

Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Endoperóxidos de origem marinha com actividade antimalária

Pedro José Mateus Charneca

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Junho de 2011

Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Endoperóxidos de origem marinha com actividade antimalária

Pedro José Mateus Charneca

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Dissertação orientada pela Professora Doutora Maria de Lurdes dos Santos Cristiano

Junho de 2011

Este trabalho é dedicado à minha mãe, aos meus avós e à minha namorada.

*A lesson without pain is meaningless, for you cannot gain something without sacrifice
something else in return.*

- Hiromu Arakawa

The brightest flame burns quickest.

- James Hetfield

Agradecimentos

Quero começar por agradecer à Professora Doutora Lurdes Cristiano por ter aceitado orientar esta dissertação, assim como pela sua amabilidade, ensinamentos e oportunidade de trabalhar no seu laboratório. Agradeço à Doutora Nuna Araújo por toda a sua disponibilidade, conhecimentos e boa disposição que me ofereceu ao longo destes últimos dois anos. Aos meus colegas de laboratório Amin, Lília e Andreia quero deixar um abraço.

Deixo aqui um forte e sentido abraço aos amigos que fiz na UAlg nestes últimos anos, os quais estiveram comigo nos bons e nos maus momentos. Caros amigos: Daniel, Bruno, Fábio, Marco, Joel, Tânia, Magali, Sofia, Bia, Jorge, Manuela, Cate, Tiago, Susana, Cocharro, Ruben, Ricardo, Tijolo, Carlos. Obrigado por tudo! Com vocês este caminho que escolhi na UAlg foi bem mais simples e aprendi que longe de casa conseguimos encontrar boas pessoas e sobretudo bons amigos. Obrigado por todas as tardes e noites de convívio, garagalhadas, estudo, boa disposição e amizade. Quero agradecer aos habitantes do 2º esquerdo por me terem recebido bem ao longo destes seis anos e pelos momentos de paródia.

Quero agradecer também aos meus amigos do Montijo, ao Zé “El Pepe” Miranda e à Nádia Nabóide pela vossa amizade incondicional. Obrigado por terem estado comigo, ainda que nem sempre ao pé de mim, todos estes anos.

À minha avó Mariana e ao meu avô Henrique quero agradecer toda a educação e carinho que me deram ao longo destes anos, assim como todo o incentivo que me transmitiram, sem vocês não seria quem sou hoje nem teria esta teimosia de querer dar sempre mais um passo em frente. À minha mãe Fátima agradeço a ternura, a motivação e os valores que me deu.

O meu agradecimento final é dedicado à minha namorada Marlene. Desde que ambos descemos até ao Algarve sempre nos apoiamos em todas as circunstâncias e, com ela vivo a maior aventura da minha vida. Obrigado por todo o teu amor Marlene e, ainda bem que começamos a estudar juntos naquela tarde!

Resumo

A Malária é uma doença tropical infecciosa que dizima milhares de pessoas todos os anos, causada por parasitas do género *Plasmodium*. Sendo uma doença que afecta sobretudo países sub-desenvolvidos, é de vital importância a descoberta de novos fármacos que sejam eficazes, administráveis por toma oral e com baixo custos de produção.

Desde o século XVII que o mundo ocidental conhece o quinino (extraído da casca da Chinchona), tendo este sido o primeiro fármaco a ser utilizado com sucesso pelo mundo ocidental no tratamento da Malária. Com a evolução dos meios de síntese química e elucidação estrutural, a sua estrutura foi estudada e serviu de modelo a uma série de novos fármacos anti-maláricos. Contudo, com o passar do tempo várias espécies do parasita sofreram alterações evolutivas que permitiram o aparecimento de estirpes resistentes, sobretudo na espécie *Plasmodium falciparum*, responsável pela maioria dos casos de morte por Malária, que desenvolveu uma série de resistências aos fármacos utilizados no tratamento da doença. No início dos anos 80 do séc. XX foi descoberta a artemisinina, isolada da planta *Artemisia annua*, a qual representa um marco importante para o combate a esta doença. Depois de a sua estrutura ter sido elucidada e o farmacóforo (o grupo 1,2,4-trioxano) identificado, foi possível o desenvolvimento de uma nova classe de fármacos antimaláricos. Mesmo sendo uma solução muito promissora, a artemisinina apresentava algumas limitações, sendo as mais relevantes a sua baixa solubilidade em água e óleo, baixa biodisponibilidade oral e alguma toxicidade. Com o objectivo de melhorar o seu perfil farmacocinético foram sintetizados derivados semi-sintéticos como o artemeter, arteter e artesunato, os quais possibilitaram um conjunto de novos tratamentos contra a Malária que obtiveram resultados favoráveis em mais de 60 países ao longo do globo, sobretudo em estirpes multi-resistentes do parasita. As terapias combinadas baseadas em Artemisinina (ACT), são hoje a solução possível para casos que envolvam Malária cerebral.

Actualmente as soluções quimioterapêuticas para tratamento da Malária apresentam limitações resultantes do número emergente de resistências à

artemisinina encontradas no *Plasmodium* que surgiram na fronteira entre a Tailândia e Cambodja, uma região do globo onde a Malária é endêmica. Deste modo, a investigação de novas moléculas com actividade antiplasmodial focou-se na produção de derivados totalmente sintéticos, obtidos a baixo custo e que continham grupos funcionais semelhantes ao farmacóforo da artemisinina. Assim, foram desenvolvidos os 1,2,4-trioxolanos e os 1,2,4,5-tetraoxanos, que possuem maior actividade farmacológica do que a artemisinina e possibilitam administração oral. Recentemente a investigação parece estar focada nos 1,2,4,5-tetroxanos, dada a sua maior estabilidade metabólica e actividade farmacológica face aos 1,2,4-trioxolanos.

Neste trabalho serão abordados os fármacos usados na quimioterapia da Malária, dando ênfase à descoberta de compostos de origem marinha com potencial anti-malárico. Como é do conhecimento global, o mundo marinho é pródigo na abundância de compostos com actividade contra várias patologias. Recentemente foram identificados em esponjas marinhas compostos com a função 1,2-dioxano, os quais prometem ser uma fonte promissora de novos modelos quimioterapêuticos no combate à Malária. Já foram identificados e estudados quatro novos tipos de 1,2-dioxanos promissores: os *plakortins*, os ácidos peroxiplakortínicos, as sigmosceptrelinas e dois compostos norditerpénicos. Estes compostos possuem estruturas químicas muito simples e passíveis de serem recriadas por meios sintéticos baratos, pelo que podem representar no futuro uma nova família de fármacos antimaláricos, que podem ser administrados de *per si* ou em terapias combinadas. Existe ainda a possibilidade de obter estes compostos por meios biotecnológicos, o que torna a sua produção economicamente mais vantajosa.

A descoberta e investigação destas novas classes de pequenas moléculas irá representar seguramente uma nova alternativa terapêutica para tratar aquela que é uma das doenças parasitárias mais perigosas e mais preocupantes da actualidade.

Palavras-chave: Malária, *P. falciparum*; artemisinina; 1,2-dioxanos; endoperóxidos; trioxanos; trioxolanos; resistência.

Abstract

Malaria is an infectious tropical disease caused by the protozoal *Plasmodia* parasites that kills thousands of people every year. This disease affects mostly underdeveloped countries, and therefore the discovery of new effective drugs that are amenable for oral administration and with low production costs emerges as a priority.

Since the XVII century that the eastern world knows quinine (extracted from Chinchona bark), the first successful drug for malaria treatment. With the evolution of synthetic and structural chemistry, quinine's structure was studied and served as model for new antimalarial drugs. However the parasite has begun to suffer evolutive changes that led to the emergence of resistant strains, especially with *Plasmodium falciparum* which developed resistance to almost classic antimalarial drugs. In the early 80's of the last century, artemisinin was isolated from the plant *Artemisia annua*, used for centuries by traditional Chinese medicine to treat malaria fevers. The discovery of Artemisinin was a landmark in malaria chemotherapy and provided an effective solution for the treatment of severe cases of falciparum malaria. It was established that the pharmacophore in artemisinin is the 1,2,4-trioxane structure and, since then, the design and synthesis of peroxides with potential antimalarial activity but with improved pharmacological properties has been the subject of intense research. In fact, artemisinin had some limitations, such as low water solubility, low oral bioavailability and some toxicity. Some semi-synthetic derivatives with improved pharmacokinetic profile such as artemether, artheter and artesunate are used in more than 60 countries across the world, especially on multi-resistant strains of the parasite, as part of Artemisinin-based combination therapy (ACT) protocols.

In recent days, the emergence of resistances to artemisinin-derived drugs found in some parasite strains between the frontier of Thailand and Cambodia, a region where malaria is endemic and a hot spot for emergence of resistance to drugs, has put additional pressure on WHO and medicinal chemists, who are committed to search for new solutions. So far, one of the leads in this investigation is the development of cheap and totally synthetic peroxide molecules, and 1,2,4-trioxolanes and 1,2,4,5-tetraoxanes have emerged as having improved pharmacological properties

when compared to artemisinin and enable oral administration. 1,2,4,5-Tetraoxanes are so far the most promising candidates, due to their excellent metabolic stability and potency, compared to the 1,2,4-trioxanes.

The prodigal abundance of marine compounds with pharmacological activity is a common knowledge for pharmaceutical industry. Therefore, this thesis deals with drugs used in malaria chemotherapy, emphasizing the discovery of compounds of marine origin with potential antimalarial activity. Recently, compounds with the 1,2-dioxane functional group that are promising new therapeutic models in the fight against malaria were identified in marine sponges. These molecules, known as plakortins, peroxyplakortinic acids, sigmosceptrelins and norditerpenic antimalarials have a simple chemical structure and are therefore amenable of being approached by cheap synthetic methods, representing new antimalarial leads for use in monotherapy or in association with other drugs as part of combination therapy protocols. The possibility of obtaining these 1,2-dioxanes through biotechnological techniques is also being investigated and represents another advantage.

Key words: Malaria, *P. falciparum*; artemisinin; 1,2-dioxanes; endoperoxides; trioxanes; trioxolanes; resistance.

Índice

1. Malária: endemismo e mortalidade	Pág.1
2. Metabolismo do <i>Plasmodium</i>	Pág.2
3. Estratégias de terapêuticas antimaláricas e a sua evolução ao longo do tempo	Pág.4
4. Artemisinina e seus derivados	Pág.7
5. Peróxidos sintéticos: 1,2,4-trioxanos; 1,2,4-trioxolanos e 1,2,4,5-tetraoxanos	Pág.15
6. 1,2,4-Trioxolanos.....	Pág.16
7. 1,2,4,5-Tetraoxanos.....	Pág.21
8. 1,2-Dioxanos de origem vegetal com actividade antimalárica.....	Pág.25
9. 1,2-Dioxanos de origem animal com actividade antimalárica	Pág.26
9.1. <i>Plakortin</i> e os seus derivados	Pág.26
9.2. Síntese do 1,2-dioxanos análogos ao PLK	Pág.29
9.3. Ácidos Peroxiplakortínicos.....	Pág.32
9.4. 1,2-Dioxanos com estrutura terpenóide	Pág.36
9.5. Norsesterpenos - Sigmosceptrelina	Pág.36
9.6. Norditerpenos.....	Pág.38
10. Emergência e importância dos compostos de origem marinha	Pág.42
11. Conclusão	Pág.43
12. Bibliografia	Pág.45

Índice de Imagens

1. Representação esquemática do ciclo de vida do parasita *Plasmodium*, no vector e no hospedeiroPág.1
2. Imagem obtida através de microscopia óptica de um parasita *Plasmodium falciparum*, corado com Giemsa (esquerda). Fotografia de um mosquito fêmea do género *Anopheles* (direita)Pág.3
3. Estrutura do quinino.....Pág.4
4. Estrutura de alguns fármacos antimaláricosPág.5
5. Estrutura de alguns fármacos antimaláricosPág.6
6. Estrutura da artemisininaPág.7
7. Alguns derivados importantes da artemisininaPág.8
8. Representação esquemática do modelo de cisão redutivaPág.9
9. Representação esquemática do modelo do peróxido abertoPág.10
10. Estrutura do artesunatoPág.11
11. Núcleo 1,2,4-trioxolanoPág.16
12. Representação esquemática da activação dos trioxolanos por Fe(II)Pág.17
13. Estrutura do trioxolano OZ277 (Arterolano)Pág.19
14. Estrutura do OZ439Pág.19
15. Núcleo 1,2,4,5-tetraoxanoPág.21
16. Estrutura do tetraoxano RKA 182Pág.22
17. Representação do mecanismo de bioactivação dos tetraoxanos e detecção de espécies radicalares, através da utilização de TEMPO.....Pág.24
18. Estruturas do Yingzhaosu A (esquerda) e do artefleno.....Pág.25
19. *Plakortis simplex*.....Pág.26
20. Representação estrutural do PLK (1), DHPLK (2) e do seu farmacóforoPág.26
21. Descrição representativa do farmacóforo do PLKPág.27

22. Mecanismo proposto para a formação da cadeia lateral tóxica para o <i>Plasmodium</i> , a partir do DHPLK	Pág.28
23. Reacção de Condensação de Knoevenagel modificada (em cima). Reacção de foto-oxigenação (em baixo)	Pág.29
24. Representação esquemática dos processos sintéticos utilizados na obtenção dos análogos do PLK	Pág.30
25. Estrutura dos ácidos peroxiplakortínicos A ₃ e B ₃	Pág.32
26. Mecanismo de acção postulado para os ácidos peroxiplakortínico	Pág.33
27. Estrutura do derivado sem cadeia lateral longa	Pág.33
28. Estrutura do Condrilino	Pág.34
29. Esquema da estratégia de síntese seguida para os derivados sintéticos dos ácidos peroxiplakortínicos e tabela com abreviaturas. Os compostos foram designados neste trabalho como N4 (quando n=4) e N8 (quando n=8)	Pág.35
30. Imagem de uma esponja do género <i>Diacarnus</i> de onde são isolados endoperóxidos com actividade antimalárica: <i>D. erythraeanus</i>	Pág.36
31. Estrutura da sigmosceptrelina. Esta imagem retrata a diferença estereoquímica existente entre os dois epímeros	Pág.37
32. Estruturas dos compostos norditerpénicos extraídos da esponja <i>D.levii</i>	Pág.38
33. Estrutura do epinuapapuanoato de 3-metilo	Pág.40

Índice de Tabelas

- I. Terapêuticas Combinadas de ArtemisininaPág.12
- II. Comparação da eficácia *in vivo* do arterolano com o trioxolano OZ439, em ratinhos infectados com *P. berghei*.....Pág.20
- III. Actividade biológica dos análogos do PLK (5-14) contra as estirpes D10 (CQR) e W2 (CQS) de *P.falciparum*.....Pág.30
- IV. Citotoxicidade dos compostos norditerpénicos contra células de *P. falciparum* de estirpes CQS e CQR e contra várias linhas de células tumorais (IC₅₀ µM).....Pág.39

Abreviaturas

ACT – Artemisinin-based combination therapy (Terapia Combinada de Artemisinina)

AE – Arteter

AM – Arteméter

AM + LM – Arteméter e Lumefantrina

ART – Artemisinina

AS – Artesunato

AS + AQ – Artesunato + Amodiaquina

AS + PRD – Artesunato e Pironaridina

AS + MQ – Artesunato e Mefloquina

AS + SP – Artesunato e Sulfadoxina com Pirimetamina

CQS – Chloroquine sensitive stripes (estirpes sensíveis à Cloroquina)

CQR – Chloroquine resistant stripes (estirpes resistentes à Cloroquina)

DHA – Dihidroartemisinina

DHA + PPQ – Dihidroartemisinina e Piperaquina

DHPLK – *Dihydroplakortin*

ED₅₀ – Dose de um fármaco que produz uma resposta terapêutica em 50% da população

ED₉₀ – Dose de um fármaco que produz uma resposta terapêutica em 90% da população

IC₅₀ – Concentração necessária para obter 50% do efeito inibitório de um fármaco

IV – Via Intravenosa (via de administração de fármacos)

IM – Via Intramuscular (via de administração de fármacos)

OMS – Organização Mundial de Saúde

PLK – *Plakortin* (1,2-dioxano extraído da esponja *Plakortis simplex*)

PfEMP1 – *Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1*

ROS – Reactive Oxygen Species (Espécies Reactivas de Oxigénio)

1. Malária: endemismo e mortalidade

A Malária é uma doença infecciosa causada pelo parasita protozoário *Plasmodium*, sendo endêmica em regiões tropicais africanas, asiáticas e sul-americanas. A Malária provocou 863.000 mortes a nível mundial em 2008. ^[1] Existem quatro espécies de parasita capazes de infectar o ser humano: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*. A primeira espécie é responsável pelo maior número de infecções letais em humanos pois é a que apresenta maior resistência selectiva a fármacos anti-maláricos. A malária é transmitida através de um vector animal, a fêmea do mosquito do género *Anopheles*, que introduz o parasita na circulação sanguínea quando se alimenta de sangue humano (figura 1). O *Plasmodium* entra na corrente sanguínea sob a forma de esporozoítos, de onde parte para o fígado do hospedeiro onde irá infectar os hepatócitos, passando os esporozoítos a designar-se por trofozoítos. Esta é a fase exoeritrocitária do ciclo de vida do parasita, em que os trofozoítos se multiplicam assexuadamente num intervalo compreendido entre seis a quinze dias, diferenciando-se finalmente em merozoítos, sendo de salientar que esta fase é assintomática. Estes merozoítos diferenciados irão romper a membrana celular dos hepatócitos e neste processo ficam envolvidos em pedaços desta, o que lhes permite escapar ao sistema imunitário do hospedeiro, pelo que assim invadem livremente as hemácias iniciando o seu ciclo de vida endoeritrocitário. Nas hemácias (novamente sob a forma de trofozoítos) o parasita alimenta-se da hemoglobina existente nestas células, provocando hemólise como consequência da sua alimentação. Devido à hemólise que está a sofrer, o hospedeiro passará assim a apresentar os primeiros sintomas de Malária: febre, arrepios, enxaquecas e vómitos. No caso da infecção por *Plasmodium falciparum*, se o paciente não for tratado

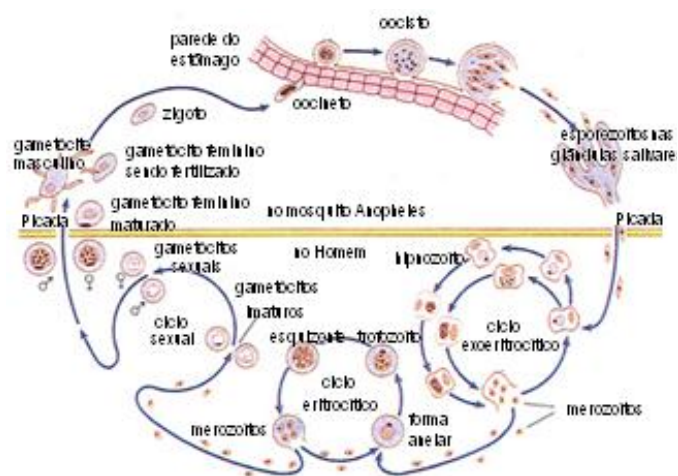


Figura 1. Representação esquemática do ciclo de vida do parasita *Plasmodium*, no vector e no hospedeiro. ^[2]

dentro de 24 horas após os primeiros sintomas, poderá morrer por anemia extrema (devido à hemólise), deficiência respiratória devida à acidose metabólica e danos cerebrais. De modo a completar o ciclo de vida do parasita, este tem de entrar novamente no vector, e para tal é necessário que o hospedeiro seja novamente picado, o que permite a passagem dos gametócitos (diferenciados a partir de merozoítos) para um novo mosquito vector. Após a entrada num novo vector os dois gametócitos vão reproduzir-se sexuadamente, formando um zigoto e posterior oocisto. Este oocisto irá diferenciar-se em novos esporozoítos, os quais penetram as paredes do estômago do mosquito e percorrem o seu tracto gastro-intestinal até às glândulas salivares do vector, onde se alojam por fim. Deste modo ficam disponíveis para infectar um novo hospedeiro humano e propagar-se novamente. Assim, o Homem funciona como um segundo vector na transmissão da doença pois um mosquito não infectado irá pica-lo, continuando assim a propagação da infecção. ^[3,4]

2. Metabolismo do *Plasmodium*

Quando se encontra dentro das hemácias sob a forma de trofozoíto, o parasita começa a alimentar-se da hemoglobina do hospedeiro. Este processo ocorre no interior do seu vacúolo de alimentação, o qual possui um meio ácido que lhe permite degradar a hemoglobina presente nas hemácias (grupo *heme*). A degradação da hemoglobina origina hematina que é um metabolito tóxico, quer para o parasita quer para o hospedeiro. A toxicidade da hematina deve-se ao facto de ser um pró-oxidante que induz a formação de ROS e de ter capacidade para danificar directamente as membranas e organelos celulares do parasita, provocando a lise do parasita protozoário. De modo a sobreviver à toxicidade da hematina o parasita polimeriza-a em cristais de hemazoina, um produto secundário que se deposita no interior das hemácias. A hemazoina não afecta o parasita e constitui uma prova hematológica da infecção. ^[4]

Como já foi referido neste trabalho, a infecção por *P.falciparum* é a forma mais severa de malária uma vez que esta espécie tem a capacidade de modificar proteínas de membrana das hemácias infectadas pelos merozoítos. Estas proteínas de membrana com função alterada irão provocar a adesão das hemácias às paredes dos vasos sanguíneos de baixo calibre, impedindo conseqüentemente a microcirculação. Este processo é designado por citoaderência e provoca a disfunção de vários órgãos, sobretudo nos casos de malária cerebral onde se verifica a afecção directa do cérebro. A citoadesão é um factor determinante para a resistência do *P.falciparum*, pois ao impedir que as hemácias percorram a corrente sanguínea de um modo natural, evita a sua entrada no baço e a conseqüente destruição das hemácias neste órgão. Assim, o parasita escapa de um modo eficaz ao sistema imunitário do hospedeiro. ^[5,6]

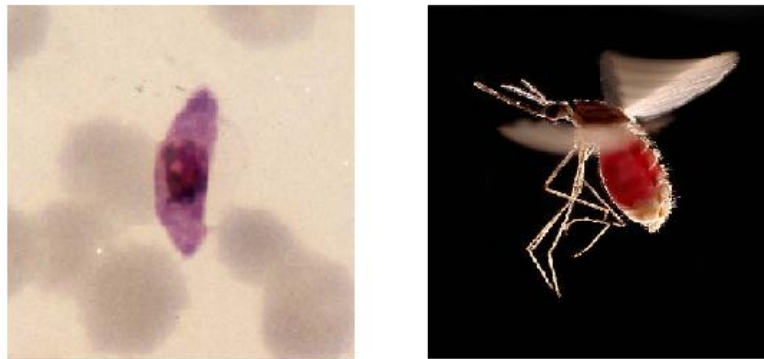


Figura 2. Imagem obtida através de microscopia óptica de um parasita *Plasmodium falciparum*, corado com Giemsa (esquerda). ^[7]

Fotografia de um mosquito fêmea do género *Anopheles* (direita). ^[8]

Algumas das resistências apresentadas pelo *P. Falciparum* são igualmente devidas às mutações apresentadas no seu genoma, nomeadamente nos genes que codificam a expressão das proteínas afectantes das proteínas de membrana das hemácias e promotoras da citoadesão, sendo as mais importantes para este processo as PfEMP1 (*Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1). Estas proteínas são um péssimo alvo para as células imunitárias do hospedeiro, dado que possuem uma grande diversidade de isoformas, as quais são expressas de um modo diferente pelo parasita ao longo do tempo de infecção o que dificulta a resposta imunitária do hospedeiro. ^[5,6]

3. Estratégias de terapêuticas antimaláricas e a sua evolução ao longo do tempo

O primeiro fármaco a ser utilizado com eficácia no tratamento da Malária pelo mundo ocidental foi o quinino, um sesquiterpeno natural produzido pelas árvores de Chinchona. A sua primeira utilização remonta ao século XVII, tendo sido este composto preterido em detrimento da cloroquina (um composto sintético), a partir de 1940, pelo que nos dias de hoje a sua utilização é rara. A profilaxia é a primeira linha no combate à Malária, pelo que a prevenção preferencial deve ser feita por meios não farmacológicos, através do controlo do vector com insecticidas ou pela utilização de protecções físicas (redes mosquiteiras). A quimioprofilaxia da doença é também de extrema importância, sobretudo quando existe a deslocação para uma zona onde a Malária é endémica, sendo esta terapêutica geralmente iniciada uma semana antes da viagem. Os fármacos mais utilizados na quimioprofilaxia da Malária são a cloroquina ou mefloquina, doxiciclina (um antibiótico da classe das tetraciclina), formulações combinadas de atovaquona e proguanilo (*Malarone*®) e dos antimetabolitos pirimetamina e sulfadoxina. A atovaquona possui uma acção sinérgica com o proguanilo e não apresenta qualquer forma de interacção cruzada com outros fármacos antimaláricos.^[9,10]

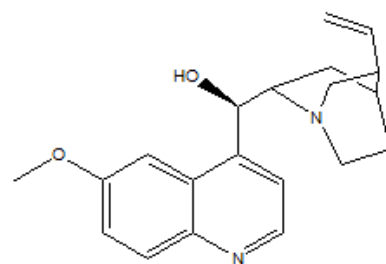


Figura 3. Estrutura do quinino.

A cloroquina foi desde a sua descoberta o medicamento de eleição no tratamento da malária. Contudo, após a segunda metade do século passado apareceram estirpes de *P. falciparum* com resistência à cloroquina em todo o globo, existindo actualmente um grande número de estirpes resistentes à cloroquina (CQR). Estes parasitas conseguiam expulsar rapidamente o fármaco do seu vacúolo alimentar antes que este conseguisse actuar farmacologicamente. Assim, a cloroquina foi preterida em favor da mefloquina, que é actualmente o fármaco de eleição no tratamento e profilaxia da malária causada por *P. falciparum*. A cloroquina continua a ser o fármaco de primeira escolha, em conjunto com a hidroxicloroquina, para o tratamento de infecções causadas por *P. vivax* e em alguns casos por *P. ovale*. Porém, já foi registado o aparecimento de estirpes de *P. vivax* resistentes à cloroquina. A

halofantrina é um fármaco que pode ser utilizado no tratamento de estirpes resistentes à cloroquina mas apenas como tratamento, uma vez que apresenta efeitos cardiotoxicos adversos que impossibilitam o seu uso em profilaxia. Após um doente ser tratado com cloroquina, deverá ser-lhe administrada primaquina ou proguanilo para prevenir recidivas, uma vez que estes são dois dos poucos fármacos que actuam na fase exoeritrocitária do parasita. A primaquina é um fármaco com características extremamente oxidantes, pelo que não deve ser utilizada em doentes que não expressem a enzima glucose-6-fosfato desidrogenase.^[11,12]

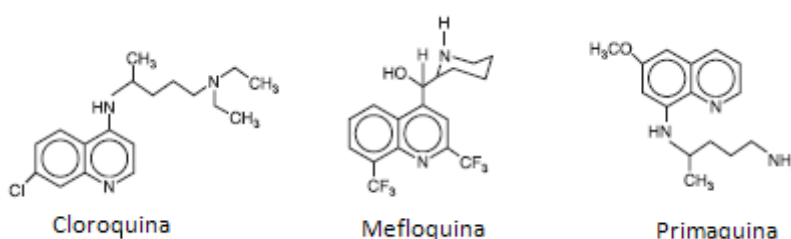


Figura 4. Estrutura de alguns fármacos antimaláricos.^[13]

Actualmente a mefloquina constitui uma opção terapêutica de primeira linha para o tratamento e profilaxia de Malária causada por *P. falciparum* e da malária em geral, sendo dispensada activamente em farmácia comunitária, mas o crescente número de resistências causadas pelo parasita e a elevada capacidade infecciosa que esta espécie de *Plasmodium* possui, condicionou a investigação de novas substâncias activas contra este protozoário, pelo que foram procuradas novas moléculas com origem em produtos vegetais. É possível afirmar que o isolamento e caracterização da artemisina (ART) em 1972 e o posterior desenvolvimento dos seus derivados foi o marco recente mais importante para o aparecimento de novas terapêuticas contra a Malária. Estes compostos, ao mesmo tempo que foram lentamente introduzidos no mercado farmacêutico, hospitais, e mais recentemente nas próprias farmácias comunitárias, foram responsáveis pela síntese e estudo de uma nova geração de moléculas de estrutura simples e economicamente mais acessíveis: os trioxanos e os tetraoxanos. É de enfatizar que a malária é uma patologia que vitima milhares de vidas

nos nossos dias, em países sub-desenvolvidos, pelo que é necessária uma solução farmacológica barata e eficaz para eliminar o parasita.

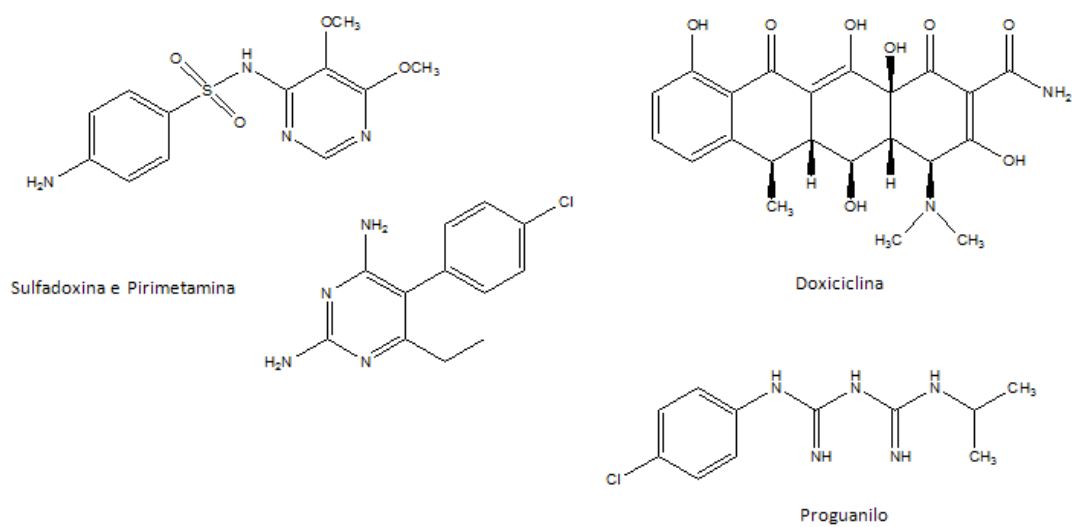


Figura 5. Estruturas de alguns fármacos antimaláricos.

4. Artemisinina e seus derivados

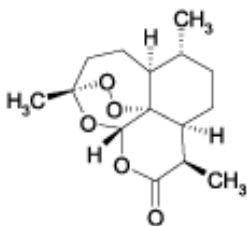


Figura 6. Estrutura da artemisinina. ^[14]

Na década de 70 do século passado foi isolada a artemisinina (ART) da planta *Artemisia annua*, a qual já era utilizada tradicionalmente há muitos séculos na China para tratar febres. Quimicamente a ART é uma lactona sesquiterpénica que possui um grupo funcional endoperóxido, sendo este o farmacóforo da molécula. A ART é o composto que apresenta uma acção mais rápida contra o *P. falciparum*, sendo também cada vez mais utilizada para o tratamento da infecção pelo *P. vivax*. Mata as formas eritrocitárias (que provocam a sintomatologia) e gametocíticas do parasita devido ao facto de ser uma molécula lipofílica que facilita a sua entrada nas hemácias através da membrana plasmática. Infelizmente, não apresenta actividade contra as formas exoeritrocitárias do parasita e é rapidamente metabolizada no organismo, pelo que a sua acção farmacológica é prejudicada pelo seu tempo de semi-vida bastante curto. Isto conduz a uma rápida eliminação da ART do organismo, aumentando assim as probabilidades de o fármaco não eliminar totalmente a infecção, pelo que a OMS não recomenda o uso da ART em monoterapia. A ART é administrada em conjunto com outros fármacos anti-maláricos em regimes terapêuticos designados por Terapias Combinadas à base de Artemisinina (ACT), sendo de salvaguardar que os derivados da ART que serão referidos mais à frente neste trabalho também são utilizados nestes regimes. ^[14]

A biodisponibilidade da artemisinina é reduzida quando administrada por via oral devido ao facto de ser uma molécula pouco solúvel em água. Deste modo é administrada sob a forma de suspensões intramusculares injectáveis (oleosas ou aquosas) que aumentam a sua biodisponibilidade. Para melhorar os parâmetros farmacocinéticos da ART (fraca biodisponibilidade e tempo de semi-vida curto) foram desenvolvidos derivados semi-sintéticos, sendo o primeiro a dihidroartemisinina (DHA), um lactol obtido através da redução da ART com tetrahydroborato de sódio (NaBH₄). A DHA apresenta uma actividade farmacológica duas vezes superior comparativamente com a ART, embora tenha aplicações terapêuticas restritas em ACT devido à sua neurotoxicidade e parâmetros farmacocinéticos similares ao do precursor

natural. A partir da DHA foram sintetizados o arteméter (AM) e o arteeter (AE) que são éteres β -alquilados, de modo a serem mais lipossolúveis e a terem por consequência um melhor perfil farmacocinético e actividade farmacológica que os dois compostos anteriores. ^[14]

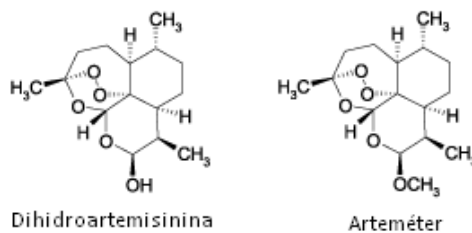


Figura 7. Alguns derivados importantes da artemisinina ^[14]

O AM é utilizado no combate à malária sob a forma de suspensão oleosa encapsulada (Artemos[®]), injeção IM (Artenam[®]) ou ainda em combinação com lumefantrina (Coartem[®]), sendo este último um exemplo de que a ACT é uma terapêutica já aplicada. ^[11, 14]

O mecanismo de acção da ART e seus derivados é um tópico que até aos dias de hoje não encontra consenso. É sabido que o grupo endoperóxido é o farmacóforo que confere a estes compostos a sua capacidade antimalárica, dependendo esta acção farmacológica da bioactivação pelo ferro existente no vacúolo alimentar do parasita. Um dos pontos de discórdia relativamente ao mecanismo de acção prende-se com o facto de não se saber ao certo em que forma se encontra o ferro quando é complexado pelo endoperóxido. A falta de consenso prende-se igualmente com a natureza química dos intermediários formados após a reacção radicalar com o ferro, pois podem ser radicais centrados em carbonos primários ou secundários ou em alternativa podem formar-se espécies carbocatiónicas, não se sabendo ao certo quais os alvos terapêuticos envolvidos. São propostas duas hipóteses para o mecanismo de bioactivação da ART, sendo que numa o endoperóxido liga-se ao ferro livre, e na outra foi considerado que se liga ao ferro do grupo Heme (efeito da alimentação do parasita). Foram efectuados estudos posteriores que confirmaram ambas as hipóteses, embora revelassem igualmente que estes peróxidos são bastante estáveis na presença de oxihemoglobina (hemoglobina oxigenada), reagindo selectivamente com o grupo heme livre de hemácias infectadas. Estes dados confirmaram a especificidade farmacológica destes compostos, mas deixaram indicações claras relativamente à possibilidade de activação no citoplasma. ^[14,15]

O primeiro modelo de bioativação da ART proposto foi o modelo da cisão redutiva. Neste modelo afirma-se que a bioativação da ART acontece quando existe a clivagem homolítica da ligação peróxido pelo Fe (II), o qual se liga à ART transferindo-lhe um electrão. É assim formado um radical centrado em oxigénio que irá depois sofrer um rearranjo, transformando-se num radical centrado em carbono primário ou secundário, uma vez que a ligação endoperóxido é assimétrica e como tal origina diferentes produtos. Apesar de serem estericamente desimpedidos, estes radicais são muito reactivos, pelo que irão provocar a alquilação das biomoléculas vitais para o parasita ou originar ROS que irão desencadear, por sua vez, processos de stress oxidativo. Caso não haja possibilidade de alquilação, ocorrerão então mais rearranjos que formarão moléculas neutras. O modelo da cisão redutiva encontra-se representado na figura 8. [14,16,17,18]

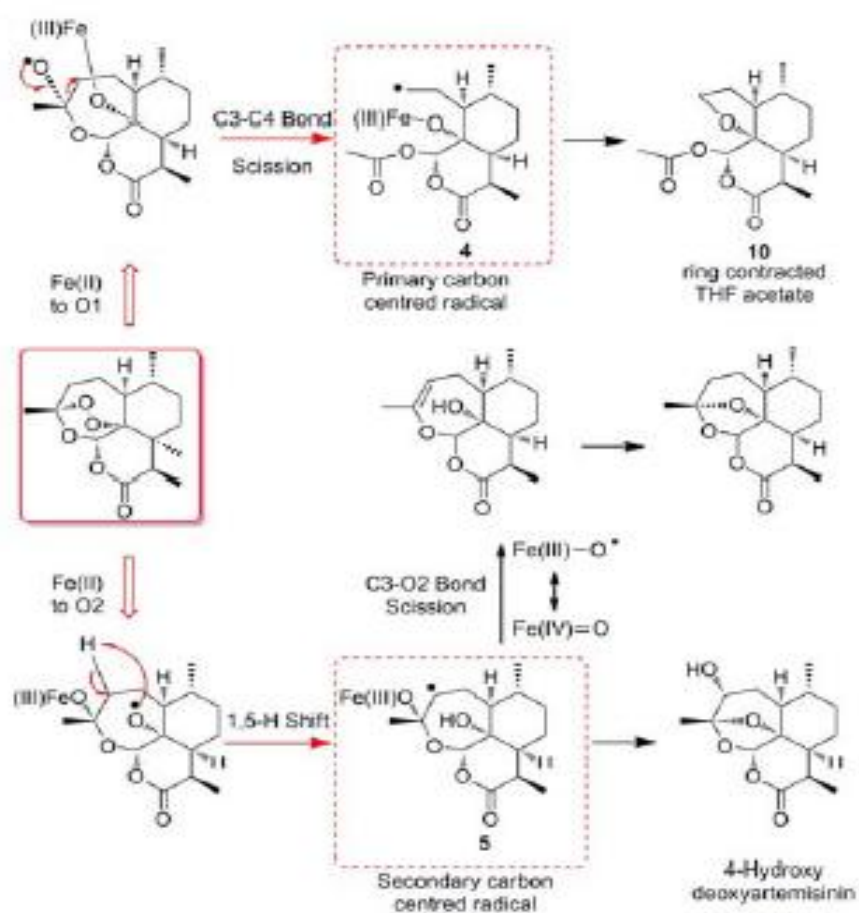


Figura 8. Representação esquemática do modelo de cisão redutiva. [17]

Como os radicais tem um tempo de semi-vida extremamente curto devido à sua reactividade elevada, existem defensores de que estas espécies poderão não ter tempo de se ligar a um alvo molecular, não havendo portanto qualquer interacção com outras moléculas. Com base neste pressuposto foi defendida a existência de outro modelo para a bioactivação da ART, o modelo do peróxido aberto. Este modelo assenta também na possibilidade de a ligação peróxido da ART ser clivada por uma molécula catiónica ou com propriedades de um ácido de Lewis, não havendo portanto a intervenção de uma espécie radicalar. Irá assim ocorrer uma clivagem heterolítica da ponte endoperóxido com posterior formação de um carbocatião terciário, que será estabilizado pelo átomo de oxigénio que não constitui a ponte endoperóxido. Este carbocatião é extremamente estável, pelo que haverá o ataque de uma molécula de água nesta posição que permitirá a abertura do anel. Quando o anel da ART é aberto irá ser formado um hidroperóxido insaturado que pode oxidar directamente resíduos laterais de proteínas, ou então formar um radical hidroxilo, através de uma redução de Fenton, que será igualmente reactivo para as proteínas. O modelo do peróxido aberto encontra-se representado na figura 9. [14,16,17]

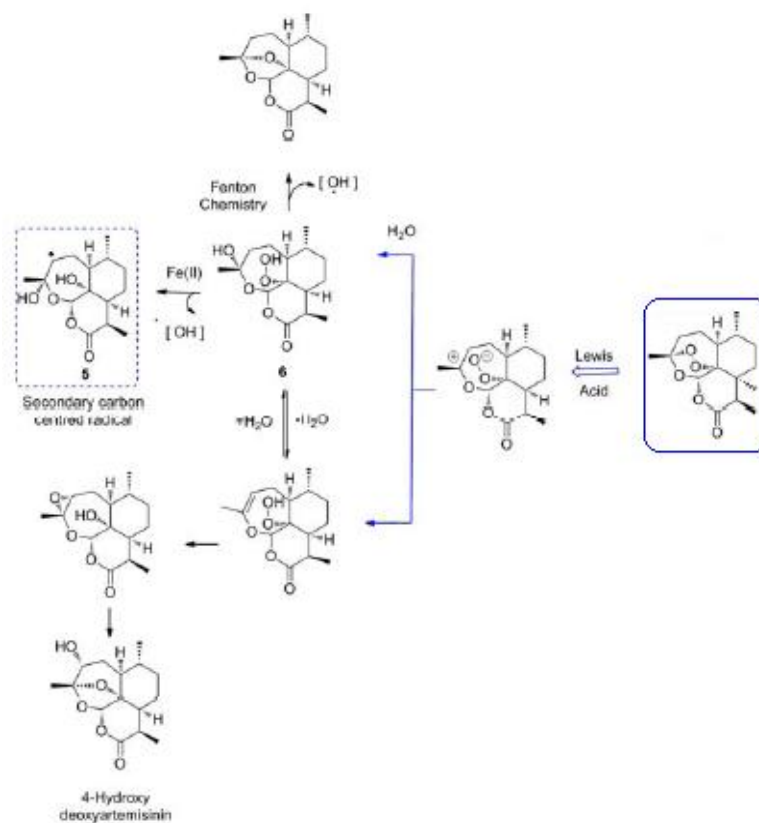


Figura 9. Representação do modelo do peróxido aberto [17]

O artesunato (AS) é um derivado semi-sintético da ART solúvel em água, sendo por isso administrado por via IV. Uma das terapêuticas aconselhadas pela OMS é uma variante da ACT onde se associa o AS a outros fármacos já existentes para combater a doença e com acção prolongada no organismo. É igualmente recomendado o uso do AS em conjunto com mefloquina ou amodiaquina para evitar o aparecimento de recidivas ou até mesmo a emergência de resistências. A dosagem de AS não é alterada para insuficientes renais ou hepáticos nem em casos em que existe medicação prévia, o que é uma grande vantagem terapêutica embora as suas interações com outros fármacos não sejam ainda conhecidas. [11,12,19]

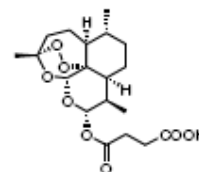


Figura 10. Estrutura do artesunato. [14]

As ACT têm uma importância fulcral para atrasar o aparecimento de parasitas com novas mutações que lhes conferem resistências aos novos tratamentos antimaláricos. Evitar um novo episódio de emergência massiva de resistências às terapêuticas por parte do *P. falciparum*, tal como sucedeu no passado com a cloroquina e com a sulfadoxina e pirimetamina, é vital para controlar o carácter epidémico que a malária tem. Através de uma utilização racional em infecções não complicadas causadas por *P. falciparum*, as ACT são actualmente as terapêuticas que mais vidas salvam, ao mesmo tempo que retardam o aparecimento de estirpes de *P. falciparum* resistentes à ART e seus derivados. De um modo geral, e segundo a OMS, é possível afirmar que as ACT são estratégias farmacológicas que visam: [20,21]

- Tratar mais rapidamente a infecção, nomeadamente em intervalos de 3 dias;
- Diminuir o número de recrudescências em pessoas tratadas para a infecção;
- Retardar o aparecimento de resistências por parte do parasita;
- Aumentar a adesão à terapêutica por parte do doente e eficácia da terapêutica, através de um número reduzido de tomas orais

Na Tabela I, apresentada em seguida, encontram-se representados os vários exemplos de associações de fármacos utilizadas em ACT.

Tabela I – Terapêuticas Combinadas de Artemisinina ^[21,22]

Terapêutica Combinada de Artemisinina e respectiva Dose Terapêutica e Posologia	Observações sobre a Terapêutica
<p>Artesunato e Amodiaquina (AS + AQ)</p> <p>4 mg de AS + 10 mg AQ /kg em toma diária durante 3 dias</p>	<p>Recomendada pela OMS no tratamento de malária não complicada causada por <i>P. falciparum</i>. Deve ser aplicada em regiões onde a percentagem de doentes curados com amodiaquina em monoterapia é superior a 80%.</p>
<p>Artesunato e Mefloquina (AS + MQ)</p> <p>4 mg/kg/dia de AS durante 3 dias em conjunto com 25 mg/kg de MQ repartidas em 8,3 mg diárias</p>	<p>Recomendada pela OMS no tratamento de malária não complicada causada por <i>P. falciparum</i>, sobretudo em regiões tailandesas. Não existem ainda provas sólidas da segurança desta terapêutica em África. O uso do AS combinado parece diminuir os efeitos secundários gastrointestinais, neuropsiquiátricos e cardiotoxicos da mefloquina.</p>
<p>Arteméter e Lumefantrina (AM + LM)</p> <p>1,7/12 mg/kg duas vezes ao dia durante 3 dias</p>	<p>Recomendada pela OMS no tratamento de malária não complicada causada por <i>P. falciparum</i>. A grande vantagem desta associação é que permite a administração da lumefantrina, uma vez que esta não se encontra disponível em monoterapia. As tomas orais devem ser efectuadas a seguir às refeições, uma vez que as gorduras aumentam a absorção da lumefantrina. Não pode ser aplicada em grávidas ou lactentes.</p>

<p style="text-align: center;">Artesunato e Sulfadoxina + Pirimetamina (AS + SP)</p> <p>4 mg/kg/dia de AS durante 3 dias em conjunto com uma única toma de 25 + 1,25 mg/kg de Sulfadoxina mais Pirimetamina no primeiro dia</p>	<p>Recomendada pela OMS no tratamento de malária não complicada causada por <i>P. falciparum</i>, sobretudo em zonas onde as taxas de sucesso do tratamento com Sulfadoxina e Pirimetamina são superiores a 80%. Em caso de estirpes resistentes a estes dois fármacos deve ser adoptada uma alternativa terapêutica de última linha.</p>
<p style="text-align: center;">Dihidroartemisinina e Piperaquina (DHA + PPQ)</p> <p>4 mg + 18 mg/kg de DHA + PPQ durante 3 dias</p>	<p>Esta combinação foi essencialmente estudada na Ásia, em determinadas regiões do Vietname e China. Os resultados desta terapêutica provaram que possui uma taxa de cura de 90 % na amostra onde foi administrada, contudo a sua aplicação foi realizada em doentes com malária não complicada causada por <i>P. falciparum</i>.</p>
<p style="text-align: center;">Artesunato e Pironaridina (AS + PRD)</p> <p>3,3 mg + 10 mg/kg durante 3 dias. É de salientar que as dosagens devem ser aperfeiçoadas.</p>	<p>Num ensaio clínico de fase III foi demonstrado o potencial parasiticida desta associação em casos malária não complicada causada por <i>P. falciparum</i>, com taxas de recuperação de 99,5% em doentes de vários países africanos. Contudo devem ser realizados mais ensaios de fase III, para definir as doses de AS + PRD a serem administradas em adultos e em crianças com peso inferior a 20 kg.</p>

Todas estas terapêuticas provaram ser muito úteis no tratamento de casos de malária não complicada causada por *P. falciparum*, contudo não devem ser adoptadas em casos de malária severa pois nestas situações o parasita é responsável por danos cerebrais e disfunção de vários órgãos, sendo que na maioria dos casos o doente apenas é salvo num intervalo de 24 horas após a infecção. Nestas situações a vida do doente é prioritária pois os episódios de malária cerebral são fatais. Estas infecções são tratadas farmacologicamente com injecções IM ou IV de AS ou AM, recorrendo-se também a injecções de quinino ou quinidino. O quinino sempre foi utilizado nestas emergências e, apesar de o seu uso ser anterior aos ensaios clínicos modernos, a sua administração continua a ser uma das poucas alternativas de última linha que os clínicos dispõem para tratamento de malária cerebral, apesar dos seus efeitos secundários. Tal como o quinino, o quinidino apresenta cardiotoxicidade (prolongamento do intervalo QT), hipotensão e alteração dos níveis plasmáticos de glucose e electrólitos, pelo que a administração de ambos deve ser feita através de uma infusão lenta e monitorizada. A administração de quinidino, devido ao facto de este ser mais tóxico que o quinino, requer monitorização dos sinais vitais do doente e só deve ser feita quando o clínico não dispõe de mais nenhuma opção terapêutica. ^[21]

Foi efectuado em África, no ano passado, um ensaio clínico sem ocultação e randomizado, comparativo entre o AS e o quinino num grupo de 5425 crianças com idades inferiores a 15 anos internadas com malária severa causada por *P. Falciparum*. Este estudo foi denominado por ensaio AQUAMAT e demonstrou, resumidamente, que houve uma redução da mortalidade de 22,5% no grupo em que foi administrado AS comparativamente com o grupo onde foi administrado quinino. Registou-se também no grupo de crianças tratado com AS um decréscimo do número de situações de convulsão, hipoglicémia e coma no período depois da saída das crianças do hospital, assim como também não foram registadas diferenças significativas no número de sequelas cerebrais causadas pela infecção. Esta foi uma evidência para a OMS de que o AS deve ser utilizado como a terapia de referência para crianças com malária severa, sendo mais uma prova da importância da ART e dos seus derivados para o tratamento da malária. O AS pode ser ainda utilizado pontualmente em terapêuticas combinadas com antibióticos, nomeadamente com tetraciclina,

doxiciclina ou clindamicina. Esta é uma opção terapêutica que deve ser apenas aplicada em doentes de grupos especiais, como por exemplo grávidas ou imunodeprimidos, quando outras ACT falharam. ^[21,23]

5. Peróxidos sintéticos: 1,2,4-trioxanos; 1,2,4-trioxolanos e 1,2,4,5-tetraoxanos

Os primeiros peróxidos totalmente sintéticos desenvolvidos com base na estrutura do composto-modelo ART foram os 1,2,4-trioxanos. Os 1,2,4-trioxanos têm uma estrutura muito simplificada face à ART, pelo que o estudo destes compostos teve uma importância vital na descoberta da estrutura do farmacóforo responsável pela actividade anti-malária. Os resultados destes estudos provaram que os anéis D e lactona da ART não interferem com o efeito farmacológico, sendo o farmacóforo da molécula a estrutura 1,2,4-trioxano. Estas observações conduziram ao *design* e síntese de novos endoperóxidos com uma estrutura simplificada. Foi igualmente comprovado que pequenas alterações de grupos substituintes, impedimento estérico e existência de epímeros podem afectar a potência anti-malária da molécula, pelo que se determinou que a existência de uma estrutura com conformação *cis* pode ser farmacologicamente mais eficaz (*cis-fused trioxane*) que a *trans*. Estas alterações estéricas podem conduzir a um impedimento estérico em torno do núcleo endoperoxídico, alterando assim a bioactivação do trioxano, a sua metabolização ou formação de intermediários. A presença de substituintes nas posições 3 e 5 interfere igualmente na actividade dos trioxanos, sendo o grupo 2-adamantil actualmente um grupo de referência na síntese de trioxanos. ^[24,25,26]

6. 1,2,4-Trioxolanos

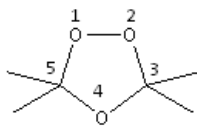


Figura 11. Núcleo 1,2,4-trioxolano

Os trioxolanos são ozonídeos formados com base na estratégia de co-ozonólise de Griesbaum, a partir, por exemplo, da O-metil oxima de 2-adamantanona e de uma ciclohexanona, pelo que este processo de síntese relativamente simples pode conduzir a uma alternativa mais barata à ART e alguns dos seus derivados.

Quimicamente são caracterizados pela presença de grupos 1,2,4-trioxolano (figura 11), tendo sido descoberto que possuem uma potência farmacológica *in vitro* superior à do artesunato e arteméter. ^[24] Foi igualmente descoberto que os trioxolanos possuem um perfil farmacocinético muito bom, devido à sua boa biodisponibilidade oral e por terem um tempo de meia-vida mais prolongado que a ART, sobretudo quando na cadeia lateral da molécula existem átomos de azoto sob a forma de aminas (primárias ou terciárias) ou de um grupo azole. Toxicologicamente, estes grupos funcionais/substituintes conferem aos trioxolanos características bastante semelhantes às do artesunato, nomeadamente uma possível irritação hepática, gastrointestinal, renal e atrofia linfática. A nível cerebral não existem evidências de que os trioxolanos danifiquem de algum modo o tecido nervoso, pelo que estes compostos seriam indicados para combater a malária cerebral causada pelo *P. falciparum* e uma alternativa à ART que provoca danos neurológicos. Para que estes compostos tenham actividade anti-malária é fundamental a presença do anel de espiroadamantano (ou adamantilo). Sem este substituinte o composto é metabolicamente instável e não exerce qualquer acção farmacológica. Este anel adamantanona é bastante rígido e volumoso, promovendo o aumento do impedimento estérico em torno do endoperóxido, diminuindo assim a sua reactividade e aumentando por consequência a sua estabilidade química e metabólica. Quando a estrutura trioxolano se encontra associada ao anel adamantanona e a um ciclohexano são obtidos os melhores valores para a actividade anti-malária, o que indica que esta associação de grupos substituintes promove uma reactividade selectiva do endoperóxido ao alvo terapêutico preferencial, o Fe (II). ^[11,24,26]

Os trioxolanos podem ter mecanismos de acção que envolvem vários alvos farmacológicos, actuando por alquilação de biomoléculas importantes para a vida do

parasita (por exemplo proteínas), ou por meio de uma reacção radicalar com o grupo Heme (formado durante a metabolização da molécula de hemoglobina pelo parasita, quando este se alimenta) e impedindo-o de formar os cristais de hemazoina não tóxicos para o parasita.

Na primeira situação ocorre a alquilação directa de biomoléculas específicas do parasita e vitais para a sua sobrevivência, sendo que quando reagem com os trioxolanos esta reacção irá fazer com que percam a sua actividade fisiológica e que o parasita morra devido à sua perda de função. Foi provado que os trioxolanos podem ligar-se a proteínas de membrana parasitárias como a PfATP6 ou a TCTP (*Translationally controlled tumor protein*) [25,27]

A reacção entre as espécies de Fe (II) da molécula de porfirina do grupo Heme, libertada durante a degradação da hemoglobina pelo parasita, e o trioxolano, conduz à formação de radicais.

Foi proposto que o ferro irá reagir com a ligação endoperóxido do trioxolano, formando um oxigénio radicalar na posição 1 do endoperóxido, que vai induzir a formação de

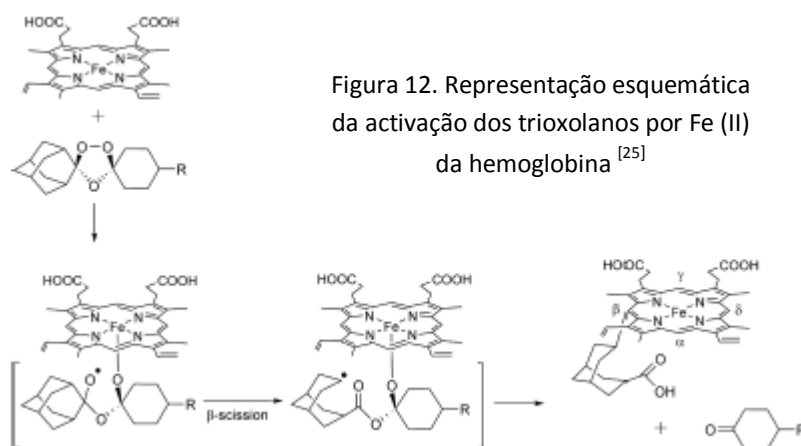


Figura 12. Representação esquemática da activação dos trioxolanos por Fe (II) da hemoglobina [25]

uma cetona como intermediário, ocorrendo finalmente a formação de um ácido carboxílico e a ligação permanente do grupo adamantil (num centro radicalar de carbono secundário) ao anel de porfirina (figura 12). Ao ocorrer esta ligação está a impedir-se que o parasita consiga polimerizar o grupo Heme em cristais de hemazoina, sujeitando-o assim à toxicidade do Heme (uma ferriproto-porfirina), metabolito da degradação da hemoglobina. Este é o modelo que melhor explica o modo como os trioxolanos preferencialmente matam o parasita devido à sua elevada concentração de Fe (II) intracelular. [25]

Estudos de estabilidade estrutural e metabólica indicaram que trioxolanos mais lipofílicos possuem uma biodisponibilidade oral maior, embora tivessem uma estabilidade metabólica menor comparativamente a trioxolanos mais hidrofílicos. Estas características são comuns a outras classes de endoperóxidos sintéticos, pelo que se concluiu que trioxolanos que possuem grupos substituintes neutros ou básicos teriam um melhor perfil farmacológico do que os que possuem grupos acídicos. Tal foi demonstrado por comparação das actividades antiplasmódicas de compostos com grupos amina, aminoácido e azole face a grupos carboxilo e hidroxilo, sendo que os primeiros demonstraram melhores resultados. Estudos comparativos da actividade de trioxolanos com bases fracas e grupos neutros na sua estrutura, em *P. falciparum* e *P. berghei*, demonstraram que a presença de uma base fraca confere melhorias farmacocinéticas a estes compostos. ^[14,24,26]

Numa fase final da investigação nestes compostos foi submetido o trioxolano OZ277 ou arterolano (figura 13) a ensaios clínicos, tendo os ensaios alcançado a fase III, em que é utilizado sob a forma de maleanato de arterolano combinado com fosfato de primaquina. Análises a microssomas hepáticos demonstraram que o arterolano era metabolicamente instável no plasma dado que sofria duas hidroxilações em posições diferentes no anel adamantilo. Estas análises indicaram que os metabolitos oriundos do efeito de primeira passagem do arterolano eram menos activos, perdendo grande parte da sua actividade. Estes dados voltaram a provar a importância da presença do grupo *spiro* não substituído para que os trioxolanos tenham actividade farmacológica, sendo este requisito estrutural comum a trioxolanos com actividade antimalárica. A observação de que este composto é facilmente inactivado metabolicamente suscitou outros estudos com vista à optimização das suas propriedades farmacológicas. Este composto apresentava uma excelente actividade antimalárica *in vitro*, pelo que se fosse possível conferir mais estabilidade metabólica ao OZ277 sem interferir muito com a sua estrutura a nível do anel adamantil, este composto poderia ter um futuro promissor como fármaco antimalárico. ^[11,28,29,30]

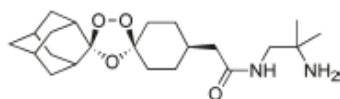


Figura 13. Estrutura do trioxolano

OZ277 (Arterolano). ^[29]

Mesmo com esta limitação a actividade e selectividade do arterolano é motivo para que possa ser, eventualmente, utilizado no futuro em terapias combinadas com outros anti-maláricos. Actualmente o arterolano encontra-se novamente em ensaios clínicos de fase III, onde está a ser estudada a sua capacidade parasiticida em conjunto com piperaquina. ^[31] Seria igualmente interessante propor um estudo para detectar quais os citocromos que metabolizam o OZ277 de modo a que, caso este citocromo não tenha uma actividade importante para um doente infectado com malária, fosse desenhado um inibidor específico para este citocromo, garantindo assim a manutenção consequente dos níveis plasmáticos do OZ277 quando administrado com este.

Recentemente encontra-se a ser estudado um trioxolano de segunda geração, designado por OZ439 (figura 14), o qual é uma molécula candidata a ser utilizada no tratamento e profilaxia da malária, através de uma única toma oral. Quando foram feitos os estudos *in vitro* para o OZ439, em estirpes de *P. falciparum*, foi registado que este trioxolano possuía uma rápida actividade farmacológica contra as formas parasitárias asexuadas do parasita no sangue, assim como possuía uma actividade antiplasmodial semelhante à dos derivados de ART. Mais tarde foram feitos ensaios *in vivo* em ratinhos infectados com *P. berghei*, nos quais foi verificado que o OZ439 curava completamente os ratinhos infectados com apenas uma toma oral de 20mg/kg; a redução total dos níveis de parasitémia não é verificada aplicando o tratamento com os derivados da ART. Foi igualmente verificado que o OZ439 possuía melhor eficácia na profilaxia da malária face à mefloquina, o fármaco actualmente mais utilizado a nível mundial para este fim. Comparativamente ao seu antecessor, o

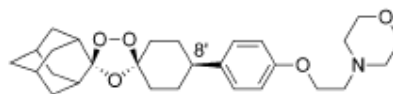


Figura 14. Estrutura do OZ439. ^[31]

arterolano, o OZ439 apresenta melhores propriedades farmacocinéticas, nomeadamente no que respeita ao tempo de meia-vida e concentração no sangue, pelo que o tempo prolongado que permanece em circulação direccionou o estudo deste composto para ensaios clínicos de fase I. O seu tempo elevado de permanência na circulação sanguínea deve-se sobretudo à sua estrutura química, que foi desenhada de modo a estabilizar o endoperóxido existente no seu farmacóforo, ao mesmo tempo que este ficasse mais desimpedido para ser bioactivado pelo Fe(II).^[31] Na tabela II encontram-se resumidos os dados referentes aos ensaios *in vivo* comparativos entre o arterolano (OZ277) e o OZ439.

Tabela II – Comparação da eficácia *in vivo* do arterolano com o trioxolano OZ439, em ratinhos infectados com *P. berghei*.^[31]

Compound	In vivo efficacy 1 × 30 mg/kg (oral)*			In vivo prophylaxis 1 × 30 mg/kg (oral) given 24 h before infection*		
	Activity (%) [†]	Survival (d)	Cure (%) [‡]	Activity (%) [†]	Survival (d)	Protected (%) [‡]
Control	0	6–7	0	0	6–7	0
AS [§]	92	9	0	21	7	0
CQ [§]	99.9	10	0	37	7	0
MF [§]	99.6	22	0	99.9	27	60
Sulfadoxine	97	15	0	Not tested		
Pyrimethamine	99.8	9	0	Not tested		
OZ277 [§]	99.9	11	0	0	7	0
OZ439	>99.9	>30	100	99.8	>30	100

**P. berghei*-infected mice (mean of $n \geq 5$ animals).

[†] Assessed on day 3 postinfection.

[‡] No detectable parasites at day 30 postinfection.

[§] Data from Vennerstrom et al.

Nos ensaios clínicos de fase I o OZ439 demonstrou ser seguro para doses até 1600 mg em doentes com malária. De momento encontra-se em ensaios clínicos de fase II.^[31]

7. 1,2,4,5-Tetraoxanos

Os 1,2,4,5-tetraoxanos são compostos heterocíclicos que possuem duas pontes endoperóxido localizadas nas posições 1,2 e 4,5, pelo que os grupos substituintes se encontram nos carbonos das posições 3 e 6 (figura 15). Há muito que estes compostos eram sintetizados para outros fins industriais, mas apenas recentemente foi descoberta a sua actividade anti-

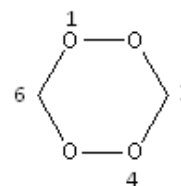


Figura 15. Núcleo 1,2,4,5-tetraoxano.

malárica. Estes compostos têm uma síntese barata, sendo produzidos por meio da ciclização em meio ácido de cetonas cíclicas com peróxido de hidrogénio, e não possuem centros quirais, uma característica que facilita bastante a sua síntese e isolamento. Contudo, a síntese deste tipo de endoperóxidos comporta igualmente a formação de diversos produtos laterais, tais como os 1,2,4,5,7,8-hexaoxanos que são farmacologicamente irrelevantes, pelo que foi levada a cabo uma série de estudos que procuravam otimizar a estratégia de síntese destes produtos. No culminar destes estudos foi descoberto que o núcleo tetraoxano (figura 15) era extremamente resistente em condições redutoras com hidretos, em meio ácido, em meios alcalinos e em condições oxidativas. Em suma, estes compostos possuem uma estabilidade química notável, excepto quando na presença de metais de transição bivalentes como o Fe (II) e o Cu (II). Foi assim possibilitado um maior leque de opções sintéticas dada a resistência do farmacóforo, tendo sido produzida uma série de tetraoxanos com vários grupos funcionais, sendo de salientar derivados com grupos funcionais polares e solúveis em água obtidos, na maioria dos casos, por aminação redutiva. [30,32]

Em analogia com outros endoperóxidos, os tetraoxanos que possuem grupos *spiro* provaram ter um bom potencial farmacológico, sobretudo os derivados *dispiro* face a derivados *monospiro*, sendo igualmente observada a maior eficácia farmacológica nos derivados *spiro* assimétricos, tal como foi verificado nos trioxolanos. Nestes compostos regista-se uma vez mais a estabilização conferida pelo grupo *spiro* à ligação endoperóxido, garantindo a estabilidade das duas ligações tetraoxanos e a actividade selectiva do composto quando exposto à acção do Fe (II) intracelular. Crê-se que a estabilidade dos tetraoxanos se encontra relacionada com a sua aquiralidade e polaridade aumentada (por terem um quarto átomo de oxigénio), face a análogos

estruturais, e ao bloqueio estérico conferido pelos grupos substituintes. Esta estabilidade acrescida pelo aumento da polaridade garante-lhes uma metabolização hepática menos extensa (efeito de primeira passagem) e uma maior biodisponibilidade oral em comparação com outros endoperóxidos anti-maláricos.^[30,32,33]

Ensaio de reactividade demonstram que os tetraoxanos reagem mais lentamente com o Fe (II) do que os seus análogos trioxolanos; foram igualmente efectuados estudos de genotoxicidade e citotoxicidade e não foram registados quaisquer danos celulares. Quanto a estudos de estabilidade foi demonstrado que os tetraoxanos são estáveis em meio aquoso e ácido. Ainda relativamente à estabilidade estrutural dos tetraoxanos, foi efectuado um estudo em que foi comparada a estabilidade reaccional de um tetraoxano seleccionado para ensaios clínicos, o RKA 182 (figura 16), com a do arterolano (OZ277), através da exposição de ambos num meio com eritrócitos infectados. Foi registado que o trioxolano foi degradado mais rapidamente no meio do que o tetraoxano, tendo o arterolano apenas resistido 35 minutos, enquanto foi detectado 79% de RKA quatro horas após o início da exposição. Estes dados indicam que os tetraoxanos podem ter um maior intervalo temporal de efectividade na infecção face aos trioxolanos e que são, efectivamente, mais estáveis no plasma, ao contrário do arterolano que era metabolizado.^[30,32,33]



Figura 16. Estrutura do tetraoxano RKA 182.^[30]

Foi determinado em ensaios *in vitro*, utilizando estirpes CQS e CQR de *P. falciparum*, que o RKA182 possui um IC₅₀ de 0,8 nM contra estirpes CQS (3D7) e de 1,1 nM contra estirpes CQR (K1). O RKA 182 provou ser mais eficaz a eliminar o parasita a longo prazo em ratinhos infectados por *P.berghei*, apenas com uma única dose por toma oral de 30 mg/kg face ao AS que elimina a parasitémia quase por completo em oito horas, ao fim das quais os níveis de infecção voltam a subir, obrigando a outra toma. Nestes ensaios *in vivo* foi igualmente determinado que o RKA 182 possuía como valores de dosagens eficazes para obter eficácia terapêutica com, respectivamente, 50% e 90% da dose de tetraoxano, de 1,3 mg/kg (ED₅₀) e de 4,2 mg/kg (ED₉₀). Se for provado em estudos mais avançados que o RKA 182 é efectivo numa unidose diária

poderá ser uma escolha aceitável para uma nova linha de fármacos. Foi determinado que o seu tempo de semi-vida em ratinhos era de 2,4 horas após administração oral. O RKA182, apresentou uma actividade *in vitro* superior à ART e a dois dos seus derivados (AS e AM), tendo apresentado resultados favoráveis contra estirpes de *P. falciparum* resistentes às ACT recolhidas na fronteira entre o Camboja e a Tailândia. Esta estirpe é extremamente preocupante para a OMS uma vez que a ACT é actualmente a única alternativa terapêutica eficaz que se encontra disponível para casos de malária aguda causada por *P. falciparum*.^[30,32,33]

Relativamente à bioactivação destes compostos, esta é dependente da acção do Fe (II) da hemoglobina degradada durante a alimentação do parasita no vacúolo alimentar, processando-se de modo semelhante a outros endoperóxidos. Uma vez activos, os tetraoxanos, e em especial o RKA182, formam radicais que alquilam o anel de porfirina da hemoglobina degradada, impedindo que se formem os cristais de hemazóina que impedem a morte do parasita por exposição a metabolitos tóxicos. Ao contrário dos trioxolanos que geram radicais em carbono secundário, o RKA182 pode dar origem a radicais em carbono primário e secundário (figura 17). A existência destas espécies radicalares foi comprovada através da captação dos radicais primários e secundários com TEMPO (2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxilo), um agente químico que forma aductos estáveis com radicais, possibilitando a sua posterior identificação. Com a observação por microscopia confocal de tetraoxanos marcados com grupos fluorescentes, conclui-se que estes se ligam selectivamente a eritrócitos infectados pelo *Plasmodium*, sendo estas moléculas detectadas no vacúolo alimentar e no citoplasma do parasita. De modo a aumentar a lipofilicidade e a conseqüente entrada selectiva nos eritrócitos infectados, foram sintetizados tetraoxanos com substituintes esteróides, que para além de terem o efeito pretendido, registaram actividade farmacológica em concentrações mais baixas. A introdução de grupos esteróides pode ser, hipoteticamente, um modo de estas moléculas suportarem melhor o efeito de primeira passagem, devido à biocompatibilidade que um derivado esteróide tem com o organismo.

Tal como os trioxolanos, os tetraoxanos podem interagir com outros alvos moleculares como proteínas de membrana e enzimas fundamentais para a vida do

parasita, pelo que quando ocorre a alquilação destas biomoléculas, estas perdem a sua função e o parasita morre. A actividade parasiticida destes compostos foi ainda estudada noutros organismos, sendo neste momento também estudado o seu perfil citotóxico, ou seja, a existência de uma actividade anti-cancerígena.

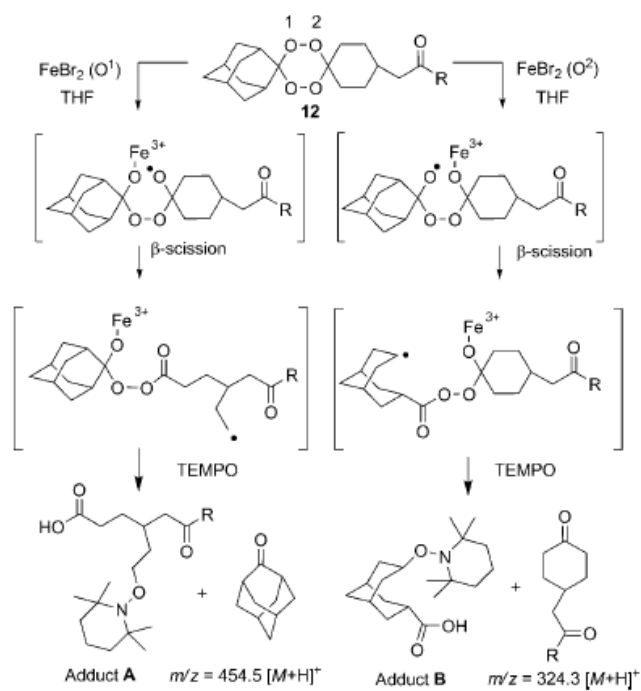


Figura 17. Representação do mecanismo de bioativação dos tetraoxanos e detecção de espécies radicalares, através da utilização de TEMPO. ^[30]

8. 1,2-Dioxanos de origem vegetal com actividade antimalárica

Dadas as limitações que os trioxolanos possuem graças à fraca sua estabilidade metabólica, foi colocada a hipótese de moléculas com um grupo endoperóxido mais simples, em que a molécula tenha na sua estrutura um grupo dioxano, poderem ter o mesmo efeito antimalárico que os endopéroxidos anteriores. Foi isolado o Yingzhaosu A (figura 18) a partir de uma planta chinesa, um endoperóxido com estrutura mais simplificada com uma ponte endoperóxido constituída por dois átomos de oxigénio. Este núcleo é um 1,2-dioxano. O isolamento e utilização do Yingzhaosu A foi dificultado por falta de matéria-prima, pelo que foram sintetizados derivados semi-sintéticos do Yingzhaosu A que tivessem o núcleo 1,2-dioxano na sua estrutura. Destes derivados foi seleccionado o artefleno (figura 18) para testes *in vitro*, que apresentou uma estabilidade metabólica superior à exibida pela ART e seus derivados, consequência da estabilidade estrutural que o anel 1,2-dioxano lhe confere, um efeito antiplasmodial mais prolongado e um menor aparecimento de recrudescências. Contudo, o artefleno foi retirado dos ensaios devido aos custos elevados que a sua síntese comportava. ^[34]

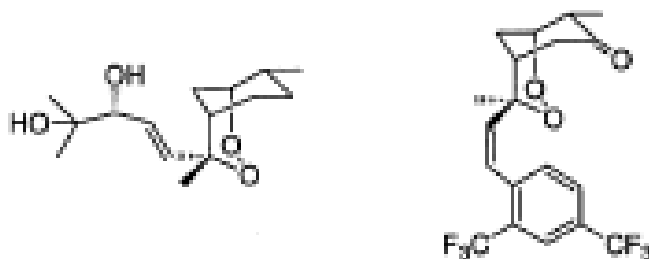


Figura 18. Estruturas do Yingzhaosu A (esquerda) e do artefleno (direita). ^[34]

Estes resultados com o artefleno encorajaram a procura de compostos naturais com um núcleo 1,2-dioxano, pelo que recentemente foram descobertos vários endoperóxidos com origem marinha.

9. 1,2-Dioxanos de origem marinha com actividade antimalárica

9.1. *Plakortin* e os seus derivados

Há quase trinta anos foram isolados e caracterizados policétidos com o grupo endoperóxido que apresentavam actividade anti-malárica, produzidos pela esponja *Plakortis halichrondroides*, tendo sido identificados 1,2-dioxanos e 1,2-dioxolanos. Contudo, a descoberta da ART relegou para segundo plano a esmagadora maioria de estudos que procuravam novas soluções para o flagelo mundial que a Malária constitui. Porém, a emergência recente de resistências à ART tornou imperativa a nova busca de moléculas eficazes contra a malária em monoterapia, de toma oral e monetariamente acessíveis às populações que mais sofrem com esta doença. Este imperativo funcionou como impulso para que o estudo dos compostos de origem marinha fosse recentemente retomado. Como resultado destes estudos foram descobertos compostos do mesmo tipo numa outra esponja do género *Plakortis*, a *P. simplex* (figura 19), oriunda do mar das Caraíbas. Os 1,2-dioxanos e os 1,2-dioxolanos da *P. simplex* foram então testados quanto à sua actividade parasiticida, sendo que apenas os primeiros apresentaram resultados de bioactividade válidos para justificar testes mais avançados.



Figura 19. *Plakortis simplex* ^[35]

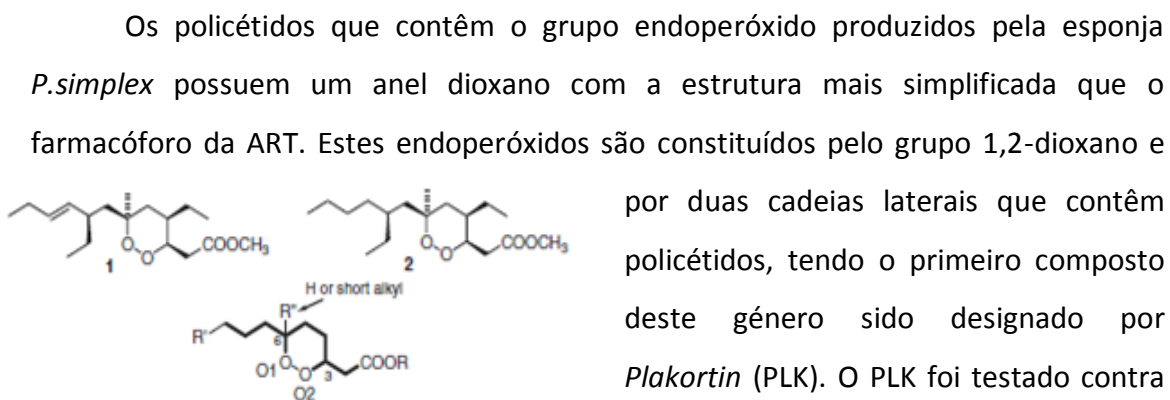


Figura 20. Representação estrutural do PLK (1), DHPLK (2) e do seu farmacóforo. ^[36]

quais demonstrou ter uma actividade farmacológica considerável, pelo que foram preparados alguns derivados semi-sintéticos com o objectivo de se proceder a estudos de relação estrutura/actividade. O primeiro derivado do PLK a ser sintetizado foi um composto com uma redução nas posições 9 e 10 denominado *dihydroplakortin* (DHPLK), representado na figura 20. É de reforçar que estes compostos possuem uma estrutura química bastante simples, comparativamente com a ART, o que pode ser uma vantagem na procura de novas moléculas com actividade anti-malária. [36,37]

Foram efectuados estudos de actividade para o PLK e para os seus compostos derivados, tendo sido confirmado o grupo 1,2-dioxano como farmacóforo. Foi ainda descrita a importância da presença da cadeia lateral alquilada do PLK situada no carbono da posição 6 do farmacóforo, assim como foi demonstrado que alterações da sua conformação têm influência no seu potencial farmacológico. A cadeia alquilada referida anteriormente é designada por *western side chain*. Por consequência, a

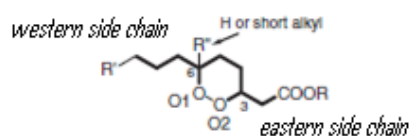


Figura 21. Descrição representativa do farmacóforo do PLK. [36]

segunda cadeia que se encontra ligada ao anel dioxano na posição 3 designa-se por *eastern side chain*. Para simplificar a linguagem utilizada neste trabalho optou-se por denominar a *western side chain* por grupo substituinte C6 e, por conseguinte, a *eastern side chain* por grupo substituinte C3.

Quanto ao mecanismo de acção do PLK e seus derivados, actualmente é proposto que existe uma interacção entre o catião Fe(II) do grupo heme sanguíneo e o grupo 1,2-dioxano do PLK. Esta interacção resulta numa clivagem reductiva homolítica que conduzirá à formação de um radical de oxigénio na posição 1 (O1) do farmacóforo do PLK, que após subsequente rearranjo origina um radical de carbono no grupo substituinte C6 devido à migração 1,4 ou 1,5 do átomo hidrogénio (figura 22). Assim irá formar-se um produto final que possui um grupo hidroxilo e um grupo substituinte C6 radicalar, o qual irá funcionar como alquilante sendo deste modo nocivo para o parasita. A distância existente entre o O1 e os carbonos das posições 4 ou 5 da *western side chain* é designada por *through space* e é fulcral para que haja acessibilidade estérica ao grupo endoperóxido e consequente migração do hidrogénio. Este modo de acção pressupõe uma vez mais um mecanismo de bioactivação do potencial fármaco

pelo Fe(II) existente no vacúolo alimentar do parasita, formando-se então um intermediário letal para o protozoário, à semelhança do que acontece com a artemisinina, trioxolanos e tetroxanos (figura ??).

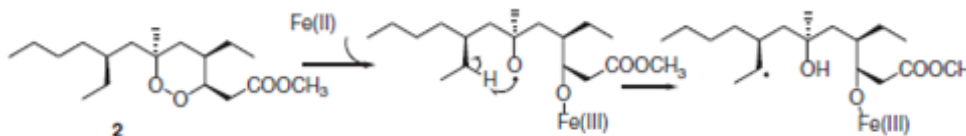


Figura 22. Mecanismo proposto para a formação da cadeia lateral tóxica para o *Plasmodium*, a partir do DHPLK. ^[36]

Retomando o tópico da reactividade do PLK, foi descrito um efeito bloqueador por parte do grupo éster existente no grupo substituinte C3. Este grupo funcional promove um impedimento estéreo selectivo quando existe a ligação do Fe(II) a um dos oxigénios do 1,2-dioxano, obrigando deste modo a haver uma interacção selectiva do Fe(II) com o O1 do endoperóxido. Isto indica que a presença de grupos funcionais ou grupos substituintes de maior dimensão facilitam a bioactivação e melhoram o perfil farmacológico destes compostos, facilitando assim a formação do radical centrado num carbono do grupo substituinte C6. De acordo com os estudos de correlação estrutura/actividade efectuados, é possível resumir os requisitos estruturais que possibilitam a actividade antiplasmodial do PLK e seus derivados em três curtos tópicos:

- ✓ Um anel dioxano nas posições 1 e 2;
- ✓ A posição 3 tem de ser monosubstituída e possuir grupos volumosos no grupo substituinte C3
- ✓ O grupo substituinte C6 tem de ser uma cadeia alquilada com ramificações que permitam a migração de hidrogénio para o intermediário radicalar centrado no endoperóxido.

É portanto possível afirmar que foi demonstrada a existência de fármacos com actividade anti-malárica que possuem uma estrutura mais simples comparativamente à da artemisinina, embora contenham o mesmo tipo de farmacóforo, a ponte peroxídica.

9.2. Síntese de 1,2-dioxanos análogos ao PLK

Com base nas informações obtidas através dos estudos de reactividade anteriormente referidos foram sintetizados análogos do PLK com estrutura mais simples. Estes compostos são primariamente caracterizados por possuírem um anel 1,2-dioxano com as seguintes substituições:

- ✓ Dois grupos hidroxilo em C3 e C6 ou duas substituições em C4 e C5
- ✓ Um grupo pentilo no grupo substituinte C6
- ✓ Um grupo éster, carboxilo ou hidroxilo no grupo substituinte C3

A estratégia de síntese destes derivados, a qual se baseia na modificação química do *trans*-2-nonenal, encontra-se esquematizada na figura 23. ^[36]

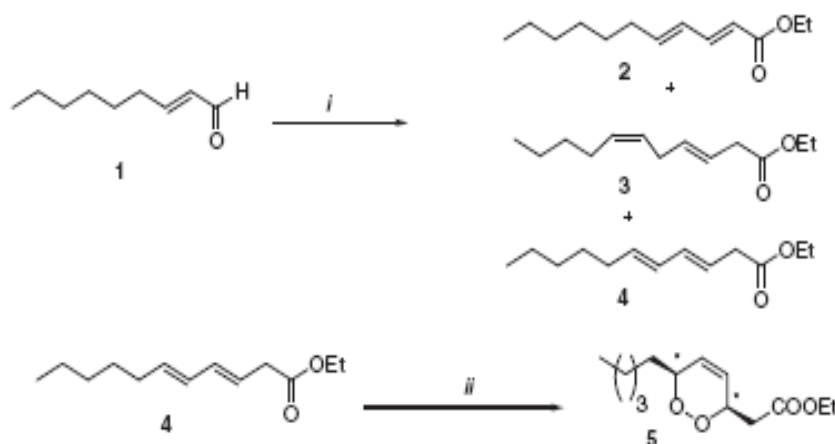


Figura 23. Reacção de Condensação de Knoevenagel modificada (em cima)

Reacção de foto-oxigenação (em baixo). ^[36]

Esta estratégia utiliza uma cicloadição [4+2] com oxigénio, designada por foto-oxigenação, como o método mais simples para sintetizar o anel 1,2-dioxano. A ciclização é efectuada com sucesso por reacção de um dieno 1,3-insaturado com oxigénio molecular na presença de luz. Contudo é necessário ter em consideração que nesta reacção é importante garantir a utilização do isómero correcto do reagente inicial de modo a garantir que o produto final possua a geometria apropriada, uma vez que a posição em que o grupo substituinte C6 se encontra relativamente ao farmacóforo determina a existência da bioactivação do 1,2-dioxano pelo Fe(II). ^[36,38]

A foto-oxigenação do intermediário 4 deu origem ao produto 5 (figura 23), o qual foi o reagente de partida para toda uma linha de composto estruturalmente análogos ao PLK e que serviram para efectuar estudos relacionais de estrutura e reactividade. Os estudos foram efectuados com as estirpes CQS D10 e CQR W2 de *P.falciparum*. Abaixo, na figura 24 encontram-se representadas as estratégias de síntese para cada composto, assim como na Tabela III estão os valores registados para a actividade de cada composto. [36]

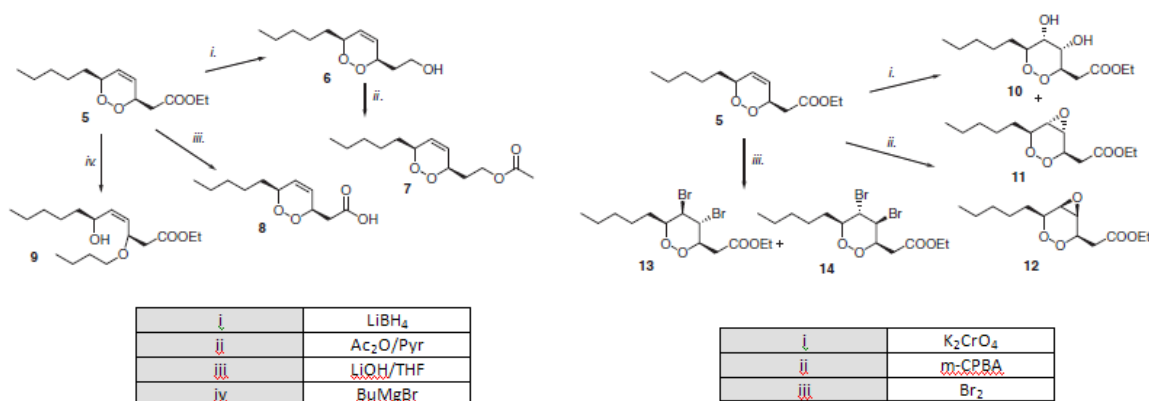


Figura 24. Representação esquemática dos processos sintéticos utilizados na obtenção dos análogos do PLK. [36]

Tabela III – Actividade biológica dos análogos do PLK (5-14) contra as estirpes D10 (CQR) e W2 (CQS) de *P.falciparum*. [36]

	D10 IC ₅₀ μM	W2 IC ₅₀ μM
1 ^a (PLK)	0.87 ± 0.35	0.39 ± 0.13
2 ^a (DHPLK)	0.90 ± 0.56	0.43 ± 0.16
5	1.20 ± 0.21	1.49 ± 0.22
6	>30	>30
7	21.90 ± 1.33	12.50 ± 2.51
8	3.33 ± 0.68	3.42 ± 0.56
9	>30	>30
10	>30	>30
11	22.10 ± 6.55	10.30 ± 3.21
12	>30	>30
13	8.15 ± 1.34	5.11 ± 0.98
14	9.12 ± 0.88	5.65 ± 1.22
Chloroquine	0.03 ± 0.01	0.25 ± 0.01

Desta série de compostos o produto 5 foi o que revelou melhor actividade farmacológica contra o parasita, apresentando um IC₅₀ de 1,20 µM, embora este valor seja equivalente a metade da actividade do PLK e cem vezes menos potente que a actividade da ART. A baixa actividade do composto 5 face ao PLK pode ser devida a diferenças conformacionais entre o *through space* de ambos os compostos. Todos os derivados do produto 5 que possuem modificações no grupo éster da *eastern side chain*, os compostos 6 a 9, provaram ser menos eficazes *in vitro*. O derivado 8 possui uma função carboxilo em vez de éster, o que dificulta a sua entrada no parasita, pois torna a molécula mais polar do que o composto de partida, e é responsável pela actividade mais baixa. Esta suposição é corroborada pelo facto de os derivados 6 e 7 possuírem, respectivamente, um álcool primário e um oxiacetal e terem actividades farmacológicas bastante reduzidas. Estes dados permitem afirmar que grupos mais polares na *eastern side chain* diminuem a eficácia parasiticida dos compostos. [36]

O estudo dos compostos 10 e 14 (fig.24) revelou que estes são inactivos ou possuem uma actividade biológica muito reduzida, afirmando-se que a razão para tal é a presença de substituintes no C4 e C5 do anel 1,2-dioxano. Para qualquer um destes compostos foram obtidos valores de IC₅₀ elevados face ao PLK e ao derivado 5, o que os exclui como potenciais candidatos a futuros fármacos, havendo até derivados que apenas tinham efeito parasiticida em concentrações demasiado altas sendo portanto considerados como biologicamente inactivos (10 e 12). [36]

Estes dados demonstram que é possível sintetizar de um modo económico e a partir de reagentes disponíveis no mercado, uma molécula com actividade antiplasmodial que pode ser utilizada para sintetizar artificialmente o PLK ou compostos análogos ao PLK. Os estudos relacionais de estrutura/actividade destes compostos elucidaram os aspectos estruturais fundamentais para a actividade farmacológica conferida pela estrutura destes fármacos e marcaram um novo passo para a descoberta de novas medidas para o combate à Malária. O PLK e os seus derivados podem estar na senda do desenvolvimento de novos tratamentos de última linha para doentes infectados pelas estirpes multirresistentes de *P.falciparum*. Se tal acontecer poderá ainda ser explorada a possibilidade de obter o PLK a partir de processos biotecnológicos, utilizando a incorporação dos segmentos genéticos da

Plakortis responsáveis pela sua produção em bactérias. Havendo esta possibilidade, a sua produção tomaria contornos economicamente rentáveis e sustentáveis, não se sucedendo o aumento dos custos da matéria-prima devido à sua escassez como está de momento a acontecer com a ART.

9.3. Ácidos peroxiplakortínicos

Existe uma classe de compostos que são estruturalmente semelhantes ao PLK, os derivados peroxicetal dos 1,2-dioxanos, os quais são obtidos a partir de esponjas do género *Plakortis* existentes no mar japonês da ilha de Okinawa. Os peroxicetais são caracterizados por possuírem um grupo substituinte alcóxido (-OCH₃) na posição 6 do anel 1,2-dioxano, o qual tem a função de mimetizar o efeito do átomo de oxigénio não peroxídico que o farmacóforo da ART possui na posição 4. O facto de este grupo não se incluir dentro do anel 1,2-dioxano provavelmente confere-lhe alguma flexibilidade estrutural que permite a formação de espécies radiculares semelhante às que se formam quando o ferro do vacúolo alimentar do parasita interage com o farmacóforo da ART. Destas esponjas japonesas foram isolados dois peroxicetais, os ésteres metilados de ácidos peroxiplakortínicos A₃ e B₃ (figura 25) que são isómeros estruturais. Após serem sujeitos a ensaios *in vitro* com *P.falciparum*, foi determinado que o composto A₃ teve um IC₅₀ de 0,15 µM enquanto o composto B₃ obteve um valor de 0,12 µM. Foram ainda efectuados testes para determinar o índice selectivo e de toxicidade destes compostos, verificando a sua influência em células infectadas com o parasita, e também na linhagem de células cancerígenas KB3-1. Foram determinando valores elevados de toxicidade nas células infectadas por *Plasmodium*, nomeadamente de 140 para o A₃ e de 250 para o B₃.^[39,40] Estes valores provam que estes ácidos peroxiplakortínicos para além de serem altamente selectivos

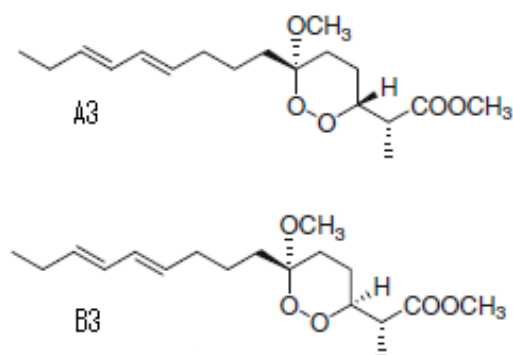


Figura 25. Estrutura dos ácidos peroxiplakortínicos A₃ e B₃.^[39]

para as hemácias infectadas, possuem actividade antimalárica em concentrações micromolares; é igualmente inferido que uma cadeia lateral alquílica com algum comprimento é importante para que estes ácidos tenham actividade farmacológica. Sucessivamente, estes compostos foram testados em ratinhos infectados com *P.berghei*, tendo sido determinado que o tempo de $t_{1/2}$ de A₃ e B₃ no plasma era reduzido devido à metabolização da função éster que existe na cadeia lateral mais curta.

Estes ácidos peroxiplakortínicos possuem um mecanismo de bioactivação e acção semelhante ao da ART e do PLK, ocorrendo a formação de radicais centrados em carbono através de um mecanismo similar ao proposto para o PLK. Existe a ligação do átomo de oxigénio na posição 2 do anel endoperóxido ao Fe(II), formando-se um radical centrado em O1. Esta espécie intermediária sofre rearranjo seguido de clivagem homolítica com a formação de um grupo carbonilo, o que depois conduzirá à formação de um éster estável e de um radical alquílico primário, extremamente reactivo. Ao formar um aducto com o Fe(II) e uma espécie radicalar de carácter alquilante, este tipo de compostos permite atacar o metabolismo do parasita de duas formas distintas, pelo que teoricamente têm um poder parasiticida elevado. [39]

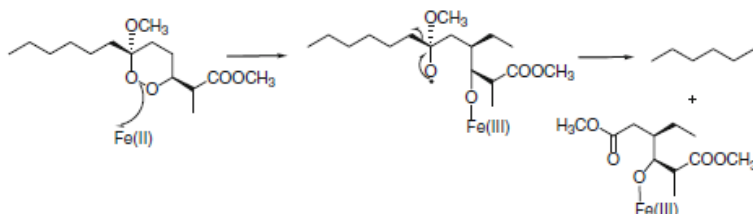


Figura 26. Mecanismo de acção postulado para os ácidos peroxiplakortínicos. [39]

Os resultados obtidos relativos à actividade biológica, aliados à estrutura simples destes compostos, encorajaram o desenho de uma série de análogos estruturais, tal como foi feito com o PLK. Estes compostos sintéticos clarificaram a importância de determinados aspectos estruturais para o potencial

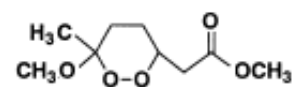


Figura 27. Estrutura do derivado sem cadeia lateral longa. [41]

farmacológico, biodisponibilidade e toxicidade ^[41]. O primeiro derivado (fig.27) a ser sintetizado possuía uma cadeia lateral curta e foi verificado que a sua actividade *in vitro* apenas se verificava para concentrações superiores a 2,4 µM (IC₅₀), sendo assim menos activo que os ácidos A₃ e B₃. Este dado permitiu inferir a importância estrutural de uma cadeia lateral longa. Ao mesmo tempo foi testada a actividade de um dioxano natural, o condrilino (fig.28), extraído de uma esponja do género *Xestospongia*, com o objectivo verificar a influência que a ligação dupla situada entre os carbonos das posições 4 e 5 teria na actividade biológica. Foi demonstrado no mesmo ensaio *in vitro* que só para concentrações superiores a 0,24 µM existia actividade antiplasmodial, sugerindo que a referida ligação dupla pode ser responsável pelo decréscimo verificado na actividade. Antes de mencionar os derivados sintéticos de A₃ e B₃, é importante referir que todos estes dados permitiram definir três requisitos estruturais para a actividade farmacológica e elevada selectividade de toxicidade dos ácidos peroxiplakortínicos ^[41,42]:

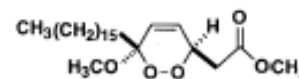
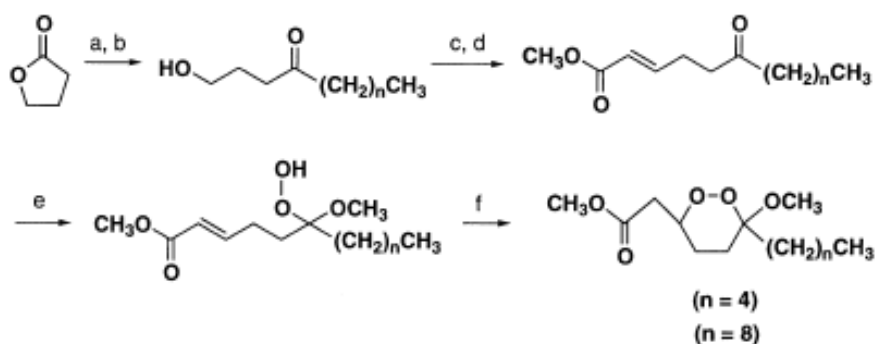


Figura 28. Estrutura do condrilino. ^[41]

- ✓ Um anel 1,2-dioxano
- ✓ Uma cadeia lateral alquílica que seja linear e possua um dieno conjugado
- ✓ Um grupo metilo situado no carbono alfa adjacente ao éster da cadeia lateral remanescente

Para efectuar os estudos de correlação estrutura/actividade, foi efectuada a síntese de dois ácidos peroxiplakortínicos, partindo da γ -butirolactona. A γ -butirolactona foi colocada em reacção com dimetiloxima e cloreto de dimetilalumínio, sendo assim convertida numa amina de Weinreb que é um substrato preferencial para a adição de carbono através de uma reacção de Grignard. Aqui o reagente de Grignard era o factor determinante para o tamanho da cadeia alquilada, pois é através desta reacção que a cadeia lateral é adicionada sob a forma de um reagente organometálico R-MgBr, obtendo-se dois produtos designados por N4 e N8, consoante o número de carbonos existentes na cadeia lateral (fig.29). O segundo derivado possuía uma cadeia lateral muito maior do que o primeiro, sendo depois ambos sujeitos a uma reacção de Wittig que vai introduzir o éster α,β -insaturado, fundamental para obter dois objectivos num só: possibilitar a formação do dioxano num primeiro passo e ficar com

o éster da segunda cadeia lateral. Ambos os derivados intermédios foram sujeitos a uma oxidação de forma a obter um grupo peróxido no lugar do carbonilo original da γ -butirolactona. Finalmente ambos os intermediários foram postos a reagir com dietilamina e 2,2,2-trifluoretanol, um álcool ácido que irá possibilitar a formação do 1,2-dioxano desejado. Esta é uma estratégia de síntese que compreende seis passos, com rendimentos médios situados entre 60% e 80%. Se os resultados biológicos de N4 e N8 forem positivos e o processo de síntese otimizado, estes derivados poderão ser promissores. ^[41]



A	MeNHOme; Me ₂ AlCl	D	PhP=COOCH ₃ ; CH ₂ Cl ₂
B	BrMg-R (R=(CH ₂) _n CH ₃) (n=4 ou n=8)	E	H ₂ O ₂ .H ₂ NCONH ₂ Sc(OTf) ₃ ; MeOH
C	COCl ₂ ; DMSO; Et ₃ N	F	Et ₂ NH; CF ₃ CH ₂ OH

Figura 29. Esquema da estratégia de síntese seguida para os derivados sintéticos dos ácidos peroxiplaokortínicos e tabela com abreviaturas. Os compostos foram designados neste trabalho como N4 (quando n=4) e N8 (quando n=8). ^[41]

Estes derivados são obtidos sob a forma de uma mistura racémica de isómeros *syn* e *anti*, tendo sido testada a actividade *in vitro*, com culturas de *P.falciparum*, da mistura e de cada isómero em separado. A actividade de cada isómero *syn* e *anti* em separado de N4 e N8 não é muito diferente da actividade da mistura racémica, contudo foi verificado que os isómeros *syn* possuem índices de selectividade toxicológica superiores aos isómeros *anti*. Dado que estereoquímica não parece interferir com a actividade antimalárica destes compostos, é possível concluir que os compostos N4 e N8 devem ser testados *in vivo* em modelos animais, de modo a determinar prioritariamente a sua estabilidade sérica. O IC₅₀ de N4 (mistura racémica) é de 0,12 μ M e para N8 é de 0,14 μ M. ^[41]

9.4. 1,2- Dioxanos com estrutura terpenóide

Foram identificados compostos de origem marinha com estrutura terpenóide que possuem um anel endoperóxido. Estes compostos foram classificados como duas novas classes de potenciais anti-maláricos de origem marinha, os norsesterpenos e os norditerpenos, e são extraídos da esponja do género *Diacarnus*.



Figura 30. Imagem de uma esponja do género *Diacarnus* de onde são isolados endoperóxidos com actividade antimalárica: *D. erythraeanus*.^[43]

9.5. Norsesterpenos – Sigmoidrelina

A partir da esponja *Diacarnus erythraeanus* foi extraída uma nova classe de dioxanos, os norsesterpenos. A sua actividade antimalárica foi testada em estirpes de *P. falciparum* utilizando dois destes norsesterpenos previamente extraídos da esponja *D. erythraeanus*: a sigmoidrelina B e o seu epímero, a sigmoidrelina A. A sigmoidrelina B possui actividade parasiticida para valores de IC₅₀ de 1200 ng/mL contra culturas da estirpe de *P.falciparum* CQS D6 e 3400ng/mL face à estirpe CQR W2. Por sua vez com a sigmoidrelina A foram obtidos valores de IC₅₀ de 470 ng/mL e de 420 ng/mL, utilizando as estirpes do parasita respectivas. Estes valores de actividade do composto são cerca de quatro vezes mais elevados, e a estes níveis a sigmoidrelina A não apresentou quaisquer indícios de citotoxicidade. Estes dados apontam para um potencial fármaco com uma selectividade bastante apreciável, sendo que a baixa citotoxicidade sugere a possibilidade de efeitos secundários muito reduzidos quando testado *in vivo*.^[42,44]

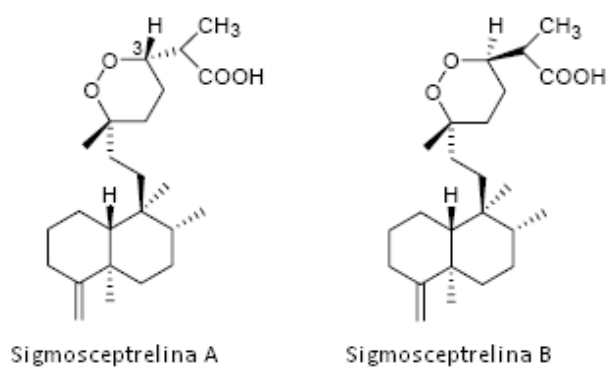


Figura 31. Estrutura da sigmoseptrelina. Esta imagem retrata a diferença estereoquímica existente entre os dois epímeros. ^[42]

9.6. Norditerpenos

A partir da esponja *Diacarnus levii*, endêmica dos mares da Nova Caledônia, foi extraída uma série de norditerpenos, que se encontram representados na figura 32. Alguns destes compostos foram isolados e caracterizados quanto à sua estrutura e estereoquímica de modo a esclarecer se diferentes isómeros podem exibir actividades biológicas diferentes. Deste conjunto de compostos foram seleccionados os compostos 1, 2, 3, 6, 10 (identificados na fig.32), assim como uma mistura dos compostos 3, 6 e 10 numa proporção respectiva de 47:33:20, para serem testados *in vitro* com estirpes CQS (HB3 e F32) e CQR (FCR3 e D2) de *P.falciparum*; o padrão utilizado foi uma vez mais a cloroquina. Estes compostos foram também testados em várias culturas de linhas celulares cancerígenas de modo a verificar se são selectivos para as células parasitárias. Nestes ensaios os valores de IC₅₀ foram expressos em µM e encontram-se na Tabela IV. ^[45]

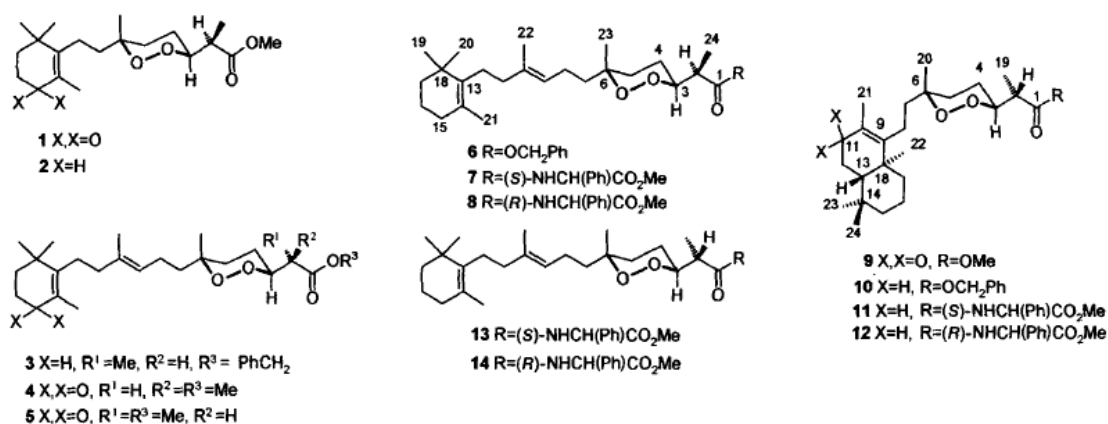


Figura 32. Estruturas dos compostos norditerpénicos extraídos da esponja *D.levii*. ^[45]

Tabela IV – Citotoxicidade dos compostos norditerpénicos contra células de *P. falciparum* de estirpes CQS e CQR e contra várias linhas de células tumorais (IC₅₀ µM). [45]

	CQ-sensitive <i>P. falciparum</i> ^{a)}		CQ-resistant <i>P. falciparum</i> ^{a)}		Tumour cell lines		
	HB3	F32	FCR3	D2	KB	HeLa	Hep-2
1	7.1	0.01	21		> 70	> 70	> 70
2	7.4		7.2		> 74	> 74	> 74
3		124		73	2.1 ^{b)}		
6		73		62			
10		11		6.4			
Mixture ^{c)}	2.9		1.4		2.5	3.1	2.1
CQ	0.03		0.23	0.21		> 0.1 [11]	

^{a)} CQ = Chloroquine.

^{b)} Experiment performed in Noumea (all other experiments done in La Paz).

^{c)} 47:33:20 Mixture of free acids corresponding to **3**, **6**, and **10**, respectively.

Desta série de compostos foi determinado que o composto 10, o desoxidiacarboato de β-benzilo, foi o mais eficaz na eliminação do parasita, com um valor de IC₅₀ de 11 µM face à estirpe F32 e de 6,4 µM utilizando a estirpe resistente D2. Como seria de esperar, a mistura dos norditerpenos 3, 6 e 10 obteve os melhores resultados contra o parasita, IC₅₀ 2,9 µM com a estirpe HB3 e 1,4 µM contra a estirpe FCR3, contudo esta mistura não foi utilizada para posteriores ensaios *in vivo* dado que demonstrou citotoxicidade a baixas concentrações (entre 2,1 e 3,1 µM), podendo acarretar riscos para um hospedeiro do parasita. Estas provas de citotoxicidade foram, como já foi referido neste trabalho, retiradas de testes *in vitro* com várias linhagens celulares cancerígenas conhecidas, para determinar se estes endoperóxidos são selectivos apenas para as células de *Plasmodium*, fornecendo igualmente informação sobre uma eventual actividade anti-neoplásica que estes endoperóxidos possam ter. É de salientar que o deoxidiacarboato de β-benzilo não foi sujeito aos ensaios de citotoxicidade anteriormente referidos, pelo que estes testes seriam importantes para determinar se este endoperóxido é de facto seguro para testes *in vivo*, dada a boa actividade antiplasmodial apresentada, sobretudo em estirpes CQR, a resistência mais frequente às terapêuticas correntes. [45]

O epinuapapunoato de 3-metilo (composto 2) foi seleccionado para ensaios *in vivo* em ratinhos infectados com *P.berghei* com consequência de ter apresentado níveis de citotoxicidade apenas para concentrações elevadas e valores de IC₅₀ de 7,2 µM e 7,4 µM, contra estirpes as HB3 e FCR3, respectivamente. Deve ainda ser referido que o epinuapapunoato de 3-metilo é de todos os ésteres norditerpénicos o mais abundante na esponja *D.levii*. Este facto, aliado às actividades *in vitro* demonstradas contra estirpes CQS e CQR, suportaram estudos detalhados neste composto. Os ensaios *in vivo* efectuados demonstraram que o epinuapapunoato de 3-metilo, em dosagens de 25 mg/kg, 50 mg/kg e 100 mg/kg, provocava 56% de inibição do crescimento parasitário com sobrevivência de todos os ratinhos, 49% de inibição do crescimento parasitário com a morte de um indivíduo e a morte de todos os indivíduos por fenómenos hemorrágicos, respectivamente. É possível assim inferir que a dose de 25 mg/kg é a mais adequada para ser o ponto de partida para mais ensaios com modelos animais e que em sobredosagem o epinuapapunoato de 3-metilo pode interferir de modo significativo com a cascata de coagulação dos mamíferos, tal como ocorreu com os ratinhos utilizados. ^[45]

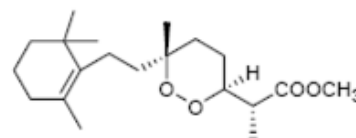


Figura 33. Estrutura do epinuapapunoato de 3-metilo. ^[42]

Com base nos dados de bioactividade, é possível afirmar que o epinuapapunoato de 3-metilo, o deoxidiacarnoato de β-benzilo e a referida mistura dos ésteres 3, 6 e 10 são mais eficazes em estirpes de *Plasmodium* CQR. Estes dados sugerem um mecanismo de acumulação, bioactivação e acção com o ferro no parasita diferente das aminoquinolinas (cloroquina, mefloquina) e também apontam para a possível existência de algum factor membranar expresso nas estirpes CQR que facilite a entrada destes ésteres no parasita. ^[45] Indicam ainda que os ésteres norditerpénicos, apesar de possuírem um farmacóforo com um núcleo endoperoxídico mais simples, podem conduzir a processos de stress oxidativo semelhantes aos que os 1,2,4-trioxolanos provocam no interior do vacúolo alimentar do parasita. ^[45,46] Estes ésteres norditerpénicos podem eventualmente afirmar-se como uma nova classe de antimaláricos para combater estirpes de *Plasmodium* resistentes. Serão assim necessários estudos relacionais de estrutura/actividade, à semelhança do que

aconteceu com o PLK, partindo do epinuapapunoato de 3-metilo e do deoxidiacarnato de β -benzilo, para poderem ser suportados os processos de optimização farmacodinâmica e farmacocinética.

10. Emergência e importância dos compostos de origem marinha

Antes de concluir este trabalho gostaria de referir o exemplo de um composto com origem marinha aprovado para o tratamento corrente de uma patologia: a eribulina. A eribulina é um fármaco obtido a partir de esponja *Halichondria okadai* e é um antimitótico que interfere selectivamente com a dinâmica dos microtúbulos do citoesqueleto de células neoplásicas, afectando deste modo a sua replicação. Este fármaco é utilizado no tratamento do cancro da mama metastisado, sendo utilizado como uma terapêutica de 3ª linha quando a administração de outros fármacos citóxicos já não é eficaz. Ao ser utilizada para o tratamento do cancro da mama, uma das formas de cancro mais frequente e mortal da actualidade, a eribulina revela a importância que os compostos com origem marinha podem ter para a descoberta de novos fármacos e para o tratamento de doenças graves. O facto de a eribulina ser o primeiro fármaco a ser obtido a partir de uma esponja e o terceiro fármaco com origem em invertebrados aquáticos a ser comercializado, confirma essa importância.

[47]

11. Conclusão

As terapêuticas clássicas contra o parasita da malária estão a revelar-se ineficazes dado que a emergência de resistências por parte do *P. falciparum* é cada vez maior. Deste modo, a busca de novos fármacos passíveis de serem utilizados em monoterapia ou nos regimes de ACT é fundamental para contornar este fenómeno de selecção de resistências. O OZ439 e o RKA 182, um trioxolano e um tetraoxano, respectivamente, estão na fase final de ensaios clínicos para determinar se podem ser utilizados em protocolos de quimioterapia da Malária devido às suas características farmacológicas e baixos custos de produção. É de salientar que quanto maior for o arsenal terapêutico disponível para tratar a Malária em intervalos curtos de tempo, ou usar em profilaxia, mais vidas irão ser salvas, ao mesmo tempo que a longo prazo o número de resistências parasitárias irá surgir mais lentamente, tornando as terapêuticas mais eficazes e duradouras.

Os 1,2-dioxanos com origem marinha são potenciais antimaláricos que estão a ser alvo de estudos de correlação estrutura/actividade, de modo a determinar quais os requisitos estruturais que cada 1,2-dioxano deve possuir para que o seu potencial antiplasmodial seja maximizado e a farmacocinética optimizada. Devido à sua estrutura simples e possibilidade de obtenção por meios economicamente sustentáveis, quer seja por síntese química quer por meios biotecnológicos, os 1,2-dioxanos são compostos promissores no tratamento futuro da malária. Se for verificada a sua eficácia farmacológica em seres humanos, estes endoperóxidos podem representar uma nova classe de fármacos antimaláricos.

O facto de os 1,2-dioxanos terem um mecanismo de acção semelhante aos endoperóxidos já utilizados no tratamento da malária, nomeadamente a ART e seus derivados, é uma característica que estimula o estudo da sua actividade em sistemas biológicos. No caso dos ácidos peroxiplakortínicos foi proposto um mecanismo onde existe, simultaneamente, a bioactivação com o Fe(II) no vacúolo alimentar do parasita e a formação de um radical alquilante. Em conjunto com o PLK e seus derivados, os ácidos peroxiplakortínicos podem ser considerados compostos promissores para

ensaios clínicos que determinarão os seus parâmetros farmacocinéticos, farmacodinâmicos e a sua toxicidade no organismo humano.

Para os restantes 1,2-dioxanos conclui-se que as sigmosceptrelinas devem ser alvo de estudos *in vivo* de modo a determinar, em primeira instância, quais as dosagens que têm eficácia terapêutica sem provocar efeitos tóxicos. Os norditerpenos necessitam de ser sujeitos a ensaios relacionais de estrutura e actividade, como aconteceu com o PLK, de modo a determinar-se quais são as optimizações estruturais que irão garantir que o epinuapapuanoato de 3-metilo e o deoxidiacarnoato de β -benzilo tenham um perfil farmacocinético e farmacodinâmico optimizado.

É de salientar que a aprovação da eribulina para o tratamento de uma forma de cancro denota a importância que os compostos com origem marinha podem ter para o desenvolvimento de novos fármacos que podem ser utilizados no tratamento de patologias graves. Pensamos que a prospecção de metabolitos secundários de origem marinha para fins farmacológicos e biotecnológicos é uma área com elevado potencial.

12. Bibliografia

1. World Health Organization; Malaria – World Malaria Report 2009; http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2009/en/; consultado entre Setembro de 2010 e Março de 2011
2. *Ilustração do ciclo de vida do parasita responsável pela Malária*; <http://pywcghana.tripod.com/id5.html>; consultado entre Setembro de 2010 e Março de 2011
3. Schimdt, G.D.; Roberts, L.S.; Janovy Jr., J.; (2004); *Foundations of Parasitology*, McGraw-Hill Science, 2004, 7ª Ed., pp. 147-164
4. Rosenthal, P.J.; Meshnick, S.R.; (1996); “Hemoglobin catabolism and iron utilization by malaria parasites”; *Molecular and Biochemical Parasitology*; **83(2)**: 131-139
5. Nomarck, J.; *et alli*; (2007); “PfEMP1-DBL1 α amino acid motifs in severe disease states of *Plasmodium falciparum* malaria”; *Processing of the National Academy of the United States of America*; **104(40)**: 15835-15840
6. Ochola, L. B.; Gweno, T.; (2005); “Estimating the sequestered load in *Plasmodium falciparum* Malaria”; *Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel*; Basel
7. Mehlhorn, H.; (2008); *Encyclopedia of Parasitology*; 3rd Ed.; Springer; Volume I: 451, 749 – 752;
8. *Imagem da fêmea do mosquito do género Anopheles* - <http://science.nationalgeographic.com/science/photos/malaria/>, consultado em 30/05/2011
9. *Prontuário Terapêutico*; 9ª Edição; Infamed; Março de 2009: 71-73
10. World Health Organization – Vector Control of Malaria; http://www.who.int/malaria/diagnosis_treatment/en/index.html; Consultado entre Março e Abril de 2011

11. *British National Formulary – 57th Edition*, BMJ Group and RPS Publishing, Março de 2009
12. *Formulário Hospitalar Nacional do Medicamento*; (2006); 9ª Edição; Infarmed
13. Bunton, L.L.; Lazo, J.S.; Parker, K.L.; (2006); *The Goodman & Gilman's Manual of Pharmacology and Therapeutics*; 11th Ed.; McGraw-Hill Medical
14. Opsenica, D.M.; Solaja, B.A.; (2009); "Antimalarial Peroxides – Review"; *Journal of the Serbian Chemistry Society*; **74(11)**: 1155 – 1193
15. Zhang, S.; Gerhard, G. (2008); "Heme activates artemisinin more efficiently than hemein, inorganic iron, or hemoglobin"; *Bioorganic Medical Chemistry*; **16**: 7853-61
16. Krishna, S.; *et alli*; (2004); "Artemisinins: Mechanisms of action and potential for resistance"; *Elsvier*; 233-244
17. O'Neill, P.; Barton, V.; Ward, S.; (2010); "The molecular mechanism of action of artemisinin – The debates continues"; *Molecules*; **15**: 1705 - 1721
18. Olliaro, P.L.; *et alli*; (2001); "Modes of action of the artmisinin-type compounds"; *Trends in Parasitology*; **17(3)**: 122- 126
19. Rosenthal, P.J.; (2010); "Artesunate for the treatment of severe malaria"; *The New England Journal of Medicine*; **358(17)**: 1829-1836
20. Hastings, I.; (2011); "How Artemisinin-containing combination therapies slow the spread of antimalarial drug resistance"; *Trends in Parasitology*; **27(2)**: 67-72
21. *Guidelines for Malaria Treatment*; (2010); World Health Organization; 2nd Ed.
22. Tshefu, A.K.; *et alli*; (2010); "Efficacy and safety of a fixed-dose oral combination of pyronaridine-artesunate compared with artemether-lumefantrine in children and adults with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria: a randomised non-inferiority trial"; *Lancet*; **371**: 1457-1467

23. Dondorp, A.M.; *et alli*; (2010); "Artesunate versus quinine in the treatment of severe *falciparum* malaria in African children (AQUAMAT): an open-label, randomized trial"; *Lancet*; **376**: 1647-1657
24. Tang, Y.; Vernnerstrom, J.L.; *et alli*; (2007); "Weak base dispiro-1,2,4-trioxolanes: Potent antimalarial ozonides"; *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*; **17**: 1260 – 1265
25. Creek, D.J.; Vernerstrom, J.L.; *et alli*; (2007); "Relationship between Antimalarial Activity and Heme Alkylation for Spiro- and Dispiro-1,2,4-Trioxolane Antimalarials"; *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, **52 (4)**: 1291–1296
26. Dong, Y.; Vernnerstrom, J.L.; *et alli*; (2006); "Effect of functional group polarity on the antimalarial activity of spiro and dispiro-1,2,4-trioxolanes"; *Bioorganic & Medicinal Chemistry*; **14**: 6368–6382
27. Uhlemann, A.C.; *et alli*; (2006); "Mechanism of Antimalarial Action of the Synthetic Trioxolane RBX11160 (OZ277)"; *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; **51 (2)**: 667–672
28. Zhou, L.; Vernnerstrom, J.L.; *et alli*; (2008); "Characterization of the two major CYP450 metabolites of ozonide (1,2,4-trioxolane) OZ277"; *Bioorganic Medical Chemistry Letter*; **18(5)**: 1555-8
29. Dong, Y.; Vernnerstrom, J.L.; *et alli*; (2010); "The structure-activity relationship of the antimalarial ozonide arterolane (OZ277)"; *Journal of Mededical Chemistry*, **53(1)**: 481-91
30. O'Neill, P.; *et alli*; (2010); "Identification of a 1,2,4,5-Tetraoxane Antimalarial Drug-Development Candidate (RKA 182) with Superior Properties to the Semisynthetic Artemisinins"; *Angewandte Chemie*; **49**
31. Charman, S.A.; *et alli*; (2010); "Synthetic ozonide drug candidate OZ439 offers new hope for a single-dose cure of uncomplicated malaria"; *Processing of the National Academy of the United States of America*; **108 (11)**: 4000 - 4405

32. O'Neill, P.; *et alli*; (2006); "Design and synthesis of orally active dispiro 1,2,4,5-tetraoxanes; synthetic antimalarials with superior activity to artemisinin"; *Organic & Biomolecular Chemistry*, **4**: 4431–4436
33. Opsenica, D.; *et alli*; (2007); "Chemical Stability of the Peroxide Bond Enables Diversified Synthesis of Potent Tetraoxane Antimalarials"; *Journal of Medical Chemistry*; **5**: 2261–2266
34. Borstnik, K.; *et alli*; (2002); "Antimalarial chemotherapeutic peroxides: artemisinin, Yingzhaosu A and related compounds"; *International Journal for Parasitology*; **32**: 1661–1667
35. BioWeb; *Imagem da esponja Plakortis simplex* - http://bioweb.uwlax.edu/bio203/2011/pluym_conn/interactions.htm ; consultado em Abril de 2011
36. Fattorusso, E.; Fattorusso C.; *et alli*; (2011); "Antimalarials based on the Dioxane scaffold of *plakortin*. A concise synthesis and SAR studies"; *Elsevier - Bioorganic & Medicinal Chemistry*; **19**: 312-320
37. Fattorusso, E.; *et alli*; (2002); "Activity against *Plasmodium falciparum* of cycloperoxide compounds obtained from the sponge *Plakortis simplex*"; *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; **50**: 883–888
38. Gemma, S.; *et alli*; (2009); "Synthetic studies toward 1,2-dioxanes as precursors of potential endoperoxide-containing antimalarials"; *Elsevier – Tetrahedron Letters*; **50**: 5719-5722
39. Fattorusso, E.; Tagliatela-Scafati, O.; (2010); "Marine endoperoxides as antimalarial lead compounds"; *Photo Chemistry Review*; **9**: 515-524
40. Muramaki, N.; *et alli*; (2001); "Facile construction of 6-carbomethoxymethyl-3-methoxy-1,2-dioxane, a core structure of spongean anti-malarial peroxides"; *Tetrahedron Letters*; **42**: 7281-7285
41. Muramaki, N.; *et alli*; (2002); "New readily accessible peroxides with high antimalarial potency"; *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*; **12**: 69–78

42. Fattorusso E.; Tagliatela-Scafati, O.; (2009); "Marine Antimalarials"; *Marine Drugs*; **7**: 130-152
43. *Fotografia da esponja Diacarnus erythraeanus* - <http://www.dafni.com/spongia/Tetractinomorpha.htm>; acedido em Maio de 2011
44. El Sayed, K.A.; Hamman, M.T.; *et alli*; (2001); "Antimalarial, antiviral, and antitoxoplasmosis norsesterterpene peroxide acids from the Red Sea sponge *Diacarnus erythraeanus*"; *Journal of Natural Products*; **64**: 522-524
45. D'Ambrosio, M.; Guerreiro, A.; *et alli*; (1998); "New types of potentially antimalarial agents: Epidioxy-substituted norditerpene and norsesterterpenes from the marine sponge *Diacarnus levii*"; *Helvetica Chimica Acta*; **81**: 1285-1292
46. Laurent, D.; Pietra, F.; (2006); "Antiplasmodial Marine Natural Products in the Perspective of Current Chemotherapy and Prevention of Malaria – A Review"; *Springer*; **8**: 433-447
47. Food and Drug Administration – *FDA approves new treatment for late stage breast cancer*; <http://www.fdanews.com/>; consultado em Maio de 2011