

Adelino José Lopes Oliveira

# Terapêutica da Malária: Presente e Prespectivas Futuras

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas,  
orientada pela Professora Doutora Maria Luísa Sá e Melo e apresentada à Faculdade de  
Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

# Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Doutora Sá e Melo, pelo incondicional e expedito apoio que me demonstrou ao longo da realização desta monografia, não sendo este maior apenas por falta de requisito da minha parte. Mais do que isso agradeço por todos os conhecimentos de química e não só, que me passou ao longo destes seis anos, espero honrar sempre o saber que me transmitiu.

Seguidamente agradecer a todos os meus amigos, por toda amizade e apoio ao longo desta caminhada, mas mais agradeço-lhes pela felicidade que sempre me conseguiram dar. De entre estes não posso deixar de referir alguns: ao Frederico e ao Gil, pelo feito de me aturarem ao longo de seis anos; ao Tuca e ao João Morgado, pela companhia nas mais variadas aventuras em Coimbra e pelos conselhos e críticas que sempre me ajudaram a crescer, à Andreia por me fazer acreditar que ainda há bondade na Humanidade; ao David Antunes por me receber como seu afilhado na UC; ao Rafael Querido por conseguir sempre que eu veja uma lado diferente, nem sempre o melhor, mas diferente, ao Tiago Martins por ter conseguido ser uma das únicas pessoas a quem eu dou ouvidos neste mundo; e finalmente ao Miguel, meu afilhado deste ano, a partir do qual voltei a acreditar que o futuro pode, ainda, vir a ser melhor.

Não posso deixar de agradecer, à quela que é a pessoa mais importante da minha vida, e sem dúvida a pessoa que mais me ajudou, espero que se perpetuem, todos os momentos, bons e maus, pois contigo todos eles valem a pena, Ana Catarina, um muito obrigado!

A Coimbra, um para sempre, pois sem ti já não vivo.

# Resumo

Neste trabalho foi abordado o tema Terapêutica da Malária. Presente e Perspectivas Futuras.

Para tal, incidiu-se sobre o tópico da epidemiologia da malária, sua incidência, prevalência e custo associado. Seguidamente estudou-se o ciclo de vida do *Plasmodium*, passando pelas quatro fases que o constituem, fase hepática, fase eritrocítica, fase de transmissão e fase no mosquito. Refere-se a terapêutica que está hoje instituída e analisam-se as suas posologias e resistências associadas, tentando encontrar as razões da sua actual diminuição de eficácia. Foi feita uma reflexão de algumas medidas futuras e de vanguarda da terapêutica, desde os estudos *in vitro* até aos estudos *in vivo*. A descoberta das capacidades terapêuticas dos tetraoxanos com duplo transportador esteróide e aminados no carbono terminal, é um exemplo promissor para terapêuticas futuras.

# Abstract

In this work, the theme: Malaria therapeutics. Present and future perspectives has been approached.

At first the malaria topic has been presented, by going through its epidemiology. Incidence, prevalence and cost associated. The life cycle of the *Plasmodium* has been studied, going through all of its four phases, the liver, the blood, the transmission and the mosquito phases. The ongoing therapeutics, from its posology and associated resistances, and the diminishment of its efficacy has been presented. A discussion of some future measures and new therapeutics, *in vitro* and *in vivo* studies included, has been presented. The discovery of double steroid carrier aminated tetraoxanes has been discussed, *Plasmodium* as a promising example for future therapies.

# Índice

Agradecimentos .....	1
Resumo .....	2
Abstract .....	2
Índice .....	3
Introdução.....	4
Ciclo de vida da malária: As suas quatro fases .....	6
Fase no fígado.....	7
Fase eritrocitária.....	7
Fase de transmissão .....	7
Fase no mosquito .....	8
Terapêutica actual: Mecanismo de acção e resistências.....	8
Descoberta de fármacos antimaláricos: modelos eficazes para o seu screening.....	11
Terapêutica: Perspectivas futuras... ..	13
Mecanismo de acção.....	14
Tetraoxanos com transportadores esteróides .....	14
Conclusões.....	18
Bibliografia e Webgrafia .....	19

# Introdução

Terapêutica da Malária. Presente e Perspectivas Futuras...

Este tema, incidirá sobre as questões referentes às actuais propostas terapêuticas para a malária, seus decorrentes problemas, como seja as resistências, e que hipóteses temos para contornar os problemas na terapêutica actual através da procura de novas alternativas terapêuticas.

Não obstante, torna-se necessário, em primeiro lugar, conhecer a dinâmica biológica e epidemiológica inerentes à malária. Serve então a introdução a este tema, para desbravar o actual conhecimento acerca da epidemiologia da malária, com o objectivo de perceber se há realmente a necessidade de procurar novas hipóteses terapêuticas, e se essa necessidade existe, o porquê.

Sabe-se que a malária é, hoje em dia, uma das doenças com maior prevalência a nível mundial, tendo como agentes etiológicos predominantes o *Plasmodium vivax*, o *Plasmodium ovale*, o *Plasmodium Knowlesi* e por fim, o mais letal, o *Plasmodium falciparum*, sendo este predominantemente encontrado em África (Gething *et al.*, 2011).

A malária apresenta como número de casos estimados 154-289 milhões, causando anualmente 660.000 mil mortes. Mais, oitenta por cento dos casos estimados ocorrem na África sub-sariana, sendo que desses, oitenta e seis por cento das mortes ocorrem em crianças de idade inferior a 5 anos de idade (WHO | *World Malaria Report 2012*).

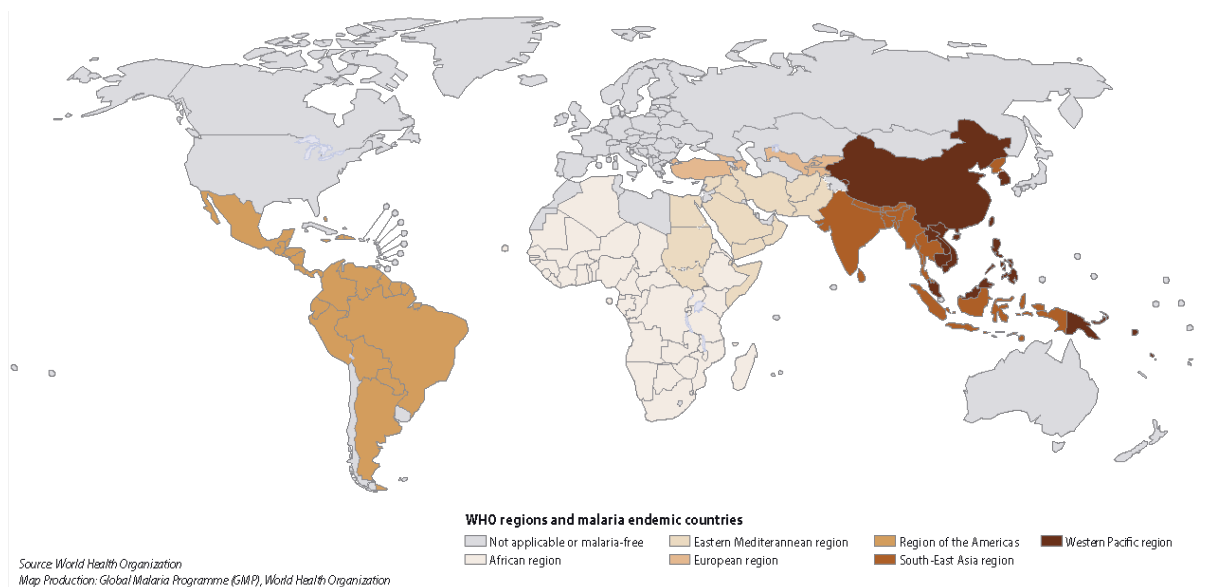


Figura I- Países endêmicos de malária, adaptado de (WHO | *World Malaria Report 2012*).

Estima-se ainda, que o número real de mortes atribuídas à malária seja o dobro do estimado, aquando da inclusão em estudos, dos casos de malária não diagnosticados ou que carecem de tratamento (Murray et al., 2012).

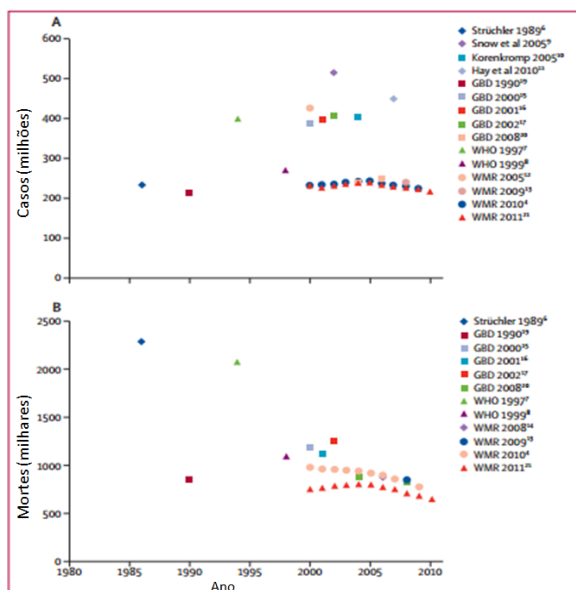


Ilustração 2- Comparação global de estimativas casos prévios de malária (A) e mortes (B) em indivíduos de todas as idades, de 1980 a 2010, adaptado de (Murray et al., 2012).

que a malária representa em África, ronda os 12 mil milhões por ano, ao mesmo tempo que as vendas de antimaláricos apresentam valores de magnitude imensamente inferior (Kar and Kar, 2010), o que se prende provavelmente com o facto da terapêutica actual já não ser completamente eficaz, o que leva à não adesão dos doentes à terapêutica, abrindo, estes factos oportunidades não só do foro da saúde, mas também do foro económico, para que seja razoável o investimento de tempo, dinheiro e conhecimento na descoberta de novas e melhores alternativas terapêuticas.

Tendo estes valores em conta e sabendo que, perante as actuais terapêuticas, o *Plasmodium* revela bastantes resistências, como será explanado, mais tarde no ponto referente à terapêutica actual, começa a ser clara a real necessidade e importância de novas descobertas terapêuticas, as quais serão abordadas no último ponto desta monografia. Não obstante, é ainda necessário explorar outro factor: o custo associado à malária, sendo este um dos factores mais preponderantes na decisão económica de investimento em I&D por parte dos laboratórios e indústrias farmacêuticas. Neste caso, o custo económico

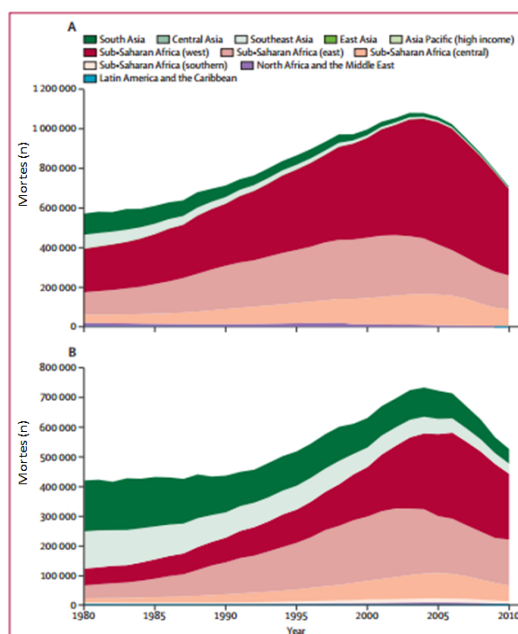


Ilustração 3- Mortes por malária em crianças de idade inferior a 5 anos (A) e em indivíduos de idade igual ou superior a 5 anos (B), de 1980 a 2010 adaptado de (Murray et al., 2012).

# Ciclo de vida da malária: As suas quatro fases

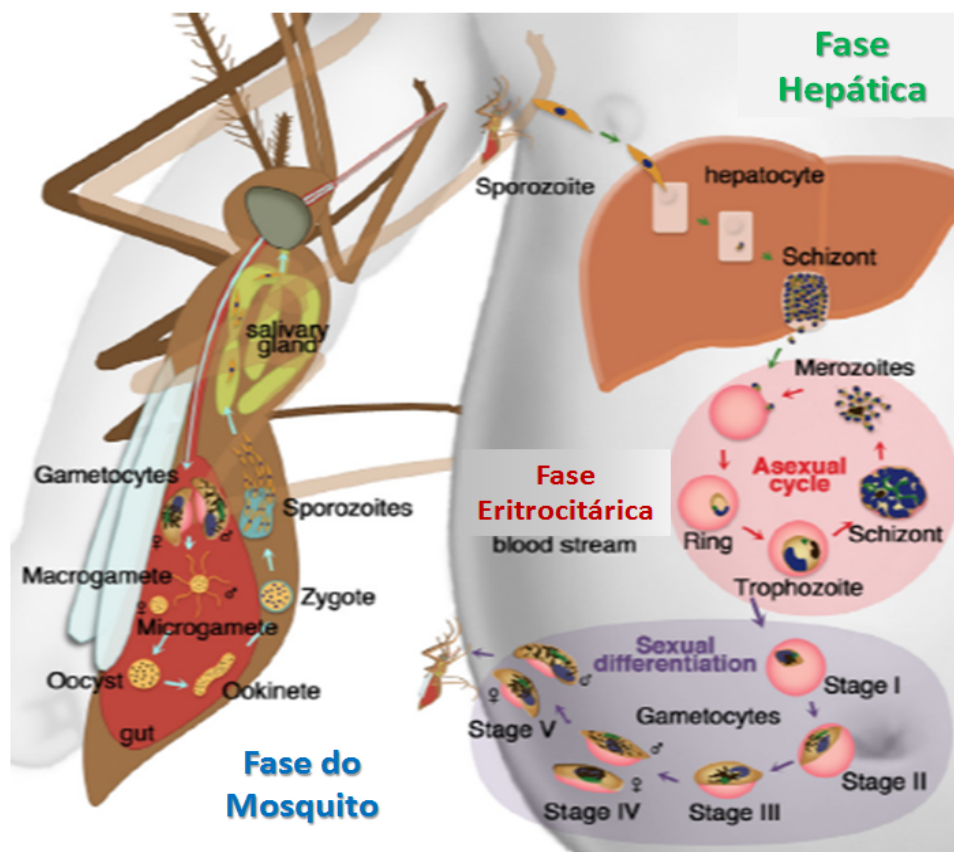


Figura 4 – Ciclo de vida do Plasmodium, fases, no fígado, eritrocitária, de transmissão e no mosquito, adaptado de (Biamonte, Wanner and Roch, Le, 2013).

A malária apresenta como sintomatologia inicial a febre terçã ou quartã, e quando não tratada desenvolve falência de vários órgãos predominantemente fígado e rins, podendo em última instância e no caso do *Plasmodium falciparum*, acumular-se no encéfalo originando a malária cerebral. Toda esta sintomatologia prende-se com o complexo ciclo de vida do parasita, sendo este possível de se resumir em 4 fases: no fígado, eritrocitária, de transmissão, e no mosquito. Torna-se relevante conhecê-las e compreendê-las para que seja possível direcionar a terapêutica, para a prevenção, controle da sintomatologia ou cura da doença.

Passa-se então de seguida a uma breve explanação de cada uma delas.

## Fase no fígado

Quando os parasitas, na forma de esporozoíto, são inoculados no organismo através do mosquito, entram na corrente sanguínea e em 30 minutos alojam-se nos hepatócitos do fígado, replicando-se e originando os esquizontes. No caso do *Plasmodium vivax*, cuja letalidade tem sido sub-valorizada (Battle et al., 2012), e do *Plasmodium ovale*, estes podem ficar num estado de latência no fígado, na forma de hipnozoítos, podendo desta forma causar recidivas anos após a primeira infecção.

Medicamentos que atuam na fase do fígado revelam a sua importância na prevenção do desenvolvimento da doença e providenciam a erradicação do parasita, na tentativa de uma “cura radical” para *Plasmodium vivax* e *Plasmodium ovale* (Biamonte, Wanner and Roch, Le, 2013).

## Fase eritrocitária

Aproximadamente 5 a 10 dias depois, os hepatócitos lisam, e os merozoítos são libertados para a corrente sanguínea invadindo os eritrócitos, onde rapidamente proliferam, causando febres altas e a patologia propriamente dita seguidamente na fase intraeritrocítica os merozoítos, num processo de reprodução assexuada, metamorfoseiam-se em anéis, trofozoítos e em esquizontes libertando em média 20 merozoítos para a corrente sanguínea infetando novos eritrócitos.

Medicamentos que atuam nesta fase são importantes para controlar os sintomas da doença e a mortalidade associada (Biamonte, Wanner and Roch, Le, 2013).

## Fase de transmissão

Após vários ciclos de reprodução assexuada, alguns parasitas diferenciam-se em gametócitos masculinos e femininos com metade dos cromossomas do cariótipo do parasita (Biamonte, Wanner and Roch, Le, 2013).



## Fase no mosquito

Quando o parasita é ingerido pelo mosquito através da picada, os gametócitos masculinos e femininos fundem-se no estômago, deste, formando um oócisto, que se desenvolverá num oócinete, e posteriormente num novo esporozoítio pronto para infetar o próximo humano.

Medicamentos que atuam nas fases de transmissão e no mosquito são importantes para prevenir a infecção de outros seres humanos, funcionando a favor da erradicação da doença (Biamonte, Wanner and Roch, Le, 2013).

## Terapêutica actual: Mecanismo de acção e resistências

Na actualidade as terapias combinadas à base de artemisina (ACTs) são as mais utilizadas no tratamento de casos menos graves de malária (Biamonte, Wanner and Roch, Le, 2013).

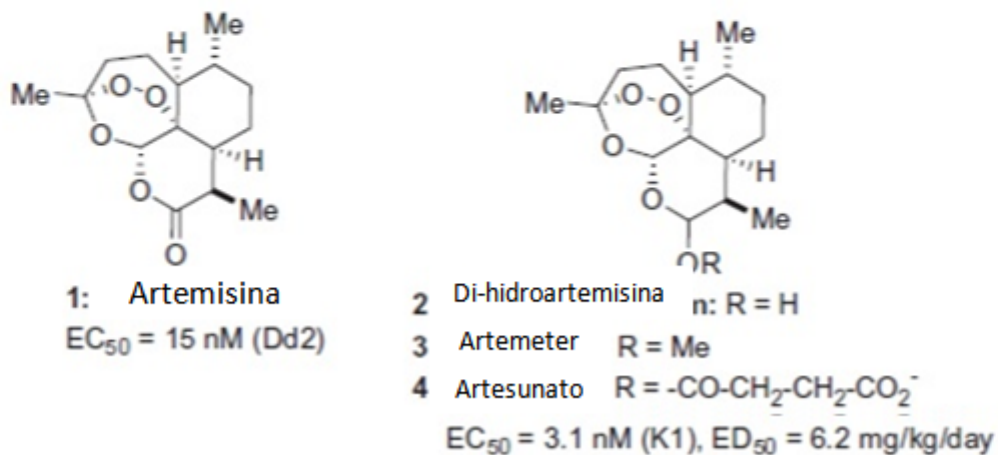


Figura 5 – Artemisina e derivados adaptado de (Biamonte, Wanner and Roch, Le, 2013).

A artemisina e seus derivados apresentam um começo de ação rápido, contudo também se consomem rapidamente no organismo ( $t_{1/2}$  humano  $\sim 1h$ ) (Morris *et al.*, 2011). Por essa razão, a sua administração é combinada com medicamentos com maior tempo de

semi-vida no organismo, de modo a atingir uma maior eficácia no tratamento, matando os parasitas residuais.

Os medicamentos mais comumente utilizados para esta terapêutica combinada incluem a lumefantrina ( $t_{1/2}$  humano = 3-4 dias) (Djimdé and Lefèvre, 2009) e a piperaquina ( $t_{1/2}$  humano = 8-16 dias) (Röshammar *et al.*, 2006).

A associação de fármacos mais comum, na forma de comprimidos, consiste em arteméter, 20 mg, e lumefantrina, 120 mg, vendido com o nome de Coartem<sup>TM</sup> pela Novartis (Omari, Gamble and Garner, 2005). A sua posologia acaba por ser um dos seus pontos negativos, pois para adultos, a toma é de quatro comprimidos duas vezes ao dia, durante três dias (*Coartem Monograph for Professionals - Drugs.com*). No entanto, o cumprimento deste regime de toma de seis doses é variável, devido ao abandono desta terapêutica, o que para além de não completar a cura, leva à origem de resistências (Lemma, Löfgren and San Sebastian, 2011). As terapias combinadas à base de artemisina complementaram os tratamentos com sulfadoxina e pirimetamina, que, por sua vez, são substitutos da cloroquina.

Em casos graves de malária o tratamento preferido usa medicamentos constituídos por artesunato parenteral (Dondorp *et al.*, 2010).

Relativo à fase no fígado, do ciclo de vida da malária, a primaquina é o único medicamento aprovado para eliminar hipnozoítos (forma de latência).

Para o tratamento profilático, é preferido o tratamento com atovaquona-proguanil por ser bem tolerado, embora seja caro, podendo este factor provocar o abandono da terapêutica.

Relativamente à fase de transmissão, a primaquina é o único fármaco ativo registado contra o gametócito maduro.

As resistências aos vários fármacos antimaláricos, por parte do parasita, está bem documentada (Dondorp *et al.*, 2010), sendo realmente preocupante a emergente resistência a artemisininas (Dondorp *et al.*, 2010) (White, 2012). Em resposta a estas resistências, tenta-se combinar os fármacos para limitar o desenvolvimento de resistências, através da morte do maior número possível de parasitas. Mas não é uma técnica infalível. Por exemplo, em determinadas áreas do Camboja, a percentagem de doentes que permaneceram infetados pelo parasita, três dias após o tratamento combinado de dihidroartemisina-piperaquina aumentou de 26% para 45% em 2010 (Fairhurst *et al.*, 2012). Este problema requer a criação de novos medicamentos. O desafio, não é só a diminuição da resistência aos fármacos, mas também que estes sejam de acção rápida, seguros para crianças e mulheres grávidas, e, idealmente, sejam passíveis de ter uma posologia de toma única. Um bom exemplo desta

complicada tarefa é a mefloquina. Este é o único fármaco registado que atua eficazmente com uma só toma ( $t_{1/2}$  humano = 2-4 semanas, dose para adulto = 1250 mg) (*Mefloquine - FDA prescribing information, side effects and uses*). Contudo, a resistência ao fármaco é problemática, tal como o é no caso da sulfadoxina-pirimetamina, o único antimalárico combinado eficaz no mercado.

A combinação de um derivado de artemisinina com medicamentos de consumo lento, pode curar a malária com uma toma única. A combinação de artemisinina (1000 mg) e naftoquina (400 mg), introduzida pelo exército Chinês, aparenta ser eficaz numa toma única de 8 comprimidos (ARCO, Fase III) (Liu, Dong and Jiang, 2012) (Tun *et al.*, 2009).

Pensa-se que a ação antimalárica da artemisinina envolve a quebra da ligação peróxido pelo Fe (II) encontrado nos grupos heme, formando assim radicais tóxicos de oxgéio. Peróxidos sintéticos são bons substituintes da artemisinina, como será abordado mais tarde no ponto das terapêuticas futuras.

Ozonídeo OZ277 de primeira geração, conhecido como arterolano, inibe o crescimento de linhagens de parasitas resistentes à cloroquina (KI) e sensíveis a cloroquina (NF54) com um  $IC_{50} = 1.6-1.8$  nM (Dong *et al.*, 2010).

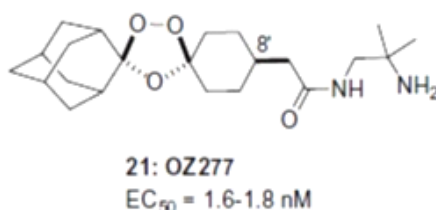


Figura 6 – Ozonídeo OZ277 adaptado de (Biamonte, Wanner and Roch, Le, 2013).

O peróxido OZ439 de segunda geração ( $EC_{50} = 3.4-4.0$  nM) encontra-se em Fase IIa de estudos clínicos. O facto de possuir um grupo 8'-arilo em vez de um grupo 8'-alquilo (Charman *et al.*, 2011), uma modificação aparentemente inofensiva traz consequências, pois a estabilidade da ligação O-O em relação ao Fe(II) aumenta 50 vezes, provavelmente por razões estéricas, traduzindo-se num tempo de meia vida muito maior quer em ratos ( $t_{1/2} = 20$  horas para o OZ439 vs. 1 hora para o OZ277) quer no ser humano ( $t_{1/2} = 25-30$  horas para OZ439) (Charman *et al.*, 2011), (Moehrle *et al.*, 2013).

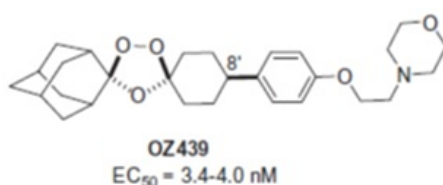


Figura 7 – Ozonídeo OZ439 adaptado de (Biamonte, Wanner and Roch, Le, 2013).

O perfil farmacocinético melhorado torna o OZ439 capaz de curar completamente ratos com malária numa toma única de 20 mg/kg, o que derivados da artemisinina foram incapazes de atingir sem a adição de um fármaco secundário. Ademais, OZ439 tem uma significativa atividade profilática, tendo uma dose oral única de 30 mg/kg de OZ439, administrada 48 horas antes da inoculação do parasita, um efeito protector. Estes ozonídeos são sintetizados a partir de um derivado de uma oxima e uma cetona na presença de ozono.

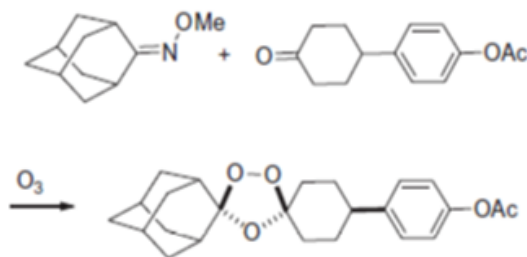


Figura 8 – Reação de formação de OZ439 a partir de oxima e uma cetona, na presença de ozono adaptado de (Biamonte, Wanner and Roch, Le, 2013).

## Descoberta de fármacos antimaláricos: modelos eficazes para o seu screening

Nas duas últimas décadas, como mencionado anteriormente, o controlo e tratamento da malária tem-se tornado cada vez mais difícil devido ao crescente número de resistências dos parasitas às actuais terapêuticas. De modo a combater este problema é necessário o desenvolvimento de novos fármacos, que sejam seguros, mais eficazes, mais potentes e de preferência, de toma diária única. Neste sentido, a realização de testes *in vitro* e *in vivo*, tem um papel fulcral, na avaliação dos fármacos.

A actividade anti-malárica deve-se a uma grande variedade de factores, associados tanto ao parasita quanto ao hospedeiro, e nos testes *in vitro* é demonstrado, de maneira precisa, os efeitos "isolados" dos compostos sobre o metabolismo do parasita. Contudo, a avaliação da actividade anti-malárica dos compostos é feita tanto por testes *in vitro*, como por testes *in vivo*, pois os dados obtidos pelos testes *in vitro* requerem sempre confirmação com modelos vivos (Nogueira and Rosário, 2010).

Relativamente aos testes *in vivo*, estes são realizados em modelos animais, particularmente primatas, pois as espécies de *Plasmodium spp.* são incapazes de infectar outras espécies animais, excepcionando um complexo modelo de ratos imunocomprometidos, desenvolvido especificamente para receber eritrócitos humanos infectados com o *Plasmodium falciparum*. Assim, já se realizaram estudos em primatas não humanos, pois estes proporcionam o modelo mais análogo ao humano, com resultados de eficácia e farmacocinética mais semelhantes aos resultados expectáveis no Homem, do que os modelos de roedores. No entanto, o uso desse modelo animal tem-se tornado difícil devido a questões de ordem económica e ética: uma quantidade limitada de símios, a pequena quantidade de linhagens de parasitas adaptadas para causar infecção em primatas e a diferente patologia apresentada por esses modelos. (Nogueira and Rosário, 2010) Consequentemente, a maior parte dos estudos experimentais sobre malária *in vivo* baseou-se no uso de roedores infectados com o *P. berghei*, *P. yoelii*, *P.* e *P. vinckei chabaudi* (Fidock *et al.*, 2004).

Nestes testes é avaliada a eliminação dos parasitas, detectados por meio de microscopia óptica ou outros métodos mais sensíveis (reação em cadeia da polimerase – PCR), o tempo gasto entre a última dose de fármaco e a diminuição/eliminação da parasitemia e a dosagem de fármaco que elimina os parasitas como resposta à sua utilização.

No que toca, aos testes *in vivo*, ainda tem de ser considerado, que factores externos, como a imunidade, as variações na absorção do composto e no metabolismo, são reduzidos devido ao uso de animais ainda não expostos (naive), de linhagens reconhecidas. No entanto, a atividade antimalárica medida num teste *in vivo* nem sempre tem em consideração factores colaterais, como o metabolismo e a genética do hospedeiro, o que pode influenciar o resultado do teste (Nogueira and Rosário, 2010).

Respeitante, aos testes *in vitro*, estes não se deparam com alguns dos problemas supra mencionados, pois baseiam-se na capacidade da realização de culturas de *Plasmodium falciparum* em eritrócitos humanos, com um hematócrito de 5%, normalmente a 37 °C, sob redução de oxigénio (geralmente 3–5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 90–92% N<sub>2</sub>), em meio de cultura (RPMI 1640) e soro humano ou albumax (albumina sérica bovina rica em lípidos). Posteriormente, é adicionada <sup>3</sup>H-hipoxantina, que é utilizada pelo parasita, para recuperação da purína e para a síntese do DNA, para determinar o nível de inibição de crescimento do *Plasmodium falciparum*. Na maioria dos testes, os parasitas são cultivados em concentrações diferentes do composto teste, contendo em média, quantidades reduzidas de hipoxantinas, após o que é adicionada a <sup>3</sup>H-hipoxantina, para contagens de radioactividade adicionais. A inibição do

crescimento de 50% dos parasitas (IC50) foi determinada através de segmentos lineares das curvas de dose-resposta, em função de regressão linear. O cálculo é feito através da percentagem de sobrevivência dos parasitas nos grupos tratados com compostos em relação ao grupo controlo não tratado, onde 100% de sobrevivência dos parasitas é observada. Apesar da incorporação <sup>3</sup>H-hipoxantina ser o método mais comumente utilizado para analisar a actividade antimalárica *in vitro*, este é caro, radioactivo e bastante complexo, e, portanto, problemático para locais com poucos recursos. Uma alternativa de baixo custo para testar um pequeno número de compostos é incubar parasitas com os compostos teste (tipicamente para 48 ou 72 horas) e um grupo de controlo e, em seguida, o desenvolvimento dos parasitas deverá ser avaliado por microscopia óptica, de esfregaços sanguíneos corados com Giemsa (um marcador de ácidos nucleicos, utilizado para distinguir o parasitas das outras células) (Fidock *et al.*, 2004).

Estudos *in vitro* e *in vivo* são direccionados para a selecção de compostos. A aplicação dos conhecimentos de química medicinal e optimização da molécula líder, são partes essenciais, no desenvolvimento de um medicamento. Os testes *in vivo* secundários, embora não sejam um requisito, são úteis para detalhar a avaliação do composto, como seja, o ajuste do intervalo entre a dose mínima efectiva e a dose tóxica, a dose de início de actividade e recrudescência, a dose profilática, e finalmente, a procura de resistências (Fidock *et al.*, 2004).

## Terapêutica: Perspectivas futuras...

As perspectivas futuras para o tratamento da malária, tornam-se uma necessidade quando se verifica após uma resistência generalizada, a nível mundial, à cloroquina um dos medicamentos outrora mais utilizados (Kumar, Singh and Rawat, 2012).

Por conseguinte o governo chinês lançou um programa, em 1967, com o objectivo de explorar plantas medicinais tradicionais, (Klayman, 1985), (Butler and Wu, 1992), no qual foi isolada, a partir da planta *Artemisia annua*, a artemisina (Wu, 2002) tornando-se o melhor antimalárico disponível para a época, no tratamento de infecções de malária relacionadas com o *Plasmodium falciparum*.(Haynes, 2006). No entanto, esta revelou fracas propriedades farmacocinéticas (Posner and O'Neill, 2004; Vroman, Alvim-Gaston and Avery, 1999) o que, com a descoberta dos seus derivados, anteriormente abordados, impulsionou a investigação de peróxidos como potenciais substitutos da terapêutica tradicional.

Estas investigações levaram a que os peróxidos estruturalmente mais simples a emergir fossem os 1,2,4,5-tetraoxanos, (Vroman, Alvim-Gaston and Avery, 1999), que são di-hidroperóxidos de cetonas e aldeídos, contendo dois grupos peroxi num heterociclo (Masuyama *et al.*, 2005), (Dong, 2002).

Os tetraoxanos abordados nesta monografia serão os tetraoxanos com transportador esteróide, em detrimento dos tetraoxanos derivados de cicloalcanonas, derivados de benzaldeídos substituídos, , tetraoxanos-aminados e conjugados com aminoquinolina, devido ao facto de serem os mais promissores

No entanto, comecemos por explicar o seu mecanismo de acção.

## Mecanismo de acção

De acordo com os estudos mecanísticos realizados na artemisina e outros peróxidos relacionados, chegou-se à conclusão que estes compostos matam o *Plasmodium falciparum* através de radicais de carbono, formados a partir do ferro (II) incluso no grupo heme (O'Neill and Posner, 2004) ou não-heme, ocorre um rearranjo do radical-O, inicial, para o radical centrado no carbono, através da troca 1,5-H ou de uma fissão- $\beta$  (Kumar, Singh and Rawat, 2012).

Estes radicais, vão oxidar as membranas fosfolipídicas tanto das hemácias como dos parasitas, levando então à sua morte (Berman and Adams, 1997).

Este tipo de medicamentos actuaram na fase eritrocítica do ciclo de vida do *Plasmodium*, sendo úteis no combate da sintomatologia e cura da doença.

## Tetraoxanos com transportadores esteróides

Este tipo de tetraoxanos, baseia-se na ligação de tetraoxanos a transportadores esteróides, que devido ao seu carácter anfifílico têm a capacidade de aumentar o carácter lipofílico destes medicamentos, com a finalidade de melhorar a permeabilidade, destes medicamentos, na bi-camada fosfolipídica, melhorando assim, a entrada na célula e por conseguinte a sua eficácia (Kumar, Singh and Rawat, 2012).

No entanto, estes compostos, apresentam como principal limitação o facto de apenas serem activos enquanto as posições C3 e C6 estiverem livres para modificações químicas.

Tendo isto em conta, Solaja *et al.* conseguiram um *design* no qual aliaram a diminuição do peso molecular com a retenção da funcionalidade do transportador esteróide, através da

criação de uma molécula assimétrica, na qual numa extremidade se encontra o esteróide e alcanos de cadeia simples, enquanto que na outra extremidade se encontra o tetraoxano. Esta hipótese levou à criação de 41 compostos assimétricos diferentes (Solaja *et al.*, 2002).

Deve-se dar relevância ao isolamento do di-hidroperóxido como o passo chave desta síntese. A título de exemplo, refere-se na figura 9 alguns tetraoxanos preparados por Kumar *et al.*, 2012.

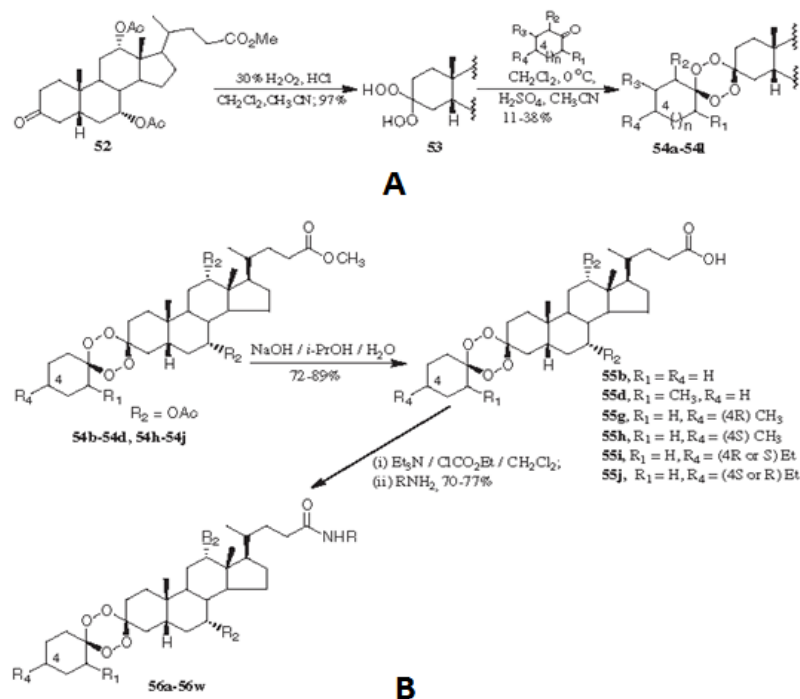


Figura 9 – Processo de síntese de tetraoxanos assimétricos com transportadores esteróides: (A) processo com a formação do di-hidroperóxido e (B) obtenção das n-propilamidas adaptado de (Kumar, Singh and Rawat, 2012).

De seguida, todos estes compostos foram testados quanto à sua eficácia contra os clones D6 e W2 do *Plasmodium falciparum*, chegando-se à conclusão que todos foram mais efectivos contra o clone D6, com a excepção do composto 54e, e dos compostos que continham éter como grupo substituinte: 54i, 54j, 56o, 56p e 56v, como demonstrado na tabela I. (Kumar, Singh and Rawat, 2012).

Composto	N	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	IC <sub>50</sub> (nM)	
						W2	D6
54a	0	H	H	H	H	27.67	39.14
54b	1	H	H	H	H	16.96	21.47
54c	3	H	H	H	H	20.0	48.44
54d	1	CH <sub>3</sub>	H	H	H	15.64	27.03
54e	1	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	357.08	31.18
54g	1	H	H	H	(4R)CH <sub>3</sub>	5.05	9.99
54h	1	H	H	H	(4R)CH <sub>3</sub>	13.16	24.64
54i	1	H	H	H	(4R or S)Et	15.46	6.73
54j	1	H	H	H	(4S or R)Et	28.31	17.70
54l	1	H	H	H	(4S or R)t-Bu	27.77	51.87
Artemisinin						7.3	8.4



Tabela I – Atividade anti-malária dos tetraoxanos com transportador esteróide (Kumar, Singh and Rawat, 2012).

Foi também observado que estes tetraoxanos contendo grupos amida e com substituintes metilo ou etilo em C-4, são mais activos (cerca de 9x mais potentes) que os seus pares quando substituídos por ácidos ou ésteres. Com a excepção das n-propilamidas (56o e 56w) que são inactivas, sendo a amida primária mais activa o composto 56h, que apresenta um  $IC_{50}(D6) = 1,17$  nM e um  $IC_{50}(W2) = 0,58$  nM, como se poderá verificar na tabela II. (Opsenica *et al.*, 2000).

Tabela II – Atividade anti-malária, *in vitro* das amidas e dos ácidos 4-substituídas, contra o *Plasmodium falciparum*. (Kumar, Singh and Rawat, 2012).

Composto	R <sub>1</sub>	R <sub>4</sub>	IC <sub>50</sub> (nM)	
			W2	D6
56a	H	H	4.74	11.83
56b	n-Pr	H	6.80	14.76
56c	CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	10.77	22.01
56d	H	CH <sub>3</sub>	11.12	17.31
56e	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	10.02	15.22
56f	Et	CH <sub>3</sub>	6.97	12.65
56f	n-Pr	CH <sub>3</sub>	9.29	13.15
56g	H	(4R)CH <sub>3</sub>	0.58	1.17
56h	CH <sub>3</sub>	(4R)CH <sub>3</sub>	3.61	5.96
56i	Et	(4R)CH <sub>3</sub>	3.93	5.80
56j	n-Pr	(4R)CH <sub>3</sub>	3.82	3.22
56k	H	(4S)CH <sub>3</sub>	14.10	20.04
56l	CH <sub>3</sub>	(4S)CH <sub>3</sub>	11.87	16.66
56m	Et	(4S)CH <sub>3</sub>	9.93	15.59
56n	n-Pr	(4S)CH <sub>3</sub>	83.01	84.94
56o	H	(4R, or 4S)Et	10.71	8.40
56p	CH <sub>3</sub>	(4R, or 4S)Et	7.82	7.21
56q	Et	(4R, or 4S)Et	9.56	19.79
56r	n-Pr	(4R, or 4S)Et	4.51	8.34
56s	H	(4S, or 4R)Et	12.52	31.06
56t	CH <sub>3</sub>	(4S, or 4R)Et	6.15	27.95
56u	Et	(4S, or 4R)Et	18.07	23.14
56v	n-Pr	(4S, or 4R)Et	122.28	90.15

Foram já sintetizados e avaliados, alguns 1,2,4,5,- tetraoxanos com transportador bi-esteróide, e amidas terminais (62a-62e), quanto à sua actividade anti-malária, tendo como resultados, conseguirem essa acção em quantidades sub micromolares (0.024 a 0.13 mM contra o clone D6 e 0,019 a 0,03 contra o clone W2 do *Plasmodium falciparum*). (Opsenica *et al.*, 2003).

Chegou-se à conclusão que as amidas terciárias 62c e 63c, com moléculas rígidas induzidas pela piperidina são mais activas que os compostos de cadeia aberta (62b e 63b), como se pode observar na figura 10.

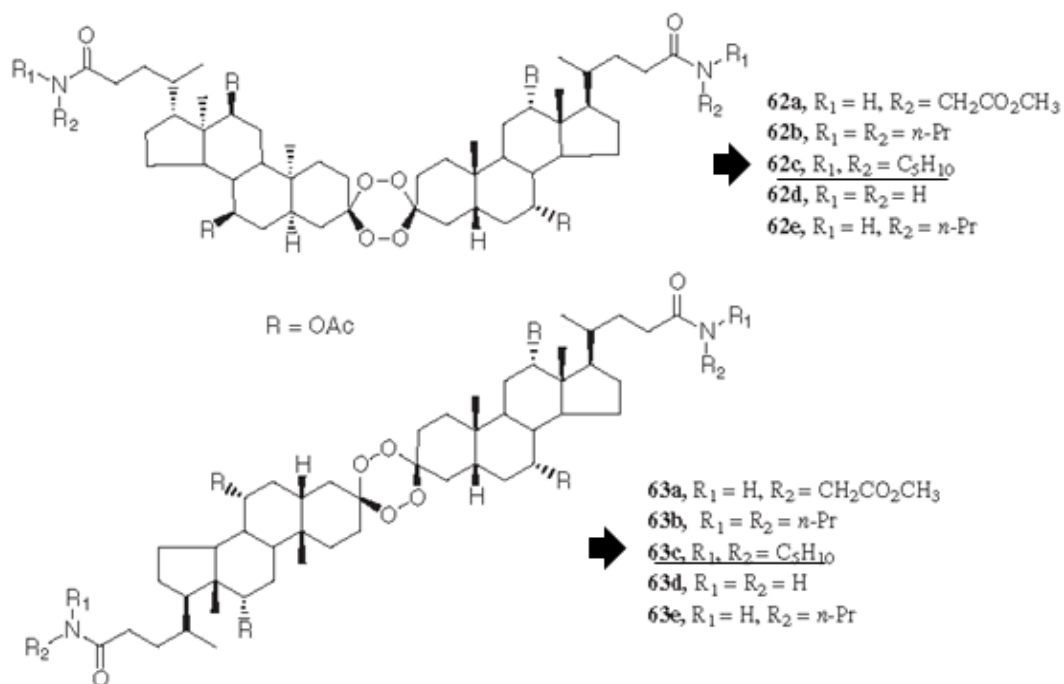


Figura 10 – Exemplos de moléculas 1,2,4,5,- tetraoxanos com transportador bi-esteróide e amidas terminais adaptado de (Kumar, Singh and Rawat, 2012).

# Conclusões

Atingido o final desta monografia, percebe-se a grande importância e necessidade da procura de novas alternativas terapêuticas para o tratamento de malária. Na introdução apresenta-se a relevância mundial da malária e do seu tratamento, focando-se aspectos epidemiológico, e económicos.

Neste sentido, verificou-se também que embora complexo, o ciclo de vida da malária, pode ser interrompido e atacado, em qualquer uma das suas quatro fases, sendo que é mais proveitoso controlar a fase sanguínea, de modo a diminuir a mortalidade e a morbilidade dos infectados, mas não devemos esquecer a fase de transmissão, sendo esta importantíssima no controlo da propagação bem como na tentativa de erradicação da doença.

Quanto, á terapêutica actual, deve-se entender que, embora já tenha contribuído muito para o declínio do número de infectados e mortos por infecção, encontra-se de momento aquém das expectativas, devido a factores, como sejam: a complexa posologia da terapêutica, com um elevado número de tomas, durante vários dias, o seu elevado custo e difícil introdução no continente africano, que muitas vezes é dependente da boa vontade de outros estados e organizações a nível mundial, e, finalmente mais relevante para este trabalho as resistências, que se verificam para todos os medicamentos utilizados, sendo que em alguns já não se observa qualquer eficácia.

Mais, conclui-se que a investigação de novos fármacos antimaláricos não é de todo fácil, por razões éticas, pois o *Plasmodium falciparum* não infecta ratos e a utilização de primatas em ensaios *in vivo* não está muito bem esclarecida, e económicas, sendo os processos de investigação muito longos e caros.

Apresenta-se um tipo de tetraoxanos nesta monografia, os tetraoxanos com transportador esteróide, que são moléculas bastante complexas, sob o ponto de vista químico, mas foram estas as escolhidas, porque são uma descoberta recente e consequente à de outras moléculas semelhantes, mais importante, é o facto de que entre os seus pares são as que apresentam melhores hipóteses terapêuticas, principalmente os tetraoxanos com dois transportadores esteróides e aminados no carbono terminal.

Em suma, espera-se que brevemente seja aumentado o nível de financiamento, para as pesquisas de novos antimaláricos de modo a que seja possível, salvar um maior número de vidas e erradicar uma das doenças que mais mata a nível mundial.

# Bibliografia e Webgrafia

BATTLE, Katherine E. *et al.* - The global public health significance of *Plasmodium vivax*. **Advances in parasitology**. . ISSN 0065-308X. 80:2012) 1–111. doi: 10.1016/B978-0-12-397900-1.00001-3.

BERMAN, P. A.; ADAMS, P. A. - Artemisinin enhances heme-catalysed oxidation of lipid membranes. **Free radical biology & medicine**. . ISSN 0891-5849. 22:7 (1997) 1283–8.

BIAMONTE, Marco A.; WANNER, Jutta; ROCH, Karine G. LE - Recent advances in malaria drug discovery. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**. . ISSN 1464-3405. 23:10 (2013) 2829–2843. doi: 10.1016/j.bmcl.2013.03.067.

BUTLER, Anthony R.; WU, Yu-Lin - Artemisinin (qinghaosu): a new type of antimalarial drug. **Chemical Society Reviews**. . ISSN 0306-0012. 21:2 (1992) 85. doi: 10.1039/cs9922100085.

CHARMAN, Susan A. *et al.* - Synthetic ozonide drug candidate OZ439 offers new hope for a single-dose cure of uncomplicated malaria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. . ISSN 1091-6490. 108:11 (2011) 4400–5. doi: 10.1073/pnas.1015762108.

## Coartem Monograph for Professionals - Drugs.com

DJIMDÉ, Abdoulaye; LEFÈVRE, Gilbert - Understanding the pharmacokinetics of Coartem. **Malaria journal**. . ISSN 1475-2875. 8 Suppl 1:Suppl 1 (2009) S4. doi: 10.1186/1475-2875-8-S1-S4.

DONDORP, Arjen M. *et al.* - Artemisinin resistance: current status and scenarios for containment. **Nature reviews. Microbiology**. . ISSN 1740-1534. 8:4 (2010) 272–80. doi: 10.1038/nrmicro2331.

DONDORP, Arjen M. *et al.* - Artesunate versus quinine in the treatment of severe falciparum malaria in African children (AQUAMAT): an open-label, randomised trial. **Lancet**. . ISSN 1474-547X. 376:9753 (2010) 1647–57. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61924-1.

DONG, Yuxiang - Synthesis and antimalarial activity of 1,2,4,5-tetraoxanes. **Mini reviews in medicinal chemistry**. . ISSN 1389-5575. 2:2 (2002) 113–23.

DONG, Yuxiang *et al.* - The structure-activity relationship of the antimalarial ozonide arterolane (OZ277). **Journal of medicinal chemistry**. . ISSN 1520-4804. 53:1 (2010) 481–91. doi: 10.1021/jm901473s.

FAIRHURST, Rick M. *et al.* - Artemisinin-resistant malaria: research challenges, opportunities, and public health implications. **The American journal of tropical medicine and hygiene**. . ISSN 1476-1645. 87:2 (2012) 231–41. doi: 10.4269/ajtmh.2012.12-0025.

FIDOCK, David A *et al.* - Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening. **Nature reviews. Drug discovery**. . ISSN 1474-1776. 3:6 (2004) 509–20. doi: 10.1038/nrd1416.

GETHING, Peter W. *et al.* - A new world malaria map: Plasmodium falciparum endemicity in 2010. **Malaria journal**. . ISSN 1475-2875. 10:2011) 378. doi: 10.1186/1475-2875-10-378.

HAYNES, Richard - From Artemisinin to New Artemisinin Antimalarials: Biosynthesis, Extraction, Old and New Derivatives, Stereochemistry and Medicinal Chemistry Requirements. **Current Topics in Medicinal Chemistry**. . ISSN 15680266. 6:5 (2006) 509–537. doi: 10.2174/156802606776743129.

KAR, Santwana; KAR, Santosh - Control of malaria. **Nature reviews. Drug discovery**. . ISSN 1474-1784. 9:7 (2010) 511–2. doi: 10.1038/nrd3207.

KLAYMAN, D. - Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. **Science**. . ISSN 0036-8075. 228:4703 (1985) 1049–1055. doi: 10.1126/science.3887571.

KUMAR, Nitin; SINGH, Ram; RAWAT, Diwan S. - Tetraoxanes: synthetic and medicinal chemistry perspective. **Medicinal research reviews**. . ISSN 1098-1128. 32:3 (2012) 581–610. doi: 10.1002/med.

LEMMA, Hailemariam; LÖFGREN, Curt; SAN SEBASTIAN, Miguel - Adherence to a six-dose regimen of artemether-lumefantrine among uncomplicated Plasmodium falciparum patients in the Tigray Region, Ethiopia. **Malaria journal**. . ISSN 1475-2875. 10:1 (2011) 349. doi: 10.1186/1475-2875-10-349.

LIU, Rong; DONG, Hui-Fen; JIANG, Ming-Sen - A pharmacokinetic approach to assess artemisinin-naphthoquine combination therapy for uncomplicated pediatric malaria. **Expert review of clinical pharmacology**. . ISSN 1751-2441. 5:5 (2012) 521–4. doi: 10.1586/ecp.12.40.

MASUYAMA, A. *et al.* - 1,2,4,5-Tetraoxacycloalkanes: synthesis and antimalarial activity. **Mini reviews in medicinal chemistry**. . ISSN 1389-5575. 5:11 (2005) 1035–43.

### **Mefloquine - FDA prescribing information, side effects and uses -**

MOEHRLE, Joerg J. *et al.* - First-in-man safety and pharmacokinetics of synthetic ozonide OZ439 demonstrates an improved exposure profile relative to other peroxide antimalarials. **British journal of clinical pharmacology**. . ISSN 1365-2125. 75:2 (2013) 524–37. doi: 10.1111/j.1365-2125.2012.04368.x.

MORRIS, Carrie A *et al.* - Review of the clinical pharmacokinetics of artesunate and its active metabolite dihydroartemisinin following intravenous, intramuscular, oral or rectal administration. **Malaria journal**. . ISSN 1475-2875. 10:2011) 263. doi: 10.1186/1475-2875-10-263.

MURRAY, Christopher J. L. *et al.* - Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. **Lancet**. . ISSN 1474-547X. 379:9814 (2012) 413–31. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60034-8.

NOGUEIRA, Fátima; ROSÁRIO, Virgílio Estólio Do - Methods for assessment of antimalarial activity in the different phases of the Plasmodium life cycle. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**. . ISSN 2176-6223. 1:3 (2010) 109–124. doi: 10.5123/S2176-62232010000300015.

O'NEILL, Paul M.; POSNER, Gary H. - A medicinal chemistry perspective on artemisinin and related endoperoxides. **Journal of medicinal chemistry**. . ISSN 0022-2623. 47:12 (2004) 2945–64. doi: 10.1021/jm030571c.

OMARI, A. A. A.; GAMBLE, C.; GARNER, P. - Artemether-lumefantrine (six-dose regimen) for treating uncomplicated falciparum malaria. **The Cochrane database of systematic reviews**. . ISSN 1469-493X. 4 (2005) CD005564. doi: 10.1002/14651858.CD005564.

OPSENICA, D. *et al.* - Cholic acid derivatives as 1,2,4,5-tetraoxane carriers: structure and antimalarial and antiproliferative activity. **Journal of medicinal chemistry**. . ISSN 0022-2623. 43:17 (2000) 3274–82.

OPSENICA, Dejan *et al.* - Antimalarial and antiproliferative evaluation of bis-steroidal tetraoxanes. **Bioorganic & medicinal chemistry**. . ISSN 0968-0896. 11:13 (2003) 2761–8.

POSNER, Gary H.; O'NEILL, Paul M. - Knowledge of the proposed chemical mechanism of action and cytochrome p450 metabolism of antimalarial trioxanes like artemisinin allows rational design of new antimalarial peroxides. **Accounts of chemical research**. . ISSN 0001-4842. 37:6 (2004) 397–404. doi: 10.1021/ar020227u.

RÖSHAMMAR, Daniel *et al.* - Pharmacokinetics of piperazine after repeated oral administration of the antimalarial combination CV8 in 12 healthy male subjects. **European journal of clinical pharmacology**. . ISSN 0031-6970. 62:5 (2006) 335–41. doi: 10.1007/s00228-005-0084-9.

SOLAJA, Bogdan A. *et al.* - Mixed steroidal 1,2,4,5-tetraoxanes: antimalarial and antimycobacterial activity. **Journal of medicinal chemistry**. . ISSN 0022-2623. 45:16 (2002) 3331–6.

TUN, Thein *et al.* - Efficacy of oral single dose therapy with artemisinin-naphthoquine phosphate in uncomplicated falciparum malaria. **Acta tropica**. . ISSN 1873-6254. 111:3 (2009) 275–8. doi: 10.1016/j.actatropica.2009.05.007.

VROMAN, J. A.; ALVIM-GASTON, M.; AVERY, M. A. - Current progress in the chemistry, medicinal chemistry and drug design of artemisinin based antimalarials. **Current pharmaceutical design**. . ISSN 1381-6128. 5:2 (1999) 101–38.

WHITE, Nicholas J. - Counter perspective: artemisinin resistance: facts, fears, and fables. **The American journal of tropical medicine and hygiene**. . ISSN 1476-1645. 87:5 (2012) 785. doi: 10.4269/ajtmh.2012.12-0573.

WHO | World Malaria Report 2012).

WU, Yikang - How Might Qinghaosu (Artemisinin) and Related Compounds Kill the Intraerythrocytic Malaria Parasite? A Chemist's View. **Accounts of Chemical Research**. . ISSN 0001-4842. 35:5 (2002) 255–259. doi: 10.1021/ar000080b.