

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
Faculdade de Ciências e Tecnologia
Departamento de Química e Farmácia

**Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação
de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos
fármacos.**

Andy Coninckx

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação da Professora Doutora Maria de
Lurdes dos Santos Cristiano

2017

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
Faculdade de Ciências e Tecnologia
Departamento de Química e Farmácia

**Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação
de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos
fármacos.**

Andy Coninckx

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação da Professora Doutora Maria de
Lurdes dos Santos Cristiano

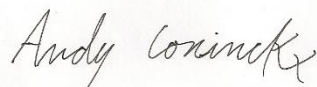
2017

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

Declaração de autoria de trabalho:

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Universidade do Algarve, 24 de setembro de 2017



© Copyright: Andy Coninckx

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer à professora Doutora Maria de Lurdes Cristiano por ter aceite ser a minha orientadora da dissertação. Agradeço pela total disponibilidade que sempre apresentou, a dedicação e o rigor científico com que me orientou não só nesta fase final, mas também ao longo do meu percurso académico. Quero também agradecer pela oportunidade, que me forneceu, de realizar um trabalho prático no seu laboratório e me fazer sentir parte do projeto de investigação.

À minha namorada Hannah Franco, que sempre me aturou durante estes anos e me apoiou incondicionalmente em todas as etapas e obstáculos. Sem ela, todo este percurso académico e de vida não teria sido realizado com a mesma dedicação e diversão pelo meio. Os melhores momentos da faculdade seguramente foram os melhores devido à tua presença.

Agradeço a toda a minha família que me apoiou durante estes anos e que me permitiu realizar esta etapa. Quero agradecer especialmente à minha mãe pois sem ela nada disto teria sido possível. Os imensos esforços que fez para me dar esta oportunidade, o amor, carinho e apoio que sempre me deu nunca serão esquecidos e foram fulcrais para o meu sucesso nesta fase da minha vida.

Aos meus amigos, obrigado pela amizade, apoio, motivação e muitas memórias ao longo destes anos todos. Sem dúvida que todos contribuíram de alguma forma para a formação da pessoa que sou hoje e pelo sucesso obtido no meu percurso académico. Sem vocês, não teria sido a mesma coisa.

Ainda quero mencionar o Doutor Pedro Horta que foi o meu professor de laboratório durante o projeto de investigação realizado. Um grande obrigado por toda a paciência, dedicação e transmissão de conhecimentos. Certamente, também contribuiu para a minha formação académica e forneceu motivação para continuar este caminho árduo mas recompensador da ciência.

Resumo

A malária é uma doença infecciosa provocada por parasitas do género *Plasmodium*, transmitidos ao ser humano através de uma picada de um mosquito fêmea do género *Anopheles*. Apesar do grande esforço que tem sido feito para controlar esta doença, estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) revelam que, em 2015, ocorreram no mundo cerca de 212 milhões de casos de malária, dos quais 429 000 resultaram em morte.

Atualmente, o combate contra a malária passa principalmente pelo controlo do vetor, prevenção da picada por mosquitos infetados e pela utilização de quimioterapia em profilaxia ou tratamento. No entanto, o arsenal terapêutico existente para a malária apresenta imensas limitações no que diz respeito à sua eficácia, custo e segurança.

Tem se verificado, cada vez mais, um aumento das resistências aos fármacos com atividade antimalárica, incluindo, mais recentemente, os atuais fármacos de primeira linha (derivados de artemisinina). Assim, é de extrema importância conhecer os mecanismos de ação, limitações e respetivos mecanismos de resistência dos atuais fármacos utilizados de modo a, no futuro, desenvolver novos fármacos contra a malária que contornem os problemas existentes.

A presente dissertação apresenta uma revisão bibliográfica relativa às características e impacto global da malária, às estratégias atuais da sua prevenção, às limitações das atuais terapêuticas utilizadas e às perspetivas futuras dos diversos grupos terapêuticos. O alvo terapêutico do complexo de citocromo bc_1 da cadeia de transporte de eletrões mitocondrial de *P. falciparum* é abordado com particular ênfase. Atualmente, a atovaquona é o único fármaco comercializado como inibidor seletivo deste complexo. Foi estabelecida a atividade antimalárica (por inibição do complexo bc_1) de outros compostos com o núcleo 4-oxoquinolínico, incluindo as 4-oxoquinolinas com um grupo éster na posição 3. Neste âmbito, foi desenvolvido um projeto de síntese orgânica com o objetivo de preparar inibidores seletivos do complexo de citocromo bc_1 de *P. falciparum* e estudar as propriedades e problemas associados a estes compostos. Este projeto é apresentado e discutido nos capítulos finais desta dissertação.

Palavras-chave: Malária, doença parasitária, *Plasmodium*, Fármacos antimaláricos, Resistências, Síntese de quinolonas, Inibidores do complexo bc_1 de *P. falciparum*

Abstract

Malaria is an infectious disease caused by parasites of the genus *Plasmodium*, transmitted to humans through the bite of a female mosquito of the genus *Anopheles*. Despite the great effort that has been made to control this disease, World Health Organization (WHO) estimates show that around 212 million malaria cases occurred worldwide in 2015, of which 429,000 resulted in death.

Currently, the fight against malaria mainly involves vector control, prevention of the bites by infected mosquitoes and the use of chemotherapy in prophylaxis or treatment. However, the existing therapeutic arsenal for malaria has many limitations in terms of its efficacy, cost and safety.

Increasing resistance to antimalarial drugs, including, more recently, the current first-line drugs (artemisinin derivatives) has been observed. Thus, it is extremely important to know the mechanisms of action, limitations and respective mechanisms of resistance of the current drugs used, in order to, in the future, develop new drugs against malaria that bypass the existing problems.

Therefore, the present dissertation presents a bibliographic review regarding the characteristics and overall impact of malaria, as well as the current strategies of its prevention, the limitations of the current therapeutics used and future perspectives of the different therapeutic groups. In particular, the cytochrome *bc₁* complex of the mitochondrial respiratory chain of *P. falciparum* is addressed as therapeutic target. Currently, atovaquone is the only drug marketed as a selective inhibitor of this complex. Recently, the antimalarial activity (by inhibition of the *bc₁* complex) of other compounds with the quinolone core was established, including for 4-oxoquinolines with an ester group at the position 3 of the 4-oxoquinoline pharmacophore. In this scope, an organic synthesis project was developed with the aim of developing selective inhibitors of the cytochrome *bc₁* complex of *P. falciparum* and studying the properties and problems associated to these compounds. This project is presented and discussed in the final chapters of this dissertation.

Keywords: Malaria, *Plasmodium*, Antimalarial drugs, Resistance, Quinolone synthesis, *P. falciparum* *bc₁* complex inhibitors.

Índice de Conteúdo

Agradecimentos.....	i
Resumo	ii
Abstract	iii
Índice de figuras	vi
Abreviaturas	ix
1. Introdução.....	1
1.1. Malária.....	1
1.1.1. História	1
1.1.2. Epidemiologia	4
1.1.3. Parasita	6
1.1.4. Transmissão.....	7
1.1.5. Base genética da resistência à malária.....	8
1.1.5.1. Hemoglobina S.....	9
1.1.5.2. Talassemia	9
1.1.5.3. Hemoglobinas C e E	10
1.1.5.4. Deficiência em glucose-6-fosfato desidrogenase.....	10
1.1.5.5. Deficiência em piruvato quinase	11
1.1.5.6. Ovalocitose do Sudeste Asiático.....	11
1.1.5.7. Antígeno leucocitário humano	12
1.1.5.8. Antígeno Duffy negativo.....	12
1.1.6. Ciclo de vida do parasita.....	12
1.1.7. Sintomatologia.....	16
1.1.8. Diagnóstico	19
1.1.9. Prevenção	22
2. Quimioterapia	26
2.1. Quinolinas.....	26
2.1.1. 4-Metanolquinolinas	26
2.1.1.1. Quinina e Quinidina	26
2.1.1.2. Mefloquina	28
2.1.2. 4-Aminoquinolinas.....	29
2.1.3. 8-aminoquinolinas.....	32
2.1.4. Outros compostos de base quinolínica	33

2.1.5. Resistência e futuras perspectivas dos fármacos de base quinolínica	36
2.2. Antagonistas de folatos	39
2.2.1. Resistência e futuras perspectivas dos antifolatos com atividade antimalárica	42
2.3. Antibióticos.....	43
2.4. Artemisinina e derivados	45
2.4.1. Resistência e futuras perspectivas dos derivados de artemisinina	48
2.5. Naftoquinonas	50
2.5.1. Resistência e futuras perspectivas das naftoquinonas	52
2.5.2. Outras classes de compostos que têm como alvo o citocromo <i>bc₁</i> de <i>P. falciparum</i>	54
2.5.2.1. 4-Piridonas.....	54
2.5.2.2. Acridinodionas e acridonas	55
2.5.2.3. Quinolonas.....	56
3. Síntese de quinolonas com potencial como inibidores do citocromo <i>bc₁</i> de <i>P. falciparum</i>	59
3.1. Âmbito da parte experimental	59
3.2. Estratégia de síntese geral.....	60
3.3. Problemas encontrados durante a síntese de quinolonas.....	62
3.4. Síntese de 3-carboxilato-4-oxo-7-metilquinolina de etilo.....	66
3.5. Síntese de 3-carboxilato-4-oxo-5-metilquinolina de etilo.....	68
3.6. Estratégia de síntese para obter 4-quinolona	69
3.7. Síntese de 4-oxoquinolina	70
3.8. Discussão dos resultados.....	75
4. Procedimento experimental	77
4.1. Procedimentos utilizados nas sínteses desenvolvidas no projeto	78
4.1.1. Síntese de 3-carboxilato-4-oxo-7-metilquinolina de etilo	78
4.1.2. Síntese de 4-oxoquinolina	79
5. Conclusão	82
6. Referências Bibliográficas	84
7. Anexos	100

Índice de figuras

Figura 1-1 – Evolução da incidência da Malária no mundo. Países onde a malária permanece endêmica em 2016 (azul) e países onde a malária também era endêmica em 2000.....	5
Figura 1-2 – Morfologia de parasitas da filo Apicomplexa.....	6
Figura 1-3 – Mapa global de espécies de vetores dominantes transmissores de malária	8
Figura 1-4 – Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i> , no hospedeiro humano e no vetor.	13
Figura 2-1 – Representação da estrutura química da quinina, quinidina e azul de metileno.....	27
Figura 2-2 – Representação da estrutura química da mefloquina.....	28
Figura 2-3 – Representação da estrutura química da cloroquina, hidroxicloroquina e amodiaquina.....	31
Figura 2-4 – Representação da estrutura química da pamaquina e a primaquina.....	32
Figura 2-5 – Representação da estrutura química da piperquina e pironaridina.....	34
Figura 2-6 – Representação da estrutura química dos compostos AQ-13, ferroquina, SAR116242 e Tafenoquina.	38
Figura 2-7 – Esquema da via do folato de <i>P. falciparum</i> , com indicação dos alvos para ação dos fármacos sulfadoxina e pirimetamina.....	39
Figura 2-8 – Representação da estrutura química de vários antagonistas de folatos...	40
Figura 2-9 – Representação da estrutura química da lincomicina e clindamicina.....	44
Figura 2-10 – Representação da estrutura química da tetraciclina e da doxiciclina	45
Figura 2-11 – Representação da estrutura química da artemisinina e derivados, usados como antimaláricos.	46
Figura 2-12 – Representação da estrutura química dos fármacos ou candidatos antimaláricos artemisona, arterolano (OZ277), artefenomel (OZ439), RKA182 e E209.50	
Figura 2-13 – Representação da estrutura química da atovaquona.....	51
Figura 2-14 – Representação esquemática da função do complexo III	52
Figura 2-15 – Representação da estrutura química dos compostos S-10576 e NQ1-3 .	54
Figura 2-16 – Representação da estrutura química de clopidol, GW844520 e GSK932121	55

Figura 2-17 – Representação da estrutura química da floxacrina e de WR242685.....	56
Figura 2-18 – Representação da estrutura química de 3-(5,6,6,6-Tetrafluoro-5-trifluorometil-hexiloxi)-6-cloroacridona e T3.5.....	56
Figura 2-19 – Representação da estrutura química de endoquina, ELQ-271, ELQ-300 E P4Q-391	57
Figura 2-20 – Representação da estrutura química de decoquinato e RCQ.....	58
Figura 3-1 – Representação esquemática da estratégia de síntese geral de 3-ésteres de 4-oxoquinolinas	60
Figura 3-2 – Representação esquemática da via de redução do composto aromático com um grupo substituinte nitro para a anilina correspondente.....	61
Figura 3-3 – Proposta mecanística da síntese geral de 3-ésteres 4-oxoquinolinas	62
Figura 3-4 – Representação esquemática da estratégia de síntese utilizada e dos resultados obtidos na síntese de 3-éster-4-oxoquinolinas. Condições: (a) 100°C, 14 horas; (b) Dowtherm A, 250°C, 3 horas.....	63
Figura 3-5 – Proposta mecanística para a síntese de 3-éster-4-cloroquinolinas mediada por POCl ₃	64
Figura 3-6 – Representação da estrutura química dos compostos 19b.HCl e 22	64
Figura 3-7 – Representação esquemática da possível tautomerização do composto 19b	65
Figura 3-8 – Representação da estrutura química de 4-oxo(1H)quinolina.....	66
Figura 3-9 – Representação esquemática da estratégia de síntese utilizada para obter o composto 12.....	67
Figura 3-10 – Representação da proposta mecanística para a reação de síntese do composto 12.....	67
Figura 3-11 – Representação esquemática da estratégia de síntese para obter o composto 19a.....	68
Figura 3-12 – Representação da proposta mecanística da reação de síntese do composto 19a.	68
Figura 3-13 – Representação esquemática da estratégia de síntese para obter o composto 19b.....	69
Figura 3-14 – Representação esquemática da estratégia de síntese proposta para obter 4-oxoquinolina.....	69

Figura 3-15 – Representação esquemática da estratégia de síntese utilizada para obter o composto 24.....	70
Figura 3-16 – Representação da proposta mecanística para a síntese do composto 24.	70
Figura 3-17 – Representação esquemática da estratégia de síntese utilizada para obter os compostos 25 e 28.	71
Figura 3-18 – Representação da proposta mecanística da síntese do composto 25.....	71
Figura 3-19 – Representação da proposta mecanística para a síntese do composto 28 mediada por POCl ₃	72
Figura 3-20 – Representação esquemática da estratégia de síntese do composto 26 .	73
Figura 3-21 – Representação da proposta mecanística para a hidrólise do composto 25 em condições alcalinas, com formação de 26.....	73
Figura 3-22 – Representação da estratégia de síntese proposta para obter o composto 27	74
Figura 3-23 – Representação da proposta mecanística para a síntese do composto 27.	74
Figura 7-1 – Espectro de ¹ H-RMN obtido para o composto (12)	100
Figura 7-2 – Espectro de ¹³ C-RMN obtido do composto (12).....	101
Figura 7-3 – Espectro de ¹ H-RMN obtido para o composto (24)	102
Figura 7-4 – Espectro de ¹³ C-RMN obtido do composto (24).....	103
Figura 7-5 – Espectro de ¹ H-RMN obtido para o composto (25)	104
Figura 7-6 – Espectro de ¹³ C-RMN obtido do composto (25).....	105
Figura 7-7 – Espectro de ¹ H-RMN obtido para o composto (26)	106
Figura 7-8 – Espectro de ¹³ C-RMN obtido do composto (26).....	107

Abreviaturas

ACT – Terapia de Combinação Baseada em Artemisinina, do inglês: *Artemisinin-based Combination Therapy*

ADME – Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

AEC – Antes da Era Comum

An. *Gambiae* – *Anopheles Gambiae*

An. *Funestus* – *Anopheles Funestus*

A. *Annua* – *Artemisia Annua*

ATP – Trifosfato de Adenosina, do inglês: *Adenosine Triphosphate*

B₁ – Índice de Bird

CCMAR – Centro de Ciências do Mar

CoQ – Coenzima Q, ubiquinona

CoQH₂ – Ubiquinol

DARC – Antígeno Duffy Receptor de Quimiocina, do inglês: *Duffy antigen/chemokine receptor*

DCM – Diclorometano

DEEMM – Etoximetilenomalonato de Dietilo, do inglês: *Diethyl Ethoxymethylenemalonate*

DEET – N,N-dimetil-*meta*-toluamida

DHFR – Dihidrofolato Redutase

DHODH – Dihidroorotato desidrogenase

DHPS – Dihidropteroato Sintase

DMSO – Dimetilsulfóxido

ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática, do inglês: *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

EMA – Agencia Europeia do Medicamento, do inglês: *European Medicines Agency*

EUA – Estados Unidos da América

FDA – *Food and Drug Administration*

Fe – Ferro

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

FTIR – Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier, do inglês: *Fourier-transform Infrared Spectroscopy*

G6PD – Glucose-6-fosfato Desidrogenase

GPDH – Glicerol-3-fosfato Desidrogenase

HbC – Hemoglobina C

HbE – Hemoglobina E

Hbs – Hemoglobina S

HCL – Ácido Clorídrico

HGF – Fator de Crescimento do Hepatócito, do inglês: *Hepatocyte Growth Factor*

HOMA – Modelo de Aromaticidade do Oscilador Harmônico, do inglês: *Harmonic Oscillator Model of Aromaticity*

HRP2 – Proteína 2 Rica em Histidina, do inglês: *Histidine Rich Proteine 2*

HSPGs – Proteoglicanos de Sulfato de Heparano, do inglês: *Heparan Sulfate Proteoglycans*

IFA – Imunofluorescência Indireta

LAMP – Amplificação Isotérmica Mediada por *Loop*, do inglês: *Loop Mediated Isothermal Amplification*

MQO – Malato-Quinona Oxidorredutase

mtADN – ADN Mitocondrial

mtETC – Cadeia Transportadora de Elétrons Mitocondrial, do inglês: *Mitochondrial Electron Transport Chain*

MTOC – Centro Organizador de Microtúbulos, do inglês: *Microtubule-Organizing Center*

NADPH – Forma Reduzida de Fosfato de Dinucleótido de Adenina e Nicotinamida, do inglês: *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*

NDH2 – NADH Desidrogenase tipo 2

OMS – Organização Mundial de Saúde

P. falciparum – *Plasmodium falciparum*

P. knowlesi – *Plasmodium knowlesi*

P. malariae – *Plasmodium malariae*

P. ovale – *Plasmodium ovale*

P. vivax – *Plasmodium vivax*

pABA – Ácido *para*-Aminobenzóico, do inglês: *para*-Aminobenzoic Acid

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

PCR – Reação em Cadeia de Polimerase, do inglês: *Polymerase Chain Reaction*

PfCRT – Transportador de Resistência à Cloroquina de *P. falciparum*, do inglês: *Plasmodium falciparum Chloroquine Resistance Transporter*

PfEMP1 – Proteína de Membrana de Eritrócitos de *P. falciparum* 1, do inglês: *Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1*

PfHRP2 – Proteína 2 Rica em Histidina de *Plasmodium*, do inglês: *Plasmodium falciparum Histidine Rich Proteine 2*

PfMDR1 – Resistência a Múltiplos Fármacos de *P. falciparum*, do inglês: *Plasmodium falciparum Multidrug resistance 1*

PLDH – Lactato Desidrogenase de *Plasmodium*, do inglês: *Plasmodium Lactate Dehydrogenase*

POCl₃ – cloreto de fosforilo

ppm – partes por milhao

QBC – Técnica da Camada Leucoplaquetária Quantitativa, do inglês: *Quantitive Buffy Coat*

RDT – Teste Rápido de Diagnostico, do inglês: *Rapid Diagnostic Test*

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SAO – Ovalocitose do Sudeste Asiático, do inglês: *Southeast Asian Ovalocytosis*

SAR – Relação estrutura-atividade, do inglês: *Structure-activity Relationship*

SDH – Succinato Desidrogenase

SERCA – ATPase Envolvida no Transporte de Ca²⁺ no Retículo Endoplasmático, do inglês: *Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase*

SNC – Sistema Nervoso central

THF – Tetrahydrofurano

TLC – Cromatografia em Camada Fina, do inglês: *Thin-layer Chromatography*

TMS – Tetrametilsilano

TRAP – Proteína Anónima Relacionada à Trombospondina, do inglês: *Thrombospondin Related Anonymous Protein*

WRAIR – Walter Reed Army Institute of Research

1. Introdução

1.1. Malária

A malária é uma doença infecciosa provocada por parasitas do género *Plasmodium*, transmitidos ao ser humano através de uma picada de um mosquito fêmea do género *Anopheles*.¹ Atualmente são conhecidas cinco espécies de *Plasmodium* capazes de infetar o ser humano: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi*. De entre estas, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae* são as espécies que há mais tempo são reconhecidas como capazes de infetar o ser humano e *P. falciparum* é a espécie responsável pela maioria dos casos de morte por malária. *Plasmodium knowlesi* é uma espécie tradicionalmente associada à infeção em primatas que recentemente foi reconhecida como causa de malária zoonótica no Homem.²

1.1.1. História

A primeira evidência de que a malária é causada por parasitas foi encontrada em mosquitos infetados, preservados em âmbar do período Paleogénico, que têm aproximadamente 30 milhões de anos.³ Estes parasitas evoluíram ao longo do tempo e, através de uma cadeia de transmissão entre espécies, atingiram o ser humano. No caso de *P. falciparum* não se sabe concretamente quando esta transmissão terá acontecido. Pensa-se que a infeção humana por *P. falciparum* ocorreu a partir de gorilas⁴, a infeção por *P. vivax* ocorreu a partir de gorilas e chimpanzés africanos⁵ e a infeção por *P. knowlesi* teve origem em macacos asiáticos do género *Macaca*.⁶ Apesar de *P. malariae* ser específico para o ser humano, existe alguma evidência que é possível ocorrer uma infeção assintomática persistente em chimpanzés selvagens.⁷

Os sintomas da malária (febres e esplenomegalia) foram descritos desde 2700 AEC no *Nei Ching*, também conhecido como o cânone da medicina chinesa, nas tabuletas de argila da Mesopotâmia de 2000 AEC, nos papiros egípcios de 1570 AEC e em textos hindus de 600 AEC.^{8,9}

A malária parece ter assumido especial relevância na Grécia durante o período de 850-400 AEC, dado que vários autores gregos deste período mencionam a doença nas suas obras.⁸⁻¹⁰ Os primeiros relatos detalhados das febres periódicas da malária

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

estão presentes no *Corpus Hippocraticum*. Hipócrates foi o primeiro a descrever as manifestações da doença (por exemplo, a esplenomegalia), a classificar as febres e a relacionar a doença com a época do ano e a proximidade de águas estagnadas.¹¹

O nome “malária” tem origem italiana. O vocábulo teria o significado de “mau ar”, uma vez que os antigos romanos acreditavam que esta doença provinha de maus ares (miasmas) dos pântanos.⁸⁻¹⁰

Nos dois mil anos seguintes, a malária prosperava nos locais da Europa onde existiam colonizações lotadas e água estagnada, tornando as pessoas sazonalmente doentes e cronicamente fracas e apáticas.¹⁰

Posteriormente, por volta do século XVI, a malária foi introduzida na América através de exploradores, conquistadores e colonizadores europeus, que transportavam *P. malariae* e *P. vivax*. Já *P. falciparum* terá sido importada para o Novo Mundo por escravos africanos, que inicialmente estariam protegidos por defesas genéticas, nomeadamente a anemia falciforme e deficiência de G6PD, além de imunidade parcial obtida através da exposição ao longo da vida. No entanto, os seus descendentes, assim como os nativos americanos e colonizadores de ascendência europeia, eram mais vulneráveis, levando à proliferação do parasita, até que a malária se tornou comum.^{10,12}

Após as descobertas de Louis Pasteur de que a maioria das doenças infecciosas eram causadas por micróbios (a "teoria do germe"), surgiu a hipótese de uma origem bacteriana da malária. Vários estudos, principalmente em Itália e nos Estados Unidos, procuraram um agente infeccioso em solo de pântano e incriminaram várias algas, protozoários aquáticos e bactérias, que designaram por *Bacillus malariae* em Itália.^{10,13}

Todavia, a descoberta da causa de malária só surgiu mais tarde, na sequência dos estudos de Charles Louis Alphonse Laveran, um médico do exército francês que, em 1880, observou o sangue de um doente que tinha febre há 15 dias e no qual detetou um corpo esférico pigmentado que nas bordas tinha elementos filiformes que se moviam com grande vivacidade. A motilidade desses elementos convenceu Laveran que teria descoberto o agente causador da malária e que este era um protozoário parasita ao qual deu o nome de *Oscillaria malariae*.^{10,13}

Em 1886 Golgi descreveu as diferenças morfológicas que foram utilizadas para distinguir duas espécies de parasitas da malária, *P. vivax* e *P. malariae*. Estas designações foram associadas pelos investigadores italianos Giovanni Batista Grassi e Raimondo

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

Filetti a dois dos parasitas da malária que afetam os seres humanos, em 1890. Posteriormente, em 1897, William H. Welch designou outro parasita da malária por *P. falciparum*, e em 1922 John William Watson Stephens descreveu o quarto parasita da malária humana, *P. ovale*. *P. knowlesi* foi descrito pela primeira vez por Robert Knowles e Biraj Mohan Das Gupta em 1931.^{8,10}

A 20 de agosto de 1897, Ronald Ross, médico britânico, demonstrou que os parasitas da malária poderiam ser transmitidos aos mosquitos a partir de doentes infetados. Após dissecar o tecido do estômago de um mosquito *Anopheles*, que se teria alimentado de um doente infetado de malária, encontrou parasitas da malária, provando o papel de vetor deste mosquito.^{9,10,14}

Em trabalhos posteriores, efetuados com malária aviária devido à conveniência deste modelo, Ross mostrou que os mosquitos poderiam transmitir parasitas da malária de pássaro para pássaro, demonstrando em julho de 1898 que os mosquitos poderiam servir como hospedeiros intermediários para a malária das aves. Depois de alimentar os mosquitos em aves infetadas, Ross descobriu que os parasitas da malária podem desenvolver-se nos mosquitos e migrar para as glândulas salivares dos insetos, permitindo que estes mosquitos infetem outras aves durante as refeições de sangue subsequentes.^{10,14}

Uma equipa de investigadores italianos liderada por Giovanni Batista Grassi, que incluía Amico Bignami e Giuseppe Bastianelli, alimentou mosquitos *Anopheles claviger* a partir de doentes com malária, demonstrando em 1899 o ciclo esporogónico completo de *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*.⁸⁻¹⁰

Foi inicialmente sugerido por Grassi que deveria existir alguma fase de desenvolvimento do parasita exterior aos eritrócitos e, embora outros investigadores tivessem descoberto que o parasita da malária de aves se reproduzia inicialmente no sistema reticuloendotelial, o local de reprodução do parasita nos primatas e humanos, fora dos eritrócitos, permaneceu desconhecido.^{9,10} Em 1948 Henry Edward Shortt e Percy Cyril Claude Garnham, investigadores do Ross Institute, da London School of Hygiene and Tropical Medicine, demonstraram que uma fase de divisão no fígado precedia o desenvolvimento do parasita no sangue, no caso de infeção por *Plasmodium cynomolgi* em macacos Rhesus.¹⁵

Pouco tempo depois Shortt e Garnham encontraram formas exoeritrocíticas de *P. vivax* em biópsias do fígado de voluntários humanos¹⁶, e posteriormente também em voluntários infetados por *P. falciparum*, em 1949¹⁷, e por *P. ovale*, em 1954¹⁸. Foi somente em 1960 que R. S. Bray demonstrou a presença das formas exoeritrocíticas de *P. malariae* em chimpanzés experimentalmente infetados.¹⁹

A causa do longo período entre a infeção e o aparecimento e reaparecimento de parasitas no sangue, observado em algumas estirpes de *P. vivax*, foi descoberta por Wojciech Krotoski, um colaborador na equipa de Garnham, em 1982, tendo sido atribuída a uma fase exoeritrocítica na qual há uma formação de hipnozoítas (estado latente).²⁰

O genoma de *P. falciparum*²¹ foi finalmente publicado em 2002 e os genomas de *P. vivax*²² e *P. Knowlesi*²³ foram igualmente publicados em 2008.

1.1.2. Epidemiologia

A malária é prevalente em áreas tropicais e subtropicais, como a América latina, a África Subsariana e Sudeste Asiático, onde os mosquitos conseguem sobreviver e multiplicar-se e o parasita consegue igualmente completar o seu ciclo de vida devido ao clima quente e húmido que estas zonas proporcionam. A temperatura é particularmente importante, pois a temperaturas inferiores a 20°C o parasita *P. falciparum*, responsável pela forma mais grave de malária, não consegue completar o seu ciclo de crescimento no mosquito *Anopheles*, não podendo portanto ser transmitido. Assim, em regiões mais frescas, a transmissão será menos intensa e mais sazonal, e *P. vivax* poderá ser mais prevalente pelo facto de esta estirpe ser mais tolerante a temperaturas ambiente mais baixas.²⁴

De acordo com um relatório da OMS²⁵, no início de 2016, a malária foi considerada endémica em 91 países (Figura 1-1), o que representa uma diminuição relativamente ao ano 2000 em que esta doença era endémica em 108 países.

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

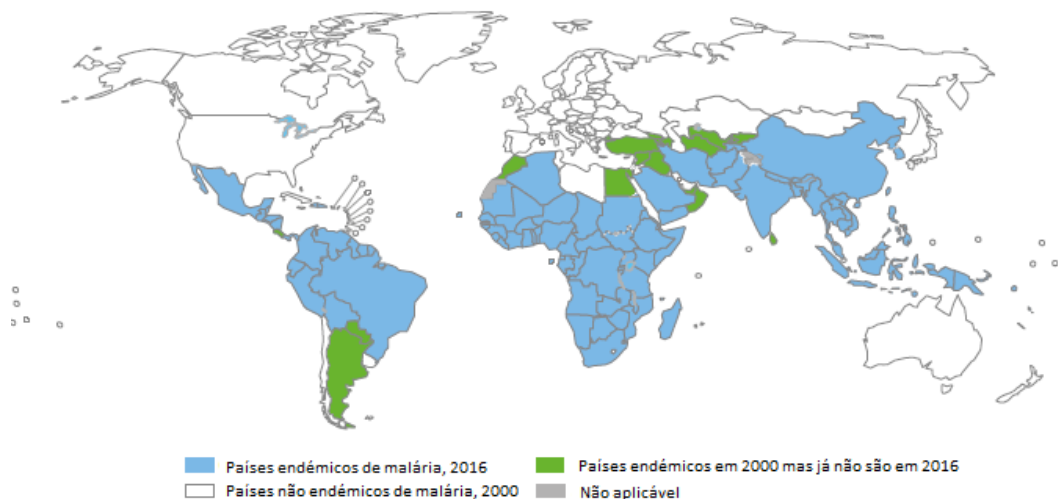


Figura 1-1 – Evolução da incidência da Malária no mundo. Países onde a malária permanece endêmica em 2016 (azul) e países onde a malária também era endêmica em 2000 (Adaptado de²⁵).

Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), ocorreram no mundo cerca de 212 milhões de casos de malária em 2015, dos quais 90% ocorreram na Região Africana, 7% na Região do Sudeste Asiático e 2% na Região Mediterrânica Oriental. Globalmente cerca de 4% dos casos são causados por *P. vivax*, mas fora do continente africano essa proporção aumenta para 41%. No entanto, a taxa de incidência mundial da malária, que tem em conta o crescimento da população, reduziu em 41% entre 2000 e 2015, e em 21% entre 2010 e 2015.²⁵

Dos 212 milhões de casos de malária surgidos em 2015 estimou-se que resultaram 429 000 mortes, de entre as quais 303 000 crianças com menos de 5 anos. As mortes ocorreram na Região Africana (92%), no Sudeste Asiático (6%) e no Mediterrâneo Oriental (2%), e quase todas (99%) resultaram de malária provocada por *P. falciparum*. Apesar destes números exigirem um esforço continuado para se conseguir o controlo da doença, há que referir que as taxas de mortalidade por malária diminuíram mundialmente 62% entre 2000 e 2015, e 29% entre 2010 e 2015.²⁵

De acordo com estimativas da OMS, observou-se uma diminuição global de 1,3 biliões de casos de malária, e de 6.8 milhões de mortes por malária, entre 2001 e 2015. A OMS considera, contudo, que nem todos os casos e óbitos evitados podem ser atribuídos às medidas de controlo da malária, uma vez que apenas 70% dos casos evitados foram objeto de intervenções subsequentes a diagnóstico de malária. Alguns

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

destes progressos estão relacionados com fatores como o aumento da urbanização e o desenvolvimento económico, que conduziram à melhoria das habitações e da nutrição.^{25,26}

1.1.3. Parasita

O parasita da malária é um protozoário que pertence ao filo Apicomplexa, caracterizado pela presença de um conjunto de organelos denominado de complexo apical (**Erro! A origem da referência não foi encontrada.**). Estes organelos incluem as roptrias, as micronemas e o anel polar apical. As roptrias e micronemas são organelos secretores que contêm produtos necessários para a motilidade, adesão a células hospedeiras, invasão de células hospedeiras e estabelecimento do vacúolo parasitário. O anel polar apical é um dos três centros organizadores de microtúbulos (do inglês: *Microtubule-Organizing Center*, MTOCs).²⁷

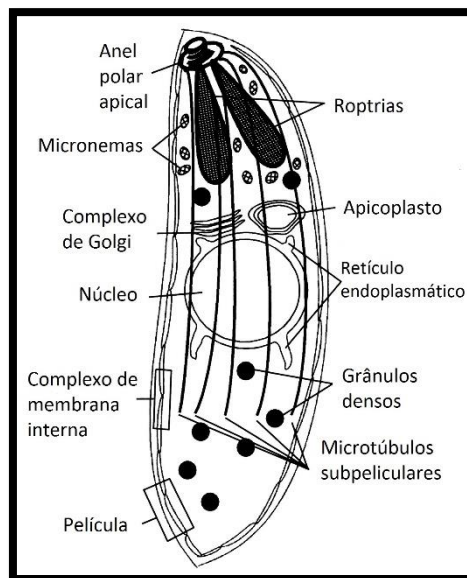


Figura 1-2 – Morfologia de parasitas da filo Apicomplexa (adaptado de ²⁷)

Além do complexo apical, os parasitas do filo Apicomplexa possuem outras características estruturais únicas, como o apicoplasto, que é essencial ao parasita, mas a sua função ainda não é totalmente conhecida.²⁸ Os parasitas são limitados pela película, uma estrutura composta pela membrana plasmática e do complexo de membrana interna. A película está associada a uma série de elementos do citoesqueleto, incluindo a actina, a miosina e os microtúbulos.²⁷

Atualmente são conhecidas cinco espécies de *Plasmodium* capazes de infetar o ser humano: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi*.

P. falciparum é encontrado, mundialmente, em áreas tropicais e subtropicais, e especialmente na África, onde esta espécie predomina. Esta espécie pode causar malária grave e é responsável pela maioria dos casos de morte por malária.

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

P. vivax encontra-se principalmente na Ásia, América Latina e em algumas partes da África. Devido às densidades populacionais, especialmente na Ásia, é provavelmente o parasita da malária humana mais prevalente.

P. ovale é encontrado principalmente na África (especialmente na África Ocidental) e nas ilhas do Pacífico ocidental. É biologicamente e morfológicamente muito parecido com *P. vivax* mas ao contrário deste, pode infetar indivíduos que são negativos para o grupo sanguíneo Duffy. Como esta característica é comum na África subsaariana, existe uma maior prevalência de *P. ovale* do que *P. vivax* na maior parte da África.

P. malariae encontra-se mundialmente e é a única espécie de parasita da malária humana que possui um ciclo quartã. Caso a infecção por esta espécie não seja tratada, pode desenvolver-se uma infecção crónica duradoura que, em alguns casos, pode durar toda a vida.

P. knowlesi é encontrado em todo o Sudeste da Ásia como um patógeno natural de primatas. Foi recentemente demonstrado que é uma causa significativa da malária zoonótica naquela região, particularmente na Malásia. *P. knowlesi* pode progredir rapidamente de uma infecção não complicada para uma infecção grave.²⁹

1.1.4. Transmissão

A malária é transmitida ao ser humano através de uma picada de um mosquito fêmea do género *Anopheles*, que inclui um total de 475 espécies formalmente reconhecidas e mais de 50 membros de complexos de espécies sem nome.³⁰ Destes, foi demonstrado que aproximadamente 70 espécies são capazes de transmitir os parasitas da malária humana dos quais, aproximadamente, 40 são considerados espécies de vetor dominantes.³¹

Os mosquitos fêmeas do género *Anopheles* são encontrados mundialmente, exceto na Antártida, e a espécie responsável pela transmissão da malária depende da região e do meio ambiente (Figura 1-3). Uma vez que estes insetos são encontrados não apenas em áreas endémicas, mas também em áreas onde a malária foi eliminada, existe constantemente um risco de reintrodução da doença.³¹

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

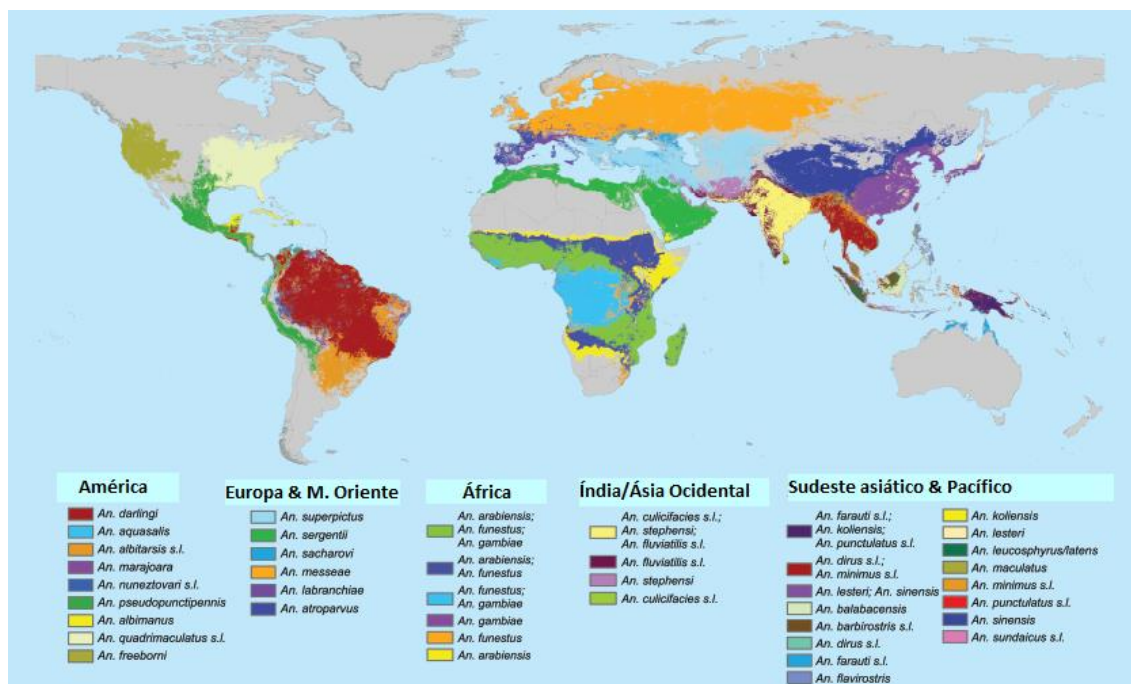


Figura 1-3 – Mapa global de espécies de vetores dominantes transmissores de malária (adaptado de³¹)

Os fatores que afetam a capacidade do mosquito de transmitir malária incluem a sua suscetibilidade inata ao parasita, a sua escolha de hospedeiro e a sua longevidade. As espécies de *Anopheles* podem preferir alimentar-se de seres humanos (antropófilo) ou de animais (zoófilo). Os vetores primários da malária na África, *An. Gambiae* e *An. Funestus*, são fortemente antropófilos e consequentemente são dos vetores de malária mais eficientes do mundo. Após os parasitas serem ingeridos por um mosquito, este necessita de sobreviver durante o período de incubação extrínseca de modo a poder transmitir o parasita. Uma vez adultos, a probabilidade de sobrevivência dos mosquitos depende da temperatura ambiente, humidade e chuvas. Temperaturas ambiente mais elevadas reduzem a duração do ciclo extrínseco, aumentando a probabilidade de transmissão. Por outro lado, abaixo de uma temperatura ambiente mínima (15°C para *P. vivax* e 20°C para *P. falciparum*), o ciclo extrínseco não pode ser concluído e a malária não pode ser transmitida. Este fator esclarece, parcialmente, a razão pela qual a transmissão da malária é maior nas áreas com climas mais quentes.³²

1.1.5. Base genética da resistência à malária

A malária colocou uma das maiores pressões seletivas conhecidas sobre o genoma humano nos últimos 10 mil anos.^{33,34} Várias variantes hereditárias nos

eritrócitos tornaram-se comuns em partes do mundo onde a malária é frequente, como resultado da pressão seletiva exercida por este parasita.³⁵

1.1.5.1. Hemoglobina S

A hemoglobina S (HbS) é caracterizada pela substituição do aminoácido glutamato por valina, na sexta posição da cadeia β . Embora o estado homocigótico de SS (anemia falciforme) seja frequentemente fatal para crianças, as altas frequências do gene HbS são mantidas pela proteção que o estado heterocigótico benigno AS (traço falciforme) pode conferir a crianças contra a malária por *P. falciparum*. As crianças com parasitemia, portadoras do genótipo AS, têm 50-90% menos probabilidade de progredir para malária severa, e as que progridem têm menos probabilidade de morrer.

A ligação de eritrócitos falciformes com parasitas a células endoteliais e monócitos sanguíneos é significativamente reduzida devido a uma exibição alterada da proteína de membrana de eritrócitos de *P. falciparum* 1 (do inglês: *Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1*, PfEMP1), o principal ligando de citoaderência do parasita e o fator de virulência na superfície de eritrócitos.³⁶ A proteção pela HbAS envolve a imunidade inata e também a imunidade adquirida ao parasita.³⁶ A instabilidade de HbS desencadeia uma regulação acima dos anticorpos naturais e uma remoção acelerada por células fagocitárias.³⁷

1.1.5.2. Talassemia

As talassemias são um grupo de anemias que resultam de defeitos hereditários na produção de hemoglobina. Uma vez que os reticulócitos produzem quantidades equimoleculares de cadeias alfa e beta, os eritrócitos maduros contêm quantidades essencialmente equimoleculares de cada cadeia. Indivíduos com talassemia não produzem hemoglobina A ($\alpha_2\beta_2$) suficiente porque as suas células não conseguem produzir a cadeia de polipéptidos alfa ou beta da hemoglobina humana. A alfa-talassemia deprime apenas a produção das cadeias alfa e a beta-talassemia deprime apenas a produção das cadeias beta. Clinicamente, ambas podem ocorrer nos genótipos homocigóticos e heterocigóticos.³⁸ Estudos demonstram que a talassemia alfa está correlacionada com a resistência à malária verificada em algumas populações.^{39,40}

1.1.5.3. Hemoglobinas C e E

A hemoglobina C (HbC) é uma hemoglobina anormal, com substituição de um aminoácido de ácido glutâmico por lisina da cadeia β , exatamente na mesma posição 6 que a mutação HbS. A HbC é comum em áreas com malária da África Ocidental, especialmente em Burkina Faso, onde um estudo realizado em 4348 indivíduos mostrou que o HbC conduz a uma redução de 29% no risco de malária clínica em heterozigotos HbAC e de 93% nos homozigotos HbCC.⁴¹ A HbC modifica a quantidade e a distribuição da PfEMP1 na superfície de eritrócitos infetados e assim reduz a capacidade de adesão, resultando numa redução do risco de doença grave.⁴²

A hemoglobina E (HbE) é muito comum em partes do Sudeste Asiático e resulta de uma única mutação pontual no gene para a cadeia β , com uma substituição de glutamato por lisina na posição 26. Os eritrócitos HbE têm uma anomalia de membrana não identificada, que torna a maioria da população de eritrócitos relativamente resistente à invasão por *P. falciparum*. Apesar de não proteger completamente contra infecções de malária não complicada, evita o desenvolvimento de grande parasitemia.⁴³

1.1.5.4. Deficiência em glucose-6-fosfato desidrogenase

A glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) é uma enzima que catalisa a primeira reação na via das pentoses fosfato, proporcionando uma via redutora a todas as células na forma de NADPH (forma reduzida de fosfato de dinucleótido de adenina e nicotinamida, do inglês: *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*). A NADPH permite que as células contrabalancem o estresse oxidativo que pode ser desencadeado por vários agentes oxidantes e para preservar a forma reduzida de glutathione. Uma vez que os eritrócitos não contêm mitocôndrias, a via das pentoses fosfato é a sua única fonte de NADPH, dependendo exclusivamente desta defesa contra os danos oxidativos.⁴⁴

A deficiência de G6PD é um defeito genético hereditário ligado ao cromossoma X, causado por mutações no gene G6PD, resultando em variantes de proteínas com diferentes níveis de atividade enzimática que estão associados a uma ampla gama de fenótipos bioquímicos e clínicos. As manifestações clínicas mais comuns são a icterícia

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

neonatal e a anemia hemolítica aguda, que na maioria dos afetados é desencadeada por um agente exógeno.⁴⁴

A deficiência em G6PD está associada à uma diminuição do risco de malária severa e a distribuição mundial da malária é notavelmente semelhante à dos alelos G6PD mutados, tornando a hipótese de que a deficiência de G6PD é protetora contra a malária uma noção geralmente bem aceita.^{45–48}

1.1.5.5. Deficiência em piruvato quinase

A piruvato quinase catalisa o passo limitante da glicólise, convertendo o fosfoenolpiruvato em piruvato, com a formação de uma molécula de ATP. Na ausência de mitocôndrias, como nos eritrócitos maduros, a enzima é crítica para a produção de energia. A deficiência desta enzima pode levar à hemólise dos eritrócitos e, conseqüentemente, à anemia hemolítica. Foi demonstrado que a deficiência de piruvato quinase proporciona proteção contra a infecção e replicação de *P. falciparum* em eritrócitos humanos, aumentando a possibilidade de que os alelos mutantes de piruvato quinase possam conferir uma vantagem protetora contra a malária em populações onde a doença é endêmica.⁴⁹

1.1.5.6. Ovalocitose do Sudeste Asiático

A ovalocitose do Sudeste Asiático (do inglês: *Southeast Asian Ovalocytosis*, SAO) é causada por uma deleção do gene da banda 3 da membrana de eritrócitos, a proteína que medeia a citoaderência de eritrócitos parasitados *in vitro*. Esta mutação está associada à proteção contra a malária cerebral em crianças porque reduz o sequestro de eritrócitos parasitados por *P. falciparum* na microcirculação cerebral.⁵⁰ No entanto, outro estudo permitiu verificar que os eritrócitos infetados de indivíduos com SAO tinham uma citoaderência aumentada pelo CD36. Estes resultados sugerem que a proteção de indivíduos SAO contra a malária cerebral pode ser mediada por uma distribuição alterada de eritrócitos infetados sequestrados.⁵¹

1.1.5.7. Antígeno leucocitário humano

O sistema antígeno leucocitário humano (HLA) é um complexo genético que codifica o complexo principal de histocompatibilidade (MHC). A função mais importante do HLA está na indução, regulação das respostas imunes e a seleção dos linfócitos T.⁵² Antígenos HLA comuns da África ocidental estão associados à proteção contra a malária grave. O antígeno HLA de classe I (HLA Bw53) e um haplótipo HLA classe II (DRB1*130Z-DQB1*0501) estão independentemente associados à proteção contra a malária grave.⁵²

1.1.5.8. Antígeno Duffy negativo

A glicoproteína de Duffy também é chamada de Antígeno Duffy Receptor de Quimiocina (do inglês: *Duffy antigen/chemokine receptor*, DARC). É um recetor de quimiocinas, ligando-se aos produtos químicos que são produzidos pelas células durante a inflamação e recrutando outras células sanguíneas para a área afetada.⁵³ Em 1976, Miller et al. demonstraram que o antígeno Duffy é o recetor de *P. vivax* e que a ausência do grupo sanguíneo Duffy em eritrócitos é o fator de resistência a *P. vivax* em pessoas de ascendência africana.⁵⁴ Posteriormente, Barnwell et al. também demonstraram que os merozoítos de *P. vivax* são incapazes de infectar eritrócitos negativos para o grupo Duffy.⁵⁵ No entanto, mais recentemente, tem-se verificado em estudos humanos da transmissão de *P. vivax* que há evidências de transmissão de *P. vivax* entre as populações negativas para o grupo Duffy no oeste do Quênia⁵⁶, na Região Amazônica Brasileira⁵⁷, Madagáscar⁵⁸, Angola e Guiné Equatorial⁵⁸.

1.1.6. Ciclo de vida do parasita

O ciclo de vida de *Plasmodium* envolve dois hospedeiros: o ser humano e o mosquito fêmea do género *Anopheles*. O mosquito é considerado o hospedeiro definitivo do parasita, uma vez que é neste que ocorre a fase sexuada, o ciclo esporogónico **(C)**. Assim, o ser humano é considerado o hospedeiro intermediário no qual ocorrem duas fases assexuadas: o ciclo exo-eritrocítico **(A)**, que ocorre nas células hepáticas, e o ciclo eritrocítico **(B)**, que se desenvolve no interior dos eritrócitos (Figura 1-4).⁵⁹

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

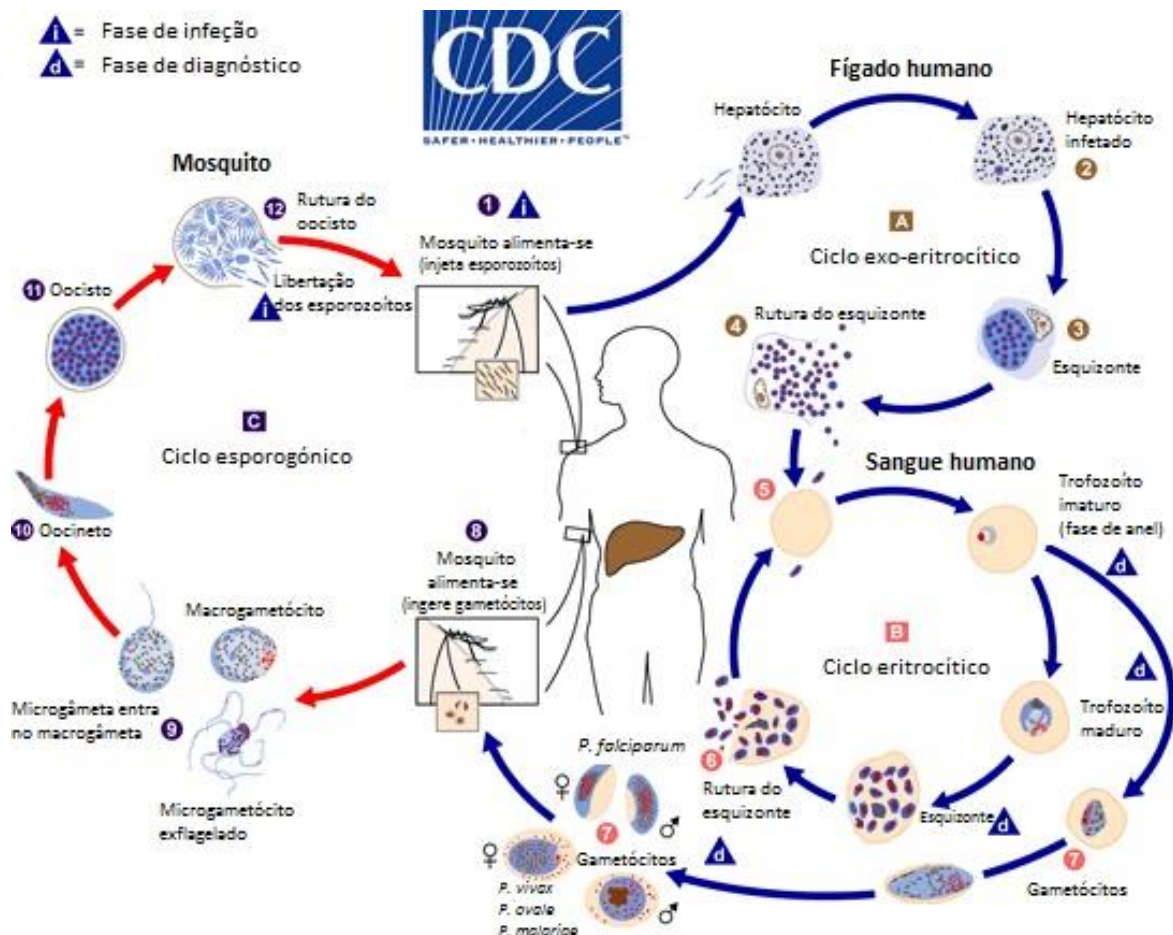


Figura 1-4 – Ciclo de vida de *Plasmodium*, no hospedeiro humano e no vetor. adaptado de Centers for Disease Control and Prevention.⁵⁹

A transmissão do parasita da malária para o ser humano ocorre quando um mosquito fêmea *Anopheles*, durante a sua refeição sanguínea, inocula dezenas a centenas de esporozoítos no seu hospedeiro através da saliva que estava presente nas glândulas salivares do mosquito (1). Esta saliva tem componentes bioativos que facilitam a alimentação sanguínea dos mosquitos, uma vez que previnem a agregação plaquetária, coagulação sanguínea, vasodilatação, reações inflamatórias e outras reações no local da picada. Os esporozoítos que alcançam a corrente sanguínea rapidamente chegam ao fígado. A capacidade dos esporozoítos para deslizar, bem como para atravessar e invadir células, foi atribuída a uma série de proteínas, sendo uma delas a proteína anónima relacionada à trombospondina (do inglês: *Thrombospondin Related Anonymous Protein*, TRAP).⁵⁹⁻⁶¹

Quando os parasitas do género *Plasmodium* chega ao sinusoide hepático, este é sequestrado pela interação de uma proteína do esporozoíto, denominada por proteína

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

circunsporozoíta, com proteoglicanos de sulfato de heparano (do inglês: *Heparan Sulfate Proteoglycans*, HSPGs) das células hepáticas. Seguidamente, os parasitas invadem as células de kupffer, macrófagos específicos do fígado, atravessando estes e o espaço de Disse até chegarem aos hepatócitos. Os esporozoítos atravessam múltiplos hepatócitos do hospedeiro, o que induz a secreção do fator de crescimento de hepatócitos (do inglês: *Hepatocyte Growth Factor*, HGF), tornando estas células mais vulneráveis ao parasita, até que o esporozoíto invade um hepatócito final, onde forma um vacúolo parasitário **(2)**. De seguida, o esporozoíto desenvolve-se e replica-se dentro dos hepatócitos por reprodução assexuada (esquizogonia), resultando na formação de um esquizonte que contém uma grande quantidade de merozoítos **(3)**. Em infeções por *P.vivax* e *P.ovale* alguns dos esporozoítos podem permanecer num estado latente (hipnozoítas) no fígado, durante semanas, meses ou mesmo anos, até que provoquem uma recaída de malária. Posteriormente, os merozoítos rompem a membrana celular dos hepatócitos **(4)** e inicia-se o ciclo eritrocítico.⁶¹⁻⁶³

Assim que os merozoítos são libertados dos hepatócitos, reconhecem, ligam-se e entram nos eritrócitos por múltiplas interações recetor-ligando, em apenas 60 segundos **(5)**. Este rápido desaparecimento da circulação minimiza a exposição dos antigénios na superfície do parasita, protegendo o parasita da resposta imune do hospedeiro. A ligação inicial do merozoíto ocorre em qualquer ponto da superfície, ocorrendo depois uma reorientação com o objetivo de justapor a zona apical do merozoíto com a membrana eritrocítica. Para o parasita entrar no eritrócito, é formada uma junção entre o parasita e a membrana do eritrócito, e esta junção move-se da extremidade apical para a extremidade oposta do merozoíto, numa série complexa de eventos sustentados pelo motor de actina-miosina do parasita. À medida que o parasita entra na célula hospedeira, este cria um vacúolo parasitário para se isolar do citoplasma da célula hospedeira e formar um ambiente adequado para o seu desenvolvimento.^{59,64}

Enquanto que *P. falciparum* é capaz de infetar qualquer tipo de eritrócito, independentemente da idade, *P. vivax* somente invade reticulócitos que têm antigénios Duffy, *P. ovale* também só afeta reticulócitos e *P. malariae* tem preferência pelos eritrócitos mais maduros.⁶⁵

Dentro dos eritrócitos o parasita inicia a multiplicação assexuada, transformando-se inicialmente em trofozoítos em estado de anel, que sofrem

maturação e, seguindo-se o processo de esquizogonia até ser obtido um esquizonte com merozoítos. É nesta fase que *Plasmodium* consome hemoglobina da célula hospedeira. A hemoglobina sofre proteólise no vacúolo digestivo do parasita, catalisada por algumas proteases, como as proteases aspárticas, plasmepsina I e II, e as proteases cisteínicas, falcipainas II e III, sendo os aminoácidos resultantes utilizados pelo parasita para síntese de proteínas. Desta proteólise ainda resultam produtos tóxicos, como o grupo heme, o qual é destoxificado pelo parasita através da formação de um cristal, denominado por hemozoína (pigmento malárico). Eventualmente os esquizontes rompem **(6)**, libertando novos merozoítos que irão invadir outros eritrócitos, continuando assim o ciclo eritrocítico. O ciclo eritrocítico ocorre a cada 48 h, nos casos de *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale*, e 72 h, no caso de *P. malariae*. Esta fase do parasita é a responsável pelas manifestações clínicas da doença.^{59,66,67}

Uma pequena proporção de parasitas assexuados não sofre esquizogonia e diferencia-se nos gametócitos da fase sexual **(7)**. Estes podem ser ingeridos por um mosquito *Anopheles* durante uma refeição sanguínea, iniciando assim o ciclo esporogónico.^{59,68}

A ingestão de gametócitos por um mosquito **(8)** promove a formação de gametas (gametogénese) no mosquito. A presença de ácido xanturénico, além de mudanças de temperatura e de pH, pode desencadear a gametogénese masculina, sob a forma de exflagelação. Seguidamente ocorre a fertilização de gâmetas masculinos (microgâmetas) e femininos (macrogâmetas) **(9)**, surgindo a única forma diploide do ciclo de vida do parasita, o zigoto. Após a formação do zigoto, é executada a meiose e o zigoto passa de uma forma esférica para uma forma alongada e móvel, denominada de oocineto **(10)**. Esta forma do parasita consegue atravessar a membrana peritrópica, de modo a continuar o seu ciclo, através de uma enzima chamada quitinase. De seguida o oocineto penetra nas células epiteliais do intestino do mosquito e migra para a camada basal, onde se irá desenvolver em oocistos **(11)**. Nesta fase, o parasita multiplica-se e passa pela forma de esporoblasto, que conseqüentemente se diferencia em esporozoíto. Por fim sucede a rutura do oocisto **(12)**, e os esporozoítos são libertados para o hemocelo do mosquito e são transportados pela circulação da hemolinfa até encontrarem e invadirem as glândulas salivares, num processo mediado pela TRAP. O ciclo no mosquito tem uma duração de 10 a 18 dias, após o que pode iniciar-se um novo

ciclo de infecção no ser humano caso o mosquito fêmea infetado, ao realizar uma refeição de sangue, inocule um novo hospedeiro humano.^{59,68}

1.1.7. Sintomatologia

A infecção por parasitas da malária pode resultar numa grande variedade e intensidade de sintomas, variando de sintomas ausentes ou muito leves a graves, podendo até resultar na morte do hospedeiro. Deste modo, a malária pode ser classificada como não complicada ou grave (complicada).⁶⁹

Após a inoculação pelo mosquito *Anopheles* existe um período de incubação, que corresponde ao intervalo de tempo antes de aparecerem os primeiros sintomas. O período de incubação, na maioria dos casos, varia de 7 a 30 dias, em que os períodos mais curtos são observados com maior frequência em infecções por *P. falciparum* enquanto que os mais longos resultam geralmente de infecções por *P. malariae*.⁶⁹ A duração do período de incubação é também influenciada por outros fatores, como o modo de transmissão do parasita, a exposição prévia ao parasita e a quimioprofilaxia.⁷⁰ Os medicamentos antimaláricos tomados para profilaxia podem atrasar o aparecimento de sintomas de malária por semanas ou meses, o que pode resultar em diagnósticos errados ou tardios.⁶⁹

Os sintomas clínicos de malária só aparecem na fase seguinte, a fase eritrocítica. Quando o parasita se desenvolve no eritrócito, várias substâncias, como a hemozoína e outros fatores tóxicos, acumulam-se nos glóbulos vermelhos infetados. Estes entram na corrente sanguínea através da lise celular provocada pelos parasitas, estimulando os macrófagos e outras células a produzir citocinas e outros fatores solúveis que provocam alguns dos sintomas de malária no hospedeiro.^{69,70}

O paroxismo clássico da malária apresenta três fases: uma fase fria, seguida de uma fase quente com uma fase final de transpiração. A fase fria caracteriza-se tipicamente por um início súbito com uma sensação de extrema frieza acompanhada de tremores. Esta fase inicial, dura geralmente entre 10 e 30 minutos e apenas ocasionalmente até 90 minutos. De seguida, a temperatura aumenta gradualmente até um pico (geralmente entre 39° e 41° C) e, eventualmente, o tremor cessa e a fase quente começa. Esta fase poderá ser acompanhada de náusea, vômitos, diarreia, cefaleias,

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

dores corporais, garganta seca, tosse, sede extrema, alteração da consciência e, em crianças jovens, ainda podem ocorrer convulsões. Em países onde a malária é pouco frequente, estes sintomas podem ser confundidos com gripe, constipação ou outras infecções comuns. Após 2 a 6 horas inicia-se a terceira fase do paroxismo, com transpiração repentina e abundante, depois a temperatura desce rapidamente e o doente apresenta-se com um extremo cansaço. Esta fase dura cerca de 2 a 3 horas e a duração total do paroxismo é de 6 a 10 horas.^{69,70}

A fase sintomática da malária ocorre por ciclos que se sucedem a cada 48 horas em *P. falciparum*, *P. ovale* e *P. vivax* e a cada 72 horas em *P. malariae* sendo classicamente denominadas por febre terçã e quartã, respetivamente.⁶⁹

Em conjunto com os sintomas presentes, durante um exame físico pode também ser detetado icterícia, hepatomegalia e esplenomegalia que pode resultar numa rutura do baço quando a infeção é provocada por *P. vivax*. Adicionalmente, em exames laboratoriais pode ser detetada anemia, hiperbilirrubinemia, trombocitopenia e um aumento da concentração de aminotransferases.^{69,70}

A evolução para malária complicada ou grave é provocada principalmente por *P. falciparum* e, ocasionalmente, por *P. vivax* e *P. knowlesi*. Como esta complicação tem uma progressão rápida e potencialmente fatal, qualquer doente com malária deve ser avaliado e tratado rapidamente, com observações frequentes para detetar sinais precoces de complicações sistémicas.^{69,70}

A malária grave provocada por *P. falciparum* é definida pela OMS com a presença de um ou mais dos seguintes critérios, na ausência de uma causa alternativa identificada, e na presença de parasitemia assexuada do parasita⁷¹:

- Consciência alterada: uma classificação de coma de Glasgow <11 em adultos ou de Blantyre <3 em crianças.
- Prostração: fraqueza generalizada o que resulta na incapacidade de sentar-se, ficar de pé ou caminhar sem assistência.
- Múltiplas convulsões: mais de dois episódios em 24 h.
- Acidose: um défice de base >8 mEq/L ou, se não disponível, um nível de bicarbonato plasmático <15 mmol/L ou lactato plasmático venoso ≥ 5 mmol/L. A

acidose grave manifesta-se clinicamente como um distúrbio respiratório que inclui respiração rápida, profunda e árdua.

- Hipoglicemia: glucose sanguínea ou plasmática $<2,2$ mmol/L (<40 mg / dL). Sintomas comuns de hipoglicemia incluem fome, nervosismo, tremores, transpiração, tonturas, cefaleias, sonolência, fraqueza, desorientação e até convulsões e consciência alterada.⁷² A hipoglicemia também pode resultar de infusões rápidas ou tratamento prolongado com quinina, devido à sua capacidade de estimular a secreção de insulina.⁷³
- Anemia grave: concentração de hemoglobina ≤ 5 g/dL ou hematócrito $\leq 15\%$ em crianças <12 anos (<7 g/dL e $<20\%$, respectivamente, em adultos) com contagem de parasitas $>10\ 000/\mu\text{L}$. Os mecanismos responsáveis pela anemia são multifatoriais, incluindo hemólise de glóbulos vermelhos infetados e não infetados, resposta inadequada da medula óssea e outros fatores individuais (por exemplo deficiência de G6PD e deficiência de vitamina B12).
- Insuficiência renal: Creatinina plasmática ou sérica >265 $\mu\text{mol/L}$ (3 mg/dL) ou ureia sanguínea >20 mmol/L
- Icterícia: Bilirrubina plasmática ou sérica > 50 $\mu\text{mol/L}$ (3 mg/dL) com contagem de parasitas $>100\ 000/\mu\text{L}$
- Edema pulmonar: é suspeitado em doentes com hipoxia (saturação de oxigênio $<92\%$) e taquipneia (frequência respiratória $>30/\text{min}$) com crepitação na auscultação. É confirmado radiologicamente.
- Hemorragia significativa: incluindo hemorragia recorrente ou prolongado do nariz, gengivas ou locais de venipunctura; hematémese ou sangue nas fezes.
- Choque: choque compensado é definido como tempo de reenchimento capilar ≥ 3 s ou gradiente de temperatura na perna (membro médio a proximal), mas sem hipotensão. O choque descompensado é definido como pressão arterial sistólica <70 mm Hg em crianças ou <80 mm Hg em adultos, com evidência de perfusão prejudicada (periferia fresca ou tempo de reenchimento capilar prolongado).
- Hiperparasitemia: parasitemia por *P. falciparum* $> 10\%$

A malária grave provocada por *P. vivax* é definida pelos parâmetros acima descritos mas sem limiares de densidade parasitária, enquanto que em *P. knowlesi* difere para os critérios de hiperparasitemia (densidade parasitária >100 000/μL) e, icterícia e densidade parasitária >20 000/μL.⁷¹

Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, após a recuperação do primeiro episódio de doença pode haver recaídas, devido ao possível estado latente no fígado, após meses, ou mesmo anos, sem sintomas.⁶⁹

1.1.8. Diagnóstico

Um diagnóstico preciso e imediato da malária é fundamental para uma gestão eficaz da doença. A OMS considera que casos de suspeita de malária, fundamentados com um histórico de viagens, sintomas e alterações físicas, devem ser tratados com base num diagnóstico confirmado por exame de microscopia ou teste rápido de diagnóstico (do inglês: *Rapid Diagnostic Test*, RDT), de uma amostra de sangue.⁷¹

O diagnóstico pode ser difícil em áreas onde a malária já não é endémica, uma vez que os profissionais de saúde não estão familiarizados com a doença e podem fazer um diagnóstico errado ou mesmo esquecer-se de considerar a malária entre os potenciais diagnósticos para alguns doentes. Por outro lado, em algumas áreas a transmissão da malária é tão intensa que uma grande proporção da população está infetada, mas permanece assintomática. Nessas situações, encontrar parasitas de malária numa pessoa doente não significa necessariamente que a doença é causada pelos parasitas. Em muitos países onde a malária é endémica a falta de recursos ainda é uma barreira para um diagnóstico confiável e atempado.⁷⁴

O diagnóstico baseado em sintomas é tradicional entre médicos e, apesar de ser um método menos dispendioso, os sintomas da malária são inespecíficos, o que dificulta um correto diagnóstico. A sobreposição de sintomas de malária com outras doenças tropicais prejudica a especificidade do diagnóstico que por sua vez promove o uso indiscriminado de fármacos antimaláricos e comprometem a qualidade dos cuidados de saúde para doentes com febre de uma origem distinta.^{75,76}

A malária é convencionalmente diagnosticada por exame microscópico de esfregaços de sangue corados, usando corantes como Giemsa. A deteção e identificação

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

microscópica de *Plasmodium sp.* em esfregaços espessos de sangue (para detecção do parasita) e esfregaços delgados de sangue (para confirmação da espécie) continua a ser o teste padrão de malária. É possível detetar parasitas assexuados com uma densidade <10 por μL de sangue, mas em condições normais o limite de sensibilidade é de aproximadamente 100 parasitas por μL .⁷¹

A microscopia não só fornece um diagnóstico muito sensível e específico da malária quando a análise é bem realizada, mas também permite a determinação da densidade parasitária e a identificação das espécies infetantes. Esta técnica, que envolve baixos custos diretos, possibilita a detecção de gametócitos no sangue e permite monitorar as respostas à terapia.^{71,74}

A técnica da camada leucoplaquetária quantitativa (do inglês: Quantitative Buffy Coat, QBC) foi concebida para melhorar a detecção microscópica de parasitas e simplificar o diagnóstico de malária. Este método envolve a coloração de ácido desoxirribonucleico (ADN) de parasitas em tubos de hematócrito com corantes fluorescentes, por exemplo o laranja de acridina, e sua subsequente detecção por microscopia fluorescente.⁷⁷ Embora esta técnica seja simples, confiável e fácil de usar, requer instrumentação especializada, é mais dispendiosa do que o microscópio de luz convencional e é desfavorável na determinação de espécies e números de parasitas.⁷⁴

Os testes rápidos de diagnóstico (do inglês: *Rapid Diagnostic Test*, RDTs) são testes imunocromatográficos para a detecção de antígenos específicos de parasitas numa amostra de sangue. Alguns testes permitem a detecção de uma única espécie (*P. falciparum*) enquanto que outros permitem a detecção de uma ou mais das outras espécies de parasitas da malária humana. Estão disponíveis comercialmente em vários formatos (tiras, cassetes, cartões)⁷⁸, são relativamente simples de executar e interpretar, e não requerem eletricidade ou equipamentos especiais. Contudo, os RDTs devem ser usados em conjunto com outros métodos para confirmar os resultados, caracterizar a infeção e monitorizar o tratamento.^{71,74}

Os testes atuais baseiam-se na detecção de proteína 2 rica em histidina (do inglês: *Histidine Rich Proteine 2*, HRP2), que é específica para *P. falciparum*, lactato desidrogenase de *Plasmodium* (do inglês: *Plasmodium Lactate Dehydrogenase*, PLDH) ou aldolase de *Plasmodium*.^{71,74}

Os RDTs permitem um fornecimento rápido de resultados (10-15 minutos), o que reduz o tempo de determinação da possível infecção do doente por *Plasmodium sp.*. Estes testes ainda possibilitam uma extensão de serviços de diagnóstico para as instalações e comunidades de saúde de nível mais baixo e necessitam de menos requisitos de formação do pessoal. Porém os RDTs baseados em *PfHRP2* não permitem distinguir novas infecções de infecções recentes que foram tratadas com sucesso, devido à persistência do *PfHRP2* no sangue durante 1 a 5 semanas após o tratamento. Os testes baseados em *HRP2* nem sempre são adequados, uma vez que em países da região da Amazônia existem deleções de *HRP2*, em *P. falciparum*, de frequências variáveis. A má sensibilidade para detetar *P. malariae* e *P. ovale*, a qualidade heterogênea dos produtos comercialmente disponíveis e a existência de variações entre lotes representam obstáculos ao uso dos RDTs.^{71,74}

Os métodos sorológicos de diagnóstico de malária são geralmente baseados na detecção de anticorpos contra parasitas assexuados do ciclo eritrocítico, utilizando imunofluorescência indireta (IFA) ou ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês: *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*, ELISA).⁷⁹ Embora o IFA seja muito sensível e específico, o teste sorológico não é prático como diagnóstico de rotina de malária aguda devido ao tempo necessário para o desenvolvimento de anticorpos e a sua persistência no sangue. Ainda requer microscopia de fluorescência e técnicos treinados que podem influenciar a fidedignidade dos resultados. Assim, os testes sorológicos têm a sua utilização limitada a estudos epidemiológicos, rastreio de potenciais doadores de sangue e confirmação do diagnóstico em doentes que foram recentemente tratados para malária.^{74,79}

As técnicas baseadas em reação em cadeia de polimerase (do inglês: *Polymerase Chain Reaction*, PCR), que detetam o ácido nucleico do parasita, representam um desenvolvimento recente no diagnóstico molecular da malária e figuram entre os métodos de diagnóstico mais específicos e sensíveis. Conseguem detetar infecções mistas e com baixas densidades parasitárias, que não são detetáveis por microscopia convencional ou com RDTs. Apesar do sucesso deste método, a utilidade do PCR é limitada devido ao custo elevado e à complexidade das metodologias, que requerem técnicos instruídos. Assim, o PCR não é regularmente implementado nos países em desenvolvimento por causa da complexidade do teste e da falta de recursos para realizar

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

o mesmo de forma adequada e rotineira. É, todavia, útil na determinação da espécie responsável pela infecção quando esta não consegue ser determinada pela observação microscópica, o que é relevante nos estudos de resistência a fármacos e noutros estudos epidemiológicos especializados.

Outros testes e técnicas têm vindo a ser desenvolvidas, como a amplificação isotérmica mediada por *loop* (do inglês: *Loop Mediated Isothermal Amplification*, LAMP), microarranjo de ADN, análise de citometria de fluxo e espectrometria de massa. Todavia, estas técnicas ainda estão em desenvolvimento e/ou necessitam de estudos clínicos para comprovar a sua eficácia.⁷⁴

1.1.9. Prevenção

A profilaxia da malária assenta numa combinação de medidas de prevenção de picadas de mosquitos (controlo do vetor) e em quimioprofilaxia. Embora com um grau de sucesso elevado, as intervenções recomendadas não são 100% eficazes, sendo recomendada uma avaliação de risco individual, de modo a aplicar medidas de prevenção adequadas. Esta deve considerar não só o país de destino, mas também o itinerário detalhado, incluindo cidades específicas (a transmissão da malária não é distribuída de forma homogénea em todos os países), o tipo de alojamento (p. ex. alojamento com ar condicionado pode ser preventivo; pernoitar no exterior aumenta o risco), estação do ano, meio de transporte, gravidez e informação relativa a resistências a medicamentos antimaláricos no destino.^{80,81}

O controlo vetorial é a principal abordagem para prevenir a malária e reduzir a sua transmissão,⁸² incluindo medidas de prevenção comportamentais, químicas e mecânicas.⁸⁰

As medidas de prevenção comportamentais passam por evitar locais com surtos de malária conhecidos e aplicar as medidas de prevenção necessárias durante as horas em que o vetor é mais ativo (do anoitecer ao amanhecer). Devem ser evitadas permanências ao ar livre, ou então tomar medidas preventivas (como o uso de repelente) durante as horas de maior risco e usar roupas adequadas, como camisolas de manga comprida, calças longas, botas e chapéus, de modo a minimizar as áreas da pele expostas. Ainda poderão ser aplicados repelentes ou inseticidas, como a permetrina, em

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

roupas e equipamentos, para fornecer uma maior proteção. Deve-se ainda evitar permanências junto a piscinas e lagos.^{80,81}

As medidas de prevenção química compreendem o uso de substâncias com propriedades inseticidas e repelentes, como os piretróides (p. ex. aletrina, permetrina). Estes podem ser utilizados em salas ou áreas com mosquitos (aerossóis de pulverização) ou repelir mosquitos numa área definida (repelentes espaciais). No entanto, devem ser suplementados pelo uso de repelentes na pele exposta ou na roupa. Os repelentes podem ser de origem sintética ou natural e, os mais vulgarmente utilizados são o DEET (*N,N*-dimetil-*meta*-toluamida) e Icaridina (2-(2-hidroxi-1-piperidinoformato de 1-metilpropionilo). Outros repelentes incluem óleo de *Corymbia citriodora* ou PMD (*para*-mentane-3,8-diol), IR3535 (3-[*N*-butil-*N*-acetil]-aminopropionato de etilo) e 2-undecanona.^{80,81}

As medidas de prevenção mecânicas abrangem a utilização de redes anti insetos nas janelas das residências, de forma a prevenir a entrada de mosquitos para o interior, e a utilização de redes mosquiteiras nas camas, que poderão ser impregnadas com piretróides (p. ex. permetrina), para um aumento da sua eficácia.^{80,81}

Têm vindo a ser desenvolvidos outros métodos de controlo vetorial, como a gestão de fontes de larvas (modificação do habitat, manipulação de habitat, larvicidas e controlo biológico), o uso de mosquitos geneticamente modificados, tornando-os resistentes à infeção por *Plasmodium* ou com capacidade de reduzir a sua esperança de vida e ainda a criação, esterilização e libertação de mosquitos masculinos geneticamente modificados, o que resulta numa redução da população de fêmeas.^{83,84}

A quimioprofilaxia é uma estratégia preventiva eficaz em áreas onde a malária é endémica. Contudo, esta geralmente não previne as recidivas posteriores que podem ocorrer com *P. vivax* e *P. ovale*, e nenhum regime terapêutico confere proteção total, portanto a quimioprofilaxia deve estar sempre associada ao controlo vetorial. Ao escolher um regime de quimioprofilaxia devem ser considerados vários fatores, como a informação disponível sobre a transmissão da malária do país de destino e sobre resistências aos antimaláricos existentes. Devem também ser considerados outros problemas de saúde, interações medicamentosas, o custo dos medicamentos, os possíveis efeitos secundários e a preferência individual.^{80,81}

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

Alguns dos fármacos, como a doxiciclina, a primaquina e a associação atovaquona-proguanil, são ideais para viagens com planejamento de última hora, uma vez que as tomas se iniciam 1 a 2 dias antes da viagem. Porém, na profilaxia com fármacos como a cloroquina e a mefloquina o tratamento deve ser iniciado 1 a 2 semanas antes da viagem, pelo que não são os mais adequados para viagens tardiamente planejadas. Os fármacos antimaláricos podem atuar na fase eritrocítica (cloroquina, atovaquona, mefloquina e doxiciclina), em que a quimioprofilaxia deve ser continuada até quatro semanas após a última exposição possível para contabilizar com a duração da fase pré-eritrocítica, ou na fase pré-eritrocítica (proguanil e primaquina), os quais devem ser continuados por um período mais curto (sete dias).^{80,81}

Atualmente, o desenvolvimento de vacinas contra a malária é uma área de intensa investigação, que apresenta enormes desafios. Existem três tipos de candidatos a vacinas que têm como alvo diferentes fases do ciclo de vida do parasita da malária: (1) vacinas que impedem a transmissão; (2) vacinas com ação na fase pré-eritrocítica; e (3) vacinas com ação na fase eritrocítica.^{85,86}

As vacinas que impedem a transmissão do parasita têm como alvo os antigénios em gâmetas, zigotos e oocinetos, de modo a prevenir o desenvolvimento de parasitas no mosquito. O objetivo destas vacinas é induzir anticorpos contra os antigénios da fase sexuada para bloquear a transição de oocineto para oocisto e, conseqüentemente parar a geração subsequente de esporozoítos infecciosos. As vacinas que atuam na fase hepática destinam-se a prevenir o desenvolvimento da malária no hospedeiro humano uma vez que visa interromper o ciclo de vida do parasita numa fase inicial da infeção. Por fim as vacinas com ação na fase eritrocítica têm como objetivo induzir respostas contra a invasão dos eritrócitos e dos resultantes sintomas. Uma vacina ideal contra a malária requer características essenciais, como ter vários componentes de modo a induzir uma resposta imune eficaz em diferentes fases da infeção, diferentes epítomos para superar a diversidade genética e a variação antigénica e ter capacidade para induzir mais de um tipo de resposta imune.⁸⁵

Até a data, a vacina que está mais avançada é RTS,S/AS01, também conhecida como Mosquirix™, que oferece proteção parcial contra a malária em crianças. É uma proteína recombinante que tem como alvo a proteína circunsporozoíta de *P. falciparum*, expressa pelo parasita na fase pré-eritrocítica, uma vez que nesta é expressa parte da

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

sequência circunsporozóita em conjunto com antígeno de superfície de hepatite B, e formulado com o adjuvante AS01.⁸⁷

A vacina está a ser avaliada na África subsaariana como uma ferramenta complementar de controlo da malária que potencialmente poderia ser adicionada às principais medidas preventivas, diagnósticas e de tratamento recomendadas pela OMS. Em julho de 2015 a vacina recebeu um parecer positivo da Agência Europeia do Medicamento (do inglês: *European Medicines Agency*, EMA) e, em outubro de 2015, dois grupos consultivos da OMS recomendaram a implementação de RTS,S/AS01 num número limitado de países africanos. A OMS adotou essas recomendações e, em novembro de 2016, anunciou que a vacina RTS,S seria lançada em projetos-piloto em 3 países da África subsaariana. O financiamento está garantido para a fase inicial do programa e as vacinações devem começar em 2018. Estes projetos-piloto podem abrir caminho para uma maior implementação da vacina, caso a segurança e a eficácia sejam consideradas aceitáveis.⁸²

2. Quimioterapia

Atualmente o tratamento eficaz da malária inclui o uso de um vasto leque de fármacos que têm vindo a ser desenvolvidos devido a pressões socioeconómicas, políticas e também devido ao desenvolvimento de inúmeras resistências aos fármacos antimaláricos por parte do parasita.⁸⁸

Os fármacos antimaláricos podem ser classificados de acordo com a fase do ciclo de vida parasítico que afetam⁷³:

- **Os esquizonticidas sanguíneos** atuam sobre a fase eritrocítica do parasita que é diretamente responsável pelos sintomas clínicos da doença. Estes podem originar uma cura clínica ou supressão da infeção, mas como não têm efeito sobre as formas exo-eritrocíticas, o tratamento não resulta numa cura total de malária provocada por *P. ovale* ou *P. vivax*.
- **Os esquizonticidas de tecidos** atuam na fase exo-eritrocítica do parasita e são utilizados para profilaxia causal, de modo a prevenir a invasão dos eritrócitos, ou para evitar recaídas provocadas por *P. vivax* e *P. ovale*.
- **Os gametocidas** destroem as formas sexuadas do parasita com o objetivo de interromper a transmissão da infeção ao vetor.
- **Os esporonticidas** não têm efeito direto sobre os gametócitos no hospedeiro humano, mas evitam a esporogonia no mosquito.

Os fármacos antimaláricos também podem ser classificados pelo grupo químico ao qual pertencem, o que por sua vez determina a fase do ciclo de vida que afetam.⁷³

2.1. Quinolinas

2.1.1. 4-Metanolquinolinas

2.1.1.1. Quinina e Quinidina

Os extratos de casca de *Cinchona* foram identificados no início do século XVII como eficazes no tratamento de febres e existem vários relatos históricos plausíveis sobre a descoberta destas propriedades. Esta informação foi trazida para a Europa pelos jesuítas e nessa altura a casca de *cinchona* tornou-se conhecida como casca dos jesuítas.^{89,90} No início do século XIX, dois químicos franceses, Joseph Caventou e Pierre

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

Pelletier, isolaram dois alcaloides diferentes, quinina (Figura 2-1) e cinchonina, a partir de amostras de cascas de cinchona.⁹¹ O caminho até à síntese de quinina começou com William Henry Perkins, que ao tentar sintetizar quinina produziu um corante, a mauveína.⁸⁹ A partir daí, vários corantes foram descobertos e sintetizados até que Paul Erlich introduziu o uso de azul de metileno (Figura 2-1) no tratamento de malária.⁹² Pasteur obteve a d-quinotoxina por isomerização de quinina em meio ácido e mais tarde Rabe e Kindler descreveram a isomerização da d-quinotoxina na quinina original. Posteriormente, Prelog e Prostenik converteram a quinotoxina em homomeroquineno, e vice-versa.⁹³ Finalmente, em 1944, Woodward e Doering publicaram a síntese total da quinina.⁹⁴ No entanto, foi só em 2001 que Gilbert Stork completou a síntese enantiosselectiva completa, com rendimento apreciável.⁹⁵

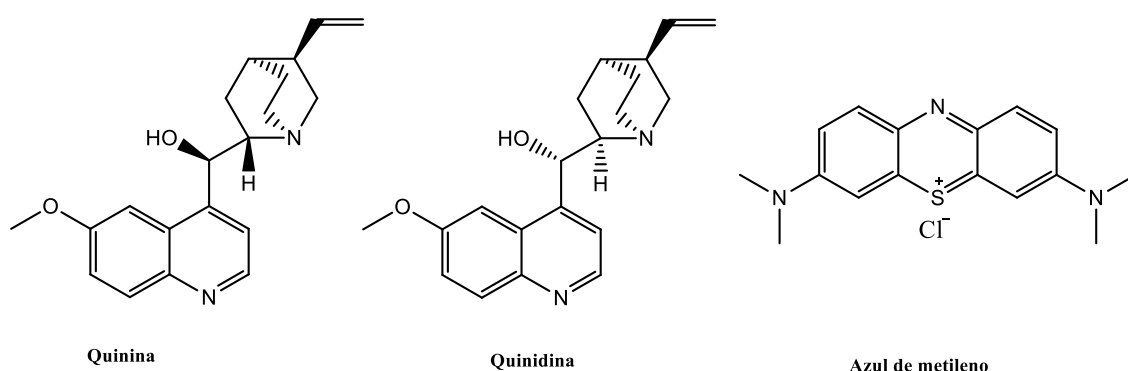


Figura 2-1 – Representação da estrutura química da quinina, quinidina e azul de metileno

A quinina tem uma rápida ação esquizotóxica nos parasitas da malária, na fase eritrocítica, e também apresenta atividade gametocida em *P. vivax* e *P. malariae*. Embora outros alvos também possam estar envolvidos em alguns casos, o grupo das quinolinas, com exceção da primaquina, têm como alvo a formação da hemozoína. Estes compostos atuam interferindo com o sequestro de heme tóxico (protoporfirina IX de ferro) produzido quando a hemoglobina é digerida pelo parasita. O heme, sob a forma de dímeros de β -hematina, é normalmente transformado, por um processo de mineralização, em hemozoína, que é depositada numa forma cristalina no vacúolo digestivo. As quinolinas ligam-se ao heme, impedindo o processo de destoxificação

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

através da dimerização e cristalização, e conseqüentemente produzem complexos prejudiciais e letais para o parasita.^{96,97}

Atualmente, a quinina é indicada para o tratamento da malária grave, por via parentérica, e da malária sem complicações, por via oral. É usada particularmente no primeiro trimestre de gravidez ou como um tratamento alternativo quando uma terapia de combinação baseada em artemisinina (do inglês: *Artemisinin-based Combination Therapy, ACT*) eficaz não está imediatamente disponível.⁷¹

A quinina em doses terapêuticas comuns pode dar origem a um conjunto de sintomas conhecidos como cinchonismo, que inclui zumbido, deficiência auditiva, cefaleia, náuseas, visão alterada e manifestações mais graves, como emese, dor abdominal, diarreia e vertigens. O cinchonismo também pode ocorrer após pequenas doses em pessoas hipersensíveis à quinina, no entanto as reações mais frequentes são urticária e rubor com prurido intenso. Outros efeitos secundários incluem febre, erupções cutâneas, dispneia, angioedema, asma, distúrbios do sangue, hipoglicemia e insuficiência renal. Os principais sintomas de sobredosagem, que podem ser fatais, incluem efeitos gastrointestinais, toxicidade ocular, distúrbios do SNC e cardiotoxicidade.⁷³

2.1.1.2. Mefloquina

A Mefloquina (Figura 2-2) foi descoberta na Divisão de Terapêutica Experimental do Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR), em Washington DC. A força motriz política responsável pelo programa foi o grave recuo clínico vivenciado pelos militares dos EUA durante a Guerra do Vietname, quando numa altura 1% das tropas de combate dos EUA estavam a falecer de malária, diariamente, devido à resistência a fármacos antimaláricos. A partir do início da década de 1960, o WRAIR realizou testes a mais de 250 000 potenciais compostos antimaláricos, sendo a mefloquina o composto número 142 490. Este novo antimalárico foi rapidamente aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) em 1989.⁹⁸

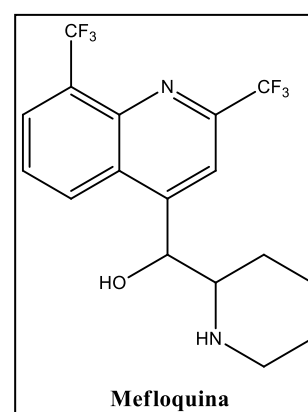


Figura 2-2 – Representação da estrutura química da mefloquina

A mefloquina é um esquizotocida sanguíneo eficaz contra todas as formas de malária, incluindo *P. falciparum* com resistências à cloroquina ou múltiplos fármacos. Atualmente é indicada para a quimioprofilaxia da malária causada por todas as espécies de *Plasmodium*, e a sua combinação com artesunato é recomendada para o tratamento da malária sem complicações.⁷¹

O mecanismo de ação da mefloquina é comum às restantes quinolinas, referido acima, e embora a mefloquina esteja associada a maiores incidências de efeitos adversos ao nível do sistema nervoso central e gastrointestinal do que outras ACTs, geralmente é bem tolerada quando administrada em combinação com artesunato (ACT) para o tratamento da malária sem complicações. Os efeitos adversos mais frequentes da mefloquina são cefaleia, tonturas, náuseas, distúrbios gastrointestinais e do sono. Outros efeitos adversos incluem perturbações no sistema cardiovascular, erupções cutâneas, prurido, perda de cabelo, mialgia, distúrbios da função hepática e muito raramente trombocitopenia e leucopenia.^{71,73}

2.1.2. 4-Aminoquinolinas

No decorrer de uma investigação para a descoberta de novos antimaláricos, Hans Andersag sintetizou em 1934 várias 4-aminoquinolinas. Um dos compostos sintetizados demonstrou ser especialmente eficaz na malária aviária, o qual recebeu o nome "resoquin", mas poucos estudos clínicos foram realizados devido à sua aparente toxicidade. Em 1943, quando o governo dos EUA criou o Conselho para a Coordenação de Estudos de Malária com o objetivo de desenvolver novos medicamentos antimaláricos, os efeitos promissores de "resoquin" foram revisitados devido a um desenvolvimento paralelo da substância SN-7619, idêntica à "resoquin" previamente estabelecida, que mais tarde recebeu o nome de cloroquina.

A partir de 1946 a cloroquina (Figura 2-3) ficou disponível para investigação clínica. Vários estudos clínicos foram rapidamente iniciados, demonstrando que a substância ativa era clinicamente eficaz e bem tolerada. A partir de 1950 a Bayer AG, em Leverkusen (Alemanha), iniciou o fabrico e a distribuição da cloroquina. A notícia do seu sucesso terapêutico espalhou-se rapidamente e alguns anos após a sua introdução, a

cloroquina tornou-se de uso generalizado e bem sucedido em quase todas as partes do mundo onde a malária estava presente.⁹⁹

A cloroquina é um esquizotocida sanguíneo de ação rápida com alguma atividade gametocida contra *P. ovale*, *P. vivax*, *P. malariae* e gametócitos imaturos de *P. falciparum*. O seu mecanismo de ação também envolve a destoxificação do heme e atualmente está indicada para o tratamento da malária não complicada provocada por *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*. Por outro lado, já não é recomendada para profilaxia contra *P. falciparum* (exceto em algumas partes da América Central), podendo contudo ser usada em profilaxia contra *P. vivax*.^{71,73,97}

A cloroquina é geralmente bem tolerada em doses terapêuticas para tratamento da malária e é também usada em doses mais elevadas para o tratamento da artrite reumatoide, situação em que se observa uma maior frequência de eventos adversos. Os efeitos adversos frequentes da cloroquina incluem cefaleias, erupções cutâneas, prurido e distúrbios gastrointestinais. Mais raramente podem ocorrer alterações mentais, distúrbios visuais ou sanguíneos e alterações na função hepática. Outros efeitos adversos incomuns decorrentes do uso prolongado incluem alopecia, despigmentação do cabelo, pigmentação de mucosas e pele, fotossensibilidade, zumbido, audição reduzida, neuromiopia e miopia.

A sobredosagem aguda com cloroquina é extremamente perigosa e a morte pode ocorrer dentro de poucas horas. Os efeitos iniciais incluem cefaleia, distúrbios gastrointestinais, sonolência e tonturas. A hipocaliemia pode ocorrer poucas horas após a ingestão de cloroquina e os distúrbios visuais podem ser dramáticos com uma súbita perda de visão. No entanto, o principal efeito da sobredosagem com cloroquina é a toxicidade cardiovascular, com hipotensão e arritmias cardíacas que progridem para colapso cardiovascular, convulsões, paragem cardíaca e respiratória, coma e morte.^{71,73}

A hidroxicloroquina (Figura 2-3) pertence ao grupo das 4-aminoquinolinas com atividade antimalárica e tem propriedades semelhantes às da cloroquina, podendo ser usada no tratamento de malária, como alternativa à cloroquina. No entanto, a hidroxicloroquina é usada principalmente no tratamento de outras doenças.⁷³

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

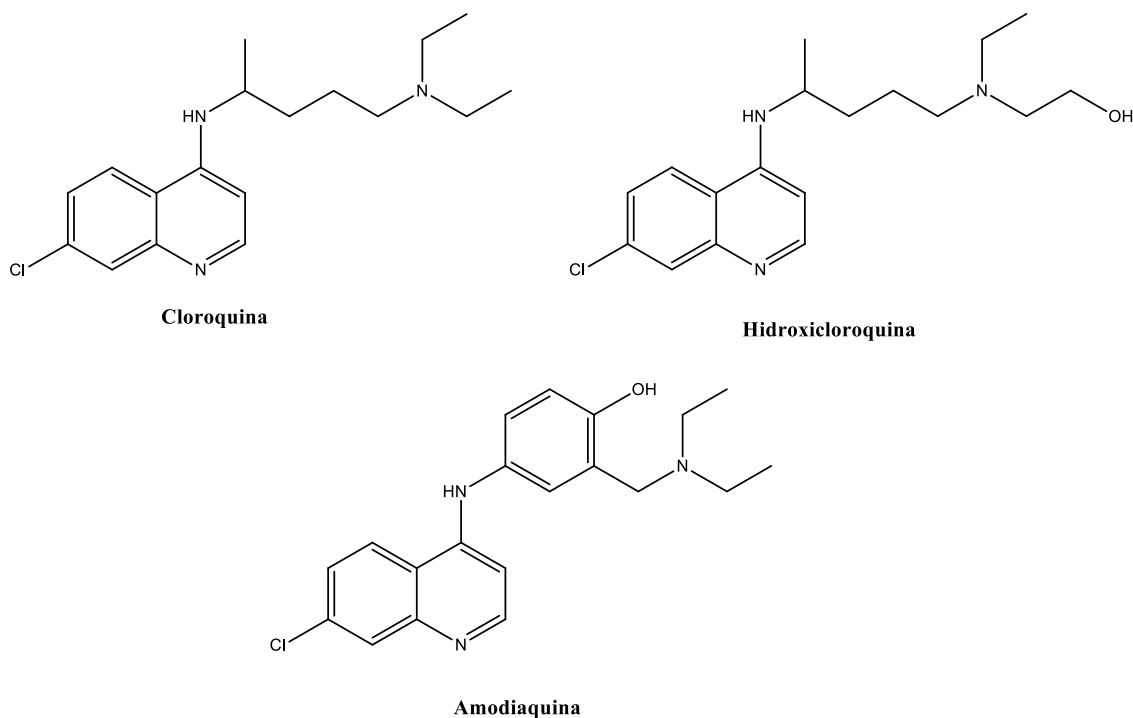


Figura 2-3 – Representação da estrutura química da cloroquina, hidroxicloroquina e amodiaquina

A amodiaquina (Figura 2-3), um análogo estrutural da cloroquina, tem eficácia e propriedades semelhantes às da cloroquina contra *P. falciparum* sensível à cloroquina e é também eficaz contra algumas estirpes resistentes à cloroquina.^{73,100}

Atualmente, a combinação de amodiaquina com artesunato é indicada para o tratamento de malária não complicada, provocada por *P. falciparum* ou *P. vivax*, e é considerada eficaz contra *P. ovale*, *P. knowlesi* e *P. malariae*. Também pode ser utilizada como tratamento contínuo em malária grave, quando existe possibilidade de administração da medicação por via oral. A combinação de amodiaquina com sulfadoxina-pirimetamina é administrada com doses completas de tratamento em intervalos mensais, como quimioprevenção sazonal de malária para crianças pequenas (3-59 meses), em áreas de transmissão sazonal e de alta intensidade. Os efeitos adversos da amodiaquina são semelhantes aos da cloroquina, porém conduz a uma maior incidência de hepatite e agranulocitose. Assim, a combinação de artesunato com amodiaquina não deve ser utilizada para profilaxia, pois a sua acumulação aumenta os riscos de hepatotoxicidade e agranulocitose.^{71,73}

2.1.3. 8-aminoquinolinas

A pamaquina (Figura 2-4) foi o primeiro agente antimalárico sintético da família das 8-aminoquinolinas que emergiu dos esforços de desenvolvimento da Bayer, na década de 1920, mas não foi muito utilizado devido à sua toxicidade. Foram entretanto intensificados esforços, nos EUA, para alterar a estrutura da pamaquina, de modo a melhorar as suas propriedades, conduzindo à síntese de alguns compostos com uma maior eficácia e menor toxicidade e finalmente a primaquina (Figura 2-4), que substituiu os anteriores. Posteriormente, na década de 1950, a primaquina foi considerada o fármaco de escolha para a cura total da malária provocada por *P. vivax*.¹⁰¹

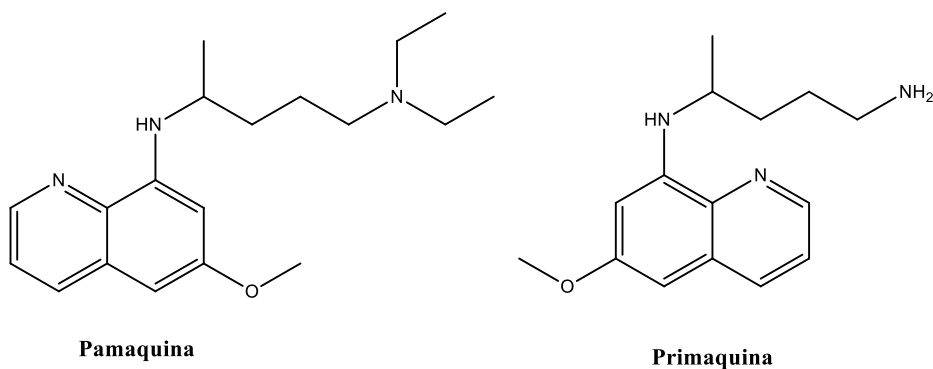


Figura 2-4 – Representação da estrutura química da pamaquina e a primaquina

As 8-aminoquinolinas são eficazes contra os parasitas na fase exo-eritrocítica, o que é essencial para prevenir a reincidência da malária, bem como para profilaxia causal (mata os parasitas na fase hepatocítica, evitando a infecção de eritrócitos). Além de ser a única classe terapêutica com atividade contra hipnozoítos, as 8-aminoquinolinas são ativas contra os gametócitos, interferindo portanto na transmissão da malária. Por outro lado, estes compostos têm uma fraca atividade contra os parasitas da fase assexuada de *P. vivax* e tem atividade insignificante contra *P. falciparum*.^{71,102}

O mecanismo de ação pelo qual a primaquina exerce a sua atividade antimalárica não está ainda esclarecido, mas foi proposto que as mitocôndrias possam ser o alvo biológico da primaquina. O metabolismo hepático da primaquina produz metabolitos intermediários reativos que geram espécies oxidativas tóxicas. Estas acumulam dentro das mitocôndrias, resultando num inchaço e em alterações estruturais nas membranas internas, interferindo com os processos metabólicos das mitocôndrias e

comprometendo o transporte de elétrons no parasita, o que pode conduzir à destruição da sua função mitocondrial.^{102,103}

Atualmente, a primaquina é indicada para a cura radical de malária provocada por *P. vivax* ou *P. ovale*, para a prevenção de uma presumível recaída (profilaxia terminal) em pessoas expostas prolongadamente a *P. vivax* ou *P. ovale* e pode também ser utilizada na profilaxia primária contra todas as espécies de malária. É também utilizado com o objetivo de reduzir a transmissão da malária por *P. falciparum*, em programas de eliminação da malária provocada por *P. falciparum* e em áreas ameaçadas pela resistência a artemisininas. Exceto na profilaxia primária, a primaquina é utilizada em conjunto com um esquizotocida sanguíneo eficaz, como uma ACT ou a cloroquina, na malária provocada por *P. vivax* ou *P. oval*.⁷¹

Quando a primaquina é utilizada em doses terapêuticas normais, os efeitos adversos são geralmente mínimos. No entanto, quando é ingerida com o estômago vazio o desconforto gastrointestinal é mais comum, e em doses maiores pode originar náuseas e vômitos. Pode ocorrer ocasionalmente uma meta-hemoglobinemia, que surge quando a concentração de meta-hemoglobina (hemoglobina anormal em que o catião ferro está no estado férrico (Fe^{3+}) em vez do estado normal, (ferroso, Fe^{2+}) nos eritrócitos é superior a 1%.¹⁰⁴ Em pessoas com deficiência de G6PD pode ainda ocorrer uma anemia hemolítica mas, felizmente, como a primaquina é eliminada rapidamente, a hemólise cessa assim que o tratamento é interrompido. Outros efeitos incomuns incluem anemia, leucocitose e, mais raramente, hipertensão arterial e arritmias cardíacas. Em casos raros, a primaquina pode também originar leucopenia ou agranulocitose, geralmente após sobredosagem. Outros efeitos associados à sobredosagem incluem sintomas gastrointestinais, anemia hemolítica e meta-hemoglobinemia com cianose.^{71,73}

2.1.4. Outros compostos de base quinolínica

Os restantes derivados de quinolinas com atividade antimalárica serão aqui descritos. Estes incluem a halofantrina, a lumefantrina, a piperaquina e a pironaridina (Figura 2-5). O mecanismo de ação destes compostos, tal como os restantes

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

antimaláricos de base quinolínica, passam pela inibição do processo de destoxificação do grupo heme no vacúolo digestivo do parasita.

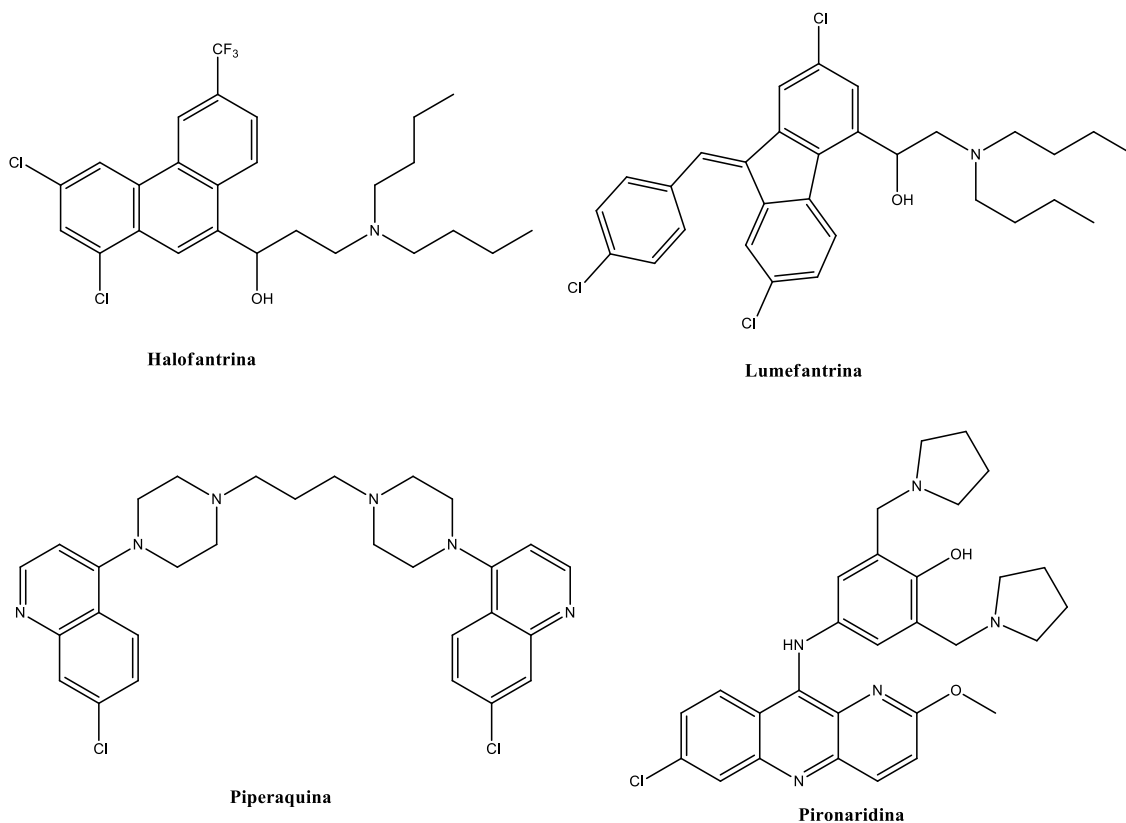


Figura 2-5 – Representação da estrutura química da piperaquina e pironaridina

A halofantrina foi desenvolvida na década de 1960, como resultado do mesmo programa de descoberta de fármacos antimaláricos pelo WRAIR que resultou na descoberta da mefloquina.⁹⁸

A halofantrina tem sido utilizada no tratamento de malária não complicada provocada por *P. falciparum* e *P. vivax* resistentes à cloroquina. É um esquizotocida sanguíneo, mas não tem atividade contra as formas exo-eritrocíticas. O seu valor terapêutico é limitado pela sua biodisponibilidade imprevisível e pela sua cardiotoxicidade. Não deve ser utilizado em casos em que a mefloquina foi previamente usada para profilaxia nem deve ser utilizada com objetivos de profilaxia da malária. Atualmente, a halofantrina já não é recomendada para o tratamento da malária.^{71,73,105}

Além da cardiotoxicidade, os efeitos adversos associados à halofantrina incluem diarreia, dor abdominal, náuseas, vômitos, prurido e erupção cutânea, elevação transitória de transaminases séricas, hemólise intravascular e reações de hipersensibilidade.⁷³

A lumefantrina foi descoberta em 1976 na sequência de uma extensão do projeto militar 523 da China, que tinha como objetivo descobrir novas terapêuticas antimaláricas durante a guerra do Vietname.¹⁰⁶

A Lumefantrina não está disponível nem tem sido utilizada como monoterapia, mas é usada em associação ao arteméter. Esta combinação terapêutica está indicada para o tratamento da malária não complicada provocada por *P. falciparum* ou *P. vivax*, é considerada eficaz contra *P. ovale*, *P. knowlesi* e *P. malariae* e pode também ser utilizado como uma continuação de tratamento de malária grave quando a terapêutica oral já é tolerada. Por outro lado, a associação arteméter-lumefantrina não está indicada para a profilaxia da malária. Esta terapêutica é geralmente bem tolerada. Quando surgem, os efeitos adversos geralmente incluem cefaleias, tonturas, distúrbios do sono, palpitações, distúrbios gastrointestinais, prurido, erupção cutânea, tosse, artralgia, mialgia e fadiga.⁷³

A Piperaquina foi sintetizada de forma independente pelo Instituto de investigação da Indústria Farmacêutica de Xangai, na China, e pela empresa Rhone-Poulenc, em França, na década de 1960. Devido à sua potência e tolerabilidade, substituiu a cloroquina como o antimalárico recomendado pelo Programa Nacional Chinês de Controlo da Malária, em 1978, tendo sido posteriormente fabricado e distribuído o equivalente a 140 milhões de doses de tratamento para adultos. No entanto o uso de piperaquina diminuiu na década de 1980, com o desenvolvimento de resistências e com a descoberta dos derivados de artemisinina. Em 1990, cientistas chineses redescobriram a piperaquina como um fármaco parceiro em terapias combinadas baseadas em artemisinina (um fármaco de semivida curta), formuladas para atingir uma elevada taxa de cura sem efeitos adversos significativos.¹⁰⁷

A piperaquina é eficaz contra parasitas de malária resistentes à cloroquina e a sua combinação com a dihidroartemisinina está indicada para o tratamento da malária não complicada por *P. falciparum* ou *P. vivax*. Também pode ser usada como continuação de tratamento de malária grave quando a terapêutica oral já é tolerada. Geralmente, a dihidroartemisinina-piperaquina é bem tolerada e tem poucos efeitos adversos. Os até agora relatados incluem náuseas, diarreia e vômitos, bem como anorexia, anemia, tonturas, cefaleias, distúrbios do sono e tosse.⁷¹

A pironaridina foi primeiro sintetizado em 1970 no Instituto Chinês de Doenças Parasitárias e tem sido usada na China nos últimos 30 anos para o tratamento da malária, em regime de monoterapia. Mais recentemente, foi renovado o interesse na pironaridina para uso em terapia de combinação baseada em artemisinina (do inglês: *Artemisinin-based Combination Therapy*, ACT) para o tratamento da malária. De fato, o seu uso limitado fora da China sugere que a resistência demorará a surgir quando usado em ACT. A pironaridina está atualmente sob investigação para uma combinação de dose fixa com artesunato, administrada numa proporção de 3: 1 para o tratamento da malária não complicada, provocada por *P. falciparum* e *P. vivax*.¹⁰⁸

2.1.5. Resistência e futuras perspectivas dos fármacos de base quinolínica

A resistência a quinolinas com ação antimalárica, especialmente a cloroquina, está associada a múltiplas mutações.¹⁰⁹ Os primeiros relatos de resistência à cloroquina ocorreram por volta dos anos 60.¹¹⁰ A investigação realizada ao longo de várias décadas para elucidar os mecanismos de resistência à cloroquina apontava para uma maior acumulação de cloroquina no vacúolo digestivo em parasitas sensíveis do que em estirpes resistentes.⁹⁷ No entanto, esta ideia foi recentemente posta em causa.¹¹¹

Os efeitos característicos da resistência à cloroquina foram atribuídos a alterações específicas de aminoácidos numa proteína integral de membrana do vacúolo digestivo, o transportador de resistência à cloroquina de *P. falciparum* (do inglês: *Plasmodium falciparum Chloroquine Resistance Transporter*, PfCRT). O PfCRT com uma mutação no aminoácido 76 parece ser central para o fenótipo de resistência à cloroquina e este PfCRT mutante parece facilitar o movimento de fármacos para fora do vacúolo digestivo.^{109,112,113} Como o PfCRT confere esse fenótipo, tem sido objeto de intenso debate, e os diferentes modelos propostos serão apresentados abaixo.

No modelo de partição foi descoberto que a cloroquina fluía muito mais rápido para fora do vacúolo digestivo em estirpes resistentes à cloroquina do que acontecia nas estirpes sensíveis a cloroquina.¹¹⁴ Inicialmente este fenómeno foi atribuído a mudanças no pH do vacúolo digestivo para estirpes sensíveis e resistentes à cloroquina. No entanto, mais tarde foi mostrado que os parasitas resistentes à cloroquina têm um pH

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

de repouso do vacúolo digestivo semelhante e, portanto, devem possuir um mecanismo de efluxo da cloroquina na membrana do vacúolo digestivo, aumentando de alguma forma a permeabilidade da cloroquina.^{109,115} No modelo de canal, o *PfCRT* mutado atua como um canal, proporcionando uma via de saída através de difusão passiva da cloroquina com carga positiva, permitindo que o mesmo flua livremente para fora do vacúolo digestivo.^{109,116} No modelo de transportador, o *PfCRT* mutado atua como um transportador que transporta a cloroquina com carga positiva por difusão facilitada ou transporte ativo através da membrana do vacúolo digestivo.^{109,117}

Foi também considerado um homólogo da resistência a múltiplos fármacos de *P. falciparum* (do inglês: *Plasmodium falciparum Multidrug resistance 1*, *PfMDR1*) na resistência à cloroquina. Foi demonstrado que a *PfMDR1* reside na membrana do vacúolo digestivo dos parasitas, com o seu domínio de ligação a trifosfato de adenosina (do inglês: *Adenosine Triphosphate*, ATP) virado para o citoplasma, sugerindo que a *PfMDR1* direciona o movimento de fármacos para o vacúolo digestivo. A perda desta capacidade de importação de fármacos pode ser vantajosa para o parasita quando o fármaco tem como alvo o vacúolo digestivo e o transporte de cloroquina mediado por *PfMDR1* demonstrou contribuir para a resistência à cloroquina. Foi demonstrado que a *PfMDR1* transporta a cloroquina e que os polimorfismos no *PfMDR1* afetam a especificidade do substrato, pois a *PfMDR1* do tipo selvagem transporta a cloroquina enquanto que as variantes polimórficas *PfMDR1* de linhas de parasitas associadas a resistências aparentemente não são tão eficientes.^{109,118,119}

Desde a descoberta da cloroquina, inúmeras tentativas foram feitas para desenvolver um fármaco quinolínico com melhores propriedades. Numa tentativa de superar as resistências, estudos em 4-aminoquinolinas revelaram que os análogos de cloroquina com uma cadeia lateral mais curta retiveram a atividade contra espécies de *Plasmodium* resistentes à cloroquina.¹²⁰ Um destes análogos, denominado AQ-13 (Figura 2-6), demonstrou resultados positivos num ensaio clínico.¹²¹ Outra estratégia para contornar a resistência à cloroquina passa pelo uso de compostos organometálicos, dos quais a ferroquina (Figura 2-6) e seus derivados apresentam os resultados mais promissores. No entanto, mais estudos são necessários nesta nova classe com potencial antimalárico.¹²² Um nova abordagem de investigação é a utilização de uma molécula híbrida sintética contendo dois farmacóforos ligados covalentemente¹²². A molécula

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

híbrida é desenhada com o objetivo de atacar o parasita por dois mecanismos distintos, contornando o desenvolvimento de resistências. Exemplos recentes incluem trioxaquinas contendo um 1,2,4-trioxano ligado covalentemente a uma 4-aminoquinolina. Verificou-se que estas novas trioxaquinas eram potentes contra espécies resistentes à cloroquina e pirimetamina e exibem atividade antimalárica acrescida em comparação com os componentes individuais. Várias trioxaquinas foram desenvolvidas ao longo de vários anos, culminando na seleção de um candidato para desenvolvimento conhecido como SAR116242 (Figura 2-6). A sua atividade superior foi atribuída ao seu mecanismo duplo de alquilação do heme e inibição da formação de hemozoína.^{123,124}

A Tafenoquina (Figura 2-6) é uma 8-aminoquinolina que foi desenvolvido conjuntamente pelo WRAIR e a GlaxoSmithKline na tentativa de obter um agente de ação mais longa, mais potente e menos tóxico para a cura radical e profilaxia causal da malária. A Tafenoquina exibiu maior atividade que a primaquina contra parasitas das fases sanguíneas e hepáticas, *in vitro*. Além disso, tem uma semivida sérica longa e menos efeitos adversos, o que sugere que pode tornar-se numa adição importante ao arsenal terapêutico para o tratamento e prevenção da malária. Atualmente, a tafenoquina encontra-se em estudos clínicos, realizados pela GlaxoSmithKline.^{125,126}

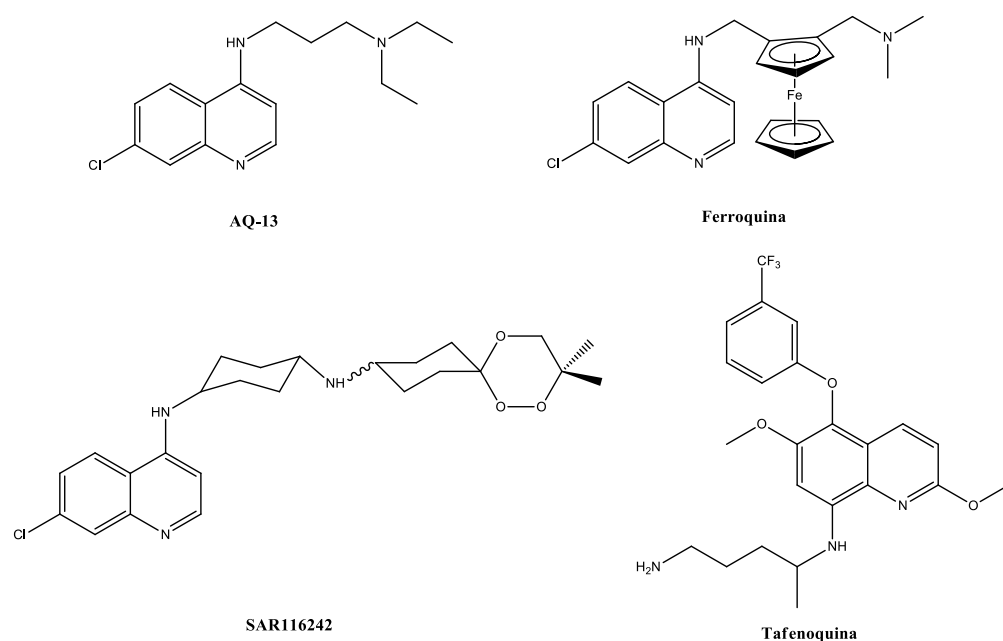


Figura 2-6 – Representação da estrutura química dos compostos AQ-13, ferroquina, SAR116242 e Tafenoquina.

2.2. Antagonistas de folatos

A via do folato (Figura 2-7) é extremamente importante para a sobrevivência dos parasitas da malária, uma vez que os derivados de folato são cofatores envolvidos na produção de purinas e pirimidinas que são essenciais para a síntese de ADN e para a síntese e/ou catabolismo de vários aminoácidos.¹²⁷

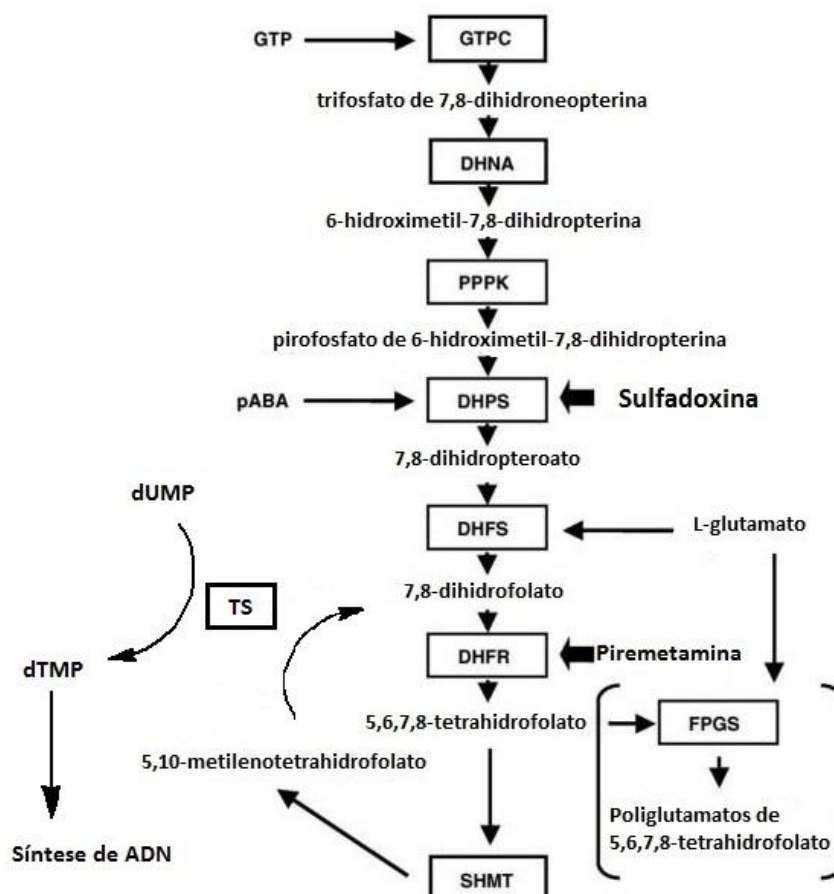


Figura 2-7 – Esquema da via do folato de *P. falciparum*, com indicação dos alvos para ação dos fármacos sulfadoxina e pirimetamina (adaptado de ¹²⁷)

Os alvos terapêuticos da via do folato já explorados na perspectiva do desenvolvimento de antimaláricos são as enzimas dihidropteroato sintase (DHPS) e dihidrofolato redutase (DHFR). A DHPS não é encontrada no hospedeiro, apenas no parasita, enquanto que a DHFR está presente tanto no hospedeiro como no parasita. A segurança e a eficácia dos fármacos que têm como alvo esta enzima, dependem de uma diferença substancial (várias centenas de vezes) na sua afinidade pela enzima parasitária, relativamente à enzima homóloga humana. Tal como demonstrado na Figura 2-7, o ácido 4-aminobenzóico, também conhecido como ácido *para*-

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

aminobenzóico (do inglês: *para*-Aminobenzoic Acid, pABA), é o substrato natural da DHPS, onde reage com o pirofosfato de 6-hidroximetil-7,8-dihidropterina para originar o 7,8-dihidropteroato. A sulfadoxina e a dapsona (Figura 2-8) são fármacos que inibem competitivamente a DHPS, enquanto que o proguanil e a piremetamina (Figura 2-8) têm a DHFR como alvo terapêutico.^{97,127,128}

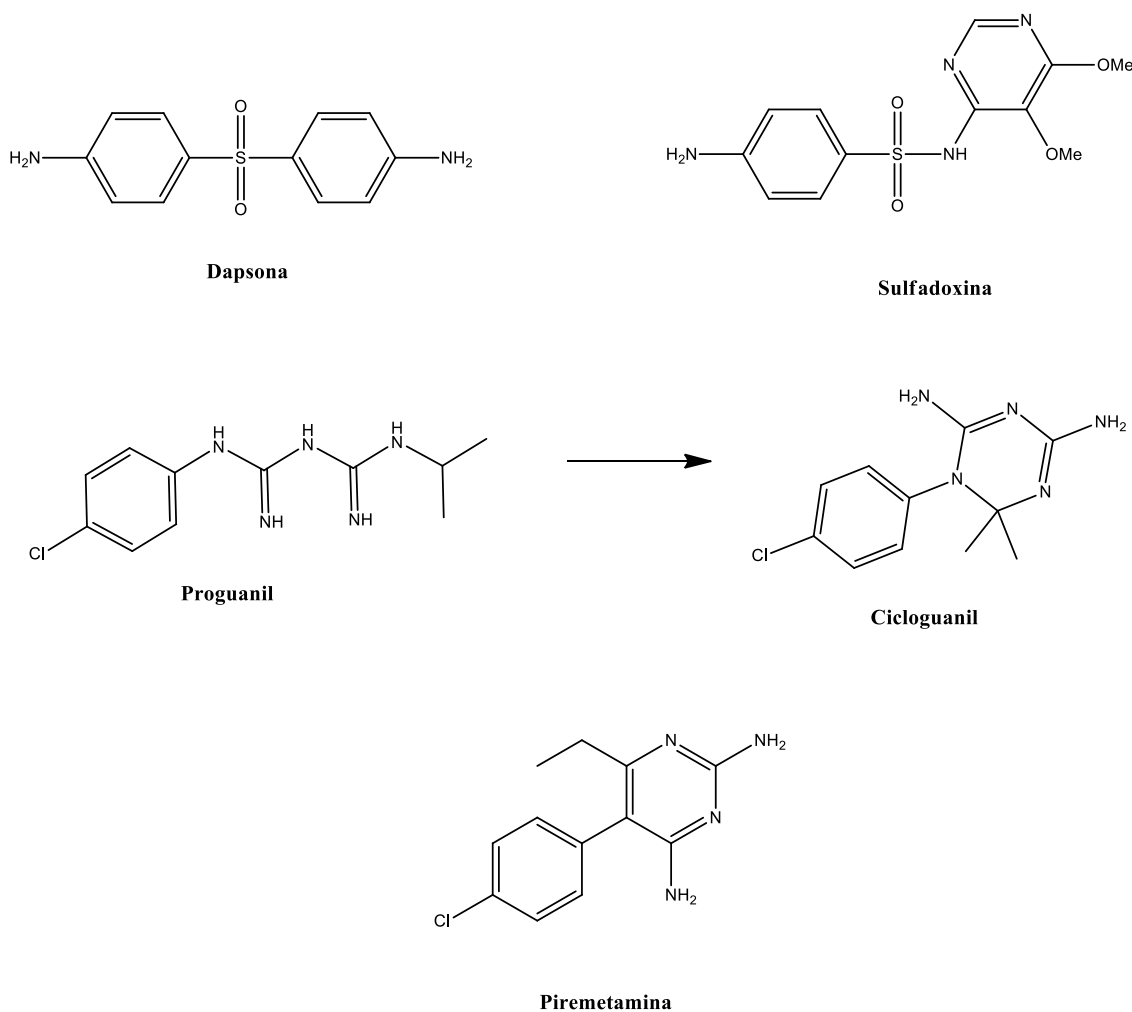


Figura 2-8 – Representação da estrutura química de vários antagonistas de folatos

Embora a pirimetamina e o proguanil tenham sido inicialmente utilizados em monoterapia, após a sua introdução nas décadas de 1940/1950, rapidamente surgiram resistências e foi apenas em combinações fortemente sinérgicas com as sulfonamidas que as formulações com utilidade a longo prazo foram produzidas.¹²⁸

O proguanil, descoberto na década de 1940, foi o primeiro antagonista de folatos usado contra a malária.¹²⁹ Este fármaco necessita de ser metabolizado no fígado para se obter a sua forma ativa, o cicloguanil (Figura 2-8).¹³⁰ Já foi utilizado em monoterapia

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

como agente profilático, mas devido a mutações no DHFR, como resultado do uso de pirimetamina, observou-se uma diminuição na atividade do cicloguanil.¹³¹ Foram feitas tentativas de combinar o proguanil com outros fármacos, como a dapsona¹³² e o artesunato,¹³³ mas atualmente é utilizado em combinação com a atovaquona (um inibidor do complexo de citocromo *bc₁*).¹³⁴

A combinação de atovaquona-proguanil (Malarone®) é indicada para a profilaxia de malária e para o tratamento da malária não complicada fora das áreas endêmicas da malária. O proguanil também é usado em combinação com artesunato e primaquina, como tratamento alternativo de malária não complicada em situações em que os tratamentos recomendados pela OMS não estão disponíveis ou não são eficazes.⁷¹

Geralmente a atovaquona-proguanil é bem tolerada. Quando surgem, os efeitos adversos mais comuns são cefaleias, tosse e distúrbios gastrointestinais. Raramente, provoca tonturas, úlceras orais, reações alérgicas e, muito raramente, distúrbios sanguíneos e reações cutâneas. Foram ainda relatadas atividades enzimáticas do fígado aumentadas, hepatite, insuficiência hepática e ocorrência de pancitopenia em pessoas com insuficiência renal grave, provavelmente devido à acumulação de fármacos.^{73,134,135}

Inicialmente, a pirimetamina foi sintetizado como um fármaco anticancerígeno, tendo sido escrutinada como um antimalárico com base na sua semelhança estrutural ao proguanil.¹³⁶ Foi utilizada pela primeira vez em monoterapia, numa formulação conhecida como Daraprim®, mas mais recentemente é utilizado em combinação com a sulfadoxina.⁷¹

A combinação sulfadoxina-pirimetamina é indicada para o tratamento preventivo intermitente da malária em mulheres grávidas e em lactentes, em áreas de intensidade de transmissão moderada a alta. Esta combinação de fármacos é também utilizada em combinação com a amodiaquina para a quimioprofilaxia sazonal da malária em crianças, em áreas com transmissão altamente sazonal da malária e, nas poucas áreas em que permanece eficaz, pode ser usada com artesunato para o tratamento da malária aguda não complicada.⁷¹

A sulfadoxina-pirimetamina é geralmente bem tolerada nas doses recomendadas, e os efeitos adversos relatados são principalmente os associados a sulfonamidas, que incluem distúrbios gastrointestinais, cefaleias, tonturas e reações cutâneas, como fotossensibilidade, erupção cutânea, prurido, urticária e perda de

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

cabelo. Também podem ocorrer reações cutâneas potencialmente fatais, nomeadamente eritema multiforme, síndrome de Stevens-Johnson e necrólise epidérmica tóxica. Outros relatos de efeitos adversos incluem leucopenia, trombocitopenia, anemia megaloblástica, anemia hemolítica (relacionada com deficiência de G6PD), cristalúria, hematúria, oligúria e hepatite. Ainda houve relatos de casos isolados de doença no soro, pericardite alérgica e infiltrados pulmonares que se assemelham a alveolite eosinofílica ou alérgica.^{73,137-140}

2.2.1. Resistência e futuras perspectivas dos antifolatos com atividade antimalárica

A resistência à pirimetamina surge predominantemente do acúmulo de mutações no *pfdhfr* que provocam as alterações de aminoácidos Asn51Ile, Cys59Arg e Ser108Asn, enquanto uma combinação de Ala16Val e Ser108Thr resulta em resistência ao cicloguanil (metabolito ativo do proguanil). Da mesma forma, a resistência à sulfadoxina geralmente envolve as mudanças Ala437Gly, Lys540Glu e Ala581Gly na enzima DHPS. A combinação resistente mais frequente em DHPS, atualmente prevalente em África, é a forma de duplo mutante Ala437Gly, Lys540Glu que, quando encontrada em conjunto com as mutações no DHFR, produz um mutante cujo padrão resulta em parasitas altamente resistentes à combinação de sulfadoxina com pirimetamina.¹⁴¹⁻¹⁴³ Este padrão está a tornar-se cada vez mais comum, com frequências de 70% ou mais relatadas em algumas áreas da África Oriental.¹⁴⁴ Uma mutação DHFR adicional, Ile164Leu, resulta em parasitas altamente resistentes a sulfadoxina-pirimetamina e estes tipos de mutantes foram recentemente detetados em regiões da África Oriental, como Quênia e Ruanda.^{145,146}

Outros estudos demonstraram que parasitas altamente resistentes à pirimetamina, principalmente aqueles com a mutação 164-Leu, têm um número de cópias aumentado do gene *gtp-ch*, que codifica a enzima GTP ciclohidrolase (catalisa o primeiro passo da via do folato, Figura 2-7). Sendo este um fenómeno adaptativo, pode refletir mecanismos compensatórios para manter uma produção de folatos suficiente.¹⁴⁷

Outros fatores, como o aumento das concentrações séricas de folato, podem desempenhar um papel importante nos níveis de falha clínica. Maiores concentrações de folato no parasita podem estar ligadas à seleção de uma forma mutante (R1466K) do transportador *PfMRP1*, em infecções persistentes após o tratamento com sulfadoxina-pirimetamina. É proposto que esta forma mutante de MRP1 seja menos ativa ao atuar como mediador de efluxo de folato e o aumento da quantidade de folatos endógenos resultantes promoverá uma competição mais eficaz com fármacos antagonistas de folatos nos sítios de ligação das enzimas.¹⁴⁸

A inibição das vias de salvação poderia ser uma estratégia de aumentar a atividade e eficácia dos antagonistas de folatos. Foi demonstrado que a probenecida, um inibidor de transportadores de aniões, aumenta substancialmente a atividade de inibidores de DHFR e DHPS e este aumento da atividade foi associado a uma diminuição da absorção de folatos pelo parasita.¹⁴⁹ Este efeito provocado pela probenecida foi testado *in vivo* e os resultados indicam que a probenecida aumenta a eficácia da pirimetamina e sulfadoxina.¹⁴⁹

2.3. Antibióticos

Existem muitos antibióticos que possuem atividade antimalárica, como as classes das fluoroquinolonas, lincosamidas, tetraciclina e macrólidos.⁸⁸ No entanto, as fluoroquinolonas não exibiram uma eficácia antimalárica útil quando testadas *in vivo*.^{150,151} As lincosamidas, tetraciclina e macrólidos têm propriedades antimaláricas estabelecidas e são clinicamente úteis em determinadas circunstâncias. Porém, nenhum destes antibióticos é muito ativo e de ação rápida, portanto o seu uso requer combinação com outras classes de fármacos de ação mais rápida.⁹⁷

As lincosamidas ganharam o seu nome a partir da lincomicina (Figura 2-9), extraída pela primeira vez de *Streptomyces lincolnensis* em 1962. A clindamicina (Figura 2-9), uma lincosamida semissintética, inibe a síntese de proteínas pela ligação à unidade ribossômica 50S. O seu efeito contra *Plasmodium sp.* deve-se ao facto de interferir com a função do apicoplasto e, conseqüentemente, no segundo ciclo intracelular do parasita resulta na sua morte. Este fenómeno é conhecido como "fenótipo de morte retardada"

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

ou "efeito de morte retardada" e, apesar desse efeito ainda não ser totalmente compreendido, existem vários estudos e propostas.^{88,152,153}

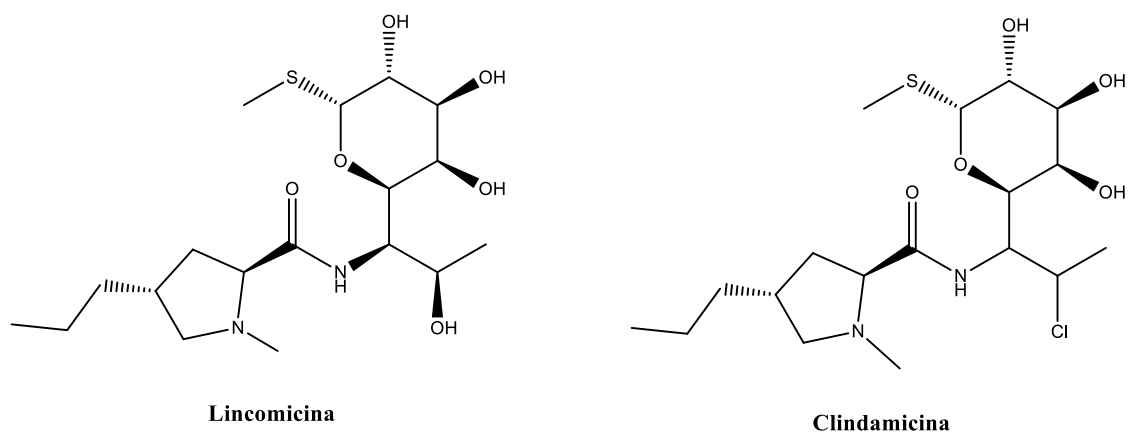


Figura 2-9 – Representação da estrutura química da lincomicina e clindamicina

A clindamicina é utilizada em combinação com artesunato ou quinina para o tratamento de malária não complicada.⁷¹ Geralmente é bem tolerada após uma administração oral e a sua principal desvantagem é o seu potencial para causar diarreia associada aos antibióticos, levando ao crescimento excessivo de *Clostridium difficile* e colite pseudomembranosa. Outros efeitos adversos incluem distúrbios gastrointestinais, erupções cutâneas ou prurido e, em doses mais elevadas, pode provocar um sabor metálico na boca. Mais raramente, a terapia com clindamicina tem sido associada a anafilaxia, leucopenia, agranulocitose, eosinofilia, trombocitopenia, eritema multiforme, síndrome de Stevens-Johnson, dermatites, poliartrite, icterícia, elevação das enzimas hepáticas, hepatotoxicidade e disfunção renal.^{71,73}

A descoberta das tetraciclina iniciou-se com a extração da clortetraciclina de *Streptomyces aureofasciens*, em 1948.¹⁵⁴ Posteriormente, em 1953, a desidrogenação catalítica da clortetraciclina deu origem à tetraciclina,¹⁵⁵ e a doxiciclina (Figura 2-10) foi desenvolvida pela primeira vez em 1967.¹⁵⁵ O modo de ação das tetraciclina passa pela inibição da síntese proteica, ligando-se à subunidade ribossomal 30S, através da interferência na função normal do apicoplasto dos parasitas.^{88,156}

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

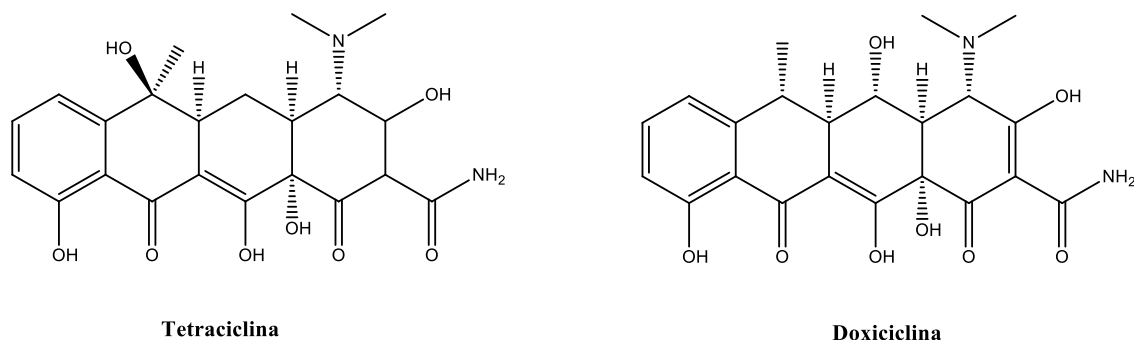


Figura 2-10 – Representação da estrutura química da tetraciclina e da doxiciclina

Atualmente a doxiciclina é indicada para a profilaxia da malária, sendo também utilizada em combinação com quinina ou com artesunato como continuação de tratamento de malária grave, ou para o tratamento da malária não complicada provocada por *P. falciparum*.⁷¹ Os efeitos secundários da doxiciclina são semelhantes às outras tetraciclina, incluindo distúrbios gastrointestinais, boca seca, glossite, estomatite, disfagia e ulceração esofágica. As tetraciclina provocam a descoloração dos dentes, causam hipoplasia do esmalte em crianças e ainda interferem no crescimento ósseo em fetos e crianças jovens. Outros efeitos secundários relatados são enterocolite, lesões inflamatórias na região ano-genital, vaginite, reações cutâneas e reações de hipersensibilidade. Os efeitos adversos graves são raros e incluem hipertensão intracraniana benigna em adultos e anormalidades hematológicas.^{71,73}

2.4. Artemisinina e derivados

A descoberta da artemisinina (Figura 2-11) por cientistas chineses na década de 1970 representou um dos maiores avanços em medicina no século XX. O projeto (projeto 523) que levou à descoberta da artemisinina foi iniciado em resposta a um pedido dos líderes norte-vietnamitas que estavam a sofrer grandes perdas de soldados devido à malária durante a guerra do Vietname. A consequente análise da farmacopeia chinesa tradicional levou à identificação de mais de dez plantas com boas atividades antimaláricas, incluindo *Artabotrys hexapetalus* e *Artemisia annua*. Após terem sido desenvolvidos vários métodos de extração, com resultados inconsistentes, um grupo de cientistas, incluindo Tu Youyou, conseguiu obter um extrato com boa eficácia contra a malária. Ensaio clínicos subsequentes forneceram dados chave, demonstrando a eficácia dos extratos de *Artemisia annua*, e serviram como base para investigações

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

posteriores. Em 1973 a artemisinina foi extraída de *A. Annu* e isolada pela primeira vez e posteriormente foram produzidos vários derivados, incluindo arteméter, artesunato e dihidroartemisinina (Figura 2-11).¹⁰⁶

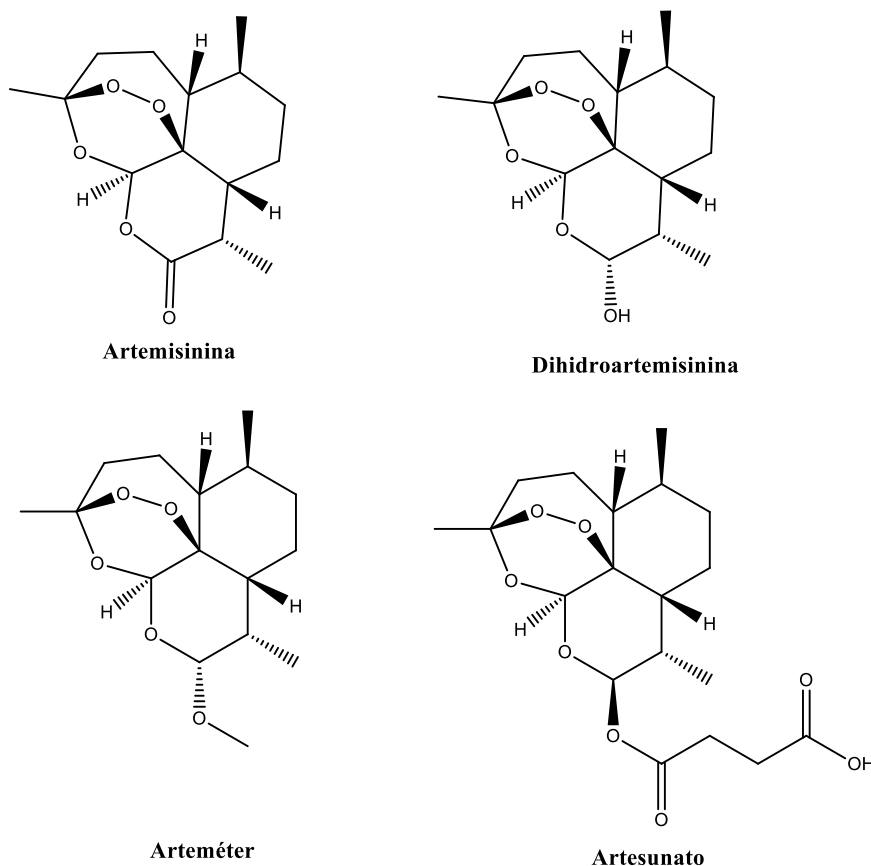


Figura 2-11 – Representação da estrutura química da artemisinina e derivados, usados como antimaláricos.

A artemisinina é uma lactona sesquiterpénica que tem na sua estrutura característica uma unidade de 1,2,4-trioxano, um endoperóxido que mostrou ser essencial à atividade deste grupo de compostos.¹⁵⁷ A artemisinina é pouco solúvel em água e óleo, mas solúvel em muitos solventes orgânicos apróticos. Todos os derivados de artemisinina compartilham a mesma estrutura química básica da artemisinina, variando no grupo químico na posição C₁₀. Este grupo é usado para ajustar propriedades tais como a solubilidade, a difusão através das membranas mucosas, entre outras propriedades farmacocinéticas e farmacológicas.¹⁵⁸

Vários estudos relativos aos mecanismos de bioativação e ação da artemisina e derivados conduziram a propostas que preveem inicialmente uma bioativação catalisada, por Fe(II) ou heme, e a subsequente ação da espécie bioativa em alvos

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

moleculares.¹⁵⁹ Inicialmente, o grupo de Meshnick¹⁶⁰ defendeu que a bioativação das artemisininas é desencadeada pelo ferro (II) para gerar espécies radicalares reativas. Posteriormente foram propostos dois modelos opostos, o "modelo de cisão redutiva"^{161,162} e o "modelo de peróxido aberto",¹⁶³ para explicar melhor este processo.

No modelo da cisão redutiva é proposto que os radicais centrados no oxigênio sofrem rearranjo posteriormente, formando radicais centrados em carbono que podem reagir com diferentes macromoléculas. Por outro lado, no modelo de peróxido aberto foi proposto que o ferro atua como um ácido de Lewis para facilitar a ativação iônica, em vez de radicalar, das artemisininas, resultando na abertura do anel. A clivagem heterolítica do endoperóxido e a subsequente captura de água conduzem à formação de um hidroperóxido insaturado, capaz de modificar irreversivelmente os resíduos de proteínas por oxidação direta. A degradação subsequente do hidroperóxido produz um radical hidroxilo, uma espécie que pode oxidar resíduos de aminoácidos.^{159,161-163}

Um dos alvos moleculares propostos é o grupo heme. Esta teoria propõe que os radicais livres produzidos após a ativação do endoperóxido da artemisinina são responsáveis pela alquilação do heme intracelular. O heme alquilado é então incapaz de sofrer a sua desintoxicação habitual pelo parasita, em forma de hemozoína. Existem vários estudos que corroboram esta teoria¹⁶⁴⁻¹⁶⁹ mas por outro lado também existem estudos que contrariam estes resultados.^{170,171} As proteínas e lípidos podem ser outros possíveis alvos moleculares da formação de ligações covalentes dos radicais livres produzidos, alterando a função dos mesmos.^{97,106,172,173} Recentemente, a inibição específica da enzima *PfATP6*, essencial para o metabolismo oxidativo no parasita, foi postulada como mecanismo de ação, uma vez que as artemisininas apresentam semelhanças estruturais com um composto que é um inibidor específico de uma ATPase envolvida no transporte de Ca^{2+} no retículo endoplasmático (do inglês: *Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase*, SERCA). Foi demonstrado que a artemisinina realmente inibe o *PfATP6* e o mecanismo parece ser altamente específico.¹⁷⁴ Vários estudos, sobre o efeito semelhante da artemisinina no homólogo SERCA em *T. gondii*¹⁷⁵ e o efeito de mutações da *PfATP6* na atividade e resistência da artemisinina, apoiam esta teoria.^{176,177} Por outro lado, existem estudos com resultados contraditórios, pondo em causa a validade desta teoria.¹⁷⁸⁻¹⁸⁰ Desta forma, muito mais estudos são necessários

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

para validar a *Pf*ATP6 como um alvo e para esclarecer como as suas mutações contribuem para as resistências.

Os derivados da artemisinina matam todos os estados parasitários do ciclo eritrocítico da malária e gametócitos, limitando a transmissão da malária. No entanto, são essencialmente inativos contra as formas exo-eritrocíticas. O arteméter administrado por via intramuscular é uma alternativa para o tratamento da malária grave em adultos, quando o artesunato para administração por via parentérica não está disponível, ou em crianças, quando o artesunato para administração por via parentérica ou retal não está disponível. O arteméter também é usado em combinação com a lumefantrina (ver secção 2.1.4). O artesunato administrado por via parentérica é indicado para o tratamento inicial da malária grave, e por via retal é indicado como tratamento de pré-encaminhamento para malária grave. As combinações artesunato-amodiaquina, artesunato-mefloquina ou artesunato-sulfadoxina-piremetamina são indicadas para o tratamento de malária aguda não complicada provocada por *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. knowlesi* ou *P. malariae*. Os usos da dihidroartemisinina estão apresentados na secção 2.1.4.

Os derivados de artemisinina geralmente são bem tolerados. Os efeitos secundários incluem reações de hipersensibilidade, distúrbios gastrointestinais leves, tonturas, tosse, erupção cutânea, artralgia, hemólise retardada, reticulocitopenia, neutropenia e atividade enzimática elevada do fígado. Ainda foi relatado bradicardia e prolongamento do intervalo QT.^{71,73}

2.4.1. Resistência e futuras perspectivas dos derivados de artemisinina

A resistência à artemisinina e derivados já foi confirmada em 5 países: Camboja, Laos, Myanmar, Tailândia e Vietname.¹⁸¹ Em 2014 foi descoberto um marcador molecular da resistência aos derivados da artemisinina, contribuindo para uma melhor vigilância global das resistências a esta classe de compostos.¹⁸² O mecanismo molecular responsável pela resistência observada aos derivados da artemisinina permanece em intenso debate. O papel dos polimorfismos na *pf*ATP6 já foi alvo de discussão mas não

foram obtidos resultados conclusivos. Mais recentemente surgiram novas hipóteses, que são alvo de investigação apesar de apresentarem limitações.¹⁸³

Numa tentativa de ultrapassar os problemas de estabilidade metabólica dos atuais derivados de artemisinina, vários derivados semissintéticos de segunda geração foram estudados.¹⁸⁴ Destes, a artemisona (Figura 2-12) apresentou melhores resultados, demonstrando uma eficácia 10 vezes superior à do artesunato, *in vitro*, e 4 a 10 vezes superior, *in vivo*, com um perfil farmacocinético adequado a esta classe terapêutica.^{185,186}

Os endoperóxidos sintéticos também estão sob investigação como alternativas aos derivados da artemisinina de primeira geração. Destes, as classes de peróxido mais promissoras são os 1,2,4-trioxanos, os 1,2,4-trioxolanos e os 1,2,4,5-tetraoxanos. O 1,2,4-trioxolano arterolano (OZ277) (Figura 2-12) é um dos compostos mais promissores em estudos clínicos^{187,188} e já tem autorização para comercialização na Índia e em 7 países africanos.^{189,190} O artefenomel (OZ439) (Figura 2-12) é um 1,2,4-trioxolano mais recente que apresenta um perfil farmacocinético melhor que o arterolano e obteve resultados promissores nos seus ensaios clínicos.¹⁸⁷ Dos 1,2,4,5-tetraoxanos, o RKA182 (Figura 2-12) era inicialmente o composto mais promissor, pois apresentava uma excelente atividade antimalárica, estabilidade, baixa toxicidade e propriedades de ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) que superavam a maioria dos problemas encontrados anteriormente com os endoperóxidos que procederam para o desenvolvimento pré-clínico.¹⁹¹ Posteriormente, numa série de estudos de otimização molecular, foi identificado o composto E209 (Figura 2-12) que apresenta melhores propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas e que supera os problemas dos derivados da artemisinina.¹⁹¹

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

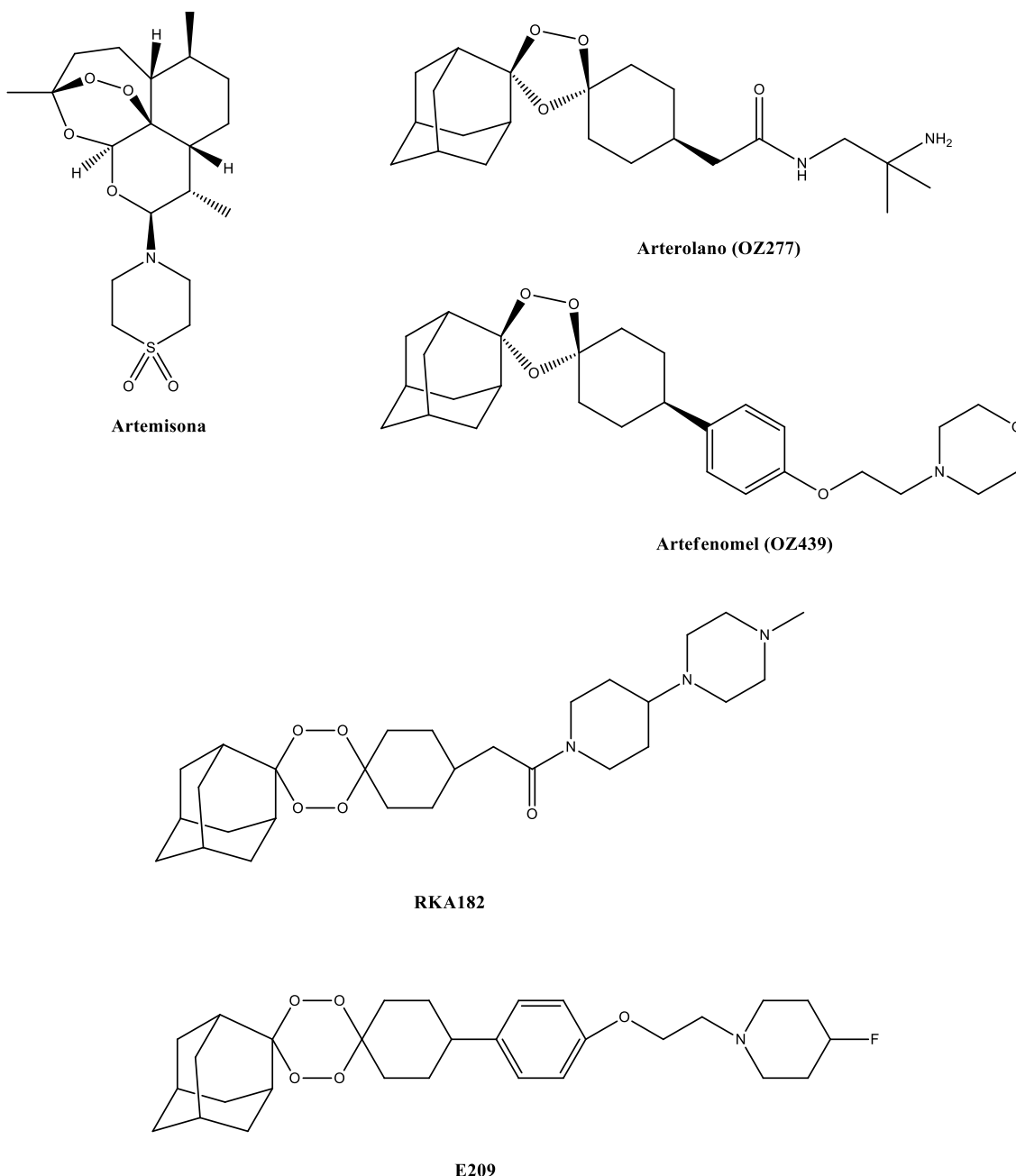


Figura 2-12 – Representação da estrutura química dos fármacos ou candidatos antimaláricos artemisone, arterolano (OZ277), artefenomel (OZ439), RKA182 e E209.

2.5. Naftoquinonas

A atividade antimalárica das naftoquinonas é conhecida desde a década de 1940. Estudos iniciais desta classe de compostos resultaram em compostos promissores, mas com algumas limitações. Todavia a disponibilidade da cloroquina barata e eficaz durante esse período resultou numa falta de interesse nesta classe de compostos, mas com o aparecimento de resistência à cloroquina, o interesse na classe das

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

hidroxinaftoquinonas como potenciais antimaláricos foi renovado na década de 1960. A partir daí vários compostos desta classe foram alvo de estudo, resultando o esforço na descoberta da atovaquona (Figura 2-13).⁸⁸

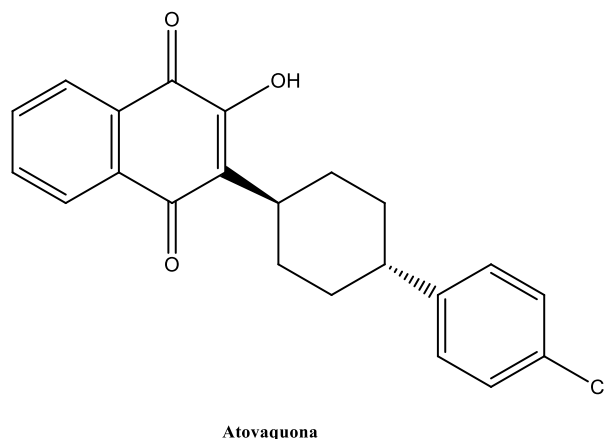


Figura 2-13 – Representação da estrutura química da atovaquona

A atovaquona inibe seletivamente a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (do inglês: *Mitochondrial Electron Transport Chain*, mtETC) do parasita sem afetar a mitocôndria do hospedeiro, devido a diferenças estruturais no citocromo b codificado pelo ADN mitocondrial do parasita (mtADN), que o distinguem do codificado pelo mtADN do hospedeiro.¹⁹²

Tal como acontece em todas as mitocôndrias, o principal transportador móvel de elétrons para a mtETC nos parasitas da malária é a ubiquinona (também denominada por coenzima Q, CoQ). No entanto, ao contrário das mitocôndrias do hospedeiro, a oxidação do piruvato através do ciclo de Krebs não parece ser a fonte de redutores equivalentes nas mitocôndrias parasitárias.¹⁹³ Além disso, os parasitas não possuem o complexo I (NADH desidrogenase), mas codificam uma única subunidade NADH desidrogenase tipo 2 (NDH2), que reduz a ubiquinona (CoQ) sem contribuir para o gradiente de prótons.¹⁹⁴ Além do NDH2, outras desidrogenases e oxirredutases, como a dihidroorotato desidrogenase (DHODH), glicerol-3-fosfato desidrogenase (GPDH), succinato desidrogenase (SDH) e malato-quinona oxidorredutase (MQO), requerem CoQ como aceitador de elétrons.

O ubiquinol (CoQH₂), que se liga no sítio de ligação Q_o, é oxidada pelo complexo do citocromo *bc*₁ (Complexo III) (Figura 2-14), sendo este um passo essencial para o fornecimento contínuo de CoQ às desidrogenases mitocondriais. É este passo que é

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

inibido pela atovaquona, e a consequência dessa inibição é o colapso do potencial da membrana mitocondrial.¹⁹⁵⁻¹⁹⁷ Várias enzimas parasitárias que estão ligadas ao sistema de transporte de elétrons mitocondrial são assim inibidas, como por exemplo a DHOD, que é necessária na biossíntese de pirimidinas. Como o *Plasmodium* depende da síntese “de novo” das pirimidinas, a inibição da DHOD resulta na morte do parasita.¹⁹⁸

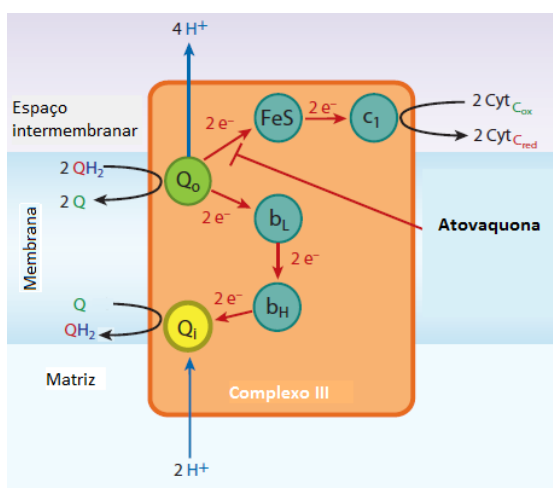


Figura 2-14 – Representação esquemática da função do complexo III (adaptado de¹⁹³)

Atualmente a atovaquona é utilizada em combinação com proguanil, uma vez que se verifica uma ação sinérgica dos 2 fármacos. Enquanto o proguanil por si só não tem efeito no transporte de elétrons ou no potencial da membrana mitocondrial, aumenta significativamente a capacidade da atovaquona de colapsar o potencial da membrana mitocondrial quando usado em combinação. Os resultados obtidos sugerem que o proguanil na sua forma de pró-fármaco atua em sinergia com a atovaquona, reduzindo a concentração necessária para esta colapsar o potencial da membrana mitocondrial nos parasitas da malária.¹⁹⁹ Os usos e efeitos secundários da combinação atovaquona-proguanil já foram anteriormente discutidos (ver secção 2.2).

2.5.1. Resistência e futuras perspectivas das naftoquinonas

Verificou-se que a resistência à Atovaquona se desenvolve facilmente durante o tratamento da malária não complicada por *P. falciparum* com atovaquona em monoterapia, tendo a elevada taxa de falha terapêutica conduzido à introdução da associação atovaquona-proguanil.²⁰⁰

O resíduo de tirosina na posição 268 do citocromo b_1 em *Plasmodium* desempenha um papel fundamental na resistência à atovaquona. Estudos de resistência de *P. falciparum* à atovaquona revelaram 3 mutações pontuais na 268ª posição (Tyr268Asn, Tyr268ser, Tyr268Cys).^{201–203} A substituição de um ou vários resíduos de aminoácidos numa proteína muitas vezes leva a mudanças substanciais em propriedades como a estabilidade termodinâmica, atividade catalítica ou afinidade de ligação. As mutações pontuais na posição 268 devem afetar a ligação da atovaquona ao seu sítio de ligação (Q_o) pois foi observado que a interação entre a atovaquona e o citocromo b_1 é principalmente estabilizada pelas interações hidrofóbicas e, após a mutação pontual na posição 268, o volume e a área de superfície do sítio de ligação são alterados e as interações com o sítio Q_o tornam-se bastante reduzidas, resultando numa menor ação farmacológica da atovaquona.^{201–204}

Numa tentativa de superar a baixa biodisponibilidade associada à atovaquona El Hage *et al.*, sintetizaram compostos em que o grupo funcional 3-hidroxilo da atovaquona foi substituído por grupos éster e éter, que são mais lipofílicos. No entanto, este estudo resultou em compostos com propriedades semelhantes à atovaquona.²⁰⁵

Com base num composto anteriormente estudado, S-10576 (Figura 2-15), que se revelou bastante seletivo contra o citocromo bc_1 de *Plasmodium*, mas demonstrou ineficácia em humanos devido à sua rápida degradação metabólica, Hughes *et al.* desenvolveram com sucesso hidroxinaftoquinonas inibidoras do citocromo bc_1 . Incorporaram grupos trifluorometilo em posições terminais de grupos alquilo de cadeia ramificada e linear e/ou como substituição de um grupo metilo no anel aromático, produzindo compostos (NQ1-3, Figura 2-15) que superaram a instabilidade metabólica observada no composto modelo. Apesar de se ter verificado alguns problemas de eficácia e seletividade, o estudo demonstrou que pequenas modificações na estrutura do anel de hidroxinaftoquinona podem mitigar significativamente a resistência que comprometeu a eficácia da atovaquona.²⁰⁶

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

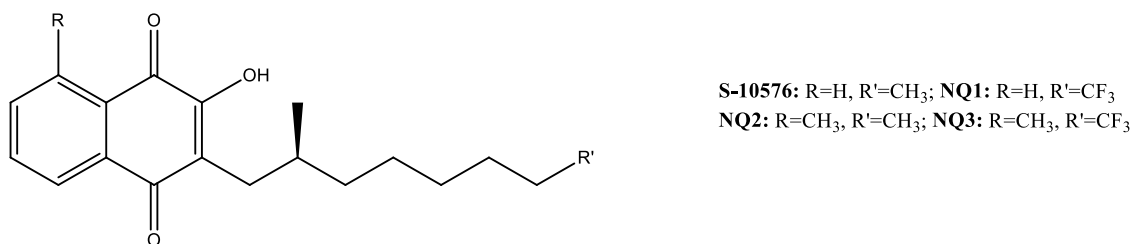


Figura 2-15 – Representação da estrutura química dos compostos S-10576 e NQ1-3

2.5.2. Outras classes de compostos que têm como alvo o citocromo *bc*₁ de *P. falciparum*

2.5.2.1. 4-Piridonas

Sabe-se que as piridonas possuem atividade antimalárica desde a década de 1960, quando o clopidol (Figura 2-16) mostrou ter atividade contra estirpes de *P. falciparum* resistentes à cloroquina.²⁰⁷ O clopidol também apresenta atividade contra estirpes resistentes à atovaquona, sugerindo que os derivados de piridona podem ligar-se num sítio diferente da atovaquona.²⁰⁷

Yeates et al. desenvolveram uma série de derivados do clopidol e, em 2006, a GlaxoSmithKline (GSK) relatou a avaliação pré-clínica de uma nova classe de 4-piridonas com atividade antimalárica, tendo como alvo o complexo do citocromo *bc*₁.^{208,209} O desenvolvimento inicial levou ao candidato promissor GW844520 (Figura 2-16) e posterior desenvolvimento deste líder de série deu origem ao composto GSK932121 (Figura 2-16), que relevou elevada potência tanto *in vitro* como contra estirpes de *P. falciparum* resistentes a múltiplos fármacos. No entanto, os estudos destes dois compostos promissores foram suspensos devido a problemas de cardiotoxicidade.^{210,211}

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

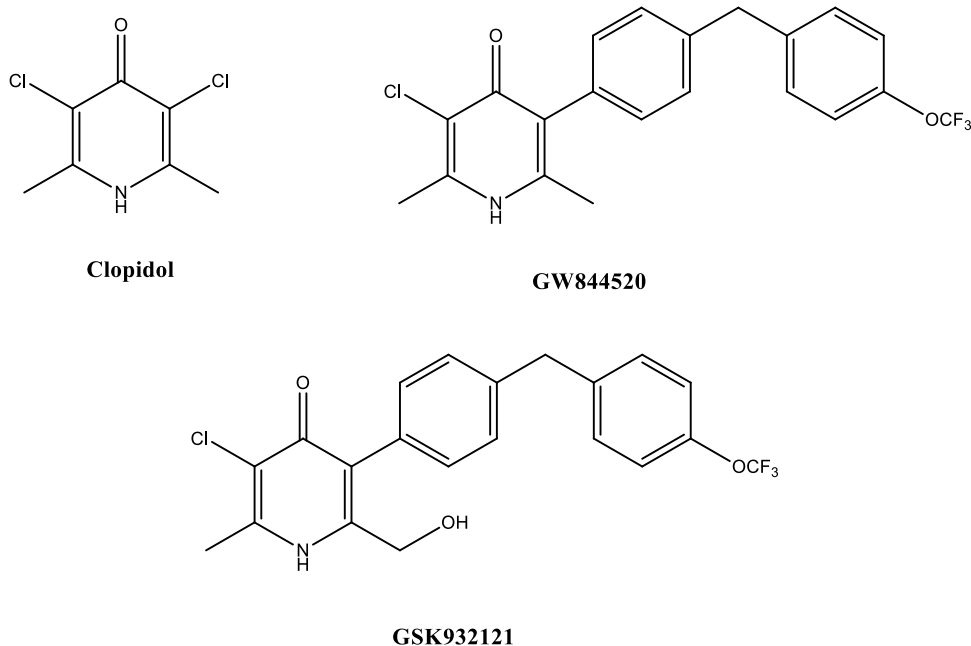


Figura 2-16 – Representação da estrutura química de clopidol, GW844520 e GSK932121

2.5.2.2. Acridinodionas e acridonas

As acridinodionas são compostos tricíclicos que incorporam o esqueleto de 4-oxo-1,4-di-hidroquinolona, estando estruturalmente relacionados com as quinolonas. A atividade antimalárica das acridinodionas é conhecida desde 1947, mas suscitou pouco interesse até 1970, quando a propriedade profilática antimalárica da floxacrina (Figura 2-17) foi descoberta. Foi demonstrado que o modo de ação da floxacrina envolve a ligação ao heme e consequente inibição da sua cristalização em hemozoína.^{210,212}

Os estudos de propriedades e modo de ação dos compostos floxacrina e WR249685 (Figura 2-17) demonstraram que a WR249685 apresenta maior atividade antimalárica *in vitro* do que a floxacrina, embora a afinidade da floxacrina pelo heme seja cerca de 20 vezes superior. Posteriormente, verificou-se que WR249685 inibe o complexo do citocromo bc_1 com uma seletividade muito superior à dos outros inibidores deste complexo, pelo que este grupo de compostos merece ser investigado com o objetivo de selecionar novos candidatos para posterior desenvolvimento como potenciais antimaláricos.²¹³

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

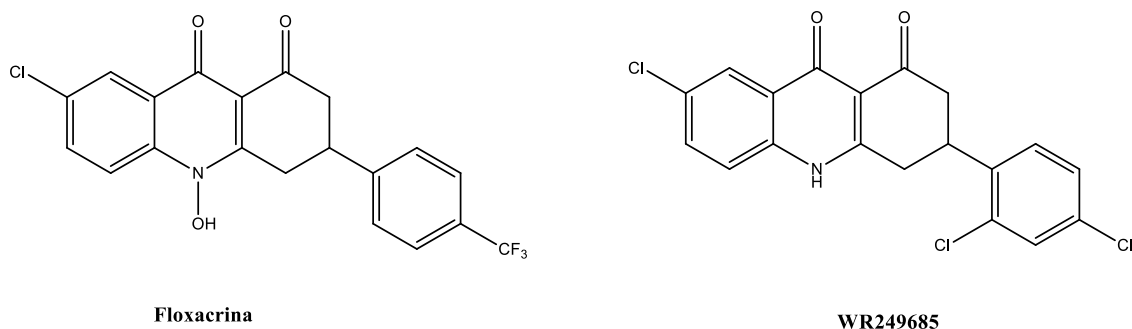


Figura 2-17 – Representação da estrutura química da floxacrina e de WR242685

As acridonas, inicialmente isoladas como intermediários na síntese de uma série de compostos que complexam o heme, apresentam um mecanismo de ação duplo, tendo a capacidade de se ligar ao citocromo bc_1 , e também de interromper a formação de hemozoína. Exemplos importantes deste grupo de compostos são a 3-(5,6,6,6-tetrafluoro-5-trifluorometil-hexiloxi)-6-cloroacridona (Figura 2-18) e, mais recentemente, o T3.5 (Figura 2-18), que tem um núcleo tricíclico cujo alvo é o heme e um grupo funcional (dietilaminoetil) que confere quimiossensibilização.^{210,212,214}

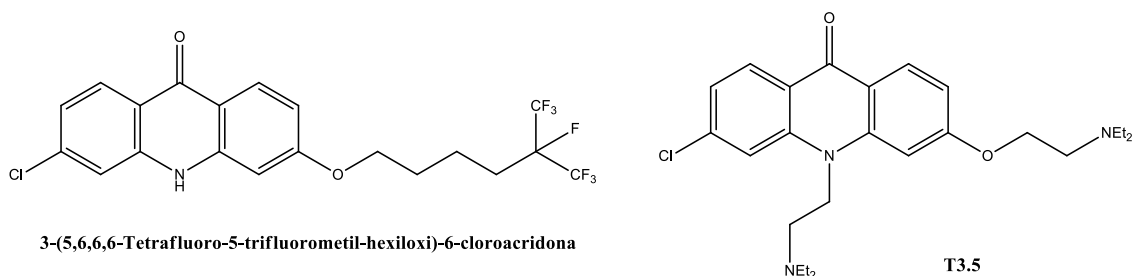


Figura 2-18 – Representação da estrutura química de 3-(5,6,6,6-Tetrafluoro-5-trifluorometil-hexiloxi)-6-cloroacridona e T3.5

2.5.2.3. Quinolonas

Nos últimos anos observou-se um grande interesse por parte da comunidade científica no desenvolvimento de quinolonas que têm como alvo terapêutico o complexo do citocromo bc_1 , e em 2008 foi demonstrado que as quinolonas se ligam ao sítio Q_0 do complexo do citocromo bc_1 . No entanto, a atividade antimalárica das quinolonas foi inicialmente descoberta na década de 1940 com o composto endoquina

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

(Figura 2-19), em modelos aviários da doença, embora não tenha sido observada atividade em humanos devido à instabilidade metabólica.^{210,215,216}

A instabilidade metabólica da endoquina foi atribuída à cadeia alquílica longa na posição três do núcleo de quinolina. A substituição desta cadeia alquílica pela cadeia lateral do composto GW844520 (Figura 2-16) deu origem ao composto ELQ-271 (Figura 2-19), que demonstrou uma estabilidade metabólica acrescida. Posteriores manipulações estruturais, no decurso de estudos de relação estrutura-atividade, levaram ao composto ELQ-300 (Figura 2-19), que demonstrou uma seletividade muito melhorada para o complexo *bc1* de *Plasmodium*. O ELQ-300 também mostrou não ter efeito sobre os níveis de ATP intracelular em duas linhas celulares de mamífero diferentes, ao contrário da ELQ-271, que causou um declínio nos níveis de ATP dependente da concentração. O P4Q-391 (Figura 2-19) foi selecionado como o composto de reserva da série, pois também demonstrou potência promissora e seletividade para o alvo. Porém, após avaliação biológica completa o ELQ-300 foi selecionado como candidato pré-clínico, pois possui uma atividade superior *in vitro* e *in vivo* contra estados sanguíneos e hepáticos de parasitas de malária e apresenta melhor seletividade. No entanto, esta classe de compostos tem algumas limitações. A solubilidade em água é fraca, o que interfere com a farmacocinética do fármaco, pois à medida que a dosagem aumenta a biodisponibilidade diminui, em concordância com a absorção limitada pela solubilidade.^{210,217}

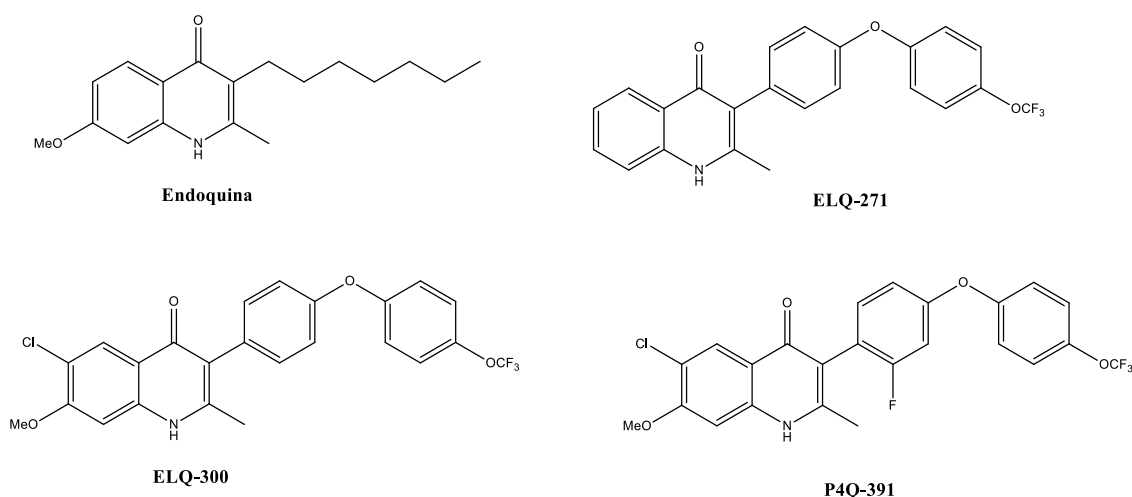


Figura 2-19 – Representação da estrutura química de endoquina, ELQ-271, ELQ-300 E P4Q-391

Outros grupos investigaram um quimiotipo de quinolonas com substituintes éster na posição 3, como inibidores do citocromo bc_1 de *P. falciparum*. Da Cruz et al. relataram recentemente os resultados de um estudo com fármacos já existentes que tivessem demonstrado atividade em estados hepáticos de *Plasmodium*, selecionando o decoquinato (Figura 2-20) como o inibidor mais potente, *in vitro* e *in vivo*.²¹⁸ Cowley et al. desenvolveram estudos de relação estrutura-atividade (do inglês: *Structure-activity Relationship*, SAR) no quimiotipo referido e identificaram o composto RCQ (Figura 2-20) com uma excelente atividade inibitória.²¹⁹

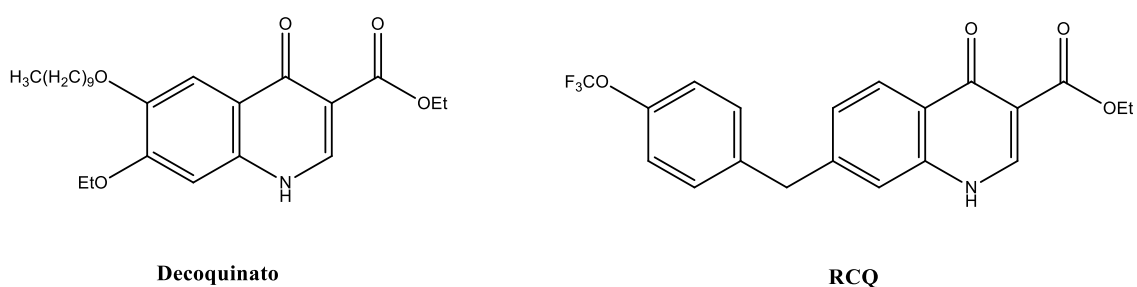


Figura 2-20 – Representação da estrutura química de decoquinato e RCQ

Os estudos entretanto desenvolvidos relativamente ao potencial antimalárico de quinolonas com um substituinte éster na posição 3 sustentam o interesse deste quimiotipo como fonte potencial de novas soluções farmacológicas para quimioterapia da malária e a relevância de mais estudos. A componente experimental que seguidamente se descreve enquadra-se nesta perspetiva.

3. Síntese de quinolonas com potencial como inibidores do citocromo *bc₁* de *P. falciparum*

No âmbito desta dissertação foi realizada uma componente experimental na área de Química Medicinal, no grupo de Síntese e Reatividade Orgânica do Centro de Ciências do Mar (CCMAR), liderado pela Professora Doutora Maria de Lurdes Cristiano. Este grupo tem vindo a desenvolver compostos com potencial atividade antimalárica, incluindo peróxidos semissintéticos e sintéticos²²⁰⁻²²², compostos com carácter peptídico com potencial como inibidores de falcipainas parasitárias²²³, compostos híbridos que acoplam um inibidor de falcipainas e um endoperóxido²²⁴ e quinolonas²²⁵⁻²²⁸. O trabalho de investigação desenvolvido no âmbito desta dissertação enquadra-se no projeto de síntese de novas quinolonas com potencial atividade antimalárica.

Neste capítulo encontra-se descrito todo o trabalho experimental desenvolvido e respetivo enquadramento.

3.1. Âmbito da parte experimental

A malária permanece uma patologia endémica em 91 países, com cerca de 212 milhões de casos por ano de que resultam cerca de 429 000 mortes.²⁵ Como foi discutido nesta dissertação, a emergência crescente de estirpes de *Plasmodium* resistentes às várias classes farmacológicas em uso clínico para combater a malária requer um grande investimento no desenvolvimento de novos fármacos de largo espectro, que permitam tratar os doentes infetados por estirpes resistentes.

A atividade antimalárica das quinolonas foi comprovada em diversos estudos referidos anteriormente. Mais especificamente, foi demonstrado o sucesso das quinolonas substituídas na posição 3 por um grupo éster na sequência da descoberta das excelentes propriedades do decoquinato e do RCQ. Estes sucessos levaram o grupo de Síntese e Reatividade Orgânica do CCMAR a contribuir para o estudo das propriedades dos 3-ésteres de quinolona com potencial como antimaláricos. Apesar da capacidade inibitória demonstrada, verificou-se em estudos anteriores que os compostos mencionados apresentam problemas farmacológicos e farmacocinéticos, como o desenvolvimento relativamente rápido de resistência, resistência cruzada, baixa solubilidade e instabilidade metabólica.

De forma a realizar uma investigação mais profunda sobre a estrutura e as propriedades desta classe, o grupo de investigação propôs o desenho, síntese e estudo estrutural de uma biblioteca de novos 3-ésteres de 4-oxoquinolina com diversidade estrutural nas posições 6 e/ou 7 da quinolona.

3.2. Estratégia de síntese geral

A estratégia geral de síntese de 3-ésteres de 4-oxoquinolina seguida no decurso deste trabalho, está apresentada na Figura 3-1. Estão destacadas três etapas principais na estratégia sintética: (i) redução de compostos nitroarenos substituídos às anilinas correspondentes; (ii) acoplamento da anilina com etoximetilenomalonato de dietilo (do inglês: Diethyl Ethoxymethylenemalonate, DEEMM) para originar o derivado de enamina (éster α , β -insaturado), para posterior ciclização; (iii) ciclização intramolecular induzida termicamente, usando a metodologia de Gould-Jacobs, para preparar os 3-ésteres de 4-oxoquinolina finais.

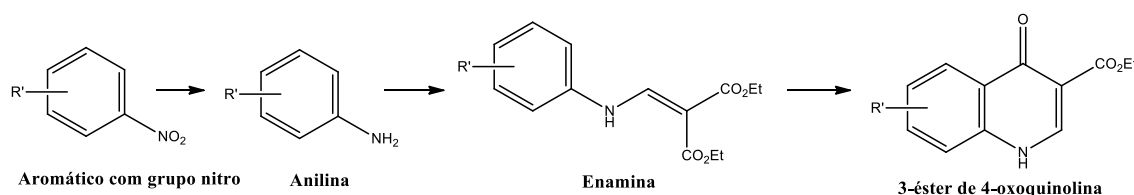
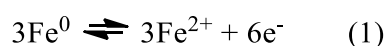


Figura 3-1 – Representação esquemática da estratégia de síntese geral de 3-ésteres de 4-oxoquinolinas

O nitroareno é reduzido na presença de ferro com valência zero. Geralmente as reduções catalisadas por Fe são realizadas em meio aquoso, mas é comum adicionar metanol ou etanol para aumentar a solubilidade dos compostos orgânicos no meio. É proposto que, inicialmente, num sistema aquoso, o ferro com valência zero (Fe^0) seja oxidado em ferro ferroso (Fe^{2+}), atuando como doador de eletrões, conforme descrito na equação (1). O cloreto de amónio adicionado posteriormente atua como doador de prótons, possibilitando a conversão do grupo nitro em grupo amina.



O nitroareno é então convertido em anilina, num processo multietápico que envolve espécies intermédias com vários graus de redução, tais como compostos com

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

grupos nitroso e hidroxilamina, num processo que consiste numa série de adições de dois elétrões (Figura 3-2).²²⁹ Este passo de redução pode ser evitado caso a anilina desejada estiver comercialmente disponível.

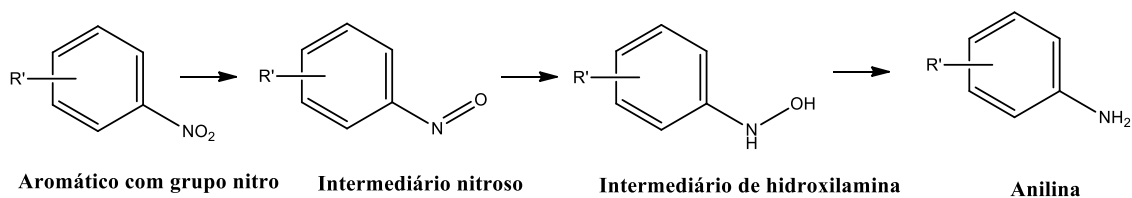


Figura 3-2 – Representação esquemática da via de redução do composto aromático com um grupo substituinte nitro para a anilina correspondente

O derivado de enamina é obtido através do acoplamento da anilina com um éster α , β -insaturado. Neste caso, o acoplamento é feito com DEEMM para obter 4-oxoquinolinas com um grupo éster etílico na posição 3. A partir da reação sem solvente de um derivado de anilina com DEEMM, a 100 °C, é sintetizado um éster de enamina que poderá ser convertido em quinolona utilizando a reação de Gould-Jacobs, estando o mecanismo proposto para as duas etapas representado na Figura 3-3. Nesta ciclização, realizada a 240-250°C, o anel aromático atua como nucleófilo, atacando o carbono do grupo carbonilo do éster e levando a uma ciclização intramolecular, termicamente favorecida.^{230,231}

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

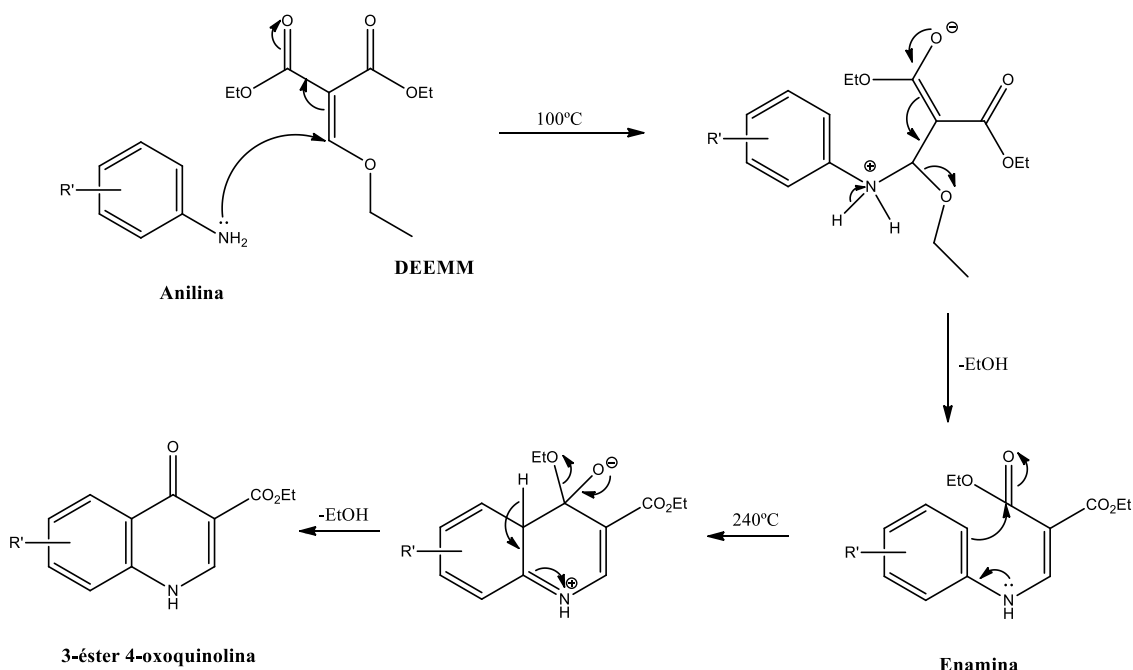


Figura 3-3 – Proposta mecanística da síntese geral de 3-ésteres 4-oxoquinolinas

3.3. Problemas encontrados durante a síntese de quinolonas

No decorrer da síntese de uma biblioteca de novos de 4-oxoquinolina 3-ésteres com diferentes variabilidade estrutural nas posições 6 e/ou 7, o grupo de investigação deparou-se com diversos problemas.²²⁷

Um dos problemas associados a esta síntese é a possibilidade da formação de isómeros estruturais durante a reação de ciclização utilizando o método de Gould-Jacobs. Na ciclização intramolecular do derivado de malonato, o anel aromático atua como nucleófilo, atacando o carbono do grupo carbonilo do éster. De seguida, este passo pode resultar na ciclização por ligação a ambos os carbonos em posição orto adjacentes ao grupo NH do derivado de malonato, podendo ser obtida uma mistura isomérica (4-oxo-quinolinas substituídas na posição 7 ou 5). Na Figura 3-4 está representada a estratégia de síntese utilizada e os respetivos resultados obtidos na síntese de diversos 3-ésteres de 4-oxoquinolina.²²⁷

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

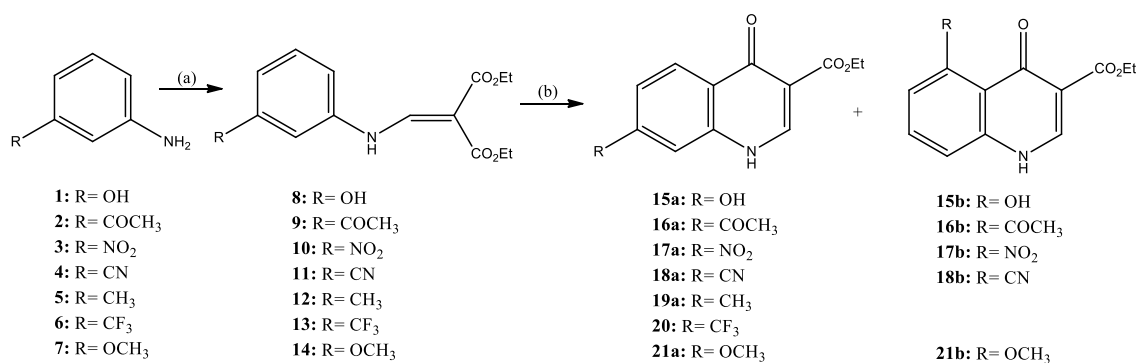


Figura 3-4 – Representação esquemática da estratégia de síntese utilizada e dos resultados obtidos na síntese de 3-éster-4-oxoquinolinas. Condições: (a) 100°C, 14 horas; (b) Dowtherm A, 250°C, 3 horas.

A obtenção do produto substituído na posição 5 demonstrou ser dependente do grupo substituinte dos compostos de partida. Possivelmente, o tamanho do grupo substituinte está relacionado com a formação ou não do produto indesejado, uma vez que grupos substituintes volumosos poderão ter efeitos estéricos que não favoreçam a formação do éster de 4-oxoquinolina substituído na posição 5. Assim, quando são utilizados grupos substituintes relativamente pequenos nos compostos de partida, poderá observar-se a formação dos dois isômeros.

Outras limitações da metodologia de Gould-Jacobs incluem o facto de a ciclização ser dependente da concentração e de o produto poder sofrer degradação térmica devido à alta temperatura necessária para a reação.²³² Como mencionado anteriormente, a maioria das quinolonas apresenta baixa solubilidade, levando a dificuldades na extração e purificação e, conseqüentemente, obtêm-se baixos rendimentos dos produtos isolados. Além disso foi demonstrado que este procedimento pode levar a produtos secundários, alguns deles resultantes de isomerismos estruturais. As vulnerabilidades da ciclização de Gould-Jacobs levou o grupo de investigação a desenvolver uma metodologia alternativa para o passo de ciclização. Foi proposta uma abordagem envolvendo a ciclização de uma enamina mediada por cloreto de fosforilo (POCl₃), de que resulta a introdução de um grupo cloro na posição 4.²³³ A representação esquemática do mecanismo proposto para a reação apresenta-se na Figura 3-5.

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

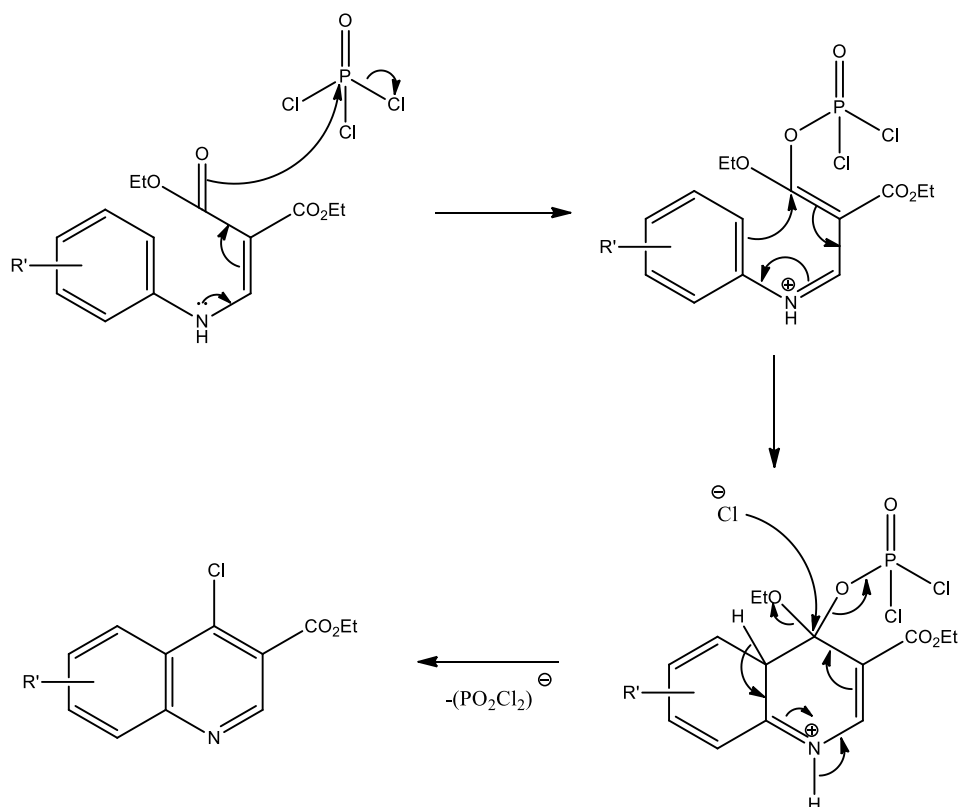


Figura 3-5 – Proposta mecanística para a síntese de 3-éster-4-cloroquinolinas mediada por POCl_3

Esta abordagem sintética alternativa foi aplicada a várias enaminas, na tentativa de melhorar os resultados quanto aos rendimentos e à pureza dos produtos. No entanto, o intermediário de 4-cloroquinolína não foi isolado em nenhuma das reações. Por vezes a reação não progrediu, ou não foi possível isolar um produto puro, ou, em vez disso, foram obtidos produtos inesperados. Curiosamente, a aplicação desta reação na enamina 12 originou um sal, 4-hidroxiquinolína 19b.HCl (Figura 3-6), enquanto que outra tentativa desta abordagem sintética originou o produto 22 (Figura 3-6), o que sugere, mais uma vez, que a síntese prévia da hidroxiquinolína correspondente ocorreu.

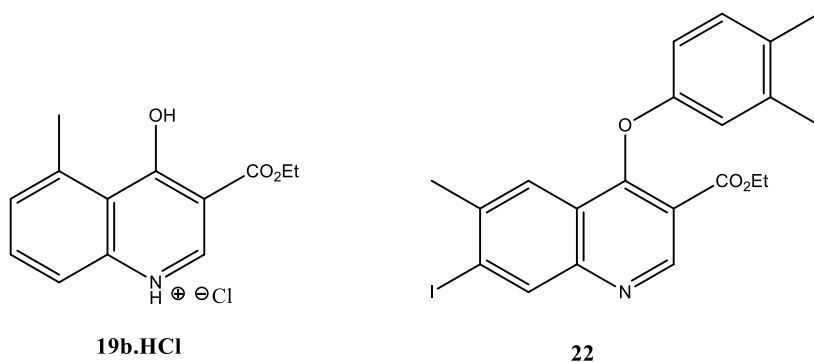


Figura 3-6 – Representação da estrutura química dos compostos 19b.HCl e 22

Estes resultados levaram o grupo de investigação a realizar um estudo mais detalhado sobre a estrutura do núcleo de quinolona, a possibilidade de tautomerismo em 3-ésteres de 4-oxoquinolona e o seu possível impacto na atividade destes compostos, uma vez que estudos de *docking* realizados com o complexo *bc₁* de levedura sugeriram que os grupos funcionais N-H e o carbonilo na posição 4 do núcleo quinolínico têm uma função importante na inibição da enzima por 3-ésteres de 4-oxoquinolonas.²¹⁹ P. Horta et al. publicaram o estudo do tautomerismo quinolona-hidroxiquinolona dos compostos 19a e 19b.²²⁸ Neste estudo foi considerada a possibilidade de 3 formas tautoméricas, representadas na Figura 3-7, para o composto 19b.

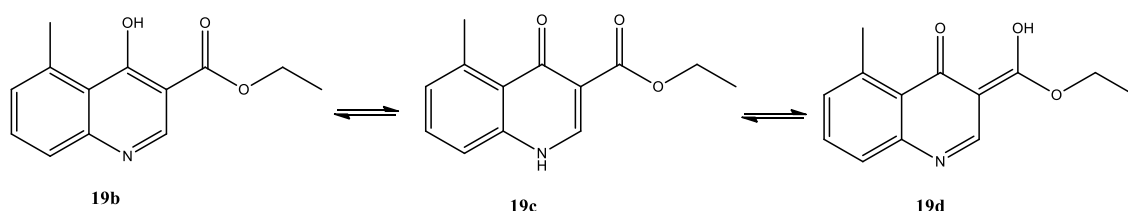


Figura 3-7 – Representação esquemática da possível tautomerização do composto 19b

Os cálculos teóricos demonstraram a preferência pelo tautómero de hidroxiquinolona em ambos os compostos. A diferença de energia entre as formas de energia mais baixas dos dois tautómeros, hidroxiquinolona e quinolona, é de 27 e 38 kJ mol⁻¹, para 19b e 19a, respetivamente. A energia consideravelmente menor das formas de hidroxiquinolona foi explicada pela presença de uma interação intramolecular estabilizadora por pontes de hidrogénio O-H ... O (carbonilo).

Os índices de aromaticidade pelo modelo de aromaticidade do oscilador harmónico (do inglês: *Harmonic Oscillator Model of Aromaticity*, HOMA) e o índice de Bird (B_i) foram determinados para 19b e os seus tautómeros. Demonstrou-se que enquanto em 19b ambos os anéis são aromáticos, sendo o anel heteroaromático apenas um pouco menos aromático do que o anel benzénico, tanto em 19c quanto em 19d o anel contendo azoto é essencialmente não aromático e o anel benzénico nesses casos é um pouco mais aromático do que em 19b. Esta aromaticidade reduzida do anel heterocíclico, tanto em 19c quanto em 19d, em comparação com 19b também pode ser considerada um fator relevante, tornando essas espécies mais energéticas do que 19b.

A estrutura do 19b monomérico também foi estudada usando o isolamento em matriz acoplado à espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (do inglês: *Fourier-transform Infrared Spectroscopy*, FTIR). Não foram encontrados vestígios de tautômeros 19c ou 19d nos espectros de infravermelho, revelando claramente que as espécies resultantes da sublimação do sal usado (19b.HCl) são unicamente HCl e 19b, isto é, as espécies tautoméricas do composto presente no sólido cristalino não se converteram em outros tautômeros, após a sublimação. Por outro lado, quando se utilizou 19c sólido (sintetizado separadamente) como material de partida nas experiências de isolamento em matriz, observou-se uma tautomerização extensa do composto, resultando na observação exclusiva da forma tautomérica 19b.²²⁸

Para se obter uma melhor compreensão do tautomerismo verificado nestes compostos decidiu-se sintetizar 3-carboxilato-4-oxo-7-metilquinolina de etilo (19a) e 3-carboxilato-4-oxo-5-metilquinolina de etilo, de modo a continuar a sua caracterização, e de 4-oxo(1H)quinolina (Figura 3-8) para investigar o possível efeito dos substituintes nas posições 6 ou 7 em relação às preferências tautoméricas e conformacionais do núcleo quinolínico e o impacto correspondente nos perfis farmacodinâmicos e farmacocinéticos.

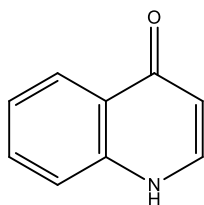


Figura 3-8 – Representação da estrutura química de 4-oxo(1H)quinolina

3.4. Síntese de 3-carboxilato-4-oxo-7-metilquinolina de etilo

Para a síntese deste composto seguiu-se a estratégia de síntese geral apresentado anteriormente na secção 3.2.

A primeira etapa da síntese consiste no acoplamento da *m*-toluidina (5) com o DEEMM, sem a presença de solvente, para se obter o correspondente derivado de enamina 12 com um bom rendimento (89,7%), representado na Figura 3-9.

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

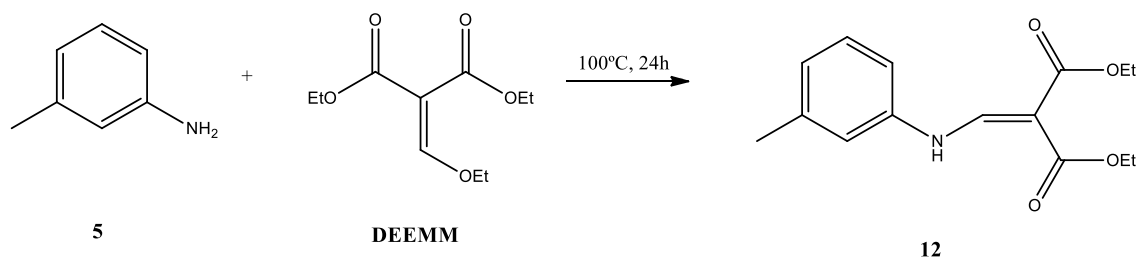


Figura 3-9 – Representação esquemática da estratégia de síntese utilizada para obter o composto 12

• **Proposta mecanística para as reações envolvidas na formação do composto 12**

O mecanismo proposto para a formação do composto 12 encontra-se esquematizado na Figura 3-10.

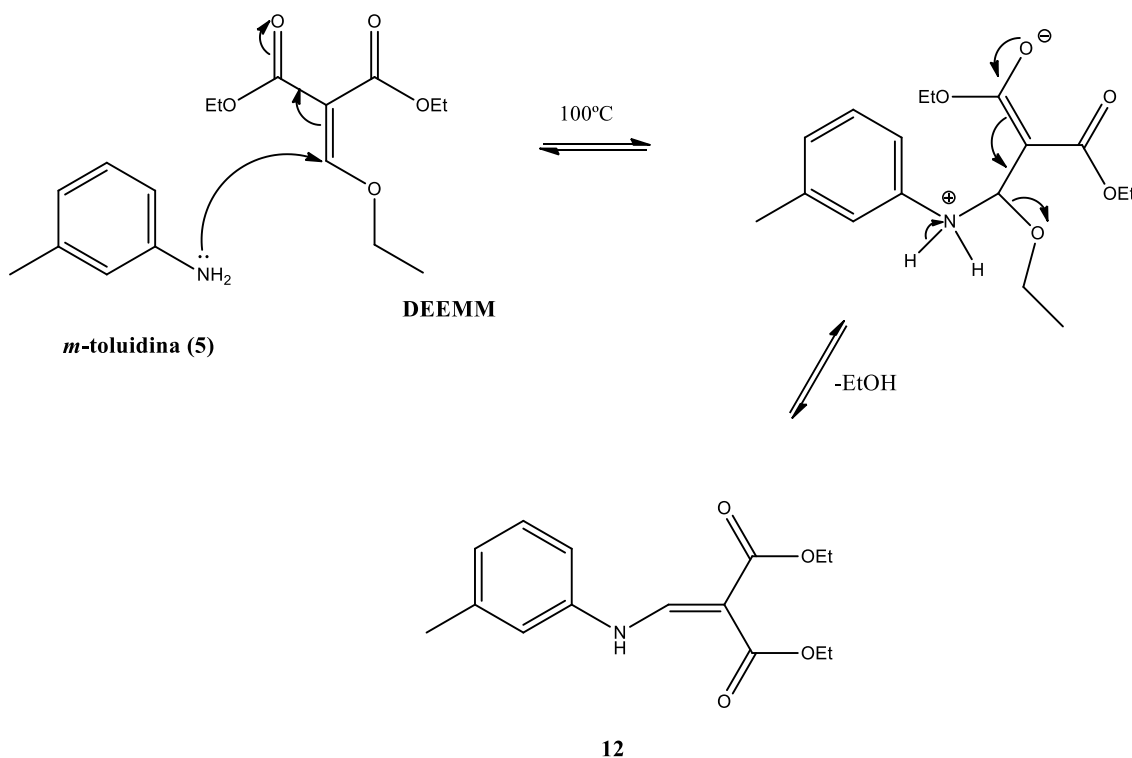


Figura 3-10 – Representação da proposta mecanística para a reação de síntese do composto 12

A segunda etapa da síntese consiste na ciclização intramolecular do composto 12 para originar o correspondente produto, 3-carboxilato-4-oxo-7-metilquinolina de etilo (19a) com um rendimento de 45,7%, como representado na Figura 3-11. Este passo é conseguido através da utilização de altas temperaturas (240-250°C), em Dowtherm A, que é termoestável. No entanto, após análise dos espectros de RMN, chegou-se à conclusão que se obteve uma mistura isomérica das quinolonas substituídas nas

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

posições 5 e 7, demonstrando novamente a limitação da estratégia, que pode conduzir à obtenção de diferentes isômeros estruturais no decorrer da via sintética selecionada.

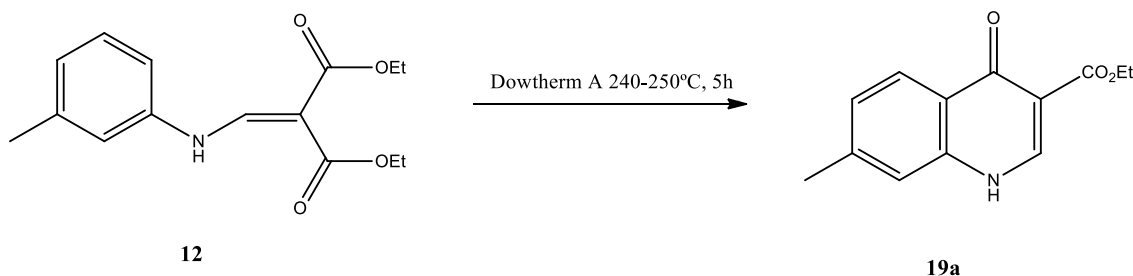


Figura 3-11 – Representação esquemática da estratégia de síntese para obter o composto 19a

• **Proposta mecanística para as reações envolvidas na formação do composto 19a**

O mecanismo proposto para a formação do composto desejado, 19a, encontra-se esquematizado na Figura 3-12. Para obtenção do isômero metilado em posição 5 o mecanismo será o mesmo, envolvendo, contudo, o outro carbono alfa.

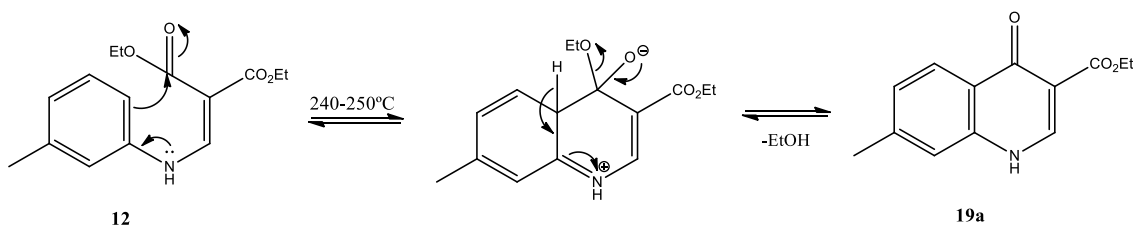


Figura 3-12 – Representação da proposta mecanística da reação de síntese do composto 19a.

3.5. Síntese de 3-carboxilato-4-oxo-5-metilquinolina de etilo

Previamente^{227,228}, a tentativa de ciclização do composto 12 mediada por POCl₃ deu origem a um produto inesperado (19b.HCl), representado na Figura 3-13. Assim, numa tentativa de obter novamente o mesmo produto, repetiu-se a reação nas mesmas condições, utilizando o composto 12 sintetizado anteriormente. Neste caso manteve-se uma mistura do composto 12 com POCl₃ a 97°C durante 14 horas, como representado na Figura 3-13. No entanto o produto pretendido não foi obtido, pois por análise dos espectros de RMN, os sinais não são compatíveis com os constantes nos espectros

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

obtidos para o composto caracterizado anteriormente.²²⁷ Aguarda-se caracterização por espectrometria de massa, para uma melhor interpretação de dados.

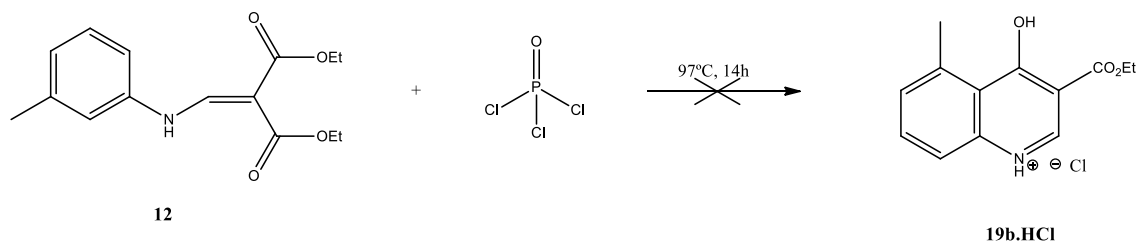


Figura 3-13 – Representação esquemática da estratégia de síntese para obter o composto 19b

3.6. Estratégia de síntese para obter 4-quinolona

Para obter uma compreensão mais profunda do tautomerismo de quinolona/hidroxiquinolina, decidiu-se sintetizar a estrutura do núcleo de quinolona sem substituintes (4-oxoquinolina), de modo a excluir possíveis efeitos de substituintes no equilíbrio tautomérico. A representação da proposta de síntese de 4-oxoquinolina está apresentada na Figura 3-14.

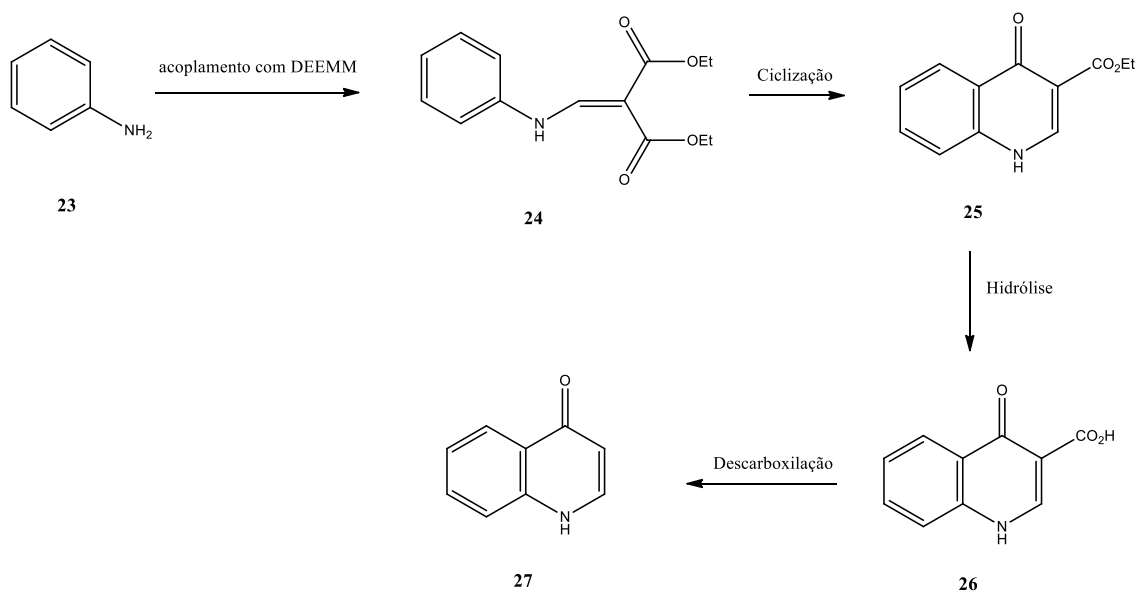


Figura 3-14 – Representação esquemática da estratégia de síntese proposta para obter 4-oxoquinolina

3.7. Síntese de 4-oxoquinolina

A primeira etapa da síntese consistiu no acoplamento da anilina (23) com o DEEMM, como representado na Figura 3-15, tendo-se obtido o produto 24 com bom rendimento (91.9%).

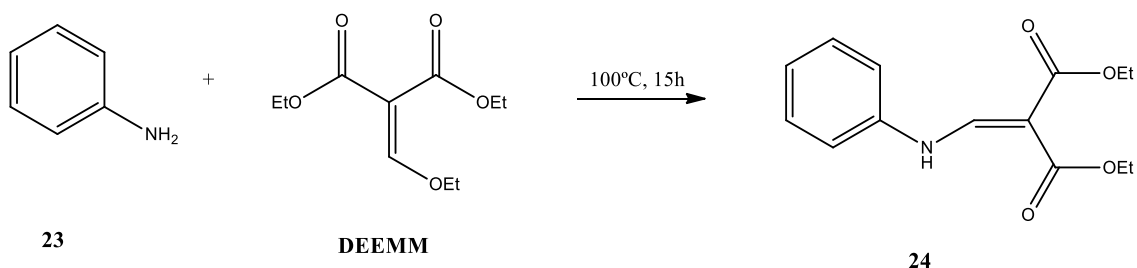


Figura 3-15 – Representação esquemática da estratégia de síntese utilizada para obter o composto 24

• Proposta mecanística para as reações envolvidas na formação do composto 24

O mecanismo proposto para a formação do composto 24 encontra-se esquematizado na Figura 3-16.

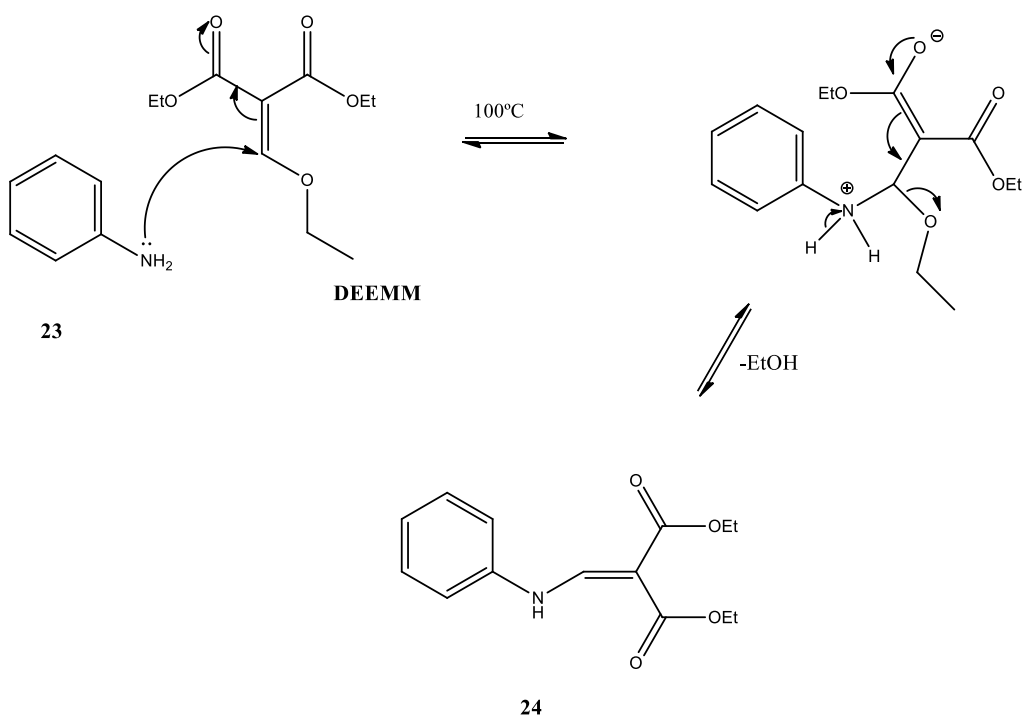


Figura 3-16 – Representação da proposta mecanística para a síntese do composto 24.

A segunda etapa da síntese consiste na ciclização intramolecular do composto 24 para originar o correspondente produto 25. Este passo é conseguido através da

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

utilização de altas temperaturas (240-250°C), em Dowtherm A, com um rendimento de 37,5%, ou pela reação com POCl₃. Ambas as metodologias estão representadas na Figura 3-17.

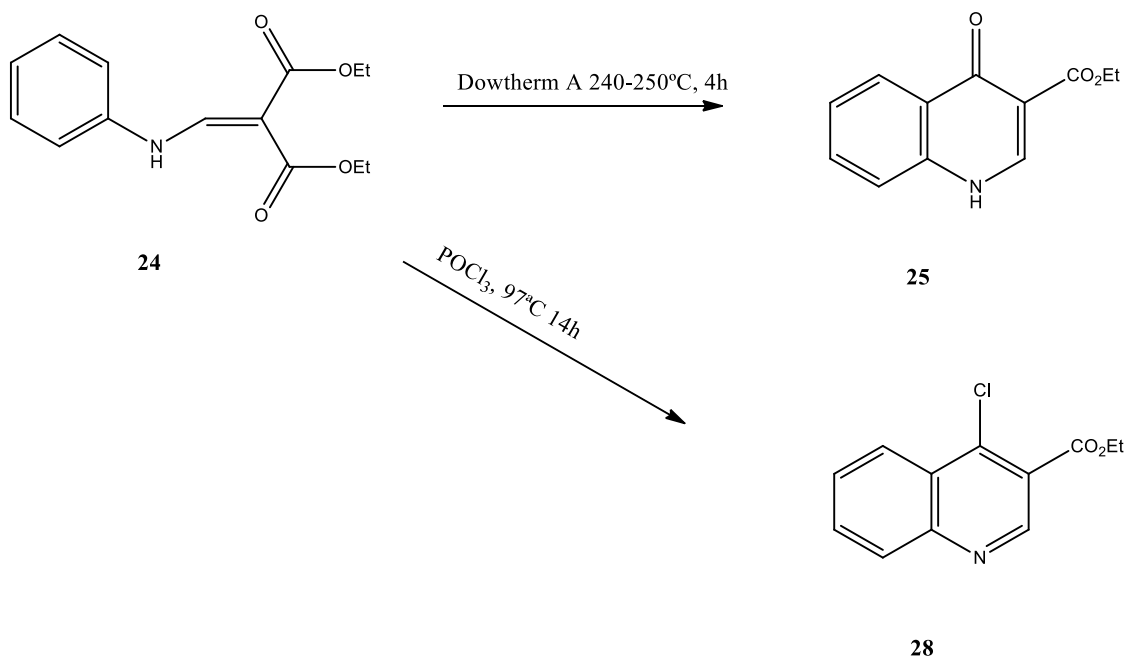


Figura 3-17 – Representação esquemática da estratégia de síntese utilizada para obter os compostos 25 e 28.

• **Proposta mecanística para as reações envolvidas na formação do composto 25 por Dowtherm A.**

O mecanismo proposto para a formação do composto 25, utilizando Dowtherm A, encontra-se esquematizado na Figura 3-18.

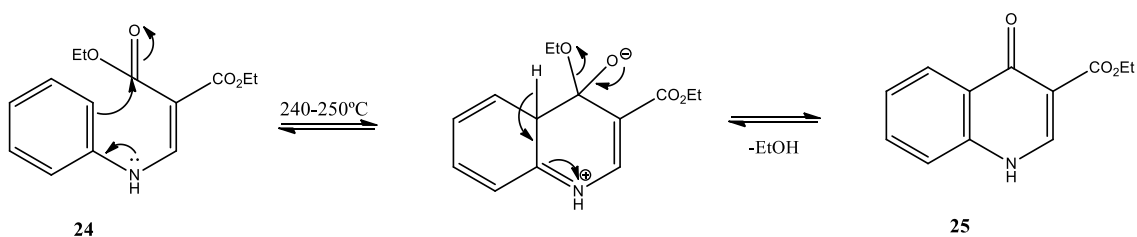


Figura 3-18 – Representação da proposta mecanística da síntese do composto 25

• **Proposta mecanística para as reações envolvidas na formação do composto 28, mediada por POCl₃.**

O mecanismo proposto para a formação do composto 28 utilizando POCl_3 encontra-se esquematizado na Figura 3-19.

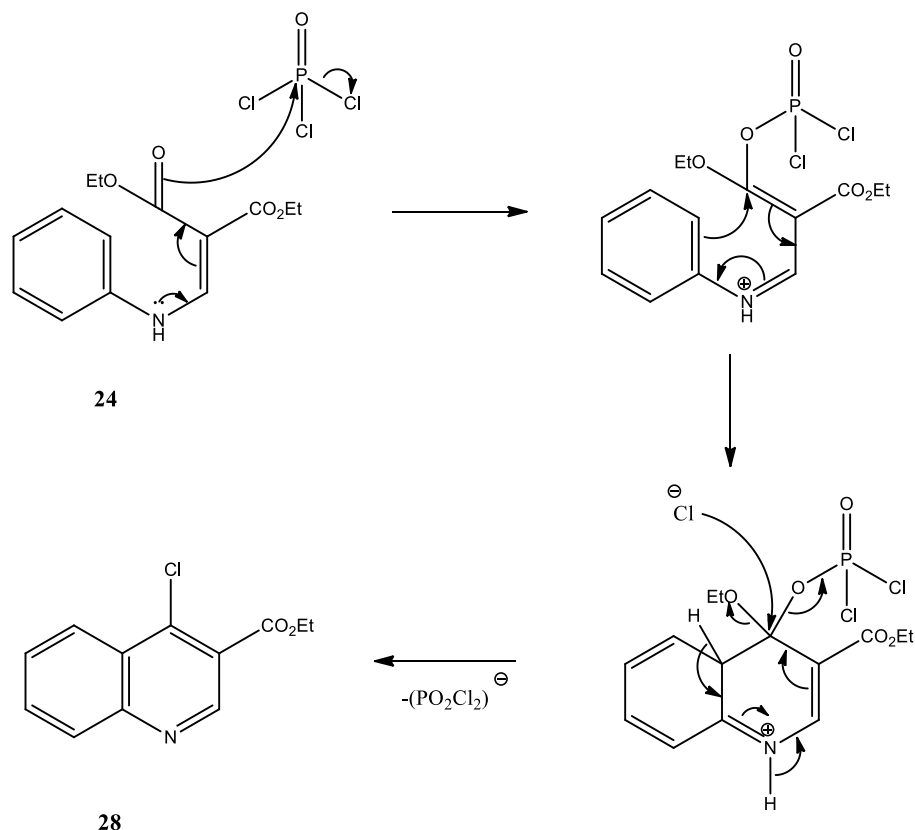


Figura 3-19 – Representação da proposta mecanística para a síntese do composto 28 mediada por POCl_3 .

No caso da ciclização mediada por POCl_3 , após a ciclização deverá ainda ocorrer hidrólise da cloro-imina com formação do grupo carbonilo, para se obter o composto 25. No entanto, há dúvidas de que o produto pretendido tenha sido obtido, uma vez que os espectros de RMN são inconclusivos. Não existem indícios claros da presença do grupo éster nos espectros de ^1H -RMN. Aguardam-se espectros de massa para uma elucidação mais detalhada da estrutura do composto obtido.

A terceira etapa da síntese consiste na hidrólise da função éster do composto 25 para originar o correspondente produto 26, obtido com um rendimento de 74,6%. Este passo é conseguido através da adição de uma base em metanol estando representada na Figura 3-20.

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

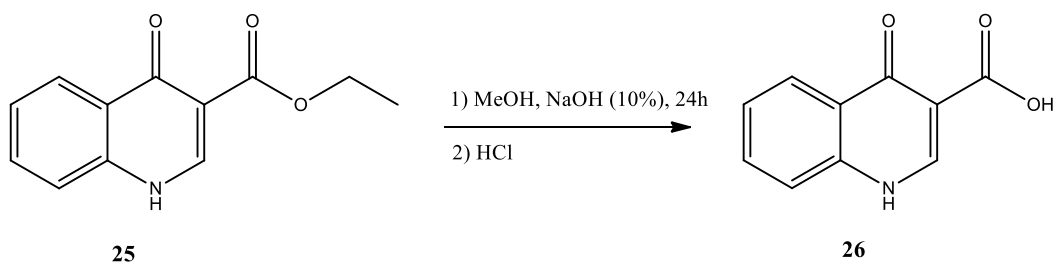


Figura 3-20 – Representação esquemática da estratégia de síntese do composto 26

• **Proposta mecanística para as reações envolvidas na formação do composto 26 por adição de uma base.**

O mecanismo proposto para a formação do composto 26, utilizando NaOH como catalisador, encontra-se esquematizado na Figura 3-21.

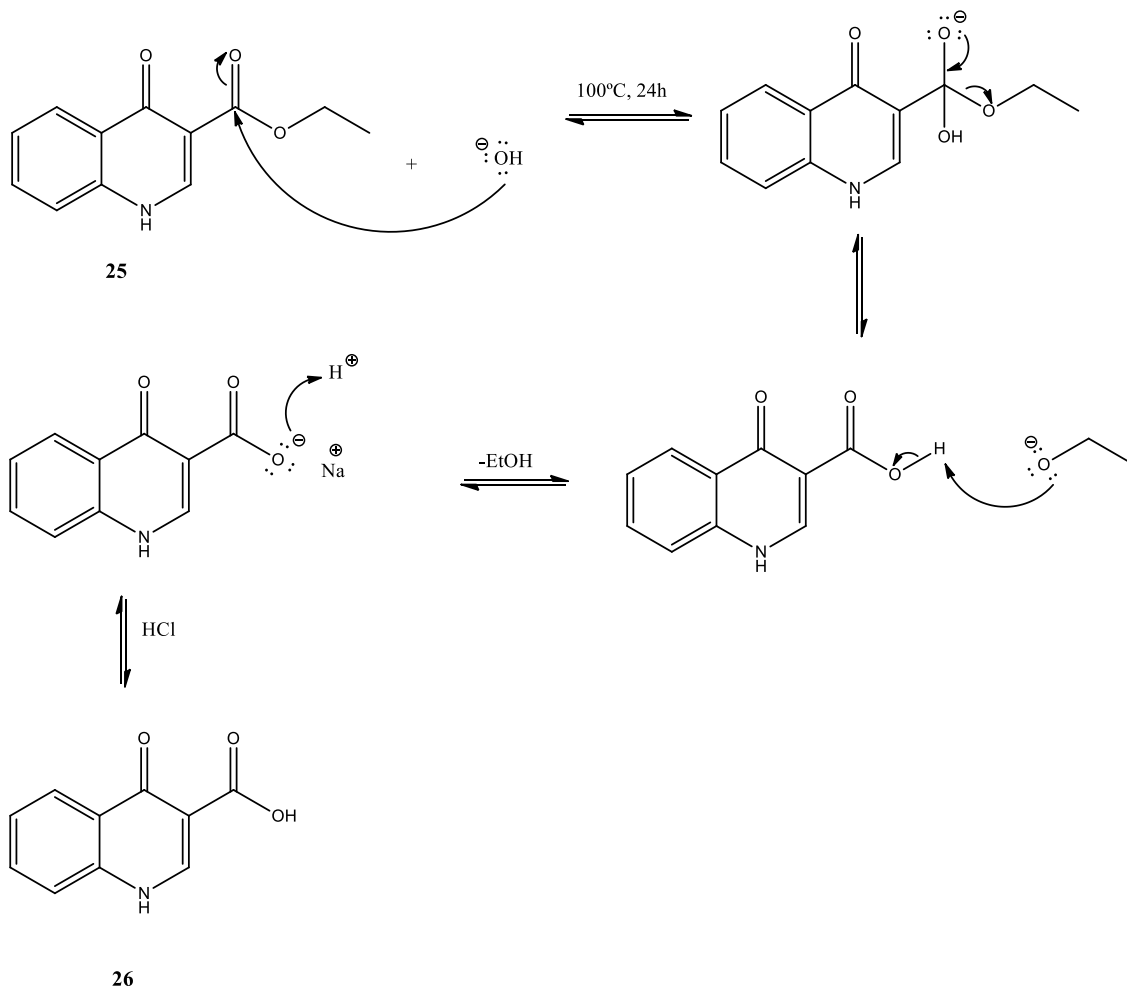


Figura 3-21 – Representação da proposta mecanística para a hidrólise do composto 25 em condições alcalinas, com formação de 26.

A etapa final da síntese de 4-oxoquinolina consiste em realizar uma descarboxilação mediada pela temperatura, como representado na Figura 3-22. No entanto este passo necessita de otimização, uma vez que o ponto de fusão do composto 26 é superior a 250°C e a reação pode ser desfavorecida devido à formação de um intermediário reacional instável, como apresentado na proposta mecanística na Figura 3-23.

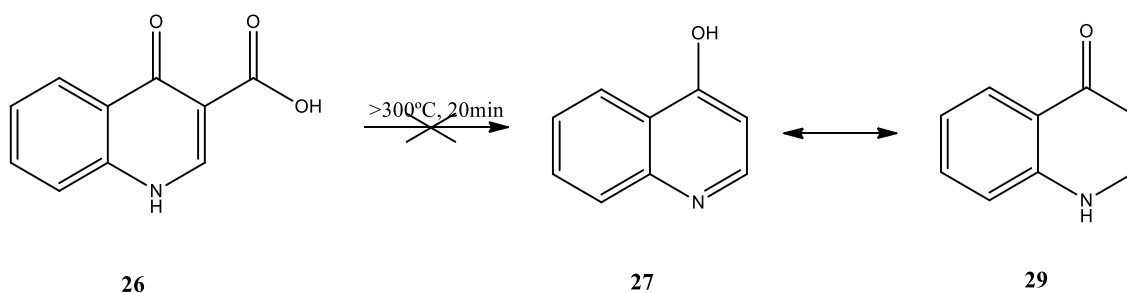


Figura 3-22 – Representação da estratégia de síntese proposta para obter o composto 27

• **Proposta mecanística para as reações envolvidas na formação do composto 27.**

O mecanismo proposto para a formação do composto 27 encontra-se esquematizado na Figura 3-23.

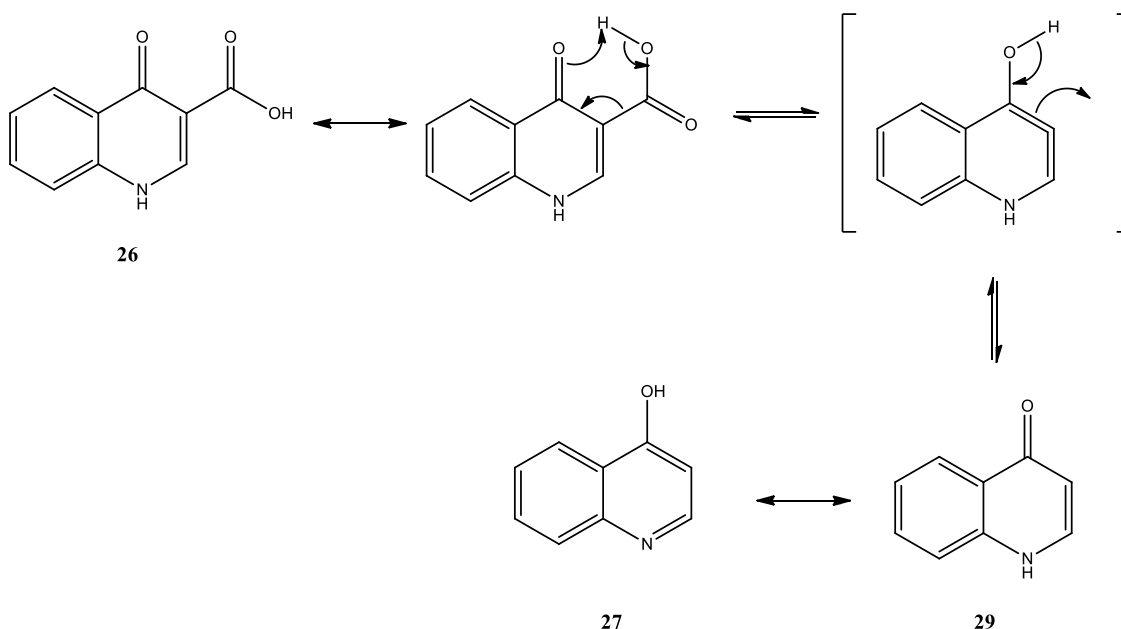


Figura 3-23 – Representação da proposta mecanística para a síntese do composto 27.

3.8. Discussão dos resultados

Apesar do sucesso comprovado das quinolonas substituídas por grupos éster na posição 3 no que concerne a sua atividade antimalárica, também apresentam problemas farmacológicos e farmacocinéticos, como o desenvolvimento relativamente rápido de resistência, resistência cruzada, baixa solubilidade e instabilidade metabólica.^{218,219}

O primeiro passo da síntese das quinolonas com substituintes éster na posição 3, que consiste no acoplamento de uma anilina com o DEEMM, é conseguido com sucesso e bom rendimento. No entanto, o passo seguinte, que consiste na ciclização intramolecular do composto obtido, apresenta muitas dificuldades.

A ciclização pelo método de Gould-Jacobs é dependente da concentração, apresenta baixos rendimentos e pode levar a misturas de isómeros estruturais, com diferentes padrões de substituição. A alta temperatura utilizada neste método pode levar à degradação térmica de alguns grupos substituintes e o ponto de ebulição elevado e natureza química de Dowtherm A torna a extração ou separação dos produtos orgânicos difícil. As quinolonas obtidas como resultado da reação, têm uma baixa solubilidade na maioria dos solventes orgânicos, o que torna a sua extração, purificação e caracterização difícil. Também existe uma possibilidade de tautomerismo de oxoquinolina/hidroxiquinolina, que pode afetar a atividade e/ou o modo de ação, devido a interconversões de grupos funcionais e alterações resultantes nas interações fármaco-alvo

Por outro lado, a ciclização mediada pelo POCl_3 também apresenta as suas limitações. O intermediário, 4-cloroquinolina, nunca foi isolado em nenhuma das reações e foram obtidos produtos inesperados.

A síntese de quinolonas sem grupos substituintes apresenta as mesmas limitações nas etapas de síntese até à obtenção da quinolona com um grupo éster na posição 3. A etapa seguinte consiste na hidrólise do grupo éster e é conseguida com um rendimento razoável e poucas limitações. No entanto o passo da descarboxilação necessita de uma otimização, uma vez que o produto pretendido não foi obtido.

Assim, considerando todos os aspetos envolvidos na síntese de derivados de quinolona, estudos adicionais para elucidar a estrutura, a possibilidade de tautomerismo e o seu impacto na atividade biológica necessitam de ser realizados. Além

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

disso, a otimização das estratégias sintéticas atuais e o desenvolvimento de novas metodologias de síntese de quinolonas são uma grande prioridade, visto que estes compostos apresentam uma ótima atividade antimalárica e poderão ser uma adição ao arsenal terapêutico para combate à malária.

4. Procedimento experimental

Este capítulo é destinado à descrição de todo o trabalho experimental efetuado durante o projeto de investigação.

Solventes e reagentes

Os reagentes e solventes comercialmente disponíveis foram adquiridos de fontes comerciais e utilizados como recebidos. Quando necessário, os solventes foram destilados no laboratório, a partir de agentes de secagem apropriados, antes da utilização: o tetrahidrofurano (THF) foi destilado a partir de sódio metálico sob um fluxo constante de azoto seco, utilizando como indicador a benzofenona.

Monitorização e purificação

As reações foram monitorizadas por cromatografia em camada fina (do inglês: *Thin-layer Chromatography*, TLC), utilizando placas pré-revestidas com gel de sílica 60, com indicador fluorescente UV254. Após a eluição, as placas foram visualizadas usando uma lâmpada de ultravioleta (254 nm) e reveladas após imersão em anisaldeído. A purificação por cromatografia em coluna foi realizada utilizando gel de sílica 60 (tamanho de partícula 40-63 μm) comercializado pela Merck.

Espectroscopia

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) para os compostos foram registados a 400 e 100 MHz, para ^1H e ^{13}C , respetivamente, utilizando espectrómetros que fazem parte da Instalação de RMN, em REQUIMTE, Departamento de Química e Bioquímica, Universidade Nova de Lisboa. Os valores de desvio químico (δ) são descritas em partes por milhão (ppm) em relação a um padrão interno de tetrametilsilano (TMS; $\delta = 0,0$ ppm). Os solventes deuterados apropriados (D_6 -DMSO; D_1 -clorofórmio; D_4 -metanol) foram fornecidos pela Sigma-Aldrich e foram utilizados sem purificação adicional. Os padrões de divisão são designados como singleto (s), singleto largo (bs), duplete (d), tripleto (t), quarteto (q), duplo duplete (dd), duplo tripleto (dt), duplo quarteto (dq) ou multiplete (m).

4.1. Procedimentos utilizados nas sínteses desenvolvidas no projeto

4.1.1. Síntese de 3-carboxilato-4-oxo-7-metilquinolina de etilo

Síntese do composto 12

Adicionou-se *m*-toluidina (3 ml; 27,97 mmol) a DEEM (5,7 ml; 28,20 mmol), sob agitação. Aqueceu-se a mistura reacional a 100°C, sob atmosfera de N₂, mantendo em agitação, durante 24h. Realizou-se o controlo da reação por TLC, utilizando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etilo (7:3). Diminuiu-se a temperatura e procedeu-se a cristalização em diclorometano (DCM) e etanol, que se aqueceu até 55°C e posteriormente deixou-se arrefecer a mistura lentamente para uma evaporação lenta do solvente. Após 48h, como não se formaram cristais, fez-se separação por cromatografia em coluna em sílica gel. Eluiu-se com 5% de acetato de etilo em hexano e posteriormente aumentou-se para 15%, verificando-se então uma mistura de produtos. Evaporou-se o solvente a pressão reduzida, usando um evaporador rotativo, e obteve-se um óleo de cor laranja acastanhado (6,96g; 25,10 mmol; rendimento 89,7%). Ponto de fusão: 38-39 °C; ¹H RMN (400 MHz, (CD₃)₂SO) δ 10.63 (d, NH), 8.40 (d, CHNH), 7.25 (t, 1H), 7.18 – 7.06 (m, 2H), 6.96 (s, 1H), 4.14 (m, 2 x OCH₂CH₃), 2.29 (s, CH₃), 1.23 (m, 2 x OCH₂CH₃); ¹³C RMN (101 MHz, (CD₃)₂SO) δ 167.95 (CO₂Et), 165.40 (CO₂Et), 151.50 (CHNH), 139.73, 139.64, 129.91, 125.82, 118.28, 114.99, 93.44 [C(CO₂Et)₂], 60.06 (OCH₂CH₃), 59.87 (OCH₂CH₃), 23.36 (CH₃), 14.68 (OCH₂CH₃), 14.59 (OCH₂CH₃)

Síntese do composto 19a

Adicionou-se o composto 12 (1,07g; 3,86 mmol) a Dowtherm A (10 ml) e deixou-se reagir a 250°C durante 5h, em refluxo, sob atmosfera de N₂. Realizou-se o controlo da reação por TLC utilizando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etilo (8:2). De seguida deixou-se arrefecer a mistura lentamente, filtrou-se o sólido formado e lavou-se com hexano e éter etílico. Por fim, deixou-se aberto e à temperatura

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

ambiente durante alguns dias para evaporar resíduos de solvente ainda presente e obteve-se um pó branco (0,408g; 1,76 mmol; rendimento 45,73%).

Síntese do composto 19b

Adicionou-se o composto 12 (1,37g; 4,94 mmol) a POCl_3 (15 ml) e deixou-se em refluxo a 97°C , sob atmosfera de N_2 , durante 14 horas. Realizou-se o controlo da reação por TLC, utilizando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etilo (8:2). Evaporou-se o POCl_3 a pressão reduzida e a temperatura elevada (110°C) e obteve-se um líquido escuro e viscoso. A mistura foi arrefecida até 90°C , adicionou-se 20 ml de isopropanol e deixou-se sob agitação até a dissolução completa da mistura anteriormente obtida. Deixou-se arrefecer a solução, lentamente e sem agitação. O processo de cristalização decorreu durante 7 dias, à temperatura ambiente. Obteve-se um sólido (0,236g), o qual foi filtrado e lavado com uma mistura de isopropanol e éter de petróleo previamente arrefecida. Obteve-se também outro sólido, resultante de cristalização a partir do filtrado anteriormente obtido. Os espectros de RMN não foram conclusivos, uma vez que neste não está presente o grupo éster e os espectros não são compatíveis com os espectros obtidos para o composto caracterizado anteriormente. Espera-se o espectro de massa, para uma caracterização mais precisa do composto.

4.1.2. Síntese de 4-oxoquinolina

Síntese do composto 24

Adicionou-se anilina (3 ml; 32,92 mmol) a DEEM (6,7 ml; 33.15 mmol) sob agitação. Aqueceu-se a mistura reacional a 100°C , sob atmosfera de N_2 , mantendo a mistura em agitação durante 15h. Realizou-se o controlo da reação por TLC utilizando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etilo (7:3). Diminuiu-se a temperatura e procedeu-se a cristalização em diclorometano (DCM) e etanol, que se aqueceu até 55°C e posteriormente deixou-se arrefecer lentamente para uma evaporação lenta do solvente. Após 48h, não se formaram cristais, pelo que se evaporou o solvente a pressão reduzida e se prosseguiu para separação por cromatografia em coluna em sílica gel usando como eluente 5% de acetato de etilo em hexano. Evaporou-

se o solvente no evaporador rotativo e obteve-se um óleo de cor laranja acastanhado. Deixou-se o produto 24 num frasco aberto e à temperatura ambiente durante alguns dias, de forma a evaporar algum solvente ainda presente (7,966g; 30,26 mmol; rendimento 91,9%). Ponto de fusão: 45-46 °C; ^1H RMN (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 10.72 (d, NH), 8.42 (d, CHNH), 7.44 – 7.35 (m, 4H), 7.17 (t, 1H), 4.17 (dq, 2 x OCH_2CH_3), 1.26 (m, 2 x OCH_2CH_3); ^{13}C RMN (101 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 167.86 (CO_2Et), 165.37 (CO_2Et), 151.59 (CHNH), 139.84, 130.11 (2C), 125.09, 117.98 (2C), 93.90 [$\text{C}(\text{CO}_2\text{Et})_2$], 60.09 (OCH_2CH_3), 59.90 (OCH_2CH_3), 14.69 (OCH_2CH_3), 14.63 (OCH_2CH_3);

Síntese do composto 25

Adicionou-se o composto 24 (1,048g; 3,98 mmol) a Dowtherm A (10ml) e refluxou-se a mistura a 250°C durante 4h, sob atmosfera de N_2 . Realizou-se o controlo da reação por TLC, utilizando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etilo (8:2). De seguida deixou-se a temperatura diminuir lentamente, filtrou-se a mistura e lavou-se o sólido com uma mistura de hexano e éter etílico. Por fim, deixou-se num frasco aberto e à temperatura ambiente, durante alguns dias, para evaporar resíduos de solvente ainda presente e obteve-se um pó branco e castanho (0,324g; 1,49 mmol; rendimento 37,5%). Ponto de fusão > 350 °C; ^1H RMN (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 12.30 (s, NH), 8.53 (s, CHNH), 8.14 (d, 1H), 7.69 (t, 1H), 7.60 (d, 1H), 7.40 (t, 1H), 4.20 (q, OCH_2CH_3), 1.27 (t, OCH_2CH_3); ^{13}C NMR (101 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 173.89, 165.28, 145.35, 139.42, 132.86, 127.73, 126.09, 125.15, 119.24, 110.26, 60.02 (OCH_2CH_3), 14.80 (OCH_2CH_3)

Síntese do composto 28

Adicionou-se o composto 24 (1,517g; 5,76 mmol) a POCl_3 (15 ml) e refluxou-se a mistura sob atmosfera de N_2 , a 97°C, durante 14 horas. Realizou-se o controlo da reação por TLC, utilizando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etilo (8:2). Evaporou-se o POCl_3 a pressão reduzida e a temperatura elevada (110°C) e obteve-se um líquido escuro e viscoso. A mistura foi arrefecida até 90°C, adicionou-se 20 ml de isopropanol e deixou-se em agitação até à dissolução completa. Deixou-se arrefecer a mistura lentamente, sem agitação, e deixou-se a cristalizar durante 7 dias, à temperatura ambiente. Obteve-se um sólido que foi filtrado e lavado com uma mistura de isopropanol e éter de petróleo

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

previamente arrefecida. Os espectros de RMN são inconclusivos. Não se observaram indícios da presença do grupo éster nos espectros de ^1H -RMN. Aguarda-se resultados de espectrometria de massa, para uma caracterização mais detalhada do composto obtido.

Síntese do composto 26

Dissolveu-se o composto 24 (0,2g; 0,92mmol) em metanol (5ml), adicionou-se hidróxido de sódio (10% aq, 7,5ml) e a mistura reacional foi aquecida a 100°C durante 24h. Realizou-se o controlo da reação por TLC, utilizando como eluente uma mistura de diclorometano e metanol (9:1). Deixou-se a mistura reacional arrefecer e acidificou-se em seguida, com a adição de HCl(aq) (10%; pH \approx 1). Formou-se um precipitado, que foi filtrado e lavado com clorofórmio, metanol e hexano, até se obter um pó branco (0,13g; 0,69 mmol; rendimento 74,6%). Ponto de fusão: 278-280 °C; ^1H RMN (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 15.34 (s, CO_2H), 13.41 (s, NH), 8.89 (s, CHNH), 8.29 (d, 1H), 7.89 (t, 1H), 7.82 (d, 1H), 7.61 (t, 1H); ^{13}C RMN (101 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 178.32, 166.40 (CO_2H), 145.25, 139.51, 133.94, 126.69, 125.05, 124.40, 119.71, 107.57;

5. Conclusão

A malária é uma doença infecciosa provocada por parasitas do género *Plasmodium* que afeta a humanidade há milhares de anos e ainda prevalece como doença endémica em muitas partes do mundo. Estimativas da OMS revelam que, em 2015, ocorreram no mundo cerca de 212 milhões de casos de malária, dos quais 429 000 resultaram em morte.

Atualmente, o combate contra a malária passa principalmente pelo controlo do vetor, prevenção da picada por mosquitos infetados e pela utilização de quimioterapia, em profilaxia ou tratamento. No entanto, como foi abordado ao longo desta dissertação, o arsenal terapêutico existente para a malária apresenta imensas limitações, tanto ao nível da eficácia como do custo e da segurança.

A seleção de estirpes resistentes aos fármacos utilizados para o tratamento da malária é o maior obstáculo ao controlo desta doença. A falha terapêutica dos fármacos mais antigos deve-se principalmente ao seu uso indiscriminado. Assim, começou a ser aplicado o uso de terapias combinadas das quais a mais importante, hoje em dia, é a terapia combinada baseada em artemisinina. No entanto, mesmo esta terapia já apresenta uma diminuição na sua atividade em diversos países, o que alerta para uma grande necessidade de investimento no desenvolvimento de novos fármacos antimaláricos que combatam eficazmente a malária provocada por estirpes de *Plasmodium* multiresistentes.

No sentido de contornar os atuais problemas de resistência às diferentes classes de compostos utilizados no combate à malária, verifica-se uma extensa atividade de investigação e desenvolvimento e de otimização das propriedades farmacológicas de compostos com atividade antimalárica. Destes, vários são considerados como compostos candidatos a fármacos, dos quais diversos estão atualmente em ensaios clínicos e apresentam resultados promissores.

A introdução da atovaquona no mercado como fármaco antimalárico validou o complexo de citocromo bc_1 da cadeia de transporte de eletrões mitocondrial como alvo terapêutico. Neste sentido, outros compostos com o núcleo oxoquinolínico foram desenvolvidos com o intuito da inibição do complexo bc_1 , incluindo as 4-oxoquinolinas com um grupo éster na posição 3.

No âmbito desta dissertação, foi desenvolvido um projeto de síntese orgânica com o objetivo do desenvolvimento de inibidores seletivos do complexo de citocromo *bc₁* de *P. falciparum* e o estudo dos problemas associados a estes compostos. Este projeto demonstrou os problemas encontrados na síntese, purificação e possível tautomeria oxoquinolina/hidroxiquinolina destes compostos, o que motiva o desenvolvimento de novas estratégias de síntese. A continuação do estudo da tautomeria oxoquinolina/hidroxiquinolina é essencial para racionalizar possíveis alterações das características farmacocinéticas e farmacodinâmicas deste grupo terapêutico.

Além dos alvos terapêuticos já conhecidos e validados, é de extrema importância descobrir novos alvos terapêuticos como outra forma de contornar os atuais problemas de seleção para resistência aos fármacos em uso clínico. Neste sentido, têm vindo a ser investigadas diversas estruturas celulares e vias metabólicas do parasita responsável pela malária, com o objetivo de inibir processos essenciais à sua sobrevivência.^{234,235}

Certamente, a malária irá continuar a ser uma doença prevalente nos países em desenvolvimento nos próximos anos. Somente com um esforço coletivo da comunidade científica, entidades competentes de saúde e toda a população em risco, será possível, no futuro, alcançar uma grande redução e até a quimérica eliminação total desta doença, que continua a ter um enorme impacto na humanidade.

6. Referências Bibliográficas

1. Centers for Disease Control and Prevention - malária. Disponível em: <https://www.cdc.gov/malaria/about/index.html>. (Acedido: 28 de Março de 2017)
2. Centers for Disease Control and Prevention - malária parasites. Disponível em: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/parasites.html>. (Acedido: 28 de Março de 2017)
3. Poinar, G. *Plasmodium dominicana* n. sp. (Plasmodiidae: Haemospororida) from Tertiary Dominican amber. *Syst. Parasitol.* **61**, 47–52 (2005).
4. Liu, W. *et al.* Origin of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in gorillas. *Nature* **467**, 420–425 (2010).
5. Liu, W. *et al.* African origin of the malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Nat. Commun.* **5**, (2014).
6. Lee, K. S. *et al.* *Plasmodium knowlesi*: Reservoir hosts and tracking the emergence in humans and macaques. *PLoS Pathog.* **7**, (2011).
7. Hayakawa, T. *et al.* Identification of *Plasmodium malariae*, a human malaria parasite, in imported chimpanzees. *PLoS One* **4**, 2–5 (2009).
8. Centers for Disease Control and Prevention. Malaria - About Malaria - History. Disponível em: <https://www.cdc.gov/malaria/about/history/index.html#>. (Acedido: 16 de Maio de 2017)
9. Cox, F. E. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasites and Vectors* **3**, 5 (2010).
10. Arrow, K. J., Panosian, C. & Gelband, H. *Saving Lives, Buying Time: Economics of Malaria Drugs in an Age of Resistance*. Institute of Medicine (US) Committee on the Economics of Antimalarial Drugs (2004).
11. Pappas, G., Kiriaze, I. J. & Falagas, M. E. Insights into infectious disease in the era of Hippocrates. *Int. J. Infect. Dis.* **12**, 347–350 (2008).
12. Yalcindag, E. *et al.* Multiple independent introductions of *Plasmodium falciparum* in South America. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 511–516 (2012).
13. Centers for Disease Control and Prevention. Malaria - About Malaria - History - Laveran and the Discovery of the Malaria Parasite. Disponível em: <https://www.cdc.gov/malaria/about/history/laveran.html>. (Acedido: 17 de Maio de 2017)
14. Centers for Disease Control and Prevention. Malaria - About Malaria - History - Ross and the Discovery that Mosquitoes Transmit Malaria Parasites. Disponível em: <https://www.cdc.gov/malaria/about/history/ross.html>. (Acedido: 17 de Maio de 2017)
15. Shortt, H. E. & Garnham, P. C. C. Pre-erythrocytic stages in mammalian malaria

- parasites. *Nature* **161**, 126 (1948).
16. Shortt, H. E., Garnham, P. C. C., Covell, G. & Shute, P. G. Pre-Erythrocytic Stage of Human Malaria, *Plasmodium Vivax*. *BMJ* **1**, 547–547 (1948).
 17. Shortt, H. E., Fairley, N. H., Covell, G., Shute, P. G. & Garnham, P. C. C. The pre-erythrocytic stage of *Plasmodium falciparum*; a preliminary note. *Br. Med. J.* **2**, 1006–1008 (1949).
 18. Garnham, P. C. *et al.* Pre-erythrocytic Stages of Human Malaria: *Plasmodium Ovale*. *Br. Med. J.* **1**, 257 (1954).
 19. Bray, R. S. Studies on Malaria in Chimpanzees. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **9**, 455–465 (1960).
 20. Killick-Kendrick, R. *et al.* Demonstration of Hypnozoites in Sporozoite-Transmitted *Plasmodium vivax* Infection *. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **31**, 1291–1293 (1982).
 21. Gardner, M. J. *et al.* Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* **419**, 498–511 (2002).
 22. Carlton, J. M. *et al.* Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Nature* **455**, 757–763 (2008).
 23. Pain, A. *et al.* The genome of the simian and human malaria parasite *Plasmodium knowlesi*. *Nature* **455**, 799–803 (2008).
 24. Centers for Disease Control and Prevention. Malaria - About Malaria - Where Malaria Occurs. Disponível em: <https://www.cdc.gov/malaria/about/distribution.html>. (Acedido: 3 de Junho de 2017)
 25. World Health Organization. *World Malaria Report*. (2016).
 26. Bhatt, S. *et al.* The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. *Nature* **526**, 207–211 (2015).
 27. Morrissette, N. S. & Sibley, L. D. Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 21–38; (2002).
 28. Lim, L. & McFadden, G. I. The evolution, metabolism and functions of the apicoplast. *Philos. Trans. R. Soc. B* **365**, 749–763 (2010).
 29. Centers for Disease Control and Prevention. Malaria - About Malaria - Biology - Malaria Parasites. Disponível em: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/parasites.html>. (Acedido: 14 de Setembro de 2017)
 30. Genus *Anopheles* Meigen, 1818 | Mosquito Taxonomic Inventory. Disponível em: <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/genus-anopheles-meigen-1818>. (Acedido: 17 de Agosto de 2017)
 31. Sinka, M. E. *et al.* A global map of dominant malaria vectors. *Parasit. Vectors* **5**, 69 (2012).

32. Centers for Disease Control and Prevention. Malaria - About Malaria - Biology - Mosquitoes - Anopheles Mosquitoes. Disponível em: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/mosquitoes/index.html>. (Acedido: 17 de Agosto de 2017)
33. Hedrick, P. W. Population genetics of malaria resistance in humans. *Heredity (Edinb)*. **107**, 283–304 (2011).
34. Kwiatkowski, D. P. How Malaria Has Affected the Human Genome and What Human Genetics Can Teach Us about Malaria. *Am. J. Hum. Genet.* **77**, 171–192 (2005).
35. Anstee, D. J., East, S. & Founder, A. The relationship between blood groups and disease. *Blood* **115**, 4635–4643 (2010).
36. Cholera, R. *et al.* Impaired cytoadherence of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes containing sickle hemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 991–6 (2008).
37. Hebbel, R. P. Sickle hemoglobin instability: a mechanism for malarial protection. *Redox Rep.* **8**, 238–240 (2003).
38. Marengo-Rowe, A. J. The thalasseмии and related disorders. *Proc. (Bayl. Univ. Med. Cent)*. **20**, 27–31 (2007).
39. Modiano, G. *et al.* Protection against malaria morbidity: near-fixation of the alpha-thalassemia gene in a Nepalese population. *Am. J. Hum. Genet.* **48**, 390–7 (1991).
40. Wambua, S. *et al.* The effect of α -thalassaemia on the incidence of malaria and other diseases in children living on the coast of Kenya. *PLoS Med.* **3**, 643–651 (2006).
41. Modiano, D. *et al.* Haemoglobin C protects against clinical Plasmodium falciparum malaria. *Nature* **414**, 305–308 (2001).
42. Fairhurst, R. M. *et al.* Abnormal display of PfEMP-1 on erythrocytes carrying haemoglobin C may protect against malaria. *Nature* **435**, 1117–1121 (2005).
43. Chotivanich, K. *et al.* Hemoglobin E: a balanced polymorphism protective against high parasitemias and thus severe P falciparum malaria. *Blood* **100**, 1172–1176 (2002).
44. Cappellini, M. D. & Fiorelli, G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Lancet* **371**, 64–74 (2008).
45. Martin, S. K. The malaria/G6PD hypothesis revisited. *Parasitol. Today* **10**, 251–252 (1994).
46. Luzzatto, L. Genetics of red cells and susceptibility to malaria. *Blood* **54**, 961 LP-976 (1979).
47. Ruwende, C. *et al.* Natural selection of hemi- and heterozygotes for G6PD deficiency in Africa by resistance to severe malaria. *Nature* **376**, 246–249 (1995).

48. Allison, A. C. & Clyde, D. F. Malaria in African Children with Deficient Erythrocyte Glucose-6-phosphate Dehydrogenase. *BMJ* **1**, 1346–1349 (1961).
49. Ayi, K. *et al.* Pyruvate kinase deficiency and malaria. *N. Engl. J. Med.* **358**, 1805–10 (2008).
50. Allen, S. J. *et al.* Prevention of cerebral malaria in children in Papua New Guinea by Southeast Asian ovalocytosis band 3. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **60**, 1056–1060 (1999).
51. Cortés, A. *et al.* Adhesion of Plasmodium falciparum-infected red blood cells to CD36 under flow is enhanced by the cerebral malaria-protective trait South-East Asian ovalocytosis. *Mol. Biochem. Parasitol.* **142**, 252–257 (2005).
52. Mosaad, Y. M. Clinical Role of Human Leukocyte Antigen in Health and Disease. *Scand. J. Immunol.* **82**, 283–306 (2015).
53. Langhi, D. M. & Orlando Bordin, J. Duffy blood group and malaria. *Hematology* **11**, 389–398 (2006).
54. Miller, L. H., Mason, S. J., Clyde, D. F. & McGinniss, M. H. The Resistance Factor to Plasmodium vivax in Blacks. *N. Engl. J. Med.* **295**, 302–304 (1976).
55. Barnwell, J. W., Nichols, M. E. & Rubinstein, P. In vitro evaluation of the role of the Duffy blood group in erythrocyte invasion by Plasmodium vivax. *J. Exp. Med.* **169**, 1795–802 (1989).
56. Ryan, J. R. *et al.* Evidence for transmission of Plasmodium Vivax among a Duffy antigen negative population in Western Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **75**, 575–581 (2006).
57. Cavasini, C. E. *et al.* Duffy blood group gene polymorphisms among malaria vivax patients in four areas of the Brazilian Amazon region. *Malar. J.* **6**, 167 (2007).
58. Menard, D. *et al.* Plasmodium vivax clinical malaria is commonly observed in Duffy-negative Malagasy people. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 5967–5971 (2010).
59. Centers for Disease Control and Prevention. Malaria - About Malaria - Biology. Disponível em: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>. (Acedido: 10 de Junho de 2017)
60. Das, S. *et al.* Transcriptomic and functional analysis of the Anopheles gambiae salivary gland in relation to blood feeding. *BMC Genomics* **11**, 566 (2010).
61. Vaughan, A. M., Aly, A. S. I. & Kappe, S. H. I. Malaria Parasite Pre-Erythrocytic Stage Infection: Gliding and Hiding. *Cell Host Microbe* **4**, 209–218 (2008).
62. Prudêncio, M., Rodriguez, A. & Mota, M. M. The silent path to thousands of merozoites: the Plasmodium liver stage. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 849–856 (2006).
63. Carrolo, M. *et al.* Hepatocyte growth factor and its receptor are required for malaria infection. *Nat. Med.* **9**, 1363–1369 (2003).
64. Cowman, A. F. & Crabb, B. S. Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell* **124**, 755–766 (2006).

65. Iyer, J., Grüner, A. C., Rénia, L., Snounou, G. & Preiser, P. R. Invasion of host cells by malaria parasites: A tale of two protein families. *Mol. Microbiol.* **65**, 231–249 (2007).
66. Coronado, L. M., Nadovich, C. T. & Spadafora, C. Malarial hemozoin: From target to tool. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1840**, 2032–2041 (2014).
67. Greenwood, B. M. *et al.* Malaria: Progress, perils, and prospects for eradication. *J. Clin. Invest.* **118**, 1266–1276 (2008).
68. Aly, A. S. I., Vaughan, A. M. & Kappe, S. H. I. Malaria Parasite Development in the Mosquito and Infection of the Mammalian Host. *Annu. Rev. Microbiol.* **63**, 195–221 (2009).
69. Centers for Disease Control and Prevention. Malaria - About Malaria - Disease. Disponível em: <https://www.cdc.gov/malaria/about/disease.html>. (Acedido: 13 de Agosto de 2017)
70. Bartoloni, A. & Zammarchi, L. Clinical aspects of uncomplicated and severe malaria. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* **4**, 2012026 (2012).
71. World Health Organization. Guidelines For The Treatment of Malaria. (2015).
72. Low Blood Glucose (Hypoglycemia) | NIDDK. Disponível em: <https://www.niddk.nih.gov/health-information/diabetes/overview/preventing-problems/low-blood-glucose-hypoglycemia>. (Acedido: 5 de Agosto de 2017)
73. Brayfield, A. *Martindale: The Complete Drug Reference*. (Pharmaceutical Press, 2014).
74. Tangpukdee, N., Duangdee, C., Wilairatana, P. & Krudsood, S. Malaria diagnosis: A brief review. *Korean J. Parasitol.* **47**, 93–102 (2009).
75. Reyburn, H. *et al.* Overdiagnosis of malaria in patients with severe febrile illness in Tanzania: a prospective study. *Bmj* **329**, 1212 (2004).
76. Mwangi, T. W., Mohammed, M., Dayo, H., Snow, R. W. & Marsh, K. Europe PMC Funders Group Clinical algorithms for malaria diagnosis lack utility among people of different age groups. **10**, 530–536 (2012).
77. Clendennen, T. E., Long, G. W. & Kevin Baird, J. QBC® and Giemsa-stained thick blood films: Diagnostic performance of laboratory technologists. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **89**, 183–184 (1995).
78. WHO | Public announcement to rapid diagnostic test manufacturers, procurement agencies and national malaria control programmes. *WHO* (2016). Disponível em: <http://www.who.int/malaria/news/2016/rdt-procurement-criteria/en/>. (Acedido: 23 de Agosto de 2017)
79. Centers for Disease Control and Prevention. Malaria - Diagnosis and Treatment (United States) - Diagnosis (U.S.) - Serology. Disponível em: https://www.cdc.gov/malaria/diagnosis_treatment/serology.html. (Acedido: 24 de Agosto de 2017)

80. Castelli, F., Odolini, S., Autino, B., Foca, E. & Russo, R. Malaria prophylaxis: A comprehensive review. *Pharmaceuticals* **3**, 3212–3239 (2010).
81. Centers for Disease Control and Prevention. *CDC Yellow Book 2018: Health Information for International Travel*. (Oxford University Press, 2017).
82. World Health Organization. WHO | Malaria. *WHO* (2017). Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>. (Acedido: 2 de Setembro de 2017)
83. WHO | Supplementary vector control methods. *WHO* (2017). Disponível em: http://www.who.int/malaria/areas/vector_control/complementary_methods/en/. (Acedido: 4 de Setembro de 2017)
84. Raghavendra, K. & Barik, T. K. Malaria vector control: from past to future. *Parasitol. Res.* **108**, 757–779 (2011).
85. Arama, C. & Troye-Blomberg, M. The path of malaria vaccine development: Challenges and perspectives. *J. Intern. Med.* **275**, 456–466 (2014).
86. WHO | Tables of malaria vaccine projects globally. *WHO* (2017). Disponível em: http://www.who.int/immunization/research/development/Rainbow_tables/en/. (Acedido: 4 de Setembro de 2017)
87. Partnership, S. C. T. Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. *Lancet* **386**, 31–45 (2015).
88. Schlitzer, M. Malaria chemotherapeutics part I: History of antimalarial drug development, currently used therapeutics, and drugs in clinical development. *ChemMedChem* **2**, 944–986 (2007).
89. Bruce-Chwatt, L. J. Three hundred and fifty years of the Peruvian fever bark. *Br. Med. J.* **296**, 1486–1487 (1988).
90. Greenwood, D. The quinine connection. *J. Antimicrob. Chemother.* **30**, 417–427 (1992).
91. Pelletier, P. & Caventou, J. *Analyse chimique des quinquina; suivie d'observations médicales sur l'emploi de la quinine et de la cinchonine*. (1821).
92. Gensini, G. F., Conti, A. A. & Lippi, D. The contributions of Paul Ehrlich to infectious disease. *J. Infect.* **54**, 221–224 (2007).
93. Seeman, J. I. The woodward-doering/rabe-kindler total synthesis of quinine: Setting the record straight. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **46**, 1378–1413 (2007).
94. Woodward, R. B. & Doering, W. E. The Total Synthesis of quinine 1. *J. Am. Chem. Soc.* **66**, 849–849 (1944).
95. Stork, G. *et al.* The first stereoselective total synthesis of quinine. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 3239–3242 (2001).
96. Achan, J. *et al.* Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: Role in the treatment of malaria. *Malar. J.* **10**, 1–12 (2011).

97. Müller, I. B. & Hyde, J. E. Antimalarial drugs: modes of action and mechanisms of parasite resistance. *Future Microbiol.* **5**, 1857–1873 (2010).
98. Croft, A. M. A lesson learnt: the rise and fall of Lariam and Halfan. *J R Soc Med* **100**, 170–174 (2007).
99. Jensen, M. & Mehlhorn, H. Seventy-five years of Resochin in the fight against malaria. *Parasitol. Res.* **105**, 609–627 (2009).
100. O'Neill, P. M., Barton, V. E., Ward, S. A. & Chadwick, J. in *Treatment and Prevention of Malaria* (eds. Staines, H. M. & Krishna, S.) 19–44 (Springer Basel, 2011).
101. Peters, W. The evolution of tafenoquine-antimalarial for a new millennium? *J. R. Soc. Med.* **92**, 345–352 (1999).
102. Waters, N. C. & Edstein, M. D. in *Treatment and Prevention of Malaria* (eds. Staines, H. M. & Krishna, S.) 69–94 (Springer Basel, 2011).
103. Hiebsch, R. R., Raub, T. J. & Wattenberg, B. W. Primaquine blocks transport by inhibiting the formation of functional transport vesicles: Studies in a cell-free assay of protein transport through the Golgi apparatus. *J. Biol. Chem.* **266**, 20323–20328 (1991).
104. Curry, S. Methemoglobinemia. *Ann. Emerg. Med.* **11**, 214–221 (1982).
105. Nosten, F., Phillips-Howard, P. A. & ter Kuile, F. O. in *Treatment and Prevention of Malaria* (eds. Staines, H. M. & Krishna, S.) 95–111 (Springer Basel, 2011).
106. Cui, L. & Su, X. Discovery, mechanisms of action and combination therapy of artemisinin. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **7**, 999–1013 (2009).
107. Davis, T. M. E., Hung, T., Sim, I., Karunajeewa, H. a & Ilett, K. F. Piperaquine: A Resurgent Antimalarial Drug. *Drugs* **65**, 75–87 (2005).
108. Croft, S. L. *et al.* Review of pyronaridine anti-malarial properties and product characteristics. *Malar. J.* **11**, 270 (2012).
109. Sanchez, C. P., Dave, A., Stein, W. D. & Lanzer, M. Transporters as mediators of drug resistance in Plasmodium falciparum. *Int. J. Parasitol.* **40**, 1109–1118 (2010).
110. Centers for Disease Control and Preventio. Malaria - Drug resistance in the Malaria Endemic World. Disponível em: https://www.cdc.gov/malaria/malaria_worldwide/reduction/drug_resistance.html. (Acedido: 14 de Setembro de 2017)
111. Cabrera, M., Paguio, M. F., Xie, C. & Roepe, P. D. Reduced digestive vacuolar accumulation of chloroquine is not linked to resistance to chloroquine toxicity. *Biochemistry* **48**, 11152–11154 (2009).
112. Fidock, D. A. *et al.* Mutations in the P. falciparum Digestive Vacuole Transmembrane Protein PfCRT and Evidence for Their Role in Chloroquine Resistance. *Mol. Cell* **6**, 861–871 (2000).
113. Sidhu, A., Verdier-Pinard, D. & Fidock, D. A. Chloroquine resistance in Plasmodium

- falciparum malaria parasites conferred by pfcr1 mutations. *Science* (80-.). **298**, 210–213 (2002).
114. Krogstad, D. J. *et al.* Efflux of chloroquine from Plasmodium falciparum: mechanism of chloroquine resistance. *Science* **238**, 1283–1285 (1987).
 115. Hayward, R.; Saliba, K. J. and Kirk, K. The pH of the digestive vacuole of Plasmodium falciparum is not associated with chloroquine resistance. *J. Cell Sci.* **119**, 1016–1025 (2006).
 116. Bray, P. G. *et al.* PfCRT and the trans-vacuolar proton electrochemical gradient: Regulating the access of chloroquine to ferriprotoporphyrin IX. *Mol. Microbiol.* **62**, 238–251 (2006).
 117. Sanchez, C. P., Stein, W. D. & Lanzer, M. Is PfCRT a channel or a carrier? Two competing models explaining chloroquine resistance in Plasmodium falciparum. *Trends Parasitol.* **23**, 332–339 (2007).
 118. van Es, H. H. *et al.* Expression of the plasmodial pfmdr1 gene in mammalian cells is associated with increased susceptibility to chloroquine. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 2419–2428 (1994).
 119. Sanchez, C. P., Rotmann, A., Stein, W. D. & Lanzer, M. Polymorphisms within PfMDR1 alter the substrate specificity for anti-malarial drugs in Plasmodium falciparum. *Mol. Microbiol.* **70**, 786–798 (2008).
 120. Ridley, R. G. *et al.* 4-Aminoquinoline analogs of chloroquine with shortened side chains retain activity against chloroquine-resistant Plasmodium falciparum. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 1846–1854 (1996).
 121. Mzayek, F. *et al.* Randomized dose-ranging controlled trial of AQ-13, a candidate antimalarial, and chloroquine in healthy volunteers. *PLoS Clin. Trials* **2**, (2007).
 122. Wani, W. A., Jameel, E., Baig, U., Mumtazuddin, S. & Hun, L. T. ing. Ferroquine and its derivatives: new generation of antimalarial agents. *Eur. J. Med. Chem.* **101**, 534–551 (2015).
 123. Benoit-Vical, F. *et al.* Trioxaquinones are new antimalarial agents active on all erythrocytic forms, including gametocytes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 1463–1472 (2007).
 124. Cosledan, F. *et al.* Selection of a trioxaquinone as an antimalarial drug candidate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 17579–17584 (2008).
 125. Crockett, M. & Kain, K. C. Tafenoquine: a promising new antimalarial agent. *Expert Opin. Investig. Drugs* **16**, 705–715 (2007).
 126. GSK Clinical Study Register. Disponível em: <https://www.gsk-clinicalstudyregister.com/>. (Acedido: 14 de Setembro de 2017)
 127. Hyde, J. E. Exploring the folate pathway in Plasmodium falciparum. *Acta Trop.* **94**, 191–206 (2005).
 128. Hyde, J. E. Drug-resistant malaria - An insight. *FEBS J.* **274**, 4688–4698 (2007).

129. Curd, F. H. S., Davey, D. G. & Rose, F. L. Studies on Synthetic Antimalarial Drugs. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **39**, 208–216 (1945).
130. Carrington, H. C., Crowther, A. F., Davey, D. G., Levi, A. A. & Rose, F. L. A Metabolite of 'Paludrine' with High Antimalarial Activity. *Nature* **168**, 1080–1080 (1951).
131. Nzila, A. The past, present and future of antifolates in the treatment of Plasmodium falciparum infection. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**, 1043–1054 (2006).
132. Mutabingwa, T. K. *et al.* A trial of proguanil-dapsone in comparison with sulfadoxine-pyrimethamine for the clearance of Plasmodium falciparum infections in Tanzania. *Trans. ...* **95**, 433–438 (2001).
133. Krudsood, S. *et al.* Artesunate-dapsone-proguanil treatment of falciparum malaria: Genotypic determinants of therapeutic response. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **99**, 142–149 (2005).
134. Nakato, H., Vivancos, R. & Hunter, P. R. A systematic review and meta-analysis of the effectiveness and safety of atovaquone - Proguanil (Malarone) for chemoprophylaxis against malaria. *J. Antimicrob. Chemother.* **60**, 929–936 (2007).
135. Jolink, H., Den Hartigh, J., Visser, L. G. & Van Nieuwkoop, C. Pancytopenia due to proguanil toxicity in a returning traveller with fever. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **66**, 811–812 (2010).
136. Falco, E. A., Goodwin, L. G., Hitchings, G. H., Rollo, I. M. & Russel, P. B. 2:4-Diaminopyrimidines - a new series of antimalarials. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* **6**, 185–200 (1951).
137. Mutabingwa, T. K. *et al.* Randomized trial of artesunate+Amodiaquine, sulfadoxine-pyrimethamine+amodiaquine, chlorproguanil-dapsone and SP for malaria in pregnancy in Tanzania. *PLoS One* **4**, 1–10 (2009).
138. Maokola, W. *et al.* Safety of sulfadoxine/pyrimethamine for intermittent preventive treatment of malaria in infants: Evidence from large-scale operational research in southern Tanzania. *Int. Health* **3**, 154–159 (2011).
139. Luntamo, M. *et al.* Effect of repeated treatment of pregnant women with sulfadoxine- pyrimethamine and azithromycin on preterm delivery in Malawi: A randomized controlled trial. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **83**, 1212–1220 (2010).
140. Peters, P. J., Thigpen, M. C., Parise, M. E. & Newman, R. D. Safety and toxicity of sulfadoxine/pyrimethamine: Implications for malaria prevention in pregnancy using intermittent preventive treatment. *Drug Saf.* **30**, 481–501 (2007).
141. Hyde, J. E. Mechanisms of resistance of Plasmodium falciparum to antimalarial drugs. *Microbes Infect.* **4**, 165–174 (2002).
142. Pearce, R. J. *et al.* Multiple origins and regional dispersal of resistant dhps in African Plasmodium falciparum malaria. *PLoS Med.* **6**, (2009).
143. Kublin, J. G. *et al.* Molecular Markers for Failure of Sulfadoxine - Pyrimethamine

- and Chlorproguanil - Dapsone Treatment of Plasmodium falciparum Malaria. *J. Infect. Dis.* **185**, 380–388 (2002).
144. Raman, J. *et al.* Five years of large-scale dhfr and dhps mutation surveillance following the phased implementation of artesunate plus sulfadoxine-pyrimethamine in Maputo Province, Southern Mozambique. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **82**, 788–794 (2010).
 145. Kiara, S. M. *et al.* In vitro activity of antifolate and polymorphism in dihydrofolate reductase of Plasmodium falciparum isolates from the Kenyan coast: Emergence of parasites with Ile-164-Leu mutation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 3793–3798 (2009).
 146. Karema, C. *et al.* Molecular correlates of high-level antifolate resistance in Rwandan children with Plasmodium falciparum malaria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 477–483 (2010).
 147. Nair, S. *et al.* Adaptive copy number evolution in malaria parasites. *PLoS Genet.* **4**, (2008).
 148. Dahlström, S., Veiga, M. I., Mårtensson, A., Björkman, A. & Gil, J. P. Polymorphism in Pfmrp1 (Plasmodium falciparum multidrug resistance protein 1) amino acid 1466 associated with resistance to sulfadoxine-pyrimethamine treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 2553–2556 (2009).
 149. Nzila, A. *et al.* Chemosensitization of Plasmodium falciparum by probenecid in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 2108–2112 (2003).
 150. Havemann, K., Bhibi, P., Hellgren, U. & Rombo, L. Norfloxacin is not effective for treatment of plasmodium falciparum infection in kenya. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **86**, 586 (1992).
 151. Watt, G. *et al.* Ciprofloxacin Treatment of Drug-Resistant Falciparum Malaria. *J. Infect. Dis.* **164**, 602–604 (1991).
 152. Fichera, M. E. & Roos, D. S. A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. *Nature* **390**, 407–9 (1997).
 153. Burkhardt, D. *et al.* Delayed parasite elimination in human infections treated with clindamycin parallels ‘delayed death’ of Plasmodium falciparum in vitro. *Int. J. Parasitol.* **37**, 777–785 (2007).
 154. Duggar, B. M. Aureomycin: a product of the continuing search for new antibiotics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **51**, 177–181 (1948).
 155. Conover, L. H., Moreland, W. T., English, A. R., Stephens, C. R. & Pilgrim, F. J. Terramycin. Xi. Tetracycline. *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 4622–4623 (1953).
 156. Dahl, E. L. *et al.* Tetracyclines specifically target the apicoplast of the malaria parasite Plasmodium falciparum. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 3124–3131 (2006).
 157. Krishna, S., Uhlemann, A. C. & Haynes, R. K. Artemisinins: Mechanisms of action and potential for resistance. *Drug Resist. Updat.* **7**, 233–244 (2004).

158. Eastman, R. T. & Fidock, D. A. Artemisinin-based combination therapies: a vital tool in efforts to eliminate malaria. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 864–874 (2009).
159. O'Neill, P. M., Barton, V. E. & Ward, S. A. The molecular mechanism of action of artemisinin - The debate continues. *Molecules* **15**, 1705–1721 (2010).
160. Meshnick, S. R. The mode of action of antimalarial endoperoxides. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **88**, 31–32 (1994).
161. Jefford, C. W. Why artemisinin and certain synthetic peroxides are potent antimalarials. Implications for the mode of action. *Curr. Med. Chem.* **8**, 1803–26 (2001).
162. Posner, G. H. *et al.* Further Evidence Supporting the Importance of and the Restrictions on a Carbon-Centered Radical for High Antimalarial Activity of 1,2,4-Trioxanes Like Artemisinin. *J. Med. Chem.* **38**, 2273–2275 (1995).
163. Haynes, R. K. *et al.* The Fe²⁺-mediated decomposition, PfATP6 binding, and antimalarial activities of artemisone and other artemisinins: The unlikelihood of C-centered radicals as bioactive intermediates. *ChemMedChem* **2**, 1480–1497 (2007).
164. Garah, F. B. El, Claparols, C., Benoit-Vical, F., Meunier, B. & Robert, A. The antimalarial trioxaquine DU1301 alkylates heme in malaria-infected mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 2966–2969 (2008).
165. Robert, A., Benoit-Vical, F., Claparols, C. & Meunier, B. The antimalarial drug artemisinin alkylates heme in infected mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 13676–13680 (2005).
166. Anne Robert, Y. C. and B. M. Alkylation of heme by the antimalarial drug artemisinin. *ChemBioChem* **3**, 1147–1149 (2002).
167. Hong, Y. L., Yang, Y. Z. & Meshnick, S. R. The interaction of artemisinin with malarial hemozoin. *Mol. Biochem. Parasitol.* **63**, 121–128 (1994).
168. Meshnick, S. R., Thomas, A., Ranz, A., Xu, C. M. & Pan, H. Z. Artemisinin (qinghaosu): the role of intracellular hemin in its mechanism of antimalarial action. *Mol. Biochem. Parasitol.* **49**, 181–189 (1991).
169. Creek, D. J. *et al.* Relationship between antimalarial activity and heme alkylation for spiro- and dispiro-1,2,4-trioxolane antimalarials. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 1291–1296 (2008).
170. Krishna, S., Woodrow, C. J., Staines, H. M., Haynes, R. K. & Mercereau-Puijalon, O. Re-evaluation of how artemisinins work in light of emerging evidence of in vitro resistance. *Trends Mol. Med.* **12**, 200–205 (2006).
171. Haynes, R. K. *et al.* Artemisinin antimalarials do not inhibit hemozoin formation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 1175 (2003).
172. Ying-Zi, Y., Little, B. & Meshnick, S. R. Alkylation of proteins by artemisinin. Effects of heme, pH, and drug structure. *Biochem. Pharmacol.* **48**, 569–573 (1994).

173. Asawamahasakda, W., Ittarat, I., Pu, Y. M., Ziffer, H. & Meshnick, S. R. Reaction of antimalarial endoperoxides with specific parasite proteins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 1854–1858 (1994).
174. Eckstein-Ludwig, U. *et al.* Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature* **424**, 957–961 (2003).
175. Nagamune, K., Beatty, W. L. & Sibley, L. D. Artemisinin induces calcium-dependent protein secretion in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Eukaryot. Cell* **6**, 2147–2156 (2007).
176. Valderramos, S. G., Scanfeld, D., Uhlemann, A. C., Fidock, D. A. & Krishna, S. Investigations into the role of the *Plasmodium falciparum* SERCA (PfATP6) L263E mutation in artemisinin action and resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 3842–3852 (2010).
177. Uhlemann, A.-C. *et al.* A single amino acid residue can determine the sensitivity of SERCAs to artemisinins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 628–629 (2005).
178. Witkowski, B. *et al.* Increased tolerance to artemisinin in *Plasmodium falciparum* is mediated by a quiescence mechanism. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 1872–1877 (2010).
179. Afonso, A. *et al.* Malaria parasites can develop stable resistance to artemisinin but lack mutations in candidate genes *atp6* (encoding the sarcoplasmic and endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase), *tctp*, *mdr1*, and *cg10*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 480–489 (2006).
180. Uhlemann, A. C., Wittlin, S., Matile, H., Bustamante, L. Y. & Krishna, S. Mechanism of antimalarial action of the synthetic trioxolane RBX11160 (OZ277). *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 667–672 (2007).
181. WHO. Artemisinin and artemisinin-based combination therapy resistance. 1–8 (2016).
182. Ariey, F. *et al.* A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* **505**, 50–5 (2014).
183. Mita, T., Tachibana, S.-I., Hashimoto, M. & Hirai, M. *Plasmodium falciparum* kelch 13: a potential molecular marker for tackling artemisinin-resistant malaria parasites. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **14**, 125–35 (2016).
184. Biamonte, M. A., Wanner, J. & Le Roch, K. G. Recent advances in malaria drug discovery. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **23**, 2829–2843 (2013).
185. Vivas, L. *et al.* Antimalarial efficacy and drug interactions of the novel semi-synthetic endoperoxide artemisone in vitro and in vivo. *J. Antimicrob. Chemother.* **59**, 658–665 (2007).
186. Nagelschmitz, J. *et al.* First assessment in humans of the safety, tolerability, pharmacokinetics, and ex vivo pharmacodynamic antimalarial activity of the new artemisinin derivative artemisone. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 3085–3091 (2008).

187. Toure, O. A. *et al.* Efficacy and safety of fixed dose combination of arterolane maleate and piperazine phosphate dispersible tablets in paediatric patients with acute uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria: a phase II, multicentric, open-label study. *Malar. J.* **14**, 469 (2015).
188. Valecha, N. *et al.* Comparison of the safety and efficacy of fixed-dose combination of arterolane maleate and piperazine phosphate with chloroquine in acute, uncomplicated *Plasmodium vivax* malaria: a phase III, multicentric, open-label study. *Malar. J.* **15**, 42 (2016).
189. central drugs standard control organization. Lista de fármacos aprovados de 01-01-2011 a 31-12-2011. Disponível em: <http://www.cdsco.nic.in/writereaddata/nLISTOF-APPROVED-DRUG-FROM-2011.pdf>. (Acedido: 18 de Setembro de 2017)
190. Phyto, A. P. *et al.* Antimalarial activity of artefenomel (OZ439), a novel synthetic antimalarial endoperoxide, in patients with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria: an open-label phase 2 trial. *Lancet. Infect. Dis.* **16**, 61–69 (2016).
191. O'Neill, P. M. *et al.* Identification of a 1,2,4,5-tetraoxane antimalarial drug-development candidate (RKA 182) with superior properties to the semisynthetic artemisinins. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **49**, 5693–5697 (2010).
192. Srivastava, I. K., Morrillsey, J. M., Darrouzet, E., Daldal, F. & Vaidya, A. B. Resistance mutations reveal the atovaquone-binding domain of cytochrome b in malaria parasites. *Mol. Microbiol.* **33**, 704–711 (1999).
193. Vaidya, A. B. & Mather, M. W. Mitochondrial Evolution and Functions in Malaria Parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* **63**, 249–267 (2009).
194. Fisher, N., Bray, P. G., Ward, S. A. & Biagini, G. A. The malaria parasite type II NADH:quinone oxidoreductase: an alternative enzyme for an alternative lifestyle. *Trends Parasitol.* **23**, 305–310 (2007).
195. Fry, M. & Pudney, M. Site of action of the antimalarial hydroxynaphthoquinone, 2-[trans-4-(4'-chlorophenyl) cyclohexyl]-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone (566C80). *Biochem. Pharmacol.* **43**, 1545–1553 (1992).
196. Srivastava, I. K., Rottenberg, H. & Vaidya, A. B. Atovaquone, a broad spectrum antoparasitic drug, collapses mitochondrial membrane potential in a malarial parasite. *J. Biol. Chem.* **272**, 3961–3966 (1997).
197. Vaidya, A. B., Lashgari, M. S., Pologe, L. G. & Morrillsey, J. Structural features of *Plasmodium* cytochrome b that may underlie susceptibility to 8-aminoquinolines and hydroxynaphthoquinones. *Mol. Biochem. Parasitol.* **58**, 33–42 (1993).
198. Baggish, A. L. & Hill, D. R. Antiparasitic agent atovaquone. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 1163–1173 (2002).
199. Srivastava, I. K. & Vaidya, A. B. A mechanism for the synergistic antimalarial action of atovaquone and proguanil. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 1334–1339 (1999).

200. Cottrell, G., Musset, L., Hubert, V., Le Bras, J. & Clain, J. Emergence of resistance to atovaquone-proguanil in malaria parasites: Insights from computational modeling and clinical case reports. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 4504–4514 (2014).
201. Musset, L., Bouchaud, O., Matheron, S., Massias, L. & Le Bras, J. Clinical atovaquone-proguanil resistance of *Plasmodium falciparum* associated with cytochrome b codon 268 mutations. *Microbes Infect.* **8**, 2599–2604 (2006).
202. Fivelman, Q. L., Butcher, G. A., Adagu, I. S., Warhurst, D. C. & Pasvol, G. Malarone treatment failure and in vitro confirmation of resistance of *Plasmodium falciparum* isolate from Lagos, Nigeria. *Malar. J.* **1**, 1 (2002).
203. Korsinczky, M. *et al.* Mutations in *Plasmodium falciparum* cytochrome b that are associated with atovaquone resistance are located at a putative drug-binding site. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 2100–2108 (2000).
204. Akhoun, B. A. *et al.* Understanding the mechanism of atovaquone drug resistance in *Plasmodium falciparum* cytochrome b mutation Y268S using computational methods. *PLoS One* **9**, (2014).
205. El Hage, S. *et al.* Synthesis and antimalarial activity of new atovaquone derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **44**, 4778–4782 (2009).
206. Hughes, L. M. *et al.* Design of anti-parasitic and anti-fungal hydroxy-naphthoquinones that are less susceptible to drug resistance. *Mol. Biochem. Parasitol.* **177**, 12–19 (2011).
207. Markley, L. D., Van Heertum, J. C. & Doorenbos, H. E. Antimalarial Activity of Clopidol, 3,5-Dichloro-2,6-dimethyl-4-pyridinol, and Its Esters, Carbonates, and Sulfonates. *J. Med. Chem.* **15**, 1188–1189 (1972).
208. Xiang, H. *et al.* Preclinical Drug Metabolism and Pharmacokinetic Evaluation of GW844520, A Novel Anti-Malarial Mitochondrial Electron Transport Inhibitor. *J. Pharm. Sci.* **95**, 2657–2672 (2006).
209. Yeates, C. L. *et al.* Synthesis and Structure–Activity Relationships of 4-Pyridones as Potential Antimalarials. *J. Med. Chem.* **51**, 2845–2852 (2008).
210. Nixon, G. L. *et al.* Targeting the mitochondrial electron transport chain of *Plasmodium falciparum*: new strategies towards the development of improved antimalarials for the elimination era. *Future Med. Chem.* **5**, 1573–91 (2013).
211. Capper, M. J. *et al.* Antimalarial 4(1H)-pyridones bind to the Q_i site of cytochrome bc 1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 755–760 (2015).
212. Beteck, R. M., Smit, F. J., Haynes, R. K. & N’Da, D. D. Recent progress in the development of anti-malarial quinolones. *Malar. J.* **13**, 339 (2014).
213. Biagini, G. A. *et al.* Acridinediones : Selective and Potent Inhibitors of the Malaria Parasite Mitochondrial bc 1 Complex. *Mol. Pharmacol.* **73**, 1347–1355 (2008).
214. Kelly, J. X. *et al.* Discovery of dual function acridones as a new antimalarial chemotype. *Nature* **459**, 270–273 (2009).

215. Winter, R. W. *et al.* Antimalarial quinolones: Synthesis, potency, and mechanistic studies. *Exp. Parasitol.* **118**, 487–497 (2008).
216. Salzer, W., Timmler, H. & Andersag, H. Über einen neuen, gegen Vogel malaria wirksamen Verbindungstypus. *Chem. Ber.* **81**, 12–19 (1948).
217. Nilsen, A. *et al.* Quinolone-3-Diarylethers: A New Class of Antimalarial Drug. *Sci. Transl. Med.* **5**, 177ra37-177ra37 (2013).
218. Da Cruz, F. P. *et al.* Drug screen targeted at plasmodium liver stages identifies a potent multistage antimalarial drug. *J. Infect. Dis.* **205**, 1278–1286 (2012).
219. Cowley, R. *et al.* The development of quinolone esters as novel antimalarial agents targeting the Plasmodium falciparum bc 1 protein complex. *Med. Chem. Commun.* **3**, 39–44 (2012).
220. Araújo, N. C. P. *et al.* Semi-synthetic and synthetic 1,2,4-trioxoquinones and 1,2,4-trioxoloquinones: synthesis, preliminary SAR and comparison with acridine endoperoxide conjugates. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **19**, 2038–2043 (2009).
221. O'Neill, P. M. *et al.* Diels-Alder/thiol-olefin co-oxygenation approach to antimalarials incorporating the 2,3-dioxabicyclo[3.3.1]nonane pharmacophore. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **16**, 2991–2995 (2006).
222. Lobo, L., de Sousa, B., Cabral, L., Cristiano, M. L. S. & Nogueira, F. Highly active ozonides selected against drug resistant malaria. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **111**, 450–453 (2016).
223. Verissimo, E. *et al.* Design and synthesis of novel 2-pyridone peptidomimetic falcipain 2/3 inhibitors. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **18**, 4210–4214 (2008).
224. Gibbons, P. *et al.* Endoperoxide carbonyl falcipain 2/3 inhibitor hybrids: Toward combination chemotherapy of malaria through a single chemical entity. *J. Med. Chem.* **53**, 8202–8206 (2010).
225. Horta, P. C. *et al.* Synthesis, structural and conformational analysis, and IR spectra of ethyl 4-chloro-7-iodoquinoline-3-carboxylate. *Tetrahedron* **71**, 7583–7592 (2015).
226. Horta, P. *et al.* On the ordeal of quinolone preparation via cyclisation of aryl-enamines; Synthesis and structure of ethyl 6-methyl-7-iodo-4-(3-iodo-4-methylphenoxy)-quinoline-3-carboxylate. *Pure Appl. Chem.* **89**, 765–780 (2017).
227. Horta, P. F. C. Design and synthesis of novel quinolones directed to the Plasmodium falciparum bc1 protein complex. (Universidade do Algarve, 2016).
228. Horta, P. *et al.* Quinolone-Hydroxyquinoline Tautomerism in Quinolone 3-Esters. Preserving the 4-Oxoquinoline Structure To Retain Antimalarial Activity. *J. Org. Chem.* **80**, 12244–12257 (2015).
229. Agrawal, A. & Tratnyek, P. G. Reduction of nitro aromatic compounds by zero-valent iron metal. *Environ. Sci. Technol.* **30**, 153–160 (1996).
230. Gould, R. G. & Jacobs, W. A. The Synthesis of Certain Substituted Quinolines and

- 5,6-Benzoquinolines. *J. Am. Chem. Soc.* **61**, 2890–2895 (1939).
231. Stadlbauer, W., Badawey, E.-S., Hojas, G., Roschger, P. & Kappe, T. Malonates in Cyclocondensation Reactions. *Molecules* **6**, 338–352 (2001).
232. Dorow, R. L. *et al.* Development of an Efficient Synthesis of the Pyrrolquinolone PHA-529311. *Org. Process Res. Dev.* **10**, 493–499 (2006).
233. Willard, A. K., Smith, R. L. & Cragoe, E. J. Potential diuretic-.beta.-adrenergic blocking agents: synthesis of 3-[2-[(1,1-dimethylethyl)amino]-1-hydroxyethyl]-1,4-dioxino[2,3-g]quinolines. *J. Org. Chem.* **46**, 3846–3852 (1981).
234. Alam, A. *et al.* Novel antimalarial drug targets: hope for new antimalarial drugs. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* **2**, 469–489 (2009).
235. Muregi, F. W., Wamakima, H. N. & Kimani, F. T. Novel drug targets in malaria parasite with potential to yield antimalarial drugs with long useful therapeutic lives. *Curr. Pharm. Des.* **18**, 3505–21 (2012).

7. Anexos

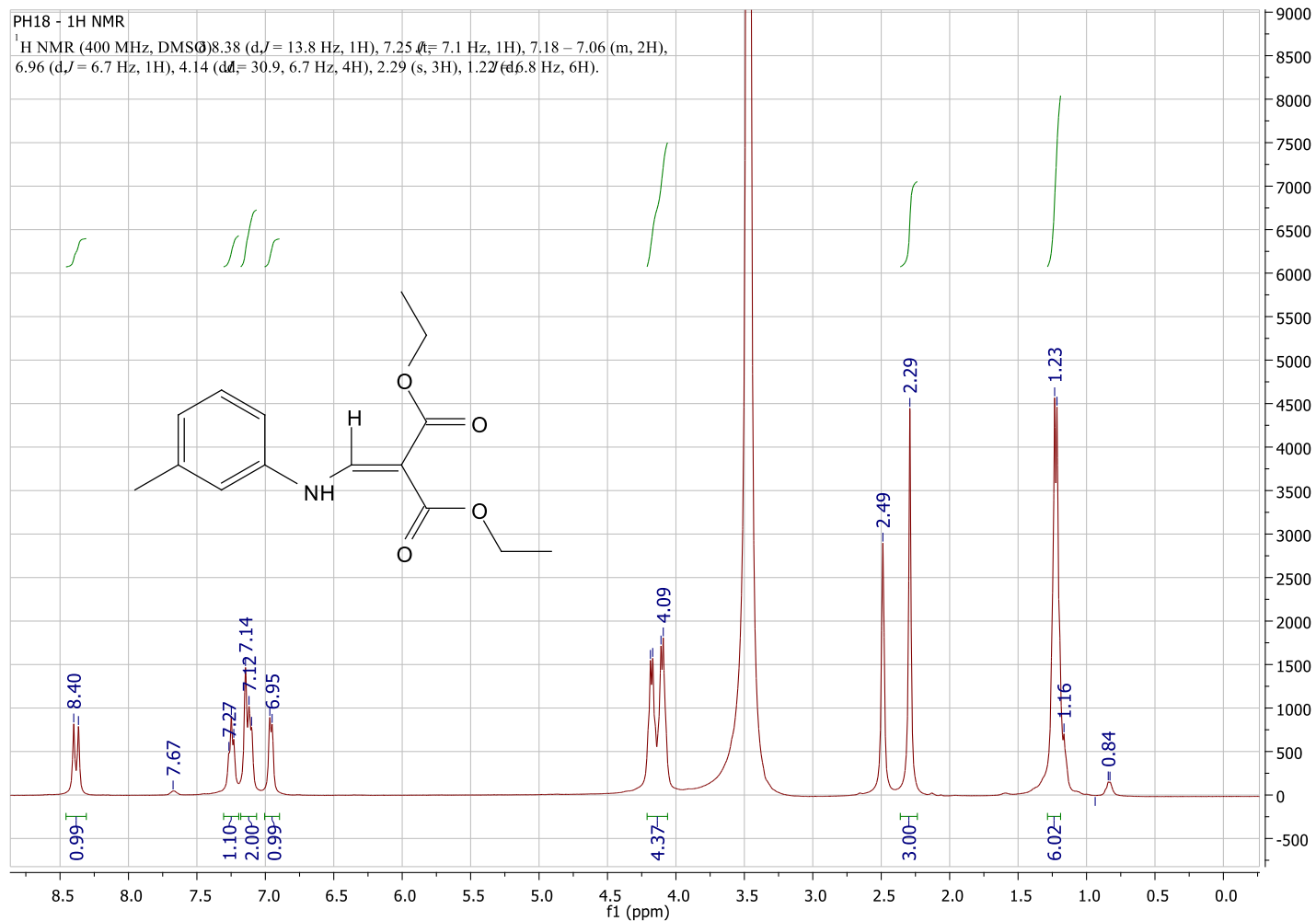


Figura 7-1 – Espectro de ¹H-RMN obtido para o composto (12)

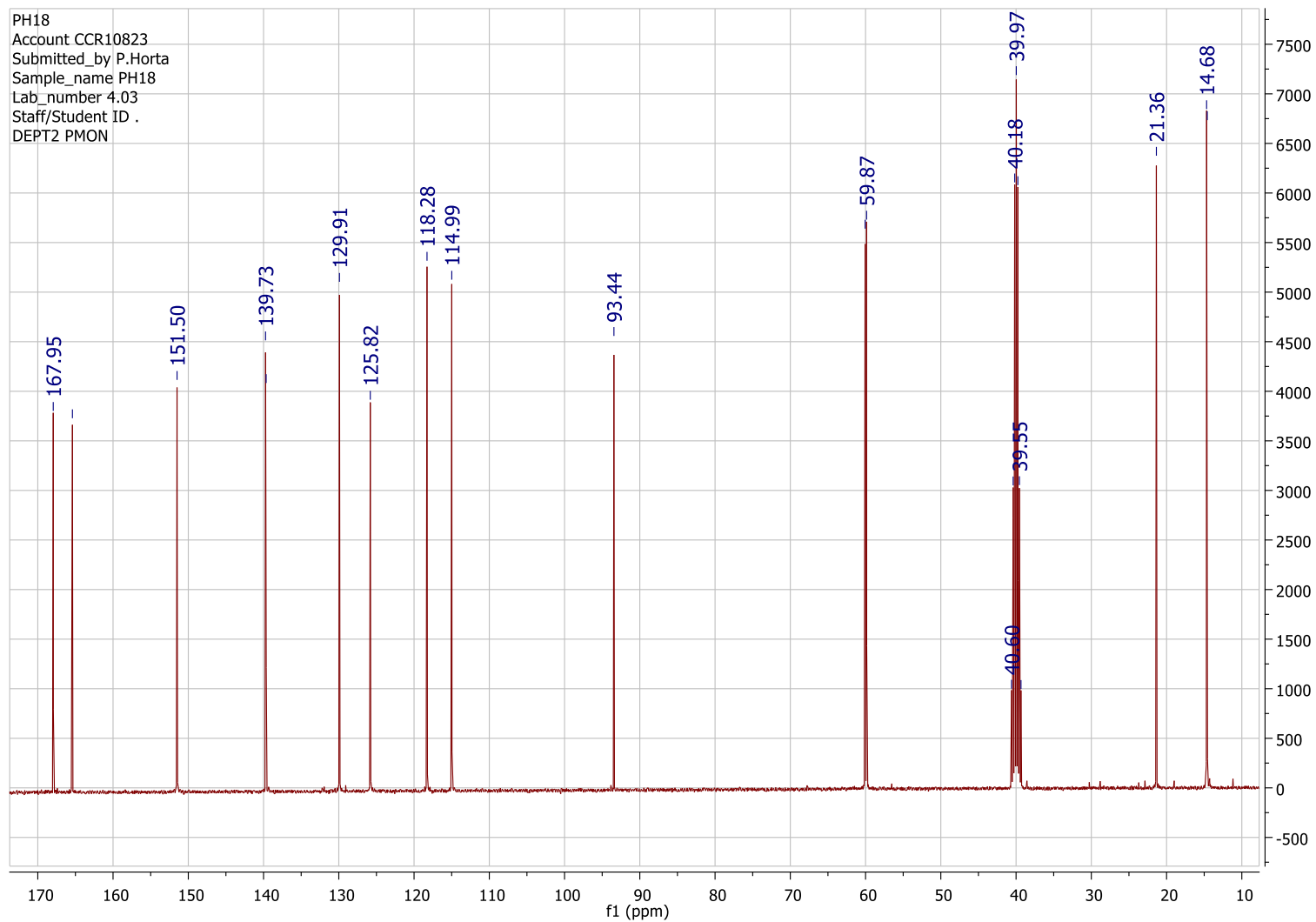


Figura 7-2 – Espectro de ^{13}C -RMN obtido do composto (12)

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

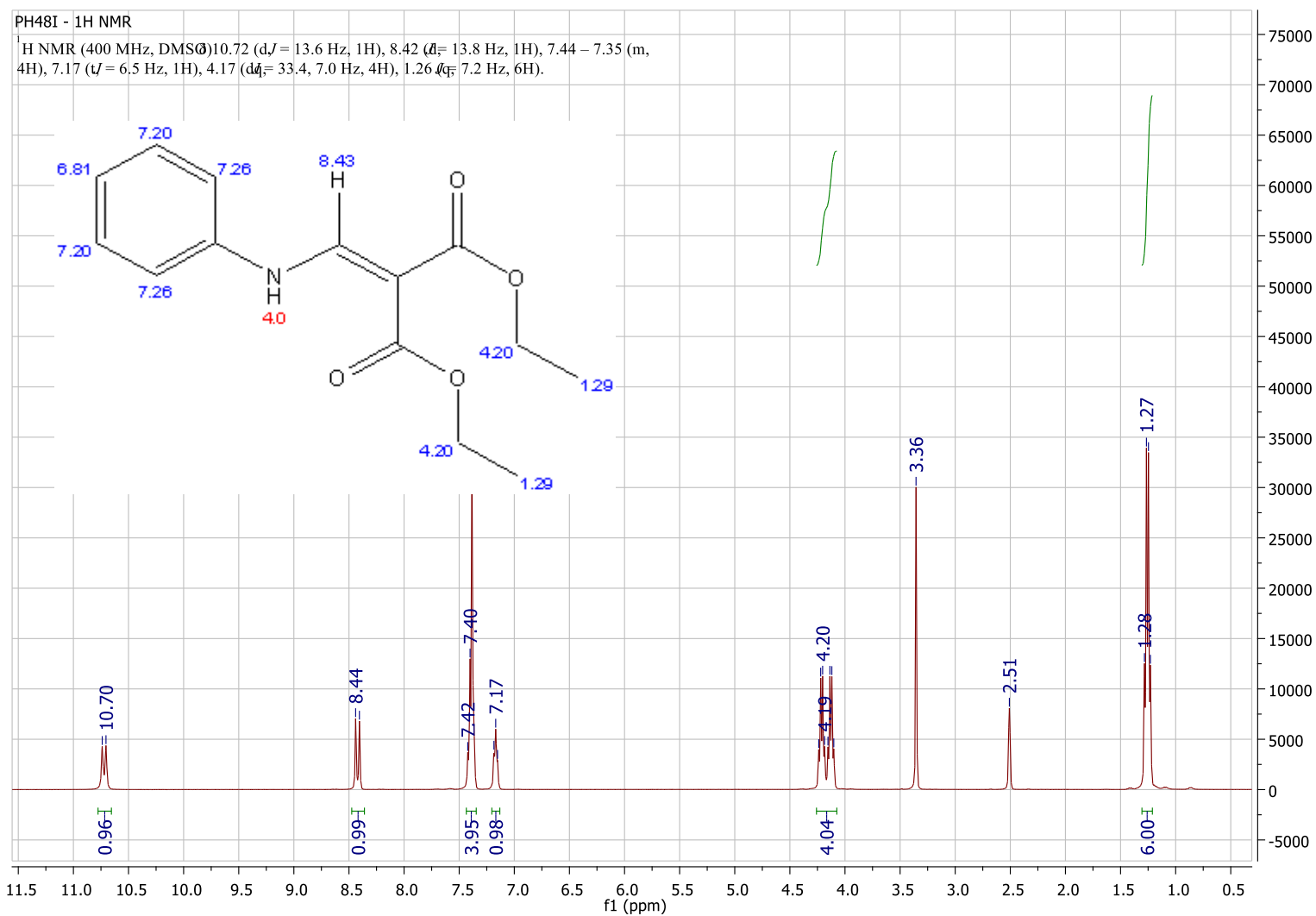


Figura 7-3 – Espectro de ¹H-RMN obtido para o composto (24)

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

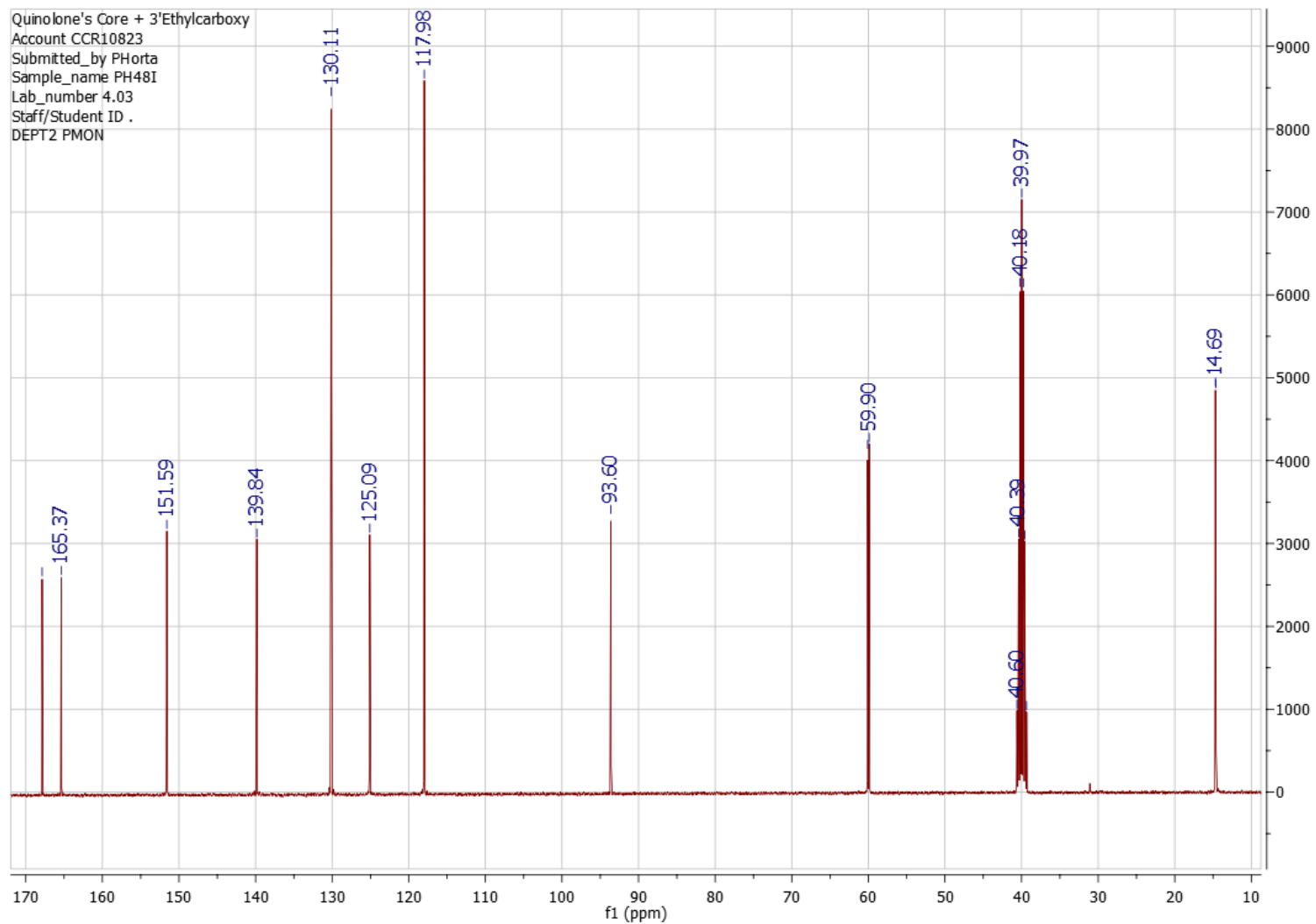


Figura 7-4 – Espectro de ¹³C-RMN obtido do composto (24)

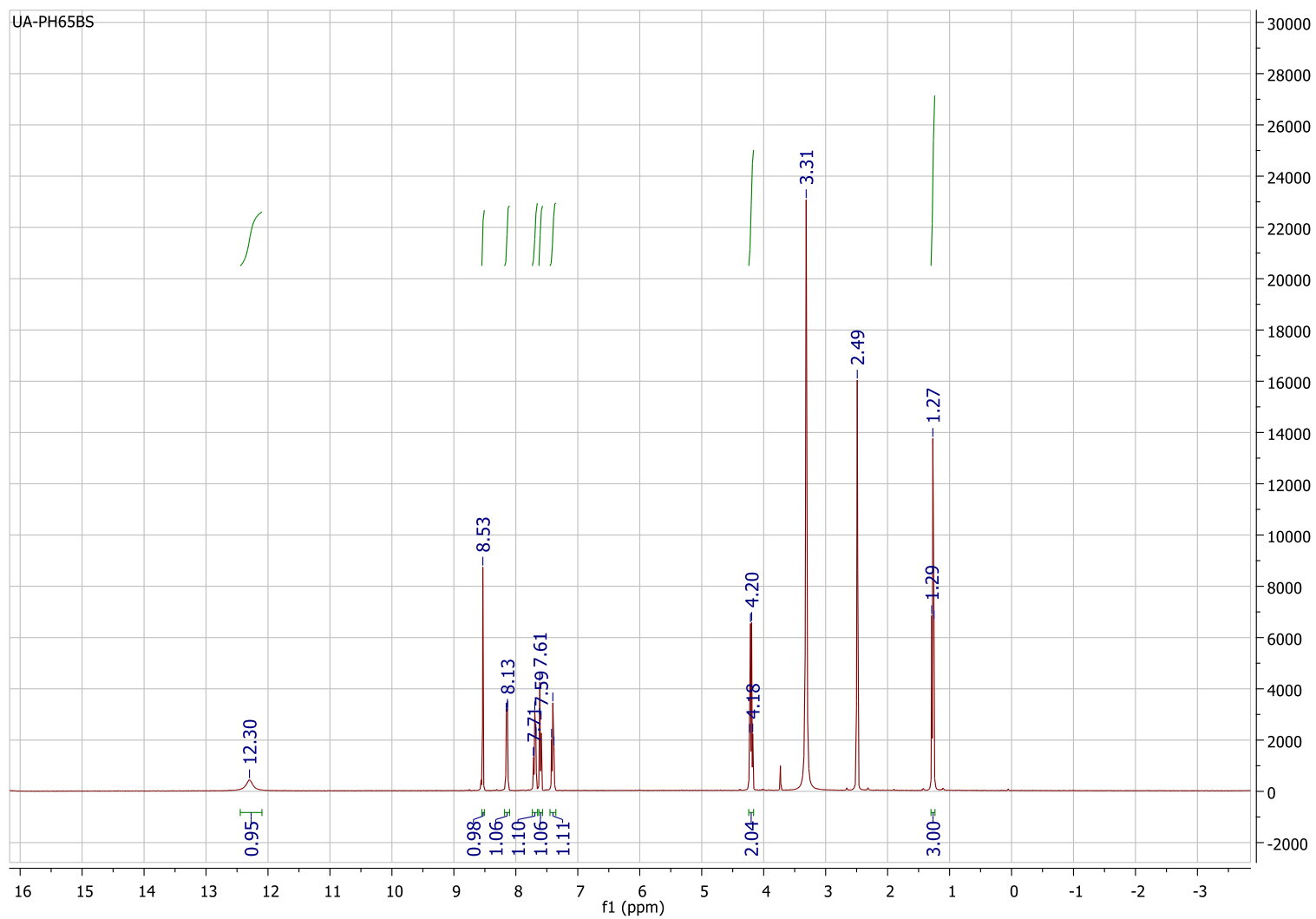


Figura 7-5 – Espectro de ¹H-RMN obtido para o composto (25)

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

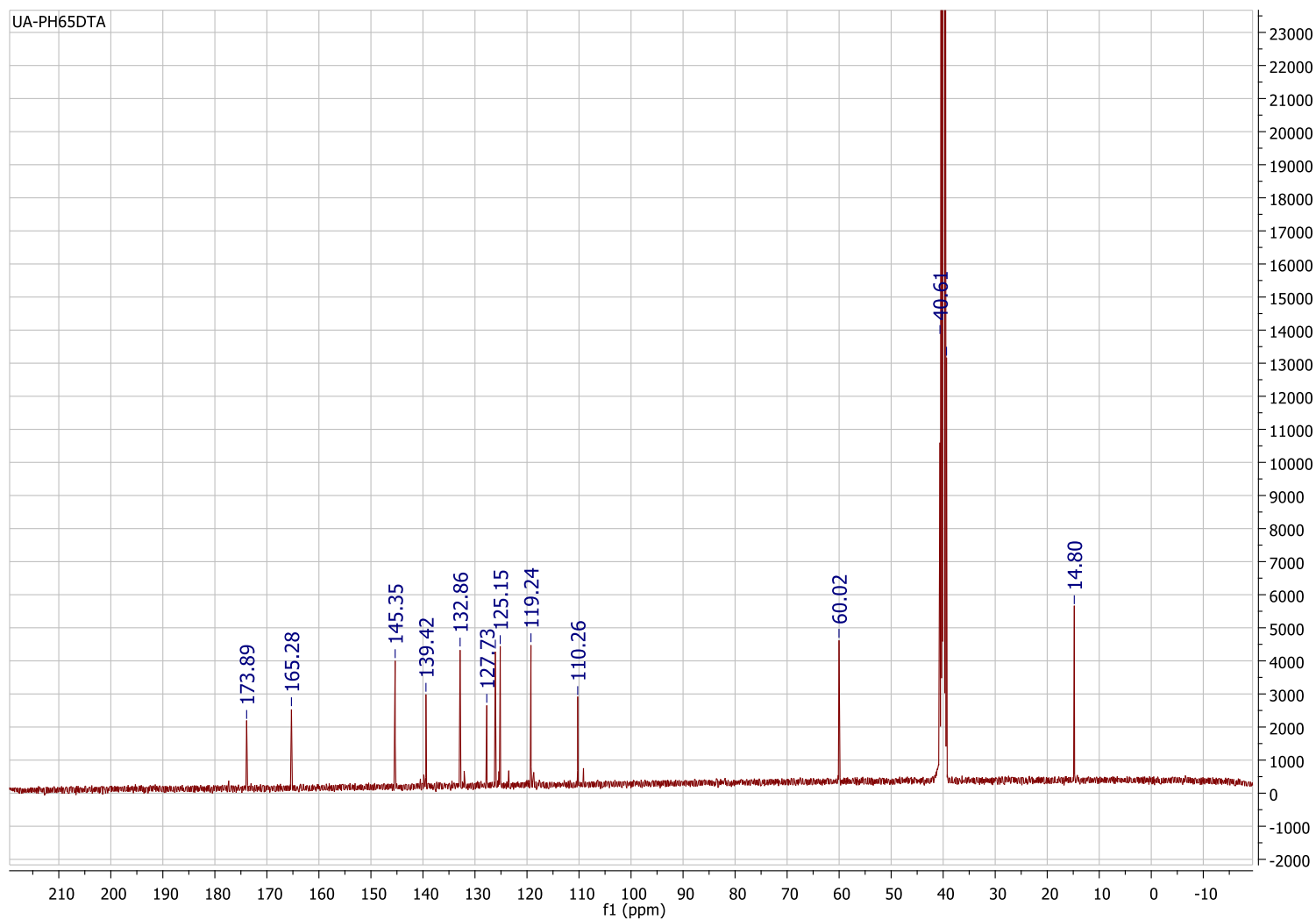


Figura 7-6 – Espectro de ^{13}C -RMN obtido do composto (25)

Malária: limitações das terapêuticas atuais, validação de novos alvos terapêuticos e descoberta de novos fármacos.

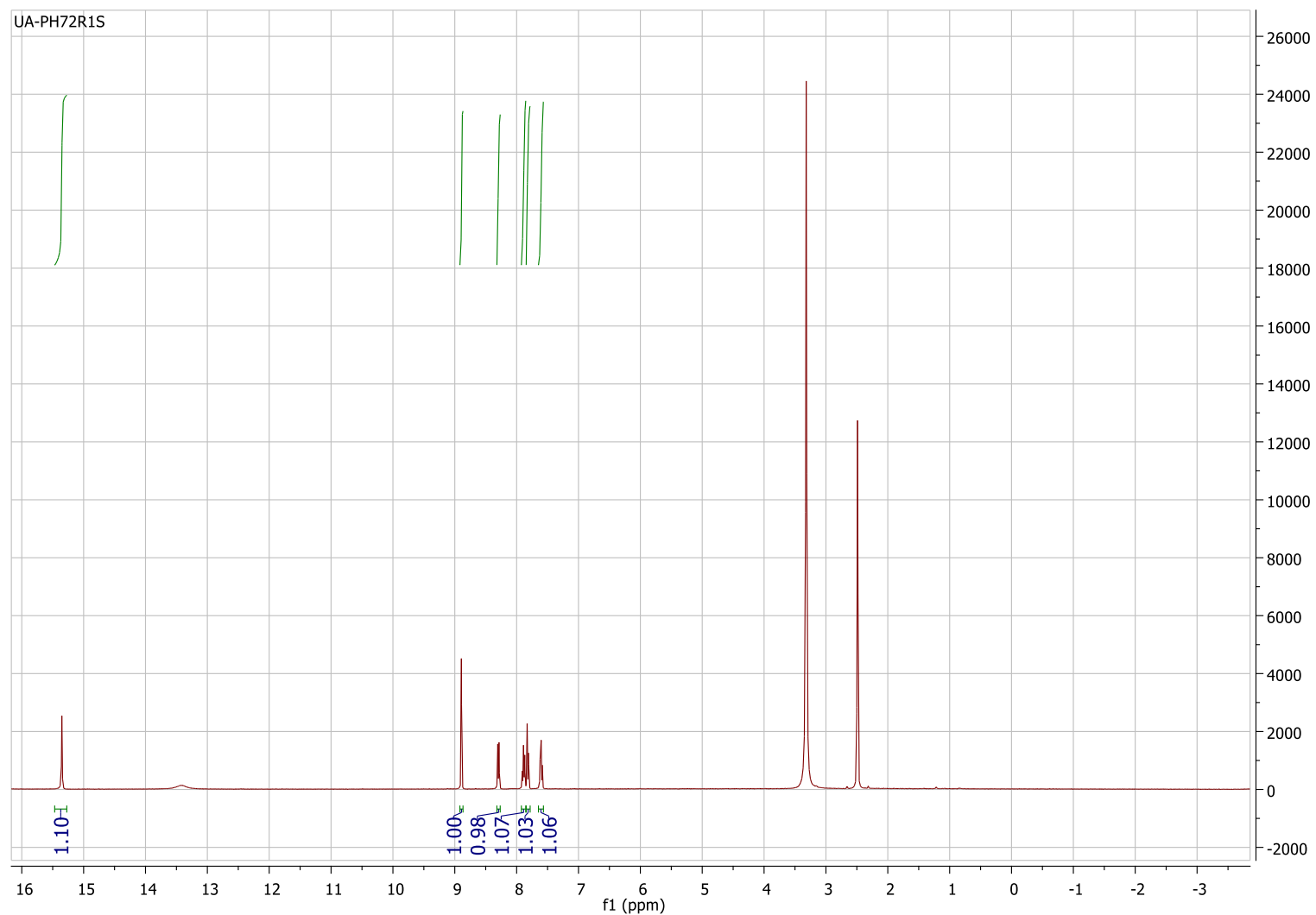


Figura 7-7 – Espectro de ¹H-RMN obtido para o composto (26)

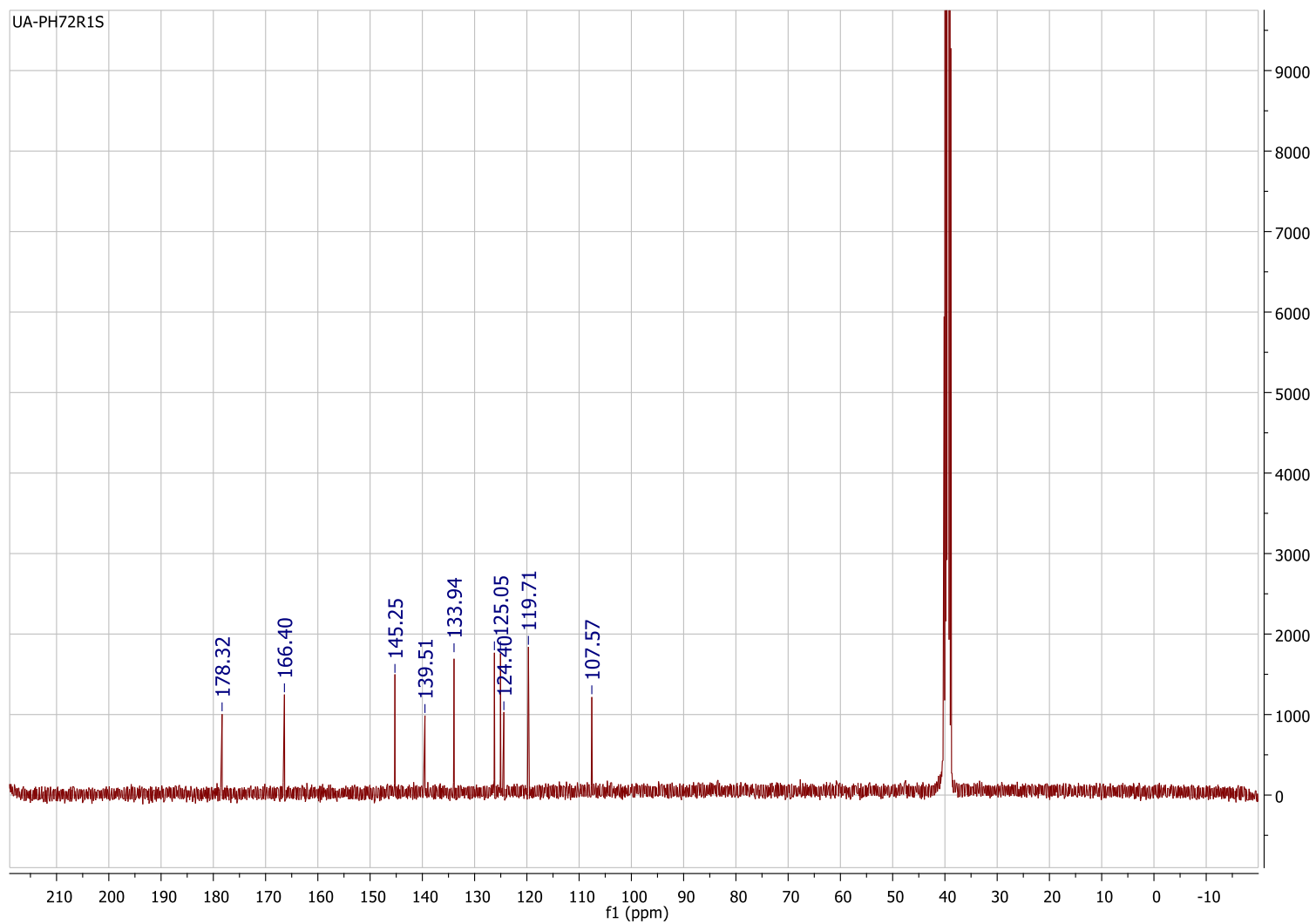


Figura 7-8 – Espectro de ¹³C-RMN obtido do composto (26)