

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Endoperóxidos com actividade antimalária:  
estrutura, reactividade e actividade.

Bruno Emanuel de Campos Guerreiro

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

[2009/2010]



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

# Endoperóxidos com actividade antimalárica: estrutura, reactividade e actividade.

Bruno Emanuel de Campos Guerreiro

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

**[2009/2010]**

Dissertação orientada por Professora Doutora Maria de Lurdes dos Santos Cristiano

Aos meus pais...

A Malária é uma das doenças infecciosas que mais mata a nível mundial e afecta a humanidade há milénios. É causada por parasitas unicelulares protozoários do género *Plasmodium* e transmitida por mosquitos fêmea do género *Anopheles*, sendo a Malária causada por *P. falciparum* de longe a forma mais grave da doença. O crescente aparecimento e disseminação de estirpes resistentes aos fármacos mais utilizados, como a cloroquina e a mefloquina, principalmente de *P. falciparum*, bem como a resistência do mosquito vector aos insecticidas utilizados, levaram a um aumento dos casos de Malária em todo o mundo nos últimos anos tendo recentemente a OMS considerado a Malária uma doença tropical de intervenção prioritária.

Assim, com o parasita a esgotar as reservas de antimaláricos mais eficazes e seguros, a descoberta da Artemisinina na década de 1970 forneceu alguma esperança no combate à Malária e permitiu a exploração de uma nova classe de antimaláricos, os endoperóxidos antimaláricos. Estes compostos, com uma extraordinária actividade antimalárica e sem grande toxicidade associada, têm um mecanismo de actuação diferente dos fármacos tradicionalmente usados e não apresentam resistência cruzada com estes. A busca de um fármaco que conjugasse uma boa actividade antimalárica com boas propriedades farmacocinéticas e toxicológicas, e que fosse barato, levou ao desenvolvimento dos derivados sintéticos da artemisinina, sendo as classes de derivados 1,2,4-trioxolanos e 1,2,4,5-tetraoxanos as mais promissoras, estando actualmente três derivados já em ensaios clínicos: os trioxolanos OZ277 (arterolano) e OZ439 e o tetraoxano RKA 182.

**Palavras-chave:** Malária, Plasmodium, falciparum, Artemisinina, endoperóxido, trioxolano, tetraoxano, trioxano.

Malaria is one of the most lethal infectious diseases all over the world and has been affecting mankind over hundreds of years. It is caused by unicellular protozoan parasites of the Plasmodium genus and is transmitted by female mosquitoes of the Anopheles genus, being Malaria caused by *P. falciparum* by far the most severe form of the disease. The constant emergence and spreading of multi-drug resistant strains of the parasite, especially *P. falciparum*, likewise the resistance of the vector mosquito to the insecticides used, lead to an increase of the number of Malaria cases all over the world in the last few years, having Malaria been considered a tropical disease of preponderant intervention by the WHO.

With the parasite depleting the world supply of the more efficient and safe antimalarial drugs, the discovery of Artemisinin in the 1970s, gave some hope in the fight against Malaria and paved the road for a new class of antimalarial drugs, the antimalarial endoperoxid. These compounds have an extraordinary antimalarial activity, no major toxicity, and a mechanism of action different from that of the traditionally used drugs, which grants them no cross-resistance with the other drugs. The quest for a drug that fused a good antimalarial activity with good pharmacokinetics and toxicological properties, along with being cheap, lead to the research of the fully synthetic artemisinin derivatives, being the 1,2,4-trioxolanes and the 1,2,4,5-tetraoxanes derivatives the most promising types, being currently three of those compounds at clinical trials: the trioxolanes OZ277 (arterolane) and OZ439 and the tetraoxane RKA 182.

**Key-words:** Malaria, Plasmodium, falciparum, Artemisinin, endoperoxide, trioxolane, tetraoxane, trioxane.

## Índice:

1. Malária na Historia	Pág. 1
2. Malária na actualidade	Pág. 5
3. Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i> sp.	Pág. 7
4. Alimentação do parasita	Pág. 9
5. A doença	Pág. 10
6. Diagnostico	Pág. 13
7. Tratamento e Profilaxia	Pág. 14
8. Endoperóxidos Antimaláricos	Pág. 21
8.1. <i>Artemisinina e derivados semi-sintéticos</i>	Pág. 21
8.2. <i>1,2,4-Trioxanos sintéticos</i>	Pág. 31
8.3. <i>1,2,4-Trioxolanos</i>	Pág. 32
8.4. <i>1,2,4,5-Tetraoxanos</i>	Pág. 37
8.5. <i>Compostos Híbridos</i>	Pág. 43
8.6. <i>1,2-Dioxolanos e 1,2-dioxanos</i>	Pág. 46
9. Conclusão	Pág. 49
10. Bibliografia	Pág. 51



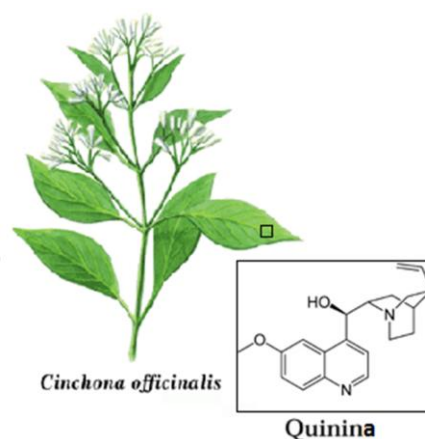


## 1. Malária na Historia

A Malária é uma doença que aflige a humanidade desde tempos imemoriais: milhões pereceram, cidades foram dizimadas, grandes civilizações declinaram, guerras foram perdidas e o avanço da humanidade foi retido. Existem descrições reconhecíveis desta doença, frequentemente letal quando não tratada convenientemente, em vários papiros egípcios, incluindo o papiro de Ebers (1550 A.C.), que mencionam sinais e sintomas como febres intermitentes e esplenomegalia, e que os relacionam com as inundações do Nilo. A relação entre as febres e os pântanos também era bem conhecida na antiguidade, atribuindo-se a doença a espíritos maus e a deuses malignos que habitavam os pantanais, assim como também se suspeitava da relação entre a doença e os mosquitos, visto muitas vezes esses espíritos e deuses malignos serem representados sob formas que lembravam mosquitos.<sup>[1, 2]</sup>

Mais tarde, quando a medicina deixou de lado as crenças espirituais e mitológicas e passou a assentar na teoria dos miasmas (séc. XVIII), atribuíram-se as febres da Malária à inalação de vapores venenosos e ares maus, *mala aria*, em pântanos e zonas de águas paradas. Esta denominação italiana, *mala aria*, evoluiu para o nome pelo qual hoje reconhecemos a doença, Malária, substituindo outros anteriormente usados como febre da selva, febre dos pântanos e paludismo, este, no entanto, ainda hoje é utilizado.<sup>[1, 2]</sup>

O primeiro tratamento eficaz para a Malária, conhecido pelo ocidente, foi a utilização de tintura da casca da árvore Cinchona, originária das encostas dos Andes. Este tratamento foi introduzido por Jesuítas na Europa, cerca de 1640, pois tinham observado a eficácia da sua utilização por indígenas, e foi rapidamente aceite pelos seus bons resultados, mas apenas em 1820 o princípio activo, a quinina (Fig. 1), foi identificado, extraído e isolado.<sup>[3]</sup> No entanto, séculos antes, enquanto os europeus recorriam a



*Figura 1* – Ramo de Cinchona e estrutura molecular da quinina.<sup>[4]</sup>

mezinhas e tratamentos inúteis e supersticiosos, já os chineses utilizavam extractos de plantas como a *Dichroa febrifuga* e *Artemisia annua* que possuíam extraordinárias propriedades antimaláricas.<sup>[1-3]</sup>

Com a evolução dos conhecimentos médicos a teoria dos miasmas foi desacreditada sendo substituída pela teoria do germe, o que levou à suposição que a Malária seria causada por um hipotético microrganismo, o *Bacillus malariae*. No entanto, a Malária não é causada nem por vírus nem por bactérias, mas sim por parasitas unicelulares com 14 cromossomas e pouco mais de 5000 genes.<sup>[1, 2]</sup>

Estes parasitas foram pela primeira vez observado e descrito por Charles Louis Alphonse Laveran, um médico do exército Francês, em 1880, na Argélia, e fazem parte do género *Plasmodium*, do filo *Apicomplexa* dos protozoários.<sup>[1, 2]</sup>

Apesar desta descoberta, o modo como a doença se propagava continuou desconhecido por praticamente mais duas décadas, até 1897, quando Ronald Ross identificou o vector da malária como sendo o mosquito *Anopheles* sp.<sup>[1, 2]</sup>

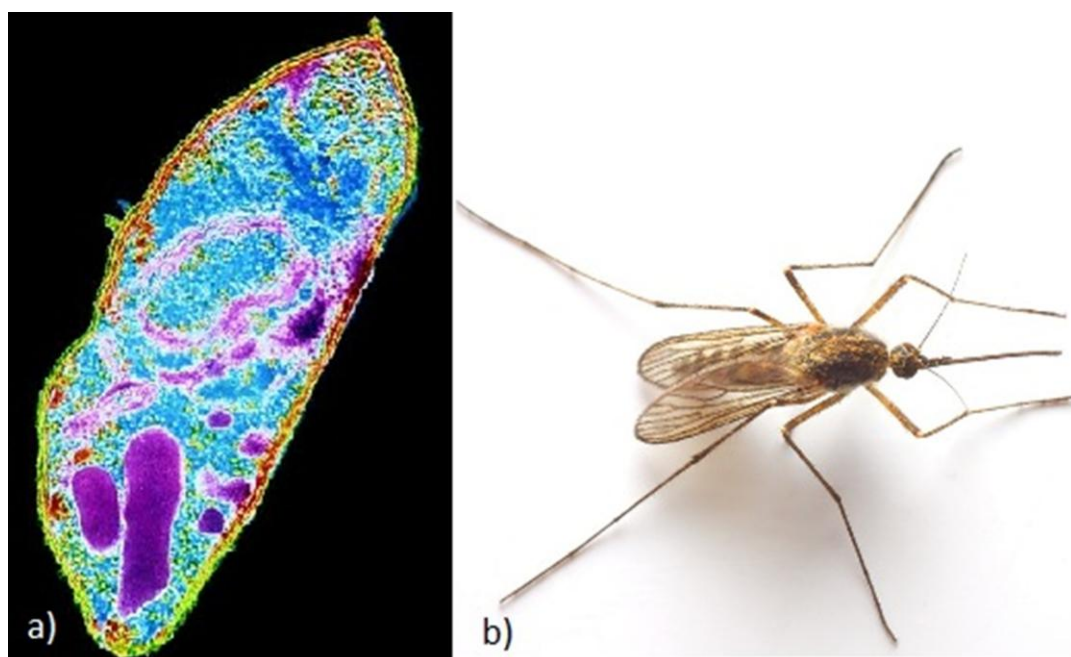


Figura 2 – Micrografia electrónica de *Plasmodium falciparum* (a) e mosquito *Anopheles* (b).<sup>[5, 6]</sup>

A partir deste momento com o conhecimento de qual o “inimigo” a combater e com o aparecimento dos primeiros insecticidas, principalmente com a descoberta das propriedades insecticidas do dicloro-difenil-tricloro-etano (DDT) em 1939 por Paul Hermann Müller, o combate eficaz à Malária foi possível. Este insecticida, amplamente utilizado na Segunda Guerra Mundial pelos Aliados para controlar as infecções, não só de malária como de tifo e febre-amarela, provou ser eficaz no combate aos vectores artrópodes destas doenças e praticamente eliminou a Malária de amplas áreas do globo, nomeadamente no sul da Europa, Brasil e Egipto, e com excelentes resultados no norte de África e Pacífico Sul.<sup>[1, 2]</sup>

Depois destes bons resultados, o uso de DDT foi a grande base do programa de erradicação global da Malária lançado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 1955, que tinha como meta a erradicação da malária de todo o planeta, principalmente através da eliminação de populações do vector infectadas em número suficiente para interromper a transmissão do parasita. Curiosamente este programa dito global não contemplava a África Subsaariana. Embora com resultados inicialmente favoráveis, o programa foi abandonado em 1969, devido ao aparecimento de resistências, não só do vector aos insecticidas como também do próprio parasita aos fármacos utilizados, principalmente devido a um uso pouco controlado destes. Outros factores sociais e económicos também contribuíram para o insucesso do programa, tal como guerras e grandes movimentações migratórias.<sup>[1, 2, 7]</sup>

Apesar de o programa ter falhado em interromper completamente a transmissão, fizeram-se bons progressos, tendo-se erradicado completamente a doença da Europa e da América do Norte, embora nestes dois continentes a situação fosse já muito positiva desde o final da Segunda Guerra Mundial.<sup>[1, 2, 7]</sup>

Em Portugal a Malária foi um dos grandes flagelos nacionais até ao final dos anos 50. Doença endémica no nosso país, afectava cerca de 40 a 50 mil pessoas todos os anos no princípio do século XX, principalmente nas zonas rurais. A partir dos anos 40 teve início o grande combate à Malária, com a pulverização das zonas mais afectadas do país com DDT e com a distribuição de milhares de comprimidos de quinina, no entanto é possível especular que o combate à Malária em Portugal se iniciou séculos antes, com a drenagem de pântanos, principalmente no reinado de D. Dinis. A malária endémica foi declarada como eliminada de Portugal em 1973 pela OMS, no entanto, já desde 1958 que não se observavam novos casos autóctones.<sup>[8, 9]</sup>

Com o abandono do programa de erradicação da malária, passou-se a estratégias de controlo da doença. No entanto nos últimos anos muitas delas foram negligenciadas pelos esforços económicos que exigiam. Assim, a situação mundial que hoje enfrentamos é pior que a que se observava à 30 anos atrás.<sup>[1, 10]</sup> Tal deve-se não só às negligências já referidas como também ao crescente aumento da resistência aos fármacos por parte do parasita, principalmente à cloroquina, a opção mais segura e barata para tratar Malária, e como tal, a mais utilizada, muitas vezes de forma pouco racional e sem qualquer controlo. O próprio mosquito tem desenvolvido resistência aos insecticidas, também eles muitas vezes utilizados indiscriminadamente, não só no controlo da Malária e de outras doenças transmitidas por artrópodes, como nas actividades agrícolas. Estes factos, associados às alterações populacionais, demográficas, ambientais e climáticas que se têm observado nos últimos anos, levaram a que a doença regressasse a áreas onde se tinha dado como erradicada e se espalhasse para novas zonas, como a Ásia Central e a Europa do Leste.<sup>[1, 2, 8, 10, 11]</sup>

## **2. Malária na actualidade**

Actualmente, a Malária é uma doença endémica numa ampla zona mundial, abrangendo mais de 100 países (Fig. 3), que pode ser transmitida a pessoas de qualquer idade, estando metade da população mundial em risco de a contrair, sendo a mais vulnerável a que vive nos países mais pobres.<sup>[8, 10, 11]</sup>

Estima-se que em 2008 tenham ocorrido cerca de 247 milhões de casos de Malária em todo o mundo, dos quais resultaram aproximadamente 881 mil mortes, principalmente entre crianças Africanas. Neste continente, onde uma criança tem em média entre 1,6 a 5,4 episódios de febre causada por Malária todos os anos, uma criança morre de Malária a cada 30 segundos e a doença é responsável por 20% de todas as mortes na infância. Mesmo quando curada, a Malária severa pode deixar danos cerebrais permanentes e dificuldades de aprendizagem nas crianças afectadas. Mulheres grávidas estão também em risco elevado, não só de morrer das complicações da Malária como também de sofrer abortos espontâneos, trabalho de parto prematuro, e nados mortos ou com atraso no desenvolvimento à nascença. Nas áreas de transmissão intensa, como nas zonas costeiras de África, a infecção pode ser crónica e constante. Um individuo pode receber centenas de picadas de mosquitos infectados por ano, estando perpetuamente enfraquecidos pelo parasita.<sup>[8, 10, 11]</sup>

Estima-se que em cada ano, cerca de 10% da população mundial irá sofrer pelo menos um episódio de malária. No entanto, é uma doença perfeitamente prevenível e curável. Como tal, foi recentemente considerada pela OMS como uma doença tropical de intervenção prioritária.<sup>[8, 10, 11]</sup>

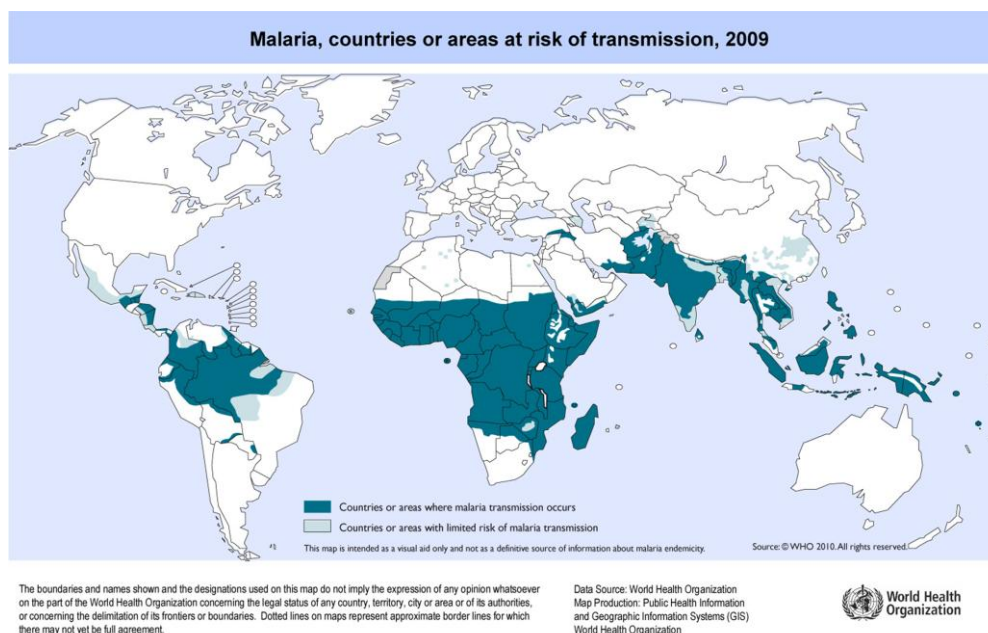


Figura 3 – *Plasmodium falciparum* no mundo, dados de 2009. [12]

Como já foi referido, a Malária é causada por parasitas denominados *Plasmodium*. Estes são protozoários unicelulares do género *Plasmodium* (filo *Apicomplexa*), existindo quatro tipos de malária humana que diferem na espécie do parasita infectante, nomeadamente *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, e *Plasmodium ovale*, sendo que *P.falciparum* e *P.vivax* são as formas infectantes mais comuns, e a infecção por *P.falciparum* é de longe a forma mais letal. O *Plasmodium* não é um parasita exclusivamente humano, existindo espécies deste protozoário que infectam aves, répteis, primatas, morcegos, roedores e outros mamíferos. O *Plasmodium knowlesi*, um dos parasitas da malária que infecta símios, pode também afectar humanos de forma artificial ou natural, sendo uma zoonose relativamente frequente no sudoeste asiático. [1, 2, 8, 10, 11]

A transmissão da Malária ocorre apenas pela picada de mosquitos *Anopheles* sp. fêmea infectados (Fig. 2b). Estes mosquitos, vectores da Malária, alimentam-se principalmente à noite e multiplicam-se em poças, pântanos e arrozais, sendo a transmissão mais intensa nos locais em que o mosquito tem um tempo de vida relativamente longo e prefere picar humanos, como é o caso dos vectores Africanos. Quanto mais vectores maior será a transmissão, como tal a transmissão depende também das condições climáticas que afectem a procriação dos mosquitos, tal como a precipitação, temperatura e humidade, daí que em muitas zonas a transmissão seja sazonal, atingindo o seu máximo durante e imediatamente após a época das chuvas. [1, 2, 8, 10, 11]

### **3. Ciclo de vida de *Plasmodium sp.***

O *Plasmodium sp.* apresenta um ciclo biológico complexo (Fig. 4), passando por vários estádios de diferenciação morfológica e expressando proteínas de superfície (antigénios) diferentes em cada um deles. O ciclo de vida do parasita humano desenvolve-se em duas fases principais: uma fase assexuada, que decorre no hospedeiro vertebrado, denominada de esquizogonia, e uma fase sexuada que decorre no hospedeiro artrópode, a esporogonia.<sup>[1]</sup>

A forma infectante para o hospedeiro vertebrado são os esporozoítos, que se encontram nas glândulas salivares das fêmeas de mosquito do género *Anopheles* infectadas, os quais têm a sua origem nos oocistos alojados no estômago do mosquito.<sup>[1]</sup>

A infecção tem o seu início quando um mosquito infectado no decurso de uma refeição sanguínea inocula, através da sua saliva, os esporozoítos no tecido subcutâneo, ou mesmo directamente na corrente sanguínea, de um hospedeiro vertebrado não infectado. Os esporozoítos parasitas dirigem-se para o fígado (no intervalo de tempo de 30 minutos a 2 horas) e invadem os hepatócitos, onde se instalam, iniciando uma fase de esquizogonia exo-eritrocitária, alimentam-se e multiplicam-se durante aproximadamente uma semana dependendo da espécie, diferenciando-se em esquizontes multinucleados. Estes esquizontes rompem os hepatócitos libertando vários milhares de merozoítos que invadem os eritrócitos dando origem ao ciclo eritrocitário. Alternativa e paralelamente, nalgumas espécies de *Plasmodium*, nomeadamente *P. Ovale* e *P. Vivax*, alguns dos esquizontes permanecem durante anos nos hepatócitos, formando os hipnozoítos, responsáveis pelas recidivas de Malária, ou seja, o aparecimento de Malária anos após a infecção inicial, sem nova exposição ao parasita, que pode ocorrer aquando da infecção por estas espécies de parasita.<sup>[1]</sup> A invasão dos eritrócitos pelo *Plasmodium* requer a existência de receptores na membrana citoplasmática do eritrócito, entre os quais a glicoproteína Duffy, muito importante para o *P. Vivax*, e a mesma que determina o grupo sanguíneo Duffy.<sup>[1]</sup>

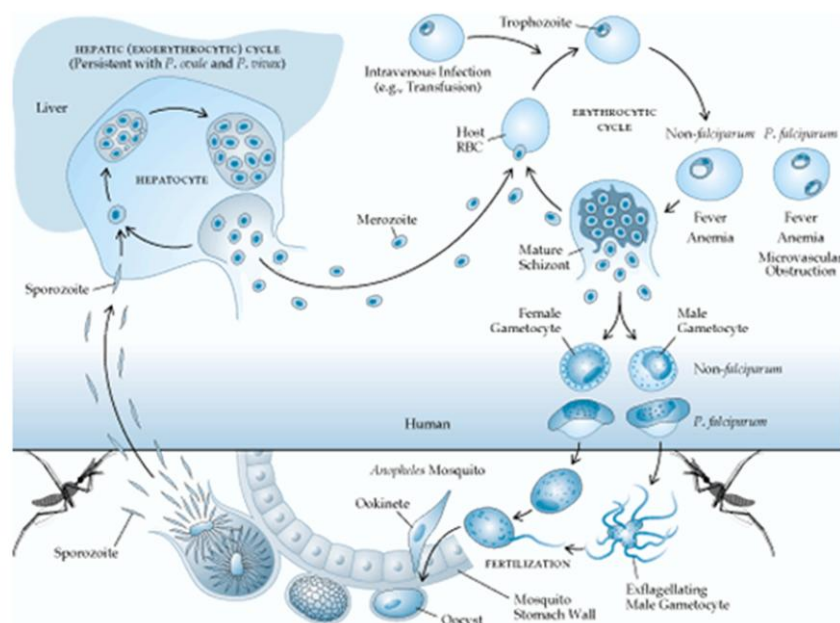


Figura 4 – Ciclo de vida do *Plasmodium sp.*<sup>[13]</sup>

Segue-se uma fase de desenvolvimento intra-eritrocitário, esquizogonia eritrocítica, onde o parasita se alimenta, estando então num estado vegetativo de trofozoíto, degradando e absorvendo nutrientes dos eritrócitos, e multiplicando-se por esquizogonia. Esta fase pode durar entre 24 e 72 horas, consoante a espécie do parasita, dando-se então a ruptura do eritrócito, com libertação de novos parasitas, novamente na fase de merozoítos, mas com os seus números exponencialmente aumentados, ocorrendo uma nova invasão de eritrócitos. A repetição do ciclo eritrocitário é responsável pelas manifestações clínicas como a febre, arrepios e exaustão características da doença, e conduz à forte anemia verificada pela destruição dos eritrócitos.<sup>[1]</sup>

Alguns trofozoítos intra-eritrocitários, após alguns ciclos, diferenciam-se em gametócitos masculinos, ou microgametocitos, e femininos, macrogametocitos, que ao serem ingeridos pelo *Anopheles* fêmea durante uma refeição sanguínea, vão continuar o ciclo do parasita no hospedeiro invertebrado.<sup>[1]</sup>

Os gametócitos, feminino e masculino, dão origem a gâmetas que, por fertilização formam o zigoto, um oocineto móvel, que atravessa a parede do estômago do mosquito, e ai se enquista, formando o oocisto. Os esporozoítos desenvolvem-se no interior do oocisto, por mitoses sucessivas, originando milhares de novos parasitas móveis, que vão migrar para as glândulas salivares do mosquito e ai acumulam-se, aguardando que o mosquito se alimente e os inocule num novo hospedeiro, e iniciar assim um novo ciclo.<sup>[1]</sup>



#### 4. Alimentação do parasita

As principais reacções envolvidas no metabolismo do *Plasmodium* são:

- 1) degradação da glucose do hospedeiro a lactato para fornecer energia necessária aos vários processos essenciais à sua maturação;
- 2) degradação de proteínas, processo essencial na maturação e libertação dos parasita das células que invade, bem como na invasão celular e na degradação da hemoglobina;
- 3) vários processos oxidativos, mantidos pela oxihemoglobina da célula do hospedeiro.

O *Plasmodium* tem uma capacidade limitada para a síntese de novos aminoácidos e a hemoglobina do eritrócito é a principal fonte de aminoácidos utilizada pelo parasita, sendo a degradação desta proteína essencial para a sobrevivência do *Plasmodium*.<sup>[1]</sup>

A digestão da hemoglobina no vacúolo digestivo do parasita, constitui a primeira etapa da acção deste sobre o eritrócito donde resulta a libertação dos aminoácidos, essenciais à sua nutrição, e do grupo heme livre, com o ferro no seu estado reduzido, na forma de Fe(II), que em seguida é oxidado, passando o ferro à forma férrica, Fe(III). Esta heme livre é tóxico para o *Plasmodium* visto inibir várias enzimas, nomeadamente proteases, oxidar e quebrar ligações fundamentais para a integridade membranar e produzir stress oxidativo no interior do vacúolo digestivo do parasita. Assim, para se proteger, o *Plasmodium* polimeriza o heme livre oxidado num agregado insolúvel de várias moléculas ligadas de forma não covalente ( $\beta$ -dímeros de hematina), através de ligações coordenadas entre os iões de Fe(III) e terminais carboxilados, denominado de hemozóina, ou pigmento malárico, através de uma polimerase. O heme livre na forma não oxidada não é polimerizado a hemozóina, e é um inibidor eficaz da polimerização da forma oxidada de heme livre.<sup>[1]</sup>

## 5. A doença

Como já foi referido a Malária é uma doença que pode afectar pessoas de todas as idades e que, de momento, coloca em risco cerca de metade da população mundial. É, como também já foi mencionado, a infecção dos eritrócitos por *Plasmodium*, e é transmitida pela picada de mosquitos *Anopheles* fêmea infectados. No entanto pode também ser transmitida por uma transfusão de sangue infectada ou pela partilha de seringas com pessoas infectadas.

Os primeiros sintomas aparecem normalmente entre 7 e 35 dias após a inoculação do parasita, normalmente entre 10 e 15 dias. Estes são geralmente calafrios e tremores, seguidos de febre, dores de cabeça e musculares, vómitos e mal-estar geral, sintomas estes que podem ser suaves e confundidos com os da gripe.<sup>[14]</sup>

A maior parte das manifestações clínicas da malária advêm da ruptura dos esquizontes eritrocitários, e subsequente destruição dos eritrócitos. Este fenómeno leva a que ocorra uma resposta inflamatória no hospedeiro, que produz os picos de febre alta e os arrepios característicos. Estes podem ter um padrão característico, e são denominados de paroxismos.<sup>[14]</sup>

Estes paroxismos, ou crises, caracterizam-se por 3 fases. Numa fase inicial o doente tem arrepios frios e tremores intensos, seguindo-se uma subida abrupta da temperatura corporal (acima dos 40°C), terminando numa fase de sudação intensa. Entre paroxismos o doente tem um período de exaustão e alívio, onde se sente melhor de uma forma geral, podendo adormecer profundamente.<sup>[1, 14]</sup>

Os paroxismos apresentam uma periodicidade coincidente com o tempo de maturação intra-eritrocitária do *Plasmodium*. Assim ocorrem em intervalos de 48h para o *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale*, formas de malária terciária, e de 72h para o *P. malarie*, malária quaternária. No entanto, é de notar que raramente esta periodicidade entre crises é claramente observada, visto frequentemente coexistirem gerações de parasitas diferentes no sangue do doente, com diferentes tempos de maturação e, como tal, com ruptura dos eritrócitos infectados a tempos diferentes, principalmente nas fases iniciais da infecção. Com o passar do tempo, os tempos de maturação destas gerações tendem a sincronizar-se, podendo estes períodos ser observados em infecções mais prolongadas.<sup>[1, 14]</sup>

Para o *P. falciparum* o tempo entre paroxismo, o período de alívio de sintomas sentidos pelo doente, é muito inferior, ao mesmo inexistente, relativamente ao que doentes infectados por outras espécies experimentam, visto o sincronismo entre gerações ser muito menos marcado, e assim os sintomas desenvolvem-se de forma mais gradual e prolongada. Como tal, na malária causada por este parasita, a fase febril é mais prolongada, podendo ser contínua ou flutuante, e podendo os paroxismos durar entre 20 a 36h, ao invés das 6 a 12h observadas na malária causada por outras espécies de *Plasmodium*.<sup>[1, 14, 15]</sup>

Da enorme destruição de eritrócitos pode resultar uma forte anemia, agravada pela incapacidade do organismo em reciclar o ferro sequestrado na hemozoína e numa resposta eritropoética insuficiente, e que pode interromper o fornecimento de oxigénio aos órgãos principais.<sup>[1, 14, 15]</sup>

Dependendo da espécie de *Plasmodium* a doença pode apresentar alguns padrões e sintomas característicos para cada espécie infectante, sendo a Malária causada por *P. falciparum* de longe a forma mais perigosa.

O *P. falciparum* invade eritrócitos de todas as idades, e retêm-nos no endotélio vascular evitando que estes sejam destruídos no baço, o que pode levar a bloqueios microvasculares no cérebro e em alguns órgãos. Este facto, além de contribuir para a enorme parasitémia que pode ser observada nas infecções por esta espécie, pode causar hipoglicémia, choque e falha de múltiplos órgãos. Assim é importante iniciar o tratamento deste tipo de malária dentro de 24h após os primeiros sintomas, para evitar que esta progrida para doença severa, que frequentemente é letal para cerca de 20% dos afectados.<sup>[14, 15]</sup>

A Malária severa pode apresentar uma anemia severa, stress respiratório e acidose metabólica, com envolvimento de múltiplos órgãos e podendo ocorrer uma alteração da função cerebral. Esta alteração denomina-se malária cerebral, é causada pelos bloqueios microvasculares no cérebro, e pode ter um início dramático, com convulsões generalizadas, ou gradual com dor de cabeça intensa, vertigens, delírio e confusão iniciais que podem progredir para coma profundo, que pode durar algumas horas ou alguns dias.<sup>[15]</sup>

Quando tratada rapidamente a infecção por *P. falciparum* responde em 48h, mas se o tratamento for inadequado pode ocorrer recrudescência da infecção, ou seja o reaparecimento de sintomas. <sup>[14]</sup>

Se um indivíduo não receber tratamento, os sintomas das infecções por *P. vivax*, por *P. ovale* ou por *P. malariae* regridem espontaneamente em 10 a 30 dias, mas podem recorrer com intervalos variáveis, e os sintomas são consideravelmente mais ligeiros e as crises mais curtas. <sup>[14]</sup>

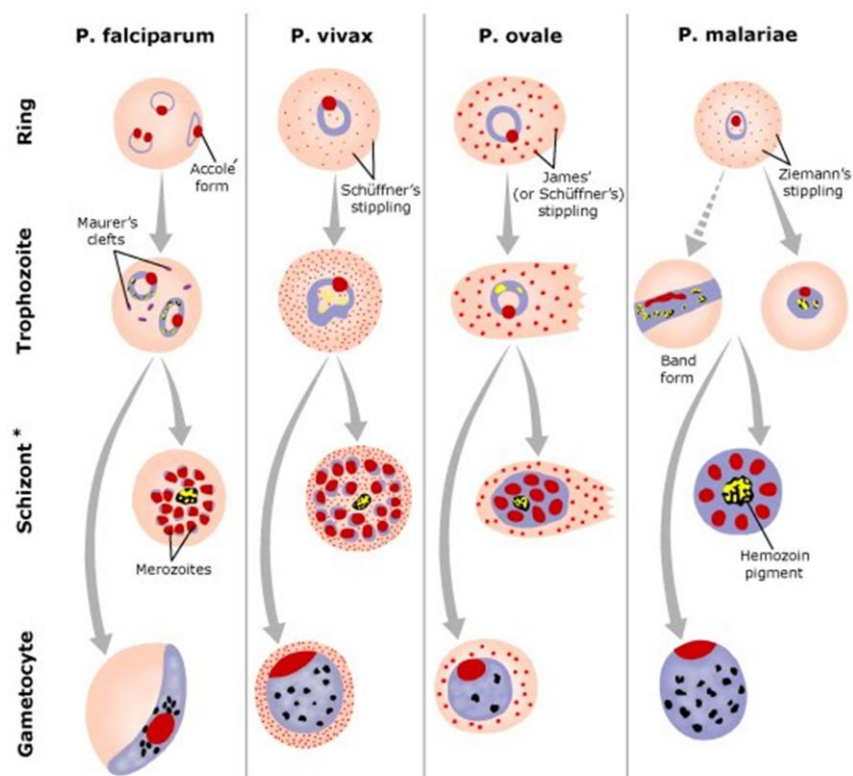
A infecção por *P. vivax* apresenta uma baixa taxa de mortalidade em adultos não tratados, sendo caracterizado por recidivas da doença causados pela reactivação das formas latentes nos hepatócitos do doente, que podem ocorrer semanas ou anos após a infecção inicial. A infecção por *P. ovale* causa também recidivas e apresenta a mesma periodicidade nas crises que *P. vivax*, mas estas são mais suaves. <sup>[14]</sup>

Por ultimo, a infecção causada por *P. malariae* causa geralmente uma infecção indolente, visto reconhecer apenas eritrócitos senescentes e manter uma parasitemia muito baixa, podendo os paroxismos ocorrer anos ou décadas depois da infecção. No entanto estes ataques não são recidivas da doença visto neste tipo de infecção não se formarem hipnozoitos nos hepatócitos dos doentes. <sup>[14]</sup>

Em geral, se a Malária não for tratada, surge icterícia ligeira e hepato e esplenomegalia, sendo frequente que a glicemia diminua nas pessoas que têm uma grande quantidade de parasitas, podendo resultar em hipoglicémia. <sup>[14]</sup>

## 6. Diagnóstico

O diagnóstico da doença é feito pela identificação do parasita em amostras de sangue do doente. Actualmente existem vários métodos para efectuar esta detecção, alguns deles bastante específicos e sensíveis como a Polimerase Chain Reaction (PCR), no entanto o método mais utilizado, e especialmente nas áreas mais afectadas pela Malária, continua a ser o desenvolvido por Romanovsky em 1891, a coloração de esfregaços sanguíneos com azul-de-metileno e eosina. Este método bastante fiável permite a observação e distinção da espécie de *Plasmodium* no interior de eritrócitos infectados recorrendo a um simples microscópio e lamelas de vidro (Fig. 5), estando a sua precisão apenas dependente da qualidade do esfregaço e da experiência do observador. Como tal, é um método de diagnóstico mais simples e muito mais barato do que o PCR, que muitas vezes não está disponível nas áreas mais afectadas pela Malária, visto estas serem as áreas menos desenvolvidas e mais pobres do nosso planeta.<sup>[1, 15]</sup>



*Figura 5* – Diferentes estágios de maturação do *Plasmodium* sp. no interior dos eritrócitos. Podem se observar as diferenças entre as espécies de *Plasmodium* para cada estadio tal como se observariam ao microscópio.<sup>[16]</sup>

## 7. Tratamentos e Profilaxia

O facto de indivíduos expostos permanentemente a *Plasmodium* apresentarem alguma imunidade à infecção no hospedeiro, nomeadamente baixos valores de parasitemia, com maior tolerância ao grau desta e atenuação dos sintomas, levou a que se desenvolvessem esforços no sentido da obtenção de uma vacina contra a Malária, no entanto o mecanismo por trás desta imunidade parcial continua um motivo de debate, sendo que esta desaparece rapidamente quando os indivíduos se deslocam para zonas sem transmissão do parasita.<sup>[17, 18]</sup>

Os esforços para desenvolver uma vacina viável e que confira total protecção à infecção por *Plasmodium* têm se debatido com o problema de o parasita alterar frequentemente as suas proteínas de superfície e em cada estágio de desenvolvimento estas serem diferentes. Os esporozoítos mudam frequentemente a sua membrana exterior substituindo-a por novas proteínas, com múltiplos epitópos, escapando assim ao sistema imunitário do hospedeiro ao criarem novos locais de ligação para os anticorpos e ao produzirem “distracções” sob a forma das moléculas descartadas. Assim, uma vacina contra merozoítos, não irá conferir protecção contra esporozoítos nem gametócitos, embora possa de certo modo diminuir a infecção de eritrócitos e assim levar à interrupção do ciclo de vida do parasita. No entanto, a imunidade obtida naturalmente é apenas parcial, pelo que existe a possibilidade de a imunidade conferida por uma vacina ser também parcial.<sup>[1, 17-19]</sup>

Desta forma, enquanto não existe uma vacina viável e eficaz, as esperanças da humanidade no combate à Malária recaem nas medidas preventivas e profiláticas, como a utilização de antimaláricos em profilaxia, não devendo os fármacos substituir as medidas simples e baratas que ajudam a prevenir a Malária, como a utilização de roupas escuras e de mangas compridas, uso de repelentes de insectos a utilização de redes contra mosquitos embebidas em insecticida sobre as camas e ao evitar a exposição a mosquitos nas alturas de maior alimentação, normalmente ao amanhecer e anoitecer.<sup>[19, 20]</sup>

O esquema terapêutico utilizado em profilaxia, para viajantes que vão para locais onde a Malária é endémica, deve ser iniciado antes da partida, para que à chegada o indivíduo tenha já em circulação quantidades suficientes de antimalárico para debelar uma possível infecção e para, na eventualidade de ocorrer intolerância aos fármacos utilizados, o regime terapêutico possa ser alterado. A terapêutica deve-se manter durante

o tempo de exposição e continuar após o regresso da zona endémica, sendo o tempo de toma pós-exposição dependente do espectro de actuação do fármaco, de forma a manter o fármaco em circulação durante o tempo em que poderia ocorrer a infecção de eritrócitos, mesmo após a saída da zona endémica e fim da exposição a mosquitos infectados.<sup>[19, 20]</sup>

Os fármacos utilizados para a profilaxia são os mesmos que os usados para o tratamento da doença, com algumas excepções de fármacos que pelas suas propriedades farmacocinéticas e toxicológicas não são apropriados para um tratamento profilático. Nenhum dos fármacos é 100% eficaz em profilaxia, sendo que alguns podem causar alguns efeitos secundários que prejudicam a aderência à terapêutica.<sup>[19, 20]</sup>

Os fármacos actualmente disponíveis para o tratamento da Malária podem ser classificados consoante a sua actividade nas diferentes fases do ciclo de vida do *Plasmodium*, mas essa é uma forma confusa visto muitas vezes o mesmo fármaco actuar em estadios diferentes de desenvolvimento do parasita, ou consoante a sua estrutura química. Assim, as principais classes de antimaláricos são as 4-aminoquinolinas, as 8-aminoquinolinas e os alcalóides da cinchona.

A cloroquina (Fig. 6) é uma 4-aminoquinolina e é o fármaco de escolha para o tratamento e profilaxia de todas as formas de Malária humana, excepto para Malária causada por *P. falciparum* resistente à cloroquina. É altamente eficaz contra as formas eritrocitárias do parasita e contra os seus gametócitos, excepto os de *P.*

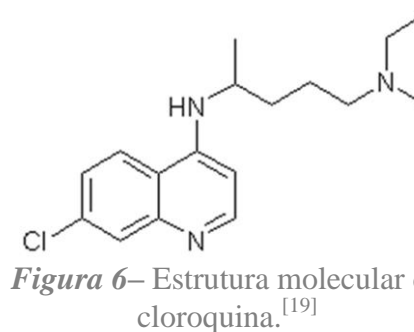


Figura 6– Estrutura molecular da cloroquina.<sup>[19]</sup>

*falciparum*, e não tem qualquer actividade contra as formas hepáticas do parasita. Foi o primeiro fármaco de síntese para o tratamento da Malária, tendo a sua síntese sido estimulada pela captura dos campos de produção de quinina americanos no Pacífico pelos japoneses, na segunda Guerra Mundial, deixando estes sem forma de responder às necessidades das suas tropas infectadas na Africa e Ásia, pois não possuíam árvores de Cinchona de onde extrair o fármaco.<sup>[19]</sup>

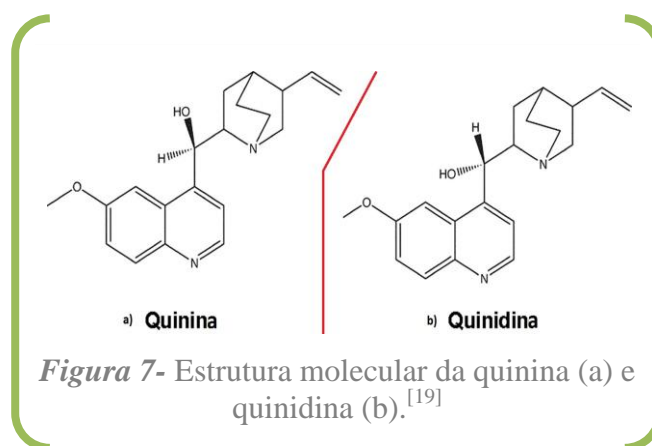
O seu mecanismo de actuação parece ser a interferência no metabolismo da hemoglobina no parasita. A cloroquina acumula-se no vacúolo alimentar e lisosomas (meios acídicos) dos parasitas susceptíveis onde se liga ao heme, inibindo a actividade das heme-polimerases do parasita, e levando à acumulação de heme livre no seu

interior, o que é tóxico para o parasita causando-lhe danos por processos oxidativos nas membranas, proteases digestivas e outras biomoléculas essenciais. A cloroquina pode também causar a fragmentação de RNA do parasita e intercalar com o seu ADN, inibindo assim a sua replicação.<sup>[19]</sup>

Outros fármacos cujo mecanismo de actuação é bastante semelhante ao da cloroquina são a hidroxicloroquina e outras quinolinas como amodiaquina, mefloquina, halofantrina, quinina e quinidina.<sup>[19]</sup>

A cloroquina é um fármaco barato, com um tempo de semi-vida de 30-60 dias e extraordinariamente seguro, quando tomado nas doses apropriadas devido a uma estreita margem terapêutica, no entanto a sua utilidade tem declinado devido ao aparecimento de estirpes de *P. falciparum* resistentes a este fármaco. Esta resistência parece estar relacionada com um aumento da excreção do fármaco do interior para o exterior do parasita.<sup>[19]</sup>

A quinina (Fig. 7a) é um alcalóide e o princípio activo do extracto da árvore da cinchona utilizado à mais de 350 anos. Este fármaco actua principalmente contra as formas eritrocitárias assexuadas do *Plasmodium* e gametocitos de *P. vivax* e *P.*



*malariae*, tendo pouco efeito nas formas hepáticas do parasita. É mais tóxico e menos eficaz que a cloroquina contra parasitas susceptíveis aos dois fármacos, mas é muito útil devido a permitir um tratamento parentérico nas formas severas da doença, principalmente às causadas por estirpes multi-resistentes de *P. falciparum*, sendo a primeira escolha nestes casos como dose de carga, para subsequente tratamento oral, assim que o mesmo seja tolerado, visto a maior parte dos outros antimaláricos quando formulados para administração parenteral poderem causar reacções locais severas.<sup>[19]</sup> Assim, apenas a cloroquina e a quinina podem ser administradas por via parentérica. E a eficácia da terapêutica com quinina pode ser reforçada pela associação com a doxiciclina.<sup>[22]</sup>

O seu estéreo-isomero quinidina (Fig. 7b) é igualmente útil nestes casos, e embora seja um pouco mais potente é também mais tóxico que a quinina. Devido ao seu tempo de semi-vida reduzido (11h após toma oral) e à sua toxicidade estes fármacos não



são utilizados em profilaxia. A sua toxicidade é dose-dependente, está associada a cinchonismo, hipoglicemia e hipotensão, e o tratamento deve ser descontinuado imediatamente se surgirem sinais de hemólise. No entanto, a quinina, parece ser relativamente segura em mulheres grávidas, sendo usada frequentemente nestas situações.<sup>[19]</sup> Estes fármacos são de uso restrito ao meio hospitalar em Portugal.<sup>[21, 22]</sup>

A mefloquina é uma 4-aminoquinolina, constituída por quatro isómeros ópticos com aproximadamente a mesma potência antimalárica. É um esquisontisida sanguíneo altamente eficaz, sem qualquer actividade contra as formas hepáticas do parasita e gametocitos maduros de *P. falciparum*, mas que pode ter alguma actividade contra esporozoítos. O seu mecanismo de actuação exacto é desconhecido mas pode ser similar ao

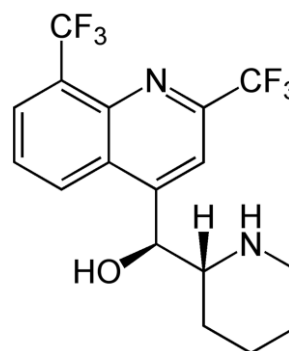


Figura 8 – Estrutura molecular de um dos isómeros da

da cloroquina, tendo também surgido resistência a este fármaco em certas estirpes de *P. falciparum*. É utilizada na prevenção e tratamento de malária causada por *P. falciparum* resistente à cloroquina e *P. vivax*, sendo principalmente útil como agente profilático para viajantes não imunes, que vão para zonas endémicas destes parasitas por breves períodos, pois tem um tempo de semi-vida de cerca de 20 dias. As doses profiláticas são muito bem toleradas, podendo ocorrer vómitos nas doses de tratamento, estando o fármaco contra-indicado na gravidez e aleitamento.<sup>[19]</sup>

A primaquina (Fig. 9) é uma 8-aminoquinolina com actividade antimalárica nas formas hepáticas, primárias e latentes, do *Plasmodium*, prevenindo e curando as recidivas de Malária provocados por *P. vivax* e *P. ovale*, mas não trata os ataques de Malária embora tenha alguma actividade contra as formas eritrocitárias. A primaquina possui actividade também nos gametocitos das 4 espécies de *Plasmodium*, e especialmente em *P. falciparum*. É utilizada principalmente na profilaxia terminal e cura radical de *P. vivax* e *P. malariae*, normalmente em conjunto com um esquisonticida sanguíneo, como a cloroquina, para erradicar as formas eritrocitárias e evitar o aparecimento de resistências ao fármaco. A primaquina é também utilizada na profilaxia de *P. falciparum* e, principalmente, *P.vivax*.<sup>[19]</sup>

O seu mecanismo de actuação parece estar relacionado com interferências na mitocôndria do parasita, interferindo com o transporte de electrões, além de originar espécies reactivas de oxigénio. A primaquina está contra-indicada em pessoas com deficiência congénita em glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), também conhecido como favismo. As hemácias dos pacientes

deficientes em G6PD não conseguem regenerar NADPH, cuja concentração é reduzida pelos metabolitos oxidantes da primaquina e de outros fármacos. Em consequência disto, as funções metabólicas gerais das hemácias alteram-se e ocorre hemólise fulminante e anemia hemolítica, muitas vezes fatal. Em pessoas saudáveis a primaquina é relativamente inócua no que respeita a toxicidade e efeitos secundários, podendo causar alguns distúrbios gastrointestinais. Não deve ser utilizada por grávidas nem por mulheres que estejam a amamentar crianças que não foram testadas para a deficiência em G6PD.<sup>[19]</sup>

Algumas estirpes de *P. vivax* exibem resistência parcial à primaquina pelo que é fundamental a estreita aderência à terapêutica com este fármaco, assim como o desenvolvimento de novos antimaláricos com actividade nas formas hepáticas do parasita.<sup>[19]</sup>

Para além dos fármacos acima referidos existem outros antimaláricos frequentemente usados. A combinação de atovaquona e proguanilo, utilizada na profilaxia e tratamento de *P. falciparum* resistente a outros fármacos, associa um composto que interfere com a função mitocondrial inibindo o transporte de electrões e colapsando o seu potencial de membrana, a atovaquona, e uma biguanida, o proguanilo, que parece aumentar a capacidade da atovaquona de colapsar a membrana mitocondrial, e ao mesmo tempo retarda o aparecimento de resistência a estes fármacos, com uma toxicidade e efeitos secundários mínimos. Esta combinação é activa contra as formas assexuadas eritrocitárias e hepáticas primárias do parasita. No entanto, está contra indicada em grávidas e mulheres a amamentar crianças com menos de 5kg, e a falha terapêutica com organismos resistentes a estes fármacos já foi documentada.<sup>[19]</sup>

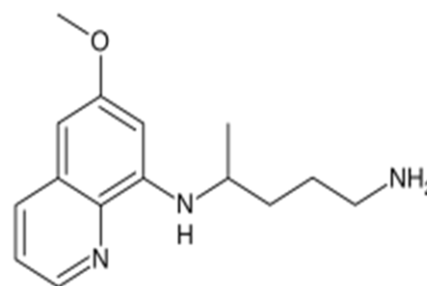


Figura 9 – Estrutura molecular da primaquina.<sup>[19]</sup>

O uso concomitante de pirimetamina e sulfadoxina foi também bastante utilizado para o tratamento de Malária causada por estirpes de *P. falciparum* resistentes à cloroquina, mas não para a sua profilaxia devido a riscos associados à toxicidade das sulfonamidas e sulfonas, que podem causar reacções cutâneas severas e fatais. No entanto, a sua utilidade no tratamento de Malária diminuiu devido à enorme distribuição de estirpes de *P. falciparum* resistentes a estes fármacos. Estes fármacos têm uma actividade sinérgica inibindo a síntese de folatos, e assim a síntese de ADN, em dois pontos do metabolismo dos folatos: as sulfonamidas e sulfonas inibem a di-hidropteroato sintase e a pirimetamina a di-hidrofolato reductase do *Plasmodium*.<sup>[19]</sup>

As tetraciclinas, um conhecido grupo de antibióticos, são também utilizadas no tratamento e profilaxia da Malária, principalmente a doxiciclina. São esquisonticidas sanguíneos de actuação lenta, tal como as sulfonamidas e sulfonas, com actividade contra as formas hepáticas primárias de *P. falciparum* resistente à cloroquina, e são usadas em profilaxia em áreas com resistência a cloroquina e mefloquina. São muito úteis no tratamento de ataques de Malária por estirpes de *P. falciparum* multi-resistentes com alguma resistência à quinina, sendo utilizadas concomitantemente com a quinina ou quinidina. Estão contra-indicadas em grávidas e crianças com menos de 8 anos devido aos seus efeitos adversos nos ossos e dentes, e causam fotosensibilidade.<sup>[19]</sup>

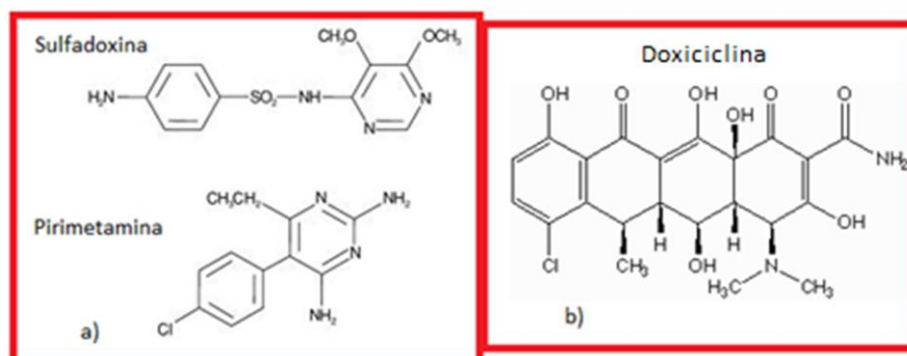


Figura 10 – Estrutura molecular da pirimetamina e sulfadoxina (a) e da doxiciclina (b).<sup>[19]</sup>

A maior problemática associada ao tratamento com antimaláricos é o crescente aparecimento e disseminação de estirpes resistentes de *Plasmodium*, principalmente de *P. falciparum*, que vão consumindo o arsenal de fármacos disponíveis para o tratamento desta doença, de uma forma muito mais rápida do que o aparecimento de novas alternativas farmacológicas viáveis para o tratamento da Malária. A resistência às terapêuticas mais efectivas, seguras e baratas, especialmente à cloroquina mas também à mefloquina e pirimetamina-sulfadoxina, é o factor mais preocupante.

Estudos genéticos a isolados de *P.falciparum* de doentes em áreas altamente afectadas pela Malária mostraram que estes continham clones do parasita com diferentes fenótipos relativamente à resistência a fármacos. Assim, sabendo que num doente com Malária severa se podem encontrar mais de  $10^{12}$  parasitas, torna-se fácil de perceber como parasitas com resistência ao fármaco possam ser seleccionados, e levar ao aparecimento de mutações que confirmam resistência aos fármacos utilizados, especialmente nas terapêuticas que utilizem fármacos com elevados tempos de semi-vida em monoterapia.<sup>[1, 19]</sup>

Se não fosse a descoberta da quinina no século XVII que formas teríamos hoje de combater a Malária? Esta é uma questão interessante visto muitos dos fármacos utilizados actualmente, como as aminoquinolinas, serem derivados estruturais completamente sintéticos deste composto, tendo sido desenhados e optimizados, em termos de actividade e perfil toxicológico, com base na quinina. Da mesma forma, podemos olhar para uma descoberta feita na década de 1970, e ter alguma esperança no futuro do combate à Malária. Esta descoberta foi a identificação do princípio activo do extracto de *Artemisia annua*, utilizado na medicina tradicional chinesa desde a antiguidade para tratar febres, e permitiu a exploração de uma nova classe de antimaláricos com um mecanismo de actuação completamente diferente do dos fármacos até então utilizados no tratamento da Malária: os endoperóxidos antimaláricos.

## 8. Endoperóxidos antimaláricos

### 8.1. Artemisinina e derivados semi-sintéticos

A artemisinina, ou qinghaosu, é o princípio activo do extracto de *Artemisia annua* utilizado em infusões há mais de 2000 anos pelos chineses para tratar febres. No entanto apenas na década de 70 é que este composto foi identificado, isolado e a sua estrutura molecular esclarecida por um grupo de investigação chinês, no âmbito de um programa governamental denominado Projecto 523. [19, 23, 24]

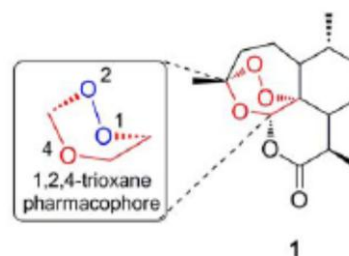


Figura 11 - Estrutura da artemisinina, e destaque do farmacóforo da molécula. [24]

A artemisinina é uma lactona sesquiterpénica com um grupo funcional endoperóxido, do tipo trioxano (Fig. 11). Esta estrutura, quando foi proposta, deparou-se com um enorme cepticismo por parte da comunidade científica visto o grupo endoperóxido ser à primeira vista demasiado reactivo e, como tal, a molécula demasiado instável para ser utilizada como fármaco. Estudos posteriores demonstraram que esta molécula era no entanto bastante estável em condições fisiológicas e que o composto apresentava uma extraordinária actividade antimalárica, sendo muito mais rápido a eliminar o parasita que os fármacos tradicionalmente utilizados, podendo atingir níveis de parasitémia abaixo do detectável em um ou dois dias de tratamento na maioria dos pacientes. [26, 37]

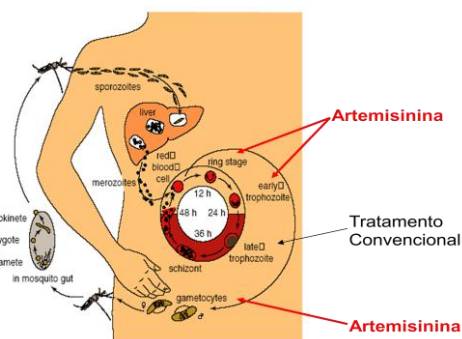


Figura 12 – Estádios de actuação da artemisinina e dos tratamentos convencionais no ciclo de vida do *Plasmodium sp.* [33]

Este composto exhibe uma rápida actividade contra as formas eritrocitárias do *Plasmodium* e apresenta também actividade contra os gametócitos do parasita, no entanto não afecta as formas hepatocíticas do parasita, quer as primárias quer as latentes (Fig. 12). Apesar de um início de actividade bastante rápido, em parte devido ao carácter anfifílico da molécula o que facilita a sua permeabilidade pelas membranas celulares,

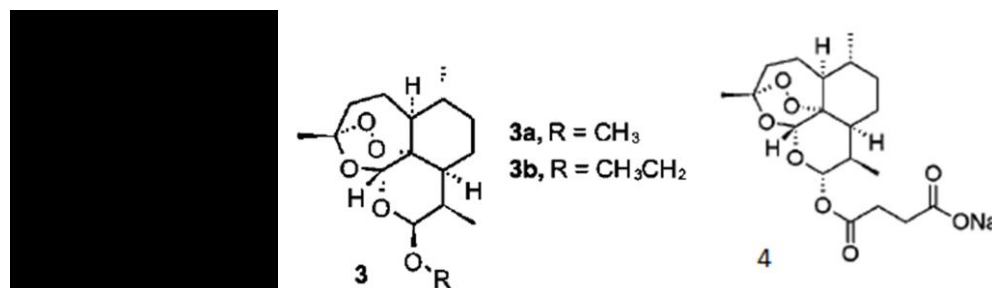
apresenta um tempo de semi-vida bastante curto, na ordem das 2-5 horas. Este tempo de semi-vida reduzido deve-se ao facto de induzir o seu próprio metabolismo, o que leva a que a sua *clearance* possa ser aumentada em mais de cinco vezes com as sucessivas administrações.<sup>[19, 23, 34, 37]</sup>

O facto de a artemisinina ser eliminada rapidamente do organismo contribui não só para que não apresente efeitos adversos graves, mas também para os altos índices de recrudescência do parasita após o tratamento inicial com artemisinina em monoterapia. Além disso, o seu rápido efeito e rápida eliminação contribuem para que seja mais difícil ao parasita desenvolver resistências a este fármaco. No entanto em algumas zonas do mundo, onde alguns derivados da artemisinina foram utilizados em automedicação de forma ilegal e sem qualquer controlo, como a Guiana Francesa e o Senegal, surgiram algumas evidências de resistência *in vitro*.<sup>[36]</sup>

A artemisinina tem pouca biodisponibilidade quando administrada oralmente e é pouco solúvel em água. É administrada na forma de suspensão aquosa ou oleosa e apresenta maior biodisponibilidade quando administrada por via intramuscular como suspensão oleosa, do que por via oral em água.<sup>[19, 23]</sup>

Os seus metabolitos, isolados após administração oral, não só não apresentam o grupo endoperóxido como também não tem qualquer actividade antimalárica. Este facto levou a que se concluísse que o grupo endoperóxido seria parte fundamental do farmacóforo da molécula.<sup>[23]</sup>

De forma a melhorar alguns aspectos relacionados com a biodisponibilidade do fármaco, foram desenvolvidos alguns derivados semi-sintéticos da artemisinina de modo a permitir a administração por vias alternativas à oral e assim aumentar a sua biodisponibilidade.



**Figura 13** - Derivados semi-sintéticos de 1<sup>a</sup> geração da artemisinina. DHA (2), arteméter (3a), artéter (3b) e artesunato de sódio (4).<sup>[23]</sup>

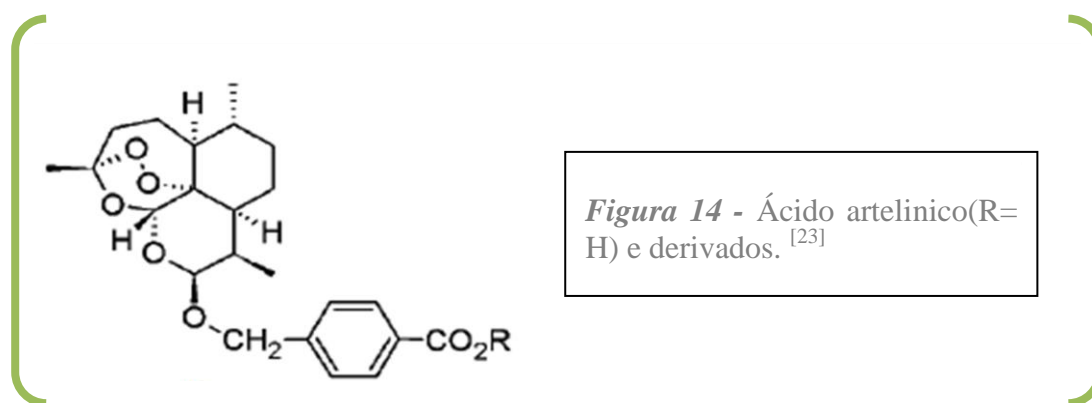
Os primeiros derivados semi-sintéticos incluem a dihidroartemisinina (DHA), obtido da redução da artemisinina; o artemeter e arteter, derivados lipofílico; e o artesunato, um derivado solúvel em água (Fig. 13).

O DHA é um lactol facilmente obtido da artemisinina por redução com tetra-hidrobórato de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) e tem uma actividade duas vezes mais potente que a artemisinina. No entanto, apresenta um grau de neurotoxicidade relativamente elevado e partilha da mesma pobre biodisponibilidade por via oral e a elevada taxa de recrudescência do parasita que a artemisinina.<sup>[19, 23]</sup>

O artemeter e o arteter são éteres  $\beta$ -alquilados do DHA, desenvolvidos para aumentar a solubilidade lipídica, perfil farmacocinético e actividade antimalárica da artemisinina e do DHA. No entanto, visto serem metabolizados a DHA, apresentam neurotoxicidade significativa principalmente a doses elevadas, doses essas superiores ao recomendado. Actualmente o artemeter é o derivado mais utilizado da artemisinina, sendo administrado por via intramuscular sob a forma de uma solução oleosa.<sup>[19, 23]</sup>

De forma a permitir uma administração intravenosa foram também sintetizados derivados solúveis em água, mais polares, sendo os mais importantes o artesunato de sódio e o ácido artelinico (Fig. 14). O facto de serem administrados por via intravenosa permite uma actuação muito mais rápida e mais eficiente, visto ser ultrapassado o passo de absorção do fármaco.<sup>[19, 23]</sup>

O artesunato é um éster do DHA e é rapidamente hidrolisado a este composto, sendo por isso de preparação extemporânea e administrado em dextrose ou soro fisiológico. Este composto diminui rapidamente a parasitémia e é muito eficaz a restabelecer a consciência a doentes em coma por malária cerebral. No entanto apresenta também elevados índices de recrudescência quando usado em monoterapia.<sup>[19, 23]</sup>



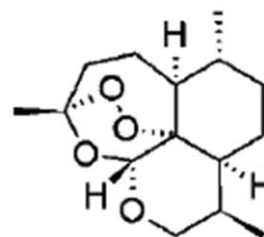
O ácido artelinico é um éter do DHA mais estável que o artesunato. Apresenta maior tempo de semi-vida plasmática, maiores concentrações plasmáticas e menor toxicidade que todos os derivados semi-sintéticos de primeira geração da artemisinina, mas menor potencia antiparasitária.<sup>[23]</sup>

O facto de todos estes derivados de primeira geração continuarem a apresentar como desvantagem o tempo de semi-vida plasmático reduzido e toxicidade ao nível do sistema nervoso central, levou a que a partir do composto mais promissor desta geração de derivados semi-sintéticos, o ácido artelinico, se tentasse ultrapassar estas desvantagens.<sup>[23]</sup>

Esta nova estratégia procurou melhorar a molécula de ácido artelinico no sentido em que se concluiu que os seus parâmetros farmacocinéticos superiores aos dos outros derivados advinham de efeitos electrónicos, lipofilicidade e factores estéricos e quirais. Estas alterações permitiriam às moléculas não só evitar ou retardar a sua metabolização pelas enzimas microssomais, evitando a formação de DHA e dos seus efeitos neurotóxicos, como as tornou mais estáveis em condições fisiológicas e aumentou a sua actividade.<sup>[23]</sup>

A deoxoartemisinina (Fig. 15), um derivado da artemisinina sem o grupo carbonilo, encorajou a síntese de novos derivados sem o grupo carbonilo devido à sua superior actividade antiparasítica. Os compostos obtidos apresentam elevada actividade o que demonstrou que a remoção do grupo carbonilo da lactona permite um excelente aumento da potência dos fármacos.

Ésteres e éteres mais lipofílicos foram também sintetizados, mas verificou-se que o potencial neurotóxico dos compostos aumentava com a sua lipofilicidade, provavelmente por facilitar a passagem através da barreira hemato-encefálica destas pequenas moléculas. Foram também sintetizados derivados diméricos da artemisinina (Fig. 16), que apresentavam maior estabilidade que esta e ao mesmo tempo mantinham muito boa actividade.<sup>[23]</sup>



*Figura 15* – Deoxoartemisinina.  
<sup>[23]</sup>



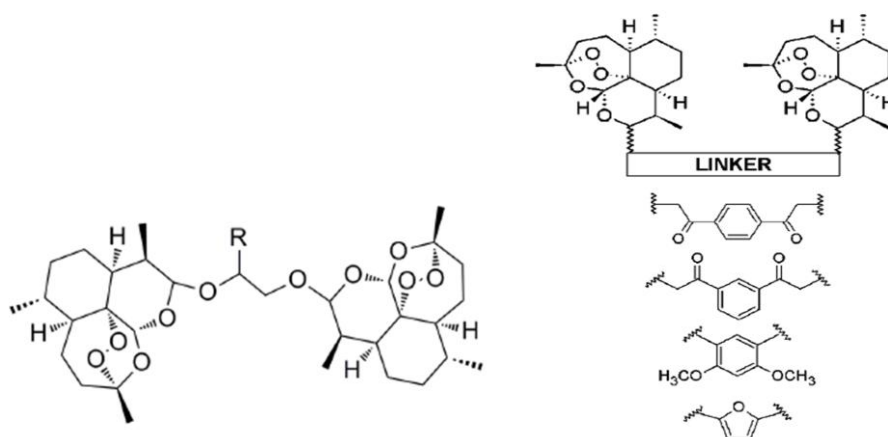


Figura 16 – Dimeros da artemisinina. [23, 24]

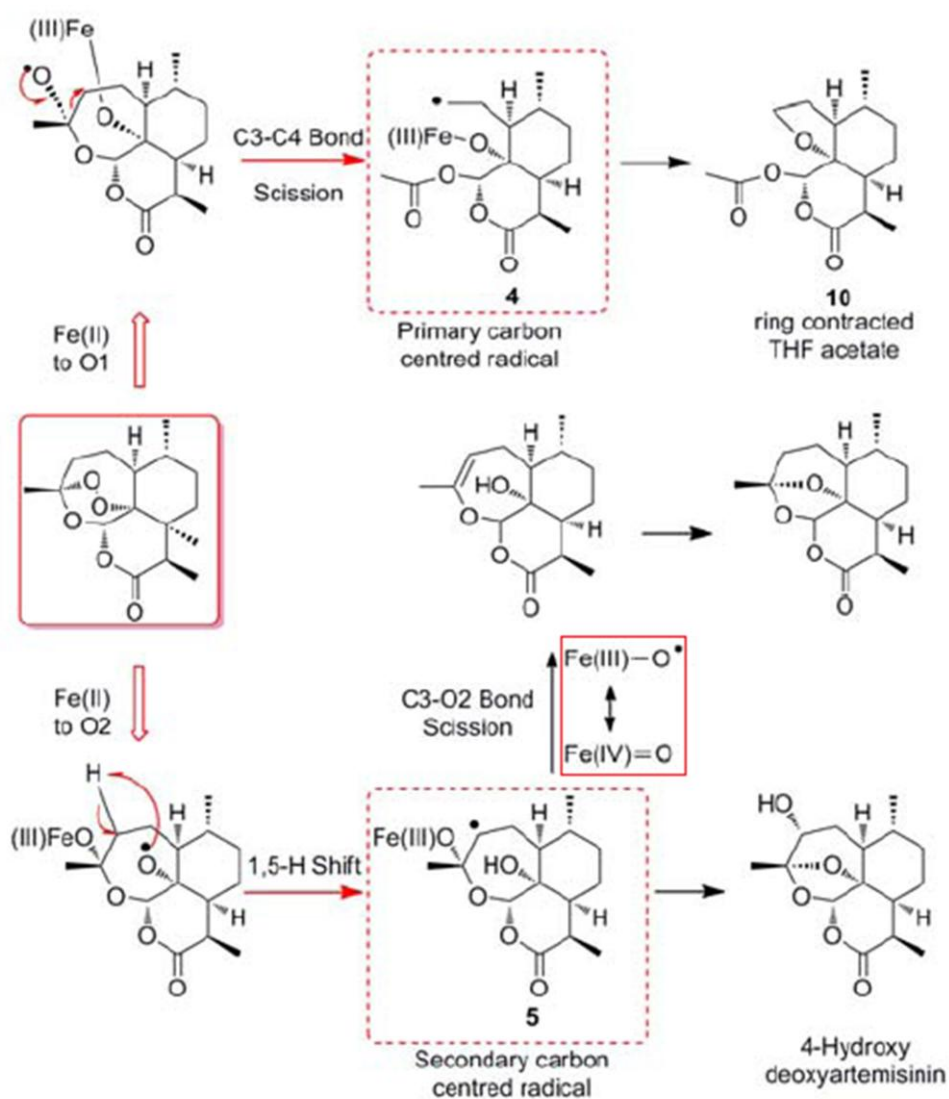
Tal como a artemisinina, todos os compostos referidos, assim como todos os compostos que apresentam uma função endoperóxido necessitam de bioactivação para exercerem o seu potencial antiparasítico. Esta proposição é consensual no entanto o seu desenvolvimento mecanístico e intermediários envolvidos após activação não o são. [23, 24]

Assim, de uma forma geral assume-se que os peróxidos antimaláricos após entrarem no parasita interagem com ferro (II) que catalisa a quebra da ligação peróxido. A fonte de ferro é no entanto um dos tópicos de discussão: ferro na forma livre ou ferro do grupo heme. [23, 24, 35]

No vacúolo alimentar do parasita, tal como já foi referido, ocorre a degradação da hemoglobina dos eritrócitos invadidos. Esta degradação leva à libertação de aminoácidos e do grupo heme da proteína. O grupo heme livre pode então interagir livremente com o endoperóxido através do seu ião de ferro, na forma reduzida. [23, 24]

Paralelamente no interior do vacúolo alimentar e no citosol do parasita existe em equilíbrio ferro intracelular na forma ferrosa e férrica, sendo esta forma reduzida do ião que poderá interagir com os átomos de oxigénio da ligação peróxido. Assim, a existência de duas possíveis fontes de ferro para activar o fármaco levou a que se realizassem várias experiências no sentido de esclarecer qual a verdadeira fonte de ferro, ou eventualmente, se estes peróxidos seriam activados pelas duas formas de ferro. Estes estudos mostraram que embora as moléculas possam ser activadas por qualquer uma das duas fontes, são-no mais rápida e eficazmente pelo ferro do grupo heme. [25]

Além do mais estes estudos demonstraram também que os peróxidos antimaláricos são bastante estáveis na presença de hemoglobina, nomeadamente oxiemoglobina, e assim a reacção com o heme livre pode explicar a sua especificidade selectiva por eritrócitos infectados. Além do mais, a incubação de endoperóxidos antimaláricos com enzimas CYP, que contêm o cofactor heme, não resulta em quebra da ligação peróxido. <sup>[23, 26]</sup>

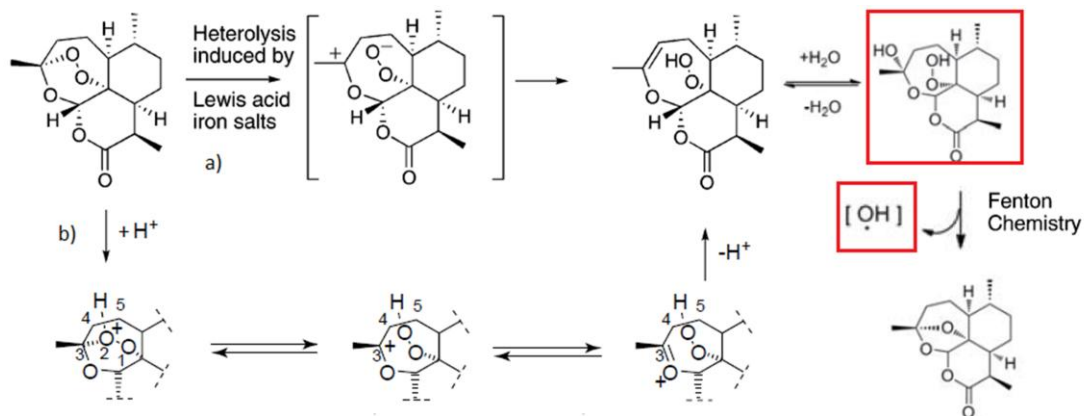


*Figura 17* – Mecanismo proposto para a cisão reductiva da ligação peróxido da artemisinina e subsequente rearranjo dos radicais formados. <sup>[24]</sup>

O modelo mecanístico de bioactivação geralmente proposto é o modelo da cisão redutiva. Neste modelo (Fig. 17), a bioactivação inicia-se com a clivagem homolítica da ligação peróxido catalisada pelo ferro na forma reduzida. O ferro liga-se à artemisinina, transferindo para esta um electrão. Esta transferência induz a clivagem homolítica da ligação e origina radicais centrados nos átomos de oxigénio (radicais alcóxilo), que posteriormente rearranjam intramolecularmente de forma a originar radicais centrados nos átomos de carbono, desimpedidos estericamente. Estes radicais podem ser centrados num átomo de carbono primário ou secundário, devido à natureza assimétrica da ligação peróxidica. [23, 24, 27, 28]

Todos os radicais formados, centrados em átomos de oxigénio ou em carbonos primários ou secundários, são espécies extremamente reactivas que podem alquilar biomoléculas, ou originar espécies reactivas de oxigénio e assim causar stress oxidativo, nomeadamente Fe(IV)=O. Na ausência de um possível alvo de alquilação estes radicais rearranjam em moléculas neutras. [23, 24, 27, 28]

Visto os radicais serem espécies muito reactivas, alguns autores afirmam que têm um tempo de semi-vida demasiado curto para terem alguma interacção intermolecular. Como tal, propuseram um modelo mecanístico alternativo ao modelo da cisão redutiva: o modelo do peróxido aberto (Fig. 18). Este modelo foi também proposto tendo em conta uma fonte de ferro não ligada à hemoglobina. Assim, neste modelo, a clivagem da ligação peróxido advém de protonação da ligação ou complexação com Fe<sup>2+</sup>, ou um outro ácido de Lewis, ocorrendo uma bioactivação iónica e não radicalar dos endoperóxidos. A quebra da ponte peróxido não é homolítica ocorrendo a formação de um carbocatião terciário, estabilizado pela sua ligação ao átomo de oxigénio que não faz parte da ligação peróxido. Esta ligação estabiliza a carga positiva do carbocatião e facilita a abertura do anel. Em seguida uma molécula de água pode reagir com o carbocatião, e através da abertura do anel, forma-se um hidroperóxido insaturado. Esta espécie é por si só bastante reactiva, podendo modificar resíduos de proteínas por oxidação directa. Através de uma posterior redução de Fenton é formado um radical hidróxilo, uma espécie reactiva de oxigénio que pode oxidar resíduos de aminoácidos. [24, 27-29]



**Figura 18** – Mecanismo proposto para o modelo do peróxido aberto. a) bioactivação por um ácido de Lewis e b) bioactivação por protonação. <sup>[27, 28]</sup>

Este modelo alternativo tem o potencial de permitir a formação de várias espécies reactivas de oxigénio, e como tal causar stress oxidativo, o que pode ter implicações na actividade antimalárica destes compostos.

As espécies reactivas formadas pela bioactivação da artemisinina e seus derivados vão depois reagir com moléculas do parasita e eventualmente conduzir à sua destruição. Alguns dos alvos moleculares propostos incluem o próprio heme, proteínas e membranas do parasita, assim como possivelmente da sua mitocondria. <sup>[23, 24]</sup>

A alquilação do heme foi um dos primeiros alvos moleculares da artemisinina e derivados a ser proposto. Com a alquilação do heme o parasita seria, em teoria, incapaz de oxidar a hematina e assim o polimerizar em moléculas de hemozoina. Como tal, o heme permaneceria livre e seria acumulado no vacúolo alimentar do parasita. Como já foi referido, o heme livre é tóxico para o *Plasmodium*, visto ser uma molécula com o potencial de originar espécies reactivas de oxigénio e assim causar stress oxidativo ao parasita. Aductos de heme e artemisinina foram identificados por espectrometria de massa, o que sustenta esta teoria como um dos mecanismos de acção dos endoperóxidos antimaláricos. <sup>[23, 24]</sup>

Para além da alquilação do heme foi também proposto a alquilação de proteínas do parasita, visto a actividade da artemisinina ser influenciada por aspectos estéricos. Assim, a alquilação de proteínas essenciais para o Plasmodium, nomeadamente as envolvidas na degradação de hemoglobina, levaria à destruição do parasita por carência de aminoácidos. Esta teoria tem sido confirmada por identificação de aductos de artemisinina com proteases cisteinicas, o que também tem sugerido que a alquilação de resíduos de cisteína pode estar envolvida no mecanismo de acção ao interferir com a

função da proteína, nomeadamente as falcipains, uma família de proteases cisteínicas envolvidas na degradação da hemoglobina.<sup>[24]</sup>

Especificamente, a inibição da actividade de uma ATPase transportadora de cálcio, denominado *PfATP6*, e existente no retículo endoplasmático do parasita, é também um dos mecanismos de actuação da artemisinina, após bioactivação, ao perturbar a homeostasia de cálcio no interior do parasita. Esta inibição leva a que o parasita não consiga reduzir a concentração de cálcio livre no seu citosol, visto esta proteína concentrar esse cálcio livre em estruturas ligadas à membrana, o que leva à destruição do parasita.<sup>[23, 24]</sup>

Outro dos mecanismos propostos para a actuação da artemisinina e derivados envolve a formação de espécies reactivas de oxigénio e concomitante stress oxidativo. Desta forma um dos alvos moleculares dos endoperóxidos antimaláricos são as membranas do parasita. Foi demonstrado que a artemisinina acumula em lipídios neutros e causa danos nas membranas do parasita, nomeadamente, causa a ruptura da membrana do vacúolo digestivo, enquanto outros endoperóxidos podem também causar acumulação de vesículas endocíticas, e os tetraoxanos parecem causar degradação oxidativa de fosfolípidos. Para além disso a perda da função da mitocôndria do parasita pode também ocorrer, no entanto este não parece ser um dos alvos iniciais de actuação dos endoperóxidos antimaláricos.<sup>[24]</sup>

Embora não se consiga estabelecer uma ligação directa entre um dos alvos moleculares e a morte do parasita, parece aparente a complexidade e multiplicidade dos mecanismos de acção e seus alvos moleculares envolvidos na actuação da artemisinina e derivados.

Devido à rápida eliminação da artemisinina e derivados estes compostos não são adequados para a quimioprofilaxia da Malária. A sua utilização implicaria um número elevado de administrações e um eventual aumento da dosagem devido à indução da sua própria metabolização por parte dos fármacos, de modo a permanecerem em circulação quantidades suficientes de fármaco para exercer actividade antimalárica, e assim fornecer alguma protecção contra a infecção.

Do mesmo modo, quando utilizados em monoterapia estes compostos apresentam o mesmo problema. Como os fármacos são rapidamente eliminados, necessitam de administrações frequentes para manter níveis terapêuticos. Para que se atinjam rácios de cura elevados, sem risco de recrudescências, é necessário que o composto antimalárico permaneça em circulação durante pelo menos 4 ciclos de vida do

parasita, ou seja, durante pelo menos 8 dias. <sup>[15]</sup> Isto implicaria um número excessivamente elevado de administrações durante um período de tempo consideravelmente longo, o que levaria a uma provável fraca adesão à terapêutica e, conseqüentemente, maior número de falhas terapêuticas assim como poderia, eventualmente, facilitar o desenvolvimento de resistência por parte do parasita a estes compostos, além de potenciar a toxicidade ao nível do sistema nervoso central destes compostos. <sup>[30, 37]</sup>

De forma a contornar estes problemas desenvolveram-se as denominadas terapêuticas combinadas com artemisinina, que envolvem a utilização de derivados da artemisinina em combinação com antimaláricos de outras classes, como as aminoquinolinas, com tempos de semi-vida muito maiores que os da artemisinina e derivados. Assim, com estas estratégias pretende-se uma rápida diminuição da parasitemia, o que é conseguido pela utilização de artemisinina ou derivados, e evitar a recrudescência da infecção pela presença de antimaláricos em circulação durante mais tempo, o que permite manter a actividade durante o tempo necessário, sem implicar um número exagerado de administrações. <sup>[30, 37]</sup>

Actualmente a Organização Mundial de Saúde recomenda as seguintes combinações:

**Tabela 1** – Terapêuticas Combinadas de Artemisinina. <sup>[30]</sup>

Terapêutica Combinada de Artemisinina (ACT)	Observações
1) Arteméter e lumefantrina	
2) Artesunato e amodiaquina	Em áreas onde o rácio de cura por monoterapia com amodiaquina é >80%
3) Artesunato e mefloquina	Não existem dados de segurança suficientes para recomendar o seu uso em África
4) Artesunato e sulfadoxina + pirimetamina	Em áreas onde o rácio de cura com sulfadoxina e pirimetamina é >80%

Esta estratégia permite a obtenção de curas completas em pessoas infectadas mais rapidamente, sem a ocorrência de recrudescências, e com maior aderência por parte dos doentes, assim como retarda o possível aparecimento de resistências por parte do *Plasmodium* aos fármacos utilizados. <sup>[30]</sup>

Têm surgido um crescente número de relatórios de falhas terapêuticas de terapias de combinação com artemisinina na fronteira entre a Tailândia e o Camboja, tendo-se inclusivamente confirmado a presença de *P. falciparum* resistente ao artesunato nesta área em 2008. Esta área fronteiriça, assim como outras ao longo do rio Mekong, têm sido o epicentro do aparecimento de resistência a outros fármacos antimaláricos tal como a cloroquina e mefloquina, e teme-se agora que estas estirpes de *Plasmodium* resistentes à artemisinina e seus derivados, possam disseminar-se a outras áreas do globo, tal como sucedeu com outros fármacos. [24, 31, 32]

Para além da possível disseminação de resistência a estes compostos promissores, outros problemas têm surgido, como a escassez de *Artemisia annua* e o crescente preço da artemisinina, assim como o baixo rácio de extracção desta das folhas de *Artemisia annua* (menos de 1% do peso seco). Associados a estas dificuldades, a já referida fraca biodisponibilidade oral, toxicidade e fraco perfil farmacocinético, conduziram a comunidade científica na busca de derivados mais baratos e com melhores perfis farmacoterapêuticos.

### 8.2. 1,2,4-Trioxanos sintéticos

Os trioxanos são compostos com uma estrutura molecular muito mais simples que a artemisinina (Fig. 19). A observação de que o farmacóforo da molécula é a ponte endoperóxido e o entendimento de que o átomo de oxigénio adjacente facilitaria a formação dos derivados envolvidos no mecanismo de acção da artemisinina, levou a que se preparassem derivados sintéticos com estrutura 1,2,4-trioxano, semelhante mas muito mais simples, de forma a elucidar os requisitos estruturais para a actividade antimalárica dos endoperóxidos, e dar indicações sobre a forma de a potenciar. Estes estudos mostraram que esses derivados mantinham uma elevada actividade antimalárica, mesmo sem as outras características estruturais da artemisinina, como o anel lactona, demonstrando assim que estas seriam de somenos importância para a actividade antimalárica do composto, e confirmaram a importância da estrutura 1,2,4-trioxano. [23]

Com o estudo destas estruturas simples foi demonstrada também a relevância que algumas pequenas alterações estruturais e estéricas tinham na actividade

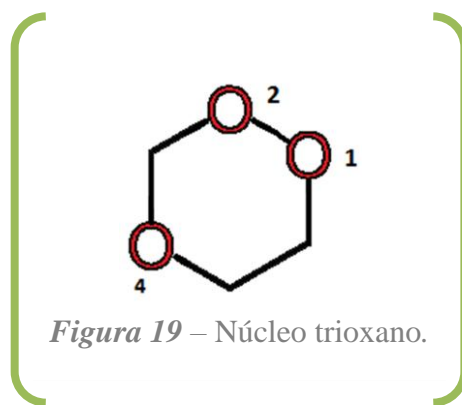


Figura 19 – Núcleo trioxano.

antimalárica dos compostos, visto a presença da ponte endoperóxido em todos estes compostos (peróxidos antimaláricos) ser essencial mas não suficiente para apresentarem actividade antimalárica. Por exemplo, moléculas em posição *cis* apresentavam maior actividade que os respectivos enantiómeros *trans*, os substituintes ligados em 3-, 5- e 6- influenciam grandemente a actividade, nomeadamente a estrutura 2-adamantil, o que levou a que se passasse a utilizar o modelo adamantil-spiro-1,2,4-trioxano como uma fonte de boa actividade antimalárica (Fig. 20).<sup>[23]</sup>

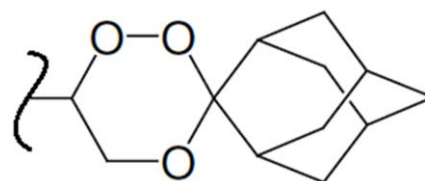


Figura 20 – Adamantil-spiro-1,2,4-trioxano.

Alterações estéricas nalgumas posições mostraram também diferenças relevantes entre epímeros<sup>[23]</sup>, o que poderá estar relacionado com algum bloqueio estérico à ligação endoperóxido, o que dificultaria a bioactivação dos compostos, ou a uma maior dificuldade na formação dos intermediários reactivos.

### 8.3. 1,2,4-Trioxolanos

Os trioxolanos são moléculas com um núcleo heterocíclico de 5 átomos, incluindo a ponte endoperóxido (Fig. 21). Estas moléculas são também denominadas ozonídeos, e algumas delas provaram ser mais activas contra o *Plasmodium* que o

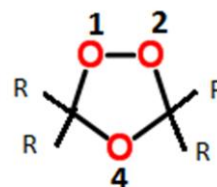
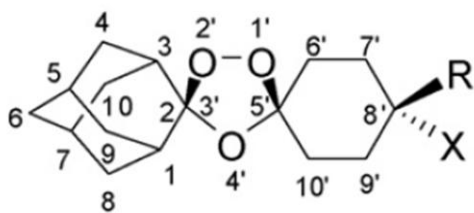


Figura 21 – Núcleo 1,2,4-trioxolano.

artesanato e arteméter tanto *in vitro* com *in vivo*, além de apresentarem maiores tempos de semi-vida e melhor biodisponibilidade após administração oral.<sup>[23]</sup>

A observação que estas moléculas, obtidas por co-ozonólise de O-álquil ceto-oximas na presença de compostos contendo um grupo carbonilo, numa reacção de Griesbaum, eram bastante estáveis em diversas condições sintéticas, permitiu a síntese de inúmeros compostos e a observação de correlações entre a estrutura e a actividade destes compostos.<sup>[23, 38]</sup>

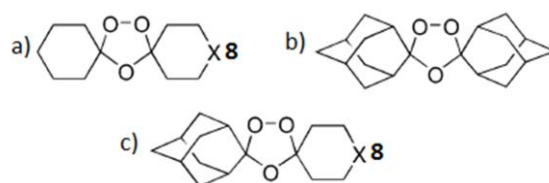




*Figura 22* – Dispiro-1,2,4-trioxanos com os grupos adamantil e ciclo-hexano numerados.

Assim, foi demonstrado que trioxolanos, e outros peróxidos antimaláricos, simetricamente substituídos são praticamente inativos, enquanto os endoperóxidos assimétricos apresentam normalmente excelentes valores de actividade, principalmente quando são flanqueados pelo grupo adamantil e um anel ciclo-hexilico (Fig. 22). A utilização desta combinação de substituintes provou ser bastante útil ao permitir um equilíbrio no balanço entre um grupo endoperóxido demasiado exposto, e como tal muito reactivo, e um grupo endoperóxido demasiado protegido estericamente, e praticamente inactivo, já que o grupo adamantil, por ser bastante volumoso e rígido, impede o acesso ao átomo de oxigénio da ponte endoperóxido do seu lado, enquanto do outro o grupo ciclo-hexano expõe o endoperóxido ao complexo de ferro (II) no seu lado da molécula, permitindo a sua bioactivação. Desta forma, trioxolanos substituídos com 2 grupos ciclo-hexano são inactivos por serem demasiado reactivos e se degradarem rapidamente, enquanto trioxolanos di-substituídos por adamantil são inactivos por não serem reactivos, visto a ponte endoperóxido estar demasiado bloqueada estericamente (Fig. 23).<sup>[38-41]</sup>

Além disso, estudos quânticos em dispiro-1,2,4-trioxolanos mostraram que a conformação dos substituintes na proximidade da ponte endoperóxido influenciava grandemente a sua interacção e formação de complexos com o ferro (II). Assim, isómeros conformacionais da mesma molécula apresentam diferentes graus de actividade antimalárica consoante a acessibilidade estérica que a sua ligação endoperóxido apresenta. Assim, foi observado que a conformação equatorial do ciclo-hexano em relação à ponte endoperóxido é a que permite maior acessibilidade e como tal, maior reactividade, sendo a prevalência desta conformação que determina a reactividade e estabilidade da molécula. Foi também observado que quanto mais volumosos os substituintes em *cis*-8'- maior a prevalência de conformações axiais. Assim, parece importante limitar o bloqueio estérico à volta da ligação peróxido aquando do desenho de novos trioxolanos, no entanto uma excessiva reactividade com o ferro (II) levará a uma maior clearance do composto, sendo por isso fundamental regular o equilíbrio entre os conformos axiais e equatoriais de modo a favorecer a estabilidade destes compostos, e assim potenciar a sua actividade *in vivo*.<sup>[46]</sup>



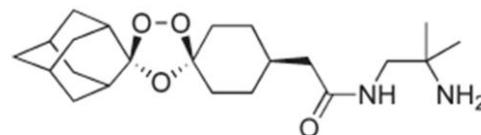
**Figura 23** – Dispiro-1,2,4-Trioxolanos com estrutura simétrica (a e b) e assimétrica (c).

Embora se tenha verificado que compostos com fraca actividade *in vitro* não possuem actividade *in vivo*, foi demonstrado que a boa actividade *in vitro* não é preditiva de boa actividade *in vivo* <sup>[38-41]</sup>, o que não pode ser considerado uma surpresa visto a maior complexidade destes modelos.

Para os trioxolanos, e para qualquer família de peróxidos antimaláricos, os derivados mais lipofílicos são mais activos oralmente mas são metabolicamente menos estáveis. Tal deve-se ao facto de uma boa biodisponibilidade oral requerer um bom equilíbrio entre solubilidade em meio aquoso, favorecida para compostos polares, e lipofilicidade, de forma a permitir a permeabilidade membranar dos compostos. No entanto, a biodisponibilidade oral é prejudicada para compostos mais lipofílicos, visto estes serem mais extensamente afectados por metabolismo de primeira passagem que os compostos mais polares. <sup>[38-41]</sup>

Trioxolanos com grupos funcionais básicos e neutros apresentam bons perfis antimaláricos, no entanto grupos funcionais acídicos diminuem a actividade antimalárica. A comparação da actividade antimalárica contra *P. falciparum in vitro* entre trioxolanos com grupos funcionais de base fraca e neutros não apresentou diferenças relativas na actividade dos compostos, no entanto, a mesma comparação de actividade contra *P. berghei*, mostrou que os grupos funcionais de base fracas eram essenciais para a excelente actividade dos trioxolanos contra este parasita, o que pode ser função de propriedades de ADME superiores de trioxolanos de base fraca contra trioxolanos neutros. <sup>[39, 40]</sup>

Dos trioxolanos sintetizados nestes estudos um foi seleccionado como candidato a desenvolvimento como fármaco, devido às suas características biofarmacêuticas e perfil toxicológico. O arterolano, também conhecido por OZ277 (Fig. 24), encontra-se agora na fase III de

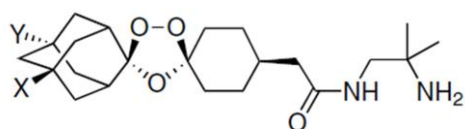


Arterolane

**Figura 24** – Estrutura molecular do arterolano ou OZ277. <sup>[41]</sup>

testes clínicos na forma de maleato de arterolano em combinação com fosfato de piperaquina. Este composto apresenta uma semi-vida plasmática superior à da dihidroartemisinina e artesunato e é mais activo que estes tanto, *in vitro* como *in vivo*. Toxicologicamente o arterolano apresenta baixos níveis de toxicidade mesmo a doses elevadas, sendo o fígado, sistema linfático e possivelmente os rins o alvo da sua toxicidade. Não se observaram sinais de neurotoxicidade nestes compostos, o que constitui uma enorme vantagem, visto que a neurotoxicidade é uma das grandes desvantagens associada ao tratamento com artemisinina e derivados.

No entanto o arterolano apresentou alguns problemas relacionados com estabilidade plasmática em doentes com malária durante a fase II dos ensaios clínicos, o que poderá aumentar os custos terapêuticos, por implicar uma dosagem maior do que a inicialmente ponderada.<sup>[52]</sup>



- 1 (OZ277) X, Y = H  
 2 (OZ397) X = OH, Y = H  
 3 (OZ381) X = H, Y = OH

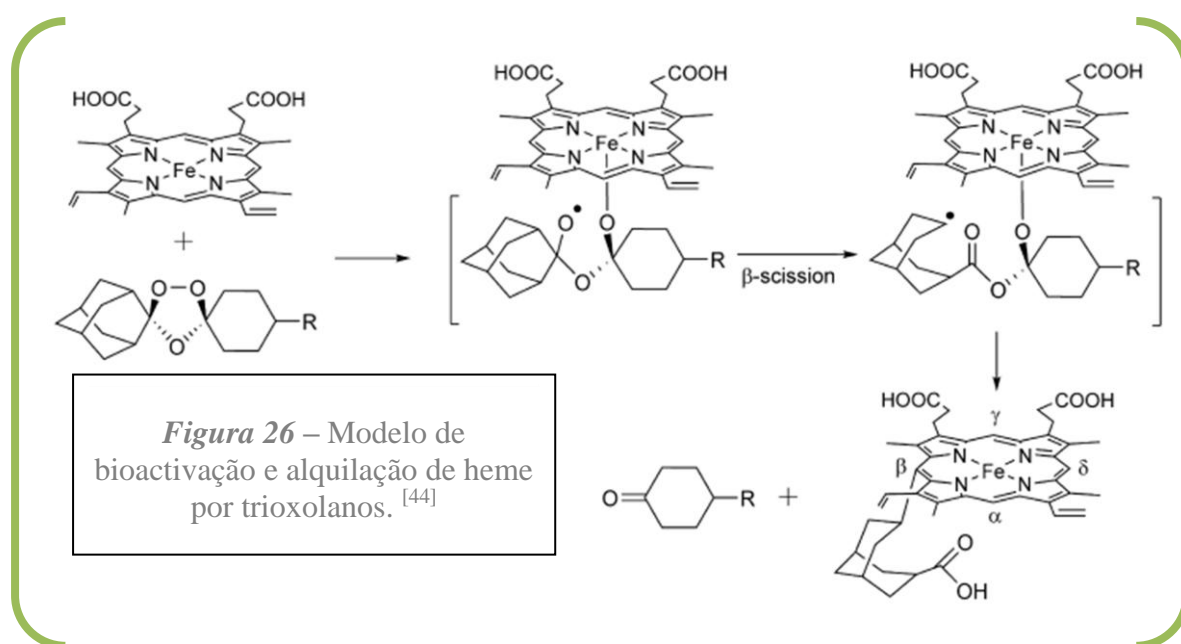
Figura 25 – Arterolano (1) e seus metabolitos hidroxilados (2 e 3).<sup>[42]</sup>

A incubação do arterolano com microsomas hepáticos humanos mostrou que este era hidroxilado em dois pontos dos anel adamantanona e os metabolitos originados (Fig. 25) por essa reacção eram substancialmente menos activos.<sup>[42]</sup> Esta observação pode indicar a perda substancial de actividade através de metabolismo de primeira passagem, não apenas para este

composto mas para todos os endoperóxidos de estrutura espiro-adamantanona, assim como também demonstra a importância de um anel adamantanona não substituído para a actividade destes compostos.

Posteriormente foram já identificados outros trioxolanos de estrutura similar ao arterolano, mas com outros grupos funcionais de base fraca, com eficácia antimalárica, assim como perfis de absorção, distribuição, metabolização e excreção (ADME), iguais ou superiores ao arterolano.<sup>[41]</sup> É importante referir ainda que actualmente encontra-se um outro trioxolano em fase II de ensaios clínicos, o OZ439, que até agora provou ser em todos os aspectos superior ao arterolano.<sup>[56]</sup>

Quanto ao mecanismo de actuação destes compostos este parece estar relacionado com alquilação de heme e de outros alvos moleculares, após bioactivação catalisada por ferro (II) (Fig. 26). A redução da ligação peróxido mediada por ferro (II) origina a formação de radicais centrados em átomos de carbono que podem posteriormente alquilar alvos moleculares assim como causar stress oxidativo no parasita. Alguns estudos mostram que os trioxolanos parecem estar associados a maiores índices de alquilação de heme do que a artemisinina e seus derivados. Estes estudos mostraram também que os trioxolanos são inibidores muito menos potentes da *Pf*ATP6 que a artemisinina e derivados, provavelmente devido às suas diferenças estruturais, o que mostra que os alvos moleculares e mecanismo de actuação envolvido na actividade antimalárica destes endoperóxidos possam ser diferentes. [43-45]



#### 8.4. 1,2,4,5-Tetraoxanos

Os tetraoxanos são também eles compostos heterocíclicos mas possuem duas pontes endoperóxido (Fig. 27). Os derivados substituídos em 3,6- dos 1,2,4,5-tetraoxaciclo-hexano são há muito utilizados para diferentes fins, tais como a produção

industrial de hidrocarbonetos macrocíclicos e lactonas, mas a descoberta da sua impressionante actividade antimalárica *in vitro*, especificamente de dispiro-1,2,4,5-tetraoxanos simétricos, na década de 90 do século passado, por Vennerstrom e colaboradores, abriu caminho à exploração deste grupo promissor de endoperóxidos antimaláricos.<sup>[23, 49]</sup>

Estes compostos são facilmente obtidos pela ciclização catalisada por ácido de cetonas cíclicas com peróxido de hidrogénio, no entanto formam-se bastantes subprodutos da reacção sem qualquer utilidade, como os 1,2,4,5,7,8-hexaoxanos, compostos com 3 pontes endoperóxido, que apresentam muito fraca actividade antimalárica comparativamente aos tetraoxanos alvo, devido a um maior bloqueio estérico das pontes endoperóxido nos hexaoxanos (Fig. 28).<sup>[51]</sup> Este facto levou a uma busca da optimização das condições de reacção, com utilização de substratos, solventes e catalisadores específicos, e à síntese de intermediários bis-hidroperóxido de forma a aumentar o rendimento de reacção.<sup>[47]</sup> A descoberta de que o núcleo tetraoxano era extremamente estável, mesmo em condições acídias e redutivas extremas com hidretos (pH de 1,6 e em presença de  $\text{LiAlH}_4$ ), assim como em condições básicas e oxidativas, permitiu a síntese de uma grande variedade de derivados com grupos funcionais polares e solúveis em água, muitos deles através de aminação redutiva.<sup>[23, 48]</sup>

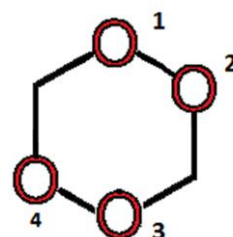
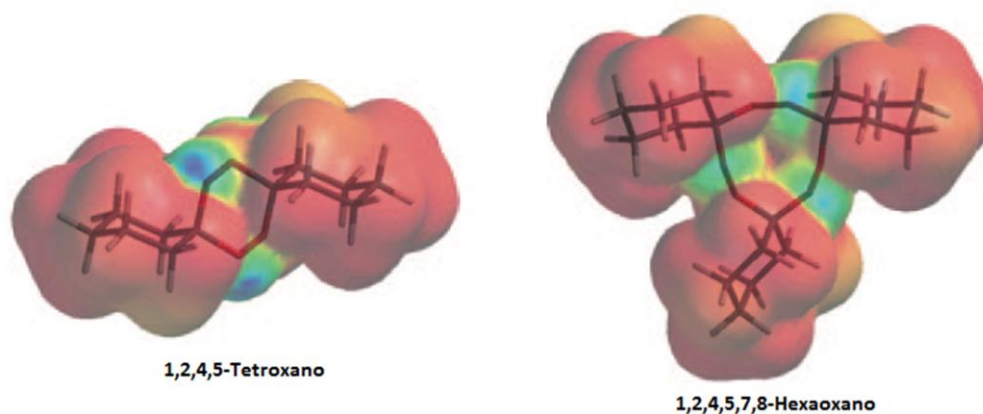


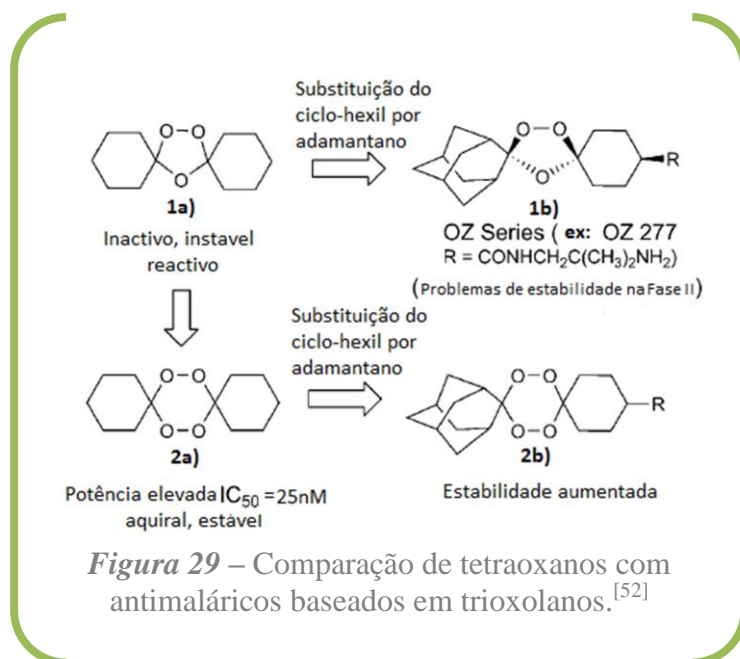
Figura 27 – Núcleo 1,2,4,5-tetraoxano.



*Figura 28* – Estrutura tridimensional de tetraoxano e hexaoxano. <sup>[51]</sup>

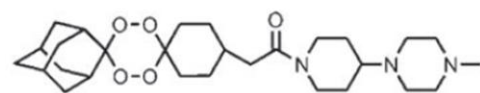
Tal como nas outras classes de endoperóxidos sintéticos, os compostos dispiroprovaram ser mais potentes como antimaláricos que os seus derivados monospiro, através da comparação de 3,6-dispiro-1,2,4,5-tetraoxanos com análogos monospiro. Ao mesmo tempo foi novamente observada a maior potência de derivados mistos (ou assimétricos) relativamente a tetraoxanos com o mesmo substituinte em 3- e 6- e, sem surpresa, a superior contribuição do anel adamantil face à estabilização e aumento da potência antimalárica dos tetraoxanos, tal como foi observado para os trioxanos sintéticos e trioxolanos, cujos sistemas só apresentavam biodisponibilidade oral em ratinhos se contivessem este grupo substituinte, devido à sua rigidez e ao equilíbrio entre a exposição e bloqueio estérico da ligação peróxido que proporciona, como já foi referido. <sup>[23, 47, 49]</sup>

Além disso os compostos com o núcleo tetraoxano provaram ser, em estudos comparativos com moléculas análogas, mais estáveis que os respectivos trioxolanos e trioxanos sintéticos, visto estes serem mais rapidamente degradados na presença de ferro que os tetraoxanos: ao final de 48h o tetraoxano mantinha 69% do produto inicial não degradado contra 43% do trioxano, enquanto o trioxolano tinha-se degradado completamente nesse período de tempo. Um exemplo simples da superioridade do núcleo tetraoxano face ao trioxolano é dado pela inactividade e instabilidade reactiva do dispiro-1,2,4-trioxano **1a**) face ao seu análogo tetraoxano **2a**) que apresenta actividade antimalárica em quantidades nanomolares, e é metabolicamente mais estável (Fig. 29). <sup>[50]</sup>



No mesmo estudo foi também observada a estabilidade química dos tetraoxanos, visto para estes compostos não se ter observado degradação significativa em solução aquosa e ácida. Foram também realizados ensaios de cito e genotoxicidade não se tendo observado indícios de citotoxicidade nem genotoxicidade para os tetraoxanos testados.<sup>[50]</sup>

Da mesma maneira que um composto da classe dos trioxolanos foi seleccionado para ensaios clínicos, surgiu também um possível candidato a fármaco, proposto por O'Neill e colaboradores, daquela que parece ser a classe mais promissora de endoperóxidos antimaláricos: os tetraoxanos. Este composto, o RKA 182 (Fig. 30), apresenta actividade antimalárica *in vitro* superior ao artesunato, artemeter e artemisinina, mesmo contra 11 isolados de *Plasmodium* de pacientes da fronteira entre a Tailândia e o Camboja, a quem a ACT a que foram sujeitos falhou. Suprimiu a parasitemia para níveis indetectáveis em ratinhos infectados com *P. berghei* ANKA após 24h e em dose oral única de 30mg/kg, enquanto o artesunato reduz a parasitemia em cerca de 95% em 8h mas esta aumenta rapidamente em seguida. Para comparar a estabilidade deste tetraoxano com o arterolano (OZ277) em eritrócitos infectados e não infectados *in*



RKA 182 IC<sub>50</sub> = 0.87 nM  
ED<sub>50</sub> = 1.1 mg kg<sup>-1</sup>  
ED<sub>90</sub> = 4.1 mg kg<sup>-1</sup>  
Solubilidade > 40 mg mL<sup>-1</sup> (H<sub>2</sub>O)

**Figura 30** – Estrutura molecular e dados biofarmacêuticos do RKA 182.<sup>[52]</sup>

*vitro*, foram realizados ensaios de resgate do fármaco após determinados intervalos de tempo, tendo-se observado que após 35min o arterolano já se encontrava completamente degradado nos eritrócitos infectados, não se tendo resgatado qualquer fármaco, enquanto a percentagem de RKA 182 resgatada após 4h foi de 79%, o que mostra que este tetraoxano é mais estável que o arterolano que, como já foi referido, apresentou problemas associados à diminuição da concentração plasmática do fármaco nos ensaios clínicos de Fase II. Além da sua superior estabilidade face ao arterolano, à sua superior actividade antimalárica comparativamente a artesunato, arteméter e artemisinina, apresenta um tempo de meia vida de cerca de 2,4h após administração oral, superior ao de qualquer outro endoperóxido antimalárico em ratos, boa disponibilidade oral (38% em ratos e 42% em ratinhos), baixa toxicidade e uma síntese industrial simples de apenas 4 passos e com um custo de produção baixo, sendo obtido de matéria prima relativamente barata.<sup>[52]</sup>

A superior estabilidade destes compostos relativamente às outras classes parece estar associada à sua aquiralidade, assim como ao facto de serem mais polares que os seus análogos de outras classes mesmo com estrutura semelhante (apresentam mais um átomo de oxigénio no farmacóforo que as outras classes portanto são mais polares), o que contribui para que sofram menos efeitos de metabolização de primeira passagem e também os torna mais solúveis, facilitando assim o passo de solubilização necessário à absorção de qualquer fármaco, o que vai aumentar a sua biodisponibilidade oral relativamente às outras classes de endoperóxidos antimaláricos.

De resto, os tetraoxanos parecem obedecer às mesmas relações estruturais de actividade que as já referidas para os trioxolanos:

- ✓ Tetraoxanos simetricamente substituídos são praticamente inactivos, enquanto os endoperóxidos assimétricos apresentam normalmente excelentes valores de actividade, principalmente quando são flanqueados pelo grupo adamantil e ciclo-hexano.
- ✓ Tetraoxanos com grupos funcionais básicos e neutros apresentam bons perfis antimaláricos, no entanto grupos funcionais acídicos diminuem a actividade antimalárica.
- ✓ Os derivados mais lipofílicos são mais activos oralmente mas são metabolicamente menos estáveis.

Relembrar que compostos com fraca actividade *in vitro* não possuem actividade *in vivo*, no entanto a boa actividade *in vitro* não é preditiva de boa actividade *in vivo*.



O seu mecanismo de acção está, como todos os outros endoperóxidos antimaláricos, dependente de bioactivação por parte de ferro (II). Estudos mecanísticos ao RKA 182 interceptaram tanto os radicais centrados em carbonos primários como secundários em presença de TEMPO, um agente que forma aductos com compostos radicalares (Fig. 31).<sup>[52]</sup> Neste aspecto os tetraoxanos parecem diferir dos 1,2,4-trioxolanos visto que para estes apenas foi caracterizado o radical centrado em carbono secundário.<sup>[55]</sup> Visto a alquilação da hemoglobina ser um dos potenciais mecanismos de actuação molecular dos endoperóxidos antimaláricos, tal também foi estudado para os tetraoxanos, tendo-se observado, através de espectrometria de massa, a formação de aductos entre a porfirina do heme e o radical centrado em carbono secundário derivado do tetraoxano, o que mostra que este processo pode ser importante para o mecanismo de actuação dos tetraoxanos, tal como também o parece ser para as outras classes de endoperóxidos antimaláricos.<sup>[52]</sup> Adicionalmente foi observado, através de microscopia confocal após a adição de tetraoxanos marcados com sondas fluorescentes, que estes acumulavam selectivamente nos eritrócitos infectados por parasitas, no vacúolo alimentar e no citoplasma do *Plasmodium*.<sup>[50]</sup> A mesma distribuição celular foi também observada para a artemisinina e 1,2,4-trioxolanos.<sup>[23]</sup>

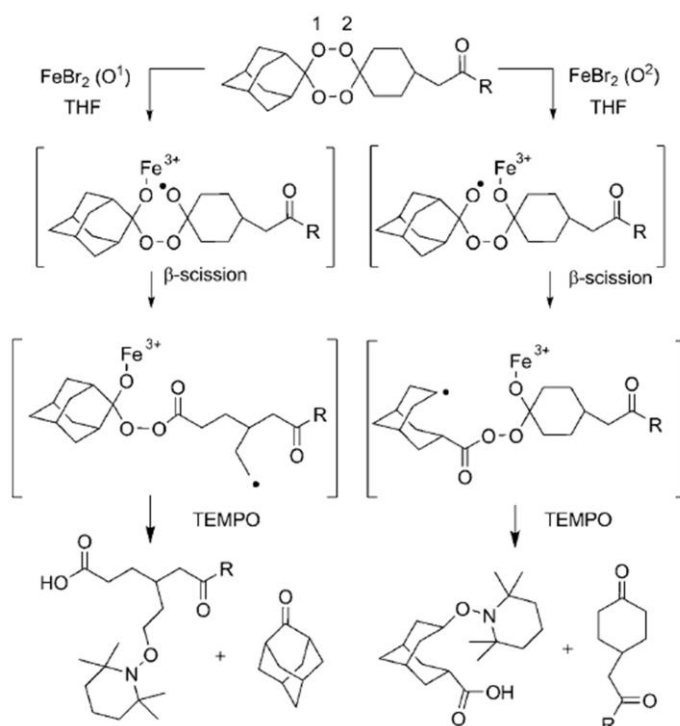
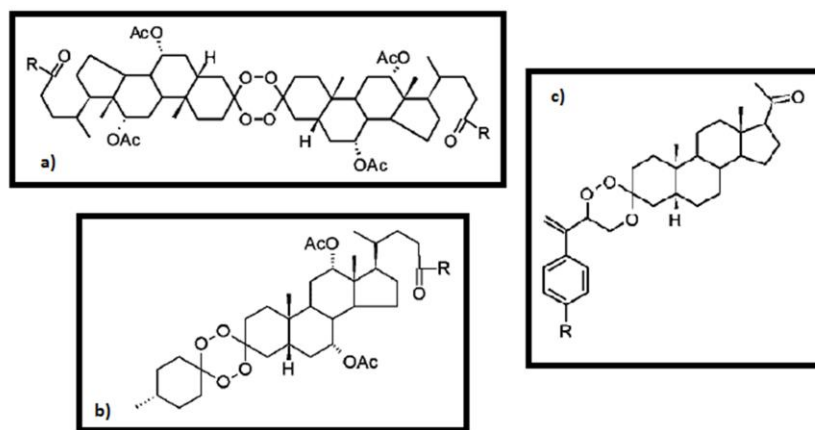


Figura 31 – Mecanismo de bioactivação de tetraoxanos e formação de aductos com TEMPO.<sup>[51]</sup>

A incorporação do núcleo tetraoxano, assim como de outros endoperóxidos antimaláricos sintéticos, em moléculas esteróides foi levada a cabo, e as propriedades antimaláricas dos conjugados resultantes estudadas (Fig. 32). Inicialmente foram obtidos derivados bis-esteroidais de colestano que apresentavam actividade antimalárica na ordem das micromoles, a substituição do colestano por derivados do ácido cólico levou ao aumento das actividades antimaláricas destes compostos. Com a substituição de um dos esteróides por um derivado alquilideno, como o anel ciclo-hexano, esta actividade foi potenciada apresentando alguns dos compostos obtidos actividades *in vitro* e *in vivo* em concentrações nanomolares. Nenhum dos derivados testados apresentou toxicidade nos animais utilizados, em qualquer das concentrações aplicadas, e foi observado a sua especificidade de actuação em eritrócitos infectados. Estes resultados são bastante interessantes pois mostram que mesmo moléculas complexas, como é o caso dos esteróides, podem ser utilizados como veículos para farmacóforos endoperóxidos sem comprometer a sua actividade antimalárica, e mesmo aumentá-la, visto, e especificamente no caso dos esteróides, serem moléculas anfifílicas que vão aumentar a solubilidade dos compostos em condições fisiológicas e ao mesmo tempo facilitar a permeabilidade destes a membranas celulares.<sup>[23, 53]</sup>



**Figura 32** – Exemplos de endoperóxidos conjugados com esteroides. a) tetraoxano bis-esteróide de ácido cólico; b) tetraoxano esteróide de ácido cólico e c) trioxano pregnano.<sup>[23]</sup>

Estudos do mecanismo de acção dos derivados de tetraoxano conjugados com esteróides revelaram que estes derivados originaram apenas radicais alcoxilo (radicais centrados em oxigénio) após bioactivação na presença de ferro (II), e revelaram a presença de espécies de ferro de alta valência, Fe(IV)=O.<sup>[23]</sup> Assim, parece provável que as espécies originadas por bioactivação de tetraoxanos conjugados com esteróides não sejam radicais centrados em átomos de carbono, devido a um possível bloqueio do rearranjo intermolecular observado nos dispiro-tetraoxanos com o grupo adamantil e ciclo-hexaoxano já referidos.

### 8.5. Compostos Híbridos

Com o intuito de ultrapassar a resistência a fármacos derivados da cloroquina e ao mesmo tempo tirar partido das propriedades farmacocinéticas dos trioxanos, ozonídeos e tetraoxanos foram desenhados e sintetizados compostos que continham, convalentemente ligados, um endoperóxido antimalárico e um derivado quinolinico.<sup>[23,57]</sup>

Estes compostos híbridos (Fig. 33), denominados 1,2,4-trioxaquinas, 1,2,4-trioxolaquinas e 1,2,4,5-tetraoxaquinas assim como derivados híbridos semi-sintéticos da artemisinina, foram conjugados a um grupo aminoquinolónico ou aminoacridino que contribui para a acumulação destes compostos no vacúolo alimentar ácido do parasita, e assim aumentar o *turnover* de radicais livres pela bioactivação do endoperóxido, além de poderem danificar o parasita por dois mecanismos distintos e, mesmo após alguma

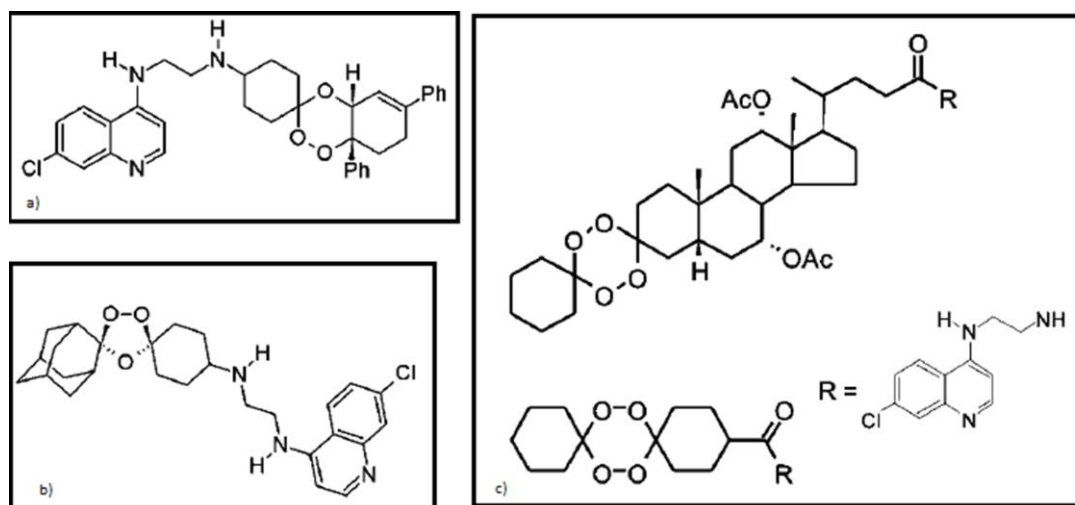
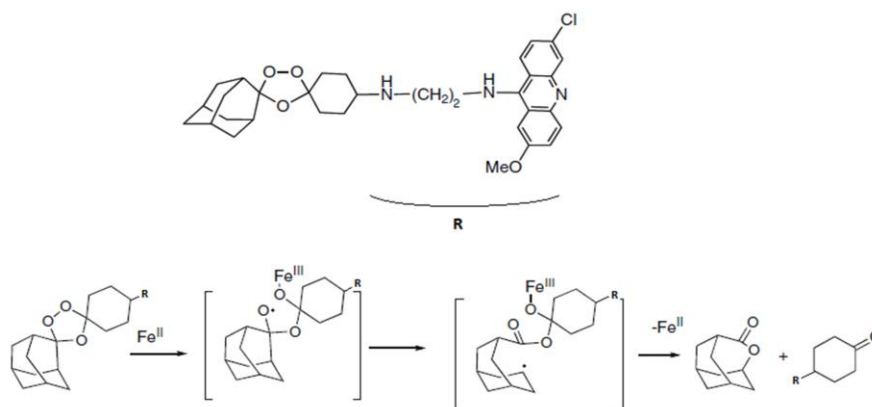


Figura 33 – Derivados quiméricos de trioxanos(a), trioxolanos (b) e tetraoxanos (c).<sup>[23]</sup>

degradação química ou metabólica do endoperóxido, os metabolitos continuariam a ter actividade pronunciada, podendo funcionar como agentes alquilantes ou bloqueadores da polimerização da hematina. Além disso, muitos dos compostos quiméricos obtidos podem ser convertidos em sais solúveis em água tornando possível a sua administração oral ou intravenosa.<sup>[23, 57]</sup>

Os resultados destas experiências mostraram que os compostos obtidos eram mais activos contra estirpes de *Plasmodium* resistentes a cloroquina que a própria cloroquina, não indicando qualquer resistência cruzada com este fármaco, no entanto o sinergismo esperado não foi observado, visto muitas vezes o derivado endoperóxido sozinho apresentar melhor actividade que os correspondentes híbridos. Os resultados de actividade antimalárica dos híbridos de derivados semi-sintéticos da artemisinina, inferiores aos obtidos para o arteméter, podem ser justificados pela inacessibilidade destes compostos a outros possíveis alvos moleculares fora do vacúolo alimentar, como a *PfATP6*, o que mais uma vez mostra a importância deste alvo molecular na actividade antimalárica da artemisinina e dos seus derivados semi-sintéticos. Mesmo assim, recentemente uma trioxaquina sintética foi seleccionada para desenvolvimento como fármaco.<sup>[23, 57]</sup>

Alguns dos compostos obtidos de endoperóxidos sintéticos podem inclusivamente funcionar como sistemas de transporte para uma aminoacridina ou aminoquinolina visto, após bioactivação por ferro (II), formarem os respectivos radicais livres e libertarem a cetona conjugada com um destes grupos (Fig. 34), incluindo assim dois potenciais agentes antimaláricos, com diferentes mecanismos e alvos moleculares, no interior do *Plasmodium* de uma só vez.<sup>[57]</sup>



**Figura 34** – 1,2,4-trioxolaquina e esquema da sua bioactivação levando à formação do radical livre e libertação da aminoacridina.<sup>[57]</sup>

O mesmo princípio foi também utilizado em modelos de profarmacos endoperóxidos que após bioactivação por ferro (II) no interior do parasita, iriam sofrer a respectiva fragmentação e libertar não só os correspondentes radicais livres do endoperóxido como também outros potenciais agentes antiparasitários, como as já referidas aminoquinolinas e aminoacridinas ou inibidores das proteases cisteinicas do *Plasmodium*, como as chalconas (Fig. 35). Estas proteases são responsáveis, em conjunto com outras proteases asparticas, pela degradação da hemoglobina e concomitante obtenção de aminoácidos por parte do parasita, que os usa para a biosíntese das suas proteínas. Isto torna as proteases cisteinicas um alvo atractivo para o desenvolvimento de fármacos antimaláricos, os seus inibidores uma classe inovadora e de grande potencial antimalárico, e esta associação mais um passo em frente, visto os derivados sintetizados apresentarem maior actividade que o composto endoperóxido sintético de que derivam, o artefleno (Fig. 38b), e ao mesmo tempo serem, tal como este, não tóxicos em experimentações *in vivo*.<sup>[58]</sup>

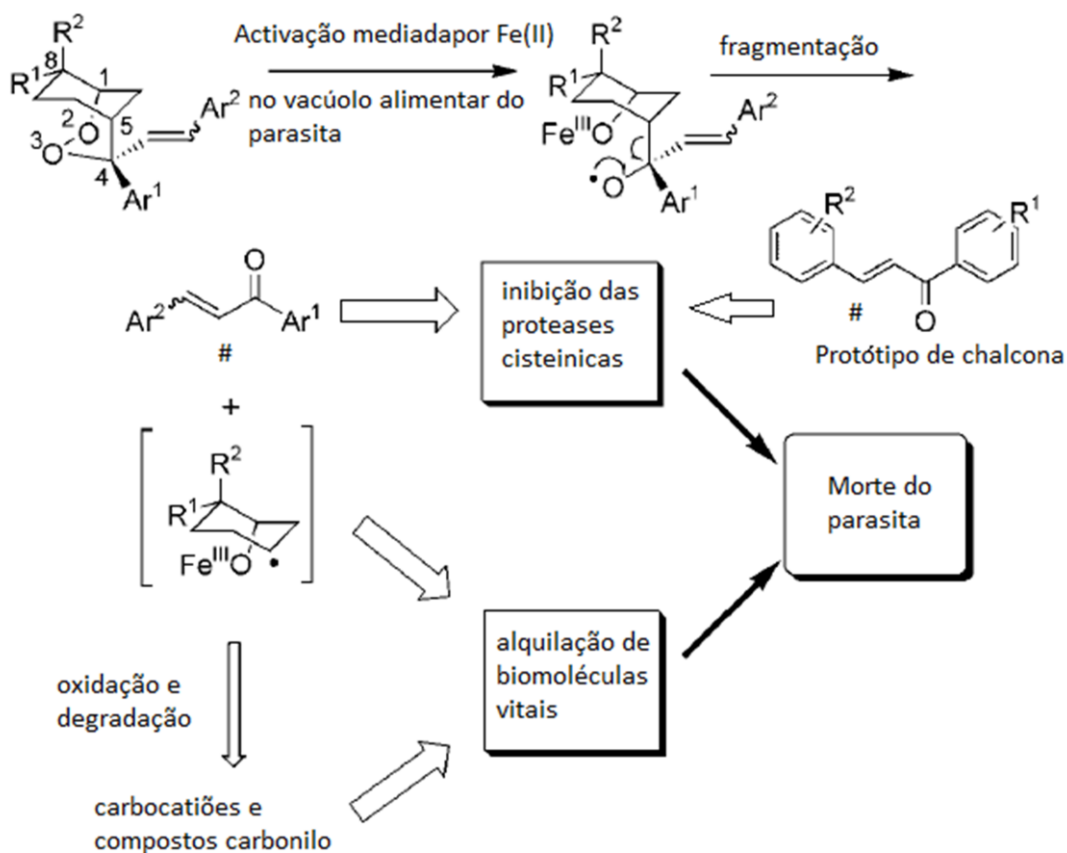


Figura 35 – Mecanismo de acção do protótipo dioxano com subsequente libertação do inibidor das proteases cisteinicas (#) e do radical livre.<sup>[58]</sup>

### 8.6. 1,2-dioxolanos e 1,2-dioxanos

Na tentativa de elucidar os fundamentos estruturais de reactividade que determinam a actividade antimalárica dos peróxidos antimaláricos e de otimizar o desenho de novos

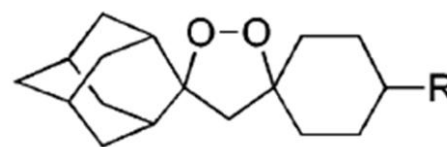


Figura 36 – Dispiro-1,2-dioxolano.

compostos, foram sintetizados 1,2-dioxolanos (Fig. 36) e a sua actividade antimalárica estudada. Assim, foi observado que estes compostos, para os quais foi inicialmente sugerido que seriam mais estáveis e com melhores características biofarmacêuticas que os outros endoperóxidos antimaláricos, eram mais estáveis mas ao mesmo tempo inactivos ou praticamente inactivos no que respeita a actividade antimalárica. Essa observação foi justificada com o facto de estes compostos sofrerem preferencialmente uma redução mediada por ferro (II) de dois electrões, o que leva à formação de diois a partir do radical alcoxilo formado pela redução da ligação peróxido (Fig. 37), enquanto os outros endoperóxidos maláricos sofrem principalmente uma redução de um electrão na sua ligação peróxido, e também pela ausência do átomo de oxigénio ligado a um ou aos dois carbonos que contem a ligação peróxido e que permite as modificações estruturais que levam à formação dos radicais centrados em carbono, considerados fundamentais para a sua actividade antimalárica.<sup>[32]</sup> Esta observação confirma mais uma vez o que já foi dito: a ponte peróxido é essencial para a actividade antimalárica dos endoperóxidos antimaláricos mas não é suficiente.

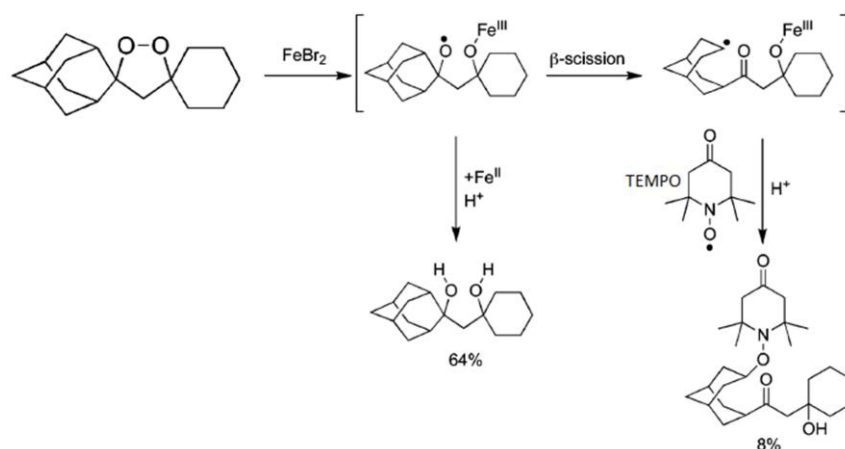


Figura 37 – Bioactivação induzida por  $\text{FeBr}_2$  de 1,2-dioxolano e intermediários formados. Formou-se 64% de diol inactivo e apenas 8% de radical C centrado (medido por aductos com TEMPO).<sup>[54]</sup>

Derivados 1,2-dioxanos tal como o já referido artefleno, são derivados estruturais do yingzhaosu A (Fig. 38a) um produto natural. No entanto existem outros produtos naturais, também eles com um núcleo 1,2-dioxano, mais simples estruturalmente e activos contra o *Plasmodium*: os plakortins.

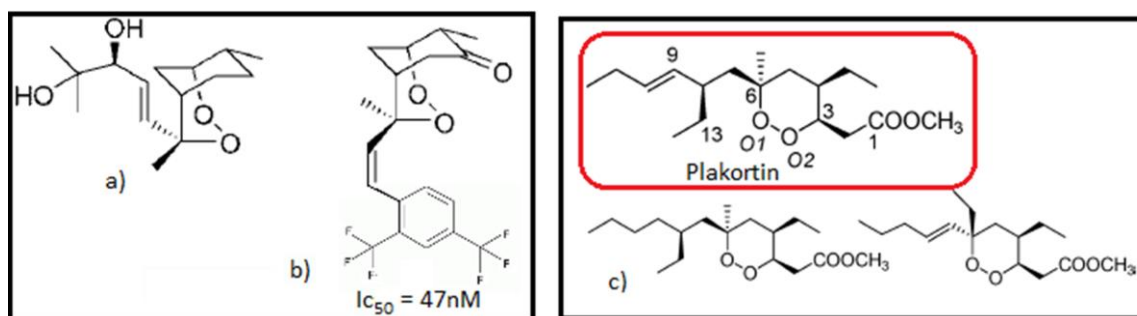
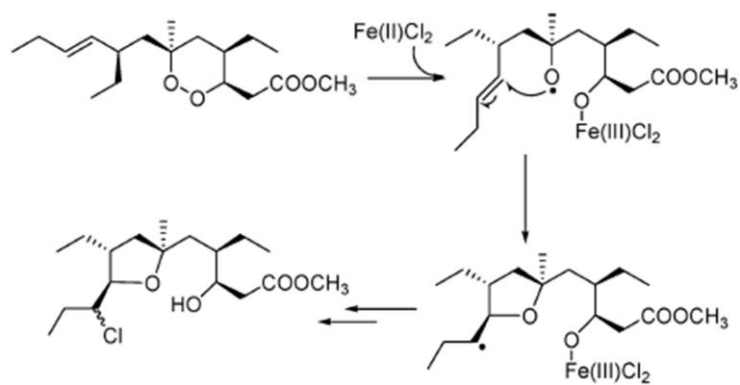


Figura 38 – 1,2-dioxanos. a) yingzhaosu A e b) artefleno<sup>[58]</sup>; c) Plakortin e análogos.<sup>[59]</sup>

Os plakortins (Fig. 38c) são endoperóxidos simples, de núcleo 1,2-dioxano, isolados com elevado rendimento de uma esponja proveniente das Caraíbas, denominada *Plakortis simplex*, e possuem actividade *in vitro* significativa em estirpes de *Plasmodium falciparum* resistentes à cloroquina,  $I_{c50}$  de 390nM contra 9nM da artemisinina. O plakortin e os seus derivados semi-sintéticos possuem um mecanismo de actuação dependente de bioactivação redutiva por ferro (II) tal como os outros endoperóxidos antimaláricos já referidos, e tal como estes, após bioactivação formam radicais alcóxido que posteriormente rearranjam para radicais centrados em átomos de carbono (Fig. 39) que irão interagir com biomoléculas do parasita, e assim conduzir à sua morte. Ao contrário dos dioxolanos e tal como os restantes endoperóxidos antimaláricos já referidos, estes compostos sofrem uma redução de um electrão mediada pelo ferro (II) na sua ponte endoperóxido, o que justifica a sua superior actividade face aos dioxolanos.<sup>[59]</sup> Esta observação, aliada à simplicidade da estrutura dos plakortins, demonstra a superioridade destes compostos como modelos para o estudo da química subjacente à actividade antimalárica da ligação peróxido do que os seus confrades dioxolanos, o que possibilitará a optimização dos compostos de todas as classes de endoperóxidos antimaláricos, tanto em termos de actividade antimalárica como de estabilidade e, concomitantemente, dos seus parâmetros farmacoterapêuticos.



*Figura 39* – Bioativação do plakortin. <sup>[59]</sup>



## 9. Conclusão

Com o crescente aumento de resistência aos antimaláricos de uso corrente por parte das várias espécies de *Plasmodium*, e principalmente de *P. falciparum*, torna-se extremamente importante a identificação e síntese de novos fármacos que conjuguem uma pronunciada actividade antimalárica e um bom perfil toxicológico e de segurança, assim como boas características farmacocinéticas, e um baixo custo associado à terapêutica, visto a maior parte dos casos de Malária ocorrerem nos países menos desenvolvidos e mais pobres e sendo a população destes o principal alvo da terapêutica.

A descoberta da Artemisinina, uma molécula de elevado potencial antimalárico e sem grandes efeitos secundários, abriu as portas à exploração de uma nova classe de antimaláricos com um mecanismo de actuação proposto diferente do de todos os outros antimaláricos de uso corrente: os endoperóxidos antimaláricos.

O facto de o mecanismo de actuação proposto para estes compostos ser diferente é uma das suas grandes vantagens, visto assim conseguirem ultrapassar as resistências estabelecidas, muitas vezes cruzadas, aos outros antimaláricos de uso corrente.

O fraco perfil farmacocinético da Artemisinina, caracterizado por baixa solubilidade em água, um tempo de semi-vida extremamente curto e baixa biodisponibilidade oral, levou à tentativa de optimização do mesmo através de derivados semi-sintéticos. No entanto, devido à escassez e contínuo aumento do preço da matéria-prima, de forma a não encarecer o tratamento, a pesquisa direccionou-se na busca de derivados completamente sintéticos, e como tal mais baratos, que continuassem a exibir a excelente actividade antimalárica da Artemisinina mas que possuíssem melhores parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos.

Assim, foram obtidos modelos mais simples de endoperóxidos com actividade antimalárica, e o estudo destes contribuiu para elucidar os mecanismos associados ao seu modo de acção, obtendo-se assim informação para o desenho e optimização de endoperóxidos antimaláricos. Através da síntese de novos compostos que respeitassem essas requisitos estruturais básicos, mas com a integração de diferentes grupos funcionais, foi possível observar quais destes contribuíam para uma optimização da actividade e dos parâmetros farmacocinéticos, estabelecendo correlações entre a estrutura e a actividade destes compostos e permitindo a síntese de melhores compostos.

O trioxolano OZ439, um composto com características farmacoterapêuticas superiores ao seu precursor OZ277 (arterolano), é um bom exemplo de como a pesquisa

contínua e os estudos de reactividade estrutural podem contribuir para a optimização dos fármacos.

Os trioxolanos e os tetraoxanos, parecem ser as classes mais promissoras de endoperóxidos antimaláricos completamente sintéticos, existendo derivados derivados destes compostos em ensaios clínicos, como o trioxolano OZ439 e o tetraoxano RKA 182. Enquanto os trioxolanos são extremamente potentes como antimaláricos, os tetraoxanos associam essa potência a uma maior estabilidade e, como tal, a melhores características farmacocinéticas.

Ao comparar os mecanismos, alvos e intermediários propostos para a actividade antimalárica de cada classe de endoperóxidos antimaláricos existem óbvias diferenças. No entanto, a capacidade alquilante, e especificamente a alquilação do grupo heme, é um denominador comum. Quanto às diferenças, estas podem ser fruto das diferenças estruturais de cada uma das classes, sendo por isso natural que os intermediários formados e os alvos moleculares possam ser diferentes, não descartando no entanto a possibilidade de que todos estes compostos possam causar stress oxidativo no interior do parasita podendo este ser, juntamente com o seu potencial alquilante, um factor preponderante da sua actividade antimalárica.

Apesar de alguns relatórios darem conta de um crescente número de falhas terapêuticas associadas aos protocolos de terapia combinada com base em Artemisinina (ACT's), a observação de que os derivados de síntese total parecem ter um mecanismo de acção, intermediários e alvos moleculares diferentes dos propostos para a Artemisinina e derivados semi-sintéticos pode significar que a resistência *in vivo* do *Plasmodium* a estes últimos poderá não afectar os derivados de síntese. No entanto, é extremamente importante evitar a disseminação global destas estirpes resistentes, visto que enquanto nenhum dos derivados de síntese é aprovado para utilização humana, a melhor arma para o combate à Malária, principalmente a causada por estirpes multi-resistentes, é a Artemisinina e os seus derivados semi-sintéticos, sempre em terapêuticas combinadas.

As observações aqui descritas permitem antever que os endoperóxidos antimaláricos sintéticos, principalmente os derivados de trioxolano e tetraoxano, vão no futuro desempenhar um papel preponderante no combate à Malária, possibilitando o acesso a terapêuticas eficazes e seguras às populações mais pobres e mais afectadas por este flagelo.

## 10. Bibliografia

- [1] – Schmidt, G.D., Roberts, L.S. & Janovy Jr., J. (2004). “Foundations of Parasitology”, McGraw-Hill Science, 2004, 7ª Ed., pp. 147-164;
- [2] – Kakkilaya, B.S. (Última actualização 30/07/2010). *Malaria Site: Comprehensive Malaria Website*. <http://www.malariasite.com/malaria/History.htm>;
- [3] – Kaufman, T. & Rúveda, E. (2005). “The quest for quinine: those who won the battles and those who won the war.” *Angew Chem Int Ed Engl* **44** (6): 854–85;
- [4] – Healing Herbs & Himachal Pharmaceuticals, *Quinine (Hydrochloride and Sulphate) BP*. [http://himpharm.com/productlinks.php?product=Quinine\\_BP](http://himpharm.com/productlinks.php?product=Quinine_BP), consultado a 20/09/2010;
- [5] – Biology Reference, *Protozoan Diseases*. <http://www.biologyreference.com/Po-Re/Protozoan-Diseases.html>, consultado a 20/09/2010;
- [6] – Photo dictionary, *Culex*. <http://www.faqs.org/photo-dict/phrase/3719/culex-.html>, consultado a 20/09/2010;
- [7] – Feachem, R. & Sabot, O. (2008) “A new global malaria eradication strategy.” *Lancet* **371**: 1633-5;
- [8] – World Health Organization (Última actualização Abril 2010). *Malaria*. <http://www.who.int/topics/malaria/en/ site>;
- [9] – Castro, L., Cardoso, A.I., Queirós, L. & Gonçalves, G. (2004). “Malária na região Norte de Portugal (1993-2002) – Caracterização Epidemiológica.” *Acta Méd Port* **17**: 291-298
- [10] – Malaria Foundation International, *About Malaria*, [http://www.malaria.org/index.php?option=com\\_content&task=category&sectionid=8&id=41&Itemid=32](http://www.malaria.org/index.php?option=com_content&task=category&sectionid=8&id=41&Itemid=32), consultado a 20/09/2010;
- [11] – Roll Back Malaria Partnership, *Global Malaria Action Plan (2008)*. <http://www.rollbackmalaria.org/gmap/gmap.pdf>; consultado a 20/09/2010;
- [12] – World Health Organization – Global Health Observatory Map Gallery, *Malaria, countries or areas at risk of transmission, 2009*. [http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global\\_Malaria\\_ITHRiskMap.JPG](http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_Malaria_ITHRiskMap.JPG), consultado a 20/09/2010;
- [13] – *Imagens do ciclo do parasita da malária*, [http://estudmed.com.sapo.pt/trabalhos/malaria\\_3.htm](http://estudmed.com.sapo.pt/trabalhos/malaria_3.htm), consultado a 03/08/2010;
- [14] – Manual Merck para a Família, *Secção 17: Infecções; Capítulo 184: Infecções por parasitas; Tema: Paludismo (malária)*. <http://www.manualmerck.net/?id=210&cn=1738&ss=>, consultado a 20/09/2010;
- [15] – Trampuz, A., Jereb, M., Muzlovic, I. & Prabhu, R.M. (2003). “Clinical review: Severe malaria” *Critical Care* **7**: 315-323
- [16] – Malaria, (última actualização 6 de Novembro de 2009) *Treatment of Falciparum Malaria*. <http://nsg521uwmalariaanna.blogspot.com/2009/11/treatment-of-falciparum-malaria.html>;
- [17] – Fowkes, F.J.I., Richards, J.S., Simpson, J.A. & Beeson, J.G. (2010). “The Relationship between Anti-merozoite Antibodies and Incidence of *Plasmodium falciparum* Malaria: A Systematic Review and Meta-analysis” *PLoS Med* **7** (1): e1000218.
- [18] – Hansen, D.S & Schofield, L. (2010). “Natural regulatory T cells in malaria: host or parasite allies?” *PLoS Pathog* **6** (4): e1000771
- [19] – Brunton, L.L., Lazo, J.S. & Parker, K.L. (2006). “Goodman & Gilman’s The Pharmacological Basis of Therapeutics”, McGraw-Hill Medical, 2006, 11ª Ed., Cap. 39;
- [20] – Center for Disease Control and Prevention (última actualização 08/02/2010). *Malaria – Travelers – Choosing a Drug to Prevent Malaria*. <http://www.cdc.gov/malaria/travelers/drugs.html>;
- [21] – INFARMED, *Prontuario Terapêutico Online* <http://www.infarmed.pt/prontuario/index.php>; consultado a 20/09/2010;

- [22]– INFARMED, *Formulário Hospitalar Nacional de Medicamentos*, 9ª Edição, <http://www.infarmed.pt/formulario/formulario.pdf>; consultado a 20/09/2010;
- [23]– Opsenica, D.M. & Šolaja, B.A. (2009). “Antimalarial Peroxides – Review.” *J. Serb. Chem. Soc.* **74** (11): 1155–93;
- [24]– O’Neill, P.M., Barton, V.E. & Ward, S. A. (2010). “The Molecular Mechanism of Action of Artemisinin—The Debate Continues.” *Molecules* **15**: 1705–21;
- [25]– Zhang, S. & Gerhard, G. (2008). “Heme activates artemisinin more efficiently than hemin, inorganic iron, or hemoglobin.” *Bioorg. Med. Chem* **16**: 7853–61;
- [26]– Creek, D.J., Ryan, E., Charman, W.N., Chiu, F.C.K., Prankerd, R.J., Vennerstrom, J.L. & Charman, S.A. (2009). “Stability of Peroxide Antimalarials in the Presence of Human Hemoglobin.” *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**: 3496–3500;
- [27]– Posner, G.H. & O’Neill, P.M. (2004). “Knowledge of the proposed chemical mechanism of action and cytochrome p450 metabolism of antimalarial trioxanes like artemisinin allows rational design of new antimalarial peroxides.” *Acc Chem Res.* **37** (6): 397–404
- [28]– Olliaro, P.L., Haynes, R.K., Meunier, B. & Yuthavong, Y. (2001). “Possible modes of action of the artemisinin-type compounds.” *Trends Parasitol.* **17** (3): 122–6;
- [29]– Haynes, R.K., Chan, W.C., Lung, C.M., Uhlemann, A.C., Eckstein, U., Taramelli, D., Parapini, S., Monti, D. & Krishna, S. (2007). “The Fe<sup>2+</sup>-mediated decomposition, PfATP6 binding, and antimalarial activities of artemisone and other artemisinins: The unlikelihood of C-centered radicals as bioactive intermediates.” *ChemMedChem* **2**, 1480–97;
- [30]– World Health Organization (última actualização Janeiro de 2006), *Roll Back Malaria Partnerships: Fact on ACTs (Artemisinin-based Combination Therapies)*, [http://www.rollbackmalaria.org/cmc\\_upload/0/000/015/364/RBMInfosheet\\_9.htm](http://www.rollbackmalaria.org/cmc_upload/0/000/015/364/RBMInfosheet_9.htm);
- [31]– World Health Organization, (2007). *Containment of Malaria Multi-Drug Resistance on the Cambodia-Thailand Border: Report of an Informal Consultation*. [http://www.searo.who.int/LinkFiles/Meeting\\_Reports\\_Report\\_29-30\\_Jaunary2007.pdf](http://www.searo.who.int/LinkFiles/Meeting_Reports_Report_29-30_Jaunary2007.pdf) - acedido a 20/09/2010;
- [32]– World Health Organization, (2010). *Weekly epidemiological record* No. 21, **85**; <http://www.who.int/wer/2010/wer8521.pdf> - acedido a 20/09/2010;
- [33]– Cheng, W. “A New Treatment for Malaria: Artemisinin”, <http://www.science.mcmaster.ca/biopharm/ppt/artemis.ppt>, acedido a 20/06/2010;
- [34]– Gordi, T., Huong, D.X., Hai, T.N., Nieu, N.T. & Ashton, M. (2002). “Artemisinin Pharmacokinetics and Efficacy in Uncomplicated-Malaria Patients Treated with Two Different Dosage Regimens.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **4** (46): 1026–31;
- [35]– Stocks, P.A., Bray, P.G., Barton, V.E., Al-Helal, M., Jones, M., Araujo, N.C., Gibbons, P., Ward, S.A., Hughes, R.H., Biagini, G.A., Davies, J., Amewu, R., Mercer, A.E., Ellis, G. & O’Neill, P.M. (2007). “Evidence for a common non-heme chelatable-iron-dependent activation mechanism for semisynthetic and synthetic endoperoxide antimalarial drugs.” *Angew. Chem. Int. Ed.*, **119**: 6394–9;
- [36]– Jambou, R., Legrand, E., Niang, M., Khim, N., Lim, P., Volney, B., Ekala, M.T., Bouchier, C., Esterre, P., Fandeur, T. & Mercereau-Puijalon, O. (2005). “Resistance of Plasmodium falciparum field isolates to in-vitro artemether and point mutations of the SERCA-type PfATPase6.” *Lancet*, **366**:1960–3;
- [37]– Gordi, T., Xie, R. & Jusko, W.J. (2005). “Semi-mechanistic pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling of the antimalarial effect of artemisinin.” *Br J Clin Pharmacol*, **60** (6): 594–604;
- [38]– Dong, Y., Chollet, J., Matile, H., Charman, S.A., Chiu, F.C.K., Charman, W.N., Scorneaux, B., Urwyler, H., Santo Tomas, J., Scheurer, C., Snyder, C., Dorn, A., Wang, X., Karle, J.M., Tang, Y., Wittlin, S., Brun, R. & Vennerstrom, J.L. (2005). “Spiro and Dispiro-1,2,4-Trioxolanes as Antimalarial Peroxides: Charting a Workable SAR Using Simple Prototypes.” *J. Med. Chem.* **48**: 4953–61;
- [39]– Dong, Y., Tang, Y., Chollet, J., Matile, H., Wittlin, S., Charman, S.A., Charman, W.N., Tomas, J.S., Scheurer, C., Snyder, C., Scorneaux, B., Bajpai, S., Alexander, S.A., Wang, X., Padmanilayam, M., Cheruku, S.R., Brun, R. & Vennerstrom, J.L., (2006). “Effect of functional group polarity on the antimalarial activity of spiro and dispiro-1,2,4-trioxolanes.” *Bioorg. Med. Chem.*, **14** (18): 6368–82;

- [40]– Tang, Y., Dong, Y., Wittlin, S., Charman, S.A., Chollet, J., Chiu, F.C.K., Charman, W.N., Matile, H., Urwyler, H., Dorn, A., Bajpai, S., Wang, X., Padmanilayam, M., Karle, J.M., Brun, R. & Vennerstrom, J.L., (2007). “Weak base dispiro-1,2,4-trioxolanes: potent antimalarial ozonides.” *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **17** (5): 1260-5;
- [41]– Dong, Y., Wittlin, S., Sriraghavan, K., Chollet, J., Charman, S.A., Charman, W.N., Scheurer, C., Urwyler, H., Santo Tomas, J., Snyder, C., Creek, D.J., Morizzi, J., Koltun, M., Matile, H., Wang, X., Padmanilayam, M., Tang, Y., Dorn, A., Brun, R. & Vennerstrom, J.L., (2010). “The structure-activity relationship of the antimalarial ozonide arterolane (OZ277).” *J Med Chem.* **53** (1): 481-91;
- [42]– Zhou, L., Alker, A., Ruf, A., Wang, X., Chiu, F.C., Morizzi, J., Charman, S.A., Charman, W.N., Scheurer, C., Wittlin, S., Dong, Y., Hunziker, D. & Vennerstrom, J.L. (2008). “Characterization of the two major CYP450 metabolites of ozonide (1,2,4-trioxolane) OZ277.” *Bioorg Med Chem Lett.* **18** (5): 1555-8;
- [43]– Kaiser, M., Wittlin, S., Nehrbass-Stuedli, A., Dong, Y., Wang, X., Hemphill, A., Matile, H., Brun, R. & Vennerstrom, J.L. (2007). “Peroxide Bond-Dependent Antiplasmodial Specificity of Artemisinin and OZ277 (RBx11160)” *Antimicrob Agents Chemother* **51** (8): 2991-3;
- [44]– Creek, D.J., Charman, W.N., Chiu, F.C.K., Pranker, R.J., Dong, Y., Vennerstrom, J.L. & Charman S.A. (2008). “Relationship between Antimalarial Activity and Heme Alkylation for Spiro- and Dispiro-1,2,4-Trioxolane Antimalarials.” *Antimicrob Agents Chemother* **52** (4): 1291-6;
- [45]– Wang, X., Creek, D.J., Schiaffo, C.E., Dong, Y., Chollet, J., Scheurer, C., Wittlin, S., Charman, S.A., Dussault, P.H., Wood, J.K. & Vennerstrom, J.L. (2009). “Spiroadamantyl 1,2,4-trioxolane, 1,2,4-trioxane, and 1,2,4-trioxepane pairs: Relationship between peroxide bond iron(II) reactivity, heme alkylation efficiency, and antimalarial activity” *Bioorg Med Chem Lett.* **19**: 4542–5;
- [46]– Creek, D.J., Chalmers, D.K., Charman, W.N. & Duke, B.J. (2008). “Quantum chemical study of the intermediate complex required for iron-mediated reactivity and antimalarial activity of dispiro-1,2,4-trioxolanes.” *J Mol Graph Model.* **27** (3): 394-400;
- [47]– Zmitek, K., Stavber, S., Zupan, M., Bonnet-Delpon, D., Charneau, S., Grellier, P. & Iskra, J. (2006). “Synthesis and antimalarial activities of novel 3,3,6,6-tetraalkyl-1,2,4,5-tetraoxanes.” *Bioorg Med Chem.* **14** (23): 7790-5;
- [48]– Opsenica, I., Opsenica, D., Smith, K.S., Milhous, W.K. & Šolaja, B.A. (2008) “Chemical Stability of the Peroxide Bond Enables Diversified Synthesis of Potent Tetraoxane Antimalarials” *J. Med. Chem.* **51**: 2261–6;
- [49]– Amewu, R., Stachulski, A.V., Ward, S.A., Berry, N.G., Bray, P.G., Davies, J., Labat, G., Vivas, L. & O'Neill, P.M. (2006). “Design and synthesis of orally active dispiro 1,2,4,5-tetraoxanes; synthetic antimalarials with superior activity to artemisinin.” *Org Biomol Chem.* **4** (24): 4431-6;
- [50]– Ellis, G.L., Amewu, R., Sabbani, S., Stocks, P.A., Shone, A., Stanford, D., Gibbons, P., Davies, J., Vivas, L., Charnaud, S., Bongard, E., Hall, C., Rimmer, K., Lozanom, S., Jesús, M., Gargallo, D., Ward, S.A. & O'Neill, P.M. (2008). “Two-step synthesis of achiral dispiro-1,2,4,5-tetraoxanes with outstanding antimalarial activity, low toxicity, and high-stability profiles.” *J Med Chem.* **51** (7): 2170-7;
- [51]– Dong, Y., Creek, D., Chollet, J., Matile, H., Charman, S.A., Wittlin, S., Wood, J.K. & Vennerstrom, J.L., (2007). “Comparative antimalarial activities of six pairs of 1,2,4,5-tetraoxanes (peroxide dimers) and 1,2,4,5,7,8-hexaoxonanes (peroxide trimers).” *Antimicrob Agents Chemother.* **51** (8):3033-5;
- [52]– O'Neill, P.M., Amewu, R.K., Nixon, G.L., Bousejra, F., Mungthin J., Shone, A.E., Vivas, L., Lander, H., Barton, V., Muangnoicharoen, S., Bray, P.G., Davies, J., Park, B.K., Wittlin, S., Brun, R., Preschel, M., Zhang, K. & Ward, S.A. (2010). “Identification of a 1,2,4,5-tetraoxane antimalarial drug-development candidate (RKA 182) with superior properties to the semisynthetic artemisinins.” *Angew Chem Int Ed Engl.* **49** (33):5693-7;
- [53]– Opsenica, D., Angelovski, G., Pocsfalvi, G., Juranić, Z., Zizak, Z., Kyle, D., Milhous, W.K. & Solaja, B.A. (2003). “Antimalarial and antiproliferative evaluation of bis-steroidal tetraoxanes”. *Bioorg Med Chem.* **11** (13):2761-8;
- [54]– Wang, X., Dong, Y., Wittlin, S., Creek, D., Chollet, J., Charman, S., Tomas, J., Scheurer, C., Snyder, C., Vennerstrom, J., (2007). “Spiro- and Dispiro-1,2-dioxolanes: Contribution of Iron(II)-

- Mediated One-Electron vs Two-Electron Reduction to the Activity of Antimalarial Peroxides". *J. Med. Chem.* **50**, 5840-5847;
- [55] – Vennerstrom, J., Arbe-Barnes, S., Brun, R., Charman, S., Chiu, F., Chollet, J., Dong, Y., Dorn A., Hunziker, D., Matile, H., McIntosh, K., Padmanilayam, M., Santo, J., Scheurer, C., Scorneaux, B., Tang, Y., Urwyler, H., Wittlin, S. & Charman, W. (2004). "Identification of an antimalarial synthetic trioxolane drug development candidate". **430** (7002):900-4;
- [56] – Medicines for Malaria Venture, *Interactive project portfolio*, <http://www.mmv.org/research-development/project-portfolio>, consultado a 20/09/2010;
- [57] – Araújo, N.C., Barton, V., Jones, M., Stocks, P.A., Ward, S.A., Davies, J., Bray, P.G., Shone, A.E., Cristiano, M.L. & O'Neill, P.M. (2009). "Semi-synthetic and synthetic 1,2,4-trioxaquines and 1,2,4-trioxolaquines: synthesis, preliminary SAR and comparison with acridine endoperoxide conjugates." *Bioorg Med Chem Lett.* **1;19**(7):2038-43;
- [58] – O'Neill, P.M., Stocks, P.A., Pugh, M.D., Araujo, N.C., Korshin, E.E., Bickley, J.F., Ward, S.A., Bray, P.G., Pasini, E., Davies, J., Verissimo, E. & Bachi, M.D. (2004). "Design and synthesis of endoperoxide antimalarial prodrug models." *Angew Chem Int Ed Engl.* **43** (32):4193-7;
- [59] – Tagliatalata-Scafati, O., Fattorusso, E., Romano, A., Scala, F., Barone, V., Cimino, P., Stendardo, E., Catalanotti, B., Persico, M. & Fattorusso, C. (2010). "Org Biomol Chem. Insight into the mechanism of action of plakortins, simple 1,2-dioxane antimalarials." *Org Biomol Chem.* **8** (4):846-56;