ANDREZA DA SILVA FIGUEREDO

Síntese e avaliação biológica de *glycoclusters* com potencial aplicação para o tratamento de diabetes e doença de Chagas

Tese de doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do título de doutor em Ciências.

Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientadora: Prof^a. Dra. Ivone Carvalho

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas em 02/04/2018. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2018

RESUMO

FIGUEREDO, A. S. Síntese e avaliação biológica de *glycoclusters* com potencial aplicação para o tratamento de diabetes e doença de Chagas. 171f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

As funções abrangentes e complexas de carboidratos nos sistemas biológicos oferecem muitas possibilidades para explorar essas estruturas no desenvolvimento de estratégias terapêuticas. Como consequência de sua estrutura e função, algumas glicosidases e glicosiltransferases envolvidas em patologias significativas como diabetes e doença de Chagas são alvos interessantes na busca por inibidores enzimáticos baseados em carboidratos. Assim, o conhecimento de características estruturais e mecanismo de ação de α - e β -glucosidases e *trans*-sialidases e as sólidas evidências de que glicosidases são sensíveis a efeito de multivalência sustentaram o planejamento de *glycoclusters* potencialmente inibidores dessas enzimas contendo três, quatro ou seis unidades correlatas aos seus substratos naturais (glicose e galactose/ácido siálico). Adicionalmente foram propostos *glycoclusters* baseados na estrutura do glicoaminoácido α -GalNAc-*O*-Thr. Empregando reações de cicloadição CuAAC, treze dos dezesseis *glycoclusters* tetra- e hexavalentes inicialmente propostos foram obtidos em bons rendimentos, sendo 8 derivados de glicose, 4 de galactose e o derivado tetravalente de ácido siálico **7**. Dez desses compostos são inéditos na literatura. Com a finalidade de gerar diversidade estrutural o derivado trivalente **29** foi preparado e permitiu o acoplamento de um imino-açúcar D-gluco ou L-gulo DNJ a estruturas trivalentes de glicose. A mesma estratégia levou à obtenção do *glycocluster* **85**, contendo unidades de galactose e um resíduo de ácido siálico. Ensaio de cinética em α -glucosidases de arroz e *Saccharomyces cerevisiae* e β -glucosidase de amêndoas com os *glycoclusters* derivados de glicose **1-4**, **9-12** e **63-66** mostraram atividade interessante apenas para os compostos mistos, evidenciando a importância do imino-açúcar para a interação com essas enzimas. No que diz respeito aos derivados multivalentes de galactose e/ou ácido siálico **5-7**, **13**, **14** e **85**, inibição expressiva da enzima TcTS foi alcançada pelo derivado **7** (IC₅₀ 450 μ M). Ensaio de atividade tripanocida, bloqueio de invasão e citotoxicidade sobre fibroblastos de mamífero não-infectados cultivados *in vitro* evidenciaram atividade de todos esses compostos contra a forma amastigota e bloqueio de invasão celular por *T. cruzi* (diminuindo a infecção em concentrações de até 25 μ M).

Palavras-chave: 1. Efeito multivalente 2. *Glycoclusters* 3. Síntese de carboidratos 4. Glucosidases 5. *trans*-sialidase

1. INTRODUÇÃO

1.1 Carboidratos, glicoconjugados e aplicações terapêuticas

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. Para além de suas funções energéticas e estruturais, vastamente conhecidas e exploradas, moléculas de açúcares unidas covalentemente a proteínas ou lipídeos sob a forma de glicoconjugados estão envolvidas em diferentes processos fisiológicos e patológicos de reconhecimento e comunicação celular (DOORES et al., 2006; WERZ et al., 2007).

Esses eventos mediados por carboidratos podem incluir adesão, diferenciação e crescimento celular, transdução de sinais, infecções por vírus, bactérias e protozoários, e resposta imune. Tal diversidade de funções, tem levado ao emprego de estruturas sacarídicas no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e para fins de diagnóstico com aplicação em condições patológicas diversas como câncer, doenças autoimunes, infecções virais, bacterianas e parasitárias (SZNAIDMAN, 1999; DAVIS, 2002; DOORES et al., 2006).

Nesse contexto, é válido mencionar que fármacos derivados de carboidratos, tanto naturais quanto análogos sintéticos, já foram introduzidos com sucesso na terapêutica, casos do antiviral fosfato de oseltamivir (Tamiflu, Roche®), do anticonvulsivante topiramato (Topamax, Janssen-Cilag®), dos antidiabéticos acarbose (Glucobay, Bayer®) e miglitol (Glyset, Pfizer®), do antitrombótico heparina (heparinas de baixo peso molecular) e dos antibióticos aminoglicosídeos (SEEBERGER & WERZ, 2007).

A diversidade de funções e estruturas dos carboidratos está correlacionada ao seu caráter polifuncional, capaz de fornecer diferentes posições para acoplamento a outros monossacarídeos, aminoácidos e cadeias lipídicas. Adicionalmente, a complexidade estrutural dos carboidratos é aumentada pela estereoquímica dos centros quirais, os quais são gerados a cada nova ligação glicosídica formada, pelo tipo de ligação glicosídica e configuração anomérica (DOORES et al., 2006; HOLEMANN & SEEBERGER, 2004).

Dessa forma, considerando apenas os dez monossacarídeos mais abundantes em mamíferos (figura 1), mais de 100 mil estruturas trissacarídicas distintas são teoricamente viáveis, número esse que cresce significativamente com a extensão da cadeia (WERZ et al., 2007).

Figura 1. Monossacarídeos mais abundantes em glicoconjugados de mamíferos; Em azul os açúcares explorados no presente trabalho (WERZ et al., 2007).

1.2 Aspectos gerais da química de carboidratos

A síntese de derivados sacarídicos apresenta dois pontos essenciais: i) a diferenciação das hidroxilas que possuem reatividade similar, exigindo o emprego de estratégias de proteção e desproteção altamente seletivas e ortogonais e ii) a obtenção de produtos com estereosseletividade desejada durante reações de glicosilação envolvendo a posição anomérica (C-1) (SEEBERGER & HAASE, 2000; LINDBERG et al., 2002).

Embora não exista uma regra geral para discriminar a reatividade das hidroxilas nas piranoses, uma vez que isso depende da configuração em que estão no anel (axial ou equatorial) e também das condições reacionais, é sabido que as hidroxilas primária e anomérica são mais reativas que as secundárias. Além disso, hidroxilas em posição equatorial são estericamente mais acessíveis em relação às axiais e por isso tendem a reagir mais rapidamente (figura 2) (FERRIER & COLLINS, 1996).

Figura 2. Estruturas químicas de glicose e seus epímeros e reatividade de seus grupos hidroxila.

Nesse contexto, a escolha de um grupo protetor e das condições reacionais para introduzi-lo ou removê-lo é fundamental para que as reações sejam químio-, régio- e estereosseletivas. Via de regra, as classes de grupos protetores mais comuns em química de carboidratos são: acetais (isopropilideno e benzilideno), ésteres (acetato e benzoato), éteres (benzila, tritila e alila), éteres de silila (trimetilsilila - TMS, t-butildimetilsilila - TBDMS, t-butildifenilsilila - TBDPS) e estanilenos (óxido de dibutilestanho – Bu_2SnO) (PÉTURSSON, 1997; PEI et al., 2007).

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

Em relação às hidroxilas secundárias de piranosídeos, uma estratégia muito aplicada é a proteção com (a)cetais. Uma propriedade importante desses grupos protetores é a formação de anéis de 5 (isopropilideno) ou 6 membros (benzilideno) na presença de hidroxilas adjacentes. Dessa forma, as hidroxilas das posições 3,4 (A) e 4,6 (B) podem ser protegidas de forma simultânea, seletiva e com alto rendimento (figura 3).

Figura 3. Proteção seletiva das hidroxilas 3,4 (A) e 4,6 (B) de D-galactose.

As proteções seletivas com isopropilideno ou benzilideno são catalisadas por ácido e podem ser obtidas com o emprego de 2,2 dimetoxipropano (2,2-DMP) ou acetona (A) e benzaldeído ou 2,2-dimetoxibenzeno (B), respectivamente. A remoção desses grupos pode ser realizada por hidrólise ácida com ácido *p*-toluenossulfônico (*p*-TSOH), ácido acético sob aquecimento ou com ácido trifluoroacético à 0 °C, por exemplo (PÉTURSSON, 1997).

No que concerne às reações envolvendo a hidroxila anomérica é especialmente importante destacar os conceitos de glicosilação, doador e aceptor glicosídico, e efeito anomérico. Reações de glicosilação clássicas são aquelas em que há formação de uma ligação *O*-glicosídica entre o carbono anomérico de um sacarídeo (doador) e uma função hidroxílica qualquer (aceptor), seja um álcool simples, outra molécula de açúcar ou um grupo -OH de aminoácidos desprotegidos (esquema 1). Vale destacar ainda que em biologia o termo glicosilação tem significado mais específico e se refere ao processo enzimático que adiciona

glicanas a lipídeos, proteínas ou outras moléculas orgânicas como forma de modificação pós-traducional.

Esquema 1. Reação genérica de glicosilação. R: grupo de proteção; R₁: grupo abandonador; R₂: substituinte de natureza diversa

Os grupos abandonadores tricloroacetimidatos, cloretos, brometos, tioglicosídeos e pentenilglicosídeos ativados por sais de prata, ácidos de Lewis ou eletrófilos “*soft*” são os mais utilizados na posição anomérica de doadores em reações de glicosilação. Entre os promotores destacam-se sais de prata, particularmente Ag₂CO₃ e AgClO₄, triflatos, sais de mercúrio e outros metais (SEEBERGER & WERZ, 2007; BONGAT & DEMCHENKO, 2007).

A obtenção de produtos estereosseletivos é o grande desafio dessas reações, sendo influenciada por promotores, solventes e pelos substituintes ligados ao anel do doador glicosídico. Nesse contexto, o efeito anomérico pode ser entendido como um fator estereoeletrônico que descreve a tendência do substituinte em C-1, vizinho ao heteroátomo do anel pirano, adotar preferencialmente orientação axial em detrimento da equatorial, ainda que a última seja favorecida por menor impedimento estérico (JUARIST & CUEVAS, 1992).

Esse comportamento inesperado tem duas explicações bem aceitas: A) quando o substituinte está na posição equatorial ocorre alinhamento de dipolos envolvendo os átomos de oxigênio endocíclico e anomérico, o que causa repulsão entre os mesmos. Em contrapartida, um sistema energeticamente mais estável ocorre quando o substituinte está em posição axial, o que resulta em dipolos opostos e menor repulsão (esquema 2) (MYDOCK & DEMCHENKO, 2010; DA SILVA, 2001).

Esquema 2. Efeito anomérico explicado pelos modelos eletrostático (A) e hiperconjugação (B).

A explicação alternativa (**B**) é a existência de efeito estereoeletrônico adicional promovida pelo fenômeno de hiperconjugação entre um dos pares de elétrons não compartilhados do oxigênio endocíclico e o orbital sigma antiligante σ^* da ligação axial. A sobreposição é eficiente apenas quando um dos pares de elétrons está em posição antiperiplanar ao orbital molecular desocupado de mais baixa energia (LUMO), o que ocorre para a orientação axial da ligação anomérica (JUARIST & CUEVAS, 1992).

A estereosseletividade da reação de glicosilação é também influenciada pelo substituinte em C-2 do doador glicosídico. Grupos não participantes em C-2, como éter benzílico ou azida, originam o correspondente α -glicosídeo, favorecido pelo efeito anomérico. Por outro lado, funções N- ou O-aciladas, como acetila ou benzoíla, nesta posição induzem à participação de grupo vizinho com formação de intermediário oxazolina (a partir do grupo NHAc) durante a ativação da posição anomérica e promovem glicosilação 1,2-*trans* seletiva, geralmente resultando em β -glicosídeos (BONGAT & DEMCHENKO, 2007).

1.3 Multivalência e efeito cluster

A atividade de glicoproteínas, peptideoglicanas, glicolípídeos e lipopolissacarídeos depende de interações complexas entre unidades de açúcar desses glicoconjugados e lectinas, proteínas que reconhecem especificamente carboidratos. Normalmente as interações monoméricas carboidrato-lectina são de baixa afinidade e seletividade. Todavia, interações poliméricas em processos biológicos podem apresentar aumento sinérgico de afinidade e especificidade quando ocorrem por multivalência, a qual está associada ao reconhecimento de múltiplas cópias de carboidratos por múltiplas cópias de lectinas presentes na superfície celular (BREWER et al., 2002; ELGAVISH & SHAANAN, 1997; CLONINGER, 2002).

Assim, efeito multivalente (MVE) ou efeito *cluster* pode ser definido como o aumento da resposta biológica observada para compostos que possuem mais de uma unidade bioativa ligada a uma matriz comum em comparação com a soma das contribuições dadas pelas moléculas bioativas isoladas (figura 4).

Idealmente, para serem consideradas interessantes do ponto de vista terapêutico, estruturas contendo múltiplas cópias de unidades glicosídicas devem apresentar valores de MVE positivos ($rp/n > 1$). Este valor é dado pela razão entre a potência relativa rp (K_i ou IC_{50} do composto multivalente/monovalente) e a valência n (número de unidades bioativas no sistema) (KANFAR et al., 2015; MATASSINI et al., 2016).

O modo de interação de estruturas multivalentes é dependente da natureza do alvo macromolecular e determinado por características deste, como o número de sítios de ligação, tendência à multimerização e impedimento estérico. Dessa forma, a potencialização de efeito observada em comparação a um monômero bioativo pode ser explicada por quatro fenômenos distintos: (A) Probabilidade de religação ampliada, que é gerado por uma concentração local melhorada em torno do sítio de ligação, (B) Quelação, quando vários locais de ligação idênticos estão presentes no alvo, (C) Efeito de ligação em subsítios, quando ocorrem ligações inespecíficas na superfície da macromolécula bloqueando o acesso de substratos ao sítio de ligação/catalítico e (D) Efeito de agrupamento, quando ocorre associação a múltiplas unidades macromoleculares (figura 5) (KANFAR et al., 2015; MIRABELLA et al., 2017).

Figura 5. Modelos de ligação para explicar o efeito multivalente. Adaptado de Matassini, 2016.

1.3.1 Glycoclusters e glicodendrimeros

Glycoclusters e glicodendrimeros foram primeiramente descritos por Roy e colaboradores (1993), como uma nova família de biomacromoléculas multivalentes sintéticas derivadas de carboidratos e capazes de mimetizar glicoconjugados no sistema biológico. A arquitetura molecular melhor definida e a viabilidade superior do ponto de vista terapêutico são algumas das vantagens desta nova classe em relação aos glicopolímeros (ROY et al., 1993; ROY, 1996).

Embora Roy (2003) tenha sugerido que os termos *glycoclusters* e glicodendrimeros referem-se a compostos que diferem entre si quanto à multivalência, ou seja, quanto à quantidade de carboidratos presentes na estrutura, existem diversas publicações em que os termos são usados indiscriminadamente como sinônimos.

Todavia, para fins de classificação nesse trabalho, *glycoclusters* são considerados sistemas de baixa valência contendo até oito açúcares unidos diretamente a uma estrutura ramificada, tais como os blocos de construção pentaeritritol e dipentaeritritol, enquanto glicodendrimeros apresentam maior número de carboidratos (figura 6). A construção de glicodendrimeros envolve a união de açúcares a estruturas hiper-ramificadas denominadas dendrimeros, tais como BoltornTM H20 e BoltornTM H30 (ROY, 2003).

Figura 6. Representação geral de *glycoclusters* e glicodendrimeros. Os blocos de construção pentaeritritol e dipentaeritritol são comumente empregados na preparação de *glycoclusters* enquanto as estruturas hiper-ramificadas BoltornTM H20 e BoltornTM H30 são empregadas na síntese de dendrimeros.

Os carboidratos presentes nestes sistemas multivalentes conferem alta especificidade e força de interação com lectinas, apresentando potencial capacidade de interferência em vários

processos que envolvam reconhecimento e adesão celular, sendo hoje uma abordagem muito útil e comum para desenvolver ferramentas de compreensão e intervenção nos processos biológicos relacionados a glicoconjugados (BAEK & ROY, 2002; ROY, 2003).

Todavia, é importante destacar que o aumento de eficiência decorrente dessas interações múltiplas ocorre de forma limitada e dependente de uma complexidade molecular ideal. Assim, um forte efeito *cluster* requer uma estrutura dendrímica que possa apresentar o carboidrato com orientação e espaçamento adequados, considerando fatores como multivalência, natureza dos carboidratos, formato, distância entre unidades e flexibilidade do dendrímero (MATASSINI et al., 2016; ROY, 2003).

Gómez-García e colaboradores (2010) demonstraram, por exemplo, uma substancial amplificação da afinidade de ligação devido à multivalência do *glycocluster* TriMan-OH contendo três unidades funcionalizadas de açúcar, cuja afinidade de ligação à lectina Concanavalina A foi 17 vezes maior em relação ao monômero manose (figura 7).

Figura 7. *Glycocluster TriMan-OH* e o monômero com respectivos valores de IC_{50} para a Concanavalina A.

Em muitos casos, aumentando-se a multivalência aumenta-se a eficiência da interação carboidrato-lectina. Entretanto, há relatos em que apenas dímeros, trímeros ou tetrâmeros apresentaram afinidade superior, quando comparados a análogos de maior valência (ROY, 2003; KANFAR et al., 2015).

Um estudo mais recente e completo envolvendo 20 peptídeos cíclicos ligados a unidades de um imino-açúcar (18 a 48 monômeros de 1-desoxinojirimicina-DNJ) reforçou essa ideia de que há limites para observação do efeito *cluster* (LEPAGE et al., 2016). O derivado CP-36 para o qual se observou o mais alto valor de MVE (rp/n= 4747) frente a enzima α -manosidase (JB α -man) apresentava 36 fragmentos bioativos e nenhum ganho de potência foi observado para os compostos maiores (figura 8).

Figura 8. Ciclopeptídeo ligado a 36 unidades de 1-desoxinojirimicina (DNJ) com MVE=4747.

Uma vez que *glycoclusters* e glicodendrimeros podem interagir em sistemas biológicos por mimetizarem glicoconjugados naturais, esta classe de substâncias pode ser empregada em processos como infecções por patógenos e tumores. Como diversos trabalhos direcionam para o emprego destes glicoconjugados como anti-adesinas (substâncias capazes de bloquear a interação entre oligossacarídeos e lectinas) é possível considerar a inibição destas interações como uma estratégia viável para o desenvolvimento de substâncias com importante atividade antiparasitária, antimicrobiana e antitumoral (TOUIABIA et al., 2007; ROY, 2003; BAEK & ROY, 2002).

Entre os exemplos mais animadores da exploração do efeito multivalente para o desenvolvimento de agentes anti-infecciosos destaca-se o trabalho publicado por Touaibia e colaboradores (2007). Nele os autores descrevem a preparação de um *glycocluster* antibacteriano contendo quatro unidades de manose que apresentou afinidade de ligação à lectina *Fimbriae* tipo 1 de *E. coli* 93 vezes superior ao monômero (figura 9-A). Uma avaliação prévia dessa lectina por cristalografia de raios-x havia demonstrado a existência de um domínio de reconhecimento de carboidrato com capacidade para acomodar apenas um resíduo de manose.

Figura 9. Em (A) *Glycocluster* com potencial antibacteriano; (B) Dendron 12, contendo quatro unidades trissacarídicas com alta afinidade de ligação à receptores DC-SIGN; e (C) Glicodendrímico de antígeno Tn preparado a partir do dendrímico PAMAM (suporte baseado em poliamidoamina).

Em 2010, Satín e colaboradores descreveram a preparação de um glicodendrímico (Dendron 12) capaz de bloquear fortemente lectina C (DC-SIGN), responsável pelo reconhecimento de glicoconjugados na superfície do vírus HIV. Na ocasião, o composto reduziu a infecção de Linfócitos TCD4⁺ pelo vírus em cerca de 90% a uma concentração de 50 μM , sendo que nas concentrações de 100 μM e 250 μM , a inibição foi quase completa (figura 9-B).

Baek e Roy (2002) descreveram a preparação e avaliação biológica de glicodendrímicos contendo 32 unidades de antígeno Tn ($\beta\text{-Gal}(1\text{-}3)\text{-}\alpha\text{-GalNAc}$), conhecidos como epítomos relacionados à processos tumorais e como importante antígeno para a diagnóstico e imunoterapia em câncer, particularmente em câncer de mama (figura 9-C). Estes glicodendrímicos propostos tiveram afinidade de ligação ao anticorpo 3800 vezes maior que o correspondente monômero de antígeno Tn.

Embora a maior parte das pesquisas na área de glicoconjugados e dos exemplos até aqui citados explorem interações carboidrato-lectinas, promissoras abordagens baseadas em interações multivalentes carboidrato-enzima e carboidrato-DNA têm emergido. Estudos recentes destas interações, apesar de preliminares, indicam uma boa aplicabilidade em processos enzimáticos, terapias gênicas e transporte de fármacos (DIOT et al., 2009; KANFAR et al., 2015; MIRABELLA et al., 2017; AIZAWA et al., 2012; AOYAMA et al., 2003).

Weïwer e colaboradores (2009) descreveram, por exemplo, a preparação de um *glycocluster* capaz de inibir a enzima neuraminidase do vírus *influenza* e, assim, impedir a liberação de novos vírus a partir da célula infectada. Este *glycocluster*, composto por quatro

unidades de ácido siálico, apresentou IC_{50} cerca de 3 vezes menor que o conhecido inibidor de neuraminidase *Neu5Ac2en* (figura 10).

Figura 10. Glycocluster de ácido siálico e inibidor *Neu5Ac2en* com respectivos valores de IC_{50}

Adicionalmente, Diot e colaboradores (2009) ao estudarem os efeitos da multivalência na inibição de glicosidases, observaram que o aumento da multivalência além de proporcionar aumento da potência de inibição enzimática, também influenciou o perfil de seletividade. Enquanto o monômero do imino-açúcar modificou apresentou melhor valor de atividade para β -glucosidase de amêndoas, o glycocluster trivalente inibiu preferencialmente α -manosidase de feijão (JB α -man) (figura 11).

<p>Monômero Imino-açúcar modificado</p>		
	IC_{50} (μm)	
	α -manosidase	β -glucosidase
Monômero	230	47
Glycocluster	35	400

Glycocluster

Figura 11. Monômero de derivado imino-açúcar e glycocluster trivalente com respectivos valores de IC_{50} para as enzimas α -manosidase e β -glucosidase.

As principais enzimas para as quais um efeito multivalente considerável tem sido observado estão sumarizadas na tabela a seguir. São apresentados também os diferentes blocos de construção, valência e aumento relativo de potência de inibição (tabela 1).

Tabela 1. Efeito multivalente observado na inibição de enzimas (Adaptado: Kanfar et al, 2015).

Enzima alvo	Plataforma	Ligante	Valencia (n)	Aumento de potência (rp)
α -manosidase de feijão	éteres de oligoetilenoglicol	DNJ	3(JB α -man)*	7,6
α -manosidase de feijão	porfirina	DNJ	4 (JB α -man)	800
α -manosidase de feijão e α -galactosidase	Fulereo C ₆₀	DNJ	12 (JB α -man)	2147
β -Glucocerebrosidase	β -ciclodextrina	DNJ e DMJ**	7 (Gcase)***	200
α -manosidase de feijão	Calixereno	DNJ	8 (JB α -man)	19
neuraminidase	pentaeritritol	zanamivir	4	3,2
Neuraminidase de influenza	Ácidos poli-glutâmicos	zanamivir	~ 47	500
anidrase carbônica	Fulereo C ₆₀	cumarinas	12	5
anidrase carbônica	PAMAN	sulfonamidas	4	6
humana hCA II e IX	nanoparticulas	sulfonamidas	12-15	72
anidrase carbônica	peptídeos	benzamidina	2	7391
Serina protease (trombina)				
5-Lipooxigenase	pentaeritritol	ácido cafeico	4	38

*JB α -man: α -manosidase de feijão **DMJ: desoximanonojirimicina *** β -Glucocerebrosidase

1.4 Estratégia de ‘Click Chemistry’

Os progressos mais recentes e significativos no desenvolvimento de ligantes que exploram o conceito de multivalência foram alcançados nas últimas duas décadas com o emprego de reações de cicloadição azido-alcino 1,3-dipolar catalisada por cobre (I) (CuAAC). A reação, descrita de forma independente pelos grupos de Sharpless e Meldal (2002), ocorre pela ligação de dois reagentes ou blocos de construção, um azido e um alcino terminal, de maneira rápida e regioseletiva gerando o produto 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituído na presença de cobre (I) (esquema 3) (TORNOE et al., 2002; ROSTOVTSEV et al., 2002; TIWARI et al., 2016; KOWALCZYK et al., 2012).

Esquema 3. Reação de cicloadição azido-alcino 1,3-dipolar catalisada Cu (I) entre grupos azido (N₃) e alcino ligados ao R₁ e R₂, respectivamente, formando o grupo 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituído.

O mecanismo pelo qual a reação ocorre foi primeiro proposto pelo grupo de Sharpless, em 2002, e desde então revisado com a inclusão de diferentes metalocíclicos. A proposta aqui

detalhada foi apresentada por Bock e colaboradores (2006) e sugere a participação de dois átomos de cobre (esquema 4). No primeiro momento, há a formação de uma estrutura de Cu(I)-acetilídeo através de um complexo π entre Cu(I) e o alcino terminal; a participação do segundo átomo de cobre parece estar relacionada à ativação do grupo azido, todavia a espécie de Cu(I)-acetilídeo poderia também se complexar a outro átomo de cobre, sendo difícil a proposição de apenas uma estrutura. Na sequência, ocorre a aproximação do grupo azido formando o complexo cobre-acetilídeo-azido, com dois átomos de cobre. Isto permite que o grupo azido fique mais susceptível ao ataque nucleofílico do carbono C-4 do alcino ao nitrogênio terminal N-3 do azido, gerando um metalociclo. Este metalociclo posiciona o azido de forma que o par de elétrons não compartilhado do nitrogênio N-1 se associe ao orbital π^* (antiligante) do carbono C-5-Cu(I), formando uma espécie triazolídeo de cobre mais estável. Por fim, a protonação da espécie de triazolídeo de cobre, seguida de dissociação, leva ao produto 1,2,3-triazol 1,4-disubstituído e a regeneração do catalisador (ROSTOVTSEV et al., 2002; BOCK et al., 2006; LEONETI et al., 2010).

Esquema 4. Mecanismo proposto para a reação de CuAAC. Adaptado de Bock (2006).

A fonte de sais de Cu (I) mais utilizada envolve a redução de sulfato de cobre (II) por ascorbato de sódio, embora outras condições igualmente eficientes sejam descritas, tais como complexos orgânicos, sais e derivados estabilizados de Cu (I), nanoclusters e também fio de cobre (ROSTOVTSEV et al., 2002; CHAN et al., 2004; GIL et al., 2007).

O grupo 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituído formado nas reações CuAAC apresenta propriedades físico-químicas favoráveis à descoberta de novos fármacos. A unidade triazol mantém os átomos de carbono ligados nas posições 1,4 a uma distância de 5 Å mimetizando a ligação amida (em que a distância é 3,9 Å), e diferentemente desta, não pode ser oxidada, reduzida ou clivada por hidrólise química ácida ou básica (figura 12). No meio biológico, o anel 1,2,3-triazol é estável à degradação metabólica e atua como acceptor e/ou doador de ligações de hidrogênio, podendo ainda estabelecer ligações adicionais do tipo dipolo-dipolo e π stacking (LEONETI et al., 2010).

Figura 12. Similaridade estrutural entre ligação amida e anel 1,2,3-triazol.

Considerando interações intra- e intermoleculares, o grupo triazolil pode fornecer um adequado espaçamento entre dendrímero e carboidrato, permitindo melhor interação deste com seu alvo, bem como o acoplamento de muitas unidades de açúcares. Adicionalmente, esta estratégia permite modular os parâmetros de flexibilidade molecular, densidade eletrônica e hidrofiliicidade. Como alternativa sintética, a utilização de irradiação por micro-ondas (MO) ou ultrassom em reações CuAAC pode ser empregada para a obtenção de maiores rendimentos e tempo reacional reduzido (MÉNDEZ-ARDOY, et al., 2009; LEONETI et al., 2010).

1.5 Alvos terapêuticos

1.5.1 Diabetes tipo II e glucosidases

Diabetes tipo II (TD2) é um distúrbio metabólico de etiologia múltipla caracterizado por secreção disfuncional de insulina por células beta pancreáticas e/ou resistência à insulina no fígado e tecidos periféricos, o que resulta em hiperglicemia crônica. Esta doença, principalmente associada ao estilo de vida e fatores genéticos, afeta aproximadamente 392 milhões de pessoas em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Apesar do benefício de mudanças na dieta e inclusão de exercícios físicos regulares à rotina diária de pacientes, o que reduz o risco de diabetes em 28%, a intervenção com agentes hipoglicemiantes pode ser necessária para aqueles com hiperglicemia persistente (LANCET, 2016; OMS, 2018).

Os fármacos mais utilizados para o tratamento de TD2 podem ser classificados em seis classes principais incluindo sulfonilureas, meglitidinas, biguanidas, tiazolidinedionas, inibidores do cotransportador sódio-glicose 2 (SGLT2) e inibidores da enzima α -glucosidase (AGIs), ou mesmo administração de insulina exógena e seus análogos (FERREIRA et al., 2010; MILLER et al., 2014).

Diferentemente de outros fármacos clássicos aprovados para o tratamento de diabetes Tipo-2, os AGIs não tem efeito direto sobre a secreção ou sensibilidade a insulina. De fato, esses compostos ligam-se competitivamente a região de processamento de carboidratos das enzimas α -glucosidases, impedindo a clivagem de oligossacarídeos em monossacarídeos absorvíveis nas microvilosidades do intestino delgado. Dessa forma a inibição dessas enzimas retarda a absorção de carboidratos, permitindo que as células beta pancreáticas tenham mais tempo para liberar insulina, levando à diminuição dos níveis de glicose na circulação, especialmente no período pós-prandial (MILLER et al., 2014).

Em humanos, quatro enzimas são responsáveis pela completa degradação de amido em glicose. Primeiro, as α -amilases salivares e pancreáticas quebram as ligações α -1,4 internas do amido em cadeias de dextrina mais curtas. As dextrinas são então hidrolisadas em glicose por duas exo-hidrolases das microvilosidades intestinais: maltase-glucoamilase e sacarose-isomaltase. Essas enzimas apresentam geralmente sítios ativos únicos e profundos que se ligam ao substrato natural ou inibidores análogos. Alfa e beta-glucosidases catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas de dissacarídeos a partir de terminais não redutores (1 $\rightarrow$ 4) liberando apenas uma molécula de glicose (HENRISSAT, 1991). Adicionalmente, a deficiência de β -glucosidase, conhecida como β -glucocerebrosidase, está envolvida na

disfunção metabólica da Doença de Gaucher, enquanto a deficiência de α -glicosidase ácida (GAA) é responsável pela doença metabólica recessiva autossômica, denominada de Doença de Pompe (MATASSINI, 2016).

Mecanismo de hidrólise de oligossacarídeos

O mecanismo pelo qual enzimas α - e β -glicosidases clivam a ligação *O*-glicosídica de oligossacarídeos envolve a participação de dois aminoácidos contendo ácidos carboxílicos no sítio ativo, cada um atuando como ácido ou base (esquema 5). Acredita-se que a reação possa ocorrer por dois mecanismos S_N2 principais. No primeiro e menos comum (i), moléculas de água ativadas por um dos carboxilatos atacam o carbono anomérico C-1 de glicose, com inversão de estereoquímica do produto formado (MELO et al., 2006; GLOSTER & DAVIES, 2010).

Esquema 5. Mecanismos de quebra de oligossacarídeos

Em (ii), a reação se processa via mecanismo bimolecular de substituição com formação de intermediário covalente com a enzima, e dupla inversão de configuração, o que resulta em retenção da estereoquímica original. Na proposta (i), um grupo carboxílico age como ácido e outro como base, diferentemente de (ii) em que um ácido carboxílico age como ácido e base e o outro, como nucleófilo. Evidências experimentais, entretanto, têm sugerido a geração de íon no estado de transição, via S_N1 , com participação de ambos os aminoácidos e clivagem da ligação entre o carbono anomérico e o oxigênio glicosídico, gerando espécies positivamente carregadas, como carbocátion (A) e íon oxocarbênio (B) (esquema 6) (GLOSTER & DAVIES, 2010).

Esquema 6. Formação de íon oxocarbênio (**B**) durante clivagem de ligação glicosídica por ação enzimática

Inibidores de glicosidases

A potência e especificidade de inibidores de glucosidase está diretamente relacionada a capacidade desses compostos de mimetizar o estado de transição da glicose supracitado, sendo sua conformação e a presença de grupos protonáveis de grande relevância para interação no sítio ativo. Os inibidores de α -glucosidase atualmente disponíveis para o tratamento de diabetes Tipo-2 são os aminoaçúcares acarbose (Precose[®]) e voglibose (Voglib[®]) e o imino-açúcar miglitol (Glyset[®]). Miglitol é um derivado *N*-alquilado de 1-desoxinojirimicina (DNJ), uma piperidina hidroxilada natural, isolada de culturas de *Streptomyces sp.* que tornou-se protótipo de uma série de compostos com elevada propriedade de inibição de glucosidases (figura 13). (FERREIRA et al., 2010; MILLER et al., 2014).

Figura 13. Fármacos inibidores de α -glucosidase 1-desoxinojirimicina

Apesar da alta atividade apresentada por esses inibidores monoméricos, uma melhor modulação da afinidade e seletividade de inibição de glicosidases tem sido alcançada por estruturas dendriméricas contendo múltiplas cópias de 1-desoxinojirimicina e isômeros.

Além do forte efeito multivalente repetidamente relatado para α -manosidase, caso do *glycocluster* trivalente de DNJ apresentado na figura 11 (pág. 11), outras glicosidases terapeuticamente relevantes também são sensíveis a esses imino-conjugados, tais como glucocerebrosidase-GCase humana, envolvida na doença de Gaucher, α -fucosidase, α - e β -galactosidases, α - e β -glucosidases e isomaltase (DIOT et al., 2009; MATASSINI et al., 2016).

Enquanto o MVE em α -manosidase foi experimentalmente relacionado a interações com múltiplas unidades macromoleculares e efeito de probabilidade de religação ampliada, o aumento de atividade sobre outras glucosidases que apresentam sítios ativos mais profundos se dá pela ligação em locais não catalíticos na superfície da enzima. Acredita-se que essas interações podem também bloquear a entrada do sítio catalítico impedindo a aproximação do substrato (STAUFFERT et al., 2016).

1.5.2 Doença de Chagas e *trans*-sialidase

A descoberta da doença de Chagas pelo médico brasileiro Carlos Justiniano Ribeiro Chagas (1879-1934) é considerada um feito sem precedente na história da medicina. Pela primeira vez um único cientista foi capaz de descrever em detalhes todos os aspectos de uma doença infecciosa: patógeno, vetor, hospedeiros, principais manifestações clínicas e epidemiologia. Passados 108 anos desde sua descoberta, a enfermidade figura agora como a terceira doença parasitária tropical de maior incidência no mundo, só superada por malária e esquistossomose, e também como uma das mais negligenciadas (IOC, 2018; RASSY JR et al., 2010).

De acordo com a OMS, a doença é endêmica em 21 países da América Latina e sul dos Estados Unidos e afeta aproximadamente 7 milhões de pessoas em todo mundo, com 30 milhões vivendo sob risco de infecção. Todavia, alguns estudos sugerem que esse número pode ser ainda subestimado devido a falhas no diagnóstico e notificações (OMS, 2017).

Tal como reportado por Carlos Chagas, o agente causador da doença é o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Esse parasita intracelular obrigatório possui notável habilidade de infectar células nucleadas de mamíferos, incluindo células musculares lisas e estriadas, macrófagos e fibroblastos (ANDRADE & ANDREWS, 2005).

Clinicamente a infecção é caracterizada por uma curta fase aguda com alta parasitemia e parasitismo tecidual, seguida de uma longa e progressiva fase crônica. Os sintomas da fase aguda são geralmente suaves, mas pacientes imunossuprimidos podem desenvolver uma forma mais grave como miocardite aguda e encefalomielite. Se não tratada precocemente, a doença de Chagas evolui para uma condição crônica na qual é observada destruição de tecidos musculares e nervosos, causando danos irreversíveis a diversos órgãos (coração, esôfago e cólon, entre outros) (RASSY JR et al., 2010; ZHANG & TARLETON, 1999).

O tratamento atual tem sido realizado com o uso do fármaco nitro-heterocíclico benznidazol (Rochagan) desenvolvido pela Roche® há mais de 50 anos. O fármaco nifurtimox (Lampit, Bayer®), também utilizado no tratamento por muito tempo, teve sua produção

descontinuada no Brasil em 2001 (figura 14). O mecanismo de ação do nifurtimox está relacionado com a formação de espécies reativas de oxigênio (ânions radiculares), envolvidas no dano de componentes críticos celulares do parasita, a partir da redução do grupo nitroarílico (WILLIAMS; LEMKE, 2002; URBINA et al., 2003; URBINA, 2010).

Figura 14. Estrutura química dos fármacos nifurtimox e benznidazol.

Já o mecanismo de ação do benznidazol (BZD) é mais complexo e além da liberação de intermediários radiculares e/ou metabólitos nucleofílicos que causam danos ao DNA do parasita, há evidências de que o fármaco atue na inibição enzima NADH-fumarase redutase bloqueando o crescimento de *T. cruzi*. Outra proposta sugere ainda que BZD é capaz de estimular a produção da citocina interferon gama (INF- γ), levando a aumento da fagocitose e lise celular (URBINA et al., 2003; RAJAO et al., 2014).

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. Os dois apresentam baixa eficácia na fase crônica, efeitos colaterais severos e precisam ser usados em tratamento de longo prazo. Assim, o desenvolvimento de fármacos mais seguros e eficazes continua a ser um desafio fundamental no controle da doença de Chagas (URBINA, 2010).

***trans*-sialidase de *Trypanosoma cruzi* (TcTS)**

A superfície de *T. cruzi*, assim como de outros protozoários, é densamente recoberta por proteínas altamente glicosiladas (mucinas) que atuam na interface entre parasita e hospedeiro mediando eventos relacionadas a adesão e invasão de células ou tecidos e evasão de resposta imune (CHIOCCOLA et al., 2000; COREY et al., 2002).

Particularmente multigalactosiladas, as glicoproteínas de mucina do *Trypanosoma cruzi* apresentam unidades de lactose e galactose ligadas a uma cadeia peptídica com sequência rica nos aminoácidos treonina e prolina, por de unidades de α -N-acetilglicosamina

(α -GlcNAc) (figura 15). Diferentemente, nos vertebrados, as unidades oligossacarídicas são ligadas à cadeia peptídica por uma unidade *N*-acetilgalactosamina (GalNAc).

Figura 15. Representação de mucina de *T. cruzi*, com unidades multigalactosiladas ligadas à unidade repetitiva Thr₈LysPro₂.

Quando presentes em posição terminal, os resíduos de β -galactopiranosídeo ligados a unidade α -GlcNAc presentes na mucina são decorados com ácido siálico no meio extracelular pela ação da enzima regulatória *trans*-sialidase de *T. cruzi* (TcTS), específica da superfície do parasita (CHIOCCOLA et al., 2000; BUSCAGLIA et al., 2006).

Devido à incapacidade do *T. cruzi* de sintetizar ácido siálico (derivado ácido *N*-acetilneuramínico), TcTS transfere esse monossacarídeo a partir de glicoconjugados de células do hospedeiro para mucinas parasitárias com retenção da configuração α -2,3 da ligação glicosídica (esquema 7). Além de contribuir para adesão de *T. cruzi* às células do hospedeiro, a sialilação das moléculas de mucina pela enzima *trans*-sialidase também protege o parasita contra os mecanismos de defesa do hospedeiro, tornando-o resistente à ação de anticorpos líticos anti- α -gal (AGUSTI et al., 2005; COREY et al., 2002).

Esquema 7. Reação de transferência (A) e hidrólise de ácido siálico (B) pela *trans*-sialidase

Apesar de ser classificada como sialiltransferase, promovendo reações reversíveis, *trans*-sialidase possui também ação residual hidrolítica, *in vivo* e *in vitro*, na presença de substratos adequados, como β -galactose terminal de glicoconjugados (BUSCHIAZZO et al., 2010).

Inibidores de *trans*-sialidase de *T. cruzi*

Considerando as importantes funções da sialilação para a sobrevivência do *Trypanosoma cruzi* no organismo hospedeiro e a presença exclusiva da enzima *trans*-sialidase no parasita, TcTS tornou-se rapidamente um alvo de interesse para o desenvolvimento de novos fármacos antichagásicos. Entretanto, apesar dos esforços de vários grupos de pesquisa, os avanços na busca por inibidores potentes e seletivos não permitiram ainda a validação definitiva de TcTS como alvo para o tratamento da doença de Chagas.

Com novos dados sobre a estrutura da enzima em complexos, obtidos por cristalografia de raios-x a partir de 2002 e a sugestão de um mecanismo consistente para a reação de *trans*-glicosilação catalisada por TcTS, o planejamento racional de inibidores tem sido baseado majoritariamente na busca por compostos capazes de mimetizar o substrato doador (ácido siálico) ou substratos aceptores (lactose e galactose). Outra possibilidade explorada tem sido a preparação de miméticos de substratos duplos, capazes de se ligar em ambas as regiões do sítio ativo (BUSCHIAZZO et al., 2010; NERES et al, 2008; KASHIF et al., 2017).

Inibidores miméticos de substrato doador

Em virtude da similaridade estrutural entre os sítios ativos e mecanismo catalítico de TcTS e neuraminidase de influenza, parte da busca racional de inibidores envolveu a avaliação de miméticos de ácido siálico ou de seu estado de transição capazes de inibir sialidasas virais.

Entre os compostos testados destacam-se o ácido 2-desoxi-2,3-didesidro-D-*N*-acetilneuramínico (DANA) e os fármacos zanamivir e oseltamivir (figura 16) (MOREIRA et al., 2009).

Figura 16. Estruturas de inibidores miméticos de ácido siálico (substrato doador)

Apesar de potentes inibidores de neuraminidase de influenza, esses compostos apresentaram fraca inibição sobre *trans*-sialidase de *T. cruzi*, mesmo com algumas interações favoráveis no sítio ativo. Curiosamente, a sialidase de *Trypanosoma rangeli* é fortemente inibida por DANA ($K_i = 0,15$ nM) ainda que haja 70% de identidade na sequência do domínio catalítico dessa sialidase em relação a TcTS (PARIS et al., 2005).

Na busca por inibidores potentes, estruturas não relacionadas a carboidratos também foram investigadas pelos grupos de Ferrero-Garcia e Neres, sendo descobertos os compostos piridoxal 5'-fosfato e os derivados de ácido benzóico (**A**) e piridina (**B**) (figura 17). Assim como os inibidores anteriores, esses compostos também apresentaram atividade inibitória fraca a moderada em relação à TcTS (FERRERO-GARCIA et al., 1993; NERES et al., 2007).

Figura 17. Inibidores miméticos de ácido siálico, não relacionados a carboidratos e seus respectivos K_i e IC_{50}

Inibidores miméticos de substratos aceptores

Entre os compostos planejados para ocupar exclusivamente o sítio aceptor de ácido siálico destaca-se o lactitol com valor de K_m aparente de 0,26 mM, IC_{50} de 0,21 mM e capacidade de reduzir infecção em células de mamíferos (cerca de 25%) (figura 18). Todavia, esse composto não inibe a atividade catalítica enzimática de TcTS, atuando apenas como um

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

Figura 18. Derivados miméticos de substratos aceptores

Em uma abordagem mais recente, o grupo de Rosalía Agustí descreveu ainda a preparação de *glycoclusters* de lactose tri-, tetra- e octavalentes capazes de inibir a transferência de ácido siálico para o substrato natural *N*-acetillactosamina. O composto mais potente (octavalente) foi capaz de inibir a enzima em 82% a 1 mM (AGUSTÍ et al., 2016).

Buscando também compostos com melhores propriedades farmacocinéticas Giorgi e colaboradores (2010) realizaram a conjugação de derivados de lactose com polietileno glicol (PEG) o que levou a obtenção do composto Lac-PEG capaz de inibir a ação de transferência de ácido siálico por TcTS em 82% com IC_{50} de 0,34 mM (figura 18).

Inibidores miméticos de substratos duplos

Os resultados pouco expressivos para inibidores miméticos do substrato doador ou acceptor foram em parte superados pelo desenho de estruturas capazes de ocupar os dois sítios simultaneamente, representando inibidores duplos, e tendo como primeiro exemplo importante o derivado de gangliosídeo C, com valor de IC_{50} na ordem de 100 μ M (figura 19). O mesmo grupo também realizou um *screening* de inibidores de TcTS por triagem virtual de bibliotecas de compostos comercialmente disponíveis e foi capaz de selecionar o derivado benzotiazol E como o mais ativo. (Neres et al., 2008).

Figura 19. Estruturas dos derivados miméticos de substratos duplos de TcTS descritos por Neres et al., 2009.

Em 2012, também explorando essa ideia, Campo e colaboradores descreveram a síntese de alguns glicoconjugados sialilmiméticos ligados a galactose, glicose ou gulose por um anel 1,2,3-triazol, teoricamente capazes de mimetizar o estado de transição do substrato natural (figura 20). Esses compostos foram testados na concentração de 1,0 mM e apresentaram atividade inibitória entre 67% a 91% (CAMPO et al., 2012).

Figura 20. Estruturas de neoglicoconjugados sialilmiméticos e porcentagem de inibição de TcTS a 1 mM.

Por fim, três sulfonamidas ligadas a chalconas hidroxiladas ou derivados de quinolinona mostraram-se os mais potentes inibidores de TcTS até agora reportados, inibindo a enzima em concentrações sub-micromolares (figura 21). Estudos de modelagem molecular posteriores demonstraram que o derivado quinolinona apresenta interações relevantes do grupo sulfonamido com aminoácidos das regiões do doador e acceptor no sítio ativo (KIM et al., 2009; LIMA et al., 2012).

Figura 21. Sulfo-chalconas e sulfo-quinolinona inibidores de TcTS.

Justificativa para a síntese de *glycoclusters* tetra e hexavalentes contendo unidades de glicose, galactose e ácido siálico

As funções abrangentes e complexas de carboidratos nos sistemas biológicos oferecem inúmeras possibilidades para o uso dessas estruturas no desenvolvimento de estratégias terapêuticas. Particularmente, em consequência de sua estrutura e função, glicosidases e glicosiltransferases envolvidas em patologias significativas são alvos constantes na busca por inibidores enzimáticos baseados em carboidratos. Nesta direção, o grupo de Química de Carboidratos da FCFRP-USP vem trabalhando no planejamento, síntese e avaliação biológica de carboidratos (pseudodissacarídeos, imino-açúcares, carbaaçúcares, derivados híbridos, glicomacrociclos, glicoaminoácidos, glicopeptídeos, etc) com potencial efeito terapêutico.

Assim, o conhecimento de características estruturais e mecanismo de ação das enzimas α - e β -glucosidases e TcTS e as sólidas evidências da última década de que glicosidases são sensíveis a efeito de multivalência conduziram ao planejamento de *homo-glycoclusters*, potencialmente inibidores dessas enzimas contendo três, quatro ou seis unidades correlatas aos seus substratos naturais (glicose e galactose/ácido siálico) em diferentes disposições do carboidrato, além do planejamento de *hetero-glycoclusters* contendo unidade de desoxinojirimicina (DNJ), além de glicose. Adicionalmente, foram propostos *glycoclusters* potencialmente inibidores de TcTS baseados na estrutura de α -GalNAc-*O*-Thr, um glicoaminoácido presente na unidade peptídica repetitiva que forma a mucina de *T. cruzi*.

6. CONCLUSÕES

Treze dos dezesseis *glycoclusters* tetra- e hexavalentes, inicialmente propostos, foram obtidos, sendo 8 derivados de glicose, 4 derivados de galactose e um derivado tetravalente de ácido siálico. Entre esses compostos, 10 são inéditos na literatura.

Tanto os blocos de construção multivalentes **17** e **18**, como os azido carboidratos modificados nas posições C-1, C-2, C-3 e C-6, empregados nos acoplamentos, são conhecidos e foram preparados por procedimentos convencionais descritos na literatura. Algumas dificuldades encontradas na reprodução desses métodos foram superadas pela repetição das reações em escalas diferentes e/ou pequenas alterações do protocolo utilizado.

Os acoplamentos azido-alcino por meio de reação CuAAC foram efetivos e os *glycoclusters* **1-7** e **9-14** obtidos em bons rendimentos. Esses resultados reafirmam uma vez mais a aplicabilidade de reações do tipo *Click Chemistry* na preparação de glicoconjugados de interesse não apenas terapêutico, mas também como ferramentas para entendimento de mecanismos de estrutura e função enzimática.

A pesquisa bibliográfica ao longo do trabalho levou ainda à expansão dos objetivos originais. Com a finalidade de gerar maior diversidade estrutural, o bloco de construção trivalente **29** foi utilizado para incorporação inicial de três unidades de D-glicose, ligadas pelas posições C-1 ou C-6, e posteriormente funcionalizado para acoplamento de unidades imino-açúcar derivadas de D-gluco-1-desoxinojirimicina ou seu correspondente isômero L-gulitol. A mesma estratégia levou a obtenção do *glycocluster* **85**, contendo unidades de D-galactose e um resíduo de ácido siálico.

Ensaio enzimáticos em α e β -glucosidases envolvendo os *glycoclusters* derivados de glicose **1-4**, **9-12** (*homo-clusters*) e **63-66** (*hetero-clusters*) mostraram atividade interessante apenas para os compostos mistos, evidenciando a importância do imino-açúcar para a interação com essas enzimas. Nestes estudos, a atividade reduzida pela metade observada em dois *heteroclusters*, em relação ao composto referência 1-desoxinojirimicina, foi atribuída a uma possível interferência dos resíduos de glicose expostos que podem ter dificultado a interação correta do imino-açúcar no sítio ativo da enzima. Novos *heteroclusters* deverão ser sintetizados para confirmar esta proposição.

No que diz respeito aos derivados multivalentes de galactose e/ou ácido siálico **5-7**, **13**, **14** e **85**, inibição expressiva da enzima TcTS foi alcançada pelo derivado **7** (IC₅₀ 450 μ M), uma vez que os valores de inibição frequentemente descritos para esta enzima são na faixa de 500

μM . Ensaios de atividade tripanocida, bloqueio de invasão e citotoxicidade sobre fibroblastos não-infectados cultivados *in vitro* evidenciaram a atividade de todos esses derivados contra a forma amastigota de *T. cruzi* e bloqueio de invasão celular pelo parasita (diminuindo a infecção em concentrações de até $25\mu\text{M}$).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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**. 2004 (14): 659-670.

AGUSTI, R.; MENDOZA, V. M.; GALLO-RODRIGUEZ, C.; DE LEDERKREMER, R. M. Selective sialylation of 2,3-di-*O*-(β -galactopyranosyl)-D-galactose catalyzed by *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. **Tetrahedron: Asymmetry**. 2005 (16): 541-551.

AGUSTÍ, R.; CANO, M.E.; CAGNONI, A.J.; KOVENSKY, J.; LEDERKREMER, R.M.; UHRIG, M.L. Multivalent sialylation of β -thio-glycoclusters by *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and analysis by high performance anion exchange chromatography. **Glycoconjugate Journal**. 2016 (33): 809–818.

AIZAWA, H.; OTOMO, K.; HONSHO, N.; SHIMAZAKI, T.; VILLENEUVE, M.; MATSUOKA, K.; HATANO, K.; TERUNUMA, D. A carbosilane dendrimer and a silacyclopentadiene analog carrying peripheral lactoses as drug-delivery systems. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**. 2012 (22): 3564–3566.

ALPER, P. B.; HUNG, S. C.; WONG, C. H. Metal Catalyzed Diazo Transfer for the Synthesis of Azides from Amines, **Tetrahedron Letters**. 1996 (37): 6029-6032.

ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. The *Trypanosoma cruzi*–host-cell interplay: location, invasion, retention. **Nature Reviews, Microbiology**. 2005 (3): 819-823.

AOYAMA, Y.; KANAMORI, T.; NAKAI, T.; SASAKI, T.; HORIUCHI, S.; SANDO, S.; NIIDOME, T. Artificial Viruses and Their Application to Gene Delivery. Size-Controlled Gene Coating with Glycocluster Nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**. 2003 (125): 3455-3457.

ASANO, N.; KENGO, O.; Kaneko, E.; Matsui, K. Enzymic synthesis of α - and β -D-glucosides of 1-deoxynojirimycin and their glycosidase inhibitory activities. **Carbohydrate Research**. 1994 (258): 255-266.

BAEK, M.G.; ROY, R. Synthesis and protein binding properties of T-antigen containing glycoPAMAM dendrimers. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. 2002 (10): 11-17.

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**. 1986 (27): 2307-2310.

BOCK, V. D.; HIEMSTRA, H.; VAN MAARSEVEEN, J. H. CuI-Catalyzed Alkyne–Azide “Click” Cycloadditions from a Mechanistic and Synthetic Perspective. **European Journal of Organic Chemistry**. 2006 51-68.

BREWER, C. F.; MICELI, M. C.; BAUM, L. Cluster, bundles, arrays and lattices: novel mechanisms for lectin-saccharides-mediated cellular interactions. **Current Opinion in Structural Biology**. 2002 (12): 616-623.

BONGAT, A. F. G.; DEMCHENKO, A. V. R. Recent trends in the synthesis of *O*-glycosides of 2-amino-2-deoxysugars. **Carbohydrate Research**. 2007 (342): 374-406.

BUSCAGLIA, C. A.; CAMPO, V. A.; FRASCH, A. C. C.; DI NOIA, J. M. *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. **Nature Reviews, Microbiology**. 2006 (4): 229-236.

- BUSSCHER, G. F.; RUTJES, F. P. J. T.; VAN DEL, F. L.; 2-Deoxystreptamine: Central Scaffold on Aminoglycoside Antibiotics. **Chemical Reviews**. 2005 (105): 775-791.
- 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**. 2010 (10): 757-768.
- 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**. 2012 (20): 145-156.
- 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**. 2010 (18): 2412-2427.
- CHABRE, Y. M.; CONTINO-PEPIN, C.; PLACIDE, V.; SHIAO, T. Z.; ROY, R. Expeditive synthesis of glycodendrimer scaffolds based on versatile TRIS and mannoside derivatives. **Journal of Organic Chemistry**. 2008 (73): 5602-5605.
- CHAN, T.R.; HILGRAF, R.; SHARPLESS, K.B.; FOKIN, V.V. Polytriazoles as copper(I)-stabilizing ligands in catalysis. **Organic Letters**. 2004 6 (17): 2853-2855.
- CHIOCCOLA, V. L. P.; SERRANO, A.; ALMEIDA, I.; FERGUSON, M. A.; 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**. 2000 (113): 1299-1307.
- CLONINGER, M. J. Biological applications of dendrimers. **Current Opinion in Chemical Biology**. 2002 (6): 2-7.
- 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**. 2002 (290): 29-34.
- DA SILVA, C. O. Efeito Anomérico em Carboidratos: Fatos e Hipóteses. **Revista Virtual de Química**. 2001 4 (3): 235-246.
- DA SILVA, J. G.; HYPPOLITO, M. A.; OLIVEIRA, J. A. A.; CORRADO, A. P.; ITO, I. Y.; CARVALHO, I. Aminoglycoside antibiotic derivatives: Preparation and evaluation of toxicity on cochlea and vestibular tissues and antimicrobial activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. 2007 (15): 3624-3634.
- DALE, M. P.; ENSLEY, H. E.; KERN, K.; BYERS, L. D. Reversible Inhibitors of β -Glucosidase. **Biochemistry**. 1985 p. 3530-3539.
- DAS, R.; MUKHOPADHYAY, B. Use of 'click chemistry' for the synthesis of carbohydrate-porphyrin dendrimers and their multivalent approach toward lectin sensing. **Tetrahedron Letters**. 2016 (57): 1775-1781.

- DAVIS, B. G. Synthesis of glycoproteins. **Chemical Reviews**. 2002 (102): 579.
- DIOT, J.; M. GARCÍA-MORENO, I.; GOUIN, S. G.; MELLET, C. O.; HAUP, K.; KOVENSKY, J. Multivalent iminosugars to modulate affinity and selectivity for glycosidases. **Organic Biomolecular Chemistry**. 2009 (7): 357–363, 2009.
- DOORES, K. J.; GAMBLIN, D. P.; DAVIS, B. G. Exploring and exploiting the therapeutic potential of glycoconjugates. **Chemistry - A European Journal**. 2006 (12): 656.
- ELGAVISH, S.; SHAANAN, B. Lectin-carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles. **Trends in Biochemical Sciences**. 1997 (22): 462-467.
- 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**. 1993 (213): 765-771.
- FERRIER, R. J.; COLLINS, P. M. Monosaccharides, their chemistry and their roles in natural products. New York: **Wiley**, 1996. p.594.
- FRANC, G.; KAKKAR, A. Dendrimer design using CuI-catalyzed alkyne–azide “click-chemistry”. **Chemical Communication**. 2008 5267–5276.
- FERREIRA, S. B.; SODERO, A. C. R.; CARDOSO, M. F. C.; LIMA, E. S.; KAISER, C. R.; SILVA JR, F. P.; FERREIRA, V. F. Synthesis, Biological Activity, and Molecular Modeling Studies of 1H-1,2,3-Triazole Derivatives of Carbohydrates as α -Glucosidases Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**. 2010 (53): 2364-2375.
- FISCHER, N.; GODDARD-BORGER, E. D.; GREINER, R.; KLAPÖTKE, T. M.; SKELTON, B. W.; STIERSTORFER, J. Sensitivities of Some Imidazole-1-sulfonyl Azide Salts. **Journal of Organic Chemistry**. 2012 (77): 1760-1764.
- FORD, J. H.; BERGY, M. E.; BROOKS, A. A.; GARRETT, E. R.; ALBERTI, J.; DYER, J. R.; CARTER, H. E. Further Characterization of Neomicin B and Neomicin C. **Journal of American Chemical Society**. 1955 (77): 5311-5314.
- GIL, M. V.; AREVALO, M. J.; LOPEZ, O. Click Chemistry — What's in a Name? Triazole Synthesis and Beyond. **Synthesis**. 2007 (11): 1589-1620.
- 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**. 2010 (27): 549-559.
- GLOSTER, T. M.; DAVIES, G. J. Glycosidase inhibition: assessing mimicry of the transition state. **Organic Biomolecular Chemistry**. 2010 (8): 305-320.
- GODDARD-BORGER, E. D.; STICK, R. V. An Efficient, Inexpensive, and Shelf-Stable Diazotransfer Reagent: Imidazole-1-sulfonyl Azide Hydrochloride. **Organic Letters**. 2007 (9): 3797-3800.
- GÓMEZ-GARCÍA, M.; BENITO, J. M.; GUTIÉRREZ-GALLEG, R.; MAESTRE, A.; MELLET, C. O.; FERNÁNDEZ, J. M. G.; BLANCO, J. L. J. Comparative studies on lectin–carbohydrate interactions in low and high density homo- and heteroglycocusters. **Organic Biomolecular Chemistry**. 2010 (8): 1849–1860.

GÜNTHER, K.; SCHIPS, C.; ZIEGLER, T. Preparation of Some Glycosyl Amino Acid Building Blocks via Click Reaction and Construction of a Glycotetrapeptide Library Using Spot Synthesis. **Journal of Carbohydrate Chemistry**. 2008 (27): 446-463.

HAKAMATA, W.; TOSHIYUKI, N.; OKU, T. Synthesis of p-Nitrophenyl 3- and 6-deoxy- α -D-glucopyranosides and Their Specificity to Rice α -Glucosidase. **Journal of Applied Glycoscience**. 1999 (46): 459-463.

HENRISSAT, B. A Classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid-sequence similarities. **Biochemistry Journal**. 1991 (280): 309-316.

HOLEMANN, A.; SEEBERGER, P. H. Carbohydrate diversity: synthesis of glycoconjugates and complex carbohydrates. **Current Opinion in Biotechnology**. 2004 (15): 615.

JUARISTI, E.; CUEVAS, G. Recent studies on the anomeric effect. **Tetrahedron**. 1992 48 (24): 5019-5087.

Instituto Oswaldo Cruz. Disponível em:

<<http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?tpl=home>>, Acesso em 10 jan. 2018. IOC, 2018.

KANFAR, N.; BARTOLAMI, E.; ZELLI, R.; MARRA, A.; WINUM, J-Y.; ULRICH, S.; DUMY, P. Emerging trends in enzyme inhibition by multivalent nanoconstructs. **Organic & Biomolecular Chemistry**. 2015 (13): 9894-9906.

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

KASHIF, M.; MORENO-HERRERA, A.; LARA-RAMIREZ, E. E.; RAMIREZ-MORENO, E.; BOCANEGRA-GARCIA, V.; ASHFAQ, M.; RIVERA, G. Recent developments in *trans*-sialidase inhibitors of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of drug Targeting**. 2017 (25): 485-498.

KATO, A.; KATO, N.; KANO, E.; ADACHI, I.; IKEDA, K.; YU, L.; OKAMOTO, T.; BANBA, I.; OUCHI, I.; TAKAHATA, H.; ASANO, N. Biological Properties of D- and L-1-Deoxyazasugars. **Journal of Medicinal Chemistry**. 2005 (48): 2036-2044.

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**. 2009 (10): 2475-2479.

KOWALCZYK, W.; MASCARAQUE, A.; SÁNCHEZ-NAVARRO, M.; ROJO, J.; ANDREU, D. Convergent Synthesis of Glycodendropeptides by Click Chemistry Approaches. **European Journal Organic Chemistry**. 2012 4565-4573.

<www.thelancet.com> **Lancet**. 2016 (388): 1545-1602.

LEMIEUAX, R. U.; HAYAMI, J. I. Mechanism of anomerization of tetra-O-acetyl-D-glucopyranosyl chlorides. **Canadian Journal of Chemistry**. 1965 (43): 2162-.

LEMIEUAX, R. U.; RATCLIFFE, R. M. The azidonitration of tri-O-acetyl-D-galactal. **Canadian Journal of Chemistry**. 1979 (57): 1244-1251.

LEONETI, V. A.; CAMPO, V. L.; GOMES, A. S.; FIELD, R. A.; CARVALHO, I. Application of copper(I)-catalysed azide/alkyne cycloaddition (CuAAC) 'click chemistry' in carbohydrate drug and neoglycopolymer synthesis. **Tetrahedron**. 2010 (66): 9475-9492.

- LEPAGE, M. L.; SCHNEIDER, J. P.; BODLENNER, A.; MELI, A.; DE RICCARDIS, F.; SCHMITT, M.; TARNUS, C.; NGUYEN-HUYNH, N-T.; FRANCOIS, Y-N.; LEIZE-WAGNER, E.; BIRCK, C. COUSIDO-SIAH, A. PODJARNY, A. IZZO, I. COMPAIN, P. Iminosugar-Cyclopeptoid conjugates raise multivalent effect in glycosidase Inhibition at unprecedented high levels. **Chemistry - A European Journal**. 2016 (22): 5151-5155.
- 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**. 2012 (23): 147-152.
- LINDBERG, J.; OHBERG, L.; GAREGG, P. J.; KONRADSSON, P. Efficient routes to glucosamine-myoinositol derivatives, key building blocks in the synthesis of glycosylphosphatidylinositol anchor substances. **Tetrahedron**. 2002 (58): 1387-1398.
- LOWARY, T. D.; HINDSGAUL, O. Recognition of synthetic O-methyl, epimeric, and amino analogues of the acceptor CX-L-Fucp-(1+2)-p-D-Galp-OR by the blood-group A and B gene-specified glycosyltransferases. **Carbohydrate Research**. 1994 (251): 33-67.
- MARTINS-TEIXEIRA, M. B.; CAMPO, V. L.; BIONDO, M.; SESTI-COSTA, R.; CARNEIRO, Z. A.; SILVA, J S.; CARVALHO, I. α -Selective glycosylation affords mucin-related GalNAc amino acids and diketopiperazines active on *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. 2013 (21): 1978-1987.
- MATASSINI, C.; PARMEGGIANI, C.; CARDONA, F.; GOTI, A. Are enzymes sensitive to the multivalent effect? Emerging evidence with glycosidases. **Tetrahedron Letters**. 2016 (57): 5407–5451.
- MELO, E. B.; GOMES, A. S.; CARVALHO, I. α - and β -Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. **Tetrahedron**. 2006 (62): 10277-10302.
- MÉNDEZ-ARDOY, A.; GÓMEZ-GARCÍA, M.; MELLET, C. O.; SEVILLANO, N.; GIRÓN, M. D.; SALTO, R.; SANTOYO-GONZÁLEZ, F.; FERNÁNDEZ, J. M. G. Preorganized macromolecular gene delivery systems: amphiphilic b-cyclodextrin “click clusters”. **Organic Biomolecular Chemistry**. 2009 (7): 2681–2684.
- MILLER, B. R.; NGUYEN, H.; HU, C. J-H.; LIN, C. NGUYEN, Q. T. New and Emerging Drugs and Targets for Type 2 Diabetes: Reviewing the Evidence. **American Health & Drug Benefits**. 2014 (7): 452-463.
- MIRABELLA, S.; D’ADAMIO, G.; MATASSINI, C.; GOTI, A.; DELGADO, S.; GIMENO, A.; ROBINA, I.; MORENO-VARGAS, A.J.; SESTAK, S.; JIMENES-BARBERO, J.; CARDONA, F. Mechanistic insight into the binding of multivalent pyrrolidines to α -mannosidases. **Chemistry - A European Journal**. 2017 (23): 14585–14596.
- MYDOCK, L.K.; DEMCHENKO, A.V. Mechanism of chemical O-glycosylation: from early studies to recent discoveries. **Organic and Biomolecular Chemistry**. 2010 (8): 497-510.
- 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**. 2009 (10): 212-231.
- NERES, J.; BUSCHIAZZO, A.; ALZARI, P. M.; WALSH, L.; DOUGLAS, K. T. Continuous Fluorimetric assay for high-throughput screening of inhibitors of *trans*-sialidase from *Trypanosoma cruzi*. **Analytical Biochemistry**. 2006 (357): 302-304.
- 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**. 2008 (13): 110-117.

NYFFELER, P. T.; LIANG, C. H.; KOELLER, K. M.; WONG, C. H. The chemistry of amine-azide interconversion: Catalytic diazotransfer and regioselective azide reduction. **Journal of American Chemical Society**. 2002 (124): 10773–10778.

Organização Mundial de Saúde. Disponível em:
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs138/en/>> . Acesso em: 20 jan. 2018. **OMS**, 2018.

Organização Mundial de Saúde. Disponível em:
<http://www.who.int/neglected_diseases/9789241564861/en/> Acesso em: 22 dez. 2017. **OMS**, 2017.

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**. 2005 (345): 923-934.

PARK, H.; HWANG, K. Y.; OH, K. H.; KIM, Y. H.; LEE, J. Y.; Kim, K. Discovery of Novel alpha-glucosidase inhibitors based on the virtual screening with the homology-modeled protein structure. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**. 2008 (16): 284-292.

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

PÉTURSSON, S. Protecting groups in carbohydrate chemistry. **Journal of Chemical Education**, 1997 11 (74): 1297-1303.

RAJÃO, M. A.; Furtado, C.; Alves, C. L.; Passos-Silva, D. G.; Moura, M. B.; Schamber Reis, B. L.; Kunrath-Lima, M.; Zuma, A. A.; Vieira-da-Rocha, J. P.; Garcia, J. B. F.; et al. Unveiling Benznidazole's mechanism of action through overexpression of DNA repair proteins in *Trypanosoma cruzi*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. 2014 (55): 309–321.

RAJARAM, H.; PALANIVELU, M. K.; ARUMUGAM, T. V.; RAO, V. M.; SHAW, P. N.; MCGEARY.; ROSS, B. P. “Click” Assembly of Glycoclusters and Discovery of a Trehalose Analogue that Retards A β 40 Aggregation and Inhibits A β 40-Induced Neurotoxicity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. 2014 (24) 4523–4528.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas Disease. **Lancet**. 2010, (375):1388–1402.

ROSTOVTSEV, V.V.; GREEN, L.G.; FOKIN, V.V. SHARPLESS, K.B. A stepwise Huisgen cycloaddition process: Copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. **Angewandte Chemie Int. ed.** 2002 (41): 2596-2599.

ROY, R.; ZANINI, D.; MEUNIER, S. J; ROMANOWSKA, A. Journal of the Chemical. Society., **Chemical Communications**. 1993 1869-1872.

ROY, R. Blue-prints, synthesis and applications of glycopolymers. **Trends in Glycoscience and Glycotechnology**. 1996 (8): 79-99, 1996.

ROY, R. A Decade of Glycodendrimer Chemistry. **Trends in Glycoscience and Glycotechnology**. 2003 (15): 291-310.

SATTIN, S.; DAGHETTI, A.; THÉPAUT, M.; BERZI, A.; SÁNCHEZ-NAVARRO, M.; TABARANI, G.; ROJO, J.; FIESCHI, F.; CLERICI, M.; BERNARDI, A. Inhibition of DC-SIGN-mediated HIV infection by a linear tri-mannoside mimic in a tetravalent presentation. **ACS Chemical Biology**. 2010 (5): 301–312.

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

SEEBERGER, P. H.; WERZ, D. B. Synthesis and medical applications of oligosaccharides. **Nature**. (446): 1046-1051, 2007.

STAUFFERT, F.; BODLENNER, A.; TRINH, T. M. N.; GARCIA-MORENO, M. I.; MELLET, C. O.; NIERENGARTEN, J-F.; COMPAIN, P. Understanding multivalent effects in glycosidase inhibition using C-glycoside click clusters as molecular probes. **New Journal of Chemistry**. 2016 (40) 7421-7430.

SZNAIDMAN, M. Bioorganic Chemistry: Carbohydrates (Ed.: S. M. Hecht), **Oxford University Press**, New York, 1999, p. 1-56.

TIWARI, V.; MISHRA, B. B.; MISHRA, B. K.; MISHRA, N.; SINGH, A. S.; CHEN, X. Cu-Catalyzed Click Reaction in Carbohydrate Chemistry. **Chemical Reviews**. 2016 (116): 3086–3240.

TORNOE, C. W.; CHRISTENSEN, C.; MELDAL, M. Peptideo-triazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. **Journal of Organic Chemistry**. 2002 (67): 3057-3064.

TOUAIBIA, M.; SHIAO, T. C.; PAPADOPOULOS, A.; VAUCHER, J.; WANG, Q.; BENHAMIOUD, K.; ROY, R. Tri- and hexavalent mannoside clusters as potential inhibitors of type 1 fimbriated bacteria using pentaerythritol and triazole linkages. **Chemical Communications**. 2007 380–382.

TROPPER, F. D.; ANDERSSON, F. O.; BRAUN, S.; ROY, R. Phase transfer catalysis as a general and stereoselective entry into glycosyl azides from glycosyl halides. **Synthesis**. 1991: 618-620.

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**. 2003 (21): 39-48.

URBINA, J. A. J.A. Specific chemotherapy of Chagas disease: current limitations and new approaches. **Acta Tropica**. 2010 (115): 55–68.

WERZ, D. B.; RANZINGER, R.; HERGET, S.; ADIBEKIAN, A.; VON DER LIETH, C. W.; SEEBERGER, P. H. Exploring the Structural Diversity of Mammalian Carbohydrates ("Glycospace") by Statistical Databank Analysis. **ACS Chemical Biology**. 2007 (2): 685.

WEIWER, M.; CHEN, C.; KEMP, M. M.; LINHARDT, R. J. Synthesis and Biological Evaluation of Non-Hydrolyzable 1,2,3-Triazole-Linked Sialic Acid Derivatives as Neuraminidase Inhibitors. **European Journal Organic Chemistry**. 2009 (16): 2611–2620.

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

ZAMONER, L. O. B.; ARAGÃO-LEONETI, V.; MANTOANI, S. P.; RUGEN, M.D.; NEPOGODIEV, S. A.; FIELD, R. A.; CARVALHO, I. CuAAC click chemistry with N-propargyl 1,5-dideoxy-1,5-imino-D-gulitol and N-propargyl 1,6-dideoxy-1,6-imino-D-mannitol provides access to triazole-linked piperidine and azepane pseudo-disaccharide iminosugars displaying glycosidase inhibitory properties. **Carbohydrate Research**. 2016 (429): 29–37.

ZHANG, L.; TARLETON, R.L. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. **Journal of Infectious Disease**. 1999 (180): 480–486.