et al., 1996). A enzima possui dois domínios distintos: um domínio catalítico-propulsor *N*-terminal (resíduos 1-371) estritamente associado, através de uma longa α hélice (resíduos 372-394), ao domínio *C*-terminal de lectina (resíduos 395-632) (BUSCHIAZZO et al., 2002). A estrutura de *trans*-sialidase de *T. cruzi* foi determinada a uma resolução de 1.6 Å e sua estrutura cristalográfica está disponível no PDB ("Protein Data Bank") (AMAYA et al., 2003).

Através do PDB, é possível ter acesso a vários complexos cristalográficos existentes entre a enzima TcTS e diferentes inibidores. A Figura 7 mostra a estrutura unidimensional e tridimensional do inibidor DANA (ácido 2-desóxi-2,3-dehidro-*N*-acetil neuramínico), análogo de ácido siálico, e o complexo cristalográfico (código PDB: 1MS8), deste inibidor com a enzima TcTS.

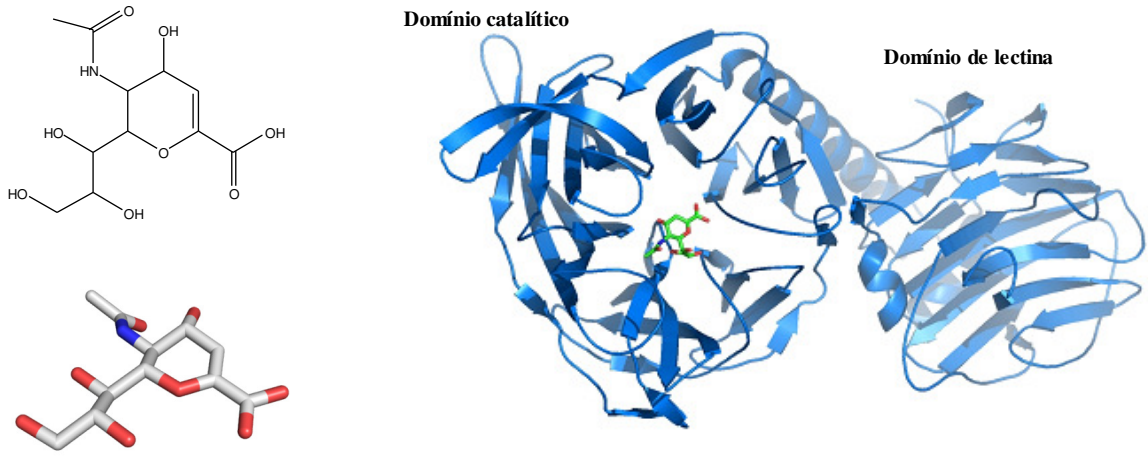


Figura 7 - Estruturas unidimensional e tridimensional do inibidor DANA e o complexo cristalográfico TcTS – DANA.

A arquitetura molecular do sítio ativo de TcTS possui várias características comuns a outras sialidases microbianas: uma tríade de aminoácidos Arg (Arg35, Arg245 e Arg314) que se liga ao grupo carboxilato presente em todos os derivados de ácido siálico, um ácido

glutâmico (Glu357) que estabiliza Arg35, um resíduo de ácido aspártico (Asp59), essencial para a atividade catalítica, e dois resíduos (Tyr342 e Glu230) na porção inferior do sítio ativo, os quais estão adequadamente posicionados para estabilizar os estados de transição reacionais (Figura 8).

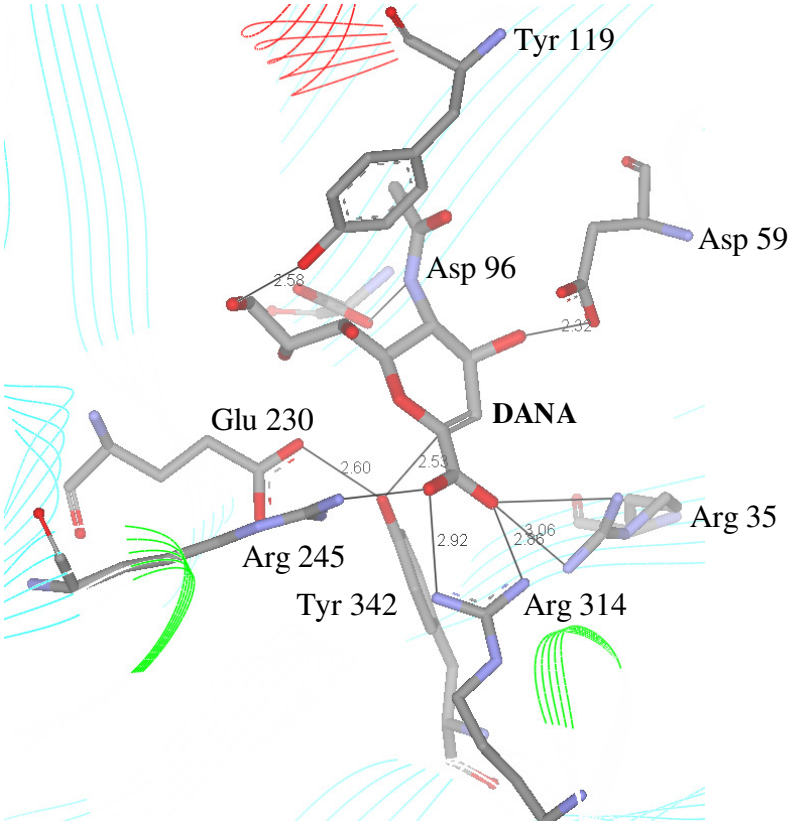


Figura 8 - Principais interações entre TcTS e DANA obtidas do PDB.

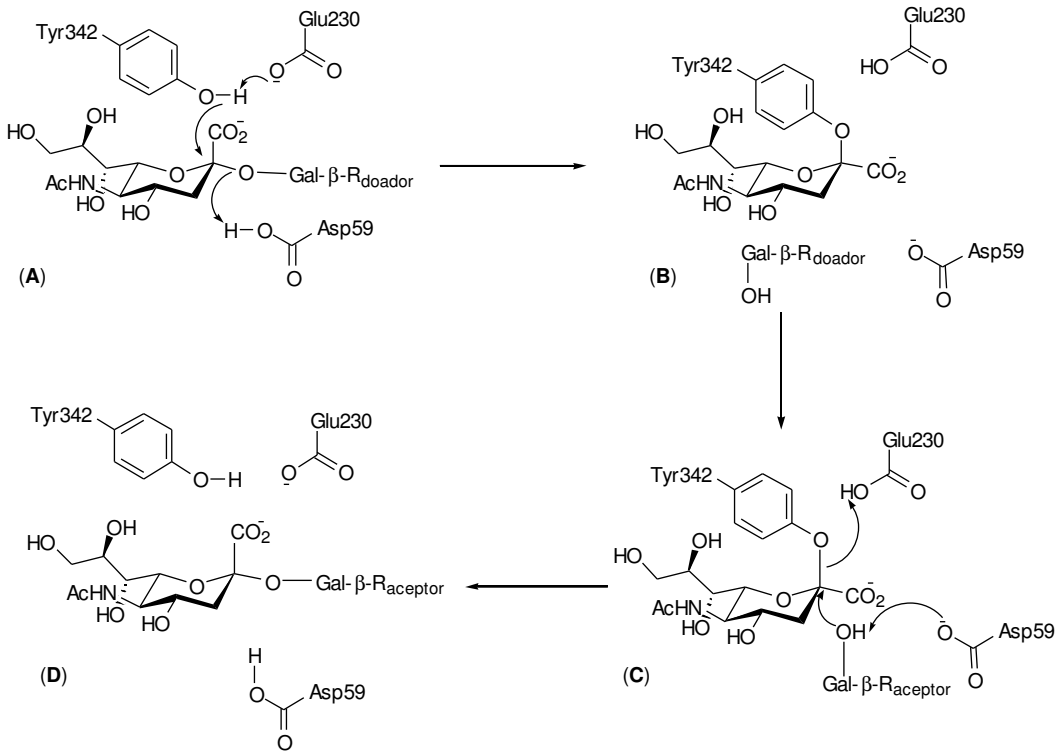
As principais funções dos resíduos de aminoácidos do sítio catalítico de TcTS, fundamentais para o processo de *trans*-glicosilação estão resumidas na tabela 1.

Tabela 1 - Principais aminoácidos do sítio catalítico de TcTS e suas funções.

Principais aminoácidos presentes no sítio catalítico de TcTS	**Funções dos resíduos de aminoácidos do sítio catalítico de TcTS no processo de *trans*-glicosilação**
Tríade de Arg: Arg35, Arg245 e Arg314	Ligam-se ao grupo carboxilato de ácido siálico.
Glu357	Estabiliza o resíduo de Arg35.
Asp59	É essencial para a catálise: realiza ligação de hidrogênio com 4-OH de ácido siálico e 3-OH de galactose.
Tyr342 e Glu230	Localizados na região inferior do sítio catalítico, estabilizam o estado de transição da reação de *trans*-glicosilação.
Val95, Leu176 e Trp120	Presentes na cavidade hidrofóbica, acomodam o grupo *N*-acetil.
Tyr119 e Tyr248	Estes resíduos, juntamente com os resíduos Trp120, Val203 e Trp312, definem o ambiente hidrofóbico que contribui para a exclusão de água do centro reacional, favorecendo a *trans*-glicosilação. Tyr119 também realiza ligação de hidrogênio com o resíduo de glicerol do ligante.
Pro283	Importante na *trans*-glicosilação em experimentos prévios de mutagênese.
Asp96	Sua orientação no sítio catalítico afeta a posição precisa de ácido siálico, pois interage com a porção glicerol.

A enzima TcTS catalisa a reação de *trans*-glicosilação por meio de um mecanismo conhecido como duplo-deslocamento ("ping pong"), tendo em vista que a ligação de lactose (substrato aceptor contendo galactose) ao sítio ativo enzimático ocorre somente após a entrada da molécula de ácido siálico (substrato doador) (Esquema 2). Após ligação do

substrato doador de ácido siálico, o grupo hidroxílico de Tyr342, com assistência de Glu230 atuando como base, realiza ataque nucleofílico ao C-2 do ácido (**A**), com deslocamento do grupo abandonador protonado e formação do intermediário TcTS-sialosídeo (**B**). Posteriormente, o grupo hidroxila 3-OH da molécula aceptora de lactose, na presença do resíduo Asp59 como base, realiza um segundo ataque nucleofílico ao C-2 do ácido (**C**), resultando em retenção de configuração da molécula de acido siálico (**D**) (NERES et al., 2008).



Esquema 2 - Mecanismo da reação de *trans*-glicosilação catalisada por TcTS.

1.2.5 Inibidores de *trans*-Sialidase de *T. cruzi*

Atualmente, abordagens no planejamento de fármacos em relação a vários alvos bioquímicos de *T. cruzi* têm sido revistas. Apesar da importância de TcTS para patogênese da doença de Chagas e seu surgimento como um alvo potencial, sua inibição sempre foi desafiadora por não haver inibidores potentes nem específicos relatados e, portanto, este alvo não havia sido devidamente validado (NERES et al., 2008; NERES et al., 2009).

Contudo, através de uma abordagem diferente, Buschiazzo e colaboradores reportaram a descoberta do inibidor mais pontente de TcTS até o momento. De acordo com o trabalho, o anticorpo monoclonal de camundongo 13G9 foi capaz de inibir a sialilação da superfície do parasita e a invasão celular, pois apresenta alta afinidade (subnanomolar) e especifidade pela enzima. Adicionalmente, com a determinação da estrutura cristalográfica do complexo TcTS-anticorpo 13G9 (código do PDB 3OPZ) foi possível observar que a cadeia leve do anticorpo bloqueia a mobilidade do resíduo de Tyr119, o que impede a entrada de substratos sialilados no sítio catalítico para que ocorra *trans*-glicosilação. Esses resultados contribuíram não apenas para reforçar a relevância biológica da enzima *trans*-sialidase, como também para validá-la como alvo no processo de descoberta de novos fármacos (BUSCHIAZZO et al., 2012).

Considerando a estrutura cristalográfica de TcTS, a maioria de seus inibidores foi classificada de acordo com a região do sítio ativo onde se ligam, ou seja, sítio de ligação de ácido siálico (doador) e sítio de ligação de β-galactose (aceptor) (GIORGI et al., 2010). Sendo assim, os inibidores de TcTS podem ser agrupados em três grandes categorias: i) miméticos de substrato doador (acido siálico), que se ligam na região do substrato doador, ii) miméticos de substratos aceptores (lactose e galactose), que se ligam na região do substrato aceptor e iii) miméticos de substratos duplos, que se ligam em ambas as regiões do sítio ativo (NERES et al., 2009).

1.2.5.1 Inibidores miméticos de substrato doador

Parte das estratégias aplicadas ao desenvolvimento racional de inibidores de neuraminidase de influenza (sialidase) foi utilizada durante a busca de inibidores de *trans*-sialidase, em virtude da similaridade dos sítios ativos e mecanismo catalítico dessas enzimas. Dentre as estratégias para concepção de novos inibidores específicos de TcTS, houve predominância significativa no uso de bioisosterismo como método de modificação molecular na estrutura de ácido siálico (Figura 9) (MOREIRA et al., 2009).

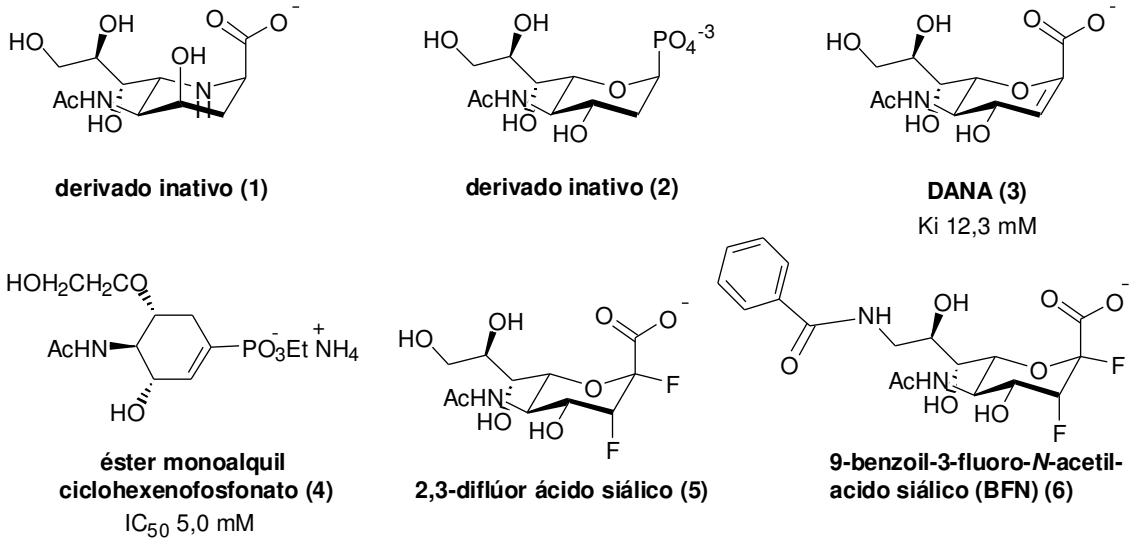


Figura 9 - Estruturas de inibidores miméticos de ácido siálico.

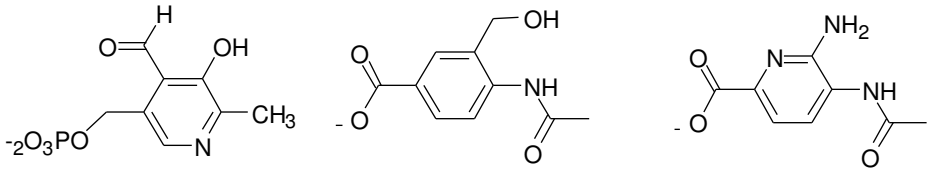
Num primeiro momento, o átomo de oxigênio do anel da estrutura de ácido siálico foi substituído por um átomo de nitrogênio e o grupo carboxila foi substituído por grupo fosfato, porém essas modificações resultaram em moléculas inativas (**1** e **2**) frente TcTS. Posteriormente, foi considerada a estrutura do estado de transição de reações de ácido siálico, o que levou à síntese do derivado **3** (DANA) (Ki 12,3 mM) através de restrição conformacional do anel e manutenção do farmacóforo básico (MOREIRA et al., 2009).

Apesar de ser potente inibidor de neuraminidase de influenza, DANA apresentou fraca inibição de TcTS mesmo apresentando interações favoráveis no sítio ativo. Este resultado mostra que diferenças entre alguns aminoácidos fundamentais no sítio ativo (responsáveis pela diferente atividade de TcTS) são também responsáveis pela baixa inibição observada para a molécula de DANA (BUSCHIAZZO et al., 2002; PARIS et al., 2005).

Uma abordagem também importante foi substituir o anel do ácido siálico por cicloexeno com simultânea mudança do grupo carboxila por fosfato. O resultado dessas modificações levou à síntese do composto **4** (IC_{50} 5,0 mM), que apresentou melhor atividade que DANA. No entanto, esse resultado não foi considerado satisfatório (STREICHER; BUSSE, 2006). Igualmente, a estratégia de fluoração do ácido siálico descrita por Buchini e

colaboradores levou à síntese de derivados de ácido siálico 2,3 difluorados (**5** e **6**), que inibiram a enzima TcTS de forma tempo-dependente e para completa inativação houve necessidade de concentrações muito elevadas dos inibidores (20,0 mM) (WATTS et al., 2003; BUCHINI et al., 2008).

Na busca por inibidores potentes, Ferrero-Garcia e colaboradores investigaram estruturas não-baseadas em carboidratos (Figura 10). Como resultado desse trabalho, foi descoberta atividade inibitória do composto **7** (piridoxal 5'-fosfato) (Ki 7,3 mM) (FERRERO-GARCIA et al., 1993). Posteriormente, Neres e colaboradores sintetizaram os derivados de ácido benzoico **8** (IC_{50} 0,54 mM) e de piridina **9** (IC_{50} 0,44 mM), que apresentaram atividade inibitória moderada. Adicionalmente, estudos de modelagem molecular foram conduzidos para ajudar na compreensão da relação estrutura-atividade (REA) desses compostos (NERES et al., 2007).



piridoxal fosfato (7) Ki 7,3 mM | **derivado de ácido benzoico (8)** IC_{50} 0,54 mM | **derivado de piridina (9)** IC_{50} 0,44 mM

Figura 10 - Estruturas de inibidores miméticos de ácido siálico não-baseados em carboidratos.

1.2.5.2 Inibidores miméticos de substratos aceptores

Alguns compostos foram planejados para ocupar exclusivamente o sítio aceptor de ácido siálico. Lactitol **10** (Figura 11) foi o melhor análogo de lactose descoberto até o momento para inibir a reação de transferência para substratos como lactose / *N*-acetillactosamina, com IC_{50} de 0,21 mM, sendo também verificado que este composto reduziu infecção em células de mamíferos em cerca de 20-27%. No entanto, este composto não inibe a atividade catalítica enzimática de TcTS, atuando somente como um aceptor

preferencial de ácido siálico se comparado com outros substratos convencionais (AGUSTI et al., 2004).

Oligossacarídeos de alditóis, tais como tetra- e pentassacarídeo alditóis, contendo uma unidade externa de galactofuranose **11** (Figura 11) foram também sintetizados por Agusti e colaboradores como potenciais substratos para a transferência de ácido siálico, inibindo a transferência de ácido siálico para o substrato aceptor *N*-acetillactosamina com valores de IC_{50} entre 0,6 e 4,0 mM (AGUSTI et al., 2007).

Tendo em vista que compostos ativos tais como lactitol apresentaram baixa meia-vida plasmática devido à elevada excreção renal ou inativação por enzimas plasmáticas, foi realizada conjugação de derivados de lactose com polietileno glicol (PEG) visando ao aumento da biodisponibilidade. Dessa forma, o composto **12** apresentou a maior taxa de inibição de transferência (82%), com IC_{50} de 0,34 mM, enquanto os derivados **13** e **14** apresentaram somente 21% (IC_{50} 2,7 mM) e 3,5% (IC_{50} 4,52 mM) de inibição, respectivamente (Figura 11) (GIORGI et al., 2010).

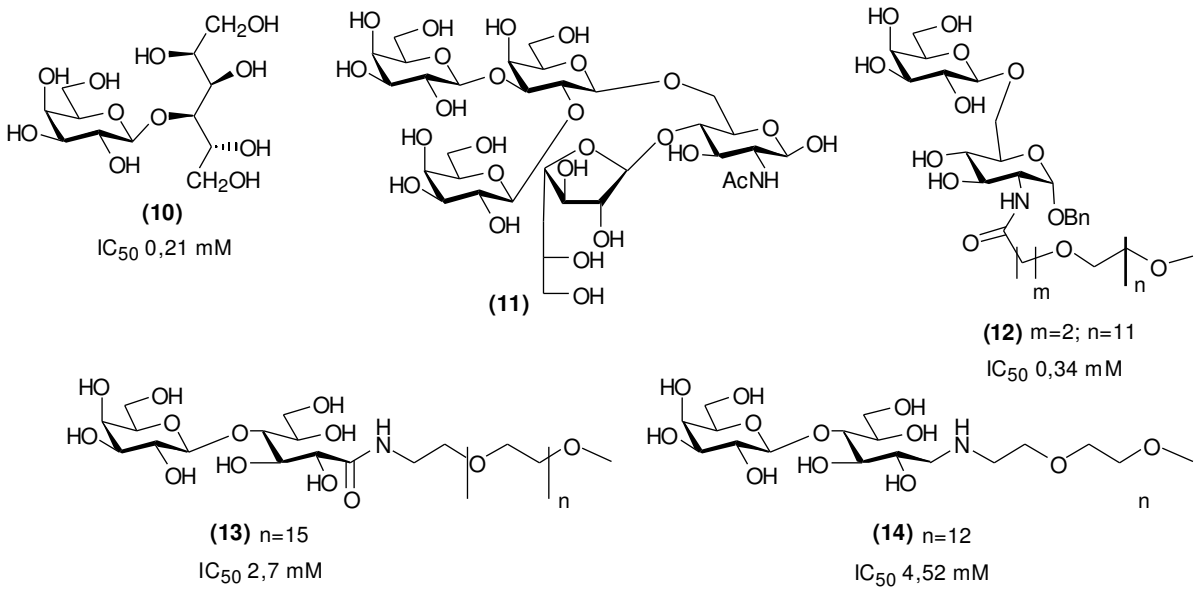


Figura 11 - Derivados miméticos de substratos aceptores de acido siálico.

1.2.5.3 Inibidores miméticos de substratos duplos

Dentre os inibidores planejados para ocupar a região do doador e do aceptor no sítio ativo, estão os derivados fosforilados de galactose **15** (IC_{50} 3,0 mM) e **16** (IC_{50} 1,5 mM) e o derivado de glangliosídeo **17**, tido como um dos mais potentes inibidores por apresentar valores de IC_{50} na ordem de 100 µM (Figura 12) (BUSSE et al., 2007; VANDEKERCKHOVE et al., 1992). Considerando este último resultado, a literatura tem sugerido que a melhor estratégia para inibir a enzima deva envolver estruturas que ocupem tanto o sítio ativo doador quanto o sítio ativo aceptor, representando inibidores de substratos duplos (NERES et al., 2009).

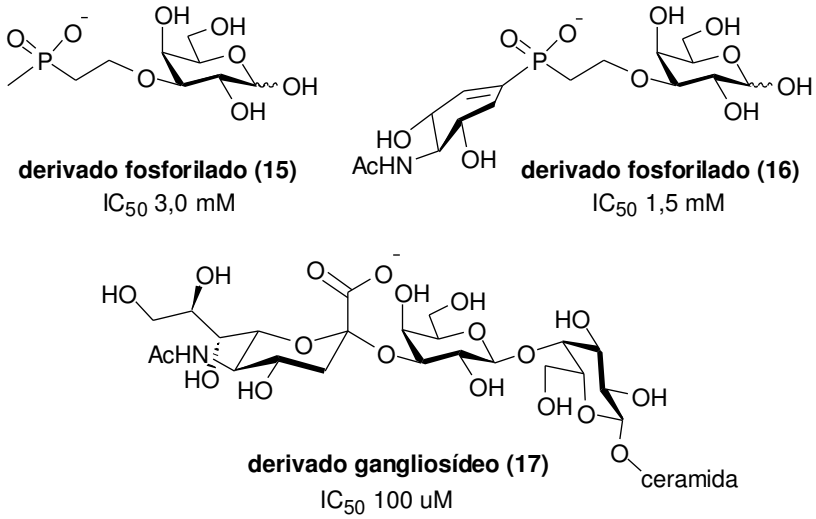
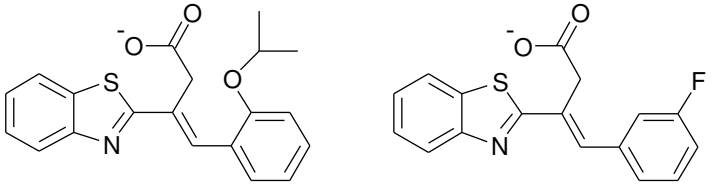


Figura 12 - Estruturas de derivados miméticos de substratos duplos de TcTS.

Dessa forma, Neres e colaboradores reportaram a descoberta de inibidores mais ativos de TcTS a partir de triagem virtual de bibliotecas de compostos comercialmente disponíveis, considerando a efetividade das interações desses compostos no sítio ativo de TcTS, por estudos de modelagem molecular, como critério para aquisição dos mesmos. Dentre 23 compostos selecionados e testados, quatro apresentaram inibição acima de 50%, sendo as maiores atividades atribuídas aos derivados benzotiazol **18** (IC_{50} 0,15 mM) e **19** (IC_{50} 0,12 mM) (Figura 13) (NERES et al., 2009).

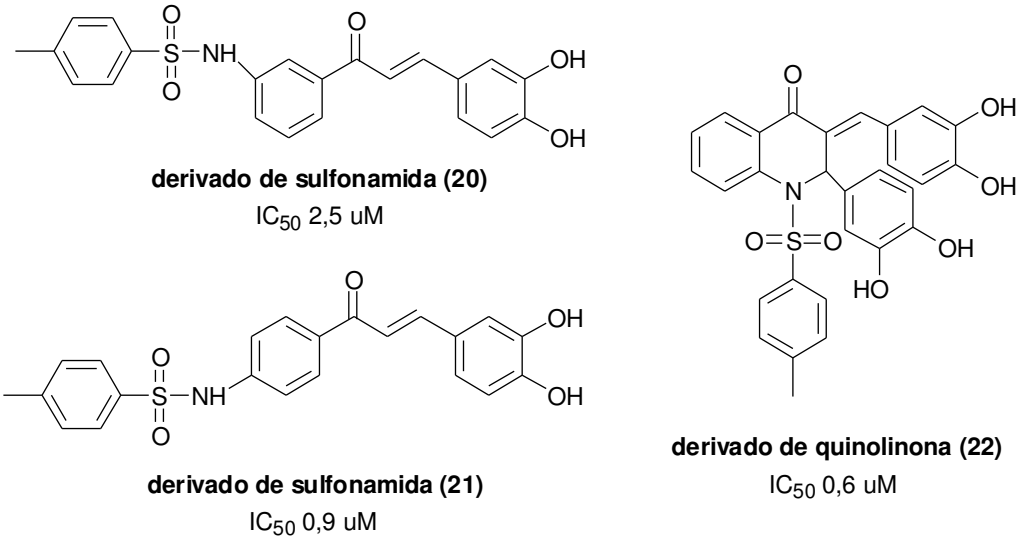


(18) **(19)**

IC_{50} 0,15 mM IC_{50} 0,12 mM

Figura 13 - Estruturas de derivados benzotiazol miméticos de substratos duplos.

Visando também à descoberta de inibidores de substratos duplos através de síntese, vários autores descreveram trabalhos relevantes nesse processo. Uma série de sulfonamidas contendo chalconas hidroxiladas e derivados de quinolinona foram recentemente descritas por Kim e colaboradores como potentes inibidores de TcTS (KIM et al., 2009). É importante ressaltar que a síntese dos compostos **20** (IC_{50} 2,5 µM), **21** (IC_{50} 0,9 µM) e **22** (IC_{50} 0,6 µM) (Figura 14) representou grande avanço na busca de potentes inibidores de TcTS, uma vez que a enzima foi inibida em concentração submicromolar. Recentemente, estudos de modelagem molecular do derivado quinolinona **22** demonstraram interações relevantes do grupo sulfona com a tríade de arginina e dos anéis aromáticos com Tyr119 e Trp312, ou seja, o derivado **22** ocupa as duas regiões do sítio ativo (LIMA et al., 2012).



derivado de sulfonamida (20)

IC_{50} 2,5 uM

derivado de sulfonamida (21)

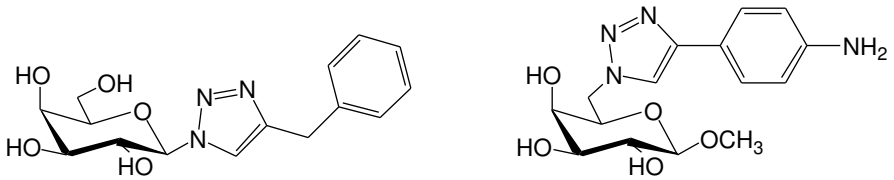
IC_{50} 0,9 uM

derivado de quinolinona (22)

IC_{50} 0,6 uM

Figura 14 - Estruturas de derivados de sulfonamida e quinolinona como inibidores de TcTS.

Alguns autores investigaram a síntese e avaliação biológica de bibliotecas de galatosilmiméticos. Nesse sentido, Carvalho e colaboradores relataram estudos de uma biblioteca com 46 derivados galactosil triazólicos substituídos na posição C-1 ou C-6 do açúcar. Apesar dos derivados apresentarem grande diversidade estrutural, as melhores inibições na concentração de 1,0 mM foram observadas apenas para os derivados **23** (37%) e **24** (34%) (Figura 15) (CARVALHO et al., 2010a).

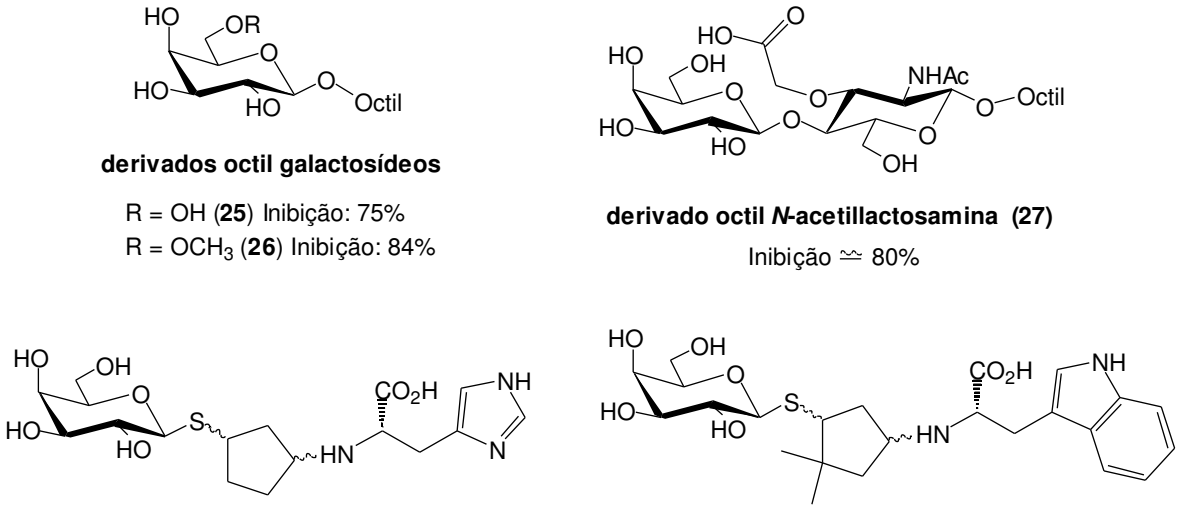


(23) Inibição: 37%

(24) Inibição: 34%

Figura 15 - Estruturas de derivados galactosil triazólicos como inibidores de TcTS.

Harrison e colaboradores também descreveram a síntese e avaliação biológica de bibliotecas. Os melhores derivados octil galactosídeos (**25** e **26**) e octil *N*-acetillactosamina (**27**) apresentaram inibição próxima de 80%, porém os melhores derivados tiogalactosídeos (**28** e **29**) apresentaram inibição próxima de 60% (Figura 16) (HARRISON et al, 2011).



derivados octil galactosídeos

R = OH (**25**) Inibição: 75%
R = OCH_3 (**26**) Inibição: 84%

derivado octil *N*-acetillactosamina (27)

Inibição ≃ 80%

derivado tiogalactosídeo (28)

Inibição ≃ 60%

derivado tiogalactosídeo (29)

Inibição ≃ 60%

Figura 16 - Estruturas dos derivados mais ativos nos ensaios de inibição com TcTS.

Uma abordagem interessante descrita por Giorgi e colaboradores, foi a conjugação covalente de oseltamivir com derivados de galactose (Figura 17). No entanto, os valores de IC_{50} dos melhores compostos (**30** a **33**) não foram muito expressivos (IC_{50} 2,16 mM a 4,26 mM), indicando que a conjugação com oseltamivir não afeta a interação do aceptor com a região de ligação do açúcar (GIORGI et al., 2011).

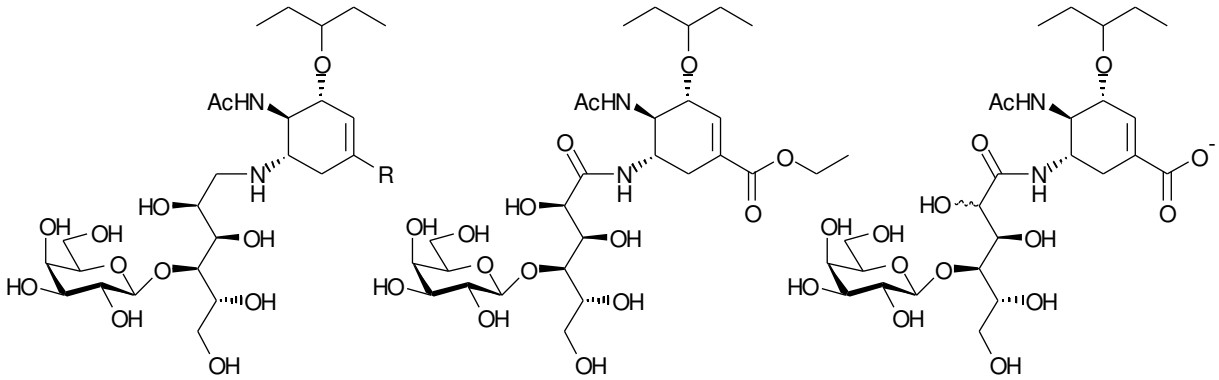
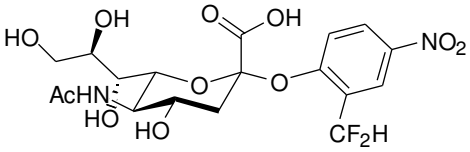


Figura 17 - Estruturas de derivados conjugados com oseltamivir e seus valores de IC_{50}.

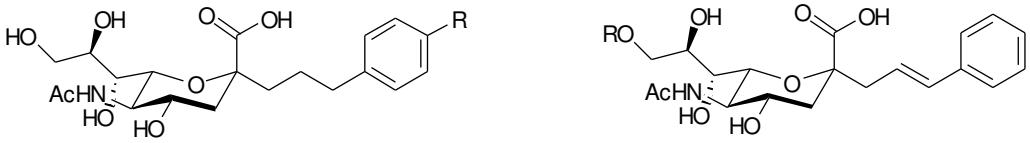
Por outro lado, alguns autores investigaram a síntese e avaliação biológica de sialilmiméticos. Nesse sentido, Carvalho e colaboradores mostraram que o ácido 2-difluorometil-4-nitrofenil-3,5-dideoxi-D-glicero-D-α-galacto-2-nonulopiranosídeo (NeuNAcFNP) (**34**) inibiu a enzima de forma irreversível (Figura 18). Adicionalmente, o composto **34** foi capaz de reduzir invasão celular parcialmente, o que evidenciou de forma direta que TcTS está envolvida na invasão de células hospedeiras (CARVALHO et al., 2010b).



NeuNAcFNP (34)
I_{50} 0,57 mM

Figura 18 - Estrutura do derivado sialilmimético capaz de inibir TcTS irreversivelmente.

Considerando a importância de ligantes aromáticos que pudessem ser introduzidos na molécula de ácido siálico para alcançar a região de ligação do sítio aceptor, Meike e colaboradores sintetizaram vários *C*-sialosídeos (**35** a **38**) e determinaram suas constantes de afinidade (Figura 19) (MEINKE et al, 2011). As constantes foram obtidas por ressonância plasmônica de superfície (SPR) e o derivado com maior afinidade foi **35** (Kd 0,16 mM).

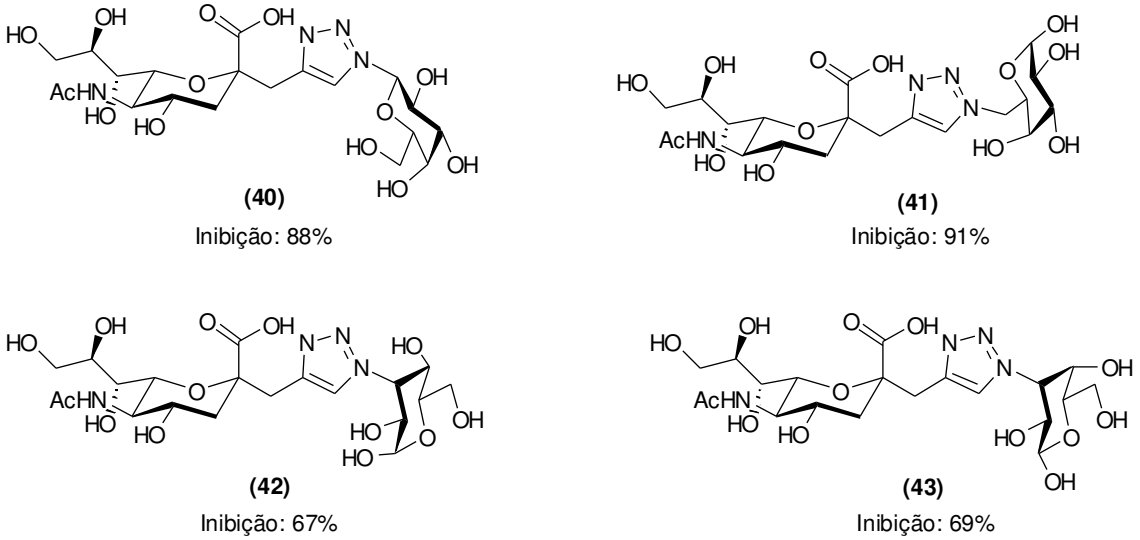


R = H (**35**) Kd 0,16 mM
R = NH_2 (**36**) Kd 0,35 mM
R = NHAc (**37**) Kd 3,9 mM

R = H (**38**) Kd 3,6 mM
R = $CH_2C_6H_5$ (**39**) Kd 2,0 mM

Figura 19 - Estrutura de derivados sialilmiméticos e suas constantes de afinidade por TcTS.

Recentemente, Campo e colaboradores descreveram a síntese de alguns neoglicoconjugados sialilmiméticos (Figura 20). Através de "click chemistry" (cicloadição 1,3-dipolar) esses derivados 1,2,3 triazólicos contendo galactose (**40** e **41**), glicose (**42**) e gulose (**43**) foram testados na concentração de 1,0 mM e apresentaram atividade inibitória entre 67% a 91%. Estudos de modelagem molecular também foram realizados a fim de verificar as principais interações desses compostos no sítio ativo de TcTS (CAMPO et al., 2012).



(40)
Inibição: 88%

(41)
Inibição: 91%

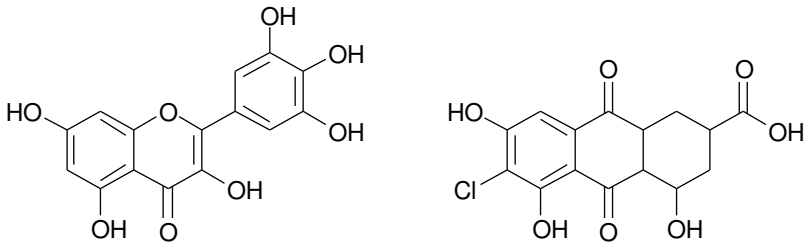
(42)
Inibição: 67%

(43)
Inibição: 69%

Figura 20 - Estruturas de neoglicoconjugados sialilmiméticos testados em TcTS.

1.2.5.4 Inibidores oriundos de produtos naturais

Considerando a grande diversidade química de produtos naturais, Arioka e colaboradores identificaram derivados de flavonoide e antraquinona com potente atividade inibitória de TcTS (ARIOKA et al., 2010). A partir de triagem biológica de uma biblioteca contendo 2283 produtos naturais, os compostos mais ativos foram **44** (IC_{50} 17,0 µM) e **45** (IC_{50} 0,58 µM) (Figura 21). É importante destacar que o derivado **45** não demonstrou atividade inibitória frente à neuraminidase humana, tornando-o seletivo para TcTS (ARIOKA et al., 2010).



(44) IC_{50} 17,0 uM

(45) IC_{50} 0,58 uM

Figura 21 - Estruturas de derivados de flavonoide e antraquinona como inibidores de TcTS.

1.3 Química de carboidratos

Os carboidratos constituem a classe de moléculas mais abundante, diversa e complexa da natureza e podem ser encontrados nos sistemas biológicos como monossacarídeos, oligossacarídeos e glicoconjugados (glicoproteínas, glicolipídeos etc). Essas características, bem como suas diversas funções nos organismos vivos, justificam a importância de estudos direcionados à química e à biologia dessas moléculas. (NICOLAOU; MITCHELL, 2001; WERZ; SEEBERGER, 2005).

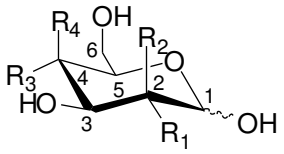
Com relação à química, a síntese de oligossacarídeos apresenta dois pontos cruciais: i) a obtenção de produtos com estereosseletividade desejada durante reações de glicosilação envolvendo a posição anomérica (C-1) e ii) a diferenciação dos grupos

hidroxílicos, que possuem reatividade similar (SEEBERGER; HAASE, 2000). Por essa razão, a síntese de carboidratos exige o emprego de estratégias de proteção e desproteção altamente seletivas das hidroxilas, ocasionando aumento do número de etapas da rota sintética (LINDBERG et al., 2002; JIN et al., 2008).

Por outro lado, a utilização de enzimas (glicosiltransferases, glicosidases, lipases etc) é uma alternativa à síntese tradicional de carboidratos, pois reduz ou elimina o emprego de grupos protetores e conduz à formação de ligações glicosídicas de forma estéreo e regioespecífica. Sendo assim, mediante abordagem quimioenzimática é possível obter oligossacarídeos e glicoconjugados com menor número de etapas e maior rendimento (SADDAM, et al., 2009; TOLBORG et al., 2002).

A escolha do grupo protetor e as condições reacionais para introduzi-lo ou removê-lo são fundamentais durante o planejamento sintético, uma vez que as reações devem ser químio, régio ou estereosseletivas. As classes de grupos protetores mais comuns em carboidratos são: acetais (isopropilideno e benzilideno), ésteres (acetato e benzoato), éteres (benzila, tritila e allila) e éteres de silila (trimetilsilila - TMS, t-butildimetilsilila - TBDMS, t-butildifenilsilila - TBDPS) (PEI et al., 2007).

Além disso, a reatividade das hidroxilas do açúcar deve ser levada em consideração (Figura 22). As duas hidroxilas mais reativas nas piranoses são a primária e a anomérica, porém não existe uma regra geral para discriminar a reatividade das outras hidroxilas secundárias, uma vez que dependem da configuração em que estão no anel (axial ou equatorial) e também dos reagentes e condições reacionais. Contudo, sabe-se que as hidroxilas em equatiorial são estericamente mais acessíveis em relação às axiais e por isso tendem a reagir mais rapidamente (FERRIER; COLLINS, 1996; PÉTURSSON, 1997).



R_1= H, R_2=OH, R_3=OH, R_4=H manose

R_1= OH, R_2=H, R_3=OH, R_4=H glicose

R_1= OH, R_2=H, R_3=H, R_4=OH galactose

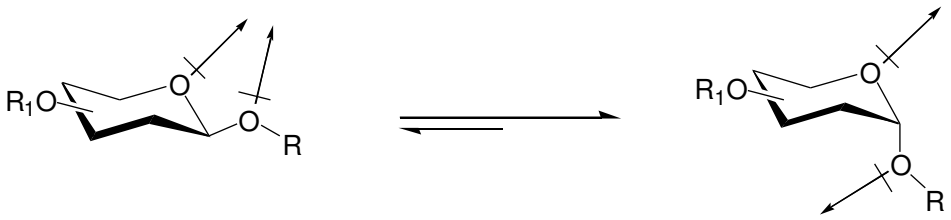
hidroxila primária, hidroxila anomérica, demais hidroxilas secundárias

← aumento da reatividade

Figura 22 - Estrutura química de algumas piranoses e reatividade de suas hidroxilas.

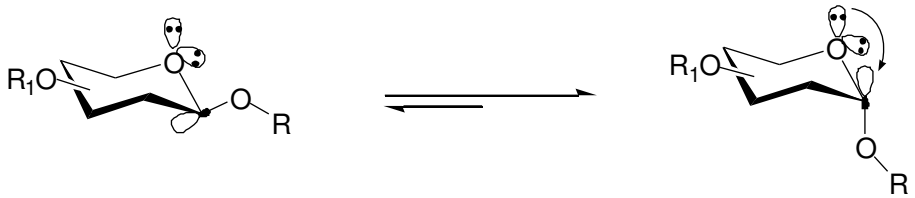
De maneira geral, os grupos protetores mais volumosos (TBDPS, TBDMS, tritila, tosila etc) protegem de forma regiosseletiva a hidroxila primária, que é mais reativa que as secundárias, e também podem ser removidos de forma seletiva (FERRIER; COLLINS, 1996; PÉTURSSON, 1997).

Em relação à hidroxila anomérica é importante destacar o conceito do efeito anomérico, que pode ser entendido como um efeito estereoeletrônico que descreve a tendência de um substituinte, adjacente ao heteroátomo do anel tetraidropirano, preferir orientação axial ao invés da equatorial. Quando o substituinte está na posição equatorial, ocorre alinhamento dos vetores de momento de dipolo causando repulsão entre os oxigênios. Por outro lado, quando o substituinte está na posição axial os vetores de momento de dipolo ficam opostos, representando um sistema energeticamente favorecido por não haver repulsão (Esquema 3) (JUARISTI; CUEVAS, 1992; DA SILVA, 2011).



Esquema 3 - Representação dos dipolos alinhados e opostos nas posições β e α, respectivamente.

Uma explicação alternativa e bastante aceita é a existência de estabilização eletrônica (hiperconjugação) entre um dos pares de elétrons não compartilhados do oxigênio do anel e o orbital sigma antiligande da ligação axial. A sobreposição é eficiente apenas quando um dos pares de elétrons está em posição antiperiplanar ao LUMO (orbital molecular desocupado de mais baixa energia) da ligação axial (Esquema 4). É importante ressaltar que a magnitude do efeito anomérico depende do tipo de substituinte ligado ao carbono anomérico, dos outros substituintes ligados ao anel e até mesmo do solvente. (CAREY; SUNDBERG, 2000; DA SILVA, 2011).



Esquema 4 - Influência dos elétrons do oxigênio no orbital antiligante da ligação axial.

Em relação às hidroxilas secundárias de piranosídeos, uma estratégia muito aplicada é a proteção com acetais. Uma propriedade importante desses grupos protetores é a formação de anéis de 5 membros (isopropilideno) ou 6 membros (benzilideno) na presença de hidroxilas vicinais (Figura 23). Dessa forma, as hidroxilas das posições 3,4 (**A**) e 4,6 (**B**) são protegidas de forma simultânea, seletiva e com alto rendimento (PÉTURSSON, 1997).

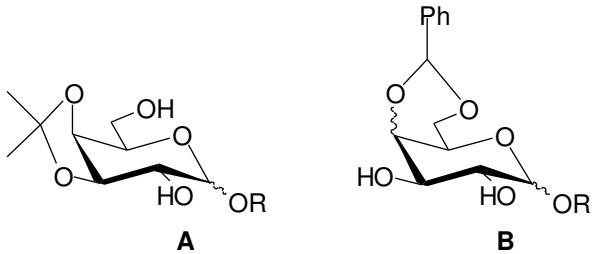


Figura 23 - Proteção seletiva das hidroxilas 3,4 (**A**) e 4,6 (**B**) com cetais e acetais.

No caso da estrutura **A**, a diferença de reatividade entre a hidroxila primária (C-6) e secundária (C-2) fica evidenciada, o que facilita a proteção de uma em detrimento da outra. Em **B**, a diferença de reatividade pode ser atribuída à existência de ligações de hidrogênio

internas (LHI), que alteram bastante sua acidez (Figura 24). Como Ha está envolvido na LHI, este se torna menos ácido que Hb, logo Hb pode ser desprotonado primeiro por uma base. Uma vez desprotonada a hidroxila em C-3, a LHI diminuirá ainda mais a acidez do hidrogênio Ha, o que amplifica a discriminação das duas hidroxilas, levando a um alto nível de regiosseletividade (WANG et al., 2004).

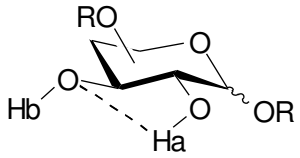


Figura 24 - Efeito da ligação de hidrogênio interna em dióis de piranosídeos.

Outra estratégia para diferenciar reatividade de hidroxilas secundárias em piranosídeos é a utilização de óxido de dibutilestanho (DBTO). Reagente muito usado em química de carboidratos, o DBTO forma derivados estanilenos cíclicos nas posições 2,3 (**C**, **D**), 3,4 (**E**) e 4,6 (**F**) (Figura 25) que aumentam a nucleofilicidade de um dos átomos de oxigênio envolvidos resultando em reações de alquilação, acilação e sulfonação regiosseletivas. Contudo, sabe-se que fatores como quantidade de DBTO, natureza do grupo protetor, presença de nucleófilo, polaridade do solvente e posição da hidroxila no anel influenciam no resultado final dessas reações (FERRIER; COLLINS, 1996; GRINDLEY, 1998; DONG et al., 2007).

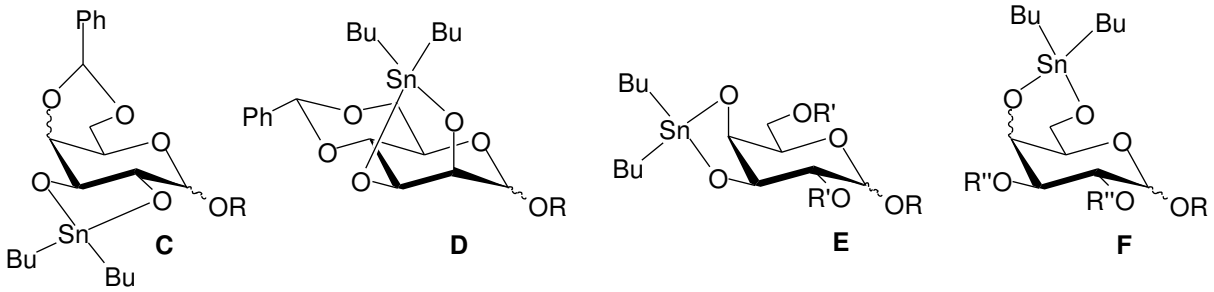


Figura 25 - Formação de estanilenos cíclicos em alguns piranosídeos.

Como citado anteriormente, o maior desafio na síntese de carboidratos não está relacionado apenas ao controle estereosseletivo de reações de glicosilação na posição anomérica, mas também à obtenção estratégica de unidades monossacarídicas com uma posição livre (grupo hidroxila) em relação às demais posições protegidas (WANG et al., 2007). Contudo, diante da imensa variedade de grupos protetores utilizados em química orgânica e dos diversos tipos de monossacarídeos, seria praticamente impossível abranger todos os casos descritos na literatura. Adicionalmente, existem vários métodos, condições e reagentes que são específicos para determinar seletividade de hidroxilas de muitos monossacarídeos.

1.4 Modelagem molecular

Desde a concepção de um alvo biológico até a descoberta de um novo fármaco, processo que pode levar em média 11 anos ou mais, o uso de ferramentas computacionais, como bioinformática e química computacional (genericamente citada como modelagem molecular), tem se tornado indispensável no planejamento racional de novos fármacos. Com alguns casos de sucesso envolvendo o emprego de métodos computacionais, de acordo com Manuel Peitsch, da Novartis Institutes for BioMedical Research, o processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos é totalmente dependente de métodos computacionais (MARSHALL, 2004; PEITSCH, 2004).

O planejamento racional de fármacos consiste no uso de um conjunto de ferramentas que auxiliam em decisões racionais durante as etapas do processo de descoberta (ZOETE et al., 2009). O planejamento baseado na estrutura e no mecanismo de ação é o método mais eficiente e menos dispendioso para o desenvolvimento de novos fármacos; capaz de contribuir em todos os estágios do processo, desde a descoberta de protótipos (também conhecidos como “lead compounds”), sua otimização (com respeito à afinidade, especificidade, eficácia e efeitos colaterais) e elaboração de compostos candidatos a testes clínicos (MARSHALL, 2004).

Este método é baseado na inibição ou estimulação da atividade biológica de macromoléculas, tais como proteínas ou ácidos nucleicos (DNA ou RNA) associados a diferentes doenças. A informação estrutural do biorreceptor (e ligantes) permite a descoberta e o planejamento de síntese de compostos com complementaridade estérica, hidrofóbica e eletrostática ao seu sítio de ligação, os quais podem se tornar fármacos e ser introduzidos na terapêutica (MARSHALL, 2004).

Dentre as ferramentas utilizadas no planejamento racional, destaca-se o "docking" molecular. Através desse método, são investigadas possíveis orientações que determinada molécula assume no interior do sítio ligante de um biorreceptor, ou simplesmente entre duas moléculas, tal como é o caso da interação entre proteína-proteína ou proteína-DNA, caracterizando o "docking" macromolecular. O "docking" molecular proporciona conhecimento básico das interações que ocorrem entre o ligante e seu receptor, demonstrando uma estimativa de afinidade importante para posterior otimização do ligante (ZOETE et al., 2009).

Os métodos de "docking", em geral, envolvem uma função de energia contendo parâmetros eletrostáticos, de van der Waals, de ligação de hidrogênio e, algumas vezes, hidrofóbicos, os quais geram modelos matemáticos que predizem as melhores orientações de um ligante, segundo uma lista de "score" de energia. Dessa forma, a ideia geral contida nas técnicas de "docking" é a de gerar um leque de conformações do complexo ligante-proteína e ordená-las por "score" com base em suas estabilidades (ALONSO et al., 2006).

As versões dos programas de maior sucesso em "docking", FlexE (SYBYL USER GUIDE, 2005), GOLD (PFEIFFER-MAREK et al., 2003) e GLIDE (FRIESNER et al., 2004; HALGREN et al., 2004), consideram a flexibilidade do ligante e também de algumas cadeias laterais do sítio receptor. A partir desse método, é possível selecionar por triagem virtual compostos de bases de dados contendo tipicamente milhares de estruturas, eliminando compostos não promissores antes que eles sejam sintetizados.

A triagem virtual é utilizada para a seleção de novos protótipos, e a literatura tem reportado diversos casos de sucesso com o uso desse método, tal como a descoberta de

isoflavonoides como inibidores não-esteroidais da 5α-redutase, utilizando "constraint" farmacofórica (BRENK et al., 2003; CHEN et al., 2001). O farmacóforo representa o conjunto de domínios funcionais das moléculas ligantes através dos quais se definem os tipos de interação que os ligantes em comum fazem com o sítio receptor. Dessa forma, a análise por métodos computacionais dos possíveis conjuntos de grupos farmacofóricos associados a cada molécula ativa, permite a derivação do padrão farmacofórico comum ao conjunto de análogos ativos em questão (MARSHALL, 2004).

Um diferente e robusto método de planejamento racional de fármacos, agora direcionado à otimização "in silico" de protótipos, consiste em investigar as condições energéticas entre moléculas, as quais se aproximam uma da outra gerando os campos de interação molecular ("Molecular Interaction Field" - MIF). Os MIFs descrevem a variação da energia de interação entre uma molécula alvo e um grupo químico de prova que se move confinado ao interior de um "grid" 3D, o qual é posicionado de modo a mapear a região de interesse do alvo molecular (o sítio ligante). As diferentes provas que usualmente são testadas refletem as características químicas que deveriam possuir o ligante ideal ou fragmentos de sua estrutura (INSIGHT II USER GUIDE, 2005).

Em relação ao processo de descoberta de novos fármacos, já é possível estimar propriedades farmacocinéticas, farmacodinâmicas e propriedades "drug-like" ou "lead-like" de diferentes compostos, selecionando, durante as diversas etapas da modelagem, somente aqueles com potencial de serem fármacos. Assim, propriedades tais como absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) podem ser preditas a partir de triagem em bancos de dados contendo informações específicas, as quais são computadas para uma grande variedade de compostos (TESTA et al., 2005). Dentre os programas mais utilizados para esses fins, destacam-se o Meteor (predições de metabolismo) e Derek (predições de toxicidade).

5. CONCLUSÕES

A pesquisa bibliográfica ao longo do trabalho foi fundamental para expansão dos objetivos propostos inicialmente de síntese, com a finalidade de gerar maior diversidade estrutural de análogos de galactose. Frente às dificuldades encontradas na síntese, é importante destacar que os métodos utilizados na preparação de vários compostos foram reavaliados, repetidos e/ou alterados a fim de que os rendimentos fossem otimizados. Em alguns casos, nos quais os resultados permaneceram insatisfatórios, foram propostas rotas alternativas para síntese de outros intermediários. Dessa forma, o trabalho permitiu a síntese e elucidação estrutural de vários intermediários galactosídicos, bem como de seus derivados com ácido succínico em todas as posições do anel, os quais são inéditos na literatura. Na etapa de desproteção dos grupos acetila houve clivagem do ácido succínico por metanólise, logo outros métodos precisam ser investigados para solucionar o problema. A desproteção dos grupos benzila permitiu a obtenção do derivado com ácido succínico na posição 4 (**85**). O maior tempo investido na síntese dos intermediários impossibilitou o trabalho com ácido benzoico, também proposto incialmente no trabalho.

Com relação aos estudos de modelagem molecular, os resultados obtidos na determinação do padrão farmacofórico a partir dos melhores inibidores de *trans*-sialidase e na determinação dos sítios de interação virtual a partir do mapeamento do sítio ativo foram importantes, pois conduzirão o grupo de pesquisa a um consenso quanto aos campos moleculares, que serão usados como “filtros” para as 50 moléculas selecionadas na base de compostos diverset a partir da triagem virtual baseada na estrutura da enzima. Após esse estudo, os melhores compostos serão adquiridos para ensaio de inibição com TcTS.

Por fim, o método fluorimétrico contínuo foi padronizado com sucesso permitindo a realização do ensaio de inibição de TcTS na presença do derivado de galactose **85**. A inibição de 56% foi bastante promissora e abre perspectiva para investigação da relação entre a presença de ácido succínico nas demais posições da unidade galactosídica e a taxa de inibição da enzima *trans*-sialidase.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA-SERRANO, A.; ALMEIDA, I. C.; FREITAS-JUNIOR, L. H.; YOSHIDA, N.; SCHENKMAN, S. **Molecular and Biochemical Parasitololgy**, v.114, p.143-150, 2001.

AGRELOS, O. A.; JONES, C.; TODESCHINI, A. R.; PREVIATO, J. O. A novel sialylated and galactofuranose-containing O-linked glycan, Neu5Acα2→3Galpβ1→6(Galfβ1→4)GlcNAc, is expressed on the sialoglycoprotein of *Trypanosoma cruzi* Dm28c. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.126, p.93-96, 2003.

AGUSTI, R.; PARIS, G.; RATIER, L.; FRASCH, A. C. C.; LEDERKREMER, R. M. Lactose derivatives are inhibitors of *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase activity toward conventional substrates *in vitro* and *in vivo*. **Glycobiology**, v.14, p.659-670, 2004.

AGUSTI, R.; GIORGI, M. E.; MENDOZA, V. M.; GALLO-RODRIGUEZ, C.; LEDERKREMER, R. M. Comparative rates of sialylation by recombinant *trans*-sialidase and inhibitor properties of synthetic oligosaccharides from *Trypanosoma cruzi* mucins-containing galactofuranose and galactopyranose. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.15, p.2611-2616, 2007.

ALONSO, H.; BLIZNYUK, A.A.; GREADY, J.E. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. **Medicinal Research Reviews,** v. 26, n. 5, p. 531-568, 2006.

AMATO NETO, V.; PASTERNAK, J. Chagas disease centenary. **Revista de Saúde Pública,** v. 43, p.381-382, 2009.

AMAYA M. F.; BUSCHIAZZO A.; NGUYEN T.; ALZARI P. M. The high resolution structures of free and inhibitor-bound *Trypanosoma rangeli* sialidase and its comparison with T-cruzi *trans*-sialidase. **Journal of Molecular Biology**, v.325, p.773-784, 2003.

ANGATA, T.; VARKI, A. Chemical Diversity in the Sialic Acids and Related Alpha-keto Acids: an Evolutionary Perspective. **Chemical Reviews**, v.102, p.439-469, 2002.

ANKNER, T.; HILMERSSON, G. Instantaneous deprotection of tosylamides and esters with SmI2/Amine/Water. **Organic Letters**, v.11, n.3, p.503-506, 2009.

ARIOKA S.; SAKAGAMI, M.; UEMATSU, R.; YAMAGUCHI, H.; TOGAME, H.; TAKEMOTO, H.; HINOU, H.; NISHIMURA, S. Potent inhibitor scaffold against *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.18, p.1633-1640, 2010.

BARILI P. L.; BERTI G.; BERTOZZI, D.; CATELANI, G.; COLONNA, F.; CORSETTI, T.; D'ANDREA, F. Meta-chloroperbenzoic acid as a selective reagent for the removal of O-propenyl groups. Its use in the synthesis of some D-galactopyranoside and 4-deoxy-L-threo-4-hexenopyranoside derivatives. **Tetrahedron,** v.46, p.5365-5376, 1990.

BARILI, P. L.; BERTI, G.; CATELANI, G.; COLONNA, F.; MARRA, A. New results in the isopropylidenation of galactopyranosides: useful intermediates for the synthesis of galactose derivatives. **Tetrahedron Letters,** v.27, n.20, p.2307-2310, 1986.

BARILI, P. L.; BERTI, G.; D'ANDREA, F.; DI BUSSOLO, V.; GRANUCCI, I. A new synthesis of L-Ascorbic acid from D-galactose. **Tetrahedron,** v.48, p. 6273-6284, 1992.

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annual Review of Microbiology**, v.27, p.347-382, 1973.

BRENK, R., NAERUM, L., GRAEDLER, U., GERBER, H., D., GARCIA, G. A. Virtual screening for submicromolar leads of tRNA-guanine transglycosylase based on a new unexpected binding mode detected by crystal structure analysis. **Journal of Medicinal Chemistry,** v. 46, p. 1133-1143, 2003.

BUCHINI, S.; BUSCHIAZZO, A.; WITHERS, S. G. A New Generation of Specific *Trypanosoma cruzi trans*-Sialidase Inhibitors. **Angewandte Chemie International Edition**, v.47, p.2700-2703, 2008.

BUCKNER, F. S.; VERLINDE, C. L.; LA FLAMME, A. C.; VAN VOORHIS, W. C. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing β-galactoside. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.40, n.11, p.2592 - 2597, 1996.

BUREAU, R.; DAVEU, C.; LANCELOT, J. C.; RAULT, S. Molecular design based on 3D-pharmacophore. Application to 5-HT subtypes receptors. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences,** vol. 42, n. 2, p. 429-436, 2002.

BURLEIGH, B. A.; ANDREWS, N. W. The Mechanism of *Trypanosoma cruzi* Invasion of Mammalian Cells. **Annual Review Microbiology**, v.49, p.175-200, 1995

BUSCHIAZZO A.; AMAYA M. F.; CREMONA M. L.; FRASCH A. C.; ALZARI P. M. The crystal structure and mode of action of *trans*-sialidase, a key enzyme in *Trypanosoma cruzi* pathogenesis. **Molecular Cell**, v.10, p.757-768, 2002.

BUSCHIAZZO, A.; MUIÁ, R.; LARRIEUX, N.; PITCOVSKY, T.; MUCCI, J.; CAMPETELLA, O. *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase in complex with a neutralizing antibody: structure/function studies towards the rational design of inhibitors. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2012.

BUSSE, H.; HAKODA, M., STANLEY, M.; STREICHER, H. Galactose-phosphonates as mimetics of the sialyltransfer by trypanosomal sialidases. **Journal of Carbohydrate Chemistry**, v.26, p.159-194, 2007.

CAMPO, V. L.; SESTI-COSTA, R.; CARNEIRO, Z. A.; SILVA, J. S.; SCHENKMAN, S.; CARVALHO, I. Design, synthesis and the effect of 1,2,3-triazole sialylmimetic neoglycoconjugates on *Trypanosoma cruzi* and its cell surface *trans*-sialidase **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 145-156, 2012.

CAREY F. A.; SUNDBERG, R. J. **Advanced organic chemistry - A**: structure and mechanisms. 4ª ed. New York: Ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2000. 823 p.

CARVALHO, I.; ANDRADE, P.; CAMPO, V. L.; GUEDES, P. M. M.; SESTI-COSTA, R.; SILVA, J. S.; SCHENKMAN, S.; DEDOLA, S.; HILL, L.; REJZEK, M.; NEPOGODIEV, S. A.; FIELD, R. A. 'Click chemistry' synthesis of a library of 1,2,3-triazole-substituted galactose derivatives and their evaluation against *Trypanosoma cruzi* and its cell surface *trans*-sialidase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.18, n.7, p.2412-2427, 2010a.

CARVALHO, S. T.; SOLA-PENNA, M.; OLIVEIRA, I. A.;, PITA, S.; GONÇALVES, A. S.; NEVES, B. C.; SOUSA, F. R.; FREIRE-DE-LIMA, L.; KUROGOCHI, M.; HINOU, H.; NISHIMURA, S.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; PREVIATO, J. O.; TODESCHINI, A. R. A new class of mechanism-based inhibitors for *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase and their influence on parasite virulence. **Glycobiology,** v. 20, n. 8, p. 1034-1045, 2010b.

CHEN, G. S., CHANG, C. S., KAN, W. M., CHANG, C. L., WANG, K. C., CHERN, J. W. Novel lead generation through hypothetical pharmacophore three-dimensional database searching: discovery of isoflavonoids as nonsteroidal inhibitors of rat 5 alpha-reductase. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 3759-3763, 2001.

CHENG, H.; CAO, X.; XIAN, M.; FANG, L.; CAI, T. B.; JI, J. J.; TUNAC, J. B.; SUN, D.; WANG, P.G. Synthesis and Enzyme-Specific Activation of Carbohydrate-Geldanamycin Conjugates with Potent Anticancer Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.48, p.645-652, 2005.

CLAYTON, J. Outlook: Chagas disease. **Nature,** v. 465, p. S4-S22, 2010.

COREY, W. T.; LIMA, M. F.; VILLALTA, F. *Trypanosoma cruzi* Uses a 45-kDa Mucin for Adhesion to Mammalian Cells. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v.290, p.29-34, 2002.

CORSARO, A.; CHIACCHIO, U.; PISTARA, V.; ROMEO, G. Microwave-assisted chemistry of carbohydrates. **Current Organic Chemistry**, v.8, n.6, p.511-538, 2004.

COURA, J. R.; De CASTRO, S. L. A Critical Rewiew on Chagas Disease Chemoterapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, p.3-24, 2002.

DA SILVA, C. O. Efeito Anomérico em Carboidratos: Fatos e Hipóteses **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 4, 235-246, 2011.

DARAGICS, K.; FUEGEDI, P. Regio- and chemoselective reductive cleavage of 4,6-*O*-benzylidene-type acetals of hexopyranosides using BH_3 THF-TMSOTf. **Tetrahedron Letters**, v.50, n.24, p.2914-2916, 2009.

DE NINNO, M. P. The synthesis and glycosidation of. *N*-acetylneuraminic acid. **Synthesis**, p. 583, 1991.

DIAS, L. C.; DESSOY, M. A.; SILVA, J. J. N.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO**,** A. D. Quimioterapia da Doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química nova***,* v 32, n.9, p.2444-2457, 2009.

DIAS, J. C. P.; SCHOFIELD, C. J. The evolution of Chagas Disease (*American Trypanosomiasis*) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.94, p.103-121, 1999.

DI-NOIA, J. M.; POLLEVICK, G. D.; XAVIER, M. T.; PREVIATO, J. O.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; SANCHEZ, D. O.; FRASCH, A. C. C. High diversity in mucin genes and mucin molecules in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Biological Chemistry**, v.271, p.32078-32083, 1996.

DO CAMPO, R. Recent developments in the chemoterapy of Chagas disease. **Current Pharmaceutical Design**, v.7, p.1157-1164, 2001.

DONG, H.; PEI, Z.; BYSTRÖM, S.; RAMSTRÖM, O. Reagent-dependent regioselective control in multiple carbohydrate esterifications. **Journal of Organic Chemistry**, v. 72, p. 1499-1502, 2007.

DROR, O.; SCHNEIDMAN-DUHOVNY, D.; INBAR, Y.; NUSSINOV, R.; WOLFSON, H. J. Novel Approach for efficient pharmacophore-based virtual screening: method and applications. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, n. 10, p. 2333-2343, 2009.

EGIMA C. M.; BRIONES M. R. S.; FREITAS L. H.G.; SCHENKMAN R. P. F.; UEMURA H.; SCHENKMAN S. Organization of *trans*-sialidase genes in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.77, p.115-125, 1996.

ELLERVIK, U. 9-Anthraldehyde acetals as protecting groups. **Tetrahedron Letters**, v.44, p.2279-2281, 2003.

ELLIS, D.; NORMAN, S. E.; OSBORN, H. M. I. Synthesis of *S*-linked carbohydrate analogues via a Ferrier reaction. **Tetrahedron**, v.64, n.12, p.2832-2854, 2008.

EL-SAYED, N. M. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science**, v.309, p.409-415, 2005.

FAIRLAMB, A. H. Future prospects for the chemotherapy of Chaga's Disease. **Medicina (Buenos Aires)**, v.59, supl.II, p.179-187, 1999.

FARKAS, F.; THURNER, A.; KOVACS, E.; FAIGL, F.; HEGEDUS, L. Hydrogenolysis of *O*-protected hydroxyoxetanes over palladium: An efficient method for a one-step ring opening and detritylation reaction. **Catalysis Communications**, v.10, n.5, p.635-639, 2009.

FERRERO-GARCIA, M. A.; TROMBETTA, S. E.; SANCHEZ, D. O.; REGLERO, A.; FRASCH, A. C. C.; PARODI, A. J. The action of *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase on glycolipids and glycoproteins. **European Journal of Biochemistry**, v.213, p.765-771, 1993.

FRASCH, A. C. C.; BUSCAGLIA, C. A.; LEGUIZAMON, M. S.; CAMPETELLA, O. The repetitive domain of *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase enhances the immune response against the enzymatic domain. **Journal of Infectious Disease**, v.177, p.431, 1998.

FERRIER, R. J.; COLLINS, P. M. **Monosaccharides, their chemistry and their roles in natural products**. New York: Wiley, 1996. 594 p.

FRIESNER, R.A.; BANKS, J.L.; MURPHY, R.B.; HALGREN, T.A.; KLICIC, J.J.; MAINZ, D.T.; REPASKY, M.P.; KNOLL, E.H.; SHELLEY, M.; PERRY, J.K.; SHAW, D.E.; FRANCIS, P.; SHENKIN, P.S. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. **Journal of Medicinal Chemistry,** v. 47, n. 7, p. 1739-1749, 2004.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). **Centenário de Descoberta da Doença de Chagas.** Portal da Fiocruz, 2009. Disponível em: <www.fiocruz.br>. Acesso em: 12 de agosto de 2009.

GAREGG, J.; HULTBERG, H.; WALLIN, S. A novel, reductive ring-opening of carbohydrate benzylidene acetals. **Carbohydrate Research**, v.108, n.1, p.97-101, 1982.

GIORGI, M. E.; RATIER, L.; AGUSTI, R.; FRASCH, A. C. C.; LEDERKREMER, R. M. Synthesis of PEGylated lactose analogs for inhibition studies on *T.cruzi trans*-sialidase. **Glycoconjugate Journal**, v.27, p.549-559, 2010.

GIORGI, M. E.; PIUSELLI, D.; AGUSTI, R.; DE LEDERKREMER, R. M. Synthesis of oseltamivir conjugates with lactose analogs for inhibition studies on *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. **ARKIVOC,** v. 7, p. 260-271, 2011.

GRAEBIN, C. S.; UCHOA, F. D.; BERNARDES, L.S.C.; CAMPO, V.L.; CARVALHO, I.; EIFLER-LIMA, V. L. Antiprotozoal Agents: An Overview. **Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry**, v.8, p.345-366, 2009.

GRINDLEY, T. B. Application of tin-containing intermediates to carbohydrate chemistry. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 53 p.17-142, 1998.

GUHL, F.; LAZDINS-HELDS, J. K. (Eds.) Reporte del grupo de trabajo cientifico sobre la enfermedad de Chagas. **WHO & PAHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases Report**, v.9, p.1-2, 2007.

GUEDES, P. M.M.; OLIVEIRA, F. S.; GUTIERREZ, F. R.; DA SILVA, G. K.; RODRIGUES, G. J.; BENDHACK, L. M.; FRANCO, D. W.; DO VALLE MATTA, M. A.; ZAMBONI, D. S.; DA SILVA, R. S.; SILVA, J. S. BR. Nitric oxide donor *trans*-[RuCl([15]aneN4)NO]2+ as a possible therapeutic approach for Chagas' disease. **Journal of Pharmacology**, v.160, n.2, p.270 - 282, 2010.

HALGREN T. A.; MURPHY, R. B.; FRIESNER, R. A.; BEARD, H. S.; FRYE, L. L.; POLLARD, W. T.; BANKS J. L. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening. **Journal of Medicinal Chemistry,** v. 47, n. 7, p. 1750-1759, 2004.

HARRISON, J. A.; KARTHA, K. P. R.; TURNBULL, W. B.; SCHEUERL, S. L.; NAISMITH, J. H.; SCHENKMAN, S. R.; FIELD, A. Hydrolase and sialyltransferase activities of *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase towards NeuAc-α-2,3-Gal-β-*O*-PNP. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.11, p.141-144, 2001.

HARRISON, J. A.; KARTHA, K. P.; FOURNIER, E. J.; LOWARY, T. L.; MALET, C.; NILSSON, U. J.; HINDSGAUL, O.; SCHENKMAN, S.; NAISMITH, J. H.; FIELD, R. A. Probing the acceptor substrate binding site of *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase with systematically modified substrates and glycoside libraries. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 9, p. 1653-1660, 2011.

HOLTJE, H. -D.; SIPPL, W.; ROGNAN, D.; FOLKERS, G. Introduction to comparative protein modeling. In: **Molecular modeling: basic principles and applications.** Weinheim: Wiley-VCH, 2003, p. 87-143.

***Insight II User Guide*,** version 2005, Accelrys: CA, USA, 2005.

JIN, X. Y.; DING, H. X.; YANG, R. C.; XIAO, Q.; JU, Y. Synthesis of carbohydrate-conjugated furo[2,3-d] pyrimidine using “Click Chemistry”. **Synthesis**, v. 6, p. 865-870, 2008.

JUARISTI, E.; CUEVAS, G. Recent studies of the anomeric effect. **Tetrahedron**, v. 48, p. 5019-5087, 1992.

KARTHA K. P. R.; FIELD, R. A. Iodine: A versatile reagent in carbohydrate chemistry IV. Per-*O*-acetylation, regioselective acylation and acetolysis. **Tetrahedron**, v.53, n.34, p.11753-11766, 1997.

KIM, J. H.; RYU, H. W.; SHIM, J. H.; PARK, K. H.; WITHERS, S. G. Development of New and Selective *Trypanosoma cruzi trans*-Sialidase Inhibitors from Sulfonamide Chalcones and Their Derivatives. **Chembiochem**, v.10, p.2475-2479, 2009.

KIRK, R. E.; OTHMER, D. F. **Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology.** 4ª ed. New York: John Wiley and Sons, 1991. 585 p.

KOMIOTIS, D.; AGELIS, G.; MANTA, S.; TZIOUMAKI, N.; TSOUKALA, E.; ANTONAKIS, K. A facile, one-step conversion of 6-*O*-trityl and 6-*O*-TBDMS monosaccharides into the corresponding formate esters. **Journal of Carbohydrate Chemistry**, v.25, n.6, p.441-450, 2006.

KRAUS J. M.; VERLINDE, C. L.; KARIMI, M.; LEPESHEVA, G. I.; GELB, M. H.; BUCKNER, F. S. Rational Modification of a Candidate Cancer Drug for Use Against Chagas Disease. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.52, p.1639–1647, 2009.

KRAUTH-SIEGEL, R. L.; COOMBS, G. H. Enzymes of parasite thiol metabolism as drug targets. **Parasitology Today**, v.15, p.404-409, 1999.

LEE, S-G.; KIM, B-G. Development of spectrophotometric method for monitoring *trans*-sialidase reaction and its application **Biotechnology Letters,** v.22, p.819-823, 2000.

LEGGETTER, B. E.; BROWN, R. K. The reductive cleavage of 1,3-oxathiolanes with lithium aluminum hydride in the presence of aluminum chloride or boron trifluoride. **Canadian Journal of Chemistry**, v.41, n.10, p.2671-2682, 1963.

LEMANSKI, G.; ZIEGLER, T. Prearranged Glycosides Part 12: Intramolecular Mannosylations of Glucose Derivatives via Prearranged Glycosides. **Helvetica Chimica Acta**, v.83, p.2655-2675, 2000.

LINDBERG, J.; OHBERG, L.; GAREGG, P. J.; KONRADSSON, P. Efficient routes to glucosamine-myo-inositol derivatives, key building blocks in the synthesis of glycosylphosphatidylinositol anchor substances. **Tetrahedron**, v.58, p.1387-1398, 2002.

LIMA, A. H.; LAMEIRA, J.; ALVES, C. N. Protein ligand interaction of *T. cruzi* trans-sialidase inhibitors: a docking and QM/MM MD study. **Structural Chemistry**, v. 23, p. 147-152, 2011.

LIPTAK, A.; JODAL, I.; NANASI, P. Stereoselective ring cleavage of 3-*O*-benzyl- and 2,3-di-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidenehexopyranoside derivatives with the lithium aluminum hydride-aluminum chloride reagent. **Carbohydrate Research**, v.44, n.1, p.1-11, 1975.

MALIK, S.; KARTHA, K. P. R. A mild, highly efficient, and chemoselective deprotection of trityl ethers of carbohydrates and nucleosides using iodine monobromide. **Synlett**, v.11, p.1809-1811, 2009.

MARSHALL, G. R. Introduction to chemoinformatics in drug discovery – A personal view. In: OPREA, T. I. **Chemoinformatics in drug discovery.** Weinheim: WILEYVHC, 2004. p. 1-22.

MEINKE, S.; SCHROVEN, A.; THIEM, J. Sialic acid *C*-glycosides with aromatic residues: investigating enzyme binding and inhibition of *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 9, p. 4487-4497, 2011.

MONCAYO, A. Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.94, p.401-404, 1999.

MONCAYO, A.; SILVEIRA, A. C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, n.1, p.17-30, 2009.

MOREIRA, D. R. M.; LEITE, A. C. L.; DOS SANTOS, R. R.; SOARES, M. B. P. Approaches for the development of new anti-*Trypanosoma cruzi* agents. **Current Drug Targets**, v.10, p.212-231, 2009.

MUELAS, S.; SUÁREZ, M.; PËREZ, R.; RODRIGUEZ, H.; OCHOA, C.; ESCARIO, J. A.; GOMEZ-BARRIO, A. *In vitro* and *in vivo* assays of 3,5-disubstituted-tetrahydro-2H-1,3,5-tiadizin-2-thione derivatives agaisnt *Trypanosoma cruzi.* **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, p.269-272, 2002.

MUELAS-SERRANO, S.; LE-SENNE, A.; FERNÁNDEZ-PORTILLO, C.; NOGAL, J. J.; OCHOA, C.; GÓMEZ-BARRIO, A. *In vitro* and *in vivo* anti-*Trypanosoma cruzi* activity of a novel nitro-derivative. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.9, p.553-557, 2002.

MUKHOPADHYAY, B.; FIELD, R. A. A simple one-pot method for the synthesis of partially protected mono- and disaccharide building blocks using an orthoesterification- benzylation-orthoester rearrangement approach. **Carbohydrate research**, v.338, p.2149-2152, 2003.

MUTHANA, S.; CAO, H.; CHEN, X. Recent progress in chemical and chemoenzymatic synthesis of carbohydrates. **Current Opinion in Chemical Biology**, vol. 13, p. 573-581, 2009.

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. **Parasitologia Humana**. 9a. edição, Ed. Atheneu, Belo Horizonte, 1995, p.82.

NERES, J.; BRYCE, R. A.; DOUGLAS, K. T. Rational drug design in parasitology: *trans*-sialidase as a case study for Chagas disease. **Drug Discovery Today**, v. 13, p. 110-117, 2008.

NERES, J.; BREWER, M. L.; RATIER, L.; BOTTI, H.; BUSCHIAZZO, A.; EDWARDS, P. N.; MORTENSON, P.N.; CHARLTON, M. H.; ALZARI, P. M.; FRASCH, A. C.; BRYCE, R. A.; DOUGLAS, K. T. Discovery of novel inhibitors of *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase from in silico screening. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.19, p. 589-596, 2009.

NERES, J.; BONNET, P.; EDWARDS, P. N.; KOTIAN, P. L.; BUSCHIAZZO, A.; ALZARI, P. M.; BRYCE, R. A.; DOUGLAS, K. T. Benzoic acid and pyridine derivatives as inhibitors of *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.15, p.2106-2119, 2007.

NERES, J.; BUSCHIAZZO, A.; ALZARI, P. M.; WALSH, L.; DOUGLAS, K. T. Continuous Fuorimetric assay for high-throughput screening of inhibitors of *trans*-sialidase from *Trypanosoma cruzi.* **Analytical Biochemistry**, v.357, p.302-304, 2006.

NICOLAOU, K. C.; MITCHELL, H. J. Adventures in carbohydrate chemistry: new synthetic technologies, chemical synthesis, molecular design, and chemical biology. **Angewandte Chemie International**, v. 40, n. 9, p. 1576-1624.

NISSINK, J. W. M.; MURRAY, C.; HARTSHORN, M.; VERDONK, M. L.; COLE, J. C.; TAYLOR, R. A. A new test set for validating predictions of protein-ligand interaction. **PROTEINS: Structure, Function, and Genetics**, v. 49, n. 4, p. 457-471, 2002.

NITZ, M.; BUNDLE, D. R. Efficient synthesis of 3,6-dideoxy-beta-D-arabino-hexopyranosyl-terminated LacdiNac glycan chains of the Trichinella spiralis parasite. **Journal of Organic Chemistry**, v.65, p.3064-3073, 2000.

OGAWA, T.; KATANO, K.; MATSUI, M. Total synthesis of sorbistin A1 and a positional isomer. **Tetrahedron**, v.36, n.19, p.2727-2733, 1980.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **First WHO report on neglected tropical diseases**. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Genebra, Suíça: OMS, 2010. p. 75-78.

PANCHADHAYEE, R.; MISRA, A. K. Efficient iodine-catalyzed preparation of benzylidene acetals of carbohydrate derivatives. **Journal of Carbohydrate Chemistry**, v.27, n.3, p.148-155, 2008.

PARIS, G.; RATIER, L.; AMAYA, M. F.; NGUYEN, T.; ALZARI, P. M.; FRASCH, A. C. C. A sialidase mutant displaying *trans*-sialidase activity. **Journal of Molecular Biology**, v.345, p.923-934, 2005.

PARODI, A. J.; POLLEVICK, G. D.; MAUTNER, M.; BUSCHIAZZO, A.; SÁNCHEZ, D. O.; FRASCH, A. C. C. Identification of the Gene(S) Coding for the *trans*-Sialidase of *Trypanosoma cruzi*. **EMBO Journal**, v.11, p.1705, 1992.

PAULSEN, H.; HASENKAMP, T.; PAAL, M. Building blocks for oligosaccharides. LXIV. A building block for 3-*O*-β-D-galactopyranosyl-D-galactopyranose. **Carbohydrate Research**, v.144, n.1, p.45-55, 1985.

PAVÃO, F.; CASTILHO, M. S.; PUPO, M. T.; DIAS, R. L. A.; CORREA, A. G.; FERNANDES, J. B.; DA SILVA, M. F. G. F.; MAFEZOLI, J.; VIEIRA, P. C.; OLIVA, G. Structure of *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complexed with chalepin, a natural product inhibitor, at 1.95 angstrom resolution. **Federation of European Biochemical Societies (FEBS Letters)**, v.520, p.13-17, 2002.

PEI, Z.; DONG, H.; CARABALLO, R.; RAMSTRÖM, O. Synthesis of positional thiol analogs of β-D galactopyranose. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 29, p. 4927-4934, 2007.

PEITSCH, M. C. Manuel Peitsch discusses knowledge management and informatics in drug discovery. **Drug Discovery Today: BIOSILICO,** v. 2, n. 3, p. 94-96, 2004.

PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L.; ACOSTA-SERRANO, A.; CORREIA de ALMEIDA, I.; FERGUSON, M. A.; SOUTO-PADRON, T.; RODRIGUES, M. M.; TRAVASSOS, L. R.; SCHENKMAN, S. Mucin-like molecules form a negatively charged coat that protects *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes from killing by human anti-alpha-galactosyl antibodies. **Journal of Cell Science**, v. 113, p.1299-1307, 2000.

PÉTURSSON, S. Protecting groups in carbohydrate chemistry. **Journal of Chemical Education**, v. 74, n. 11, p. 1297-1303, 1997.

PFEIFFER-MAREK, S.; MATTER, H.; ENGLERT, H.; GERLACH, U.; KNIEPS, S.; SCHUDOK, M., LEHR, K. H. Using VolSurf descriptors to model pharmacokinetic properties during lead optimization. In: FORD, M., LIVINGSTONE, D., DERDEN, J., VAN DE WATERBEEMD, H. (Eds). **Designing drugs and crop protectants,** Proceedings of the 14th European Symposium on QSAR. Oxford: Blackwell Publishers, 2003. p.104-105.

POUYSÉGU, L.; DE JÉSO, B.; LARTIGUE, J. C.; PÉTRAUD, M.; RATIER, M. Structural analysis of partially acetylated glycosides by refocused-decoupled insensitive nuclei enhanced by polarization transfer (INEPT) experiments: a qualitative and quantitative method. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 50, n. 8, p. 1114-1117, 2002.

PREVIATO, J. O.; JONES, C.; XAVIER, M. T.; WAIT, R.; PARODI, A. J.; PREVIATO, L. M. Structural characterization of the major glycosylphosphatidylinositol membrane-anchored glycoprotein from epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi* Y-strain. **Journal of Biological Chemistry**, v.270, p.7241-7250, 1995.

RAMOS, A. M.; DUSCHAK, V. G.; GEREZ DE BURGOS, N. M.; BARBOZA, M.; REMEDI, M. S.; VIDES, M. A.; CHIABRANDOA, G. A. *Trypanosoma cruzi*: cruzipain and membrane-bound cysteine proteinase isoform(s) interacts with human α-2-macroglobulin and pregnancy zone protein. **Experimental Parasitology**, v.100, p.121-130, 2002.

RAO, K. V.; PATIL, P. R.; ATMAKURI, S.; KARTHA, K. P. Iodine-sodium cyanoborohydride-mediated reductive ring opening of 4,6-O-benzylidene acetals of hexopyranosides. **Carbohydrate Research**, v. 345, n. 18, p. 2709-2713, 2010.

RASSI, A.; DIAS, J. C.; MARIN-NETO, J. A.; RASSI, A. Challenges and opportunities for primary, secondary, and tertiary prevention of Chagas' disease. **Heart**, v.95, p.524-534, 2009.

REMME, J. H. F.; FEENSTRA, P.; LEVER, P. R.; MÉDICI, A.; MOREL, C.; NOMA, M.; RAMAIAH, K. D.; RICHARDS, F.; SEKETELI, A.; SCHMUNIS, G.; VAN BRAKEL, W. H.; ANNA VASSALL, A. Tropical diseases targeted for elimination: Chagas Disease, Lymphatic Filariasis, Onchocerciasis, and Leprosy. In: JAMISON, D. T.; BREMAN, J. G.; MEASHAM, A. R.; ALLEYNE, G.; CLAESON, M.; EVANS, D. B.; JHA, P.; MILLS, A.; MUSGROVE, P. (eds) **Disease control priorities in developing countries.** 2ª ed. Washington: The World Bank, 2006, p.433-449.

REN, T.; ZHANG, G.; LIU, D. Synthesis of bifunctional cationic compound for gene delivery. **Tetrahedron Letters**, v.42, p.1007–1010, 2001.

RIBEIRÃO, M.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L.; EICHINGER, D.; RODRIGUES, M.; SCHENKMAN, S. Temperature differences for *trans*-glycosylation and hydrolysis reaction reveal an acceptor binding site in the catalytic mechanism of *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase. **Glycobiology**, v.7, p.1237, 1997.

ROEN, A.; PADRON, J. I.; VAZQUEZ, J. T. Hydroxymethyl rotamer populations in disaccharides. **Journal of Organic Chemistry**, v.68, n.12, p.4615-4630, 2003.

SAKAGAMI, M.; HAMANA, H. A selective ring opening reaction of 4,6-*O*-benzylidene acetals in carbohydrates using trialkylsilane derivatives. **Tetrahedron Letters**, v.41, n.29, p.5547-5551, 2000.

SANCHEZ-MORENO, M.; SANZ, A. M.; GÓMEZ-CONTRERAS, F.; NAVARRO, P.; MARIN, C.; RAMÍREZ-MACIAS, I.; ROSALES, M. J.; OLMO, F.; GARCIA-ARANDA, I.; CAMPAYO, L.; CANO, C.; ARREBOLA, F.; YUNTA, M. J. R. *In Vivo* Trypanosomicidal Activity of Imidazole- or Pyrazole-Based Benzo[*g*]phthalazine Derivatives against Acute and Chronic Phases of Chagas Disease. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.54, p.970-979, 2011.

SCHRADER, S.; TIRALONGO, E.; PARIS, G.; YOSHINO, T.; SHAUER, R. A nonradioactive 96-well plate assay for screening of *trans*-sialidase activity. **Analytical Biochemistry**, v.322, p.139-147, 2003.

SEEBERGER, P. H.; HAASE, W. C. Solid-phase oligosaccharide synthesis and combinatorial carbohydrate libraries. **Chemical Reviews,** v.100, p.4349-4394, 2000.

SILVA, R. S. F.; COSTA, E. M.; TRINDADE, U. L. T.; TEIXEIRA, D. V.; PINTO, M. D. F. R.; SANTOS, G. L.; MALTA, V. R. S.; DE SIMONE, C. A.; PINTO, A. V.; DE CASTRO, S. L. Synthesis of naphthofuranquinones with activity against *Trypanosoma cruzi*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.41, n.4, p.526-530, 2006.

SILVA, J. J. N.; PAVANELLI, W. R.; GUTIERREZ, F. R. S.; LIMA, F. C. A.; SILVA, A. B. F.; SILVA, J. S.; FRANCO, D. W. Complexation of the anit-*Trypanosoma cruzi* Drug Benznidazole Improves Solubility and Efficaccy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.51, n.14, p.4104 - 4114, 2008.

SRIKRISHNA, A.; VISWAJANANI, R. A mild and simple procedure for the reductive cleavage of acetals and ketals. **Tetrahedron**, v.51, n.11, p.3339-3344, 1995.

STEVENIN, A.; BOYER, F.; BEAU, J. Regioselective Control in the Oxidative Cleavage of 4,6-*O*-Benzylidene Acetals of Glycopyranosides by Dimethyldioxirane. **Journal of Organic Chemistry**, v.75, n.5, p.1783-1786, 2010.

STEVERDING D. AND. TYLER, K. M. Novel antitrypanosomal agents. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v.14, p.939-955, 2005.

STREICHER, H.; BUSSE, H. Building a successful structural motif into sialylmimetics-cyclohexene phosphonate monoesters as pseudo-sialosides with promising inhibitory properties. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.14, p.1047-1057, 2006.

STTOPANI, A. O. M. Quimioterapia de La Enfermidade de Chagas. **Medicina (Buenos Aires)**, v.59 (Supl II), p.147-165, 1999.

***Sybyl User Guide*,** version 7.1, Tripos Inc: CA, USA, 2005.

TANAKA, N.; OGAWA, I.; YOSHIGASE, S.; NOKAMI, J. Regioselective ring opening of benzylidene acetal protecting group(s) of hexopyranoside derivatives by DIBAL-H. **Carbohydrate Research**, v.343, v15, p.2675-2679, 2008.

TEMPONE, A.G.; SARTORELLI, P.; MADY, C.; FERNANDES, F. Natural Products to Anti-trypanosomal Drugs: An Overview of New Drug Prototypes for American Trypanosomiasis. **Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry**, v.5, p.222-265, 2007.

TESTA, B.; BALMAT, A.; LONG, A.; JUDSON, P. Predicting drug metabolism - an evaluation of the expert system METEOR. **Chemistry & Biodiversity,** v. 02, p. 872-885, 2005.

THE LANCET. Chagas disease: a neglected emergency. Editorial. **The Lancet,** n.9678, p.1820-1820, jun. 2009.

TOLBORG, J. F.; PETERSEN, L.; JENSEN, K. J.; MAYER, C.; JAKEMAN, D. L.; WARREN, R. A. J.; WITHERS, S. G. Solid-phase oligosaccharide and glycopeptide synthesis using glycosynthases. **Journal of Organic Chemistry**, v. 67, p. 4143-4149, 2002.

URBINA, J. A.; PAYARES, G.; SANOJA, C.; MOLINA, J.; LIRA, R.; BRENER, Z.; ROMANHA, A. J. Parasitological cure of acute and chronic experimental Chagas disease using the long-acting experimental triazole TAK-187. Activity against drug-resistant *Trypanosoma cruzi* strains. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.21, p.39-48, 2003.

VANDEKERCKHOVE, F.; SCHENKMAN, S.; PONTES DE CARVALHO, L.; TOMLINSON, S.; KISO, M., YOSHIDA, M.; HASEGAWA, A.; NUSSENZWEIG, V. Substrate specificity of the *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase. **Glicobiology**, v.2, p.541-548, 1992.

VENDEVILLE, S.; BOUREL, L.; DAVIOUD-CHARVET, E.; GRELLIER, P.; DEPREZ, B.; SHERGHERAERT, C. Uromated parallel synthesis of a tetrahydroisoquinolin-based library: potential prolyl endopeptidase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.9, p.437-442, 1999.

VIK, A,; PROSZENYÁK, A.; VERMEERSCH, M.; COS, P.; MAES, L.; GUNDERSEN, L. L. Screening of agelasine D and analogs for inhibitory activity against pathogenic protozoa; identification of hits for visceral leishmaniasis and Chagas disease. **Molecules**, v.14, v.279-288, 2009.

WAHLSTROM, J. L.; RONALD, R. C. Detritylation of ethers using iodine-alcohol reagents: An acid-catalyzed reaction. **Journal of Organic Chemistry**, v.63, n.17, p.6021-6022, 1998.

WANG, C. C.; LEE, J. C.; LUO, S. Y.; KULKARNI, S. S.; HUANG, Y. W.; LEE, C. C.; CHANG, K. L.; HUNG, S. C. Regioselective one-pot protection of carbohydrates. **Nature Letters**, v. 446, p. 896-899, 2007.

WANG, H.; SHE, J.; ZHANG, L.; YE, X. Silver (I) oxide mediated selective monoprotection of diols in pyranosides. **Journal of Organic Chemistry**, v.69, n.17, p.5774-5777, 2004.

WATTS, A. G.; DAMAGER, I.; AMAYA, M. L.; BUSCHIAZZO, A.; ALZARI, P. M.; FRASCH, A. C.; WITHERS, S. G. *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase operates through a covalent sialyl-enzyme intermediate: Tyrosine is the catalytic nucleophile. **Journal of the American Chemical Society**, v.125, p.532-7533, 2003.

WENDEL, S.; GONZAGA, A. L. Chaga's Disease and Blood Transfusion: a new world problem? **Vox Sanguinis**, v.64, p.1-12, 1993.

WERZ, D. B.; SEEBERGER, P. H. Carbohydrates as the next frontier in pharmaceutical research. **Chemistry - A European Journal**, v. 11, p. 3194-3206, 2005.

WILLIAMS, D. A.; LEMKE, T. L. **Foye's Principles of Medicinal Chemistry**. 5a. edição, Ed. Lippincott Williams & Wilkim, New York, 2002.

ZOETE, V.; GROSDIDIER, A.; MICHIELIN, O. Docking, virtual high throughput screening and in silico fragment-based drug design. **Journal of Cellular and Molecular Medicine.** v.13, n. 2, p. 238-248, 2009.

ZUCCOTTO, F.; BRUM, R.; PACANOWSKA, D. G.; PEREZ, L. M. R.; GILBERT, I. H. The structure-based design and synthesis of selective inhibitors of *Trypanosoma cruzi* dihydrofolate reductase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.9, p.1463-1468, 1999.