



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO



**Síntese de derivados do ácido quínico como potenciais
inibidores de *trans*-sialidase de *T.cruzi* e avaliação de
atividade tripanocida**

Dayan Setton Amâncio

Ribeirão Preto
2022

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Dayan Setton Amâncio

Síntese de derivados do ácido quínico como potenciais inibidores de *trans*-sialidase de *T.cruzi* e avaliação de atividade tripanocida

Ribeirão Preto
2022

Dayan Setton Amâncio

Síntese de derivados do ácido quínico como potenciais inibidores de *trans*-sialidase de *T.cruzi* e avaliação de atividade tripanocida

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientadora: Prof^a. Dra. Ivone Carvalho

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas no dia 09/12/2022. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2022

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.

Amâncio, Dayan Setton

Síntese de derivados do ácido quínico como potenciais inibidores de *trans*-sialidase de *T.cruzi* e avaliação de atividade tripanocida.

151 p. : il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado 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. Ácido Quínico; 3. Análogos de Ácido siálico; 4. *trans*-sialidase; 5. *Click chemistry*.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Dayan Setton Amâncio

Síntese de derivados do ácido quínico como potenciais inibidores de *trans*-sialidase de *T.cruzi* e avaliação de atividade tripanocida.

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Aprovado em: 09/12/2022

BANCA EXAMINADORA

Prof.Dr. _____

Instituição: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____

DEDICATÓRIA

*Aos meus amados pais, Laila e Samuel,
pelo amor incondicional, pela dedicação e incentivo constantes. Além de serem exemplos de
integridade e esforço.*

*À minha companheira, Beatriz,
pelo carinho, apoio e compreensão, que fazem parte desta conquista.*

*A minha vó, Zélia,
por todos os ensinamentos passados ao longo da vida.*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Profa. Dra. Ivone Carvalho, pela orientação desde a graduação, que embasou minha formação científica, por todos os ensinamentos e pelas oportunidades oferecidas, pelo incentivo e respeito. O seu exemplo de trabalho, esforço, dedicação e otimismo, me estimulam a continuar trabalhando com entusiasmo.

AGRADECIMENTOS

Ao amigo, Marcelo Fiori, pela fundamental contribuição nesse trabalho e no meu desenvolvimento científico, pelas discussões, ideias e amizade.

Aos companheiros do grupo de pesquisa em Química Farmacêutica: Analu, Carol, Filipe, Maris, Paulo, Peterson, pelos momentos de alegria e frustração compartilhados, e pela prontidão em ajudar uns aos outros.

Aos amigos do 1º andar do bloco M da FCFRP: Carla, Cláudia, Gabi, Guilherme, João, Léo, Luís Otavio, Margot pela amizade, café e momentos de descontração, minha eterna gratidão.

Aos meus amigos: André, Bah, Fekank, Lemão, Martin, Yuri, pelo apoio nos dias difíceis, pelos inesquecíveis anos de amizade, pela torcida sempre sincera e pela confiança.

Aos Professores: Carlos Tomich, Flávio Emery, Giuliano Closoki, Mônica Pupo, Marcelo Baruffi, e Vanessa Leiria, pelo auxílio em diferentes etapas do projeto.

Aos técnicos dos laboratórios da FCFRP e FFCLRP: Luisão, Murilo, Thiago e Vinicius, pela ajuda e gentileza.

À FAPESP pelo suporte financeiro que viabilizou o desenvolvimento desse trabalho, processo número 2019/18069-3.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

EPÍGRAFE

“Conformar-se é submeter-se e vencer é conformar-se, ser vencido. Por isso toda a vitória é uma grosseria. Os vencedores perdem sempre todas as qualidades de desalento com o presente que os levaram à luta que lhes deu a vitória. Ficam satisfeitos, e satisfeito só pode estar aquele que se conforma, que não tem a mentalidade do vencedor. Vence só quem nunca consegue.”

(Fernando Pessoa)

RESUMO

AMÂNCIO, D. S. **Síntese de derivados do ácido quínico como potenciais inibidores de *trans*-sialidase de *T.cruzi* e avaliação de atividade tripanocida**. 151p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022

trans-sialidase de *Trypanosoma cruzi* (TcTS) é uma glicosiltransferase que desempenha papel fundamental na patogênese da doença de Chagas – uma infecção parasitária que afeta muitas pessoas na América do Sul e Central e cerca de 6 a 7 milhões de pessoas em todo o mundo. Apesar dos esforços de órgãos internacionais para o desenvolvimento de uma estratégia inovadora contra esta doença, nenhum novo fármaco atendeu os requisitos para uso clínico. Este estudo envolve a síntese de inibidores de TcTS mais potentes, que mimetizam parcialmente ácido siálico, substrato doador natural de TcTS. A síntese foi iniciada a partir do precursor ácido quínico (AQ), um produto natural que preserva características estruturais de ácido siálico, como grupos hidroxila e um ácido carboxílico, ligado ao anel ciclohexanol. Os novos derivados de AQ foram sintetizados contendo uma cadeia lateral triazólica. Com base em estudos *in silico*, o tamanho e as propriedades eletrônicas dessas cadeias laterais foram otimizados para interação com TcTs. Primeiramente, foram sintetizados os precursores azido **12** e **18**. Os quatorze novos derivados triazólicos foram obtidos a partir da reação de cicloadição azida-alcino 1,3-dipolar (CuAAC) catalisada por Cu(I) utilizando uma biblioteca de alcinos para obtenção dos derivados benzílicos (**22, 23**), *para*-metoxilados (**24, 25**), *para*-nitro (**26, 27**), álcool (**28, 29**), piridina (**30, 31**), tolueno (**32, 33**) e *O*-benzilados (**34, 35**). Também foi sintetizado um novo alcino que atuou como *linker* específico (**36**) na obtenção de dois derivados dimerizados (**37, 38**). A última etapa para todos os derivados foi a reação de desesterificação para obtenção dos correspondentes ácidos carboxílicos, sendo possível obter os derivados de benzila (**39**), metoxila (**40, 41**), nitro (**42**), álcool (**43**), e tolueno (**44**). Os derivados triazólicos benzílicos **23** e **39** foram submetidos aos ensaios enzimáticos com a enzima TcTS, e apresentaram inibição em concentração 1mM de aproximadamente 60%, o que confirmou que estes compostos e seus respectivos análogos podem atuar como potenciais inibidores de TcTS.

1. Doença de Chagas; 2. Ácido Quínico; 3. Análogos de Ácido siálico; 4. *trans*-sialidase; 5. *Click chemistry*.

ABSTRACT

AMÂNCIO, D. S. **Synthesis of Quinic Acid Derivatives as Potential Inhibitors of *T.cruzi trans-sialidase* and Evaluation of Trypanocidal Activity**. 151p. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Trypanosoma cruzi trans-sialidase (TcTS) is a retaining glycosyltransferase that plays a key role in the pathogenesis of Chagas' disease—a parasitic blood-borne infection, which affects many people in South and Central America and 6 to 7 million people worldwide. Despite the efforts of international organs for the development of an innovative strategy against this disease, no new drug candidate met the requirements for clinical use. Therefore, this study involves the synthesis and evaluation of more potent TcTS inhibitors that partially mimic the sialic acid, the natural donor substrate of TcTS. The synthesis started from quinic acid (QA), a natural product that preserves structural characteristics of the sialic acid such as hydroxyl groups and a carboxylic acid, linked to the cyclohexanol ring. The novel QA derivatives were designed bearing a triazolic side chain. Based on *in silico* studies, the size and electronic properties of these side-chains are been optimized for TcTs interaction. First, we synthesized the key azido derivatives **12** and **18**. The fourteen novel triazolic derivatives were obtained from the Cu(I)-assisted 1,3-dipolar azide–alkyne cycloaddition (CuAAC) reaction using a library of alkynes, to yield the benzilic (**22**, **23**), *para*-methoxide (**24**, **25**), *para*-nitro (**26**, **27**), alcohol (**28**, **29**), pyridine (**30**, **31**), toluene (**32**, **33**) and *O*-benzilic (**34**, **35**) compounds. A new alkyne (**36**) that acted as a specific linker was also synthesized in order to obtain two dimerized derivatives (**37**, **38**). The last step for all derivatives was the deesterification reaction to obtain the corresponding carboxylic acids, and yielded benzyl (**39**), methoxyl (**40**, **41**), nitro (**42**), alcohol (**43**) and toluene (**44**). The benzylic triazole derivatives **23** and **39** were submitted to enzymatic assays with the enzyme TcTS, and showed inhibition at 1mM concentration of approximately 60%, which confirmed that these compounds and their respective analogues can act as potential inhibitors of TcTS.

Keywords: 1. Chagas Disease; 2. Quinic Acid; 3. Sialic acid analogues; 4. *Trans-sialidase*; 5. Click chemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A) Comparação entre a distribuição da doença em 2002 e 2017 (adaptado de SANTOS <i>et al.</i> , 2020). B) Prevalência da infecção por <i>T. cruzi</i> por país na América Central (adaptado de PETERSON <i>et al.</i> , 2019).....	1
Figura 2. Estrutura química dos fármacos existentes para o tratamento da doença de Chagas.....	5
Figura 3. Estrutura química do fexinidazol.....	7
Figura 4. Estrutura química dos antifúngicos itraconazol, ravuconazol, posaconazol e E1224.....	8
Figura 5. Estrutura química do alopurinol, AN4169 e GNF6702.....	9
Figura 6. Ácidos Sialicos naturais, ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac), ácido neuramínico (Neu), ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc) e ácido 2-ceto-3-desoxi-D-glicero-D-Galacto-nonulosônico (Kdn).....	11
Figura 7. Complexo cristalográfico TcTS-DANA, código PDB 1MS8.	13
Figura 8. Modo de ligação proposto para DANA em trans-sialidase, código PDB 1MS8.....	13
Figura 9. Estruturas do ligante MuNANA e o complexo cristalográfico TcTS – MuNANA, código PDB (1S0J).....	14
Figura 10. A) DANA e lactose no sítio catalítico de TcTS e as duas conformações assumidas pelos resíduos envolvidos na ligação (Tyr 119) e ativação enzimática (Tyr 342). Em transparente é mostrada a posição de Tyr 119 na enzima não ligada. B) Mapa de densidade eletrônica (2Fo-Fc), mostrando as moléculas de lactose e DANA no complexo ternário. (adaptado de: BUSCHIAZZO <i>et al.</i> , 2002).....	15
Figura 11: Estruturas de compostos inibidores do subsítio doador de <i>trans</i> -sialidase.....	16
Figura 12. Estruturas do ácido chiquímico, ácido quínico e ácido gálico.....	17
Figura 13. Substrato natural ácido siálico e o material de partida D-(-)-ácido quínico.....	18
Figura 14: A) Interações de DANA no sítio de TcTS, código PDB: 1MS8 (adaptado de: BUSCHIAZZO <i>et al.</i> , 2002). B) Interações de DANA no sítio de Neuraminidase, código PDB: 1F8D (adaptado de: SMITH <i>et al.</i> , 2001).....	19
Figura 15. Comparação do inibidor análogo de estado de transição Neu5Ac2en, intermediário reacional, e derivados carbocíclicos (Adaptado de PATRICK e SPENCER, 2009).....	21

Figura 16. Retrossíntese dos derivados triazólicos com configuração R e S, via intermediários R e S azido e D-(-)-Ácido Quínico.....	23
Figura 17. Substrato natural ácido siálico, material de partida D-(-)-ácido quínico, e derivados triazólicos propostos.....	54
Figura 18. Sobreposição dos resultados da validação de docking (azul) e o ligante cristalográfico DANA (verde).....	55
Figura 19. Resultados de <i>docking</i> em 3D e 2D para as interações realizadas pelo derivado triazólico no sítio ativo de <i>trans-sialidase</i>	56
Figura 20. Modo de ligação proposto para DANA em <i>trans-sialidase</i> , código PDB 1MS8 (BUSCHIAZZO <i>et al.</i> , 2002).....	56
Figura 21. A) Espectro de RMN ¹ H (300MHz, CDCl ₃) do composto isolado na reação de conversão do derivado hidroxilado 7 em azido 9 , e B) Espectro de RMN ¹ H (300MHz, CDCl ₃) do derivado lactônico 6	60
Figura 22. A) Estrutura 3D do derivado azido 12 com configuração 5S. B) Estrutura 3D do derivado azido 18 com configuração 5R.....	64
Figura 23. Estrutura 3D do derivado azido 12 com configuração 5S e ângulos entre H-4 e H-5 (58,7°), H-5 e H-6a (48,2°) e H-5 e H-6b (165,2°).....	65
Figura 24. Estrutura 3D do derivado azido 18 com configuração 5R e ângulos entre H-4 e H-5 (64,8°), H-5 e H-6a (74,6°) e H-5 e H-6b (41,6°).....	66
Figura 25. Espectro RMN ¹ H dos derivado azido 12 e 18 expandido para análise de H-4 e H-5 e H-6.....	66
Figura 26. Características estruturais do anel triazólico que permitem interaçõesceptoras e/ou doadoras de ligação de hidrogênio.	70

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> , passando pelo hospedeiro vertebrado e inseto vetor. (Adaptado de https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html CDC, USA, 2021).....	3
Esquema 2: Mecanismo de formação de EROS a partir de compostos nitro-aromáticos (adaptado de ROCHE <i>et al.</i> , 2012).....	6
Esquema 3: Representação de alguns dos importantes mecanismos de invasão celular do T.cruzi e seus alvos (adaptado de CAMPO <i>et al.</i> , 2016).....	10
Esquema 4: Transferência de ácido siálico pela <i>trans-sialidase</i>	12

Esquema 5: Mecanismo proposto para a hidrólise catalisada por sialidases virais, os substituintes foram omitidos durante o mecanismo para maior clareza (adaptado de: PATRICK e SPENCER, 2009).....	20
Esquema 6: Exemplo genérico da ciclização de Huisgen.....	21
Esquema 7: Rota sintética para obtenção do intermediário azido 5 , a partir do precursor ácido quínico 1	57
Esquema 8: Rota sintética modificada com grupo protetor ciclopropilideno para obtenção do intermediário azido 9 , a partir do precursor ácido quínico 1	59
Esquema 9: Método de formação de azida via álcool, utilizando DPPA como fonte de azida e DBU como base.....	59
Esquema 10: Rota sintética para obtenção do intermediário desprotegido 10 e seu correspondente derivado azido 11 , a partir do precursor ácido quínico 1	60
Esquema 11: Tentativas de desidratação de 11 utilizando POCl ₃ e SOCl ₂ , ambos em piridina.....	61
Esquema 12: Rota sintética para obtenção do intermediário azido 12 , a partir do precursor ácido quínico 1	62
Esquema 13: Rota sintética passando pelo intermediário acetilado 15 para obtenção de derivado azido 16	63
Esquema 14: Formação do produto azido 12 e epóxido 17 , a partir de mesil 14 , e formação do derivado azido 18 com config. invertida em C-5.....	64
Esquema 15: Rota modificada para obtenção do derivado mesilado 13 a partir do novo precursor ácido chiquímico 19	68
Esquema 16. Reação de “CuAAC” resultando em um composto 1,2,3-triazólico 1,4-dissubstituído (adaptado de RAMAPANICKER e CHAUHAN, 2016).....	69
Esquema 17. Mecanismo proposto para a reação de CuAAC (adaptado de BOCK <i>et al.</i> , 2006).....	70
Esquema 18: Síntese dos derivados triazólicos a partir dos isômeros 12 e 18	71
Esquema 19: Síntese dos derivados triazólicos dímerizados 37 e 38 , a partir de TTDDA funcionalizado 36 e o intermediário azido 12 ou 18	73
Esquema 20: Reação catalisada por TcTS, na presença do doador MuNANA e formação de metilumbeliferona que pode ser detectado em fluorímetro.....	76
Esquema 21: Conversão enzimática do ácido chiquímico catalisada pela enzima Chiquimato Quinase.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- Å: angstroms
- Ac₂O: anidrido acético
- AcOEt: acetato de etila
- AS: ascorbato de sódio
- Bn: benzil
- CCC: cromatografia em coluna clássica
- CCD: cromatografia em coluna delgada
- CDCl₃: clorofórmio deuterado
- CD₃OD: metanol deuterado
- CuSO₄: sulfato de cobre
- DBU: 1,8-diazabicyclo(5.4.0)undec-7-eno
- DCM: diclorometano
- DMF: *N,N*-dimetilformamida
- DMSO-d₆: dimetilsulfóxido deuterado
- DPPA: difenilfosforil azida
- 2,2 DMP: 2,2 dimetoxipropano
- ESI: ionização por *electrospray*
- Et₃N: trietilamina
- FM: fase móvel
- Hex: hexano
- HRMS: espectrometria de massas de alta resolução
- H-Ar: hidrogênio aromático
- H-Pyr: hidrogênio aromático de grupo piridina.
- LiOH: hidróxio de lítio
- MeCN: acetonitrila
- MeOH: metanol
- MHz: mega-Hertz
- MO: micro-ondas
- MsCl: cloreto de mesila (cloreto de metanossulfonilo)
- NaHCO₃: bicarbonato de sódio
- NaN₃: azida de sódio

NaOMe: metóxido de sódio

POCl₃: oxicloreto de fósforo (cloreto de fosforila)

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

δ: deslocamento químico

ap.: aparente

d: duplete

dd: duplo duplete

ddd: duplo duplo duplete

dt: duplo tripleto

J: constante de acoplamento

m: multiplete

s: simpleto

t: tripleto

SN₂: substituição nucleofílica bimolecular

SOCl₂: cloreto de tionila

TFA: ácido trifluoroacético

Tf₂O: anidrido trifílico

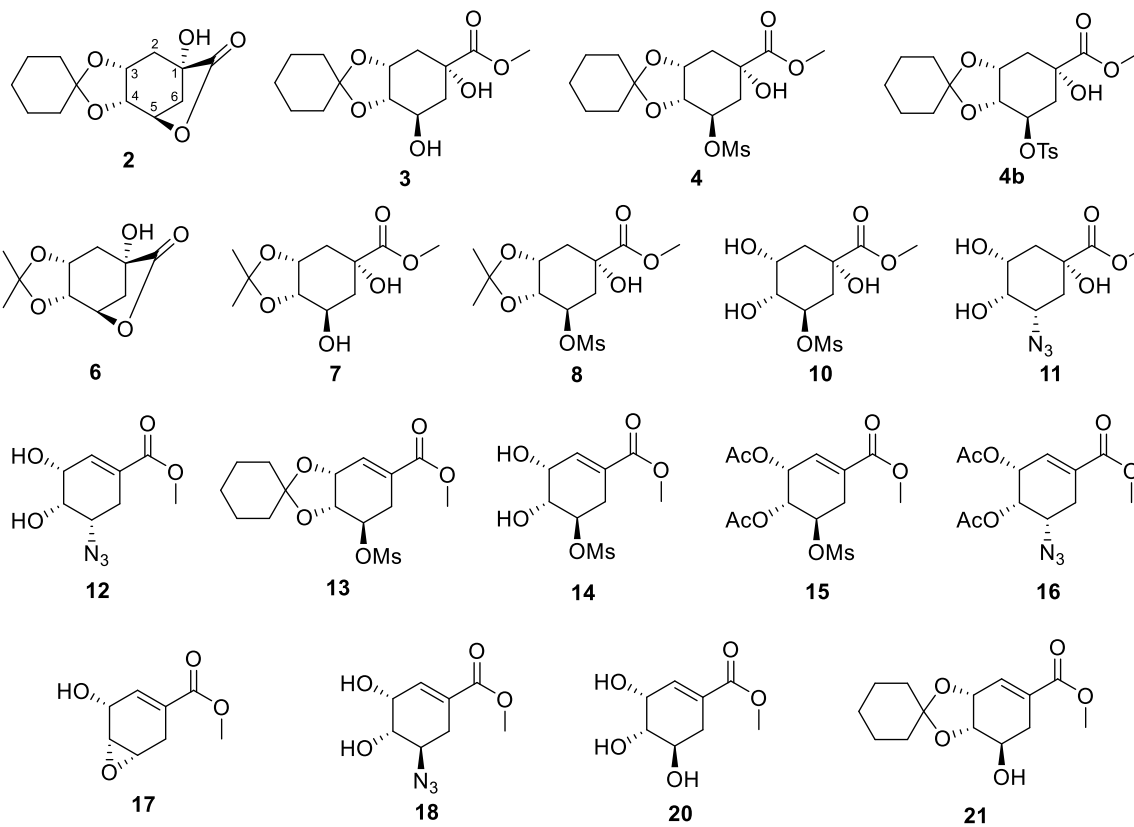
THF: tetrahidrofurano

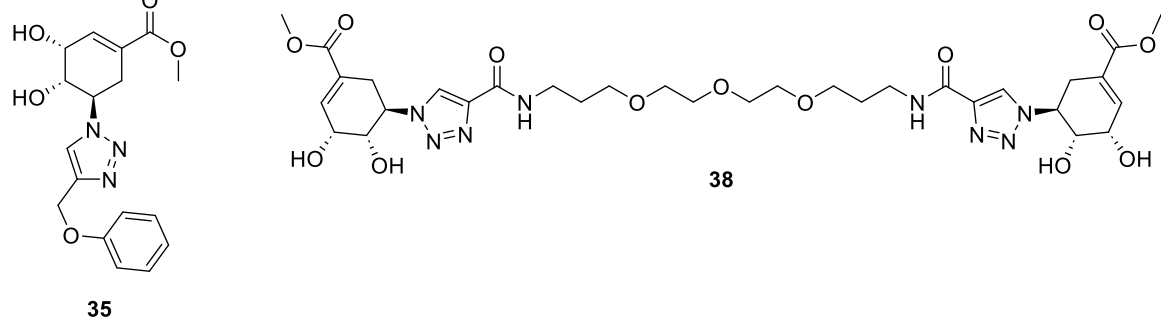
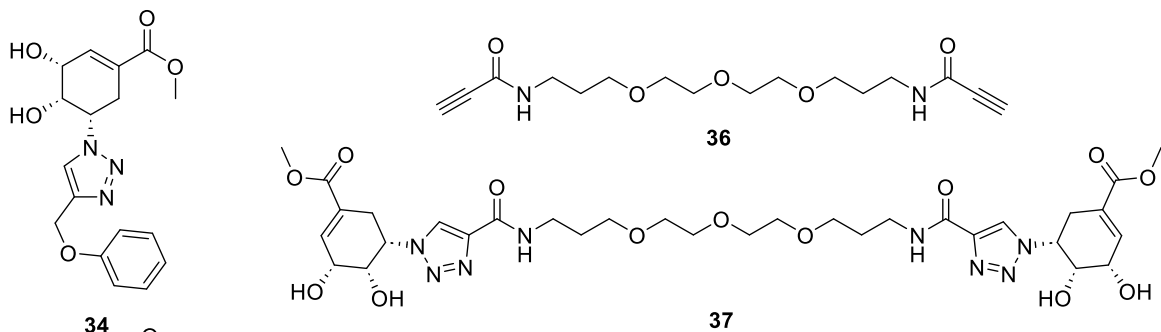
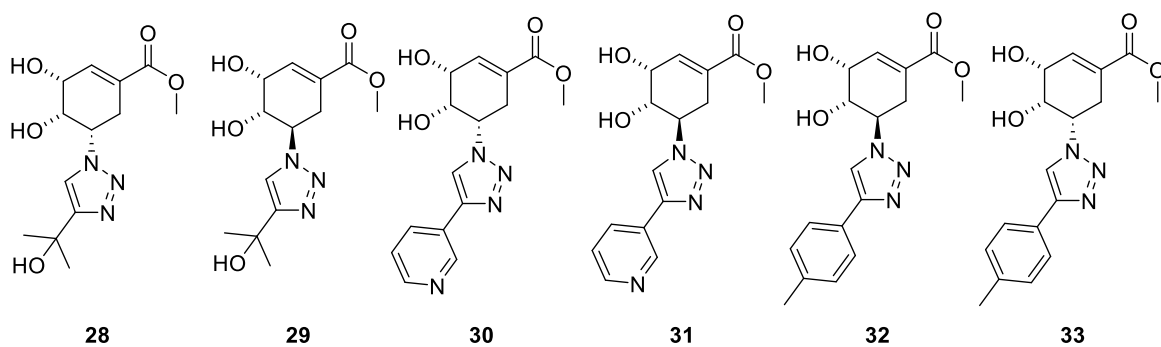
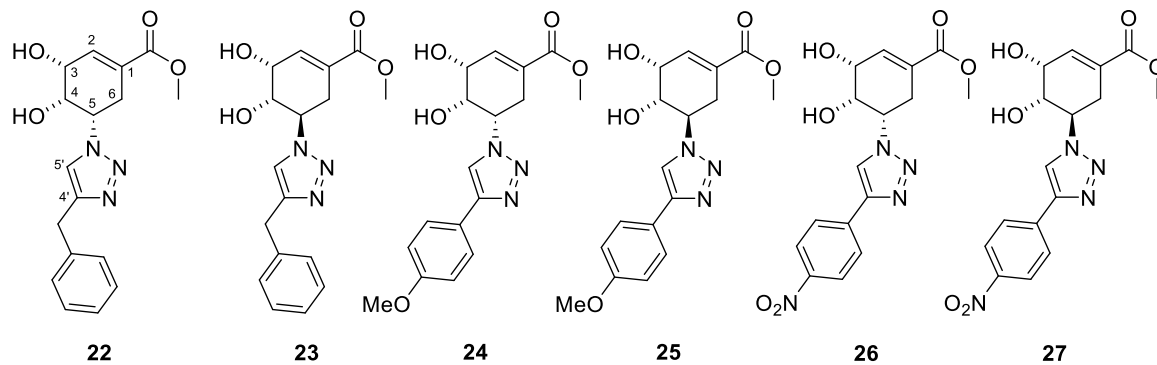
Tol: tolueno

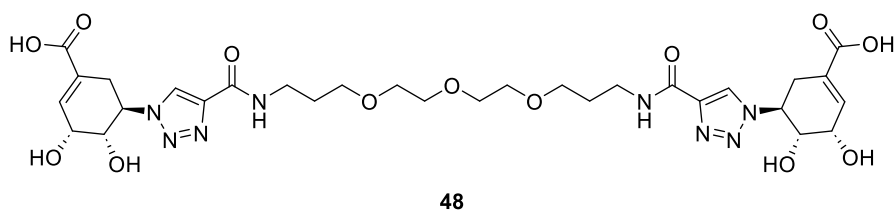
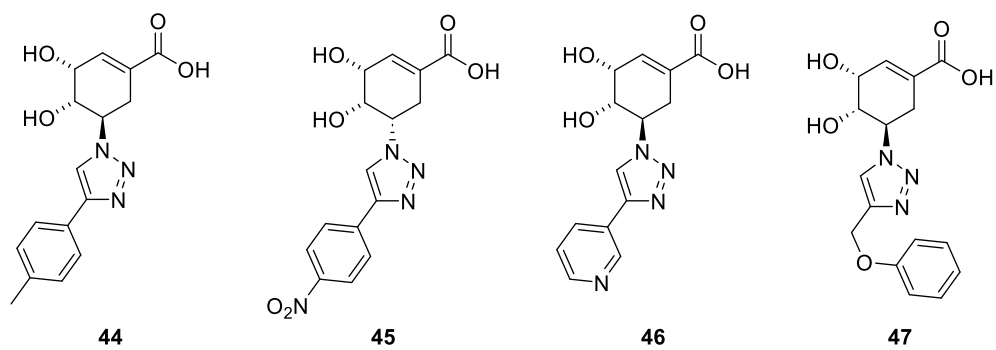
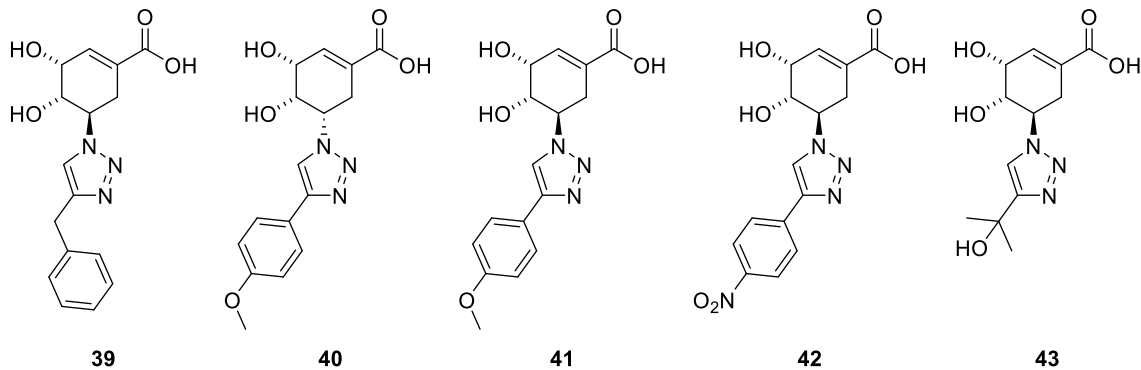
TsCl: Cloreto de tosila

W: Watts

p-TSOH: ácido *p*-toluenossulfônico

LISTA DOS PRINCIPAIS INTERMEDIÁRIOS SINTETIZADOS

LISTA DOS PRINCIPAIS PRODUTOS SINTETIZADOS (ÉSTER TRIAZÓLICOS)

LISTA DOS PRODUTOS FINAIS SINTETIZADOS (ÁCIDOS)

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE ESQUEMAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	v
PRINCIPAIS COMPOSTOS SINTETIZADOS	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 ASPECTOS GERAIS DA DOENÇA DE CHAGAS	1
1.2 CICLO DE VIDA E TRANSMISSÃO	2
1.3 TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS	5
1.4 DESCOBERTA DE NOVOS TRATAMENTOS	7
1.5 MECANISMO DE ADESÃO E INVASÃO POR <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	9
1.5.1 MUCINAS DE <i>T.CRUZI</i> (TcMUC)	10
1.5.2 GALECTINA 3	11
1.6 ÁCIDO SIÁLICO E <i>TRANS</i> -SIALIDASE	11
1.6.1 ÁCIDO SIÁLICO	11
1.6.2 <i>TRANS</i> -SIALIDASE	12
1.6.2.1 ESTRUTURA 3D DA <i>TRANS</i> -SIALIDASE	13
1.6.2.2 MECANISMO DE AÇÃO E ESTADO DE TRANSIÇÃO	14
1.7 INIBIDORES DE TcTS	15
1.8 ÁCIDO QUÍNICO	17
1.9 NEURAMINIDASE, UMA SIALIDASE VIRAL	18
1.9.1 NEURAMINIDASE X TcTS	19
1.10 <i>CLICK CHEMISTRY</i>	21
2. OBJETIVOS.....	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1 MATERIAIS	24
3.2 MÉTODOS SINTÉTICOS	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
4.1 ESTUDOS PRÉVIOS E <i>DOCKING</i>	54
4.2 SÍNTESE DO PRECURSOR AZIDO	57
4.2.1 REAÇÃO DE ELIMINAÇÃO	61
4.2.2 REAÇÃO DE ACETILAÇÃO E DERIVADO EPÓXIDO	63
4.3 CONFIGURAÇÃO 5S E 5R DO DERIVADO AZIDO	64
4.4 ÁCIDO CHIQUÍMICO E ADEQUAÇÃO DA ROTA SINTÉTICA	68
4.5 SÍNTESE DOS DERIVADOS TRIAZÓLICOS VIA " <i>CLICK CHEMISTRY</i> "	69
4.5.1 MECANISMO PROPOSTO PARA REAÇÃO CUAAC	69
4.5.2 SÍNTESE DOS DERIVADOS TRIAZÓLICOS	71
4.6 REAÇÃO DE DESESTERIFICAÇÃO E OBTENÇÃO DOS PRODUTOS FINAIS	74
4.7 INIBIÇÃO DE <i>TRANS</i> -SIALIDASE (TcTS)	76
4.8 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE TRIPANOCIDA	78
5. CONCLUSÕES.....	79
6. PERSPECTIVAS.....	80
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
8. ANEXOS.....	88

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais da Doença de Chagas

A doença de Chagas, descrita há mais de 100 anos pelo médico sanitarista, Carlos Justiniano Chagas (COURA, 2013) é uma doença endêmica classificada como uma antropozoonose causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). É uma condição infecciosa (com fase aguda e crônica) considerada pela Organização Mundial da Saúde como enfermidade negligenciada com elevada carga de morbimortalidade e impacto dos pontos de vista psicológico, social e econômico (DIAS; NETO; LUNA, 2011).

Apesar de sua descoberta por Carlos Chagas por volta de 1909, sua presença é muito mais antiga, podendo estar associada aos seres humanos por mais de 9000 anos. Diversas múmias pré-colombianas apresentando evidências físicas da doença e vestígios de DNA do *T. cruzi* foram encontradas no Deserto do Atacama (norte do Chile e sul do Peru) e em Minas Gerais, Brasil (ARAUJO *et al.*, 2009; AUFDERHEIDE *et al.*, 2004).

A distribuição espacial da doença é limitada primariamente ao continente americano (“tripanossomíase americana”) em virtude da disposição de mais de 140 espécies do inseto vetor, incluindo América Central, principalmente na região do México, e sul do Estados Unidos (LIÑARES; RAVASCHIMO; RODRIGUEZ, 2006). Contudo a crescente mobilização populacional tem levado a doença para diversas regiões do globo como Europa, Canada, Austrália e Japão (WHO, 2015).

Atualmente existem aproximadamente 6 a 7 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo, causando 9490 mortes no ano de 2019 (IHME, 2019), sendo que 75 milhões de pessoas estão expostas ao risco de adquirir a doença (WHO, 2019).

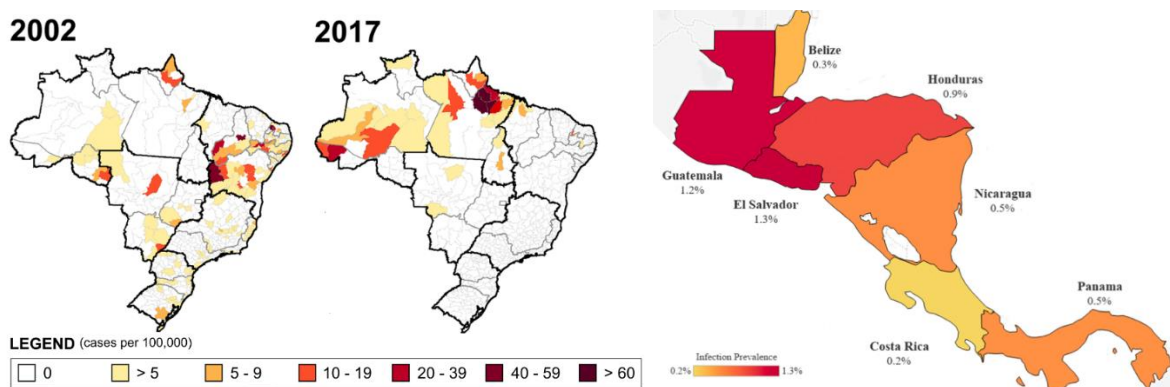
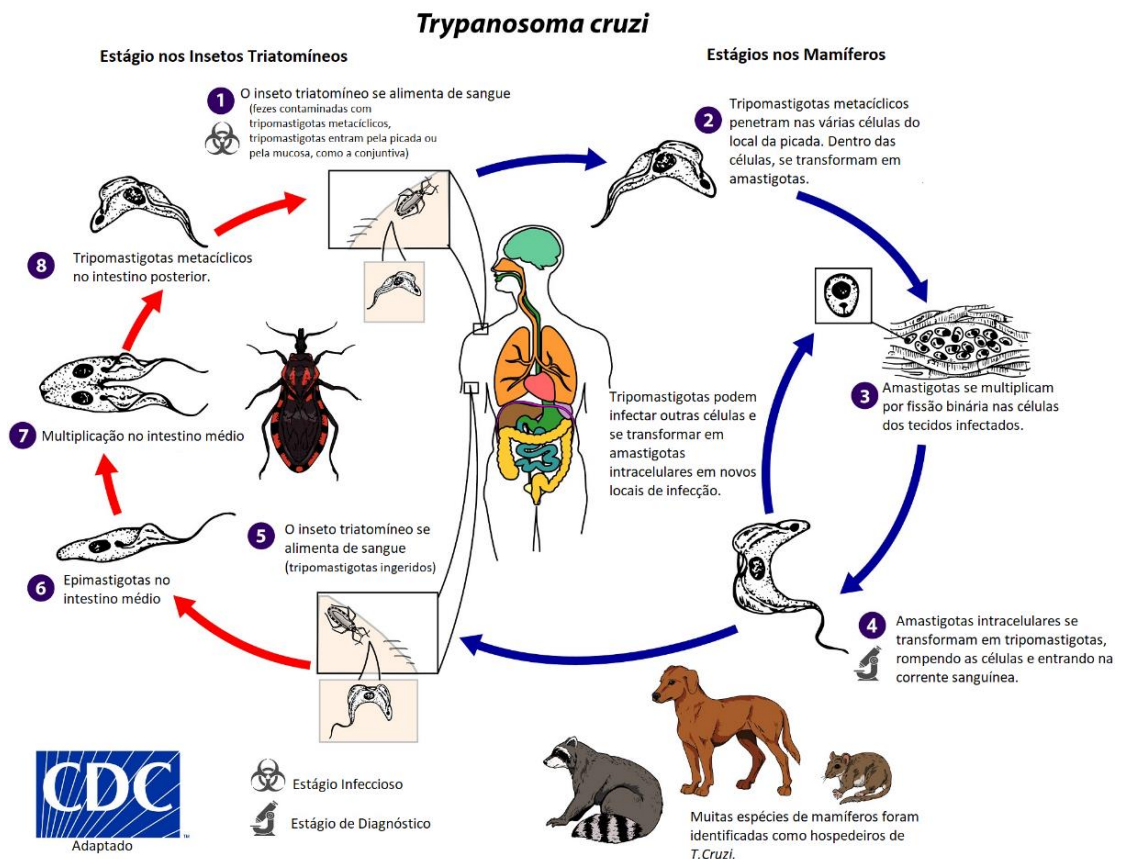


Figura 1: A) Comparação entre a distribuição da doença em 2002 e 2017 (adaptado de SANTOS *et al.*, 2020). B) Prevalência da infecção por *T. cruzi* por país na América Central (adaptado de PETERSON *et al.*, 2019).

Santos *et al.* (2020), publicaram um estudo descrevendo a evolução da distribuição dos casos de doença de Chagas no território brasileiro, de 2001 a 2017, no qual é notável a influência do fator socioeconômico nessa distribuição. Os estados com menor IDH possuem maior número de casos, a exemplo dos estados do norte e nordeste. Analisando a diferença na distribuição de casos em 2001 e 2017, fica evidente que melhora na condição socioeconômica promoveu um deslocamento do número de casos do eixo norte-nordeste para o norte, justificado pela expressiva melhora nos indicadores socioeconômicos (IDH, PIB) dos estados do nordeste, em comparação aos estados do norte, que atualmente possuem os piores indicadores do Brasil. A presença da doença especificamente na América Central novamente evidencia o impacto do fator socioeconômico na distribuição dos casos (PETERSON *et al.*, 2019).

1.2. Ciclo de Vida e Transmissão

Trypanosoma cruzi, é um protozoário hemoflagelado (família Trypanosomatidae) cujo ciclo de vida envolve passagem obrigatória pelo vertebrado (mamíferos, incluindo o homem) e hospedeiro invertebrado (percevejos triatomíneos hematófagos), em uma série de etapas (COURA; CASTRO, 2002). Os principais vetores são insetos da subfamília Triatominae, especialmente dos gêneros *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius*, popularmente conhecidos no Brasil como barbeiro, bicudo ou chupão (MINISTÉRIO DA SAUDE, 2019).



Esquema 1: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*, passando pelo hospedeiro vertebrado e inseto vetor.

(Adaptado de <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html> CDC, USA, 2021).

O ciclo de vida do *T. cruzi* envolve dois hospedeiros. A infecção de um hospedeiro mamífero é realizada pelo parasita na forma tripomastigota metacíclico, presente nas fezes do vetor triatomíneo hematófago, que penetram através da ferida da picada do vetor ou por mucosas, como a conjuntiva. Após a entrada, os parasitas diferenciam-se em amastigotas e escapam para o citoplasma da célula, onde completam a transformação morfológica incluindo involução flagelar. Os amastigotas voltam a entrar no ciclo celular e proliferam por fissão binária. Nesse ponto, os amastigotas diferenciam-se em tripomastigotas, formas que apresentam movimento contínuo e intenso, e induzem lise da membrana da célula hospedeira. Uma vez liberados, podem invadir células adjacentes ou entrar no sangue, podendo ser absorvidos por vetores triatomíneos. No intestino médio do vetor, os tripomastigotas são transformados em epimastigotas e se proliferam. Finalmente, as formas epimastigotas migram para o intestino posterior do vetor para se diferenciar em tripomastigotas metacíclicos (MARTÍN-ESCOLANO *et al.*, 2022).

A transmissão vetorial ocorre através das fezes e urina do barbeiro (Triatomíneo) contaminado, durante seu repasto, correspondendo a 70% das formas de transmissão. Esses

insetos geralmente vivem nas frestas de casas mal construídas em subúrbios e zona rural. Os insetos possuem hábitos noturnos, período que se alimentam do sangue dos mamíferos (MAGALHÃES-SANTOS, 2014).

Entretanto existem outras formas de transmissão denominadas de secundárias, ou seja, vias fora do ciclo biológico clássico do parasita que podem acometer gravemente o homem, a exemplo da infecção por transplante de órgãos, transfusões sanguíneas, transmissão congênita, exposição ocupacional e por via oral, sendo que todas estas vias podem levar a comprometimentos cardíacos graves (DIAS *et al.*, 2016).

Desde 2006, o Brasil é considerado pela OPAS/OMS livre da transmissão vetorial de doença de Chagas pelo *Triatoma infestans*, principal espécie responsável pela transmissão no passado. Desta forma, a via oral se tornou o modo de transmissão mais importante da doença no país, especialmente pela ingestão alimentos como o açaí, cana-de-açúcar, banana, milho e feijão contaminados com o *T. cruzi*. De acordo com o Ministério da Saúde, 869 casos de doença de Chagas por via oral foram reportados durante o período de 2012 a 2016, representando 73% do total de casos (MINISTÉRIO DA SAUDE, 2019).

O ciclo de evolução da doença de Chagas possui duas fases consecutivas, aguda e crônica. A fase aguda se inicia por volta de uma semana após a infecção e pode durar de 6 a 8 semanas. Uma vez encerrada a fase aguda, cerca de 30 a 40 % dos pacientes desenvolvem a forma crônica da doença. A cardiomiopatia é a manifestação clínica mais frequente e severa desta fase, levando a incapacitação e diminuição significativa da expectativa de vida (TELLERIA; TIBAYRENC, 2017).

Após a infecção inicial pela forma tripomastigota do *T. cruzi*, os pacientes entram em fase aguda, de intensa replicação parasitária, na qual o *T. cruzi* pode infectar uma ampla gama de células. A detecção da fase aguda da doença de Chagas é particularmente importante, pois a grande maioria dos pacientes que recebem tratamento nesta fase são curados. Assim, a busca por testes baratos, eficientes e específicos para diagnóstico da infecção por *T. cruzi* ainda é uma necessidade urgente (MENEZES *et al.*, 2011).

Morris *et al.* (1990), demonstram que aproximadamente 10 a 20% dos pacientes agudos, especialmente crianças, podem desenvolver miocardite em graus variáveis e/ou meningoencefalite.

Caso a doença não seja tratada ou se o tratamento falhar, ocorre a progressão para a fase crônica da doença, caracterizada por uma diminuição dos níveis de parasitas no sangue e tecidos. Apesar dessa diminuição, é nessa fase que aproximadamente 30% dos indivíduos desenvolvem patologia grave, com aparecimento da forma cardíaca ou digestiva da doença. A maioria dos pacientes (aproximadamente 60-70%), no entanto, não desenvolve sintomas, e são classificados como indeterminados. A forma indeterminada da doença de Chagas é uma fase de longa duração, que pode persistir por 10-30 anos (ROCHA *et al.*, 2007).

Na patologia cardiovascular observa-se a presença de miocardite crônica, que pode levar a cardiomegalia, arritmias e insuficiência cardíaca. No trato digestivo, pode ocorrer dilatação do esôfago e do cólon (megaesôfago e megacólon), podendo haver perda de células nervosas (COURA; CASTRO, 2002).

1.3. Tratamento da Doença de Chagas

Como ocorre com outras doenças negligenciadas, o número de medicamentos disponíveis é reduzido e não existem alternativas atuais para o tratamento. Os dois medicamentos utilizados para o tratamento da doença de Chagas são o fármaco nitroheterocíclico benznidazol (*N*-benzil-2-(2-nitroimidazol)acetamida), que geralmente é a primeira linha de tratamento na maioria dos países, e o nifurtimox (4-[(5-nitrofurfurilideno)amino]-3-metiltiomorfolin-1,1-dióxido), cuja produção foi descontinuada devido a alto grau de toxicidade (CERECETTO; GONZÁLEZ, 2002).

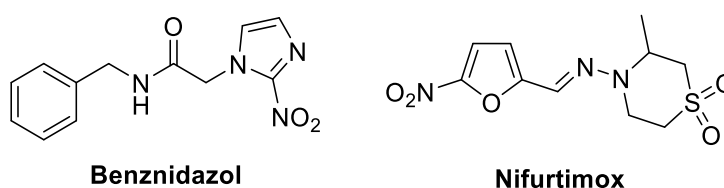


Figura 2. Estrutura química dos fármacos existentes para o tratamento da doença de Chagas.

No Brasil, benznidazol (derivado imidazólico) é o único fármaco disponível para o tratamento específico da doença de Chagas. Nifurtimox pode ser utilizado como alternativa em casos de intolerância ou que não respondam ao tratamento com benznidazol. O tratamento específico é eficaz na maioria dos casos agudos e congênitos, e em 50 a 60% em casos crônicos recentes (WHO, 2019).

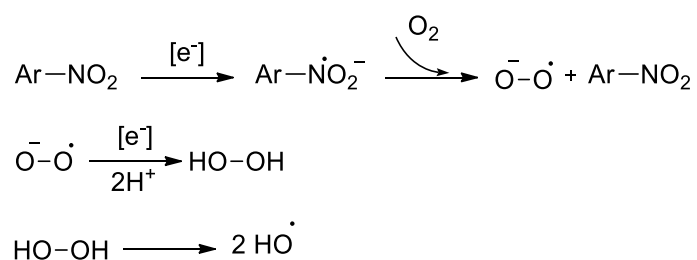
Quando a terapia é iniciada logo após o processo de infecção, a possibilidade de cura é bastante elevada, porém quanto mais tempo transcorre entre o início da infecção e o tratamento, a

eficácia é diminuída. Estudos vêm demonstrando que o tratamento na fase crônica tardia, no entanto, ainda assintomática (especialmente crianças e jovens adultos) causa um potencial efeito benéfico na prevenção da cardiomiopatia associada a doença de Chagas (WHO, 2019).

Entretanto, o tratamento com benznidazol é longo (30 a 60 dias) e exige cuidadosa atenção para adequação da dose do fármaco e para o manejo de reações adversas, em cerca de 35% dos pacientes (MENDES *et al.*, 2017). Em diversos casos o tratamento deve ser descontinuado quando efeitos colaterais mais graves como anorexia, vertigem e hipoplasia medular são diagnosticados (DIAS *et al.*, 2014). O tratamento também é contraindicado para alguns pacientes como, mulheres grávidas e pessoas com doenças renais e hepáticas (MENDES *et al.*, 2017). Assim, a descoberta de novas opções terapêuticas, com baixa toxicidade e resultados clínicos efetivos, na fase aguda e crônica da doença, é altamente necessária.

Pouco se sabe sobre o mecanismo de ação desses fármacos nitroheterocíclicos. Ambos atuam como pró-fármacos, e são ativados no parasita por uma enzima nitrorredutase tipo I. A redução do benznidazol gera o metabólito citotóxico glioxal, que impede a formação de novas cadeias de DNA. Por outro lado, a redução do nifurtimox leva à produção de derivado de nitrila insaturado, tóxico para o parasita (GARCÍA-HUERTAS; CARDONA-CASTRO, 2021).

O mecanismo de ação do nifurtimox também envolve a liberação de espécies reativas de oxigênio (EROS), responsáveis por causar danos celulares ao parasita. A liberação dessas EROS ocorre pela formação do ânion radicalar superóxido, que por sua vez, leva a formação de peróxido de hidrogênio e hidróxido (ROCHE *et al.*, 2012).



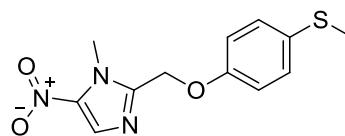
Esquema 2: Mecanismo de formação de EROS a partir de compostos nitro-aromáticos (adaptado de ROCHE *et al.*, 2012).

1.4. Descoberta de Novos Tratamentos

Muitas pesquisas estão sendo realizadas por grupos especialistas em desenvolvimento de fármacos, focados em doenças negligenciadas, como por exemplo o DNDi (Drugs for Neglected Diseases *initiative*), no qual é estabelecido um perfil ideal para novos fármacos a serem desenvolvidos para tratamento da doença de Chagas, como por exemplo: Eficácia superior a do benznidazol, seguro (sem genotoxicidade, teratogenicidade), sem interações significativas com outros fármacos, com formulação via oral, dentre outras (GARCÍA-HUERTAS; CARDONA-CASTRO, 2021); (DNDi, 2022).

A reposição de fármacos contribuiu muito para o descobrimento de novas moléculas com potencial antiparasitário, sendo que alguns dos fármacos utilizados atualmente originaram desta abordagem. Essa estratégia possui vantagens pois reduz consideravelmente o tempo de desenvolvimento e os custos, já que os fármacos tem perfil farmacocinético e toxicológico já conhecidos (ANDREWS *et al.*, 2014).

Fexinidazol, derivado 5-nitroimidazol, foi desenvolvido como um antiparasitário de amplo espectro na década de 70-80, e foi “reposicionado” e selecionado pelo DNDi como candidato para o tratamento da doença do sono. Em geral, fexinidazol apresentou bom perfil farmacocinético, sem nenhuma toxicidade elevada. Novos estudos do DNDi foram realizados, demonstrando uma eficácia relevante em modelos de camundongos em infecção aguda, com percentual de cura superior ao benznidazol. Fexinidazol está em fase 2 de desenvolvimento para o tratamento da doença de Chagas, desde 2017 (BAHIA *et al.*, 2012; BAHIA *et al.*, 2014).



Fexinidazol

Figura 3. Estrutura química do Fexinidazol.

Antifúngicos com grupos triazólicos como cetoconazol, itraconazol, posaconazol, e ravuconazol são utilizados tradicionalmente, e possuem boa farmacocinética e segurança. Eles são capazes de atuar como inibidores seletivos da biossíntese de ergosterol em *T.cruzi*, demonstrando potente atividade contra o parasita em ensaios *in vitro* e *in vivo* (APT, *et al.*, 1998).

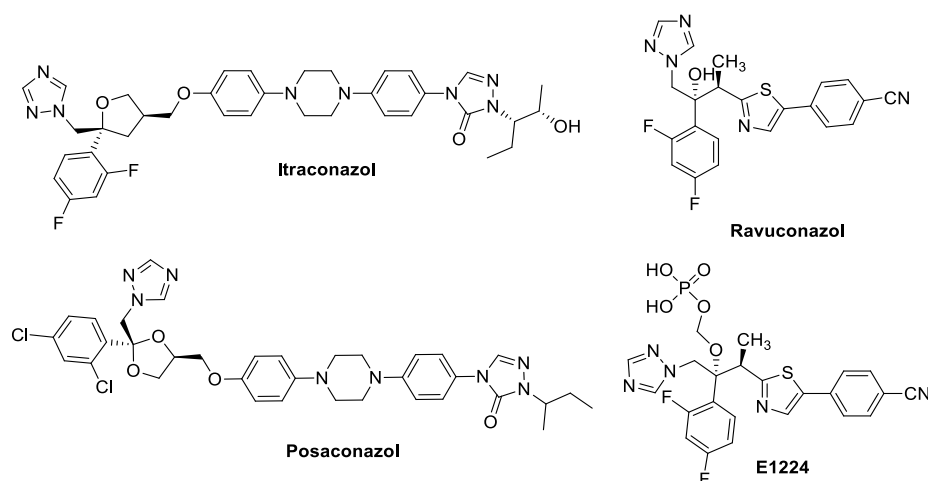


Figura 4. Estrutura química dos antifúngicos itraconazol, ravuconazol, posaconazol e E1224.

Itraconazol demonstrou relevante atividade em modelos *in vivo* em pacientes na fase crônica. Adicionalmente, sua associação com benznidazol em modelos de ratos com infecção aguda foi mais eficaz em eliminar os parasitas do sangue do que quando administrado em monoterapia. Posaconazol também demonstrou potente e seletiva atividade anti *T.cruzi* em ensaios *in vitro* e *in vivo* para fase aguda e crônica em modelos de roedores. A combinação de posaconazol com benznidazol foi mais efetiva em reduzir os níveis de parasitemia do que quando utilizados em monoterapia, indicando atividade sinérgica. Frente a esses resultados, diferentes ensaios clínicos foram realizados para avaliar a eficácia e segurança de posaconazol, administrado sozinho, e em combinação com benznidazol. No entanto a atividade observada para os modelos de roedores não foi a mesma observada em humanos. Ravuconazol também demonstrou ser um medicamento potente e específico *in vitro*, mas sua atividade *in vivo* é limitada, provavelmente devido às suas propriedades farmacocinéticas desfavoráveis. Recentemente, um pró-fármaco de ravuconazol (E1224) foi avaliado em ensaios clínicos de fase 2 em pacientes com doença de fase crônica, sem comprometimento cardíaco. Após avaliar a monoterapia em diferentes doses do pró-fármaco E1224, observou-se a eliminação do parasita do sangue ao fim do tratamento. No entanto, a parasitemia foi, posteriormente, reobservada (GARCÍA-HUERTAS; CARDONA-CASTRO, 2021).

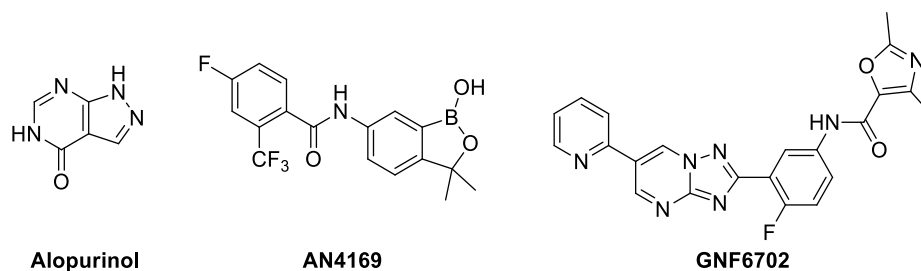


Figura 5. Estrutura química do alopurinol, AN4169 e GNF6702.

Outro fármaco reposicionado foi o alopurinol, utilizado para o tratamento de hiperuricemia, cujo mecanismo bloqueia a síntese *de novo* de purinas. Ficou demonstrado que alopurinol, um análogo de hipoxantina, atua como um substrato alternativo da enzima hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase. A enzima é capaz de incorporar alopurinol no RNA do parasita, bloqueando a síntese *de novo* de purinas, afetando a síntese proteica e levando a morte do parasita. Em combinação com nifurtimox e benznidazol, alopurinol apresentou efeito sinérgico *in vitro*, e a combinação alopurinol-benznidazol em camundongos na fase aguda da doença foi mais eficiente que a monoterapia (MAZZETI, *et al.*, 2019).

AN4169, um derivado de oxaborol desenvolvido pela *Anacor Pharmaceuticals* apresentou atividade *in vitro* contra *T. cruzi*. Esse composto curou 100% dos camundongos com infecção aguda, após 40 dias de tratamento, mas a dosagem intermitente não apresentou eficácia. Os estudos com oxaborois para o tratamento da doença de Chagas estão sendo realizados pela *Anacor*, pela Universidade da Geórgia e pelo DNDi (VERMELHO *et al.*, 2019).

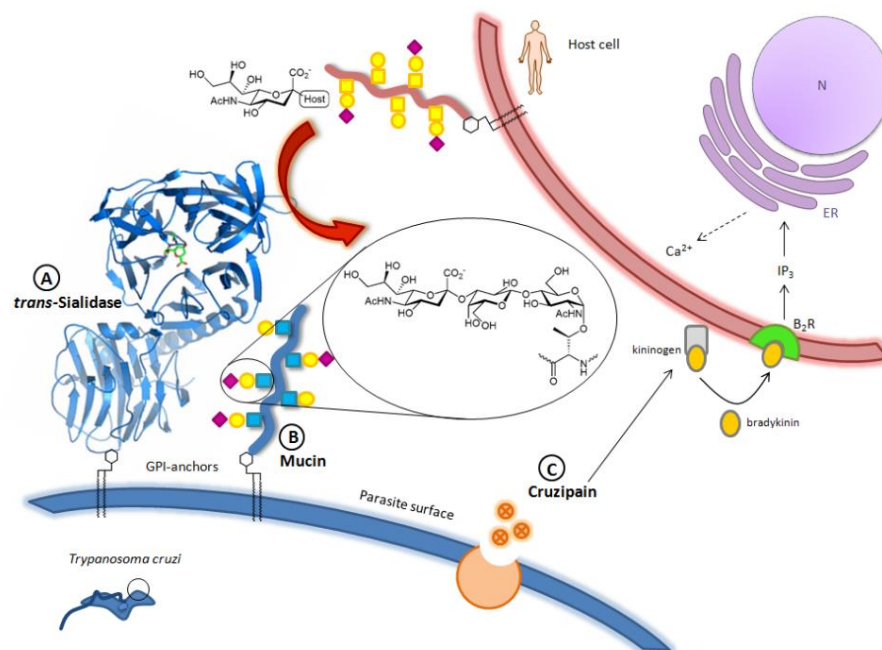
Um último derivado sintético a ser mencionado é o GNF6702, um benzoxazol que atua como inibidor específico do proteossoma cinetoplastídeo, e foi efetivo no tratamento de ratos em fase crônica. A eficácia do composto quando administrado via oral foi semelhante ao benznidazol. Vale notar que o composto passou por inúmeras modificações estruturais (GNF5343, GNF2636, GNF3848) até sua obtenção propriamente dita, e também foi testado para outras doenças parasitárias como doença do sono e leishmaniose. Atualmente, GNF6702 está em ensaio pré-clínico para avaliação de toxicidade (KHARE *et al.*, 2016).

1.5. Mecanismo de adesão e invasão por *Trypanosoma cruzi*

O processo de invasão da célula do hospedeiro é fundamental para o desenvolvimento da doença e envolve várias fases como: adesão, invasão propriamente dita, diferenciação e divisão no citoplasma, ruptura da célula hospedeira com a liberação do parasita, e manifestação da resposta imunológica.

Inicialmente, a invasão envolvendo a formação de um vacúolo parasitóforo, mediado por lisossomos e uma via de sinalização de cálcio é crucial para a entrada e retenção do parasita dentro da célula. Subsequentemente, interações entre diferentes alvos moleculares da célula hospedeira e da célula parasitaria garantem a invasão celular e a sobrevivência (CAMPO *et al.*, 2016).

Trypanosoma cruzi apresenta uma enzima de superfície, denominada de *trans*-sialidase (TcTS), que está diretamente envolvida nas interações entre as células do hospedeiro e o parasita. Apesar do *T. cruzi* não ser capaz de sintetizar ácido siálico, essa enzima pode transferir-lo de glicoconjugados do hospedeiro a glicoconjugados do parasita. Ácido siálico, ligado a extremidades de glicoproteínas e glicolipídios, influencia os processos de reconhecimento celular (SCHENKMAN; EICHINGER, 1993). Quando a forma tripomastigota entra na corrente sanguínea, rapidamente adquire moléculas de ácido siálico de sialoglicoconjugados do hospedeiro, tornando-se capaz de invadir praticamente qualquer tipo de célula do hospedeiro. Uma redução significativa da invasão parasitaria é observada quando os epítomos sialilados são neutralizados com anticorpos, quando TcTS é diretamente neutralizada, ou quando as células do hospedeiro não possuem doadores de ácido siálico (SCHENKMAN *et al.*, 1994).



Esquema 3: Representação de alguns dos importantes mecanismos de invasão celular do *T. cruzi* e seus alvos (adaptado de CAMPO *et al.*, 2016).

1.5.1. Mucinas de *T. cruzi* (TcMUC)

As mucinas de *Trypanosoma cruzi* (TcMUC) são glicoproteínas de membrana plasmática altamente glicosiladas (60% de carboidratos por peso), sendo o componente de

superfície mais comumente expresso em *T.cruzi*. Suas principais funções envolvem o reconhecimento e invasão do parasita nas células hospedeiras, visto que elas são o principal substrato acceptor para a reação de transferência de ácido siálico catalisada pela TcTS. Adicionalmente, influenciam na sobrevivência do parasita contra o sistema imune do vetor e do hospedeiro, pela formação de uma “capa” de proteção na superfície de *T.cruzi* (CAMPO *et al.*, 2016).

1.5.2. Galectina 3

As galectinas são importantes devido à sua participação em diferentes atividades celulares essenciais, incluindo o controle do ciclo celular, adesão célula-célula e célula-matriz intercelular e a transmissão de sinais intercelulares. Além disso, várias galectinas são mediadoras de inflamação e indicadores de alteração celular (RAPOPORT *et al.*, 2008).

Em relação à infecção por *T.cruzi*, galectina-3 humana atua como um dos receptores que facilitam a adesão do parasita às células hospedeiras, por se ligar de forma específica com as mucinas da forma tripomastigota do *T.cruzi*, através de seu domínio de reconhecimento de carboidratos (CAMPO *et al.*, 2016).

1.6. Ácido Siálico e *trans*-sialidase

1.6.1. Ácido Siálico

Todas as células dos vertebrados são cobertas por um padrão denso e intrincado de cadeias de açúcar, a maioria das quais está ligada a proteínas e lipídios. Os ácidos siálicos são uma classe variada de moléculas de açúcar de nove carbonos frequentemente encontradas fixadas na parte terminal dessas cadeias, e podem mediar ou modificar uma ampla gama de processos fisiológicos e patológicos devido à sua localização e ampla dispersão (VARKI, 2008).

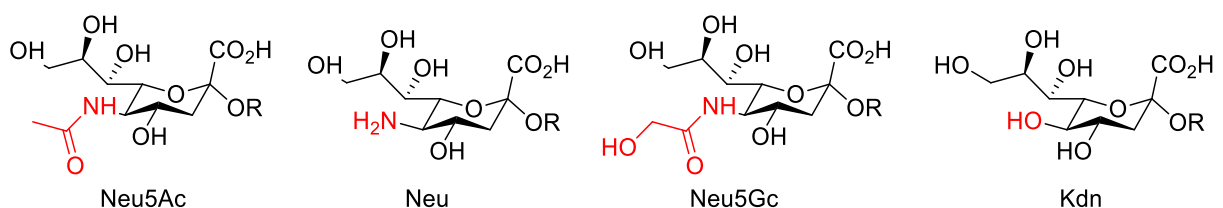


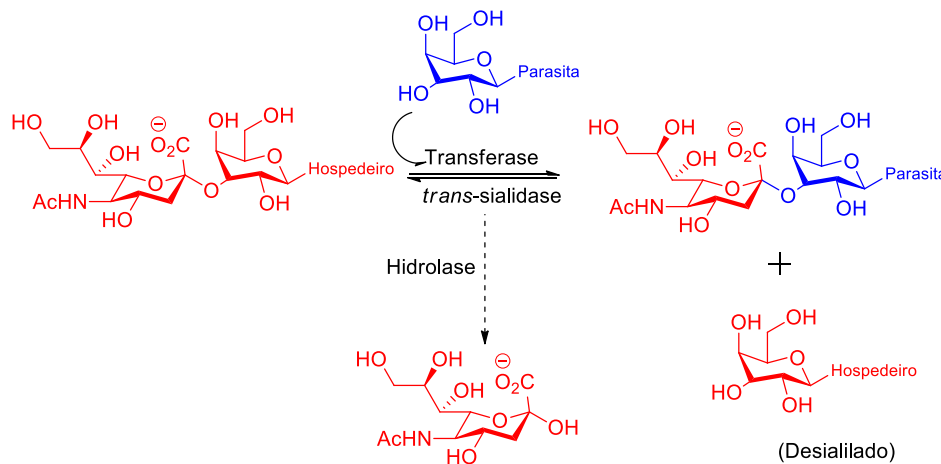
Figura 6. Ácidos Siálicos naturais, ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac), ácido neuramínico (Neu), ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc) e ácido 2-ceto-3-desoxi-D-glicero-D-galacto-nonulosônico (Kdn).

A maior parte da diversidade dos ácidos siálicos resulta de alterações em C-5, como o grupo N-glicolil, ou nos grupos hidroxila. A maioria das pesquisas se concentrou no ácido n-

acetilneuramínico (Neu5Ac) e em menor grau em seu derivado *O*-acetilado, mas outras modificações, como grupos *O*-metil, também são descritas (CHEN; VARKI, 2010).

1.6.2. *trans*-sialidase

trans-sialidase de *T. cruzi* (TcTS) é uma enzima ancorada na membrana por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol e funcionalmente dividida em dois domínios, o domínio catalítico, localizado na região *N*-terminal, e um domínio de lectina localizado na porção *C*-terminal. TcTS catalisa a transferência de um ácido siálico de glicoconjugados do hospedeiro, para grupos aceptores β -galactopiranosila de mucinas do *T. cruzi* (TcMUC) ou para glicoconjugados não-mucínicos, formando uma ligação α -2,3 (reação de transglicosilação), sendo primariamente classificada como transferase, mas com ação residual hidrolítica (BUSCHIAZZO *et al.*, 2002). Substituição na galactose terminal, ou nos sacarídeos adjacentes pode impedir a reação de transferência. A enzima não é capaz de transferir moléculas de ácido siálico livres, mas consegue remover de estruturas que não são carboidratos, como por exemplo, ácido 4'-metilumbeliferil-*n*-acetil-neuramínico em ensaios enzimáticos (SCHENKMAN; EICHINGER, 1993).



Esquema 4: Transferência de ácido siálico pela *trans*-sialidase.

A TcTS não está presente em amastigotas intracelulares e em divisão, mas começa a ser sintetizada na transformação em tripomastigotas ainda dentro de células de mamíferos, algumas horas antes da lise celular e da liberação de tripomastigotas. TcTS também é expressa em estágios parasitários que se desenvolvem no inseto vetor (FREVERT *et al.*, 1992).

1.6.2.1. Estrutura 3D da *trans*-sialidase

A estrutura cristalográfica de TcTS foi determinada e está disponível no “PDB” (Banco de Dados de Proteínas). Através do PDB, é possível ter acesso a vários complexos

crystalográficos existentes entre a enzima e diferentes inibidores/ligantes. A figura 7 representa o complexo cristalográfico (código PDB: 1MS8), do inibidor DANA (2-desoxi-2,3-dehidro-*N*-acetil-ácido-neurâmínico), análogo do ácido siálico, com a enzima TcTS, em resolução de 2.0 Å. A figura 8 representa as estruturas unidimensionais e tridimensionais do ligante DANA e suas principais interações no sítio ativo de TcTS (BUSCHIAZZO *et al.*, 2002).

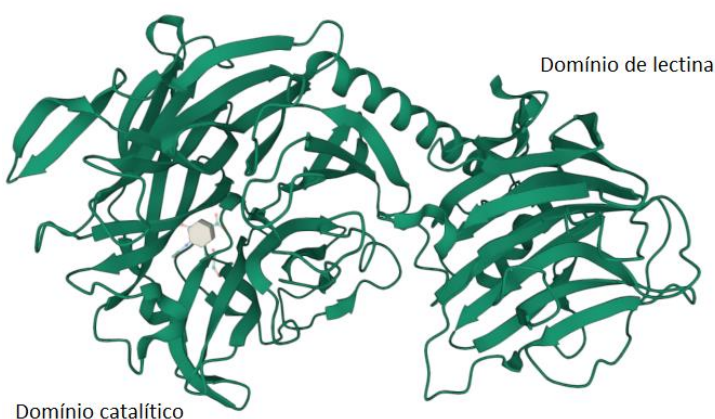


Figura 7. Complexo cristalográfico TcTS-DANA, código PDB 1MS8.

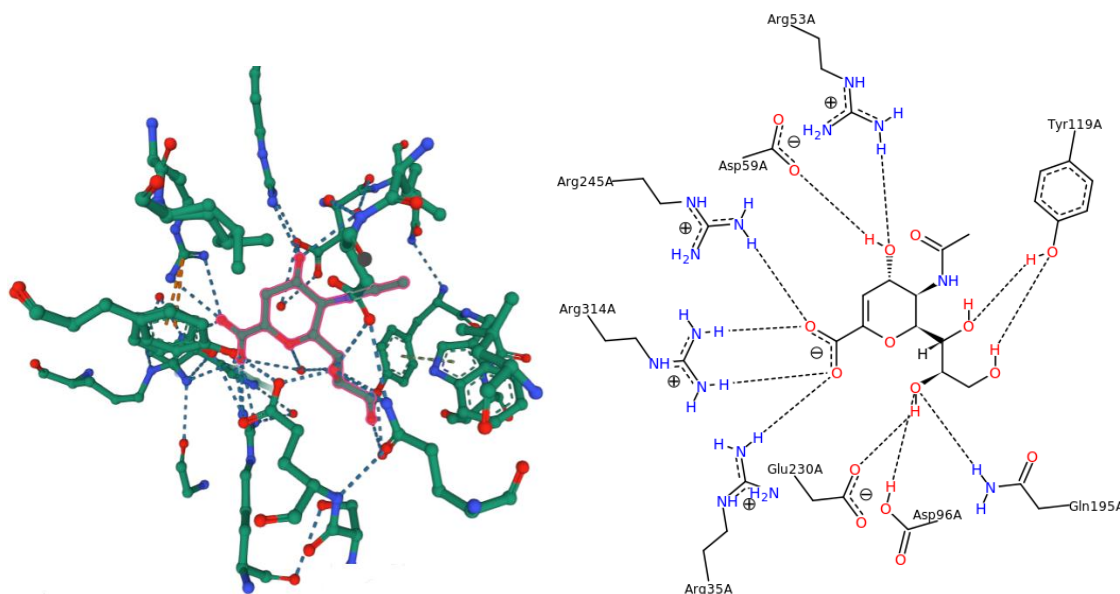


Figura 8. Modo de ligação proposto para DANA em *trans*-sialidase, código PDB 1MS8.

A arquitetura molecular do sítio ativo da TcTS compartilha diversas características com as sialidases bacterianas: Uma tríade de arginina (Arg35, Arg245 e Arg314) que se liga ao grupo carboxilato presente em todos os derivados de ácido siálico; Um ácido glutâmico (Glu357) que estabiliza uma arginina (Arg35); Um ácido aspártico (Asp59), essencial para a catalise realizada por dois resíduos (Tyr342 e Glu230) localizados na base do sítio ativo, que estabilizam o estado de transição das espécies reativas; Um bolsão hidrofóbico definido por

resíduos de Val95, Leu176 e Trp120, que se ligam ao grupamento *N*-acetil do ácido siálico (BUSCHIAZZO *et al.*, 2002).

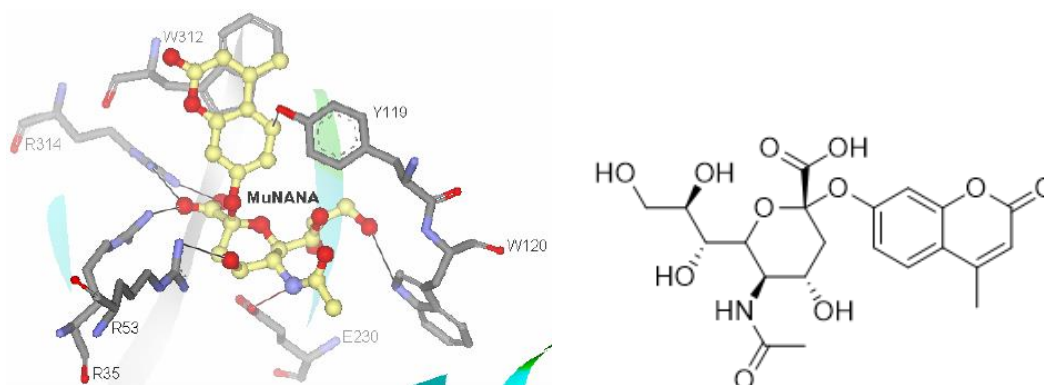


Figura 9. Estruturas do ligante MuNANA e o complexo cristalográfico TcTS – MuNANA, código PDB (1S0J)

Outros estudos realizados para determinar o sítio de ligação do ácido siálico envolveram cristais de TcTS complexados com diferentes ligantes, como lactose (um substrato aceptor), os substratos doadores: ácido *N*-acetilneuramínico (NANA), $\alpha(2,3)$ -sialil-lactose (SL), e ácido 2'-(4-metilubelilferil)- α -D-*N*-acetilneuramínico (MuNANA). TcTS precipita quando incubada com DANA/NANA, o que sugere que a ligação do ligante promove uma mudança conformacional, que interrompe o empacotamento molecular dos cristais (GAO *et al.*, 2002). Os inibidores da TcTS descritos atualmente não são potentes o suficiente, sendo que a maioria dos inibidores são geralmente derivados do substrato ácido siálico, ou do análogo ao estado de transição DANA (ARIOKA *et al.*, 2010).

1.6.2.2. Mecanismo de Ação e Estado de Transição

Segundo Buschiazzo *et al.* (2002), o mecanismo de transglicosilação de TcTS está diretamente relacionado ao seu sítio ativo flexível. Nas estruturas cristalográficas, o grupo galactosil 3-OH da lactose está posicionado para interagir tanto com o resíduo catalítico Asp59 quanto com o carbono anômérico, para que ocorra um ataque nucleofílico no substrato (ou intermediário reacional). A enzima livre não é capaz de se ligar ao substrato, e portanto está em estado inativo, devido à ausência da ligação de hidrogênio entre Tyr342 e Glu230. A ligação do substrato doador (sialoconjugado) desencadeia uma mudança conformacional com duas consequências: cria condições para a ligação do açúcar aceptor (lactose), envolvendo a reorientação da cadeia lateral de Tyr119, e ativa a enzima através de um reposicionamento de Tyr342/ Leu36. A observação de que a atividade da *trans*-sialidase (mas não as sialidases) é reduzida drasticamente quando a Tyr119 é substituída por serina confirmou que o resíduo participa do sítio aceptor do substrato.

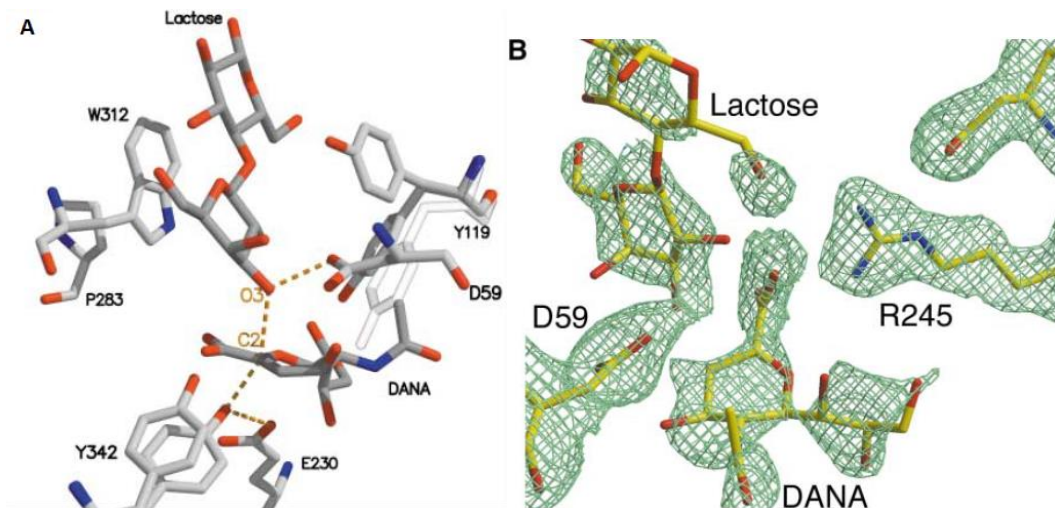


Figura 10. A) DANA e lactose no sítio catalítico de TcTS e as duas conformações assumidas pelos resíduos envolvidos na ligação (Tyr 119) e ativação enzimática (Tyr 342). Em transparente é mostrada a posição de Tyr 119 na enzima não ligada. B) Mapa de densidade eletrônica (2Fo-Fc), mostrando as moléculas de lactose e DANA no complexo ternário (adaptado de: BUSCHIAZZO *et al.*, 2002).

Na figura 10 acima é possível visualizar as posições de DANA e lactose, no sítio catalítico de TcTS, elucidando as duas conformações assumidas pelos resíduos envolvidos na ligação ao substrato (Tyr119) e ativação enzimática (Tyr342). O resíduo Tyr119 fornece uma ligação entre o substrato doador, DANA, e a molécula aceptora, sendo capaz de estabelecer ligação de hidrogênio com o grupo glicerol do DANA. O resíduo Tyr342 e o resíduo Glu230, estão localizados na posição inferior do sítio catalítico, sendo responsáveis pela flexibilidade do sítio e estabilização do estado de transição reacional (BUSCHIAZZO *et al.*, 2002).

1.7. Inibidores de TcTS.

Os inibidores de *trans*-sialidase descritos atualmente não são potentes o suficiente, e grande parte desses são derivados do substrato ácido siálico, ou do análogo ao estado de transição DANA.

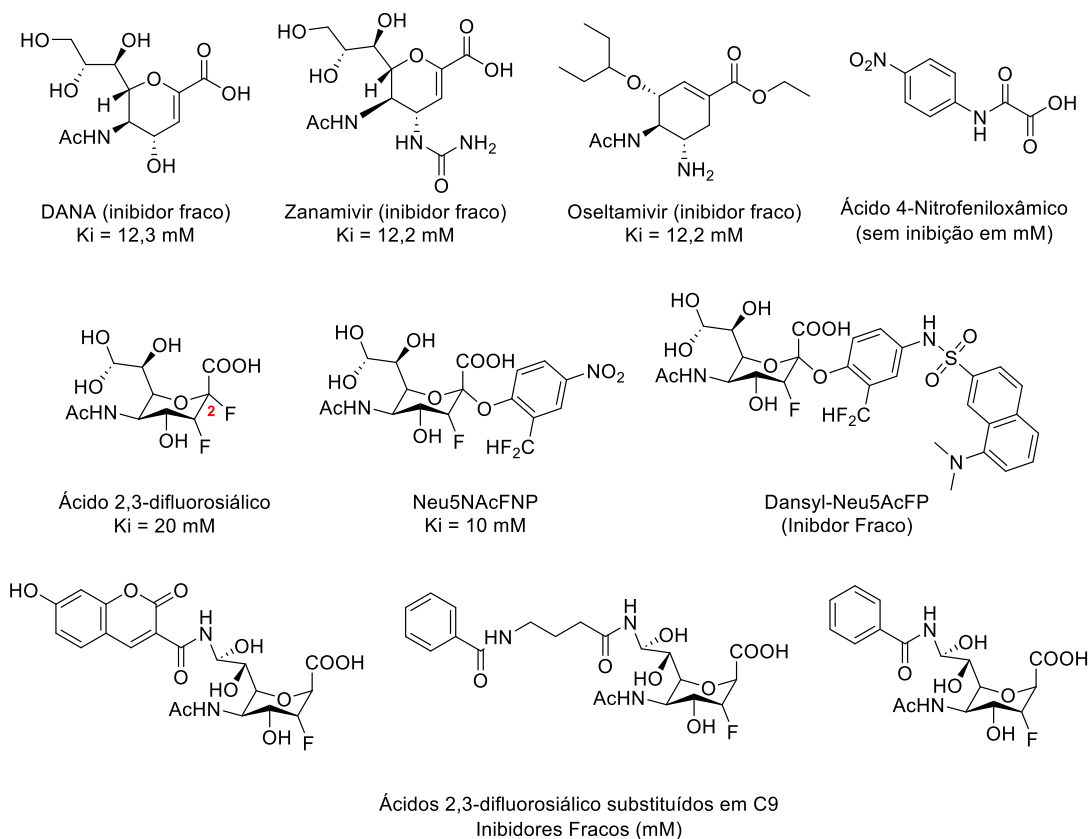


Figura 11: Estruturas de compostos inibidores do subsítio doador de *trans*-sialidase.

A figura 11 apresenta algumas estruturas de compostos inibidores do subsítio doador de *trans*-sialidase, descritos por Kashif *et al.* (2017). Dana, Zanamivir e Oseltamivir são inibidores da sialidase viral neuraminidase, mas apresentaram fraca inibição em *trans*-sialidase, na faixa de milimolar.

Em sequência, temos derivados análogos do ácido siálico, com modificação na hidroxila anteriormente posicionada em C-2 do ácido siálico. Esses análogos são inibidores irreversíveis do subsítio doador de TcTS, pela formação de uma ligação covalente com resíduos específicos, o que gera uma inibição temporária, pois quando o excesso do inibidor é removido, a enzima se torna ativa novamente. O ácido 2,3-difluorosiálico, e seu análogo Neu5NAcFNP apresentaram uma concentração inibitória de 20mM e 10 mM, respectivamente, já o derivado Dansil-Ney5AcFP apresentou fraca inibição em mM.

Análogos do ácido 2,3-difluorosiálico foram sintetizados, com modificações na cadeia de glicerol, que foi substituída por diferentes cadeias laterais tais como umbeliferil, 4-(fenil carbamida)-butiramida e benzamida, no entanto, também apresentaram inibição na faixa de milimolar.

1.8. Ácido Quínico

O ácido 1-carboxílico-(1R,3R,4R,5R)-1,3,4,5-tetra-hidrociclo-hexano, D-(-)-ácido quínico, isolado pela primeira vez como impureza em quinina bruta no final do século XVIII, ocupa uma posição de destaque entre os metabólitos principais provenientes do metabolismo de D-glicose na planta (BARCO *et al.*, 1997).

Sua estrutura e estereoquímica foram atribuídas em 1932 por H.O.L. Fisher e G. Dangschat, que logo perceberam, com base nas relações estruturais, a possibilidade de que o ácido quínico, o ácido chiquímico e os ácidos fenólicos aromáticos, como o ácido gálico, deveriam ter uma mesma origem biossintética (Figura 12). Essa intuição foi confirmada 20 anos depois, quando a via metabólica do chiquimato, pelo qual os aminoácidos aromáticos são formados em plantas e micro-organismos, foi completamente elucidada (WOLFF, 1983).

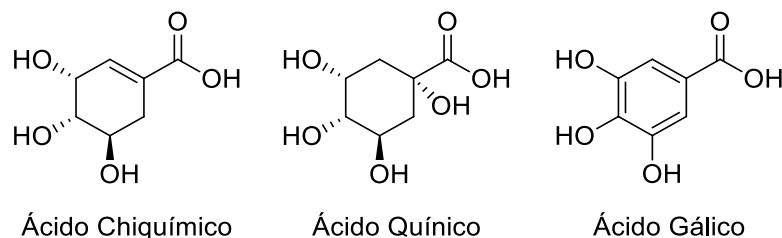


Figura 12: Estruturas do ácido chiquímico, ácido quínico e ácido gálico.

O ácido quínico é comercialmente disponível e facilmente isolado com pureza enantiomérica elevada. Devido a esta pureza quiral, ácido quínico tem se mostrado um precursor adequado na síntese de novos compostos com potencial farmacológico (BARCO *et al.*, 1997), como, por exemplo, na síntese do fármaco Oseltamivir, ou Tamiflu®, usado contra o vírus Influenza A e B, o qual tem como alvo molecular a sialidase viral (PATRICK; SPENCER, 2009). Além da utilização como precursor quiral, ácido quínico também apresenta grupos reativos ligados à estrutura, como quatro hidroxilas (três secundárias e uma terciária) e grupo de ácido carboxílico, todos susceptíveis a modificações químicas, ligados a um sistema cicloexano, os quais podem ser explorados para investigação de interações com determinado alvo biológico. Frente ao exposto, é relevante destacar que ácido quínico preserva grande similaridade estrutural ao substrato doador natural de TcTS, ácido siálico, e pode ser explorado como precursor quiral de uma diversidade estrutural de análogos com potencial afinidade e inibição pelo subsítio doador de *trans*-sialidase. Os inibidores de TcTs mais ativos são aqueles capazes de ocupar subsítios aceitor e doador de ácido siálico da enzima com IC50 na faixa de 0,6 a 100,0 μM (ARIOKA *et al.*, 2010).

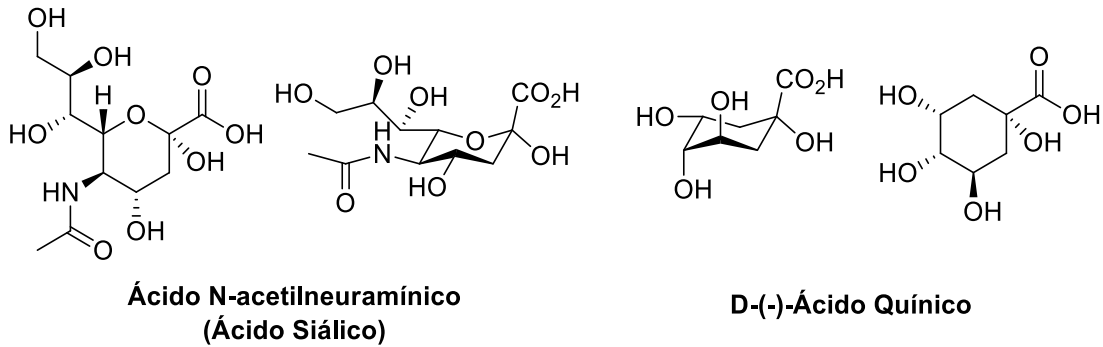


Figura 13: Substrato natural ácido siálico e o material de partida D-(-)-ácido quínico.

1.9. Neuraminidase, uma sialidase viral.

No vírus da gripe, ao redor de seu nucleocapsídeo há um envelope de membrana que contém duas glicoproteínas virais denominadas neuraminidase (NA) e hemaglutinina (HA). NA é uma glicoproteína tetramérica em forma de cogumelo, ancorada na membrana viral, crucial para o processo infeccioso. Para atingir as células epiteliais do hospedeiro no trato respiratório superior, o vírus precisa atravessar uma camada de muco protetor e acredita-se que a proteína viral NA seja fundamental nessa função. As secreções da mucosa são ricas em glicoproteínas e glicolipídios que possuem um ácido siálico terminal. NA é uma enzima sialidase que cliva o ácido siálico dessas glicoproteínas e glicolipídios, degradando assim a camada de muco e permitindo que o vírus atinja a superfície das células epiteliais.

A adsorção ocorre quando o vírus entra na célula epitelial e se liga à glicoconjugados de membrana da célula hospedeira, com uma porção terminal de ácido siálico. Este processo depende da proteína viral HA, que identifica o ácido siálico, promovendo uma ligação, em vez de catalisar a clivagem do ácido siálico, como NA.

A taxa de dessialilação por NA (para ajudar o vírion a deixar a célula hospedeira) e a taxa de ligação por HA a glicoconjugados sialilados devem coexistir em um balanço perfeito. Se NA for excessivamente ativa, pode impedir a infecção da célula, pois cliva todos os receptores que HA consegue identificar e se ligar. Adicionalmente, os virions recém-produzidos permaneceriam ligados à célula hospedeira se a atividade de NA fosse muito fraca, impedindo-os de infectar as células vizinhas (PATRICK; SPENCER, 2009).

1.9.1 Neuraminidase x TcTS

Os estudos realizados com neuraminidase apresentam inibidores com estruturas miméticas ao ácido siálico, e foram utilizados como modelo para direcionar as modificações moleculares para inibição da *trans*-sialidase, já que neuraminidase possui um sítio ativo e mecanismo de catálise semelhante ao de *trans*-sialidase.

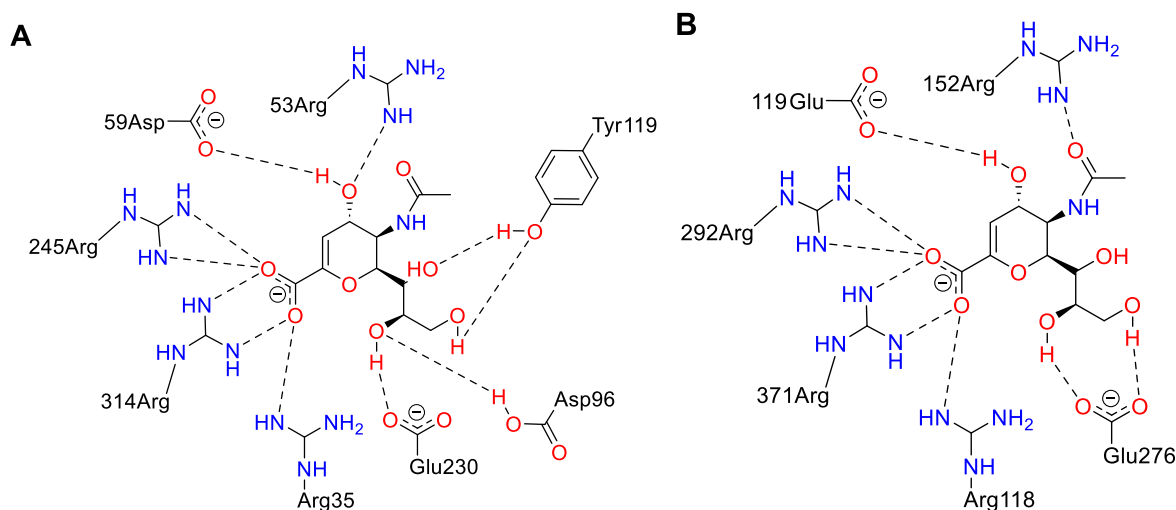


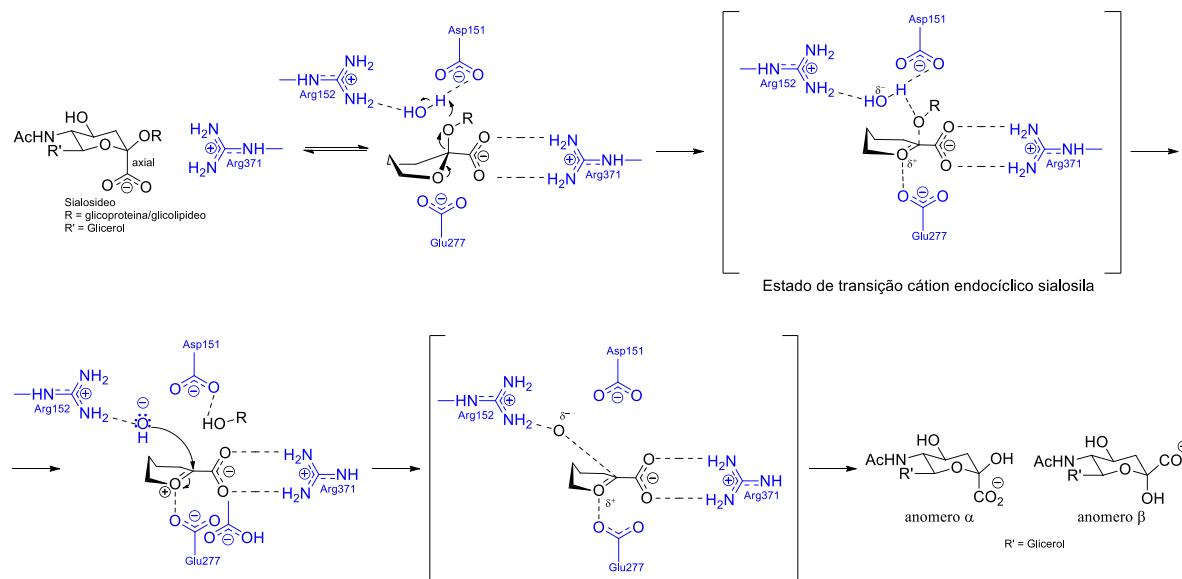
Figura 14: A) Interações de DANA no sítio de TcTS, código PDB: 1MS8 (adaptado de: BUSCHIAZZO *et al.*, 2002). B) Interações de DANA no sítio de Neuraminidase, código PDB: 1F8D (adaptado de: SMITH *et al.*, 2001).

Primeiramente, em relação as semelhanças no sítio ativo, a figura 14 demonstra uma comparação dos modos de interação entre o inibidor DANA no sítio ativo de TcTS e de neuraminidase.

Comparando as duas propostas de modo de interação, observamos que o íon carboxilato participa de interações iônica e ligações de hidrogênio com três resíduos de arginina (tríade de arginina) em ambos os casos. Além disso, a hidroxila vizinha ao grupo N-acetil e a cadeia de glicerol interagem com resíduos de ácido glutâmico e ácido aspártico nas duas propostas.

Já em relação ao mecanismo de catálise de neuraminidase, o primeiro passo é a interação com a tríade de arginina, no entanto, para que essas interações ocorram, a molécula de ácido siálico é distorcida de uma conformação estável de cadeira (na qual o íon carboxilato está na posição axial), para uma conformação menos estável de “pseudo-barco”, na qual o íon

carboxilato está na posição equatorial (PATRICK; SPENCER, 2009).



Esquema 5: Mecanismo proposto para a hidrólise catalisada por sialidasas virais, os substituintes foram omitidos durante o mecanismo para maior clareza (adaptado de: PATRICK; SPENCER, 2009).

Ademais, ficou estabelecido que o anel distorcido de piranose se liga ao “chão” da cavidade do sítio ativo, e que a hidroxila em C-2 também muda da sua posição equatorial, para uma posição axial. Adicionalmente, ocorre a formação de um estado de transição intermediário “cátion endocíclico sialosila”, que possui um centro trigonal planar em C-2, também denominado íon oxocarbênio, caracterizado por um centro de carbono sp², um substituinte de oxigênio, e uma carga positiva, deslocalizada entre o carbono central e o átomo de oxigênio (IUPAC). Vale lembrar, que o mecanismo descrito para Neuraminidase envolve a hidrólise do ácido siálico, diferentemente do que ocorre com *trans*-sialidase, que catalisa uma reação de transferência. Nesse caso, no lugar de uma molécula de água, teríamos a presença de uma mucina que atuaria como grupo aceptor.

Entendendo o mecanismo de catálise de Neuraminidase, estudos foram realizados para desenvolver inibidores para essa sialidase viral, que mimetizassem a conformação e geometria adotado pelo intermediário no estado de transição.

Primeiramente, análogos do ácido siálico contendo uma dupla ligação entre C-2 e C-3 foram sintetizados, pela eliminação da hidroxila em C-2. O fato do ligante não precisar se distorcer de uma conformação favorável para ligação, compensa energeticamente a ausência da ligação de hidrogênio realizada por essa hidroxila eliminada. Outros estudos substituíram completamente o oxigênio do anel de pirano, visto que não apresentava um papel crucial na interação com sítio, realizando a substituição por um isómero de metileno, formando análogos

carbocíclicos, que além de auxiliar no maior equilíbrio farmacocinético, mimetizam melhor a estereoquímica do estado de transição, quando comparado a outros inibidores (PATRICK; SPENCER, 2009).

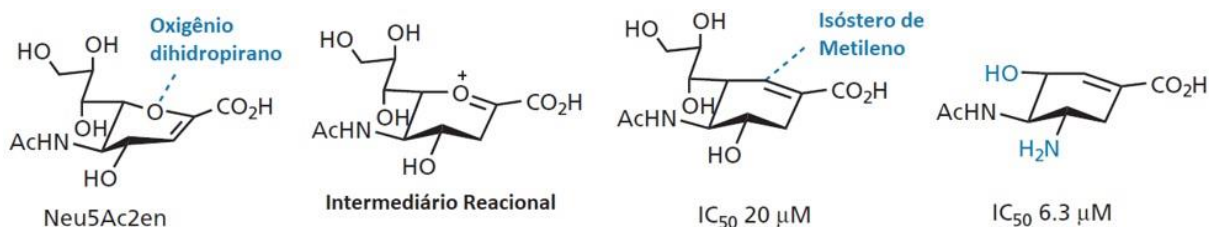
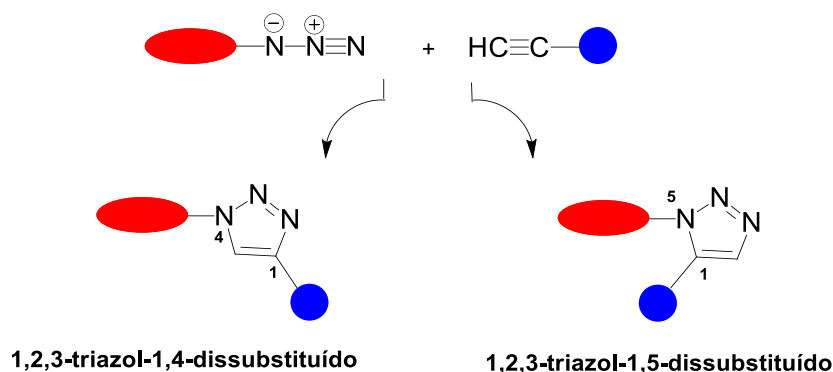


Figura 15: Comparação do inibidor análogo de estado de transição Neu5Ac2en, intermediário reacional, e derivados carbocíclicos (Adaptado de PATRICK; SPENCER, 2009).

Uma última modificação notável foi a troca da cadeia de glicerol por hidroxila, primeiramente para diminuir a polaridade, mas também para melhor mimetizar o estado de transição, já que a ligação dupla no intermediário da reação é altamente polarizada e deficiente em elétrons, enquanto a dupla ligação em estruturas carbocíclicas é rica em elétrons; A hidroxila portanto exercerá efeito elétron-sacador na dupla do ciclo, reduzindo sua densidade eletrônica e simulando melhor o estado de transição (PATRICK; SPENCER, 2009).

1.10. “Click Chemistry”

A reação de cicloadição 1,3-dipolar, utilizando alcino terminal e azido orgânico como materiais de partida é conhecida como “ciclização de Huisgen”, em referência à Rolf Huisgen, pois foi quem primeiro compreendeu a magnitude desta reação que origina produtos 1,2,3-triazóis 1,4- e 1,5-dissubstituídos (HUISGEN, 1963).



Esquema 6: Exemplo genérico da ciclização de Huisgen.

O grande obstáculo dessa reação é a completa falta de seletividade, visto que ao final da reação observa-se a formação de uma mistura 1:1 de triazóis 1,4- e 1,5-dissubstituídos. No entanto, Meldal *et al.* (2002), e Sharpless *et al.* (2002), demonstraram que esta reação pode ser catalisada eficientemente por sais de cobre Cu(I), resultando exclusivamente em triazóis 1,4-

dissubstituídos. Essa reação regioseletiva, rendeu a Medal, Sharpless e Bertozzi o prêmio nobel de química de 2022. Para a formação de Cu(I) normalmente é usado sulfato de cobre (CuSO₄) na presença de ascorbato de sódio, como agente redutor, embora outras condições já tenham sido relatadas. Por outro lado, também é possível a formação preferencial de triazóis 1,5-dissubstituídos fazendo uso de complexos de rutênio. A investigação da atividade catalítica de uma série de complexos demonstrou que complexos do tipo [Cp*RuCl] (Cp: pentametilciclopentadienila) são os catalisadores regioseletivos mais eficientes (KOLB *et al.*, 2001).

“Click chemistry”, ou reação Click, é certamente uma tendência de extrema importância na química contemporânea. As transformações químicas que fazem uso desta estratégia cumprem normalmente alguns requisitos como: serem de fácil execução, versáteis, seletivas, não necessitarem de reações de proteção/desproteção, apresentarem rendimentos elevados, além de não formarem subprodutos, serem realizadas em sua maioria em meio aquoso, e poderem ser facilmente aceleradas pelo uso de micro-ondas (APPUKKUTTAN *et al.*, 2004).

Com a descoberta dos catalisadores que eliminam o problema da falta de regioseletividade e a aplicação do conceito de “click chemistry”, a ciclização de Huisgen passou a ter um importante papel na síntese de 1,2,3-triazóis 1,4- ou 1,5-dissubstituídos, moléculas essas que no passado eram difíceis de serem obtidas como regioisômeros puros.

2. OBJETIVOS

Tendo em vista o panorama atual da doença de Chagas, e a importância da “Click Chemistry” na síntese de novos compostos, os objetivos do projeto envolvem:

1. Obter moléculas que mimetizem parcialmente o ácido siálico, substrato natural da enzima *trans*-sialidase, a partir do ácido quínico, produto natural que preserva características estruturais do ácido siálico, como grupos hidroxílicos e ácido carboxílico, ligados ao anel cicloexano.
2. Síntese de derivados **azido** de ácido quínico, com configuração 5R e 5S, para que reações subsequentes possam ser realizadas, obtendo-se uma biblioteca de compostos inéditos com potencial inibitório da enzima *trans*-sialidase de *T.cruzi*.
3. Síntese de derivados triazólicos 1,4-dissubstituídos contendo diversas cadeias laterais com diferentes propriedades físico-químicas.

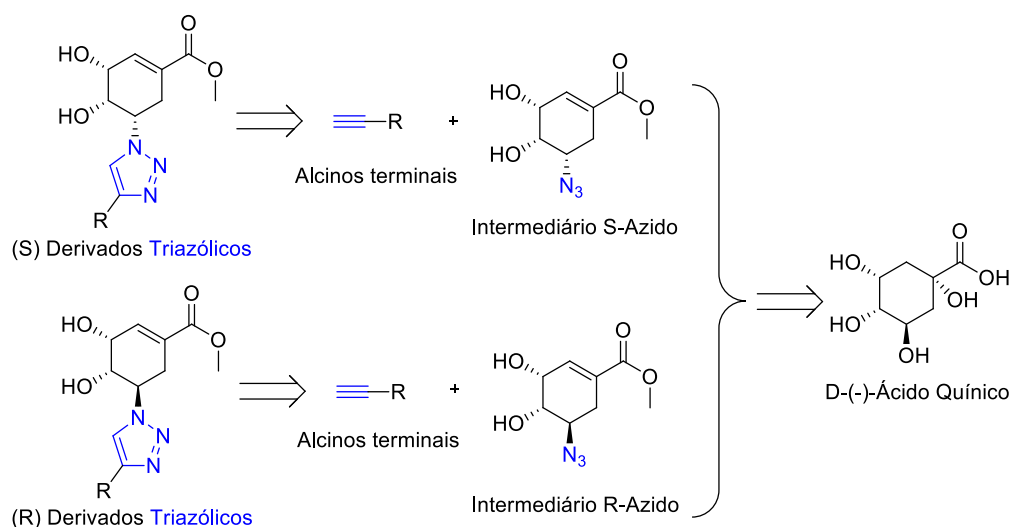


Figura 16: Retrossíntese dos derivados triazólicos com configuração 5R e 5S, via intermediários 5R e 5S azido e D-(-)-Ácido Quínico.

4. Ensaio de inibição da enzima *trans*-sialidase com os compostos sintetizados.
5. Avaliação da atividade tripanocida de todos os compostos inéditos sintetizados, com propriedades físico-química distintas.

5. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados descritos, 48 compostos derivados do ácido quinico foram sintetizados e caracterizados. Dentre estes, 25 são compostos inéditos na literatura (**11, 12, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 36, 37, 38, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 48**).

A rota sintética inicialmente proposta foi adaptada ao longo do trabalho e permitiu que intermediário azido **12** e seu isômero **18** fossem obtidos. A troca do precursor para o ácido chiquímico permitiu maior rendimento total na obtenção dos derivados azido, conduzindo a **12** e **18** em 5 e 6 etapas, respectivamente.

O acoplamento azido-alcino por meio de reação CuAAC foi efetivo e os compostos triazólicos foram obtidos em rendimentos satisfatórios, a série com configuração 5R apresentou rendimento total maior que a série com configuração 5S, inicialmente proposta no projeto. Finalmente, os ácidos carboxílicos **39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47** e **48** foram obtidos após etapa de desesterificação utilizando LiOH.

Foram realizados os ensaios enzimáticos com a enzima TcTS, utilizando os todos produtos finais obtidos. Os derivados de cadeia lateral *para*-nitro fenílica **42** e **45** foram os mais ativos, apresentando inibição de 87% e 64%, com valor de IC50 de 266 μ M e 399 μ M, respectivamente.

Levando em consideração o laborioso trabalho envolvendo a execução e otimização das rotas sintéticas, não foi possível realizar a desesterificação de todos os derivados triazólicos sintetizados, bem como obter a caracterização completa dos produtos finais obtidos. Desse modo, estas últimas reações e a posterior caracterização serão realizados futuramente.

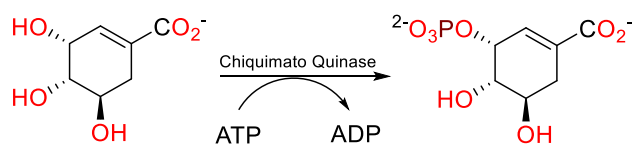
6. PERSPECTIVAS

6.1 Avaliação de atividade em Chiquimato Quinase e Neuraminidase.

Nas bactérias, a rota biosintética denominada via do ácido chiquímico tem despertado muito interesse para o desenvolvimento de novos antibióticos, já que consiste de uma função bacteriana não muito explorada, em comparação a outros alvos amplamente conhecidos, aos quais muitas bactérias já desenvolveram resistência aos fármacos que neles atuam (GONZÁLES-BELLO, 2016).

Na rota do ácido chiquímico, os aminoácidos e outros compostos aromáticos (folatos, ubiquinona) são biosintetizados, porém, as enzimas envolvidas nessa via são ausentes em mamíferos, favorecendo o desenvolvimento de agentes antimicrobianos seletivos (LAMICHHANE *et al.*, 2011). Em trabalho recente do grupo de Prado *et al.*, (2016) foram desenvolvidos inibidores da enzima chiquimato quinase, que catalisa a conversão do ácido chiquímico em fosfato-3-chiquimato, utilizando ATP como cofator, e reconhece um anel de ciclohexeno com dois dos três grupos hidroxílicos em posição axial.

A enzima foi considerada um bom alvo para bactérias relevantes, como a *Mycobacterium tuberculosis* e *Helicobacter pylori*.



Esquema 23: Conversão enzimática do ácido chiquímico catalisada pela enzima Chiquimato Quinase.

Os compostos sintetizados possuem grupo triazólico 1,4-dissubstituídos, e apresentaram atividade relevante. Os derivados triazólicos **39** e **47**, com configuração 5R, são descritos por Prado *et al.*, (2016), e foram testados frente a inibição em Chiquimato Quinase.

Dessa forma, visando a ampliação do escopo dos estudos, realizaremos os testes de inibição na enzima chiquimato quinase, utilizando os compostos inéditos já sintetizados (série 5R e 5S), sendo que também será possível a obtenção de novos derivados, utilizando a estratégia sintética já definida.

Por fim, tentando ampliar a busca por atividade das moléculas sintetizadas, também serão testadas para atividade em neuraminidase viral, em parceria com o Prof. Stephan Ludwig, da universidade de Muenster, Alemanha.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves, C.; Barros, M. T.; Maycock C. D.; Ventura M. R. An efficient transformation of quinic acid to shikimic acid derivatives, **Tetrahedron**, v. 55, p. 8443-8456, 1999, doi: [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(99\)00431-7](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(99)00431-7)

Andrews, K. T.; Fisher, G.; Skinner-Adams, T. S. Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases, **Int. J. Parasit: Drugs and Drugs Resist.** v. 4, p. 95-111, 2014, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpddr.2014.02.00>

Appukkuttan, P.; Dehaen, W.; Fokin, V. V.; Eycken, E. V. A microwave-assisted click chemistry synthesis of 1,4-disubstituted 1,2,3-triazoles via a copper(I)-catalyzed three-component reaction, **Organic Letters**, v. 6, n. 23, p. 4223–4225, 2004, doi: <https://doi.org/10.1021/ol048341v>

Apt, W.; Aguilera X.; Arribado, A.; Pérez, C.; Miranda, C.; Sánchez, G.; Zulantay, I.; Cortés P.; Rodriguez J.; Juri, D.; Treatment of chronic Chagas' Disease with Itraconazole and Allopurinol, **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 59, n. 1, p. 133–138, 1998, doi: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1998.59.133>

Araújo, A.; Jansen A. M.; Reinhard, K.; Ferreira, L. F. Paleoparasitology of Chagas' disease: a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 9–16, 2009, doi: 10.1590/s0074-02762009000900004

Arioka, S.; Sakagami, M.; Uematsu, R.; Yamaguchi, H.; Togame, H.; Takemoto, H.; Hinou, H.; Nishimura, SI. Potent inhibitor scaffold against *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase, **Bioorg. Med. Chem.**, v. 18, n. 4, p. 1633–1640, 2010, doi: 10.1016/j.bmc.2009.12.062

Aufderheide, A. C.; Salo, W.; Madden, M.; Streiz, J.; Bukstra, J.; Guhl F.; Arriaza, B.; Renier C.; Wittmers Jr, L. E.; Fornaciari, G.; Allison M. A 9000-year record of Chagas disease, **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 101, n. 7, p. 2034–2039, 2004, doi: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0307312101

Bahia, M. T.; Andrade, I. M. D.; Martins, T. A. F.; Nascimento, A. F. S.; Diniz, L. F *et al.*, Fexinidazole: A Potential New Drug Candidate for Chagas Disease. **PLoS. Negl. Trop. Dis**, v. 6 n. 11, p. e1870, 2012, doi: doi:10.1371/journal.pntd.0001870

Bahia, M. T.; Nascimento, A. F.; Mazzeti, A. L.; Marques, L. F.; Gonçalves, K.R. *et al.*, Antitrypanosomal activity of fexinidazole metabolites, potential new drug candidates for Chagas disease, **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 58, n. 8, p. 4362–4370, 2014, doi: <https://doi.org/10.1128/AAC.02754-13>

Baptistella, L. H. B.; Cerchiaro, G. Studies for the transformation of carbocycles into carbohydrates: approach toward the synthesis of higher sugar derivatives, **Carboh. Res.**, v. 339, p. 665-671, 2004, doi:10.1016/j.carres.2003.10.026

- Barco, A.; Benetti, S.; Risi, C.; Marchetti, P.; Pollini, G.P.; Zanirato, V. D-(-)-Quinic Acid: a chiron store for natural product synthesis, **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 8, n. 21, p. 3515-3545, 1997, doi : [https://doi.org/10.1016/S0957-4166\(97\)00471-0](https://doi.org/10.1016/S0957-4166(97)00471-0)
- Bianco A.; Brufani, M.; Manna, F.; Melchioni, C. Synthesis of a carbocyclic sialic acid analogue for the inhibition of influenza virus neuraminidases, **Carboh. Res.**, v. 332, p. 23-31, 2001, doi: 10.1016/s0008-6215(01)00079-9
- Bischofberger, N. W.; Kim, C. U.; Lew, W.; Liu, H.; Williams, M. A. Carbocyclic Compounds, Depositante: Gilead Sciences, Inc, US 5,763,483A depósito: 27 dez. 1996, concessão: 9 jun. 1998.
- Bock, V. D., Hiemstra H., Maarseveen J. H. CuI-Catalyzed Alkyne–Azide “Click” Cycloadditions from a Mechanistic and Synthetic Perspective, *Eur. J. Org. Chem.*, p. 51-68, 2006, doi: 10.1002/ejoc.200500483
- Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Guia de Vigilância em Saúde, v. 3, p. 1-740, 2019, http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_3ed.pdf (acessado em 20/07/2022)
- Buschiazzo, A.; Amaya, M. F.; Cremona, M. L.; Frasc, A. C.; Alzari, P. M. The Crystal Structure and Mode of Action of Trans-Sialidase, a Key Enzyme in Trypanosoma cruzi Pathogenesis, **Mol. Cell**, v. 10, p. 757-768, 2002, doi: 10.1016/s1097-2765(02)00680-9
- Campo, V. L.; Martins-Teixeira, M. B.; Carvalho, I. Trypanosoma cruzi invasion into host cells: a complex molecular targets interplay. **Mini Rev. Med. Chem**, v. 16, n. 13, p. 1084-1097, 2016, doi: 10.2174/1389557516666160607230238
- Carvalho, I.; Andrade P.; Campo, V.; Guedes, P.; Sesti-Costa, R.; Silva, J.; Schenkman, S.; Dedola, S.; Hill L.; Rejzek, M.; Nepogodiev, S.; Field R. ‘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, **Bioorg. & Med. Chem**, v.18, p. 2412-2427, 2010, doi: 10.1016/j.bmc.2010.02.053
- Cerecetto, H.; González, M.; Chemotherapy of Chagas’ Disease: Status and New Developments, **Curr. Trop. Med. Chem**, v. 2, n. 11, p. 1187-1213, 2002, doi: 10.2174/1568026023393066
- Chen, X.; Varki, A.; Advances in the Biology and Chemistry of Sialic Acids, **Acs. Chem. Bio**, v. 5, n. 2, p. 163-176, 2010, doi: 10.1021/cb900266r
- Cole, J. C.; Murray, C. W.; Nissink, J. W. M.; Taylor, R. D. Comparing Protein–Ligand Docking Programs Is Difficult. **Proteins: Struct. Funct. Bioinf.**, v. 60, p. 325–332, 2005, doi: 10.1002/prot.20497

- Coura, J. R. The discovery of Chagas disease (1908-1909): Great successes and certain misunderstandings and challenges, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 4, p. 389–390, 2013, doi: <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0143-2013>
- Coura, J. R.; Castro, S. L. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy, **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 3-24, 2002, doi: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000100001>
- Deshpande, S.; Matei, M. F.; Jaiswal, R.; Bassil, B. S.; Kortz, U.; Kuhnert, N. Synthesis, Structure, and Tandem Mass Spectrometric Characterization of the Diastereomers of Quinic Acid, **J. Agric. Food Chem.**, v. 64, p. 7298-7306, 2016, doi: 10.1021/acs.jafc.6b02472
- Dias, J. C. P.; Neto, V. A.; LUNA, E. J. A. Mecanismos alternativos de Transmissão do trypanosoma cruzi no Brasil e sugestões para sua prevenção, **Rev. Soc. Br. Med. Trop.**, v. 44, n. 3, p. 375–379, 2011, doi: 10.1590/S0037-86822011005000032.
- Dias, J. C. P.; Ramos Jr, A. N.; Gontijo, E. D.; Luquetti, A.; Shikanai-Yasuda, M. A.; Coura. J. R.; Silveira, A. C. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015, **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 25, n. 21, p. 7–86, 2016, doi: 10.5123/S1679-49742016000500002
- Drugs for Neglect Diseases *initiative*, Chagas disease target product profiles, 2022, <https://ndi.org/diseases/chagas/target-product-profile/> (acessado em 25/09/2022).
- Frevert, U.; Shenkman, S.; Nussenzweig, V. Stage-Specific Expression and Intracellular Shedding of the Cell Surface trans-Sialidase of Trypanosoma cruzi, **Infect. Immun.**, v. 60, n. 6, p. 2349-2360, 1992, doi: 10.1128/iai.60.6.2349-2360.1992
- Gao, W; Wortis, H. H.; Pereira, M. A. The Trypanosoma cruzi trans-sialidase is a T cell-independent B cell mitogen and an inducer of non-specific Ig secretion. **Intern. Immun.**, v. 14, n. 3, p. 299–308, 2002, doi: 10.1093/intimm/14.3.299
- Garcia-Huertas, P.; Cardona-Castro, N. Advances in the treatment of Chagas disease: Promising new drugs, plants and targets, **Biomed. & Pharmacotherapy**, v. 142, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112020>
- Gil, R. R.; Navarro-Vázquez A. Modern NMR Approaches to the Structure Elucidation of Natural Products, v. 2, p. 1-38, 2016, doi: 10.1039/9781849734684-00001
- González-Bello, C. Inhibition of shikimate kinase and type II dehydroquinase for antibiotic discovery: structure-based design and simulation studies. **Curr. Top. Med. Chem.** v. 16, p. 960–97, 2016, doi: 10.2174/1568026615666150825142527.
- He, Y.; Huang, Y.; Xu, Z.; Xie, W.; Luo, Y.; Li, F.; Zhu, X.; Shi, X. Stereodivergent Syntheses of All Stereoisomers of (-)-Shikimic Acid: Development of a Chiral Pool for the Diverse Polyhydroxy-

cyclohexenoid (or -cyclohexanoid) Bioactive Molecules, **Eur. J. Org. Chem**, p. 1-16, 2021, doi: doi.org/10.1002/ejoc.202100653

Hestenes, M. R.; Stiefel, E. Methods of Conjugate Gradients for Solving Linear Systems. **J. Res. Nation. Bur. Stand.**, v. 49, p. 409-435, 1952, doi: http://dx.doi.org/10.6028/jres.049.044

HUISGEN, R. Kinetics and Mechanism of 1,3-Dipolar Cycloadditions **Angew. Chem. Int. Ed. Engl**, v. 2, n. 11, p. 633-696, 1963, doi: https://doi.org/10.1002/anie.196306331

Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME). GBD Compare. Seattle, WA: IHME, University of Washington, 2015, https://www.healthdata.org/results/gbd_summaries/2019/chagas-disease-level-3-cause (acessado em 20/07/2022)

IUPAC, Compendium of Chemical Terminology, 2ª edição, Oxford, 1997, doi:10.1351/goldbook.C00812

Jones, G.; Willet, P.; Glen, R. C.; Leach, A. R.; Taylor, R. Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking, **J. Mol. Biol.**, v.267, n.3, p. 727-748, 1997, doi: <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0897>

Kashif, M.; Moreno-Herrera, A.; Lara-Ramirez, E. E.; Ramirez-Moreno E.; Bocanegra-García, V.; Ashfaq, M.; Rivera, G.; Recent developments in *trans*-sialidase inhibitors of *Trypanosoma cruzi*, **J. Drug. Targ.** v. 25, n. 6, p. 485-498, 2017, doi: http://dx.doi.org/10.1080/1061186X.2017.1289539

Khare, S.; Nagle, A. S.; Biggart, A.; Lai, Y. H.; Liang, F.; Davis, L. C *et al.*, Proteasome inhibition for treatment of leishmaniasis, Chagas disease and sleeping sickness, **Nature**, v. 531, p. 229-233, 2016, doi: <https://doi.org/10.1038/nature19339>

Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, B. K. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions, **Angew. Chem. Int. Ed. Engl**, v. 40, n. 11, p. 2004-2021, 2001, doi: 10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::aid-anie2004>3.3.co;2-x

Lamichhane, G.; Freundlich, J. S.; Ekins, S.; Wickramaratne, N.; Nolan, S. T.; Bishai, W. R. Essential metabolites of Mycobacterium tuberculosis and their mimics, **mBio.**, n. 1, v. 2, p. 1-10, 2011, doi: 10.1128/mbio.00301-10

Lew, W.; Kim, C. U.; Liu, H.; Williams, M. A. Aminocyclohexenecarboxylates as neuraminidase inhibitors, Depositante: Gilead Sciences, Inc, US 5,866,60101A depósito: 6 jun. 1995, concessão: 2 feb. 1999.

Li, F.; Ding, W.; Wu, J.; He, Y.; Zhu, X.; Shi, X.; Zhao, J.; Improved Stereoselective Syntheses of (+)-Valiolamine and (+)-Valienamine Starting from (-)-Shikimic Acid, **Chin. J. Chem**, v. 35, p. 457-464, 2017, doi: 10.1002/cjoc.201600935

- Liñares, G. E. G.; Ravaschino, E. L.; Rodriguez, J. B. Progresses in the Field of Drug Design to Combat Tropical Protozoan Parasitic Diseases, **Curr. Med. Chem**, v.13, n. 3, p. 335-360, 2006, doi: 10.2174/092986706775476043
- Magalhães-Santos, I. F. Transmission of Chagas Disease: a brief review, **Rev. Ciênc Méd. Biol**, v. 13, n. 2, p. 226–235, 2014.
- Maring, C. J.; Giranda, V. L.; Gu, Y. G.; Hanessian, S.; Kempf, D. J.; Madigan, D.; Stewart, K.; Stoll, V. S.; Sun, M.; Wang, G. T.; Wang, J.; Zhao, C. Preparation of acetyl amino cyclohexane carboxylate as neuraminidase inhibitors, Depositante: Abbott Laboratories, US 6,593,314 B1, depósito: 22 jun. 2000, concessão:15 jul. 2003.
- Martín-Escolano, J.; Marín, C.; Rosales, M. C.; Tsaousis, A. D.; Medina-Carmona, E.; Martín-Escolano R. An Updated View of the *Trypanosoma cruzi* Life Cycle: Intervention Points for an Effective Treatment, **Acs Infect. Dis**, v. 8, p. 1107-1115, 2022, doi: <https://doi.org/10.1021/acsinfectdis.2c00123>
- Mazzeti, A. L.; Diniz, L. F.; Gonçalves, K. R.; WonDollinger, R. S.; Assíria, T.; Ribeiro, I.; Bahia, M. T. Synergic Effect of Allopurinol in Combination with Nitroheterocyclic Compounds against *Trypanosoma cruzi*, **Antimicrob. Ag. Chem**, v. 63, n. 6, 2019, doi: <https://doi.org/10.1128/AAC.02264-18>
- Mendes, L. L.; Silva, M. S.; Martins, A. L. O. Treatment of chronic phase of Chagas Disease: systematic review **Rev. bras. anal. clin**, v. 49, n. 4, p. 333–338, 2017, doi: 10.21877/2448-3877.20160043
- Menezes, C.; Costa, G. C.; Gollob, K. J.; Dutra, W. O. Clinical aspects of Chagas disease and implications for novel therapies, **Drug. Dev. Res**, v. 72, n. 6, p. 471-479, 2011, doi: 10.1002/ddr.20454.
- Montchamp, J.L.; Tiang, F.; Hart, M. E.; Frost, J. W.; Butane 2,3-Bisacetal Protection of Vicinal Diequatorial Diols, **J. Org. Chem**, v. 61, n. 11, p. 3897-3899, 1996, doi: <https://doi.org/10.1021/jo960170n>
- Morris, S. A.; Tanowitz, H. B.; Wittner, M.; Bilezian, J. P. Pathophysiological Insights Into the Cardiomyopathy of Chagas' Disease, **Circulation**, v. 82, n. 6, 1990, doi: 10.1161/01.CIR.82.6.1900
- Muelas-Serrano, S.; Nogal, J. J.; Martínez-Díaz, R. A.; Escario, J. A.; Martínez-Fernández, A. R.; Gómez-Barrio, A.; In vitro screening of American plant extracts on *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas vaginalis*, **J. Ethnopharmacology**, V. 71, p. 101-107, 2000, doi: [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(99\)00185-3](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(99)00185-3).
- 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*, **Analyt. Biochem.**, v. 357, p. 302-304, 2006, doi: 10.1016/j.ab.2006.07.018
- Patrick, G. L.; Spencer J. An Introduction to Medicinal Chemistry, 6ª edição, Oxford, 2009.

- Peterson, J. K.; Toshioka, K.; Hashimoto, K.; Caranci, A.; Gootdenker N.; Monroy, C.; Saldaña, A.; Rodriguez, S.; Dorn, P.; Zúniga, C. Chagas Disease Epidemiology in Central America: an Update, **Curr. Trop. Med. Rep.**, v. 6, p. 92-105, 2019, doi: <https://doi.org/10.1007/s40475-019-00176-z>
- Prado, V.; Lence, E.; Maneiro. M.; Vázquez-Ucha. J.; Beceiro, A.; Thompson, P.; Hawkins, R.; González-Bello, C. Targeting the motion of Shikimate Kinase: Development of competitive inhibitors that stabilize an inactive open conformation of the enzyme, **J. Med. Chem.**, v. 59, p. 5471-5487, 2016, doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b00483
- Rahman, A.; Choudhary, M. I.; Wahab A. T. Nuclear Overhauser Effect. Solving problems with NMR Spectroscopy, p. 227-264, 2016, doi: 10.1016/b978-0-12-411589-7.00006-1
- Ramapanicker R., Chauhan P. Click Chemistry: Mechanistic and Synthetic Perspectives, Click Reactions in Organic Synthesis, 1ª edição, Wiley, 2016
- Rapoport, E. M.; Kurmyshikina, O. V.; Bovin, N. V. Mammalian Galectins: Structure, Carbohydrate Specificity, and Functions, **Biochemistry (Moscow)**, v. 73, n. 4, p. 393-405, 2008, doi: 10.1134/S0006297908040032
- Rocha, M. O.; Teixeira, M. M.; Ribeiro, A. L. An update on the management of Chagas cardiomyopathy, **Expert Rev. Anti. Infect. Ther.**, v. 5, n. 4, p. 727-743, 2007, doi: 10.1586/14787210.5.4.727
- Roche, V. F.; Zito, S. W.; Lemke, T. L.; Williams, D. A. Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 8ª edição, Philadelphia, 2012.
- Rostovtsev, V. V.; Green L. G.; Fokin V. V.; Sharpless B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(i)-Catalyzed Regioselective 'Ligation' of Azides and Terminal Alkynes, **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 41, n. 14, p. 2596-2599, 2002, doi: 10.1002/1521-3773(20020715)41:14<2596::aid-anie2596>3.0.co;2-4.
- Santos, E. F.; Silva, A. A. O.; Leony, L. M.; Freitas, N. E. M.; Daltro, R.; Regis-Silva, C. G.; Del-Rei, R. P.; Souza, W. V.; Ostermayer, A. L.; Costa, V. M.; Silva, R. A.; Ramos Jr, A. N.; Souza, A. S.; Gomes, Y. M.; Santos, F. L. N. Acute Chagas disease in Brazil from 2001 to 2018: A nationwide spatiotemporal analysis, **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 14, n. 8, 2020, doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008445>
- Schenkman, S.; Eichinger, D., Trypanosoma cruzi trans-sialidase and cell invasion, **Parasit. Today**, v. 9, n. 6, p. 218-222, 1993, doi: 10.1016/0169-4758(93)90017-a
- Schenkman, S.; Eichinger, D.; Pereira, M. E. A.; Nussenzweig, V. Structural and functional properties of Trypanosoma cruzi trans-sialidase. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 48, p. 499-523, 1994, doi: 10.1146/annurev.mi.48.100194.002435
- Schrödinger Release 2019-4: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2019.

- Shing, T. K. M.; Tai, V. F., (-)-Quinic Acid in Organic Synthesis. Part 4.' Syntheses of Cyclophellitol and its (1R,6S)-, (2s)-, (1R,2S,6S)-Diastereoisomers, **J. Chem. Soc. Perkin Trans**, p. 2017-2023, 1994, doi: <https://doi.org/10.1039/P19940002017>
- Shutske G. M.; Kevin J. K. 1,2,3,4,-Tetrahydro-1,9-acridinediamines, pharmaceutical compositions and use, Depositante: Hoechst-Roussel Pharmaceuticals, US 4,868,177, depósito: 29 nov. 1988, concessão:19 set. 1989.
- Telleria, J.; Tibayrenc, M, American Trypanosomiasis, Chagas Disease: One Hundred Years of Research, 2nd edição, França, 2017.
- Tomoe C. W.; Christensen C.; Meldal, M. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides, **J. Org. Chem.**, v. 67, n. 9, p. 3057-3064, 2002, doi: 10.1021/jo011148j
- Turner C. W.; Lima M. F.; Villalta F. *Trypanosoma cruzi* Uses a 45-kDa Mucin for Adhesion to Mamalian Cells. **Biochem. Bioph. Res. Comm.**, v. 290, n. 1, p. 29-34, 2002, doi: 10.1006/bbrc.2001.6189
- Usami, Y.; Takaoka, I.; Horibe, Y.; Tomiyama, S.; Ohtuska, M.; Imanishi Y.; Arimoto, M. First Total Synthesis of Antitumor Natural Product (+)- and (-)-Pericosine A: Determination of Absolute Stereo Structure, **J. Org. Chem**, v. 72, p. 6127-6134, 2007, doi : 10.1021/jo070715l
- Varki, A. Sialic acids in human health and disease, **Trends. Mol. Med**, v. 14, n. 8, p. 60-351, 2008, doi: 10.1016/j.molmed.2008.06.002
- Vermelho, A. B.; Rodrigues, G. C.; Supuran, C. T.; Why hasn't there been more progress in new Chagas disease drug discovery?, **Exp. Op. Drug Discov.**, 2019, doi: 10.1080/17460441.2020.1681394
- Wolff, W. J. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, Wiley, New York, v. 21, p. 423, 1983.
- World Health Organization (WHO), Chagas disease (American trypanosomiasis) overview, 2019, https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab_1 (acessado em 20/07/2020)
- World Health Organization (WHO), Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates, **Weekly Epidemiological Record**, n. 6, p. 33-44, 2015. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/242316> (acessado em 20/07/2022).

