



# **FÁRMACOS HÍBRIDOS PARA O TRATAMENTO DA MALÁRIA BASEADOS EM COMPLEXOS DE IÕES METÁLICOS**

Ana Catarina Ataíde Madaíl Barbosa

Dissertação para obtenção de grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

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

2023





# **FÁRMACOS HÍBRIDOS PARA O TRATAMENTO DA MALÁRIA BASEADOS EM COMPLEXOS DE IÕES METÁLICOS**

Ana Catarina Ataíde Madaíl Barbosa

Dissertação para obtenção de grau de Mestre em Ciências  
Farmacêuticas

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

2023



# FÁRMACOS HÍBRIDOS PARA O TRATAMENTO DA MALÁRIA BASEADOS EM COMPLEXOS DE IÕES METÁLICOS

## **Declaração de autoria de trabalho:**

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

---

(Ana Catarina Barbosa)

© 2023 Copyright: Ana Catarina Ataíde Madaíl Barbosa

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



## **Agradecimentos**

Para a realização deste trabalho, algumas pessoas me ajudaram, sem as quais não teria sido fácil concretizá-lo.

Dedico o meu especial agradecimento, à professora Doutora Maria de Lurdes Cristiano, minha orientadora neste projeto. O seu profissionalismo e disponibilidade, contribuíram grandemente para a elaboração deste trabalho.

Agradeço aos meus amigos, e colegas pelo companheirismo que tiveram para comigo.

Agradeço às minhas orientadoras de estágio Doutora Paula Campos e Doutora Isa Vaz, por todos os ensinamentos dados e o carinho sempre demonstrado.

Aos meus pais, que foram essenciais nesta longa jornada, e foram o suporte para que chegasse até aqui, tendo sempre me motivado nos momentos mais difíceis e terem estado sempre ao meu lado.

E, por fim, quero agradecer à Universidade do Algarve.

Esta vitória é também vossa!



## Resumo

A malária é uma das doenças mais antigas e prevalentes do mundo. A transmissão para os humanos ocorre através da picada de um mosquito fêmea *Anopheles* infectado por parasitas do gênero *Plasmodium*. As espécies infectantes *P. falciparum* e *P. vivax* são as que constituem maior ameaça, originando as maiores taxas de morbidade e mortalidade. Os casos de malária são de maior prevalência nas zonas tropicais e subtropicais de países em desenvolvimento, constituindo a doença um entrave ao desenvolvimento desses países.

O tratamento atual para a malária passa pelo uso de cloroquina (CQ) ou terapia combinada à base de Artemisinina (ACT), sendo que para casos de malária não complicada provocada por *P. falciparum*, o tratamento recomendado para as crianças e adultos, excetuando grávidas no primeiro trimestre de gestação, envolve o uso de uma das várias terapêuticas ACT, como por exemplo a associação Arteméter + Lumefantrina (LF). A seleção para resistências à CQ e à artemisinina e seus derivados semissintéticos, decorrente de mutações induzidas pelo parasita, têm conduzido a perda de eficácia destes compostos no tratamento da malária. Desta forma, é primordial compreender os diferentes mecanismos de ação dos antimaláricos e as suas limitações, com vista a melhorar as propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas dos compostos em uso, através da inserção de novas entidades farmacológicas que possam por sinergismo melhorar a resposta final da terapêutica, ou através do desenvolvimento de novos fármacos, preferencialmente moléculas capazes de atuar em alvos terapêuticos do parasita menos explorados.

A presente dissertação resume as terapêuticas atuais para o tratamento da malária e as novas moléculas híbridas que têm sido propostas, com especial foco nos complexos híbridos contendo entidades metálicas na sua estrutura, discutindo a sua atividade antiplasmodial e potencial terapêutico, face à atividade dos antimaláricos já existentes, como a CQ.

**Palavras-chave:** Malária, *Plasmodium spp.*, resistências a antimaláricos, cloroquina, terapias ATC, complexos metálicos.



## Abstract

Malaria is one of the oldest and most prevalent diseases in the world. It is transmitted to humans through the bite of female *Anopheles* mosquitoes infected with parasites of the genus *Plasmodium spp.*

The species *P. falciparum* and *P. vivax* are the ones that constitute the greatest threat, leading to the highest rates of morbidity and mortality. Cases of malaria are more prevalent in tropical and subtropical areas of developing countries, representing a burden to the welfare of the populations and the development of countries affected.

Current treatment for malaria involves the use of chloroquine (CQ) or Artemisinin-based Combination Therapy (ACT). For uncomplicated malaria due to infection by *P. falciparum*, the recommended treatment for children and adults, excepting for women in the first trimester of pregnancy, involves the use of an ACT, for instance the association of Artemeter + Lumefantrine. Development of resistance to CQ and artemisinin by the parasite has rendered these compounds less effective against malaria. As such, it is essential to understand the different mechanisms of action of current antimalarials, as well as their limitations, with a view to improving the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of the antimalarial chemotypes in use, promote their association with new entities that can synergistically improve the therapeutic response, or develop novel compounds, preferably acting on different therapeutic targets of the parasite.

The present dissertation summarizes the chemotherapeutic solutions in use for treatment of malaria as well as the novel compounds under development for malaria chemotherapy, with special focus on the design of hybrid molecules incorporating metallic entities in their structure, discussing their respective antiplasmodial activity and properties, *vis a vis* the activity of the already existing antimalarials, like CQ.

**Keywords:** Malaria, Plasmodium, Antimalarial drug resistance, chloroquine, ACT therapies, metallic complexes.



## Índice de figuras

<b>Figura 1.1-</b> Representação gráfica da distribuição do número de infecções por malária nos países endêmicos no ano de 2020, de acordo com dados da WHO .....	3
<b>Figura 1.2-</b> Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i> .....	9
<b>Figura 2.1-</b> Representação estrutural dos antimaláricos classificados com base na atividade contra os diferentes estádios de vida do parasita e de acordo com o grupo químico a que pertencem .....	15
<b>Figura 2.2-</b> Esquema representativo da via de degradação da Hb no VD do parasita <i>P. falciparum</i> .....	16
<b>Figura 2.3-</b> Representação esquemática da estrutura da hematina e das interações químicas que ocorrem para a formação do cristal neutro, a hemozoína .....	17
<b>Figura 2.4-</b> Representação esquemática da cadeia transportadora de elétrons, na mitocôndria do parasita <i>Plasmodium</i> .....	19
<b>Figura 2.5-</b> Representação do complexo citocromo bc1 .....	20
<b>Figura 3.1-</b> Efluxo da PPQ e CQ pelo transportador PfCRT .....	27
<b>Figura 3.2-</b> Informação de estudos de relação estrutura-atividade (SAR) no grupo das 4-aminoquinolinas .....	28
<b>Figura 3.3-</b> Resumo de resultados de estudos de relação estrutura-atividade no quimiotipo chalcona .....	29
<b>Figura 3.4-</b> Representação estrutural de um conjugado de 4-aminoquinolina-chalcona que incorpora um grupo triazol entre os dois farmacóforos .....	29
<b>Figura 3.5-</b> Resumo de resultados dos estudos de relação estrutura-atividade (SAR) dos derivados de híbridos quinolina-pirimidina .....	30
<b>Figura 3.6-</b> Representação estrutural do conjugado de 4-aminoquinolina-isatina .....	31
<b>Figura 3.7-</b> Representação estrutural de híbridos baseados em azalida de 15 membros e quinolina .....	32
<b>Figura 4.1-</b> Representação estrutural da reação entre o ferro ferroso e a dihidroartemisinina (DHA) .....	34
<b>Figura 4.2-</b> Representação estrutural dos derivados da artemisinina .....	35



<b>Figura 4.3-</b> Representação estrutural do mecanismo de bioativação e de ação do trioxolano sintético .....	36
<b>Figura 4.4-</b> Representação da formação do híbrido MQ-artesunato como sal orgânico.....	37
<b>Figura 5.1-</b> Representação estrutural da diversidade geométrica dos complexos organometálicos .....	39
<b>Figura 5.2-</b> Mecanismos de ação propostos para os complexos de platina e de ouro, através da interação com diferentes alvos terapêuticos cancerígenos .....	41
<b>Figura 5.3-</b> Representação estrutural de um dos complexos de [Ru(III)Cl] coordenado a uma unidade Cp* com seletividade para <i>Plasmodium</i> .....	43
<b>Figura 5.4-</b> Gráficos representativos da constante de ligação ( $K_c$ ) em função do valor de $IC_{50}$ dos complexos de Ru(III)Cp* estudados (Gráfico A) e, absorvância em função do comprimento de onda (nm) para o complexo 33 (Gráfico B) .....	43
<b>Figura 5.5-</b> Representação do Ferroceno (34) e do seu mecanismo de ação, que envolve formação de ROS .....	45
<b>Figura 5.6-</b> Representação estrutural do híbrido em que o ferroceno é acoplado a um derivado de artemisinina através de ligações éster e amida .....	46
<b>Figura 5.7-</b> Representação estrutural da ferroquina .....	47
<b>Figura 5.8-</b> Representação estrutural do conjugado organometálico de ferroquina e cloroquina .....	48
<b>Figura 5.9-</b> Representação estrutural do conjugado de FQ-(tio-semicarbazona) (38) e do conjugado ferrocenil-(tio-semicarbazona) (39) .....	49
<b>Figura 5.10-</b> Representação estrutural do híbrido de FQ com um inibidor da GR que revelou maior atividade, e capacidade inibidora de GR .....	50
<b>Figura 5.11-</b> Representação do mecanismo de ação do ferrocifeno, baseado num processo redox .....	51
<b>Figura 5.12-</b> Mecanismos de ativação celular dos complexos de Ru .....	53
<b>Figura 5.13-</b> Representação estrutural de híbridos antimaláricos de rutenoceno-aminoquinolina-trioxolano desenhados a partir de unidades isoladas de CQ e ART ....	55
<b>Figura 5.14-</b> Representação estrutural dos compostos organometálicos de Ru, Ir e Rh conjugados com um ligando de 2-(2-piridil) benzimidazol .....	57
<b>Figura 5.15-</b> Representação estrutural de complexos de gálio (III) e Fe(II), com atividade antimalárica .....	58



<b>Figura 5.16-</b> Representação estrutural do complexo de Cu(I)-CQ-PPh <sub>3</sub> .....	59
<b>Figura 5.17-</b> Representação estrutural dos complexos de Ni(II) com variação do grupo amina terminal .....	61
<b>Figura 5.18-</b> Representação estrutural do complexo de auranofina (49) e do complexo 2-piridilfosfina de Au(I) bisquelato (50).....	63
<b>Figura 5.19-</b> Representação estrutural de complexos de Rh e Ir conjugados com CQ.....	64
<b>Figura 5.20-</b> Complexo de Co(III) com atividade antiparasitária demonstrada ....	65
<b>Figura 5.21-</b> Representação do mecanismo de troca axial lábil de um ligando por um resíduo de histidina .....	66
<b>Figura 5.22-</b> Representação estrutural de um quelante de ferro, a desferrioxamina, e do correspondente derivado do ácido N-metilantranílico, com propriedades antimaláricas melhoradas .....	67
<b>Figura 5.23-</b> Representação estrutural do híbrido acoplado a um esqueleto de um quelante de Cu (TDMQ) .....	68
<b>Figura 5.24-</b> Representação da estratégia de síntese do ligando 2-hidroxibenzaldeído-ferrocenil-sulfonilhidrazona (HL) .....	69
<b>Figura 5.25-</b> Representação da estratégia de síntese, em etanol (EtOH), usando uma razão estequiométrica 2HL:1M, de complexos de Ni(II), Pd(II), e Cu(II), de fórmula geral [ $\{(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Fe}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{-S(O)}_2\text{N(H)NC(H)-o-C}_6\text{H}_4\text{-O}\}$ ] 2M] .....	70
<b>Figura 5.26-</b> Representação da estrutura química de fosfolípidos usados em quimioterapia da malária .....	72
<b>Figura 5.27-</b> Representação estrutural de nanopartículas de Au à base de glicosídeo (Glc-NCs).....	74
<b>Figura 5.28-</b> Conjugação com ciprofloxacina (Cipro@Glc-NCs) .....	75



## Índice de tabelas

<b>Tabela 1.1-</b> Síntese das diferentes características das espécies de <i>Plasmodium</i> ..	6
<b>Tabela 1.2-</b> Duração das fases do ciclo de vida das várias espécies de <i>Plasmodium</i> .....	11
<b>Tabela 2.1-</b> Antimaláricos e correspondentes mecanismos de ação, para os diferentes alvos terapêuticos do parasita .....	22
<b>Tabela 5.1-</b> Valores de IC <sub>50</sub> da ciprofloxacina e Cipro@Glc-NCs após exposição à linhagem 3D7 de <i>P. falciparum</i> .....	76



## **Abreviaturas**

**ACTs-** Terapias combinadas à base de artemisinina

**ADQ-** Amodiaquina

**ADMET-** Análise de bioatividades e estudos farmacológicos

**AQ-** Atovaquona

**ART-** Artemisinina

**ARTs-** Artemisinina e derivados semissintéticos

**Cipro@Glc-NCs-** Nanopartículas de ouro à base de glicosídeo conjugadas com ciprofloxacina

**CQ-** Cloroquina

**COD-** Ciclooctadieno

**CoQ8-** Ubiquinona

**Cp\*-** Pentametilciclopentadienilo

**CTE-** Cadeia de transporte de elétrons

**CyRPA-** Antígeno rico em cisteína

**DFO-** Desferrioxamina

**DHA-** Dihidroartemisinina

**DNA-** Desoxirribonucleotídeos

**DOPC-** 1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfolina

**DOTAP-** 1,2-dioloil-3-trimetilamônio-propano

**DPPE-MPB-** 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[4-(p-maleimidofenil) butiramida]

**DSPC-** 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfolina



**EBA-175 e DBL-EBP**- Antígeno e proteínas de ligação a eritrócitos

**EtOH**- Etanol

**FQ**- Ferroquina

**G6PD**- Enzima glicose-6-fosfato desidrogenase

**Glc-NCs**- Nanopartículas de Au ultrapequenas á base de glicosídeo

**GR**- Dissulfeto redutase

**GSH**- Glutathiona reduzida

**GSSH**- Glutathiona dissulfeto

***Hamp***- Peptídeo antimicrobiano de hepcidina

**Hb**- Hemoglobina

**HF**- Halofantrina

**HL**- 2-hidroxibenzaldeído-ferrocenil-sulfonilhidrazona

***Lcn2***- Proteína reguladora de ferro Lipocalina 2

**LF**- Lumefantrina

**MA**- Ácido N-metilantranílico

**MQ**- Mefloquina

**MPAG**- Malaria Policy Advisory Group

**OXPHOS**- Via de fosforilação oxidativa

**PBO**- Butóxido de piretróide-piperonilo

**PfDHODH** - Di-hidroorotato desidrogenase

**PfG3PDH**- Glicerol-3-fosfato desidrogenase

**PfMQO**- Malato quinona oxidoreductase

**PfNDH2**- NADH ubiquinona oxidoreductase



**PfRh5**- Homólogo de ligação de reticulócitos 5

**PfTrxR**- Tioredoxina redutase

**PG**- Proguanilo;

**PGMs**- Metais do grupo da platina

**pLDH**- Desidrogenase de lactato plasmodial

**PM**- Pirimetamina

**Poc**- *Plasmodium ovale curtisi*

**Pow**- *Plasmodium ovale wallikeri*

**PPh<sub>3</sub>**- Trifenilfosfina

**PPIX**- Protoporfirina IX

**PPQ**- Piperaquina

**PQ**- Primaquina

**Q**- Quinina

**QN**- Quinidina

**RipA**- Alquilação de proteínas induzida por radicais

**ROS**- Espécies reativas de oxigénio

**RQ**- Rutenoquina

**SAGE**- Strategic Advisory Group of Experts on Immunization

**SDH**- Succinato: Ubiquinona oxidoreductase

**SF**- Sulfaleno

**SFO**- Sulfadoxina

**Soy-PC**- L- $\alpha$ -fosfatidilcolinas

**TC**- Tetraciclina

**TDMQ**- Agentes quelantes de cobre



***Tfr1***- Receptor de transferrina 1

**VD**- Vacúolo digestivo

**WHO / OMS**- World Health Organization / Organização Mundial de Saúde

**XA**- Ácido xanturénico



## Índice

Agradecimentos.....	I
Resumo.....	III
Abstract.....	V
Índice de figuras.....	VII
Índice de tabelas.....	XIII
Abreviaturas.....	XV
Índice.....	XXIII
1. Introdução.....	1
1.1. Breve nota sobre a história da malária.....	1
1.2. Epidemiologia da malária.....	3
1.2.1 O parasita.....	4
1.2.2. Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i> .....	9
2. Terapêutica antimalárica.....	13
2.1. Principais grupos farmacológicos disponíveis para o tratamento da malária.....	13
2.2. Classes de antimaláricos, de acordo com os principais processos biológicos em que interferem e alvos moleculares em que atuam.....	15
2.2.1. Degradação da hemoglobina e síntese da hemozoína.....	15
2.2.2. Fármacos que atuam por inibição da destoxificação do grupo heme ..	18
2.2.3. Fármacos que interagem com a cadeia de transporte de elétrons do parasita.....	18
2.2.3.1. Metabolismo do parasita <i>Plasmodium</i> .....	18
2.2.3.2. Complexo III ou complexo citocromo bc1, ou ubiquinol, como alvo terapêutico.....	20

2.2.3.3. Outros alvos terapêuticos.....	22
3. Antimaláricos do grupo das quinolinas .....	25
3.1. Fatores que propiciam o desenvolvimento de resistências a antimaláricos...26	
3.2. Mecanismos de seleção para resistências às quinolinas .....	26
3.3. Conjugados antimaláricos à base de 4-aminoquinolina .....	28
3.3.1. Conjugados de aminoquinolina-chalcona.....	28
3.3.2. Conjugados de 4-aminoquinolina-pirimidina.....	30
3.3.3. Conjugados de 4-aminoquinolina-isatina .....	31
3.3.4. Conjugados de quinolina e agentes antimicrobianos.....	31
4. Artemisinina, derivados semissintéticos e análogos.....	33
4.1. Artemisinina.....	33
4.1.1. Mecanismos de ação das artemisininas .....	33
4.1.2. Artemisinina e seus derivados sintéticos .....	34
4.2. Normas orientadoras de tratamento da malária não complicada causadas por <i>P. vivax</i> , <i>P. ovale</i> , <i>P. malariae</i> ou <i>P. knowlesi</i> e <i>P. falciparum</i> .....	37
4.3. Tratamento da malária complicada .....	38
5. Moléculas híbridas e incorporação de metais.....	39
5.1. Complexos organometálicos com interesse em química medicinal .....	39
5.2. Atividade antiplasmodial dos complexos organometálicos .....	41
5.2.1. Inibição da formação dos cristais de hemozoína .....	42
5.2.2. Interação com o DNA .....	42
5.2.3. Catálise intracelular .....	43
5.3. Bioquímica do ferro na fisiologia humana .....	44
5.3.1. Ferroceno .....	44
5.3.1.1. Híbridos de artemisinina-ferroceno .....	45
5.3.2. Ferroquina.....	46
5.3.2.1. Ligação de outros compostos biologicamente ativos à ferroquina .....	48
5.3.2.2. Híbridos derivados de tio-semicarbazonas .....	49

5.3.2.3. Conjugação de híbridos de quinolina-FQ com inibidores da GR..	49
5.3.3. Ferrocifeno, um análogo do tamoxifeno.....	50
5.4. Complexos híbridos baseados em PGMs (Ir, Ru, Rh, Os, Pd, Pt) .....	51
5.4.1. Propriedades químicas do rutênio e a sua atividade organometálica..	51
5.4.2. Mecanismo de ativação celular dos complexos organometálicos .....	53
5.4.3. Híbrido organo-rutênio aminoquinolina-trioxolano .....	54
5.4.4. Complexos organometálicos de benzimidazol.....	55
5.5. Compostos híbridos à base de gálio.....	57
5.6. Complexos de Cobre (I)-CQ.....	58
5.7. Complexos de níquel .....	60
5.8. Compostos de fosfina de ouro(I) .....	62
5.9. Complexos de ródio e irídio conjugados com CQ.....	64
5.10. Cobalto e as suas propriedades de coordenação .....	65
5.11. Quelantes de metal.....	66
5.11.1. A desferrioxamina como quelante de ferro .....	66
5.11.2. Novas moléculas de Atokel híbridas.....	67
5.12. Complexos trinucleares de Ni(II), Pd(II) e Cu(II) .....	69
5.13. Nanopartículas .....	70
5.13.1. Nanotecnologia verde .....	72
5.13.2. Nanopartículas de prata usadas na malária .....	73
5.13.3. Nanopartículas de ouro.....	74
Conclusão e perspectivas futuras da utilização de complexos organometálicos no tratamento da malária .....	77
Bibliografia.....	80



## 1. Introdução

### 1.1. Breve nota sobre a história da malária

Os eventos climáticos que ocorreram na Idade do Gelo foram responsáveis pelo aparecimento e disseminação dos primeiros humanos e parasitas. Na Idade Média, as variações climáticas, com oscilações da temperatura, poderão ter estado na origem de certas doenças infecciosas que ocorreram na Europa. A urbanização crescente entre o final da Antiguidade e início da Idade Média favoreceu as pandemias, por aumento da densidade populacional. Por outro lado, zonas pantanosas do planeta criaram um ambiente propício para o desenvolvimento de parasitas. No decurso dos conflitos entre países, o constante movimento das tropas, a permanência nas trincheiras por longos períodos e o retorno dos soldados à sua terra natal propiciaram epidemias. Além das guerras, também as catástrofes naturais, as migrações das pessoas para áreas endémicas e as viagens intercontinentais favorecem a disseminação de doenças provocadas por infeções virais e parasitárias, nomeadamente da malária. (1–3)

Os primeiros relatos de febres causados por parasitas da malária encontram-se em registos médicos chineses antigos e no Papiro de Ebers. Porém, foi A. Laveran que, usando um microscópio ótico, detetou a presença de parasitas *Plasmodium* em esfregaços de sangue de um soldado em estado febril. (1–3)

Mais tarde E. Marchiafava e A. Celli identificaram o parasita no interior dos glóbulos vermelhos, enquanto C. Golgi, outro cientista italiano, descobriu que o ciclo do parasita em estádios sanguíneos era responsável pelas manifestações clínicas observadas nos pacientes, demonstrando também que cada parasita apresentava características morfológicas e biológicas específicas, diferentes entre as várias estirpes. E. Marchiafava e A. Bignami foram os primeiros a associar o parasita descoberto por Laveran à forma mais grave da malária, através da observação da obstrução da micro-vasculatura cerebral. Entretanto, R. Ross descobriu que a transmissão da malária era efetuada por mosquitos, o que permitiu validar a hipótese de que *Plasmodium* atuava como um parasita dos seres humanos. (3)

Relativamente a estratégias de controlo da doença, algumas formas de erradicação da malária passaram por um maior controlo do vetor, associando o uso

de fármacos antiparasitários e um investimento na melhoria das condições de vida das populações afetadas. Atualmente, o controlo vetorial é essencialmente baseado no uso de inseticidas. Porém, as crescentes resistências dos insetos aos inseticidas, e também dos parasitas aos fármacos antimaláricos, representam uma ameaça em termos de controlo global da malária. Segundo um estudo da Organização Mundial de Saúde (OMS), as 4 classes de inseticidas em uso (piretróides, organoclorados, carbamatos e organofosfatos) apresentam perdas de eficácia devidas a resistências por parte do vetor. Face a estas circunstâncias a OMS apresentou um plano nacional de monitorização da eficácia de inseticidas em que uma das principais intervenções se baseia no uso de redes de butóxido de piretróide-piperonilo (PBO) e inseticidas neonicotinóides, para controlo dos vetores de malária. (4,5)

Outra abordagem recentemente proposta para o controlo da doença consiste no desenvolvimento de vacinas. A classificação das vacinas para a malária é feita com base no estágio de desenvolvimento do parasita em que atuam, tendo vários grupos de investigação optado entre vacinas pré-eritrocitárias, vacinas que atuam no estágio sanguíneo e vacinas de bloqueio de transmissão. (6) A vacina RTS,S contra *Plasmodium falciparum* é uma das estratégias adotadas pela OMS desde 2011, mas deve ser usada apenas em crianças que vivem em regiões com risco de transmissão moderado ou elevado. Em outubro de 2011 os grupos SAGE ( Strategic Advisory Group of Experts on Immunization) e MPAG ( Malaria Policy Advisory Group) avaliaram os resultados do uso da vacina RTS,S em ensaios clínicos de fase 3, verificando que a vacina apresenta uma eficácia de 36% em crianças dos 5-17 meses, após receberem 4 doses da vacina, considerando um *follow-up* de 4 anos. A vacina RTS,S tem como alvo a proteína circunsporozoíta expressa na superfície do esporozoíta e atua sobre os parasitas que ainda não infetaram as células do fígado. Sendo uma vacina pré-eritrocitária pode ser a vacina ideal, já que atua nos primeiros estádios de desenvolvimento do parasita, bloqueando os estádios subsequentes e a transmissão da doença. (4,6)

As semelhanças de sintomas entre a COVID-19 e a malária podem ter conduzido a diagnósticos errados ou negligência, com possibilidade de co-infecção, já que os testes e o tratamento da malária foram preferidos face à COVID-19. (7)

## 1.2. Epidemiologia da malária

A malária é endêmica em regiões tropicais e subtropicais de África, Ásia, América Central e América do Sul”.(8) Importa referir que, entre 2000 e 2019, a incidência da malária diminuiu em 29%, enquanto que o número de mortes por malária diminuiu em 60%.(9) Globalmente, em 2019 a OMS estimou aproximadamente 227 milhões de casos de malária em cerca de 85 países endêmicos, tendo cerca de 94% das mortes sido registadas na Região Africana da OMS, apesar das medidas implementadas nesta região para conter a disseminação da doença.(4) Em 2020, no decurso da pandemia por COVID-19, foi observado um aumento de 14 milhões de casos de malária, face a 2019.(4) Neste ano, 29 dos 85 países endêmicos foram responsáveis por 96% dos casos, a nível global, e mais de metade das mortes ocorreram em 4 regiões africanas, nas quais se incluem a Nigéria (31.9%), a República Democrática do Congo (13.2%), a República Unida da Tanzânia (4.1%) e Moçambique (3.8%), como representado na Figura 1.1. (4)

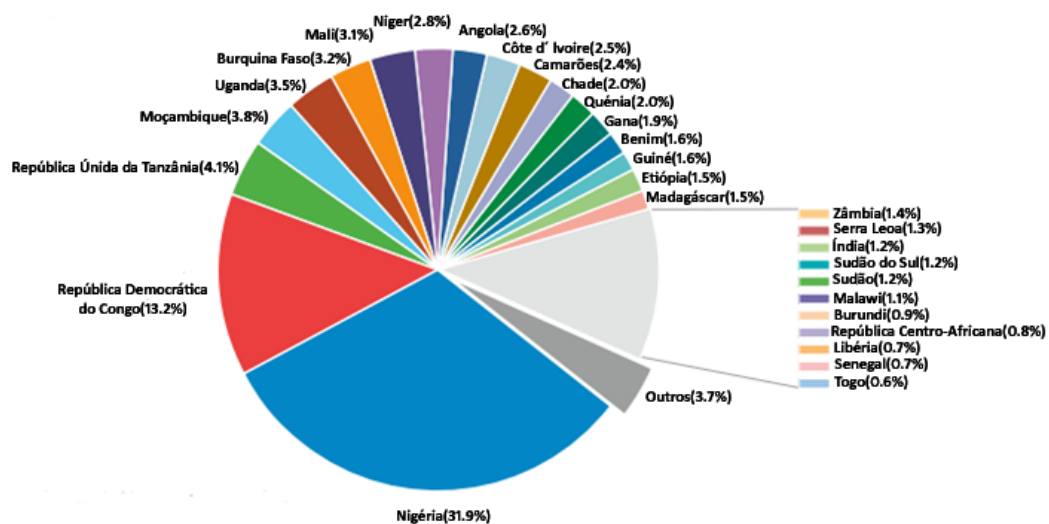


Figura 1.1- Representação gráfica da distribuição do número de infeções por malária nos países endêmicos no ano de 2020, de acordo com dados da WHO. Adaptado de (4).

### 1.2.1. O parasita

A malária ocorre devido a infecção sanguínea por parasitas protozoários pertencentes ao género *Plasmodium*. Existem atualmente 5 espécies de *Plasmodium* que infetam os humanos, nomeadamente, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, e *Plasmodium knowlesi*. Porém, destas espécies a que provoca maior morbidade e mortalidade, e com uma maior taxa de virulência, é o *Plasmodium falciparum*, em que os pacientes podem desenvolver insuficiência hepática e renal, convulsões e coma, podendo a infecção conduzir à morte. (10) A malária cerebral é uma das complicações mais frequentes e mortais, apresentando uma taxa de 100% de mortalidade se não houver tratamento com antimaláricos. Os sintomas comuns são coma, febre, convulsões, vómitos e anorexia. Envolve processos imunomediados, por ataque do próprio sistema imunitário, pelo que uma das estratégias terapêuticas assenta na modelação da resposta do sistema imune do hospedeiro. (11)

As principais características das várias espécies de *Plasmodium* infetantes encontram-se resumidas na Tabela 1.1.

As espécies *Plasmodium vivax* e *Plasmodium malariae* são as que apresentam uma maior distribuição a nível global. Os parasitas pertencentes a estas espécies causam manifestações menos graves da doença, apenas com estados febris agudos que retornam em 3 dias, no caso de *P. vivax*, designados por febre periódica “terça benigna” e, no caso de *P. malariae*, por “quartan”, pois o retorno dos episódios agudos febris ocorre por períodos de 4 dias. (12)

Nas regiões onde as infecções por *P. falciparum* e *P. vivax* são prevalentes verifica-se que a incidência da infecção por *P. vivax* tende a aumentar em pessoas mais jovens. Isto deve-se ao facto de, para *P. vivax*, a inoculação poder ser seguida de várias recaídas. *Plasmodium ovale*, tal como *Plasmodium vivax*, apresenta um risco bastante baixo de um desfecho fatal. *P. vivax* pode assumir a forma latente a nível hepático, podendo sobreviver em climas mais frios do que outras espécies de malária e levando a que a sua distribuição geográfica seja maior. É predominante nos trópicos, subtropicais e climas temperados, sendo mais prevalente na América Latina e no Sudeste Asiático. Uma das características em que o *P. vivax* difere das restantes espécies, sendo por isso menos prevalente face a *Plasmodium falciparum*, é o facto de necessitar da presença do antígeno Duffy na

superfície das células para poder infectar as hemácias, verificando-se que em África a população apresenta pouca expressão do antígeno Duffy. Embora *P. vivax* seja considerado uma forma benigna da malária, podem surgir casos de malária grave, causando anemia em crianças. Nas regiões de Papua, Indonésia e Papua Nova Guiné, *P. vivax* é uma importante causa de morbidade e mortalidade, sobretudo em crianças. (13,14)

De todas as espécies de *Plasmodium* infetantes de humanos, *P. ovale* é a que apresenta uma distribuição mais limitada. Os parasitas podem permanecer latentes no fígado por muitos meses, causando o reaparecimento dos sintomas meses ou mesmo anos depois. *P. ovale* é encontrado, principalmente, em África (especialmente na África Ocidental) e nas ilhas do Pacífico Ocidental, encontrando-se nas Filipinas, Indonésia e Papua Nova Guiné. É biologicamente e morfológicamente muito semelhante a *P. vivax*. As únicas espécies que formam hipnozoítos são *P. vivax* e *P. ovale*, podendo causar recaídas após a infeção primária. (14,15)

*Plasmodium ovale* está atualmente dividido em duas espécies simpáticas, *Plasmodium ovale wallikeri* (Pow) e *Plasmodium ovale curtisi* (Poc), quase idênticas a nível fisiológico e biológico, e também clínico, embora sejam geneticamente distintas e não recombinantes. A principal diferença entre estas duas espécies consiste numa trombocitopenia mais acentuada e maior INR, com períodos de latência menor, no caso das infeções causadas por *P. ovale wallikeri*, o que indicia uma maior patogenicidade em relação a *Plasmodium ovale curtisi*. (16–18)

*Plasmodium knowlesi* é um parasita zoonótico que foi detetado primeiramente na Malásia e subsequentemente no Sudeste Asiático e em Timor-Leste. O Sudeste Asiático é conhecido como o principal foco de transmissão, sendo o parasita disseminado para diferentes partes do mundo graças a viagens ou de atividades turísticas. O parasita apresenta um ciclo assexuado de replicação de 24 horas e por isso pode progredir rapidamente de uma simples infeção para uma situação de malária grave, semelhante a *Plasmodium Falciparum*. (14,19)

*P. Knowlesi* origina casos ocasionais de malária perto de áreas florestais do Sudoeste Asiático e do subcontinente indiano. (14)

Tabela 1.1- Síntese das características das espécies de *Plasmodium*. (12,14,15,19–

30)

<b>Espécies</b>	<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>Plasmodium vivax</i>	<i>Plasmodium malariae</i>	<i>Plasmodium ovale</i>	<i>Plasmodium knowlesi</i>
<b>Distribuição</b>	Zonas tropicais e subtropicais, em regiões de temperatura elevada; predominante em África.	Responsável por quase metade dos casos de malária fora de África. Raro em África.	Ampla distribuição demográfica na América do Sul, Ásia e África, mas menor que <i>P. falciparum</i> ; resulta na maioria dos casos de uma co-infecção com <i>P. falciparum</i> .	África Ocidental e ilhas do Pacífico Ocidental.	Distribuição limitada, na Malásia/Indonésia e noutros países do sudeste asiático.
<b>Aspetto das hemácias infetadas</b>	Não aumentam de tamanho; manutenção da área superficial relativamente a uma hemácia não infetada.	Aumentam de tamanho; formato amebóide.	Tamanho inferior ou igual ao normal.	Aumentam de tamanho; deformação, margem dentada.	Hemácia infetada nos estádios anelar, trofozoíto e esquizonte, esférica, maior área superficial e menor volume citosólico que célula sanguínea não infetada; quantidade de hemoglobina superior a <i>P. falciparum</i> (diferenciação no diagnóstico).

<b>Estádios no sangue periférico</b>	Alguns trofozoítos jovens e gametócitos.	Trofozoítos, esquizontes e gametócitos.	Trofozoítos, esquizontes e gametócitos.	Trofozoítos, esquizontes e gametócitos.	Trofozoítos, esquizontes e gametócitos.
<b>Hipnozoítos hepáticos</b>	Não apresenta.	Permanecem em estado de latência por períodos que variam entre 1 mês e 2 anos.	Não.	Sim.	Não apresenta hipnozoítos.
<b>Recaídas</b>	Não.	Sim.	Não.	Sim.	Não.
<b>Ciclo de hemólise</b>	Terça maligna; picos de febre a cada 3 dias.	Terça benigna; picos de febre a cada 3 dias.	Quartã, com picos de febre a cada 4 dias.	Terça benigna; picos de febre a cada 4 dias.	A cada 24 horas; libertação de merozoítos mais rápida que nas outras espécies, no humano - Malária diária ou “quotidiana”.
<b>Antígenos Duffy</b>	Não necessita.	Necessita.	Não necessita.	Não necessita.	<i>P. Knowlesy</i> necessita do fator Duffy na superfície dos glóbulos vermelhos para a invasão.
<b>Doença microvascular (malária cerebral)</b>	Sim.	Não.	Não.	Não.	Não causa comanemia grave, ao contrário de <i>P. falciparum</i> .

<b>Resistência a antimaláricos</b>	A quase todos.	Resistência à CQ.	Desconhecido.	Desconhecido.	Suscetível à CQ e a outros antimaláricos.
<b>Malária complicada</b>	Quase todos os casos; formas mais graves e fatais.	Pouco frequente.	Pouco frequente.	Pouco frequente.	Pode surgir tanto malária complicada como não complicada.
<b>Sintomas característicos de malária complicada</b>	Malária cerebral, insuficiência renal aguda, anemia grave, síndrome de desconforto respiratório agudo.	Esplenomegalia, Rutura esplénica e complicações pulmonares.	Síndrome nefrótica.	Rutura esplénica, trombocitopenia, coagulação intravascular.	Semelhante à malária grave por <i>P. falciparum</i> . Falta de ar, dor abdominal, vômitos. Nos estados mais graves: icterícia, lesão renal aguda, choque e desconforto respiratório, ausência de coma.

## 1.2.2. Ciclo de vida de *Plasmodium*

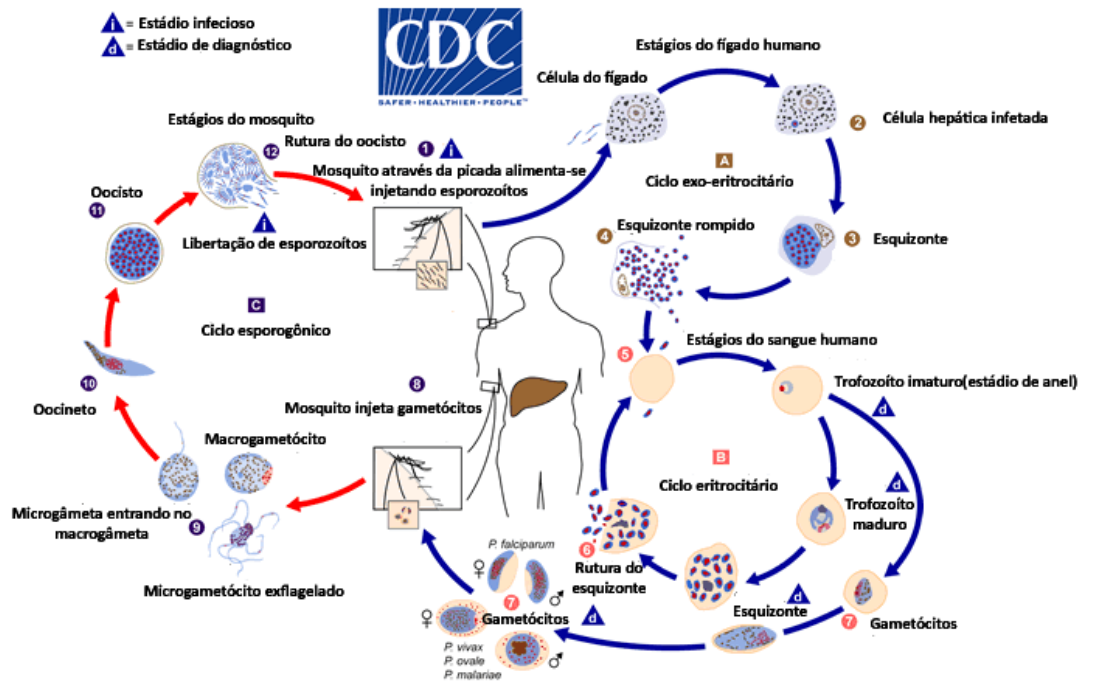


Figura 1.2- Ciclo de vida de *Plasmodium*. Adaptado de (31).

As diferentes fases que ocorrem após a infecção pelo parasita são semelhantes, independentemente da espécie de *Plasmodium* infetante. O parasita apresenta duas fases de reprodução: assexuada, no ser humano, e sexuada (esporogónica), no mosquito. (32)

A infecção natural pelo parasita da malária envolve uma transmissão cíclica de humanos e do mosquito fêmea *Anopheles* infetado, que funciona como vetor. As várias etapas estão representadas na Figura 1.2. A infecção humana inicia-se com a picada pelo mosquito, dando início ao ciclo de vida do parasita, que compreende as fases exo-eritrocítica (A), nos hepatócitos, e eritrocítica (B), nas hemácias, através de um conjunto de divisões mitóticas (reprodução assexuada). (31) No humano, após a picada pelo mosquito (1) os esporozoítos injetados (1) alojam-se no fígado, onde o parasita cresce e se multiplica nos hepatócitos (2), por mitose, durante 2 a 10 dias (variável, de acordo com a espécie de *Plasmodium infetante*). Nesta fase, os esporozoítos amadurecem formando esquizontes (3), e cada esquizonte multinucleado dá origem a milhares de merozoítos mononucleares através de uma fase de reprodução assexuada (esquizogonia exo-

eritrocítica), que são libertados na corrente sanguínea após rutura do esquizonte (4), completando assim o ciclo exo-eritrocítico. (31,33)

Nas espécies *P. vivax* e *P. ovale* os esporozoítos podem não se multiplicar ao nível dos hepatócitos, amadurecendo e permanecendo numa forma inativa, nos hepatócitos, que se designa por forma hipnozoíta. Ao longo do tempo pode haver uma reativação destas formas, dando origem a formas merozoítas que são libertadas no sangue, semanas ou até anos depois, sendo responsáveis pelas recaídas, por aumento da parasitemia sanguínea e pelas febres periódicas. (31)

A fase exo-eritrocítica (esquizogonia exo-eritrocítica) é uma fase assintomática, sendo a sua duração variável conforme a espécie do parasita, como coligido na Tabela 1.2. Após esta fase de propagação no fígado, os parasitas sofrem reprodução assexuada nos eritrócitos (esquizogonia eritrocítica). (33) Os merozoítos passam diretamente para o sangue, e na primeira fase após a invasão convertem-se em trofozoítos, que passam de um estágio anelar para um estágio maduro (d) e, de seguida, formam esquizontes (d). Dentro dos eritrócitos o parasita degrada grande parte da hemoglobina (Hb), formando heme e globina. Para evitar acumulação de heme, tóxico para o parasita, este converte-o em hemozoína, enquanto a globina usada como fonte de aminoácidos para o seu desenvolvimento e crescimento do parasita. (34)

Seguidamente, ocorre a fase de amadurecimento do esquizonte eritrocítico. Cada esquizonte maduro (d) dá origem a uma nova geração de merozoítos (esquizogonia eritrocítica) que se baseia numa fase de multiplicação assexuada, com produção de 8-16 merozoítos que geram um ciclo de infeção contínuo onde estas formas infetam novas células sanguíneas, que após rutura (6) são libertadas na corrente sanguínea de forma a invadir novas hemácias. O tempo de replicação intracelular do parasita e de digestão da Hb da célula hospedeira é de aproximadamente 48 horas (ciclo eritrocítico) em *P. falciparum*, como referido na tabela 1.2. A fase de libertação dos merozoítos e a infeção de novas células é responsável pela elevada carga parasitária no sangue e é onde a sintomatologia é predominante, levando a estádios de crises febris. (33,35,36)

Seguidamente ocorre a diferenciação de alguns merozoítos em gametócitos (7) femininos e masculinos, com parte dos merozoítos jovens envolvidos. Quando a fêmea *Anopheles* pica uma pessoa infetada, retira durante a sua refeição os gametócitos (8), que

amadurecem e se transformam em macrogâmetas (femininos e masculinos) durante um processo designado por gametogénese. (31,35)

No intestino médio do mosquito, após uma refeição de sangue, os gametócitos masculinos e femininos são ativados por uma redução da temperatura em relação ao hospedeiro invertebrado e pela presença de um fator solúvel do vetor, o ácido xanturénico (XA). O núcleo do microgâmeta divide-se três vezes, por mitose, produzindo oito núcleos, enquanto nos gametócitos femininos cada núcleo fertiliza um macrogameta (9), formando um zigoto. Após a fusão dos núcleos o zigoto forma o oocineto (10), gerado dentro do lúmen do intestino do mosquito, iniciando-se um processo designado por esporogonia (c). O oocineto penetra na parede do intestino do mosquito, formando um oocisto visível dentro do qual ocorre uma outra fase de multiplicação de que resulta a formação das formas esporozoítas, num período de 10 a 15 dias. Estas formas migram para as glândulas salivares do mosquito, sendo transmitidas aquando da picada pelo mosquito no ser humano. (11) Completa-se assim o fim da terceira fase (fase de reprodução sexual/esporogonia), gerando um novo ciclo de infeção. (33,35)

Tabela 1.2. Duração das fases do ciclo de vida das várias espécies de *Plasmodium*. Adaptado de (13,37–39).

<b>Espécies de <i>Plasmodium</i></b>				
<b>Fases do ciclo de vida.</b>	<b><i>P. vivax.</i></b>	<b><i>P. ovale.</i></b>	<b><i>P. malariae.</i></b>	<b><i>P. falciparum.</i></b>
<b>Fase pró-eritrocítica (dias).</b>	6-8	9	14-16	5.5-7
<b>Merozoítos por esquizonte hepático.</b>	10 000	15 000	15 000	30 000
<b>Ciclo eritrocítico (horas).</b>	48	50	72	48
<b>Merozoítos por esquizonte eritrocítico.</b>	14-20	6-12	8-10	16-24
<b>Período de incubação (dias).</b>	12-17, ou até 24 meses.	10 a 17, ou mais.	18-40, ou mais.	9-14

*Plasmodium vivax* e *ovale* podem ter um período de incubação de meses, anos ou até décadas, o que pode ser explicado pelo crescimento lento dos esporozoítos no fígado do hospedeiro, ficando por vezes num estágio dormente ou latente. Contudo, *P. malariae* parece não apresentar formas quiescentes hepáticas, o que poderia explicar o período de incubação mais prolongado em determinados casos, porém julga-se que a maturação e a libertação dos merozoítos seja diferente, ocorrendo de forma progressiva para a corrente sanguínea. (31,40)

Assim como cada fase do ciclo de vida do parasita varia, também o período de esporogonia difere de espécie para espécie. O período de esporogonia, caracteriza-se pelo tempo que medeia entre a ingestão de sangue infetado e o momento de formação de esporozoítos nas glândulas salivares, tornando-se um mosquito infecioso. A ampla variedade genética existente entre as espécies de *Plasmodium* pode explicar a diferente capacidade de infetar uma espécie de mosquito, por outro lado a temperatura média associada ao vetor pode influenciar o desenvolvimento do parasita no seu interior, assim como a diferente especificidade vetor-parasita. (41)

## 2. Terapêutica antimalárica

### 2.1. Principais grupos farmacológicos disponíveis para o tratamento da malária

O estudo da biologia e do genoma do parasita gera conhecimento sobre mecanismos celulares cruciais para o seu desenvolvimento, facilitando estudos sobre o modo de ação de potenciais antimaláricos e propiciando o desenho de novas moléculas, com o objetivo de mitigar perdas de eficácia por seleção para resistências, garantir segurança e ação rápida e, preferencialmente, tratar a malária em dose única. (42)

Os antimaláricos podem ser classificados de acordo com os diferentes estádios da vida do parasita no hospedeiro humano em que atuam e, nesta classificação, consideram-se os fármacos que atuam sobre as formas esquizontes teciduais, também denominados fármacos causais, como por exemplo a pirimetamina (PM) (1) e a primaquina (PQ) (2) (Figura 2.1), que também previnem recaídas causadas por hipnozoítos de *P. vivax* e *P. ovale*, no fígado. Outros fármacos, como o proguanil (PG), atuam contra hipnozoítos exo-eritrocitários, ou atuam sobre formas sanguíneas do parasita (esquizontocidas sanguíneas), eliminando ataques clínicos de malária. Incluem-se neste grupo a halofantrina (HF) (3), a quinina (Q) (4), a CQ (5) a mefloquina (MQ) (6), a PM, as sulfonas (*e.g.* a sulfadoxina (SFO) (7)), a tetraciclina (TC) (8), a atovaquona (AQ) e as artemisininas. Estas últimas também possuem atividade gametocítica, tal como Q, PG e CQ, destruindo as formas sexuais do parasita no sangue e impedido a transmissão da infecção para o mosquito. Os fármacos com atividade esporontocida, como PQ, impedem o desenvolvimento de oocistos. (43–45)

Os antimaláricos podem também ser classificados em grupos químicos (ou quimiotipos), com base nas suas estruturas. No grupo das quinolinas incluem-se as 4-aminoquinolinas, como CQ e ADQ (amodiaquina) (9), 8-aminoquinolinas, como a PQ; 4-hidroxi-metilquinolinas, como a MQ, Q e quinidina (QN) (10). Consideram-se ainda as hidroxi-naftoquinonas, (*e.g.* AQ) (11); as diaminopirimidinas, como PM; as lactonas sesquiterpênicas, como a artemisinina (ART) (12), arteéter, arteméter e artesunato; as sulfonamidas, como o sulfaleno (SF) (13), SFO, dapsona; biguanidinas como o proguanil,

clorproguanil e cicloguanil (CG) (14). A classe dos antibióticos com atividade antimalárica inclui tetraciclinas, azitromicina e doxiciclina, e fenantreno, como LF (15).

(44)

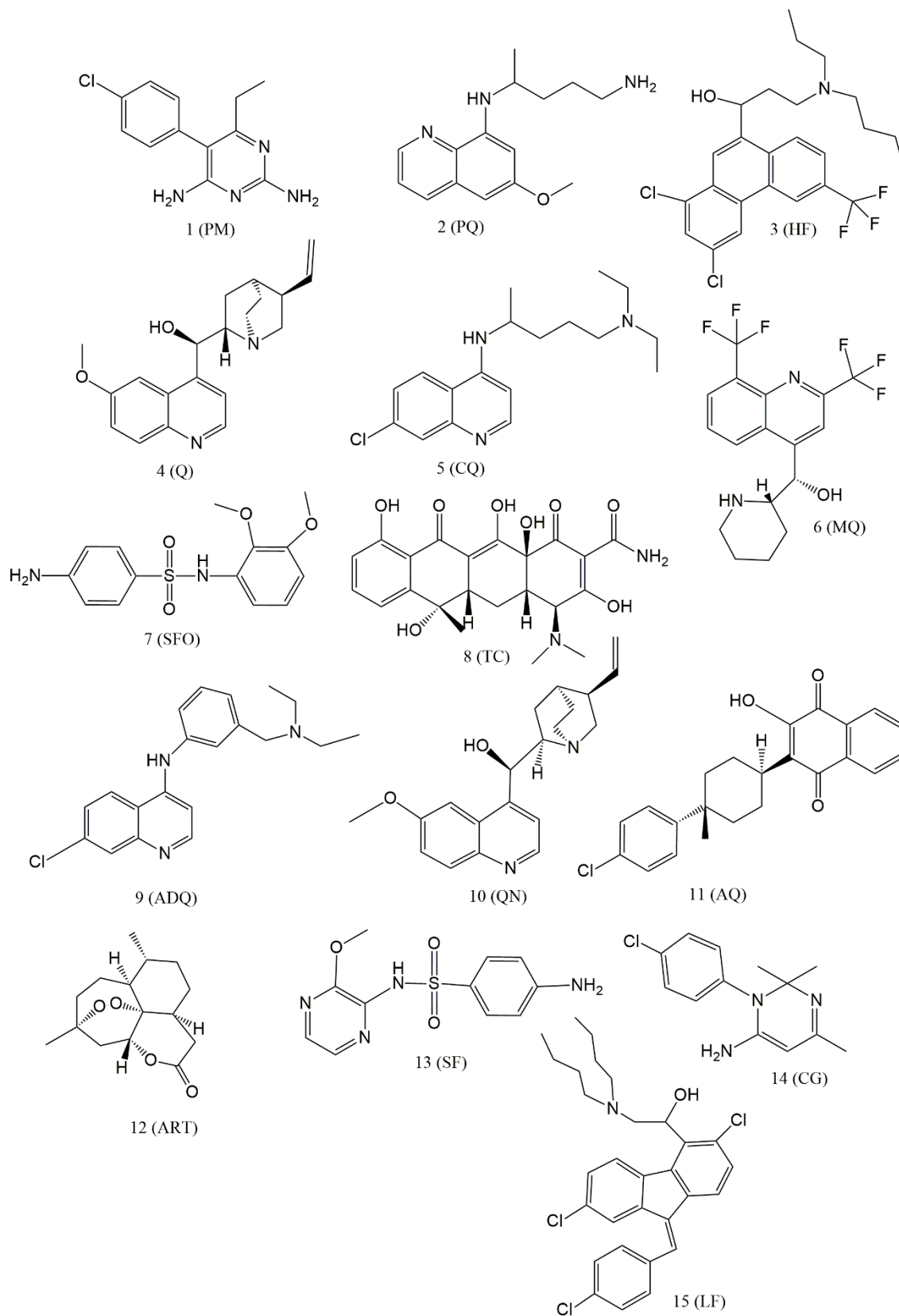


Figura 2.1- Representação estrutural dos antimaláricos classificados com base na atividade contra os diferentes estádios de vida do parasita e de acordo com o grupo químico a que pertencem. (44)

## **2.2. Classes de antimaláricos, de acordo com os principais processos biológicos em que interferem e alvos moleculares em que atuam**

Existem vários alvos de atuação dos fármacos no parasita da malária, estando disponíveis, nomeadamente, inibidores das plasmepsinas, fármacos com atuação ao nível da destoxificação do heme, ou da cadeia de transporte de eletrões (CTE), antagonistas da síntese de ácido fólico, entre outros. Os fármacos que interferem com os processos biológicos acima referidos atuam em diferentes estádios do parasita no ser humano.

### **2.2.1. Degradação da hemoglobina e síntese da hemozoína**

Na fase eritrocítica o parasita ganha capacidade para degradar a Hb nos estádios de trofozoíto maduro e esquizonte, sendo responsável pela intensa metabolização e consumo de 80% do citoplasma eritrocítico. (46) Este processo de degradação ocorre fundamentalmente no vacúolo digestivo (VD) do parasita de *P. falciparum*. Foi contudo proposto que possa ocorrer inicialmente em vesículas transportadoras, onde o citoplasma da célula sanguínea é ingerido pelo citostoma do parasita, ocorrendo a degradação da Hb (hemoglobina) nestas vesículas com formação posterior dos cristais neutros de hemozoína, como representado na Figura 2.2. (47)

O ambiente ácido do VD (vacúolo digestivo) do parasita é mantido por uma bomba ATPase, e durante o processo de invasão eritrocítica ocorre um efluxo de aminoácidos por alterações da permeabilidade dos eritrócitos, importante para a síntese de proteínas do parasita, assim como um influxo de aminoácidos do exterior, visto a Hb ser uma fonte pobre de certos aminoácidos, como a isoleucina. (46)

As enzimas que participam na degradação da Hb são as protéases aspárticas, plasmepsinas I e II, e uma protéase cisteínica (falcipaína), presentes no VD do parasita. A plasmepsina I é responsável pela clivagem entre os aminoácidos Phe e Leu, nas posições 33 e 34. A ligação entre estes dois aminoácidos é bastante importante para a manutenção da conformação da Hb. A clivagem permite a exposição de outras zonas da molécula, favorecendo as reações de catálise pelas enzimas do parasita. (46) A falcipaína cliva a Hb depois desta ter sido desnaturada pelas plasmepsinas, ou em condições redutoras. A plasmepsina cliva a Hb, mas só a falcipaína é capaz de degradar os fragmentos de menores dimensões. (48)

A par da libertação de fragmentos de péptidos que são depois hidrolisados gerando aminoácidos livres, a clivagem proteolítica da Hb liberta heme (ferriprotoporfirina IX) (Fe[III]PPIX), que é tóxico para o parasita. Este dispõe de um mecanismo de destoxificação, pela conversão do grupo heme em  $\alpha$ -hematina (HO-Fe[III]PPIX) e seguidamente formando dímeros de  $\beta$ -hematina, que ao polimerizarem formam a hemozoína. (46,48,49)

A estrutura de hemozoína consiste em dímeros de heme ligados por interações recíprocas de ferro-carboxilato e estabilizados por ligações de hidrogénio, formando um cristal inerte, o pigmento da malária (ver Figura 2.3). Foi recentemente proposto que um homólogo da lipocalina pode desempenhar um papel importante no controlo e manutenção da cristalização da hemozoína no parasita da malária, verificando-se que a destruição da lipocalina leva a uma alteração da configuração externa dos cristais de hemozoína, com perda da sua estabilidade estrutural. (49–51)

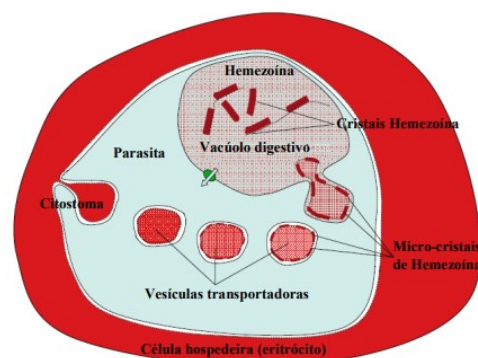


Figura 2.2- Esquema representativo da via de degradação da Hb no VD do parasita *P. falciparum*. Adaptado de (47).

O citostoma do parasita é responsável pela ingestão do citoplasma do glóbulo vermelho, que é incorporado em vesículas transportadoras. Estas vesículas fundem-se com o VD do parasita, no qual ocorre a degradação total de Hb. Adaptado de (47,52).

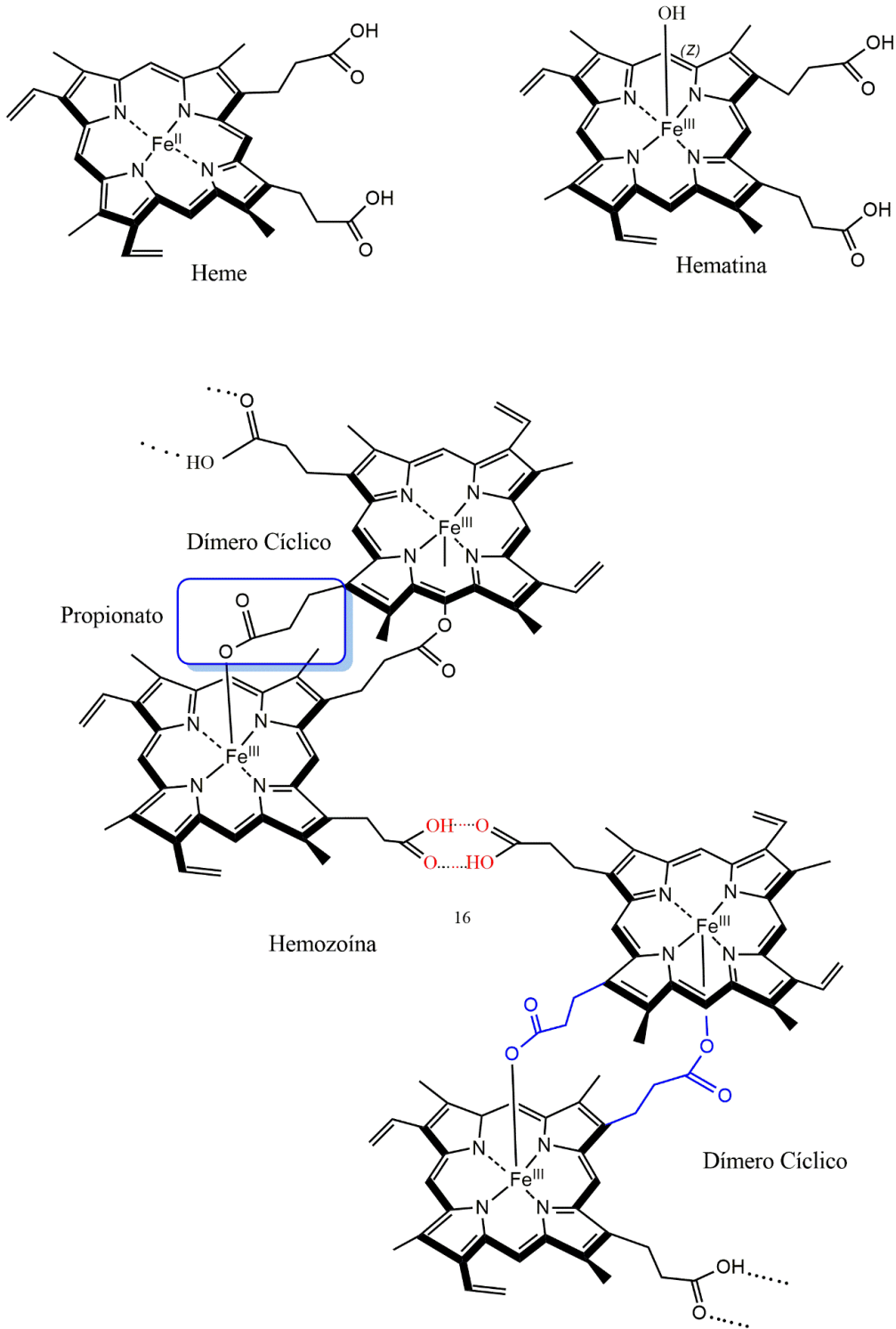


Figura 2.3- Representação esquemática da estrutura da hematina e das interações químicas que ocorrem para a formação do cristal neutro, a hemozoína. A funcionalidade ácido propiónico de cada porfirina coordena com o Fe(III) de outra porfirina, os dímeros interagem através de ligações por pontes de hidrogénio entre os grupos ácido, e de forças de Van der Waals. (49,52)

### **2.2.2. Fármacos que atuam por inibição da destoxificação do grupo heme**

A amodiaquina (ADQ), a piperaquina (PPQ) e a CQ atuam por inibição da síntese da hemozoína, com aumento do heme livre (trocável), designando-se por inibidores hemozoínicos. Os derivados arilmetanólicos de quinolina inibem de forma indireta a síntese de hemozoína, sem aumento do heme trocável, designando-se por inibidores não hemozoínicos. As principais características de cada fármaco, face ao mecanismo de ação e estágio do parasita em que atua, serão detalhadas posteriormente. (50)

Os inibidores de hemozoína atuam formando complexos com heme. Para o desenvolvimento de novos fármacos deve ter-se em atenção os grupos em que as ligações entre heme e inibidor são fortes, em ambientes aquosos e lipídicos, bem como a lipofilicidade e solubilidade dos inibidores propostos, já que o ambiente do VD do parasita se caracteriza por um pH ácido, baixa solubilidade e baixa agregação de heme, o que condiciona a complexação deste e consequente inibição do processo de destoxificação. (50)

### **2.2.3. Fármacos que interagem com a cadeia de transporte de eletrões do parasita**

#### **2.2.3.1. Metabolismo do parasita *Plasmodium***

A CTE (cadeia de transporte de eletrões) do parasita da malária envolve cinco desidrogenases, nomeadamente: a NADH (ubiquinona oxidoreductase (PfNDH2)), presente no complexo I, e a malatoquinona oxidoreductase (PfMQO), envolvidas no ciclo do ácido cítrico; a SDH (succinato: ubiquinona oxidoreductase (complexo II)), a glicerol-

3- fosfato desidrogenase (PfG3PDH) e a di-hidroorotato desidrogenase (PfdHODH), envolvidas nas vias de biossíntese da pirimidina. A PfNDH2 e a MQO não existem na mitocôndria humana, enquanto a PfdHODH apresenta propriedades diferentes da enzima correspondente existente na mitocôndria das células humanas. A função destas desidrogenases é garantir o aporte de elétrons para os diferentes complexos, nomeadamente para o complexo III, ou citocromo bc1, e para o citocromo c oxidase (complexo IV), como esquematicamente representado na Figura 2.4. (53,54)

Nos estádios sanguíneos o parasita é dependente da glicólise para a síntese de ATP, e não da fosforilação oxidativa. Durante a infecção das hemácias o parasita está dependente da renovação oxidativa da ubiquinona (CoQ8), que ocorre ao nível da CTE de *Plasmodium*. (55)

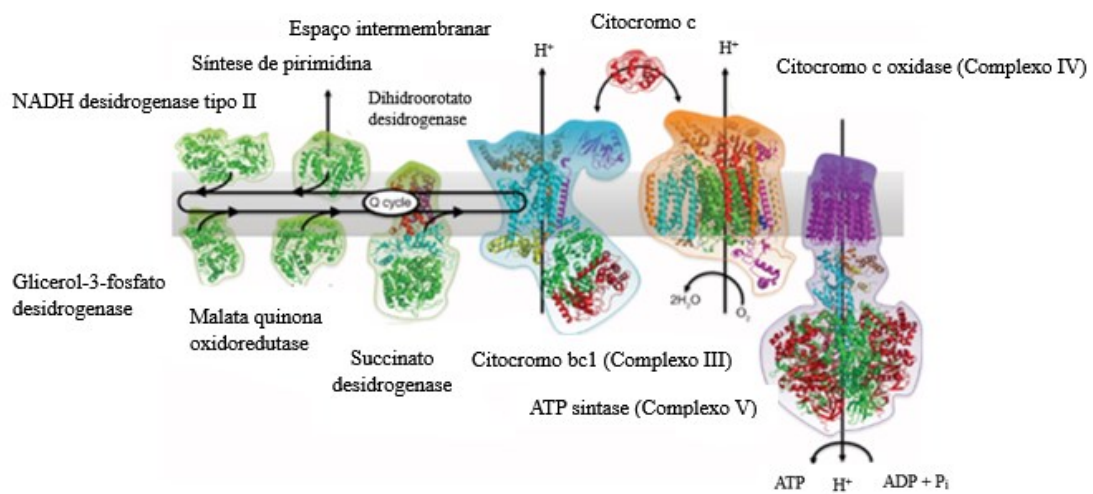


Figura 2.4- Representação esquemática da cadeia transportadora de elétrons, na mitocôndria do parasita *Plasmodium*. (53)

### 2.2.3.2. Complexo III ou complexo citocromo bc1, ou ubiquinol, como alvo terapêutico

A CoQ8 (ubiquinona) existente na mitocôndria de *P. falciparum* é diferente de outro homólogo presente na célula hospedeira humana, o que colocou a CoQ8 como um bom alvo para desenvolvimento de fármacos antimaláricos com seletividade para o parasita, resultando por exemplo as hidroxinaftoquinonas. A AQ é um inibidor competitivo do complexo III, ou complexo bc1, interagindo com o sítio de ligação Q0 e atuando nos estádios assexuados sanguíneos do parasita, em que não existe uma direta inibição da via de fosforilação oxidativa (OXPHOS), operando pela inibição da regeneração da CoQ8 que é essencial na síntese da nova pirimidina. (53,56)

O domínio catalítico do complexo citocromo bc1 é constituído por três subunidades: citocromo b, que liga ambos os hemes bH e bL, citocromo c1, que contém um heme do tipo c, e a proteína Reiske ferro-enxofre, que contém um centro [2Fe-2S]. Cada uma destas subunidades participa na transferência eletrônica ao longo de toda a cadeia, como representado na Figura 2.5 (A). (53,57) O complexo é responsável por converter a energia de Gibbs, obtida da oxidação exergónica do ubiquinol pelo citocromo c, num gradiente de prótons que é fundamental para a síntese de ATP através de uma ATP sintetase. Contém 4 cofatores redox, dois hemes do tipo b, um heme do tipo c e um centro [2Fe-2S] (Figura 2, (B)). (53,58)

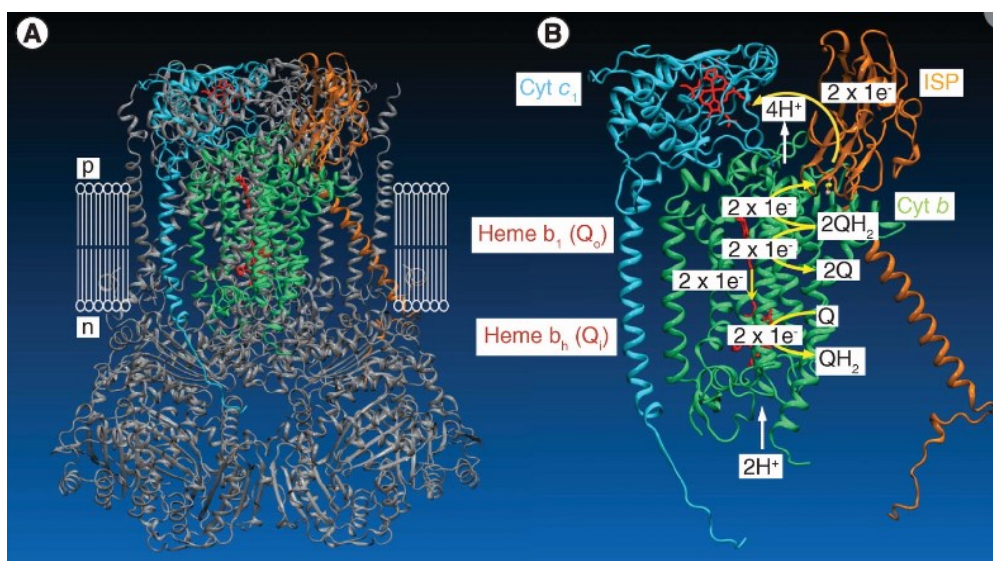


Figura 2.5- Representação do complexo citocromo bc1. Adaptado de (53).

A. Modelo a cinza da estrutura do complexo bc1 de levedura. O citocromo b encontra-se representado a verde, o citocromo c1 a ciano e a proteína Rieske a laranja. Os hemes dos citocromos b e c1 encontram-se representados a vermelho, tal como os átomos de ferro e enxofre do centro da proteína Rieske. “p” e “n” são indicadores dos lados positivo e negativo da bicamada lipídica da membrana mitocondrial interna, na qual ocorre a transferência de protões.

B. Representação da estrutura e do mecanismo do ciclo Q do núcleo catalítico do complexo bc1. Citocromo b, citocromo c1 e a proteína Rieske são representados como fitas de cor verde, ciano e laranja, respetivamente. As transferências eletrónicas são representadas por setas amarelas. Os movimentos de protões são representados por setas brancas. (53)

No complexo bc1 o ciclo catalítico envolve a ligação do ubiquinol ao sítio de ligação  $Q_0$ , que se encontra no espaço intermembranar mitocondrial com potencial positivo, sendo responsável pela oxidação do grupo quinol, com libertação de dois protões e dois eletrões. O complexo III recebe eletrões do ubiquinol e transfere-os para o citocromo c. Existem dois percursos possíveis neste complexo: o ubiquinol doa um dos eletrões à proteína Reiske ferro-enxofre [2Fe-2S], que é reduzida. Os protões libertados pela oxidação do ubiquinol são transferidos para o espaço intermembranar. O segundo eletrão do ubiquinol é transferido entre hemes do citocromo b para outra molécula de CoQ8, que é reduzida a semiquinona. Esta pode converter-se novamente em ubiquinol após abstração de um eletrão e um protão proveniente da membrana mitocondrial. A oxidação da CoQ8 e a conversão da semiquinona a ubiquinol cria um fluxo de protões da matriz para o espaço mitocondrial. De forma a reverter a proteína Reiske ferro-enxofre reduzida, esta sofre alteração conformacional após a receção do eletrão, contactando com o domínio c1, que fica reduzido, mas é rapidamente oxidado pelo citocromo c solúvel. A transferência eletrónica e a translocação de protões do lado negativo para o lado positivo da membrana mitocondrial criam um gradiente eletroquímico, como representado na Figura 2.5 (B). (58–61).

A combinação da AQ (atovaquona) com PG (proguanilo) é usada para combater infeções causadas por estirpes de *P. falciparum* resistentes à CQ. A AQ atua no estágio eritrocítico do parasita, assim como no estágio hepático, e foi associada ao proguanil em dose fixa para retardar a seleção para resistências. Com esta conjugação garante-se uma terapêutica com diferentes mecanismos de ação. A AQ é um derivado estrutural da CoQ8

que atua inibindo de forma seletiva a cadeia mitocondrial de transporte de elétrons do parasita, nomeadamente o citocromo b, por colapso do potencial de membrana, enquanto o cicloguanilo, um metabolito do PG, atua na via do folato, inibindo a dihidrofolato redutase e interferindo com a replicação do parasita. Por sinergismo, aumenta também a capacidade da AQ para colapsar o potencial de membrana. A combinação AQ-PG é formulada para administração oral, sendo usada como terapêutica de primeira linha contra a malária, e como profilaxia, em viajantes, quando surgem efeitos adversos derivados da profilaxia com MQ. (62–64)

### 2.2.3.3. Outros alvos terapêuticos

Tabela 2.1- Antimaláricos e correspondentes mecanismos de ação, para os diferentes alvos terapêuticos do parasita. (65,66)

<b>ALVO TERAPÊUTICO / ESTRUTURA</b>	<b>FUNÇÃO NO PARASITA</b>	<b>ANTIMALÁRICO E MECANISMO DE AÇÃO</b>
<b>TRANSPORTADOR DE GLICOSE, PFHT1</b>	Transporte de glicose e frutose, para crescimento do parasita.	Derivado de O-3 hexose de cadeia longa; dificulta seletivamente o transporte de glicose e frutose pelo transportador PfHT1 do parasita, sem interferir no transporte de glicose pela GLUT1 (transportador em mamíferos).
<b>PROTEÍNA QUINASE DO PARASITA</b>	Importantes no processo de fosforilação, controlo transcricional e degradação de proteínas com papel importante no	Flavopiridol inibe a proteína quinase dependente de ciclina PfPK5, com alterações na produção de DNA e RNA,

	desenvolvimento do parasita.	afetando a sobrevivência do parasita.
<b>APICOPLASTO</b>	Estrutura que contém parte do genoma do parasita, sendo responsável pela síntese de ácidos gordos, de heme e de precursores isoprenóides, vias biossintéticas que não existem no organismo humano.	Azitromicina, clindamicina e doxiciclina inibem a síntese proteica, atuando sobre os ribossomas e levando a uma perda funcional do apicoplasto do parasita.
<b>AMINOPEPTIDASES</b>	Clivagem de aminoácidos a partir do reconhecimento do grupo aminoterminal dos péptidos sintetizados por ação das proteases do parasita a partir da hemoglobina.	Os inibidores das aminopeptidases ligam-se aos centros ativos metálicos da alanina e leucina aminopeptidases, inibindo o processo de obtenção de aminoácidos pelo parasita.
<b>PFATP4</b>	Bomba de efluxo presente na membrana do parasita, responsável pela troca de iões $\text{Na}^+$ para o meio extracelular e de iões $\text{H}^+$ para o meio intraparasitário; responsável pela manutenção do gradiente osmótico do parasita.	Inibidores da PfATP4 provocam um aumento intraparasitário de iões $\text{Na}^+$ , levando à hemólise das hemácias infectadas pelo parasita. Também interrompem o ciclo celular do parasita por inibirem a libertação de merozoítos da forma esquizonte, por aumento do influxo de $\text{Na}^+$ .



### 3. Antimaláricos do grupo das quinolinas

A classe química das quinolinas fornece vários fármacos antimaláricos, de entre os mais usados para o tratamento e controlo da doença. A Q (quinina), um alcalóide extraído das cascas de Cinchona, pertence ao subgrupo dos derivados metanólicos de quinolina. Embora tenha sido o primeiro fármaco estabelecido para tratamento da malária, e um dos mais usados, a seleção para resistências e a toxicidade limitam o seu uso clínico. A Q é ainda usada para o tratamento da malária grave, e para mitigar a sua toxicidade é administrada em associação com outro antimalárico, de forma a reduzir o tempo de exposição do organismo à Q, reduzindo assim os efeitos da toxicidade inerente a este fármaco. A CQ é um dos principais fármacos usados no tratamento da malária, devido à sua elevada eficácia, segurança e baixo custo. Porém, o uso descontrolado deste fármaco conduziu ao desenvolvimento de resistências por parte de *P. falciparum*, comprometendo a sua eficácia terapêutica. (42,67)

A MQ (mefloquina), desenvolvida em meados da década de 1980, é indicada para a profilaxia da malária, apresentando atividade em espécies de *Plasmodium* resistentes à CQ e atuando nos estádios sanguíneos das estirpes *P. falciparum* e *P. vivax*. É usada em associação com artesunato, de forma a retardar o desenvolvimento de resistências. Em termos estruturais é mais simples que a Q, apresentando dois pares de enantiómeros com diferente potência. Os antimaláricos do grupo das quinolinas atuam pela formação de um complexo entre a estrutura de base quinolílica e o grupo heme, levando a uma acumulação de heme, que é tóxico para o parasita. (42,67)

A PQ é uma 8-aminoquinolina usada tanto para a cura da doença, após infeção por *P. vivax* e *ovale*, como para profilaxia. Inibe a transmissão parasitária pelo vetor devido à sua atividade gametocítica, eliminando os gametócitos da corrente sanguínea. (68)

### 3.1. Fatores que propiciam o desenvolvimento de resistências a antimaláricos

Os principais fatores que podem propiciar a evolução para resistências são as características químicas do próprio fármaco, o seu tempo de semivida, a falta de especificidade do fármaco para a indicação terapêutica referida, a dose e a imunossupressão do hospedeiro. (69)

A nível do parasita *P. falciparum*, alterações nos alvos terapêuticos propiciam também a resistência aos fármacos. Um dos exemplos é o efeito de mutações no transportador PfCRT na eficácia da CQ, que será explicado no tópico seguinte. (70)

### 3.2. Mecanismos de seleção para resistências às quinolinas

A CQ tem sido usada como fármaco de primeira linha no combate à malária devido à sua segurança e eficácia. (71) É uma base fraca, que na forma neutra permeia facilmente a membrana lipídica do VD (vacúolo digestivo). Quando no interior do vacúolo ácido ocorre a sua protonação, e conseqüente o seu acúmulo. O seu trajeto normal passa pela entrada no vacúolo e, após proteólise da Hb (hemoglobina), forma complexos heme-CQ, impedindo a biocristalização da ferriprotoporfirina IX em hemozoína. (72,73)

A PfCRT é uma proteína que contém 10 domínios transmembranares e encontra-se na membrana do VD do parasita. Após sofrer mutação cria um efluxo de iões hidrogénio do vacúolo, inibindo a protonação da CQ, o que leva a um aumento da sua exportação para o citosol e à sua ineficácia, como representado na Figura 3.1. Durante este processo o VD incha, por aumento da pressão osmótica devido à interrupção do influxo dos substratos naturais para o vacúolo do parasita. Este transportador, desempenha também um papel fisiológico durante o desenvolvimento intra-eritrocitário, sendo, por isso, a sua expressão máxima no estágio de trofozoíto. O papel funcional deste transportador parece estar relacionado com o transporte de oligopeptídeos, essencial para a sobrevivência do parasita, para além de outras funções fisiológicas importantes nas quais se inclui a manutenção da homeostase do pH, fluxos de cloretos, troca de ferro nos diferentes estados oxidativos, transporte de glutatona e transporte de alguns catiões. (71–74)

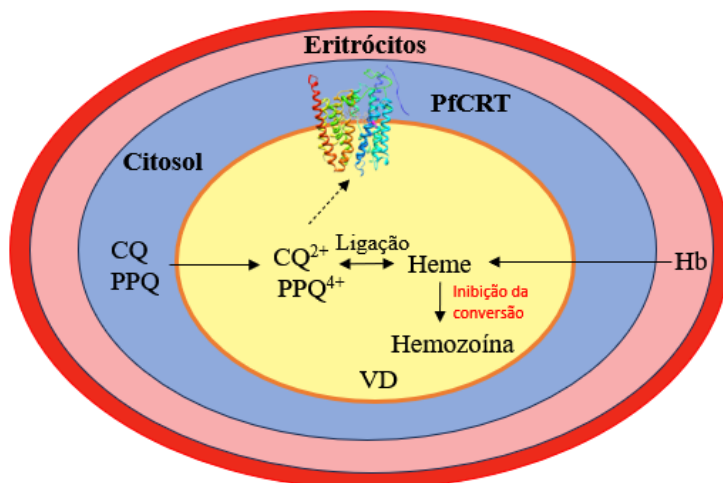


Figura 3.1- Efluxo da PPQ e CQ pelo transportador PfCRT. A PPQ e a CQ encontram-se no VD na sua forma protonada, ligando-se ao heme livre tóxico obtido após catabolização da Hb, importada do hospedeiro para o VD do parasita, inibindo o processo de conversão a hemozoína. (75)

O aumento das resistências à CQ afetou outros fármacos que partilham a estrutura 4-aminoquinolina e que tiveram como “protótipo” a CQ, que revelaram resistência cruzada. Tendo em conta este aspeto, a hibridação antimalárica tornou-se uma alternativa para fazer face a estas resistências. Por hibridação, combinam-se vários farmacóforos numa única molécula. Com o mesmo objetivo, surgiram também as terapias combinadas baseadas em ART (ACTs), que serão abordadas no capítulo seguinte. (76,77)

Face às vantagens inerentes á hibridação molecular, tais como melhorias de solubilidade, biodisponibilidade, estabilidade metabólica, compatibilidade e redução de custos, o desenvolvimento de híbridos em que o farmacóforo 4-aminoquinolina é associado a outras entidades surgiu como uma solução para fazer face às resistências aos fármacos de base quinolínica atuais. (76,77)

### 3.3. Conjugados antimaláricos à base de 4-aminoquinolina

O farmacóforo 4-aminoquinolina, é muito usado no combate à malária devido à disponibilidade de métodos de síntese, baixo custo e acessibilidade. Na CQ, estudos de relação estrutura-atividade revelaram que a presença dos substituintes 7-cloro e 4-amino, é relevante para a inibição da formação de hemozoínas, e também para a acumulação do fármaco no VD do parasita, que é naturalmente ácido, como representado na Figura 3.2. (78)

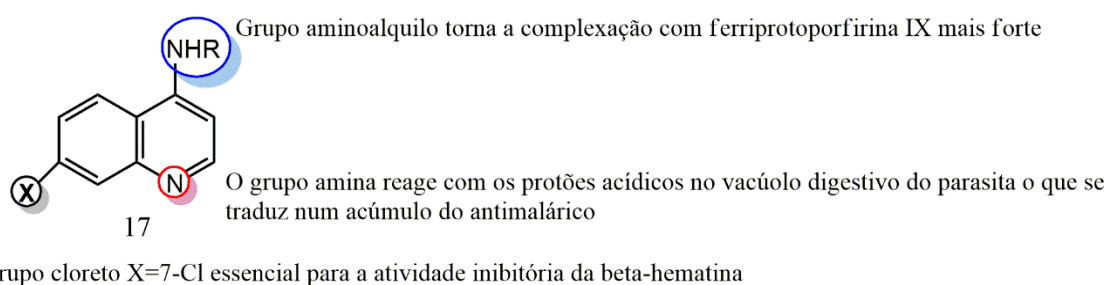


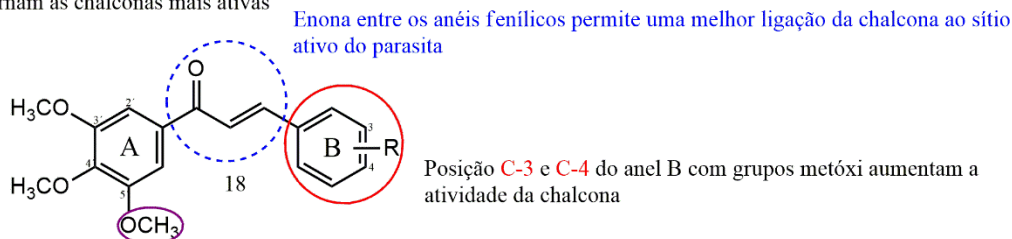
Figura 3.2- Informação de estudos de relação estrutura-atividade (SAR) no grupo das 4-aminoquinolinas. (79)

#### 3.3.1. Conjugados de aminoquinolina-chalcona

As chalconas são metabolitos que derivam da família dos flavonóides e apresentam diferentes ações farmacológicas, incluindo atividade antiplasmodial. A presença de um anel B, representado na Figura 3.3, confere às chalconas uma boa atividade antimalárica devido à sua hidrofobicidade, tamanho e padrão de substituição deste anel. O motivo chalcona, tem sido usado como base para a construção de derivados de chalcona prenilados, quinolinados, e oxigenados, porém o mecanismo de ação do grupo chalcona permanece em debate. Uma proposta de modo de ação passa pela inibição da atividade das proteases cisteínicas do parasita, impedindo o processo de degradação de globina com formação de aminoácidos livres, tendo, por isso, um mecanismo de ação complementar ao da CQ. Por outro lado, em termos estruturais, a estrutura linear da enona

entre os motivos planares dos anéis aromáticos das chalconas facilitam o encaixe no sítio ativo das proteases. (80,81)

Grupos metóxi na posição C-2' e C-5' no anel A tornam as chalconas mais ativas



Grupo metóxi 3',4',5' favorecem a lipofilicidade, favorecendo a atividade antimalárica

Figura 3.3– Resumo de resultados de estudos de relação estrutura-atividade no quimiotipo chalcona. (80,81)

Na síntese de novos híbridos, optou-se pela inserção de unidades triazólicas no híbrido de quinolina-chalcona. Verifica-se que o anel A e B das chalconas é determinante para a atividade antiplasmodial, assim como o número de átomos de carbono presentes na ponte entre o triazol e o farmacóforo quinolínico, como resumido na Figura 3.4. Importa referir que a unidade de triazol confere fluorescência ao híbrido, podendo funcionar como sonda. (82)

A unidade triazólica aumenta as ligações por pontes de hidrogénio e rigidez nos alvos biomoleculares e apresenta boa estabilidade em ambientes ácidos e básicos

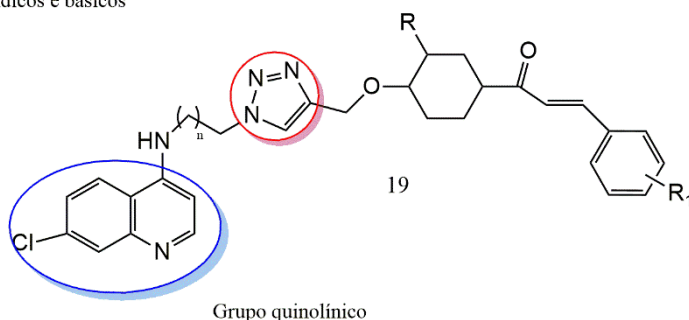
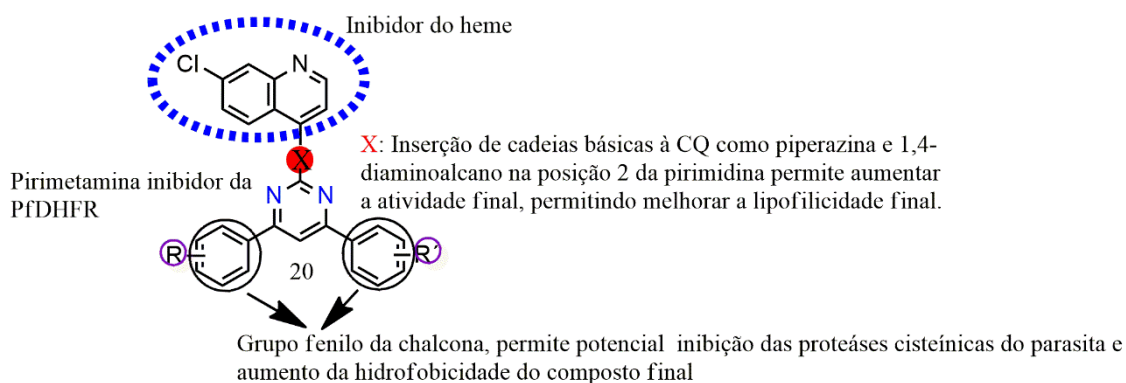


Figura 3.4– Representação estrutural de um conjugado de 4-aminoquinolina-chalcona que incorpora um grupo triazol entre os dois farmacóforos. (82)

### 3.3.2. Conjugados de 4-aminoquinolina-pirimidina

A pirimidina apresenta boa atividade antiplasmodial, inibindo a dihidrofolato redutase e assim comprometendo a síntese de DNA. Foram desenhados híbridos de base quinolínica incorporando um grupo pirimidina, com a finalidade de atuar quer na fase pré-eritrocitária (hepática) quer na fase eritrocitária de *Plasmodium*, permitindo o desenvolvimento de um fármaco para fins de tratamento e de profilaxia. As pirimidinas foram implicadas na inibição da atividade das chaperonas Hsp70 do parasita, anulando assim a via de enovelamento das proteínas plasmodiais. (83)

Híbridos de aminoquinolina-pirimidina foram avaliados quanto à sua atividade antiplasmodial e estudos de relação estrutura-atividade forneceram informação relevante para otimização, como referido na Figura 3.5. Os grupos doadores na posição para e meta nos anéis aromáticos em R e R' parecem ser essenciais para o aumento da atividade antimalárica, onde se verifica que estes híbridos sintetizados demonstram ter a capacidade de se ligarem a diferentes resíduos de aminoácidos das chaperonas PfHsp70-1 e PfHsp70-z de *Plasmodium*, com uma atividade de ligação maior para o composto contendo em x (linker variável) um diaminoalcano de 4 carbonos (n=4) e um grupo hidróxi em (R) na posição para do grupo fenilo, sugerindo um novo mecanismo de ação possível destes híbridos ao interferir com a via de enovelamento das proteínas plasmodiais. (83)



Nos anéis fenílicos a substituição por grupos doadores fortes como grupo metóxi na posição para em R e meta e para em R' aumentou a atividade antimalárica.

Figura 3.5- Resumo de resultados dos estudos de relação estrutura-atividade (SAR) dos derivados de híbridos quinolina-pirimidina. (83)

### 3.3.3. Conjugados de 4-aminoquinolina-isatina

A isatina é um derivado indólico com interesse para síntese química de uma diversidade de compostos heterocíclicos com potente atividade biológica e farmacológica. (84)

A conjugação do heterociclo isatina com estruturas de base quinolínica, em que a isatina é funcionalizada com um motivo tio-semicarbazona originou um híbrido para fins multiterapêuticos, como pode ser visto na Figura 3.6 que incorpora numa única estrutura um inibidor de proteases cisteínicas do parasita ao mesmo tempo que inibe a formação de  $\beta$ -hematina. (78,85)

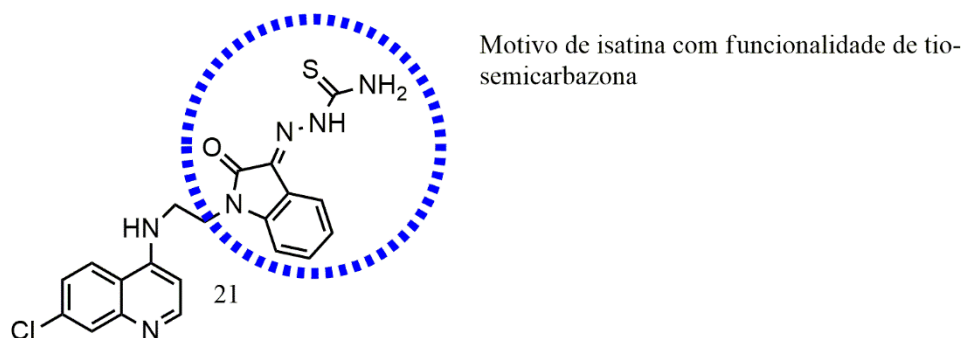


Figura 3.6- Representação estrutural do conjugado de 4-aminoquinolina-isatina. (78)

### 3.3.4. Conjugados de quinolina e agentes antimicrobianos

A azitromicina é um antibiótico do grupo dos macrólidos, de 15 membros, pertencente à subclasse de azalida semi-sintética. É conhecida pelo seu largo espectro de atividade antibacteriana e pelo seu perfil de segurança, atuando ao nível do apicoplasto,

um organelo não fotossintético. O modo de ação exercido é conhecido por “fenótipo de morte lenta”. (86,87)

Starcevic et al. produziu híbridos através da conjugação de uma azalida de 15 membros a uma 4-cloroquinolina, variando o comprimento do grupo de ligação entre os dois farmacóforos, como representado na Figura 3.7, de forma a aumentar a atividade antimalárica e reduzir a atividade antibacteriana. Alguns dos compostos híbridos sintetizados demonstraram elevada eficácia antiplasmodial e seletividade contra espécies de *P. falciparum*, resistentes e sensíveis à CQ. A eficácia dos híbridos poderá estar associado a características físico-químicas, determinantes da lipofilicidade da molécula, ou por não serem substratos de bombas de efluxo, contornando um dos mecanismos responsáveis pela resistência às quinolinas. (88–90)

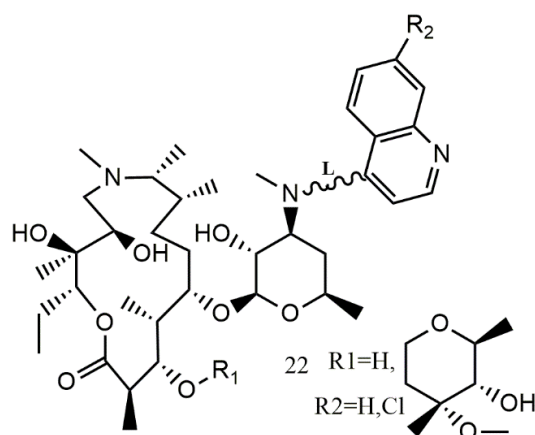


Figura 3.7– Representação estrutural de híbridos baseados em azalida de 15 membros e quinolina. (88)

## 4. Artemisinina, derivados semissintéticos e análogos

### 4.1. Artemisinina

A ART (artemisinina) é uma lactona sesquiterpénica isolada a partir de extratos de uma planta chinesa de absinto doce, *Artemisia annua L.*, em 1970. O farmacóforo da ART é um 1,2,4-trioxano cuja ligação endoperóxido é responsável pela sua atividade antiplasmodial. A terapia da malária tendo como base a ART em associação com antimaláricos de ação mais lenta, como por exemplo MQ (mefloquina) ou PPQ (piperaquina), aumenta a depuração da massa parasitária, conduzindo a uma redução substancial da morbidade e mortalidade, sobretudo em casos de malária devidos a infecção por *P. falciparum*. A ART e seus derivados são fármacos caracterizadas por uma elevada potência e baixa toxicidade mas também por um tempo de semi-vida curto, o que justifica a utilização de combinações (ACTs) e também estimula o desenvolvimento de moléculas híbridas em que o endoperóxido é conjugado com outro(s) farmacóforo(s) antimaláricos de ação mais prolongada. (91,92)

As artemisininas estão entre os fármacos mais potentes para o tratamento da malária, atuando no estágio sanguíneo do parasita, e também como esquizonticidas sanguíneos rápidos em quase todas as espécies de *Plasmodium*, em especial *P. Falciparum*. Após administração de um fármaco desta classe, a parasitemia pode ser eliminada em menos de 48 horas. Um dos desafios é a solubilidade, já que a ART é pouco solúvel em água e em óleo, o que explica a sua baixa biodisponibilidade oral. Atualmente, a ART não é recomendada para uso em monoterapia, exceto para o tratamento parentérico da malária grave. (93–95)

#### 4.1.1. Mecanismos de ação das artemisininas

Embora o modo de ação da ART (artemisinina) e seus derivados permaneça sob escrutínio, a evidência científica indica que estes fármacos causam a morte do parasita pela formação de radicais livres. A ART forma espécies reativas de oxigénio (ROS) no VD do parasita e a eliminação de todos estes radicais pelo sistema antioxidante do parasita é muito improvável. A ponte de endoperóxido e o Fe(II) livre aumentam estas espécies

radicais, que rearranjam para formais radicais centrados em carbono, como representado na Figura 4.1. (91)

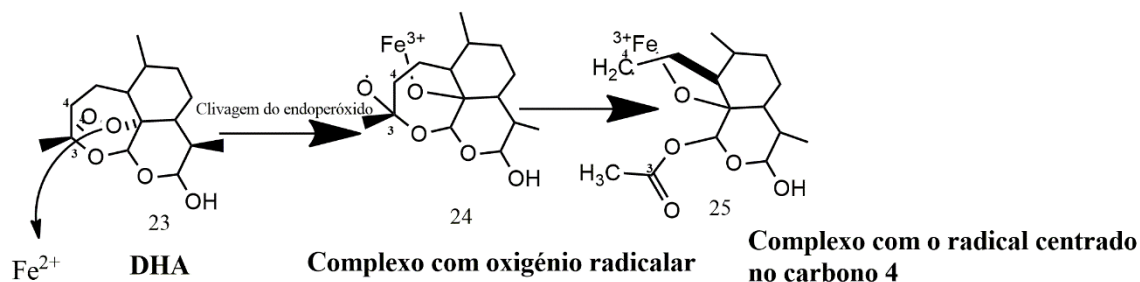


Figura 4.1- Representação estrutural da reação entre o ferro ferroso e a dihidroartemisinina (DHA), com formação de um radical centrado em carbono (25) que irá depois reagir para formar adutos ART-protoporfirina ou adutos com proteínas plasmodiais. A formação destes adutos é sempre precedida pela bioativação, envolvendo primeiramente a formação de um radical centrado no oxigénio (24) e, após a clivagem entre o carbono C3 e C4, um radical centrado em carbono primário ou secundário. (96)

Outro modo de ação das artemisininas passa pelo aumento do pH, por inibição da bomba de prótons H-ATPase, inativação da protease que degrada a Hb para gerar aminoácidos para o parasita e levando à sua morte. (91)

Estudos mostram que a ART alquila átomos de enxofre em proteases envolvidas na degradação da Hb, em proteínas de controlo de tradução e em heme proteico, sendo também responsável pela depleção da glutatona reduzida (GSH) e interferência com a cadeia eletrónica de transporte mitocondrial, bem como pela inibição da  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase do retículo sarcoendoplásmico ortólogo de *P. falciparum*. (88,92)

#### 4.1.2. Artemisinina e seus derivados sintéticos

O desenvolvimento de derivados de ART (artemisinina), como DHA (dihidroartemisinina), arteméter, arteéter e artesunato, representados na Figura 4.2, permitiu melhorar as limitações farmacológicas da ART. (97) A DHA e o artesunato são solúveis em água e administrados por via oral, enquanto o arteméter é solúvel em óleo,

sendo administrado por via intramuscular. (97) Estudos *in vivo* demonstraram conversão rápida da ART em DHA, o metabolito ativo. (98,99)

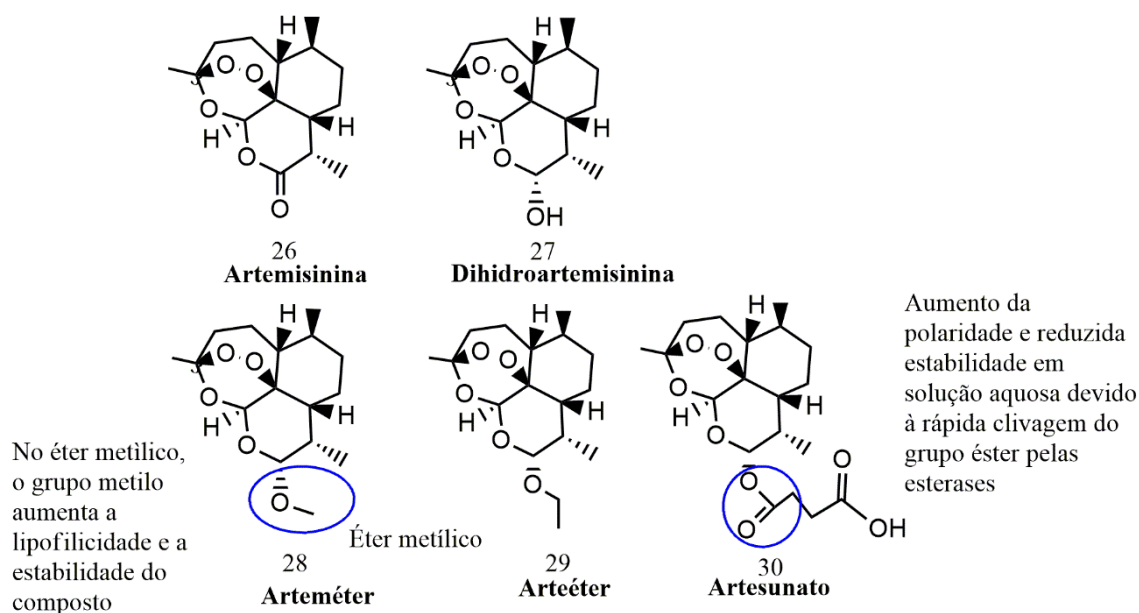


Figura 4.2 - Representação estrutural dos derivados da artemisinina. (97,100)

De forma a reduzir as limitações associadas à obtenção da ART, nomeadamente as flutuações de custo associadas à produção, foram sintetizados endoperóxidos sintéticos, por exemplo ozonídeos, também designados 1,2,4-trioxolanos. (101)

Estudos revelaram que o mecanismo de ação dos trioxolanos apresenta semelhanças em relação às artemisininas, consistindo na alquilação de proteínas do parasita pela formação de espécies radiculares intermediárias, após ativação e clivagem redutiva da ligação peróxido pelo heme ou Fe(II) livre, e posterior rearranjo dos radicais centrados em oxigénio a radicais centrados em carbono. As espécies radiculares alquilantes podem surgir sob a forma de um radical centrado num carbono primário ou secundário, como representado na Figura 4.3. É mais frequente encontrar adutos de alquilação de proteínas por espécies em que o radical está centrado em carbono secundário, não só devido a uma maior estabilidade deste, comparativamente, mas também devido ao facto de a ativação pelo heme favorecer o oxigénio com menor impedimento estéreo. (102)

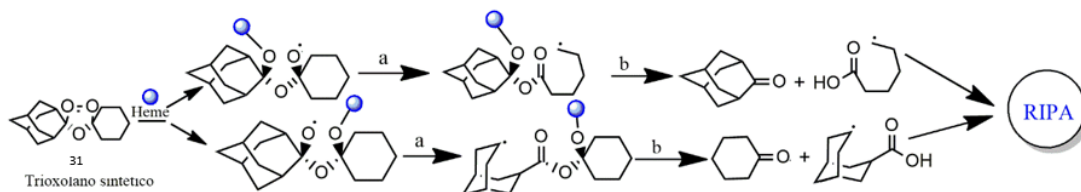


Figura 4.3- Representação estrutural do mecanismo de bioativação e de ação do trioxolano sintético. a) rearranjo; b) clivagem; RiPA- alquilação de proteínas induzida por radicais. (102)

Face às vantagens previamente mencionadas, as artemisininas tornaram-se escolha preferencial na terapêutica antimalárica. De forma a aprimorar as propriedades farmacológicas, garantindo maior eficácia no combate à malária, foram sintetizadas várias moléculas híbridas contendo o farmacóforo endoperóxido, nas quais se incluem conjugados de ART-quinolina, que demonstraram maior eficácia *in vivo* contra algumas estirpes resistentes e sensíveis à CQ. Porém, até hoje poucas são as moléculas que atingiram a fase de testes clínica, o que se deve por vezes à falta de investimento, ou por atuarem apenas numa das fases do ciclo de vida do parasita, pelo elevado peso molecular dos híbridos ou pela falta de informação relativamente a alvos terapêuticos em que atuam. Todavia a investigação nesta área tem sido intensa e recentemente foi formulado um híbrido de MQ-artesunato com atividade antimalárica muito promissora e ação em diferentes fases do ciclo de vida do parasita. (103,104)

A formação do híbrido MEFAS resulta da reação de MQ com artesunato, formando um sal orgânico. A reação ocorre entre o grupo carboxilato do artesunato e o grupo piperidil da MQ como representado na Figura 4.4. Estudos de atividade antiplasmodial revelaram que o híbrido MEFAS apresenta uma forte atividade como esquizonticida sanguíneo contra as estirpes de *Plasmodium* resistentes (W2) e sensíveis (3D7) à CQ, inibindo a transmissão de gametócitos de *P. falciparum*. Foi comprovado recentemente que o híbrido MEFAS apresenta atividade *ex-vivo* relativamente às formas sexuais do parasita de *P. vivax*, atuando sobre o ciclo esporogónico, bem como nas formas assexuais, em diferentes isolados de *P. vivax* e *P. falciparum*. Revelou maior eficácia contra *P. falciparum* *in vitro* do que a MQ e o artesunato usados isoladamente, e apresenta

um custo relativamente baixo, o que facilita o acesso a este antimalárico em países em desenvolvimento, por exemplo em certas regiões de África. (104,105)

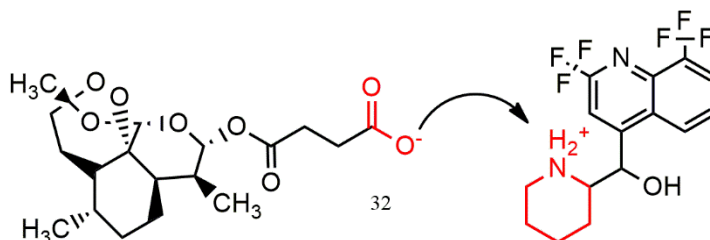


Figura 4.4- Representação da formação do híbrido MQ-artesunato como sal orgânico. (105)

#### 4.2. Normas orientadoras de tratamento da malária não complicada causadas por *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* ou *P. knowlesi* e *P. falciparum*

Tendo em conta os fármacos já referidos, atualmente o objetivo do tratamento da malária causada por *P. vivax* centra-se em curar a doença no estágio de infecção aguda e eliminar os hipnozoítos do fígado, de forma a prevenir futuras recaídas. (14)

Para *P. vivax* sensível à CQ, a CQ por via oral é eficaz e bem tolerada, assim como a terapêutica à base de ART. (14) Em áreas com *P. vivax* resistente à CQ, ACTs contendo PPQ, MQ ou LF são o tratamento padrão recomendado. (14)

Para a malária não complicada resultante de infecção por *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi*, é recomendado o tratamento com ACTs ou com CQ. (14)

Para malária resultante de infecção por *P. falciparum* o guia de tratamento para as crianças e adultos, recomenda o uso de uma das seguintes terapias de associação à base de ART (ACTs): Arteméter + LF; Artesunato + AQ; Artesunato + MQ; DHA + PPQ; Artesunato + SFO- PM ou Artesunato + pironaridina. (14)

### **4.3. Tratamento da malária complicada**

Para o tratamento de malária complicada resultante de infecção por *P. falciparum* é recomendada a administração inicial de uma dose parenteral ou retal de derivados de ART e alcaloides de cinchona (Q e QN), que deve ser seguida por uma combinação ACT administrada oralmente. (14)

## 5. Moléculas híbridas e incorporação de metais

### 5.1. Complexos organometálicos com interesse em química medicinal

O desenvolvimento de resistência aos ACTs suscitou estudos conducentes à descoberta de novos compostos com atividade antiplasmodial, entre os quais se destacam complexos organometálicos que apresentam quimiotipos terapêuticos distintos face às estruturas orgânicas já previamente desenvolvidas contra a malária. (106)

As moléculas orgânicas apresentam estruturas lineares, planares ou tetraédricas, cuja geometria é determinada pela valência dos átomos de carbono. A inserção de entidades metálicas conduz ao aumento da variabilidade de estruturas geométricas, contribuindo também para a formação de estruturas estereoquímicas mais favoráveis, com possibilidades de ajuste da rigidez e estabilidade para maior interação com o alvo terapêutico. (107)

A interação com alvos enzimáticos, pode ser feita através da complexação de inibidores enzimáticos aos centros metálicos, com geometrias diversas (quadrangular plana (a), trigonal bipiramidal (b), piramidal quadrangular (c), octaédrica (d), sanduíche (e) e semi-sanduíche (f), como representado na Figura 5.1. (107)

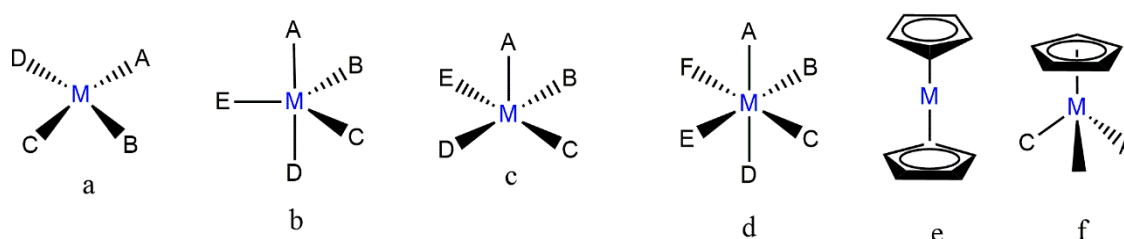


Figura 5.1- Representação estrutural da diversidade geométrica dos complexos organometálicos. (107)

Contudo, os complexos organometálicos apresentam algumas limitações. Podem exibir toxicidade, dependendo do tipo de metal, e de forma geral caracterizam-se pelas suas reduzidas propriedades farmacológicas. (107)

A platina, o níquel e o paládio pertencem ao grupo 10 da tabela periódica e o estado de oxidação mais importante é +2, com configuração eletrônica d8. Em termos de preferência termodinâmica, estes metais apresentam uma geometria quadrangular plana na presença de ligandos de campo forte, com uma maior estabilização das orbitais ocupadas. A geometria quadrangular plana dos complexos de Pt(II) torna-os diferentes dos baseados em íons metálicos de Cr(III), Ru(II), Os(II), Rh(III), Ir(III). (108,109)

Os complexos de coordenação à base de Pt são usados como anticancerígenos, sendo integrados no grupo farmacológico dos agentes alquilantes por estabelecerem ligação com as moléculas de DNA conduzindo a reticulação das cadeias. Os adutos formados inibem a replicação do DNA, bem como de RNA e a síntese de proteínas, promovendo mecanismos de apoptose das células tumorais. (110)

Um dos fármacos anticancerígenos mais conhecidos é a cisplatina, cujo mecanismo de ação está representado na Figura 5.2. a). A cisplatina passa da corrente sanguínea para as células por difusão passiva, ou através de um transportador de membrana de cobre CTR1. A redução da concentração de cloretos do meio extracelular para o intracelular estimula a troca destes por água, com a formação de um complexo intermediário monoaquá  $[Pt(NH_3)_2Cl(H_2O)]$ , que pela sua natureza eletrofílica reage com as bases nucleofílicas do DNA, nomeadamente com as bases purínicas na posição N7 de guanina e adenosina, formando adutos de ligação Pt-DNA. A troca do segundo cloreto permite a ligação a outra base de purina de DNA através de um aduto reticulado, levando à inibição do ciclo celular, e conseqüentemente, à apoptose e morte celular. (107)

Para além da ligação a bases de DNA, a incorporação de ligandos lábeis acoplados a íons metálicos, como por exemplo Au(III) ou Pd(II) demonstrou utilidade, por interagirem com proteases cisteínicas de parasitas plasmodiais, induzindo inibição covalente. Um dos exemplos são os complexos de Au(I), que demonstraram aplicabilidade em terapêutica anticancerígena como inibidores da glutatona redutase e da tioredoxina redutase (PfTrxR). O mecanismo de inibição envolve a troca dos seus ligandos lábeis, formando em seguida ligações covalentes com os resíduos de cisteína no sítio ativo das protéases, como representado na Figura 5.2.b). (107)

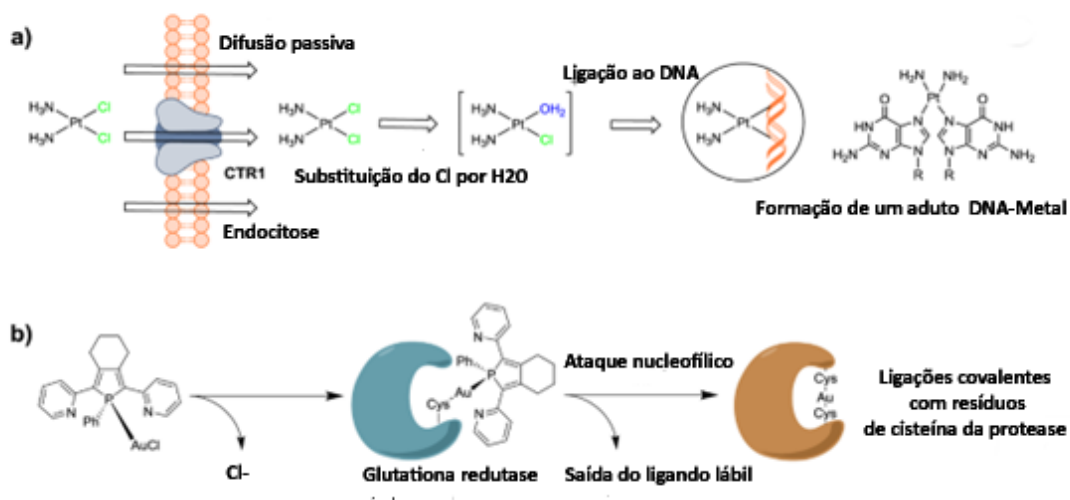


Figura 5.2- Mecanismos de ação propostos para os complexos de platina e de ouro, através da interação com diferentes alvos terapêuticos cancerígenos. a) Formação de adutos citotóxicos com bases purínicas de DNA; b) Complexo de Au(I) coordenado covalentemente, como inibidor enzimático da glutatona redutase. Adaptado de (107).

Para além da ligação a alvos terapêuticos, os ligandos por si só podem ter efeito terapêutico, por modificação da esfera de coordenação, por exemplo, induzida por alterações do estado de oxidação do metal, podendo promover a libertação de ligandos. Um dos exemplos é o caso dos complexos de Ru(III), cuja redução a Ru(II) é favorecida em condições de anóxia, com a libertação de H<sub>2</sub>S, um ligando bioativo citoprotetor. (107)

## 5.2. Atividade antiplasmodial dos complexos organometálicos

Os metais do grupo da platina (PGMs), de que fazem parte o irídio, o ruténio, o ródio, o ósmio, a Pt e o Pd, exibem propriedades físico-químicas semelhantes às da Pt. Todos estes metais têm a capacidade de se ligar a átomos ricos em eletrões, como o nitrogénio, o oxigénio ou o enxofre, o que possibilita uma grande diversidade de ligações com compostos orgânicos. (106)

Em malária, os principais mecanismos de ação associados a complexos organometálicos do grupo da Pt são a inibição da hemozoína (característica de complexos

que envolvem ligandos quinolínicos), a interação com ácidos nucleicos e mecanismos de catálise intracelular. (106)

### **5.2.1. Inibição da formação dos cristais de hemozoína**

A ferroquina (FQ) e seus análogos atuam inibindo o processo de destoxificação do grupo heme pelo parasita, para além de promoverem a formação de espécies radicalares que reagem com estruturas moleculares do parasita. (106)

### **5.2.2. Interação com o DNA**

Estudos recentes mostram que o Ru interage com o DNA. Complexos de Ru com uma unidade Cp\* (pentametilciclopentadienilo), (Figura 5.3) interagem com as bases adenina e timina, o que foi comprovado pela eletroforese de agarose em gel. Com base em estudos dos complexos de Ru(III)Cp\* sintetizados os autores verificaram que quanto menor o valor de IC<sub>50</sub> (maior atividade antiplasmodial) maior era a constante de ligação ao DNA (K<sub>b</sub>), como ilustrado na Figura 5.4, (Gráfico A). Já da análise da Figura 5.4, (Gráfico B) que representa a curva de titulação UV/vis para o complexo 33 resultante da interação com HS-DNA, verificou-se que para a gama de comprimentos de onda analisados havia picos de absorvância, o que nos indica que este complexo se ligava a determinados pontos do DNA. Estudos posteriores de *docking molecular* e agarose em gel indicaram que o complexo 33 interage com zonas ricas em adenina e timina do DNA antiplasmodial. Estes complexos foram considerados promissores por demonstrarem baixa toxicidade e seletividade para o genoma de *Plasmodium*. (106)

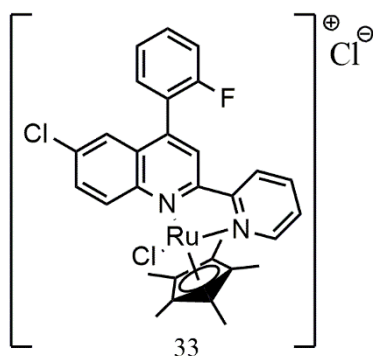


Figura 5.3- Representação estrutural de um dos complexos de [Ru (III)Cl] coordenado a uma unidade Cp\* com seletividade para *Plasmodium*. (106)

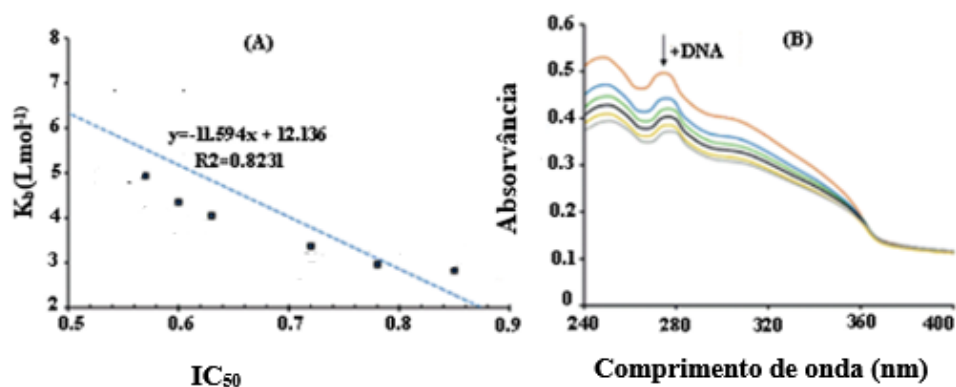


Figura 5.4- Gráficos representativos da constante de ligação ( $K_c$ ) em função do valor de  $IC_{50}$  dos complexos de Ru(III)Cp\* estudados (Gráfico A) e, absorvância em função do comprimento de onda (nm) para o complexo 33 (Gráfico B). (106)

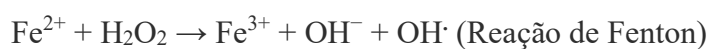
### 5.2.3. Catálise intracelular

Alguns complexos PGMs foram testados relativamente à sua capacidade de transformação catalítica de biomoléculas relevantes, como o NAD e NADH. Esses estudos, conduzidos pelos grupos de Melis et al. e Stringer et al., que seguiram a investigação baseada no alvo desidrogenase de lactato Plasmodial (pLDH), realizada pela primeira vez por Makler e seus associados, usaram complexos de Ir(III)Cp\* e Rh(II)Cp\*,

monitorizando a conversão de NAD em NADH através da detecção de azul de formazan. Os resultados permitiram comprovar que os complexos organometálicos podem atuar como catalisadores intracelulares pelo bloqueio de processos bioquímicos essenciais, neste caso na hidrogenação de NAD/NADH, representando mais um mecanismo de ação contra o parasita *Plasmodium*. (106,111,112)

### 5.3. Bioquímica do ferro na fisiologia humana

O ferro participa em inúmeros processos fisiológicos, tais como a síntese de DNA, a formação celular e o transporte de elétrons. Encontra-se normalmente entre dois estados oxidativos,  $Fe^{2+}$  e  $Fe^{3+}$ , e funcionando como catalisador nos sítios ativos de várias enzimas, em vias metabólicas essenciais. Contudo, uma das suas limitações caracteriza-se pela sua baixa solubilidade em água. O Fe também pode causar danos fisiológicos através da formação de radicais hidroxilo, que derivam de reações de Fenton, por catálise da decomposição de peróxido de hidrogénio,  $H_2O_2$ , pelo  $Fe^{2+}$ . (113)



#### 5.3.1. Ferroceno

O ferroceno é um complexo organometálico que resulta da coordenação de duas unidades de ciclopentadienilo a  $Fe^{2+}$ , como representado na Figura 5.5. O pentadienilo apresenta baixo peso molecular, elevada estabilidade e lipofilicidade, propriedades que facilitam a construção de complexos contendo esta estrutura passíveis de serem administrados por via oral, e com boa atividade antimalária. (114,115)

Ao contrário dos complexos à base de Pt, a atividade antiproliferativa do ferroceno é devida à ligação a proteínas e não a bases purínicas de DNA. Esta atividade antiproliferativa, baseia-se na reação de Fenton, envolvendo a formação de ROS que causam danos no DNA e promovem morte celular. (113)

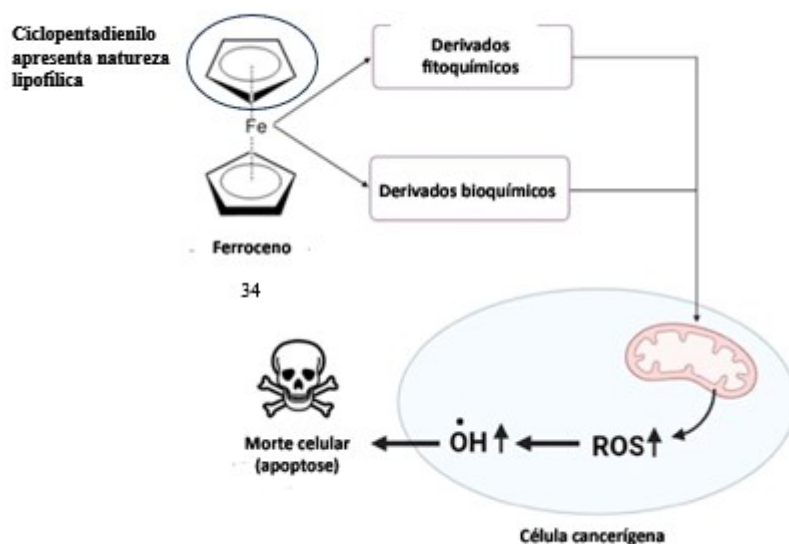


Figura 5.5- Representação do Ferroceno (34) e do seu mecanismo de ação, que envolve formação de ROS. Após doação eletrônica, o ferroceno, em que o ferro se encontra sob a forma de Fe(II), é convertido a Fe(III). O íon Fe(III) é responsável pela formação de ROS pela reação de Fenton, induzindo apoptose. Adaptado de (113).

### 5.3.1.1. Híbridos de artemisinina-ferroceno

Como já referido, o artesunato constitui uma alternativa à ART, por melhoramento da sua solubilidade em água. Tendo em conta as propriedades do artesunato e as aportadas pelo ferroceno (aumento da lipofilicidade do fármaco e aumento da permeação membranar), uma das estratégias de hibridação recente resultou em estruturas híbridas de artesunato-ferroceno com boa atividade *in vitro* contra os estádios assexuados do parasita. Com vista a aumentar o metabolismo do híbrido a complexação das duas entidades foi feita com base em ligações éster e amida. A clivagem destas ligações no vacúolo ácido do parasita liberta o endoperóxido, promovendo a sua ação, como representado na Figura 5.6. (116)

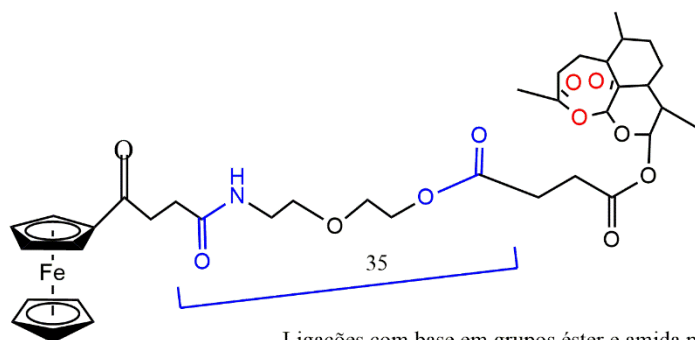


Figura 5.6- Representação estrutural do híbrido em que o ferroceno é acoplado a um derivado de artemisinina através de ligações éster e amida. (116)

### 5.3.2. Ferroquina

A FQ foi um dos primeiros medicamentos antimaláricos a sintetizados, sendo constituído por uma 4-aminoquinolina que se encontra ligada covalentemente a um grupo ferrocenil e a uma alquilamina básica, como representado na Figura 5.7. Estudos indicam que o mecanismo de ação da FQ é semelhante ao da CQ, acumulando-se no VD do parasita pela sua natureza lipofílica e inibindo a síntese de hemozoína. Todavia ao contrário do observado com a CQ os parasitas *Plasmodium* ainda não desenvolveram resistências a este fármaco antimalárico. (115)

Outro mecanismo que se pensa estar na base da ação da FQ é a formação de espécies radicalares no VD do parasita, resultantes de reações redox induzidas por eletrões, promovendo a destruição da membrana lipídica e, conseqüente, a morte do parasita. A FQ apresenta boa atividade contra estirpes de *P. falciparum* resistentes e sensíveis à CQ. (115)

Estudos de relação estrutura-atividade elucidaram sobre a forma como a FQ interage com o alvo terapêutico. A conformação “dobrada” resultante da ligação por ponte de hidrogénio entre N2 e N3 da FQ parece ser essencial para a manutenção da configuração da molécula até chegar ao alvo terapêutico. Já na cadeia alquilamina básica os grupos metilo em N3 parecem ser essenciais para a atividade, enquanto a posição da

unidade ferrocenil na CQ parece também ter influência no grau de interação com o pigmento antimalárico, com efeito na atividade antimalárica. (115,117)

Ligação por ponte de hidrogénio entre o hidrogénio do grupo amina em N2 e o azoto básico da alquilamina parece favorecer a manutenção de uma conformação fixa até chegar ao alvo terapêutico

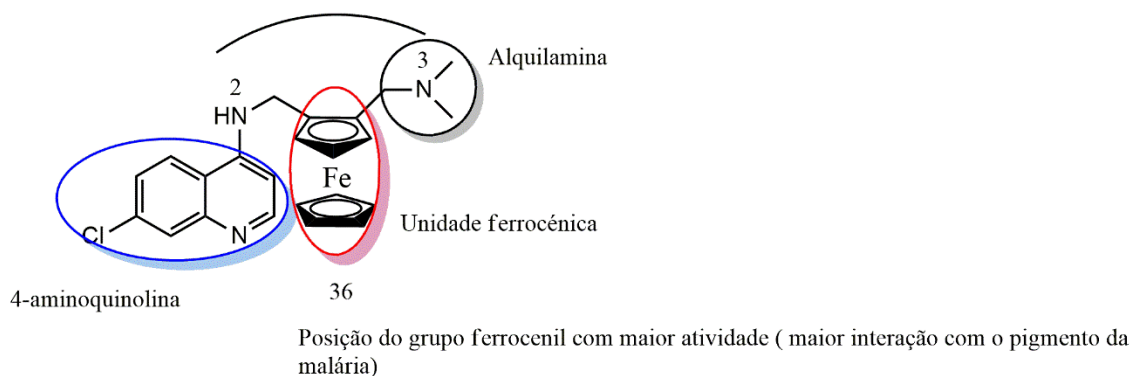


Figura 5.7- Representação estrutural da ferroquina. (115,117)

A FQ, apresenta uma maior capacidade de combater a parasitemia, de forma mais rápida, do que a CQ, sendo necessária uma dose menor em várias estirpes de *Plasmodium*, e de roedores, relativamente á CQ. A FQ é facilmente absorvida, permanecendo no organismo sob a forma de um metabolito ativo (dimetilferroquina) por 31 dias e apresentando um tempo de semi-vida de 16 dias, o que permite uma redução elevada da taxa de parasitemia. (114,115,118)

A FQ encontra-se atualmente em fase II dos ensaios clínicos, em combinação com o artefenomel, um trioxolano sintético, com o objetivo de avaliar a eficácia da combinação em dose única de FQ e artefenomel para o tratamento da malária não complicada, provocada por *P. falciparum*. (119)

Em comparação com a 4-aminoquinolina, AQ, ART, Q e PQ, verificou-se que a FQ é mais eficaz contra certas estirpes de *Plasmodium*. A presença da unidade ferrocénica protege a unidade quinolínica, que fica menos suscetível a desenvolvimento de resistências por parte do parasita. (115)

### 5.3.2.1. Ligação de outros compostos biologicamente ativos à ferroquina

Para além do estudo da FQ e da unidade de ferrocenilo de forma isolada, têm sido desenvolvidas estratégias de formulação de complexos associando ao ferroceno estruturas orgânicas já estabelecidas como antimaláricos, assim como a associação da FQ a complexos biologicamente ativos. Foram introduzidos substituintes diferentes no grupo amina ( $R = H$ ;  $CONHBn$ ) ligado à estrutura da FQ e também a variação no tamanho da cadeia alquílica que liga os 2 fragmentos biologicamente ativos ( $n = 2-6$ ), na tentativa de avaliar efeitos estruturais na atividade antiplasmodial, (Figura 5.8). Verificou-se que as variações no grupo R e a alteração do tamanho do espaçador metilénico têm impacto na atividade antimalárica contra as estirpes sensíveis D10 e resistentes K1. A atividade demonstrada pelo conjugado foi manifestamente superior à da CQ e o aporte de atividade antimalárica pelo aumento da cadeia lateral foi atribuído a uma maior facilidade de oxidação da unidade ferrocénica. (120)

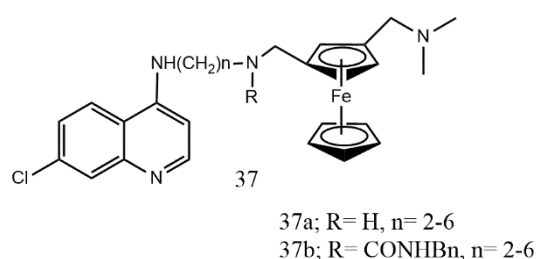
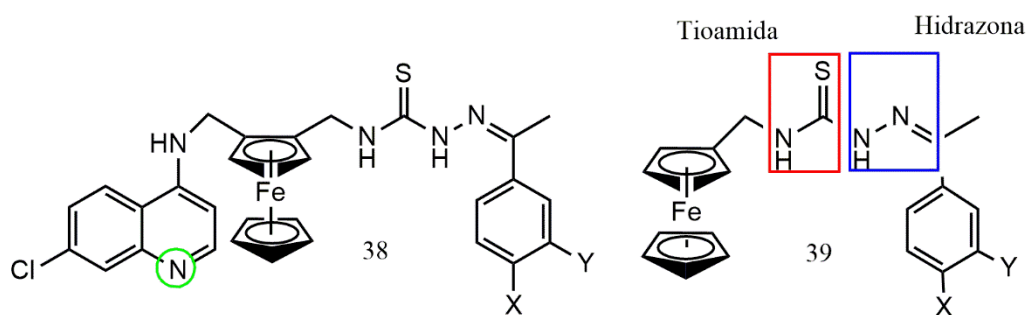


Figura 5.8- Representação estrutural do conjugado organometálico de ferroquina e cloroquina. (120)

### 5.3.2.2. Híbridos derivados de tio-semicarbazonas

As tio-semicarbazonas são compostos orgânicos que incorporam a porção hidrazona ((HC=N-NH-) e a porção tioamida (S=C-N-). Devido à facilidade de síntese e integração com outras estruturas orgânicas, as tio-semicarbazonas têm sido usadas como base para a síntese de muitos compostos que apresentam ampla diversidade biológica, na qual se inclui a atividade antimalárica. (121)

As tio-semicarbazonas causam a morte de determinados parasitas protozoários pela inibição de proteases cisteínicas específicas. Os conjugados de FQ-(tio-semicarbazona) mostraram maior eficácia contra quatro estirpes de *P. falciparum*, quando comparadas com o conjugado ferrocenil-(tio-semicarbazona) sem a entidade quinolínica, como representado na Figura 5.9. (120)



Diferença de atividade do complexo 38 para o 39 parece ser devida à presença da amina básica que melhora a potência do fármaco, por ajudar no direcionamento e acúmulo do fármaco no vacúolo digestivo do parasita

Figura 5.9- Representação estrutural do conjugado de ferroquina- (tio-semicarbazona) (38) e do conjugado ferrocenil- (tio-semicarbazona) (39). (120)

### 5.3.2.3. Conjugação de híbridos de quinolina-FQ com inibidores da GR

A glutathione (GSH) é responsável por gerar resistência à CQ pela sua ação antioxidante, protegendo o parasita do dano oxidativo. Contudo, a GSH necessita de ser reduzida para ter efeito antioxidante, através da redução da glutathione dissulfeto (GSSH) pela enzima glutathione dissulfeto redutase (GR). Estudos realizados para acoplamento de

inibidores da GR com a FQ através de ligações covalentes, de forma a minimizar problemas ao nível da farmacocinética, resultaram na construção de um pró-fármaco híbrido. A atividade contra as estirpes K1 e NF54 de *Plasmodium* dos análogos de FQ (como já referido neste capítulo relativamente à alteração da posição da unidade ferrocénica ou da cadeia alquilamina) não demonstraram ter qualquer tipo de diferença na atividade antimalárica final, em relação à FQ. Com a hibridação da FQ, ligando-a a um inibidor da GR, verificou-se que a atividade é maior que a dos inibidores da GR isolados, porém estes híbridos não superaram a atividade dos análogos de FQ já existentes, apresentando uma reatividade intermédia relativamente à CQ e a estes análogos de FQ. O complexo 40, representado na Figura 5.10, mostrou alguma capacidade de inibição da GR. (120)

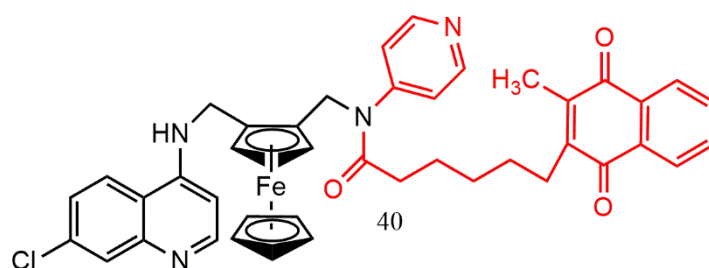


Figura 5.10- Representação estrutural do híbrido de FQ com um inibidor da GR que revelou maior atividade, e capacidade inibidora de GR. (120)

### 5.3.3. Ferrocifeno, um análogo do tamoxifeno

Na construção de novos complexos, alguns motivos aromáticos, como os grupos fenilo, têm vindo a ser substituídos por grupos metálicos. Um exemplo é o ferrocifeno, um análogo do tamoxifeno, que atua como modulador dos recetores alfa de estrogénio ( $E\alpha$ ) inibindo o processo transcricional do DNA, induzido pelo estradiol nas células tumorais. Além de atividade anticancerígena, o composto apresenta também atividade antimalárica. O ferrocifeno tem como alvos o DNA, proteínas e enzimas, por exemplo do sistema PfTrxR. O mecanismo de ação do ferrocifeno envolve inicialmente transferência de eletrões para a unidade de metaloceno, seguida pela captação de protões a partir de

moléculas de água. Após a perda de dois elétrons e dois prótons ocorre a formação de estruturas radiculares, com a formação de um intermediário, como representado na Figura 5.11. Esta espécie sofre ataque nucleofílico em três pontos distintos da molécula, por reação de Michael, originando um desequilíbrio redox nas células. (107,113,122)

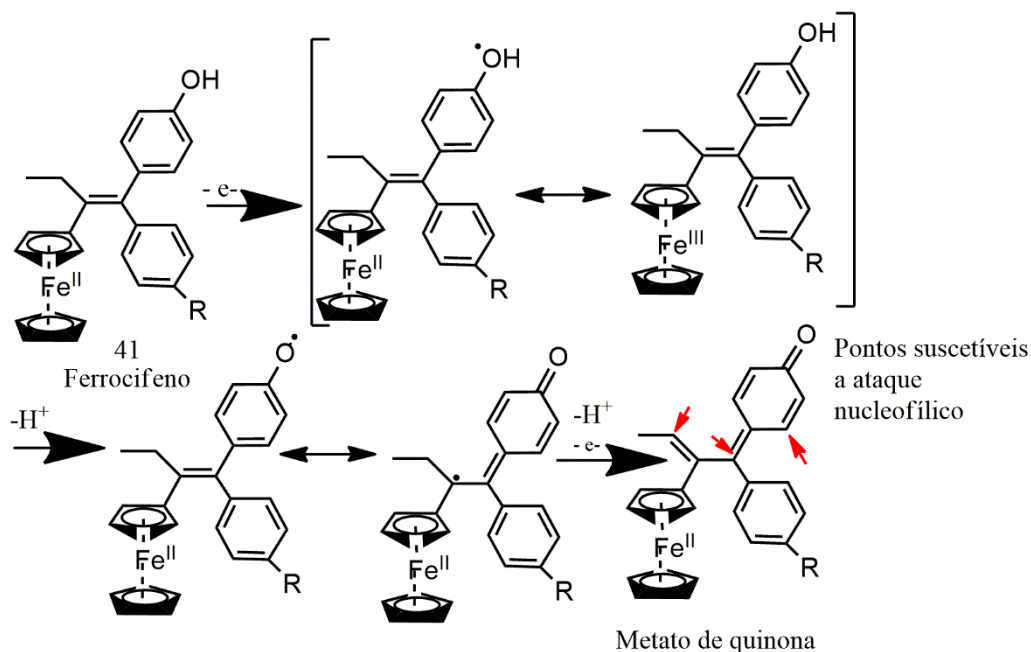


Figura 5.11- Representação do mecanismo de ação do ferrocifeno, baseado num processo redox. (107)

#### 5.4. Complexos híbridos baseados em PGMs (Ir, Ru, Rh, Os, Pd, Pt)

##### 5.4.1. Propriedades químicas do rutênio e a sua atividade organometálica

O facto de a química de coordenação do Ru se encontrar bem estudada leva a que haja uma maior diversidade estrutural em termos de compostos produzidos. Este metal apresenta baixa toxicidade e seletividade, sendo bastante usado em metodologias de síntese, como catalisador, o que o torna uma primeira escolha face a outros metais do grupo dos PGMs, como Pd, Pt, Rh e Ir. São conhecidos oito estados de oxidação do Ru, porém os mais comuns são os estados de oxidação +2, +3 e +4. O Ru, assim como todos

os metais pertencentes ao grupo PGMs têm a capacidade de se ligar covalentemente a carbonos, nomeadamente de alcenos e alcinos. (123,124)

A utilização de compostos de Ru em várias estruturas com potencial anticancerígeno deve-se aos diferentes estados de oxidação do metal e à sua geometria octaédrica, à taxa de substituição lenta dos ligandos e à sua seletividade para os alvos terapêuticos. (125)

De todos os estudos existentes dos complexos organometálicos, os que apresentam maior atividade antiplasmodial são o ferroceno e os complexos contendo Ru. Os complexos coordenados a estruturas quinolínicas como o caso da rutenocina (RQ) apresentam uma atividade antimalárica similar à FQ. (123)

O complexo de Ru associado à CQ, demonstrou a atividade antimalárica mais elevada, atuando em diferentes estádios do ciclo de vida do parasita de *Plasmodium*. A sua atividade idêntica à da CQ, atuando em todos os estádios assexuados do parasita (anelar, trofozoíto e esquizonte), mas também apresenta atividade gametocítica, atuando, assim nos estádios sexuados do parasita. (123)

Após uma análise comparativa entre a CQ e o complexo de RQ, verificou-se que o tempo de permanência do complexo no organismo era maior, induzindo mais rapidamente a morte do parasita e garantindo a eliminação da parasitemia 18 horas após a administração. Devido à rapidez de atuação, a sua utilização é particularmente interessante no sentido de encurtar o tempo de tratamento da doença. (123)

Os complexos de Ru(II) são mais reativos em ambientes ácidos e com concentrações elevadas de glutatona, conferindo seletividade destes metais para o parasita *Plasmodium*. (126)

Macedo et al. verificaram que os complexos de ruténio-CQ apresentam uma atividade antimalárica superior contra estirpes resistentes, quando comparados com a CQ e com o metal livre, o que pode ser explicado pelos diferentes modos de ação que a unidade metálica pode ter, nomeadamente a inibição da hemozoína. (126)

### 5.4.2. Mecanismo de ativação celular dos complexos organometálicos

As ativações dos complexos organometálicos são regidas por dois mecanismos. No primeiro mecanismo, representado na Figura 5.12, há uma manutenção do estado de oxidação do metal, ocorrendo uma hidrólise inicial, com a substituição por um ligando endógeno. Este tipo de mecanismo ocorre em metais com estados de oxidação baixos como o caso do Ru(II). O segundo mecanismo de ação, já envolve os metais com estados de oxidação mais elevados, nomeadamente Ru(III) e Au(III). O Ru(III) é reduzido no meio intracelular, com formação de Ru(II), sendo que durante esta transição podem ocorrer processos oxidativos de determinadas proteínas e moléculas endógenas. Durante esta redução o Ru(III) liberta ligandos da esfera de coordenação, ligandos esses que apresentam atividade antiparasitária, funcionando os complexos de Ru(III) na maioria das vezes como pró-fármacos. (126)

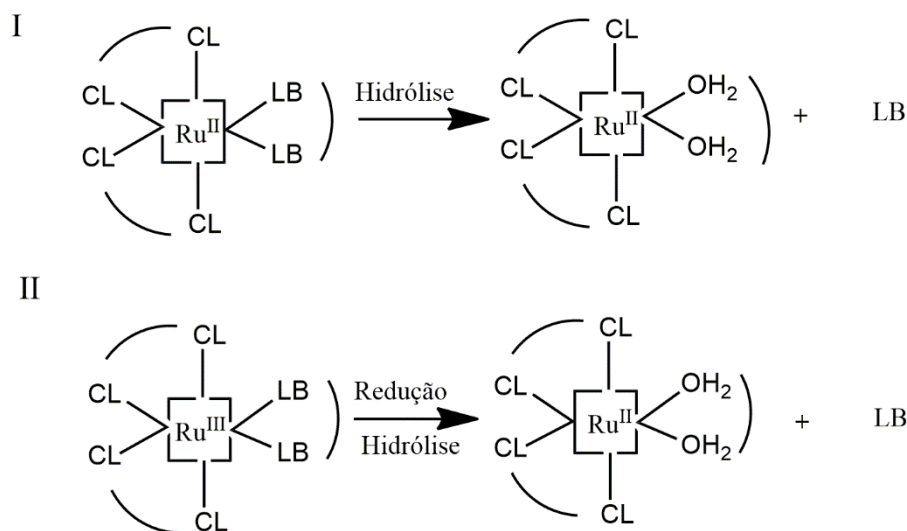


Figura 5.12- Mecanismos de ativação celular dos complexos de Ru. I- Hidrólise e libertação de LB (ligando biologicamente ativo); II- Redução do centro metálico, hidrólise e libertação do LB. Adaptado de (126).

### 5.4.3. Híbrido organo-ruténio aminoquinolina-trioxolano

Da mesma forma que foi acoplado artesunato à unidade ferrocénica de forma a potenciar a atividade antimalárica, como já mencionado neste capítulo, foram também desenvolvidos estudos de forma a melhorar a biodisponibilidade e assegurar um tempo de semi-vida mais longo em relação aos derivados de ART, assim como assegurar vários mecanismos de ação que inibam o desenvolvimento de resistências, incorporando na mesma entidade química um endoperóxido, uma unidade quinolínica e uma unidade metálica de Ru. Um dos exemplos é o híbrido organo-ruténio aminoquinolina-trioxolano que contém uma unidade rutenoceno, uma unidade quinolínica e o farmacóforo 1,2,4-trioxano, representado na Figura 5.13 (B). Uma análise comparativa da atividade antimalárica deste híbrido com as atividades da CQ, da ART, de um híbrido de rutenoceno-trioxano (Figura 5.13 (C)), do precursor cetona trioxano e de um dímero trioxano, o híbrido sintetizado **B** demonstrou uma elevada atividade antimalárica, na gama dos nanomolar, contra as estirpes K1 e Dd2 sendo 7 a 8 vezes mais ativo que a CQ usada isoladamente contra as mesmas estirpes. A RQ assim como os seus derivados apresentaram uma atividade comparável à FQ. O híbrido ruténio aminoquinolina-trioxolano (Figura 5.13 (B)), demonstrou ser muito mais ativo em relação à estrutura intermediária contendo uma unidade rutenocenil acoplada a um trioxolano (Figura 5.13 (C)), sem a aminoquinolina, o que indica que o núcleo quinolínico é imprescindível na sua atividade. Já a atividade do trioxolano simples (Figura 5.13 (A)), foi muito inferior em relação ao composto **C**, o que realça a importância farmacológica da unidade rutenocénica. O híbrido **B** apresentou baixa citotoxicidade em células saudáveis de mamíferos, o que indica que é seletivo e pouco tóxico. (106,127)

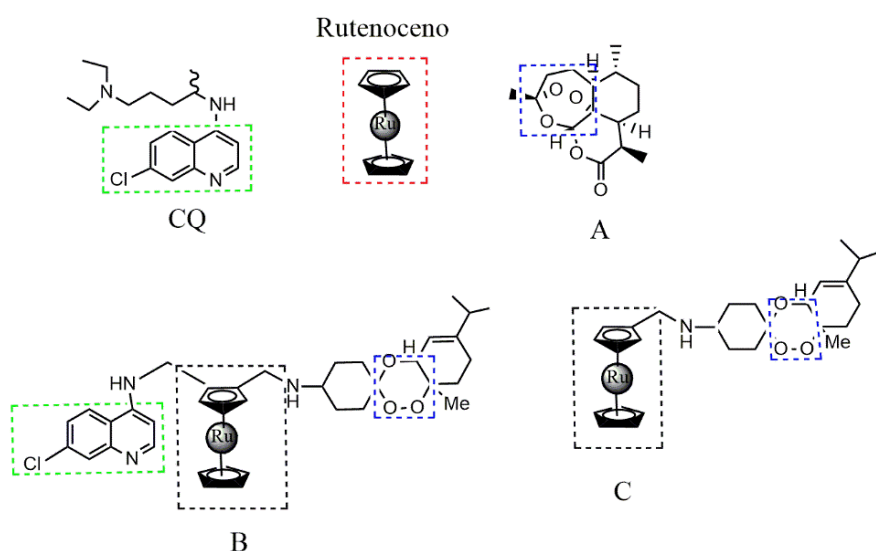


Figura 5.13- Representação estrutural de híbridos antimaláricos de rutenoceno-aminoquinolina-trioxolano desenhados a partir de unidades isoladas de CQ e ART. (106)

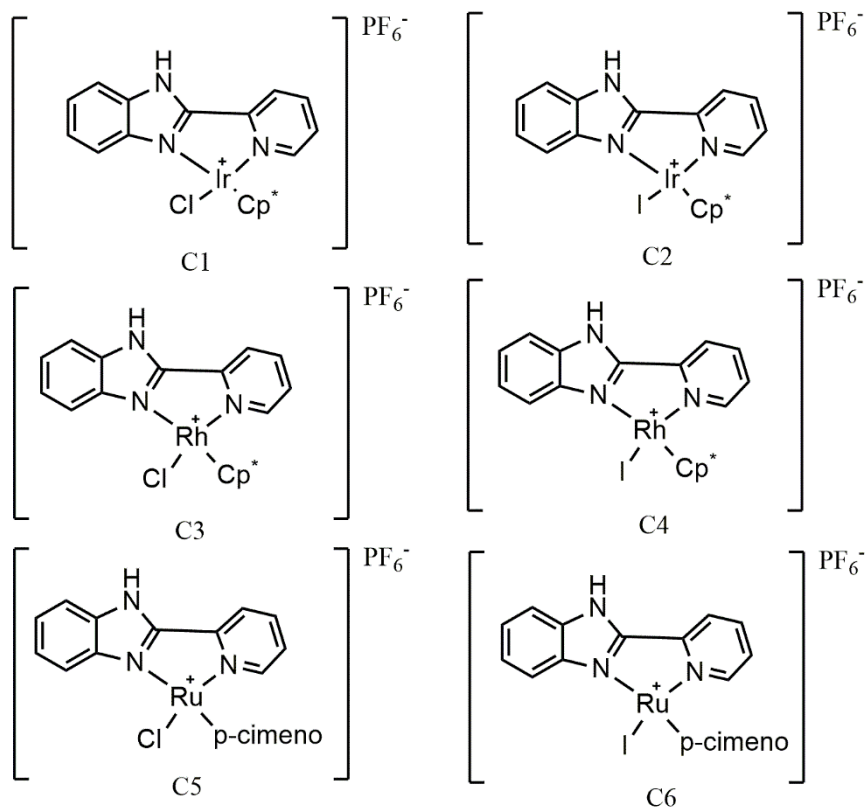
#### 5.4.4. Complexos organometálicos de benzimidazol

Os ligandos de benzimidazol, apresentam por si só atividade antiparasitária, antifúngica e antitumoral. Os complexos de Rh, Ir e Ru conjugados com derivados de 2-fenilbenzimidazol demonstraram potencializar a atividade do derivado de benzimidazol. A elevada capacidade quelante dos ligandos de benzimidazol faz com que estes sejam frequentemente inseridos em complexos organometálicos, levando a atividades biológicas potentes dos complexos resultantes. (128)

Estes complexos organometálicos, atuam promovendo uma alteração da homeostase redox funcional das células, por disrupção da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), o que leva a um aumento de ROS, gerando stress oxidativo e levando à morte do *Plasmodium*. A atividade funcional da G6PD está dependente de elevados níveis de  $\text{NAD}^+$ . Quando os valores de  $\text{NAD}^+$  e  $\text{NADH}$  são baixos existe uma disrupção funcional da atividade da enzima. Os complexos de Rh(II), Ir(III) e Ru(II) alteram o rácio  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  por apresentarem uma excelente atividade ao nível da

hidrogenação catalítica, o que foi reportado por Melis et al. e Stringer et al na sequência de estudos de avaliação de complexos de quinolina-triazol de Ir(II). (112,128)

Tendo em conta esta linha de pensamento, a hibridação daqueles metais (Ru, Ir e Rh) com um ligando de 2-(2-piridil) benzimidazol, como representado na Figura 5.14, conduziu a uma estrutura com atividade antimalárica contra a estirpe NF54 de *Plasmodium*, o que resultou do seu mecanismo de ação multialvo, confirmando também a importância da atividade individualizada dos metais no contributo para a atividade final, já que os ligandos de benzimidazol apresentam, isoladamente, uma atividade antimalárica inferior à exibida pelos híbridos. Porém, o grau de atividade é diferente para os diferentes complexos, já que para os complexos de Ir a taxa de conversão de  $\text{NAD}^+$  a  $\text{NADH}$  é maior. Por outro lado, a troca do cloreto (Figura 5.14 (C1)) pelo ligando iodeto (Figura 5.14 (C2)) aumenta as taxas de conversão em  $\text{NADH}$ , o que se traduz numa melhor atividade catalítica, já que o ligando iodeto é facilmente lábil, conduzindo a uma maior taxa de hidrogenação do cofator  $\text{NAD}^+$ . Os complexos de Rh (Figura 5.14 (C3 e C4)) e Ru (Figura 5.14 (C5 e C6)) não apresentam capacidade de hidrogenação do cofator  $\text{NAD}^+$ , contudo a atividade antimalárica é similar à dos complexos de Ir, confirmando que a taxa de conversão de  $\text{NAD}^+$  a  $\text{NADH}$  não é um fator determinante para o aumento da atividade final, neste caso para a estirpe NF54 de *Plasmodium*. Outros mecanismos de ação ainda não esclarecidos podem estar envolvidos, justificando o aumento da atividade antimalárica observado. (128)



\* p-cimeno= para-cimeno  
 Cp\* = 1,2,3,4,5-pentametilciclopentadieno

Figura 5.14- Representação estrutural dos compostos organometálicos de Ru, Ir e Rh conjugados com um ligando de 2-(2-piridil) benzimidazol. (128)

### 5.5. Compostos híbridos à base de gálio

O gálio é conhecido pelas suas propriedades antibacterianas, sendo reconhecido como Fe pelas bactérias e sendo, por conseguinte, facilmente absorvido. Contudo o gálio não é reconhecido pelas enzimas dependentes de Fe, já que não tem a capacidade de ser reduzido em condições fisiológicas, o que leva a uma alteração do metabolismo do Fe e à consequente morte das bactérias. Uma das principais características do gálio é ser facilmente hidroxilado em condições fisiológicas, levando a uma redução da sua biodisponibilidade e consequentemente comprometendo a sua ação. (129)

De entre os vários processos metabólicos do parasita verifica-se que a fase eritrocítica é dependente de Fe, assim como a síntese do heme, a degradação da Hb e síntese de DNA. Assim, uma depleção deste metal pode interromper o metabolismo do

parasita tornando-o por isso um metal interessante no quadro do desenvolvimento de fármacos antimaláricos. (130)

O complexo de gálio representado na Figura 5.15 (complexo 43), em que o metal está associado ao ligando 1,12-bis-(2-hidroxi-3-etil-benzil-1,5,8,12-tetraazadodecano), /apresenta atividade antiplasmodial contra as estirpes HB3 e Dd2, resistentes à CQ, atuando no processo de destoxificação do grupo heme e apresentando uma eficácia semelhante ao correspondente complexo de Fe(II) (complexo 42, Figura 5.15), para ambas as estirpes. Desta forma, o gálio (III) surge como um bom substituto do Fe(II) em condições biológicas. (130)

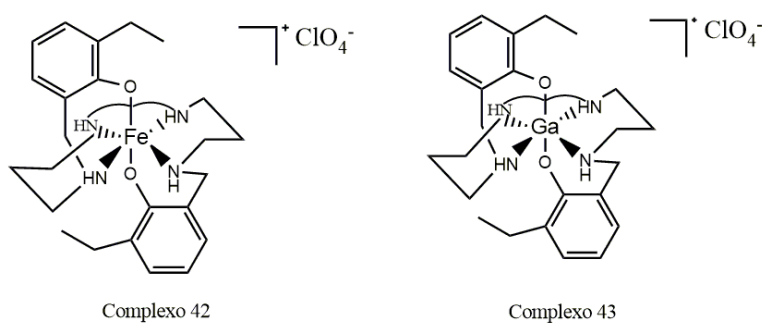


Figura 5.15- Representação estrutural de complexos de gálio (III) e Fe(II), com atividade antimalárica. (130)

## 5.6. Complexos de Cobre (I)-CQ

Complexos contendo íons metálicos de cobre (Cu) têm sido estudados em termos da sua bioatividade e potencial para tratamento de doenças, nas quais se inclui a malária. Os complexos de Cu são associados a múltiplos mecanismos de ação, nomeadamente a inibição da atividade do proteossoma e da telomerase, a degradação e intercalação do DNA e a formação de ROS. Vários estudos reportam que a complexação de compostos que exibem atividade antiplasmodial com íons de Cu aumenta a atividade. Um dos exemplos envolve o uso de ligandos de carboxamidrazona, em que se confirmou um aumento da atividade antiplasmodial contra a estirpe 3D7 de *P. falciparum*. Um dos complexos de CQ-Cu(I) sintetizados, representado na Figura 5.16, consiste num

complexo de Cu(I) coordenado triplamente, com uma CQ e duas trifenilfosfinas (PPh<sub>3</sub>), apresentando uma geometria trigonal planar. A inserção dos ligandos PPh<sub>3</sub> e CQ permite estabilizar esta geometria por aumento das interações  $\pi$ - $\pi$  destas estruturas, contudo a PPh<sub>3</sub> não demonstrou ser importante na atividade antimalárica do composto final, aumentando a citotoxicidade. (131)

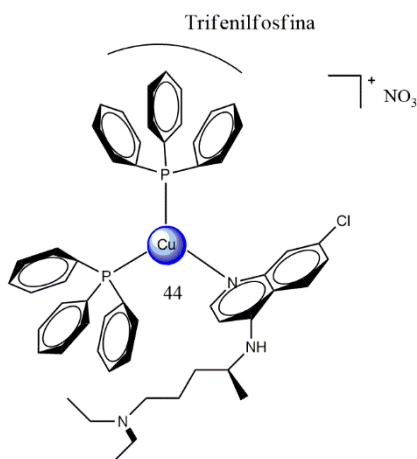


Figura 5.16- Representação estrutural do complexo de Cu(I)-CQ-PPh<sub>3</sub>. (131)

Villarreal W, et al.; conseguiram comprovar a interação destes complexos de Cu(I)-CQ com o heme através da análise de dados de absorvância a 402 nm, já que a este comprimento de onda se registra um máximo de absorção das transições  $\pi$ - $\pi$  \* no grupo porfirina. Da exposição dos complexos de Cu(I)-CQ com o heme detetou-se uma redução da absorvância derivada de um aumento da quelação do complexo de Cu à ferriprotoporfirina IX. Estudos de UV-Vis e métodos fluorométricos realizados pelo mesmo grupo mostraram que a interação com o DNA era mais forte em relação à cloroquinodifosfina, atuando como intercaladores de DNA, o que sugere que esta interação com o DNA poderá derivar da interação do Cu com a CQ. (131)

Os complexos de Cu sintetizados, Cu(I)-CQ e Cu-CQ-PPh<sub>3</sub>, são, de entre todos os metais até então complexados com CQ, como é o caso de Au e Pt, os que apresentam maior inibição da formação da hematina, demonstrando propriedades vantajosas face a complexos análogos de Ru-areno, pois são mais potentes contra estirpes resistentes à CQ

(W2) e sensíveis 3D7, o que estimula a incorporação de Cu em entidades químicas para tratamento de infecções provocadas por estirpes da *Plasmodium* resistentes. (131)

### 5.7. Complexos de níquel

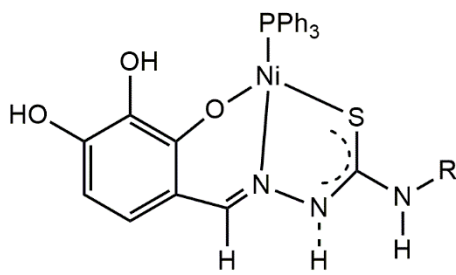
As tiosemicarbazonas são conhecidas pela sua ligação às proteases de cisteína, mas foi também demonstrado que se ligam a metais celulares, com a formação de ROS, interferem com a absorção do Fe a nível celular, diminuindo a atividade da enzima ribonucleotídeo redutase que está dependente do Fe para a catálise e síntese de novo de desoxirribonucleotídeos (DNA), e interferem também com a CTE do parasita. (132)

Relativamente às características de coordenação destes ligandos, observa-se que os metais quando coordenados a ligandos aniônicos apresentam uma força de coordenação maior, em comparação com ligandos neutros, e a presença do átomo de enxofre nas tio-semicarbazonas também favorece essa força de estabilização. A ligação ao metal é feita essencialmente através de uma ligação tridentada envolvendo três heteroátomos doadores de elétrons, O, N e S. A natureza lipídica da entidade metálica em coordenação com as tio-semicarbazonas melhora a absorção celular pelo parasita, facilitando o transporte dos ligandos livres para o meio intracelular. Os quelantes tridentados de tio-semicarbazona permitem a quelação de metais celulares essenciais para a sobrevivência do parasita, mas também geram stress oxidativo. (133)

Os ligandos à base de fosfina, como é o caso da trifenilfosfina ( $\text{PPh}_3$ ), têm vindo a ser incorporados em vários complexos, como no caso do complexo de CQ-Cu(I) já referenciado neste capítulo. Para além da estabilidade que estes ligandos conferem aos complexos, estes apresentam uma ampla gama de aplicações, incluindo farmacológicas, nas quais se incluem complexos com atividade antifúngica, antioxidante, antitumoral e antibacteriana. A  $\text{PPh}_3$  também promove uma maior eficiência catalítica em complexos usados em metodologias de síntese, tanto de compostos orgânicos como inorgânicos. A incorporação destes ligandos confere maior hidrofobicidade aos complexos, com consequente melhoria nas propriedades farmacológicas, e bem assim na citotoxicidade (compostos antineoplásicos) e atividade antimalárica. (133,134)

Alguns complexos de Ni(II) são conhecidos como inibidores da telomerase e da topoisomerase II, induzindo a morte celular programada das células tumorais. (133)

Tendo em conta o potencial da  $\text{PPh}_3$  foi proposta a síntese de complexos de Ni(II) associados a este ligando, incorporando também derivados de poli-hidroxibenzaldeído, como representado na Figura 5.17. Em termos da avaliação da citotoxicidade dos ligandos e respetivos complexos metálicos em determinadas linhagens cancerígenas, observou-se um aumento da atividade citotóxica com o aumento da lipofilicidade da cadeia lateral (R) do grupo amina. Os complexos de Ni sintetizados confirmam que o mecanismo de ação responsável pela atividade antiplasmodial depende da capacidade de se ligarem a uma das fendas do DNA, sem capacidade de intercalação devido ao seu tamanho molecular desfavorável. A ligação ao DNA é feita através de interações hidrofóbicas por parte dos motivos benzaldeído,  $\text{PPh}_3$  e fenilo com as bases de DNA. A ligação deste complexo ao DNA é forte, sendo os complexos 46 e 47 aqueles que demonstram maior força da ligação, o que justifica a maior citotoxicidade e atividade antimalárica nestes complexos. (133)



- 45 (R=CH<sub>3</sub>)
- 46 (R=C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)
- 47 (R=C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)
- 48 (R=C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>)

Figura 5.17- Representação estrutural dos complexos de Ni(II) com variação do grupo amina terminal. (133)

## 5.8. Compostos de fosfina de ouro(I)

A crisoterapia consiste no uso de complexos de Au para o tratamento de diversas doenças. De entre os modos de ação associados a estes complexos, um dos mecanismos elucidados envolve a interação com proteínas e enzimas, concretamente com os grupos tiol e selenol. A auranofina, representada na Figura 5.18, é conhecida pela sua atividade em várias doenças parasitárias, atuando por inibição da enzima tioredoxina glutathione redutase na esquistossomose. Um dos alvos que tem sido estudado em relação à ação da auranofina é o selenoproteoma do parasita. No caso de *P. falciparum*, a tioredoxina redutase (PfTrxR) é responsável por manter um ambiente reduzido e equilibrado, neutralizando o stress oxidativo. Desta forma, um alvo interessante para desenvolvimento de moléculas contra o parasita seria a PfTrxR, por inibição enzimática. Por outro lado, o facto de haver diferenças estruturais ao nível do centro redox C-terminal desta enzima, tanto no parasita como no inseto vetor ou no hospedeiro humano, confere seletividade para os potenciais inibidores desenvolvidos. Estudos anteriores realizados com complexos de Au mostraram que um dos seus principais mecanismos de ação consiste na inibição da PfTrxR, tendo a capacidade de facilmente de acumularem nas hemácias, ou seja, atuando no estágio eritrocítico do parasita. (135)

Um dos estudos recentes realizado por Ssemaganda e seus colaboradores, comprovou a capacidade da auranofina para inibir a PfTrxR, induzindo a apoptose das hemácias parasitadas, porém um dos problemas que o estudo revelou foi a ligação a tióis de proteína, devido à sua estrutura linear. Uma das estratégias adotadas para resolver este problema foi a substituição por ligandos bidentados de fosfina, como representado na Figura 5.18, (49) que permitiu aumentar a força de ligação ao metal, reduzindo a labilidade e a facilidade de troca de ligandos com tióis. Esta característica diferenciadora do complexo 2-piridilfosfina de Au(I) bis-quelutado face à auranofina foi evidente em termos da atividade antiplasmodial *in vitro*, a qual se verificou ser superior contra estirpes de *P. falciparum* que infetam humanos, garantindo-se assim uma maior seletividade em termos de alcance e inibição da enzima PfTrxR, com especial atenção para a estirpe de *P. knowlesi*, na qual demonstrou ter uma atividade similar em relação à CQ, com valores de IC<sub>50</sub> na ordem de 5.5 nM (4.6 nM para a CQ). (135)

Contudo, embora os compostos de Au apresentem propriedades que lhes conferem eficácia e alguma seletividade, ainda subsistem vários problemas, requerendo otimização,

nomeadamente ao nível da administração e biodisponibilidade *in vivo*, toxicidade e estabilidade. Porém, estas estratégias recentes de acoplamento a ligandos com mais pontos de coordenação ao ião metálico e redução da toxicidade inerente a este metal faz com que o seu uso seja interessante, tanto do ponto de vista da formulação quanto por atuar através de mecanismos de ação diferentes, no tratamento da malária. (135)

As novas estratégias também em desenvolvimento consistem no uso de vacinas, com o fim de atenuar os efeitos infecciosos do parasita *Plasmodium*, no uso de fármacos que atuam sobre o parasita no estágio sanguíneo por alquilação do DNA e de parasitas geneticamente modificados que podem induzir uma resposta imune protetora. Porém, estes fármacos de ligação ao DNA alquilam de forma irreversível o DNA humano, conferindo elevada toxicidade, o que restringe o seu uso. (135)

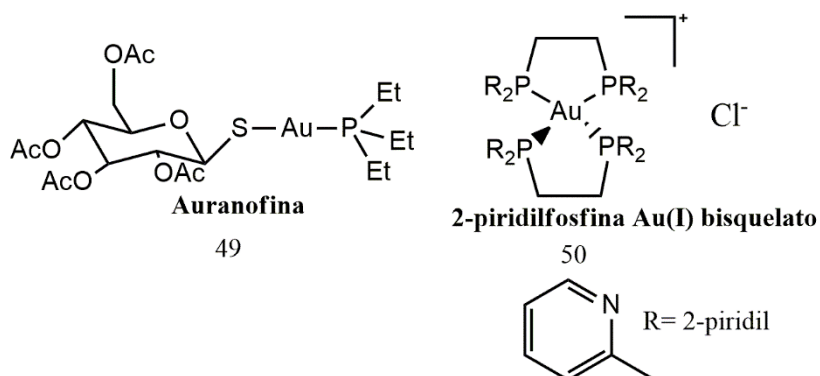


Figura 5.18- Representação estrutural do complexo de auranofina (49) e do complexo 2-piridilfosfina de Au(I) bisquelato (50). (135)

## 5.9. Complexos de ródio e irídio conjugados com CQ

O complexo de Rh resultante da complexação do COD (ciclooctadieno) e CQ com o metal demonstrou ter atividade *in vivo* e *in vitro* contra *P. berghei*, exibindo uma atividade similar à do difosfato de CQ e reduzida toxicidade face a outros metais já testados, o que constitui um aspeto diferenciador face a outros complexos organometálicos testados. (136)

O complexo de Ir também foi acoplado a um COD, contudo a sua atividade foi similar à do complexo de Rh, apresentando atividade contra *P. berghei*. A formação de sais de cloreto de irídio a partir de CQ originou uma espécie química cuja estrutura está representada na Figura 5.19, que demonstrou atividade significativamente superior à da CQ. Porém não existe uma preferência em termos de estado de oxidação ou geometria molecular do Ir, relativamente ao Rh, que se traduza numa melhoria significativa da atividade antimalárica (137,138)

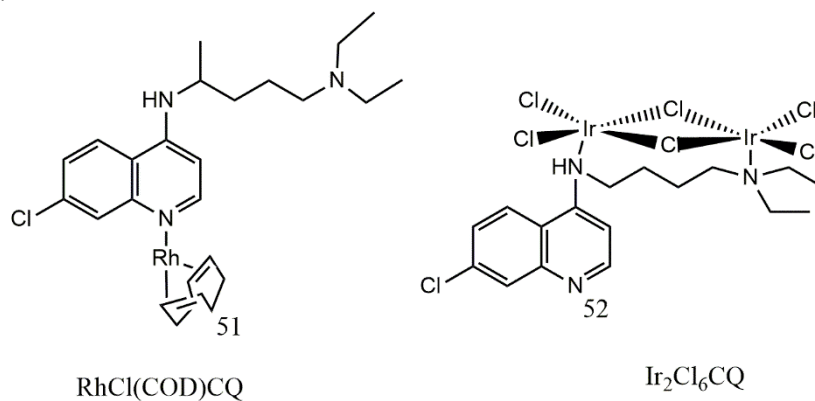


Figura 5.19- Representação estrutural de complexos de Rh e Ir conjugados com CQ. (137)

## 5.10. Cobalto e as suas propriedades de coordenação

Devido às suas propriedades redox e magnéticas, o cobalto é um elemento interessante em química de coordenação. Apresenta vários estados de oxidação, sendo o Co(II) e o Co(III) os iões mais frequentes no organismo. Os complexos de Co(III) apresentam geralmente uma geometria octaédrica. Os iões Co(II) podem apresentar diferentes coordenações, sendo reconhecidos como sendo bastante lábeis. O Co(III) tem a vantagem de formar ligações enzimáticas fortes, apresentando os complexos de Co(III) atividade antiviral, antifúngica e antibacteriana. (139)

Complexos de Co(III) inertes, acoplados a ligandos com substituintes lipofílicos que sequestram o centro metálico, como o representado na Figura 5.20, mostraram possuir atividade antiparasitária. Pensa-se que esta atividade está relacionada com o poder surfactante destes complexos, promovendo a disrupção da membrana parasitária. (139)

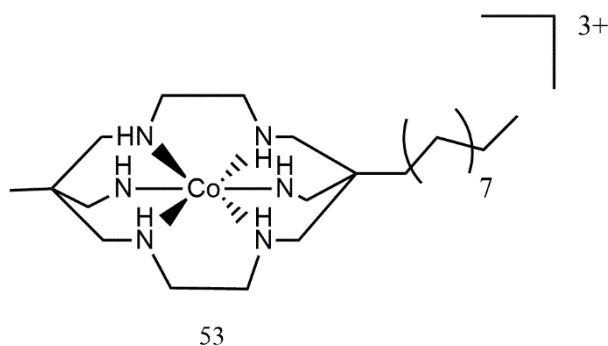


Figura 5.20- Complexo de Co(III) com atividade antiparasitária demonstrada. (139)

Devido à labilidade dos complexos de Co, alguns complexos de Co(II) e de Co(III) foram submetidos a troca de ligandos, permitindo formar complexos conjugados a resíduos de histidina de proteínas, como representado na Figura 5.21. Estes complexos poderão ter interesse na terapia da malária. (139)

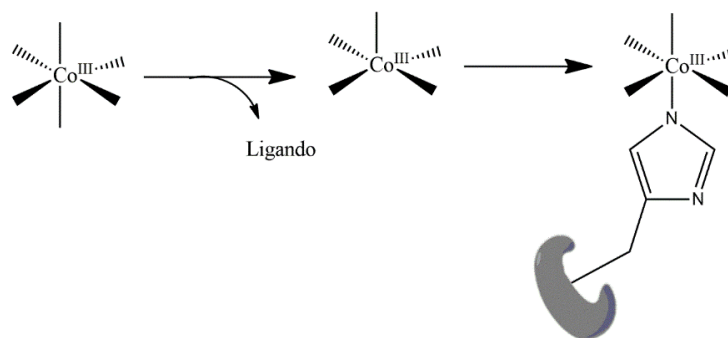


Figura 5.21- Representação do mecanismo de troca axial lábil de um ligando por um resíduo de histidina. (139)

## 5.11. Quelantes de metal

### 5.11.1. A desferrioxamina como quelante de ferro

Alguns compostos quelantes de Fe podem ser encontrados diretamente nos microorganismos, que os sintetizam como forma de adquirir o Fe do meio ambiente, podendo também ser administrados sob a forma de quelantes de Fe livres, causando a morte do parasita pela privação deste metal. Os requisitos farmacocinéticos e estruturais que estes compostos devem ter incluem um bom equilíbrio em termos de hidrofílicidade e hidrofobicidade, de forma a conseguir permear as membranas celulares. Em termos estruturais o ligante deve ter uma estrutura hexadentada, bem como elevada afinidade e seletividade para o Fe(III). Um dos quelantes de Fe conhecidos é a desferrioxamina (DFO), representada na Figura 5.22, que apresenta uma constante de quelação na ordem dos  $10^{31}$ , conferindo uma elevada estabilidade de complexação e, portanto, uma boa atividade antimalárica. Por outro lado, a DFO apresenta afinidade para outros iões metálicos, como por exemplo o cálcio e o magnésio, o que também pode ser prejudicial para o parasita. Em termos da relação estrutura-atividade da DFO, verificou-se que o grupo amina terminal apresenta a capacidade de se ligar ao Fe(III), porém a baixa permeabilidade deste complexo nas células infetadas por *Plasmodium* e o facto de não ter atividade para estádios mais avançados de *Plasmodium* tornam a DFO mais difícil de utilizar como antimalárico. Com o objetivo de melhorar a permeabilidade para as células

infetadas e aumentar o seu espectro de atuação, foram feitas algumas modificações estruturais à DFO para melhorar a lipofilicidade e a atividade antimalárica, através da ligação ao grupo amina terminal da DFO do ácido N-metilntranílico (MA), observando-se um aumento da atividade antimalárica. (130)

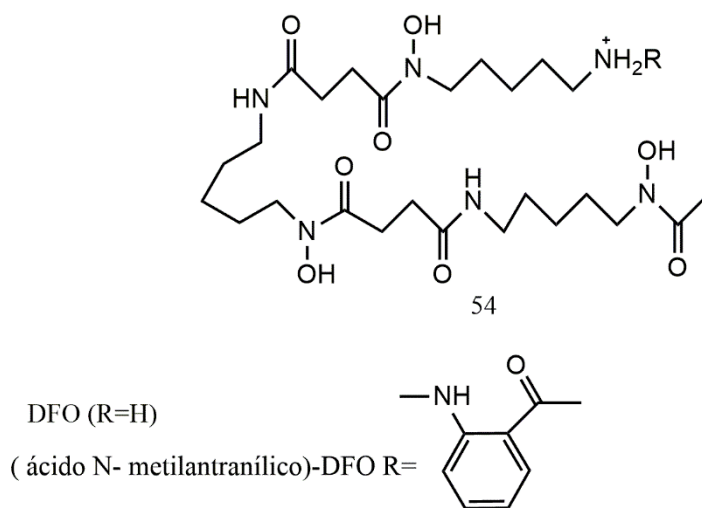


Figura 5.22- Representação estrutural de um quelante de ferro, a desferrioxamina, e do correspondente derivado do ácido N-metilntranílico, com propriedades antimaláricas melhoradas. (130)

### 5.11.2. Novas moléculas de Atokel híbridas

Com o objetivo de fazer face às estirpes de *Plasmodium* multirresistentes às trioxaquinas foram formuladas várias estratégias que envolvem a complexação da unidade trioxolano com unidades de rutenocênio, ferrocênio e outros metais, como já foi descrito ao longo deste capítulo, com vista a aprimorar a atividade antimalárica, mas também através do uso de ligandos com propriedade de metal. Uma das novas estratégias utiliza o anel de naftoquinona, que derivou da estrutura inicial da AQ, ao qual se fez associar uma estrutura 8-aminoquinolínica substituída que está associada à série de compostos TDMQ (agentes quelantes de cobre), usados como agentes quelantes de Cu em pacientes com doença de Alzheimer, como representado na Figura 5. 23. (140)

Quelantes TDMQ - quelantes de cobre que induzem a formação de espécies reativas de oxigênio

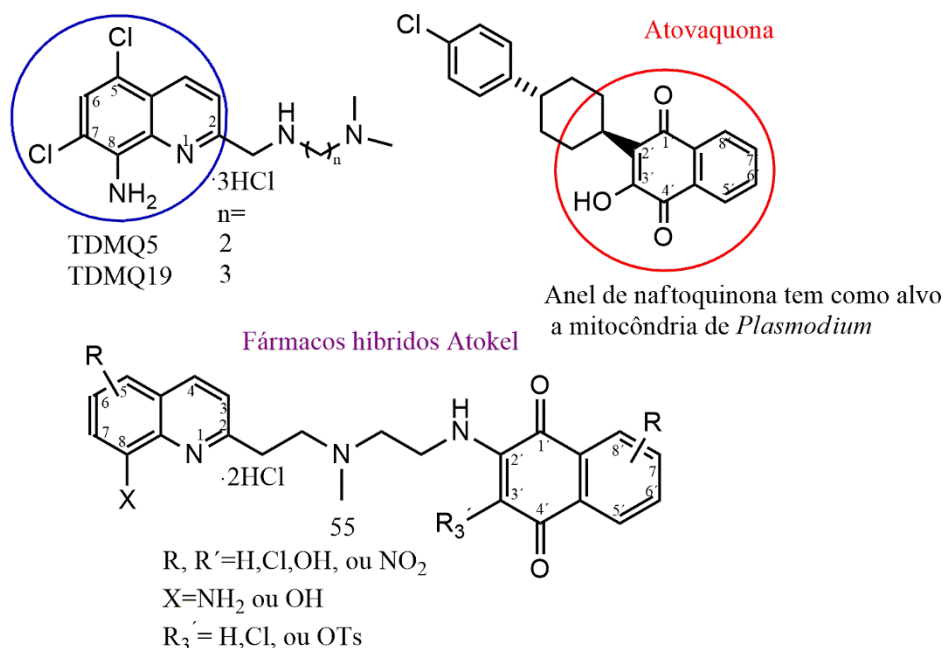


Figura 5.23- Representação estrutural do híbrido acoplado a um esqueleto de um quelante de Cu (TDMQ). (140)

De entre os compostos sintetizados verificou-se que os quelantes TDMQ5 e TDMQ19 apresentam uma afinidade moderada para o Cu(II), promovendo um ciclo redox com formação de ROS. O interesse da associação do esqueleto de TDMQ às naftoquinonas, tem em vista a capacidade de estes quelantes se ligarem a íons metálicos *in situ*, gerando stress oxidativo nas mitocôndrias, que por si só apresentam níveis elevados de elétrons e oxigênio. (140)

A variação em R5 e R7 e a substituição do anel de naftoquinona em R3' e em R8' permitiram inferir que nos complexos-TDMQ a afinidade para o Cu parece ser mais pronunciada em ligandos que oferecem uma esfera de coordenação estreita que com vários pontos de coordenação, já que conseguem acomodar o metal em diferentes estados de oxidação. (140)

Os híbridos de atokel apresentaram contudo atividade inferior à da atovaquona, o que pode estar relacionado com a ausência do grupo hidroxilo da atovaquona, crucial para a interação com o citocromo bc1. Contudo, a incorporação destes quelantes pode ser uma

boa base para estudos futuros de *docking* molecular, no sentido de perceber de que forma estes complexos interagem com os iões metálicos, para aprimorar a sua atividade. (140)

### 5.12. Complexos trinucleares de Ni(II), Pd(II) e Cu(II)

A formulação de complexos metálicos incorporando derivados de sulfonamidas tem sido estudada quanto à sua ação antitumoral, antibacteriana e em relação à atividade inibidora da anidrase carbónica. Sadler e colaboradores testaram a atividade antiplasmodial de sulfonamidas organometálicas em coordenação com complexos areno de Ru(II), Rh(III) e Ir(III). Seguindo esta linha de investigação foi introduzido um novo ligante, o composto 2-hidroxibenzaldeído-ferrocenil-sulfonilhidrazona (HL), sintetizado por reação do salicilaldeído com o ferrocenilsulfonilhidrazina, em meio ácido (HCl), como representado na Figura 5.24. (141)

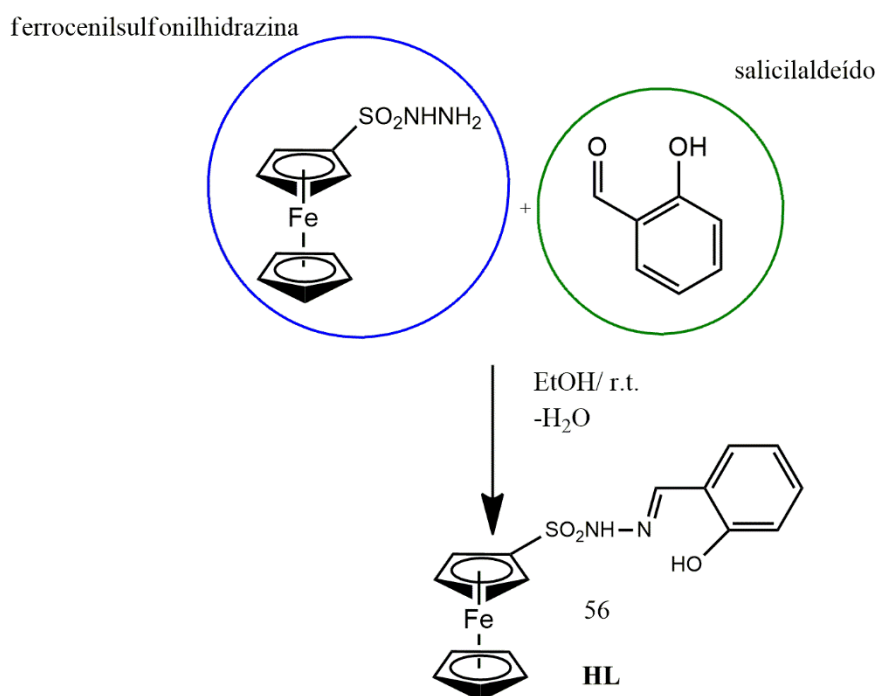


Figura 5.24- Representação da estratégia de síntese do ligando 2-hidroxibenzaldeído-ferrocenil-sulfonilhidrazona (HL). (141)

De entre os complexos trinucleares sintetizados a partir da reação entre o ligando HL e o  $[M(\text{AcO})_2]$ , como representado na Figura 5.25, o complexo 57c foi o que apresentou melhor atividade contra a estirpe NF54 de *P. falciparum*. Porém, nenhum apresentou atividade superior à da CQ, e uma das razões apresentadas foi terem demonstrado baixa solubilidade, o que poderá ter condicionado a permeação nas membranas. (141)

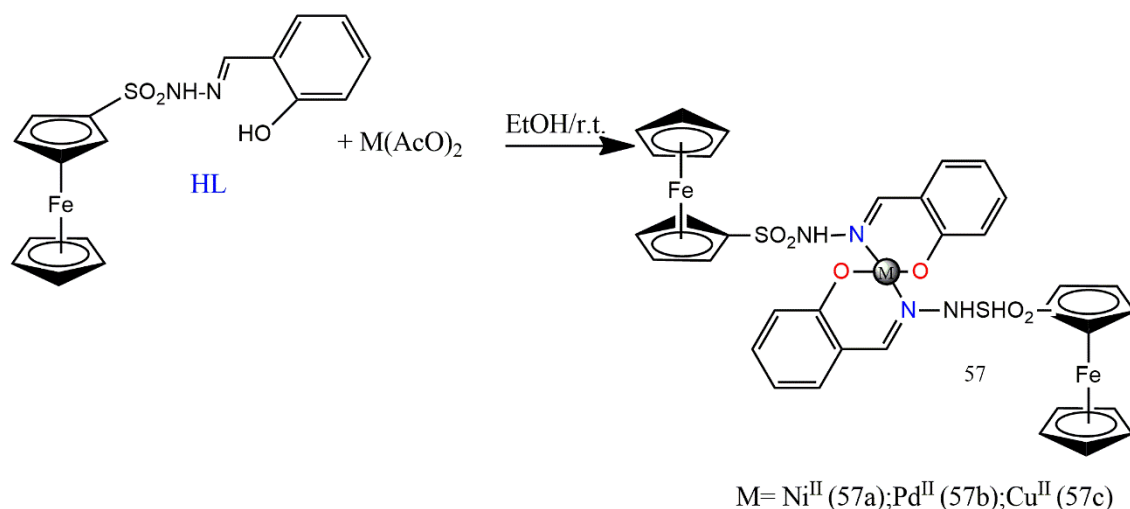


Figura 5.25- Representação da estratégia de síntese, em etanol ( EtOH), usando uma razão estequiométrica 2HL:1M, de complexos de Ni(II), Pd(II), e Cu(II), de fórmula geral  $[\{(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Fe}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{-S(O)}_2\text{N(H)NC(H)-o-C}_6\text{H}_4\text{-O}\} 2\text{M}]$ . (141)

### 5.13. Nanopartículas

Metais de transição como a Ag, Co, Ni, Pd têm sido incorporados em nanopartículas, uma estratégia com vantagens ao nível da reatividade e compatibilidade com os meios biológicos, cujo baixo custo torna possível o seu uso para diferentes aplicações. (142)

Têm sido formuladas nanopartículas inorgânicas à base de Au e Ag para diferentes aplicações, nomeadamente para técnicas de extração de mercúrio, por terem afinidade para as diferentes espécies de mercúrio (orgânicas e inorgânicas). O uso de Ag em nanomateriais é interessante pela ação deste metal como potente antimicrobiano. A sua aplicabilidade como agente antiviral, anticancerígeno e antimicótico também tem sido

investigada. Verifica-se que a Ag mantém as suas propriedades farmacológicas tanto na forma de nanopartícula, como coloidal ou iónica, evidenciando aplicabilidade no combate à malária, ao cancro e a doenças inflamatórias. A sua ação bactericida ocorre sob a forma catiónica, na qual se liga a grupos tiól das proteínas, levando a uma perda da funcionalidade destas e à conseqüente morte bacteriana. Na malária, as nanopartículas de Ag e Au são as que demonstraram maior atividade contra os estádios do vetor e do parasita *Plasmodium*. Para além do seu amplo espetro de atividade (viral, fúngica, parasitária, bacteriana), a Ag apresenta boas propriedades em termos de estabilidade, condutividade e catálise, e baixa toxicidade em humanos. (143–146)

As nanopartículas são uma opção vantajosa no desenvolvimento de antimaláricos, como meio de transporte do fármaco aos alvos terapêuticos, constituindo uma alternativa face à descoberta de novos fármacos cuja eficácia é constantemente comprometida face ao desenvolvimento de novos mecanismos de resistência do parasita ao fármaco. As nanopartículas conseguem transportar os fármacos antimaláricos em dose suficiente para eliminar o parasita, retardando o processo de desenvolvimento de resistências, pois depositam uma dose de fármaco que é efetiva, mas em doses consideradas não tóxicas para o organismo humano. (147)

Uma das principais desvantagens das nanopartículas é que para haver uma libertação mediada do fármaco é necessária uma grande quantidade de excipientes, o que pode limitar a quantidade de fármaco que pode ser carregada nas nanopartículas. (148)

Os Egg-PC e a fosfatidilcolina de soja (Soy-PC), representados na Figura 5.26, são fosfolípidos mais fluídos e, pelo que conseguem fundir-se melhor com as hemácias, gerando maior eficácia na inibição de *Plasmodium*. Porém uma desvantagem é a menor capacidade de retenção dos fármacos antimaláricos. (147)

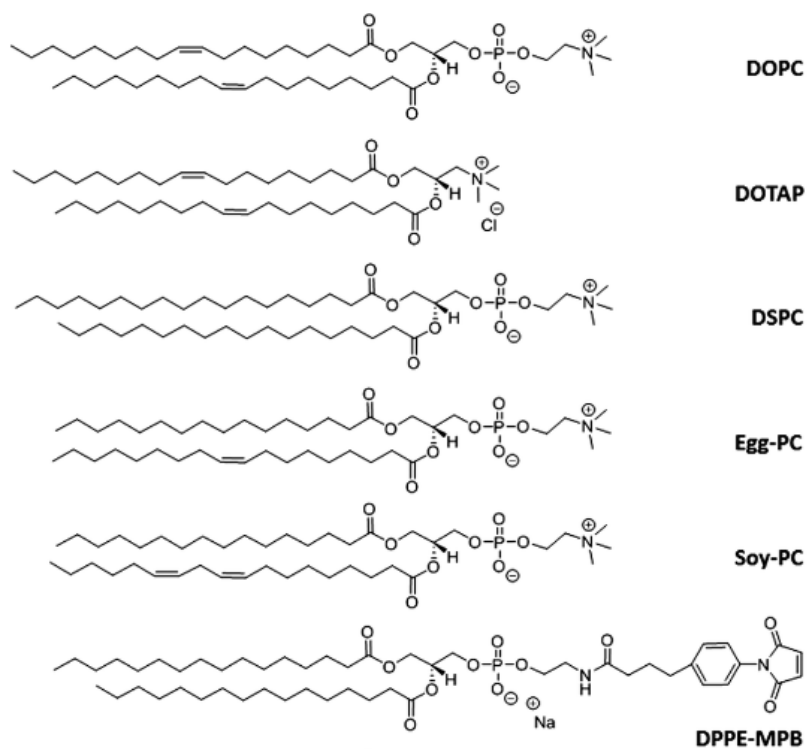


Figura 5.26- Representação da estrutura química de fosfolípidos usados em quimioterapia da malária. DOPC (1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina), DOTAP (1,2-dioloil-3-trimetilamônio-propano), DSPC (1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina), Egg-PC, Soy-PC (L- $\alpha$ -fosfatidilcolinas), DPPE-MPB (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[4-(p-maleimidofenil)butiramida]). (147)

### 5.13.1. Nanotecnologia verde

A nanotecnologia verde visa a criação de estratégias de produção mais ecológicas, em que se inclui a produção de nanopartículas através de fungos, bactérias, leveduras, plantas. A síntese de nanopartículas a partir do extrato folicular de plantas tem sido objeto de intensa investigação, tendo já sido possível sintetizar nanopartículas de prata a partir das plantas medicinais *Acalypha indica* e *Garcinia mangostana* e de extratos foliares das plantas medicinais *Aloe vera* e *Capsicum annum*. (149)

### 5.13.2. Nanopartículas de prata usadas na malária

O baço desempenha um papel importante durante a infecção por *Plasmodium*. É responsável pela regulação da fagocitose dos eritrócitos infetados bem como pela regulação do Fe, essencial para o crescimento do parasita. Tendo em conta as características da prata referidas anteriormente, torna-se essencial perceber como as nanopartículas exercem a sua atividade antimalárica. Murshed M. e seus colaboradores tentaram esclarecer a sua ação através da análise de um conjunto de genes que regulam o Fe, nomeadamente a proteína reguladora de ferro Lipocalina 2 (*Lcn2*), receptor de transferrina 1 (*Tfr1*) e o peptídeo antimicrobiano de hepcidina (*Hamp*), e elucidar a variação da expressão destes genes durante a fase de infecção de camundongos por *Plasmodium*, após ser administrado as nanopartículas de prata. As nanopartículas de prata podem ser sintetizadas a partir do extrato metanólico (IME) de *I. oblongifolia*, por adição de nitrato de prata. Esta formulação é interessante pela formação de um metabolito ativo com possível atividade antiplasmodial, o composto 2,6-di-t-butil-p-benzoquinona. (150)

Vários grupos de camundongos foram infetados previamente com *P. chabaudi* e tratados com concentrações crescentes de nitrato de prata e a taxa de parasitemia ao fim de 7 dias de infecção (pico máximo da infecção) foi comparada com a do grupo infetado, mas tratado com CQ. Foi observado que as nanopartículas de prata conseguiram reduzir a taxa de parasitemia de forma similar à CQ. (150)

A avaliação do índice esplénico nos diferentes grupos confirmou que a atividade antimalárica das nanopartículas é similar à da CQ, onde se verificou dos sintomas de esplenomegalia, com acumulação de mais Fe, já que as nanopartículas de prata reduzem a expressão dos genes *Lcn2* e *Tfr1* e *Hamp*, causando uma desregulação do Fe com consequente alteração do crescimento do parasita. (150)

Os complexos de Ag constituem uma aposta possível para o tratamento da malária, podendo ter interesse futuro para reduzir os sintomas agudos da malária, como a esplenomegalia e condições de anemia que podem aparecer do decorrer da doença. (150)

### 5.13.3. Nanopartículas de ouro

A superfície da forma de merozoíto é revestida por proteínas que estão presentes nos estádios eritrocitários do parasita. Estas proteínas apresentam regiões ricas em cisteína, que são importantes para a invasão intraeritrocitária, das quais fazem parte o homólogo de ligação de reticulócitos 5 (PfRh5), o CyRPA (antígeno rico em cisteína), antígeno e proteínas de ligação a eritrócitos, EBA-175 e DBL-EBP respetivamente, assim como proteínas com repetições cisteínicas. Estas proteínas não se encontram só no merozoíto, estando também presentes em todos os estádios correspondentes ao ciclo assexuado do parasita, de que fazem parte o estádios anelares, de trofozoíto e de esquizonte, assim como nos gametócitos e esporozoítos de *P. falciparum*. Na sequência dos compostos de fosfina de Au(I) abordados anteriormente, foram formuladas nanopartículas de Au ultrapequenas à base de glicosídeo (Glc-NCs), representadas na Figura 5.27, com o objetivo de formar ligações fortes com grupos tiol. Estas estruturas assumem particular interesse para a deteção de cisteína na superfície do parasita. (151)

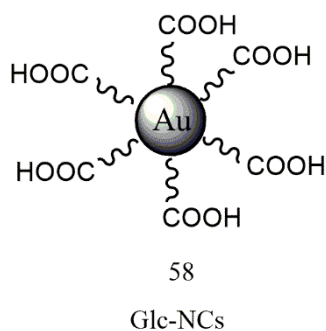


Figura 5.27- Representação estrutural de nanopartículas de Au à base de glicosídeo (Glc-NCs). (151)

De forma a avaliar a capacidade de ligação aos resíduos de cisteína na superfície do parasita foi determinada a concentração de nanopartículas de ouro estabilizadas com citrato, em comparação com as nanopartículas à base de glicosídeo. Verificou-se que ambos apresentavam afinidade de ligação para com os parasitas extracelulares maduros de *P. falciparum*, porém as nanopartículas à base de glicosídeo foram as que apresentaram

maior força de ligação, o que pode ser explicado face á elevada área de superfície, proporcionando uma maior acumulação deste complexo metálico nos parasitas. Por outro lado, os grupos hidroxilo da glicose podem aumentar a estabilização com as proteínas pela formação de ligações de hidrogénio adicionais. (151)

Os GLc-Ncs demonstraram ser seguros na sua administração em células de mamífero, apresentando um aumento crescente da atividade pelas diferentes formas assexuais intraeritrocitárias do parasita (anel, trofozoíto precoce e tardio e esquizonte), por aumento dos domínios ricos em cisteína, e nas formas sexuais, atuando na gametogénese, pelo que apresentam atividade gametocítica. (151)

Foi avaliada a vantagem da conjugação de um fármaco com estes complexos de Au à base de glicosídeo, em termos da atividade inibitória. O fármaco usado foi a ciprofloxacina, um antibiótico que apresenta atividade antimalárica moderada. A sua solubilidade em água é baixa, devido ao facto de a sua forma zwitteriónica (neutra) ter um ponto isoelétrico a pH 7.4. A conjugação com estas nanopartículas de Au (Cipro@Glc-NCs), como representado na Figura 5.28 permite alterar este pH, melhorando a solubilidade deste fármaco hidrofóbico e evitando perda de eficácia por formação de agregados em meio aquoso. Ao mesmo tempo aumenta a seletividade por incorporação direta deste fármaco nas hemácias infetadas, melhorando a sua atividade terapêutica por aumento do acúmulo do fármaco a nível intracelular. (151)

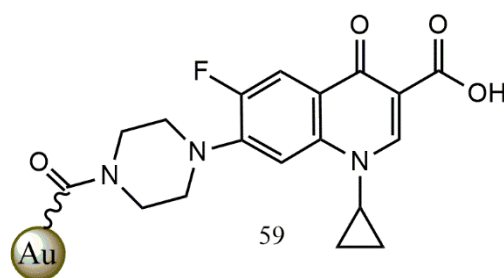


Figura 5.28- Conjugação com ciprofloxacina (Cipro@Glc-NCs). (151)

Os valores de  $IC_{50}$  determinados em testes de atividade *in vitro* para a ciprofloxacina isolada e conjugada com as nanopartículas, usando a linhagem 3D7 de *P. falciparum*, encontram-se na tabela 5.1. (151)

Tabela 5.1- Valores de IC<sub>50</sub> da ciprofloxacina e Cipro@Glc-NCs após exposição à linhagem 3D7 de *P. falciparum*. (151)

<b>Amostra</b>	<b>Cipro@Glc-NCs (<math>\mu M</math>)</b>	<b>Ciprofloxacina (<math>\mu M</math>)</b>
<b>IC<sub>50</sub></b>	<b>27.4<math>\pm</math>3.8</b>	<b>157.9<math>\pm</math>58.8</b>

A conjugação com nanopartículas reduziu o valor de IC<sub>50</sub>, comprovando o efeito sinérgico da ciprofloxacina quando conjugada com estas nanopartículas de Au em termos de direcionamento seletivo contra todos os estádios sexuais e assexuais do parasita de *P. falciparum*. Todavia, a atividade na gama micromolar indica que são necessários mais estudos para otimização farmacológica. (151)

## **Conclusão e perspectivas futuras da utilização de complexos organometálicos no tratamento da malária**

O controlo da malária tem se baseado na associação de moléculas com mecanismos de ação diferentes, permitindo mitigar as limitações individuais de cada um, como por exemplo de terapias combinadas à base de artemisinina (ACTs). Porém, alterações dos alvos terapêuticos onde atuam estes fármacos, entre outros mecanismos utilizados no processo de seleção para resistências, levam a perda da eficácia dos fármacos em uso.

Os antimaláricos necessitam de cumprir com um conjunto de critérios: por exemplo, devem ter lipofilicidade que lhes permita permear as membranas biológicas, bem como estabilidade e solubilidade baixa para acumularem no VD do parasita. Ao nível dos aspetos farmacodinâmicos, devem manter ligações fortes com os alvos parasitários. A baixa estabilidade das artemisininas, baixa solubilidade em água e óleo, com reduzido tempo de semi-vida no plasma, conduzem a reduzida biodisponibilidade.

Uma das estratégias recentes, como abordada ao longo desta tese é o desenvolvimento de fármacos híbridos e a incorporação de entidades metálicas em antimaláricos, como forma de melhorar as propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas. Os metais, pelas suas diferentes propriedades de valência, apresentam vantagens em termos do design de novos fármacos, oferecendo variabilidade em termos de geometrias de coordenação, o que pode ser vantajoso para a interação com os alvos terapêuticos. A sua inserção pode trazer benefícios ao nível das propriedades lipofílicas, bem como acrescentar novos mecanismos de ação, tais como catálise intracelular ou interação com o DNA do parasita, como no caso dos complexos  $Ru(III)Cp^*$  que interagem com o DNA. Também podem interferir na via de destoxificação do parasita.

Porém, é de assinalar que a incorporação dos metais em antimaláricos é um tópico de investigação relativamente recente, estando disponíveis muito poucos resultados de estudos *in vivo* e *ex-vivo*, devido à toxicidade de certos metais assim como à dificuldade de formação e ajuste de certos complexos, devido a características de coordenação específicas, a que acresce a falta de investimento atual que impede um ritmo de investigação adequado. O grupo ferrocenilo tem sido utilizado em vários compostos híbridos. A ferroquina (FQ) é um dos antimaláricos com interesse para uso humano.

Devido à proteção pela unidade ferrocenilo a estrutura quinolínica retém a atividade, estando mais protegida de resistências pelo parasita. Este antimalárico não apresenta resistência cruzada com nenhum fármaco antimalárico e o tempo de semi-vida é bastante superior ao da CQ, garantindo uma taxa de eliminação do parasita mais elevada. A análise de relações estrutura-atividade da FQ permitiu perceber a forma como esta interage com o alvo terapêutico e a influência de modificações estruturais na atividade final da molécula, tendo também sido explorada a inserção na estrutura de antimaláricos estabelecidos, como o artesunato, com o objetivo de formação de híbridos multimodais que possam fazer face às resistências aos ATCs.

É de assinalar também a tentativa de hibridação da FQ com unidades orgânicas não tão frequentemente utilizadas em malária, mas que parecem ser uma forte aposta devido à estabilidade e facilidade de síntese, como é o caso das tio-semicarbazonas e dos ligandos de benzimidazol, sendo que a incorporação destes últimos, com inibição da taxa de conversão de NAD/NADH favorece a interferência em determinadas vias biológicas do parasita gerando stress oxidativo. Ou seja, estes resultados apontam para novos mecanismos de ação contra o parasita que podem por si só apresentar carácter de inibição da atividade antimalárica. Todavia esta linha de investigação está ainda pouco desenvolvida, necessitando de estudos de *docking molecular* para perceber como este tipo de estruturas podem interagir com o alvo terapêutico e permitir o melhoramento através dos resultados da modelação molecular.

A incorporação de outros metais, como o Ir(III) e Ru(III), em fármacos antimaláricos já existentes, como o caso da CQ, permitiu concluir que a inserção de metais de transição pode acentuar a atividade biológica dos antimaláricos em uso, uma vez que a atividade *in vitro* dos complexos contra *P. berghei* foi superior à do difosfato de cloroquina.

Outra alternativa recentemente explorada consiste não no uso de metais, mas sim de ligandos que funcionam como quelantes de metal, causando a morte do parasita pela privação de metais relevantes para a sua sobrevivência. Contudo, problemas associados com a permeabilidade, a seletividade para metais específicos e a dificuldade de formulação de estruturas que exibam um equilíbrio nas propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas constitui um entrave para a síntese destes compostos. Estes problemas poderão ser colmatados com mais investigação nesta área.

O uso de nanopartículas como veículo de transportes de complexos metálicos com atividade antimalárica tem sido uma das estratégias investigadas para fazer face às resistências aos fármacos antimaláricos, entregando o fármaco antimalárico no seu alvo terapêutico e assim mantendo o seu perfil de eficácia. Um dos exemplos investigados foram as nanopartículas de Ag, que podem ser uma alternativa ao uso da CQ podendo constituir uma opção futura para fazer face às resistências. Porém é necessário efetuar estudos comparativos para traçar o perfil de toxicidade face aos antimaláricos já existentes, bem como o perfil de eficácia contra outras estirpes da *Plasmodium*, de forma a avaliar a viabilidade.

Com a presente dissertação pretendemos mostrar que a incorporação de centros metálicos em ligandos com atividade antiplasmodial pode conduzir a aumento de eficácia no tratamento da malária. A literatura nesta área revela o potencial das linhas de investigação referidas, mas também mostra a necessidade de mais investigação. Por exemplo, os estudos podem abranger outros metais, como o caso do Os e dos complexos de Pt. Esta área está em desenvolvimento, porém os resultados são promissores, e estudos de modelação molecular poderão apoiar o desenvolvimento de novas soluções, envolvendo metais, para uso futuro na terapia da malária. Serão necessários mais estudos, maior investimento na síntese de bibliotecas de compostos, posterior análise de bioatividades e estudos farmacológicos (ADMET) para selecionar moléculas para desenvolvimento que consigam mitigar os problemas associados ao surgimento de resistências pelo parasita, fazendo face aos mesmos.

## Bibliografia

1. Talapko J, Škrlec I, Alebić T, Jukić M, Včev A. Malaria: The Past and the Present. *Microorganisms*. 2019;7(6):179.
2. Boualam MA, Pradines B, Drancourt M, Barbieri R. Malaria in Europe: A Historical Perspective. *Front Med*. 2021;8:691095.
3. Nosten F, Richard-Lenoble D, Danis M. A brief history of malaria. *Presse Med*. 2022; 51(3): 104130.
4. World Health Organization. Global Malaria Programme: World malaria report 2021 [Internet]. Geneva; 2021 [consultado a 20/03/2023]. Disponível em: <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2021>
5. CDC. The History of Malaria, an Ancient Disease [Internet]. 2018 [consultado a 20/03/2023]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/malaria/about/history/>
6. Laurens MB. RTS, S/AS01 vaccine (Mosquirix™): an overview. *Hum Vaccin Immunother*. 2020;16(3):480-489.
7. Hussein MIH, Albashir AAD, Elawad OAMA, Homeida A. Malária and COVID-19: unmasking their ties. *Malar J*. 2020;19(457).
8. SNS 24. Doenças Infeciosas: Malária [Internet]. 2023. [consultado a 20/03/2023]. Disponível em: <https://www.sns24.gov.pt/tema/doencas-infeciosas/malaria/>
9. World Health Organization. World Malaria Day 2021 [Internet]. África; 2021. [consultado a 20/03/2023]. Disponível em: <https://www.afro.who.int/regional-director/speeches-messages/world-malaria-day-2021>
10. Stanford Medicine|Health Care. Types of Malaria Parasites [Internet]. 2022 [consultado a 20/03/2023]. Types of Malaria Parasites. Disponível em: <https://stanfordhealthcare.org/medical-conditions/primary-care/malaria/types.html>
11. Albrecht-Schgoer K, Lackner P, Schmutzhard E, Baier G. Cerebral Malaria: Current Clinical and Immunological Aspects. *Front Immunol*. 2022; 13:863568.
12. Carter R, Mendis KN. Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15(4):564–594.
13. Menkin-Smith L, Winders WT. *Plasmodium Vivax* Malaria. StatPearls [Internet]. 2022. [consultado a 20/03/2023]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538333/>
14. World Health Organization. WHO Guidelines for malaria [Internet]. Geneva; 2022. [consultado a 20/03/2023]. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/352687/WHO-UCN-GMP-2022.01-Rev.1-eng.pdf?sequence=1>
15. Okafor CN, Finnigan NA. *Plasmodium Ovale* Malaria. StatPearls [Internet]. 2022. [consultado a 20/03/2023]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519021/>

16. Hawadak J, Rodrigue R, Dongang N, Singh V, Peng WK, Veiga MI. Epidemiological, Physiological and Diagnostic Comparison of *Plasmodium ovale curtisi* and *Plasmodium ovale wallikeri*. *Diagnostics*. 2021; 11(10):1900.
17. Rojo-Marcos G, Rubio-Muñoz JM, Angheben A, Jaureguiberry S, García-Bujalance S, Tomasoni LR, et al. Prospective comparative multi-centre study on imported *Plasmodium ovale wallikeri* and *Plasmodium ovale curtisi* infections. *Malar J*. 2018; 17(1):399.
18. Nabarro LEB, Nolder D, Broderick C, Nadjm B, Smith V, Blaze M, et al. Geographical and temporal trends and seasonal relapse in *Plasmodium ovale spp.* and *Plasmodium malariae* infections imported to the UK between 1987 and 2015. *BMC Med*. 2018; 16(1):218.
19. Lee WC, Cheong FW, Amir A, Lai MY, Tan JH, Phang WK, et al. *Plasmodium knowlesi*: the game changer for malaria eradication. *Malar J*. 2022; 21(1):140.
20. Merrick CJ. Hypnozoites in *Plasmodium*: Do Parasites Parallel Plants? *Trends Parasitol*. 2021 ;37(4):273–282.
21. Anstey NM, Grigg MJ, Rajahram GS, Cooper DJ, William T, Kho S, et al. *Knowlesi* malaria: Human risk factors, clinical spectrum, and pathophysiology. *Adv Parasitol*. 2021; 113:1–43.
22. Centers for Disease Control and Prevention. Malaria. Causal Agent [Internet]. 2020. [consultado a 22/03/2023]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/malaria/index.html>
23. Singh B, Daneshvar C. Human infections and detection of *plasmodium knowlesi*. *Clin Microbiol Rev*. 2013;26(2):165–84.
24. Barber BE, Grigg MJ, William T, Yeo TW, Anstey NM. The Treatment of *Plasmodium knowlesi* Malaria. *Trends Parasitol*. 2017;33(3):242–53.
25. Centers for Disease Control and Prevention. How Can Malaria Cases and Deaths Be Reduced? Drug resistance in the Malaria Endemic World [Internet]. 2019. [consultado a 25/03/2023]. Disponível em: [https://www.cdc.gov/malaria/malaria\\_worldwide/reduction/drug\\_resistance.html](https://www.cdc.gov/malaria/malaria_worldwide/reduction/drug_resistance.html)
26. Azlan UK, Cheong FW, Lau YL, Fong MY. *Plasmodium knowlesi* Duffy binding protein alpha region II (PkDBP $\alpha$ II) in clinical isolates from Peninsular Malaysia and Malaysian Borneo exhibit different immune responses in animal models. *Parasitol Res*. 2022; 121(12):3443–3454.
27. Egy M, Firdaus R, Muh F, Park JH, Lee SK, Na SH, et al. In-depth biological analysis of alteration in *Plasmodium knowlesi*-infected red blood cells using a noninvasive optical imaging technique. *Parasit Vectors*. 2022; 15:68
28. CDC. Comparison of the *Plasmodium* Species Which Cause Human Malaria. Keypoints for *Plasmodium* Species Which Cause Human Malaria Size Shape Schüffner's Dots [Internet]. [consultado a 25/03/2023]. Disponível em: [https://www.cdc.gov/dpdx/resources/pdf/benchAids/malaria/Malaria\\_Compariso\\_n\\_p1-2.pdf](https://www.cdc.gov/dpdx/resources/pdf/benchAids/malaria/Malaria_Compariso_n_p1-2.pdf)

29. Baio P. A Importância Do Conhecimento Clínico E Epidemiológico Da Malária nos Países Não Endêmicos: Perspectivas Futuras Para Europa. [dissertação]. Universidade do Porto; 2011.
30. Milner DA. Malaria Pathogenesis. Cold Spring Harb Perspect Med. 2018; 8:a025569.
31. CDC. Biology: Lifecycle [Internet]. 2020. [consultado a 25/03/2023]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>
32. Nureye D. History, Life Cycle, Diagnosis and Prevention of Malaria: Introductory Concepts and New Advances. J Pharm Res Int. 2021;1–13.
33. Tan MSY, Blackman MJ. Malaria parasite egress at a glance. J Cell Sci. 2021;134(5): jcs257345.
34. Da M, Costa S, Kiralj R, Ferreira MMC. Estudo teórico da interação existente entre a artemisinina e o heme. Quim Nova. 2007;30(1):25–31.
35. Cox FE. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. Parasit Vectors. 2010; 3:5.
36. Klein EY. Antimalarial drug resistance: a review of the biology and strategies to delay emergence and spread. Int J Antimicrob Agents. 2013;41(4):311.
37. Orish V, Afutu L, Ayodele O, Likaj L, Marinkovic A, Sanyaolu A. A 4-Day Incubation Period of *Plasmodium falciparum* Infection in a Nonimmune Patient in Ghana: A Case Report. Open Forum Infect Dis. 2019;6(1):ofy169.
38. Kang Y, Yang J. A case of *Plasmodium ovale* malaria imported from West Africa. Korean J Parasitol. 2013;51(2):213–8.
39. Bruce MC, Day KP. Cross-species regulation of malaria parasitaemia in the human host. Curr Opin Microbiol. 2002;5(4):431–7.
40. Collins WE, Jeffery GM. *Plasmodium malariae*: Parasite and disease. Clin Microbiol Rev. 2007;20(4): 579-92.
41. Ohm JR, Baldini F, Barreaux P, Lefevre T, Lynch PA, Suh E, et al. Rethinking the extrinsic incubation period of malaria parasites. Parasit Vectors. 2018;11:178.
42. Belete TM. Recent Progress in the Development of New Antimalarial Drugs with Novel Targets. Drug Des Devel Ther. 2020;14:3875-3889.
43. McKeage K, Scott L. Atovaquone/proguanil: A review of its use for the prophylaxis of *Plasmodium falciparum* malaria. Drugs. 2003;63(6):597–623.
44. Nqoro X, Tobeka N, Aderibigbe BA. Quinoline-Based Hybrid Compounds with Antimalarial Activity. Molecules. 2017;22(12):2268.
45. Rieckmann KH, Mcnamara J V, Frischer H, Stockert TA, Carson PE, Powell RD. Gametocytocidal and Sporontocidal Effects of Primaquine and of Sulfadiazine with Pyrimethamine in a Chloroquine-Resistant Strain of *Plasmodium falciparum*. Bull World Health Organ. 1968;38(4):652-32.
46. Coronado LM, Nadovich CT, Spadafora C. Malarial Hemozoin: From target to tool. Biochim Biophys Acta. 2014;1840(6):2032-2041.

47. Miranda D. Desenvolvimento de compostos híbridos baseados nos farmacóforos peróxido e 8-aminoquinolina, como candidatos para erradicação da malária. [dissertação]. Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa; 2011.
48. Francis SE, Sullivan DJ, Goldberg DE. Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Annu Rev Microbiol.* 1997;51:97–123.
49. Vanderesse R, Colombeau L, Frochot C, Samir Acherar, Vanderesse R, Colombeau L, et al. Inactivation of Malaria Parasites in Blood: PDT vs Inhibition of Hemozoin Formation. *Current Topics in Malaria* [Internet]. *IntechOpen*; 2016 [consultado a 25/04/2023]. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/52229>
50. De Villiers KA, Egan TJ. Heme Detoxification in the Malaria Parasite: A Target for Antimalarial Drug Development. *Acc Chem Res.* 2021 Jun 1 [cited 2023 Mar 23]; 54(11):2649-2659.
51. Fong KY, Wright DW. Hemozoin and antimalarial drug discovery. *Future Med Chem.* 2013;5(12):1437-1450.
52. Egan TJ. Haemozoin (malaria pigment): a unique crystalline drug target. *Targets.* 2003; 2(3):115–24.
53. Nixon GL, Pidathala C, Shone AE, Antoine T, Fisher N, O'Neill PM, et al. Targeting the mitochondrial electron transport chain of *Plasmodium falciparum*: New strategies towards the development of improved antimalarials for the elimination era. *Future Med Chem.* 2013;5(13):1573–91.
54. Maclean AE, Hayward JA, Huet D, van Dooren GG, Sheiner L. The mystery of massive mitochondrial complexes: the apicomplexan respiratory chain. *Trends Parasitol.* 2022; 38(12):1041–1052.
55. Espino-Sanchez TJ, Wienkers H, Marvin RG, Nalder SA, García-Guerrero AE, Vannatta PE, et al. Direct Tests of Cytochrome Function in the Electron Transport Chain of Malaria Parasites. *bioRxiv.* 2023; 1–54.
56. Evers F, Cabrera-Orefice A, Elurbe DM, Kea-te Lindert M, Boltryk SD, Voss TS, et al. Composition and stage dynamics of mitochondrial complexes in *Plasmodium falciparum*. *Nat Commun.* 2021;12(1):3820.
57. Amporndanai K, Pinthong N, O'Neill PM, Hong WD, Amewu RK, Pidathala C, et al. Targeting the Ubiquinol-Reduction (Qi) Site of the Mitochondrial Cytochrome bc1 Complex for the Development of Next Generation Quinolone Antimalarials. *Biology.* 2022;11(8):1109.
58. Fisher N, Meunier B, Biagini GA. The cytochrome bc1 complex as an antipathogenic target. *FEBS Lett.* 2020; 594(18):2935–2952.
59. Magalhães J. Síntese de novos compostos híbridos com atividade antimalárica. [dissertação]. Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa; 2012
60. Borek A, Ekiert R, Osyczka A. Functional flexibility of electron flow between quinol oxidation Qo site of cytochrome bc1 and cytochrome c revealed by combinatory effects of mutations in cytochrome b, iron-sulfur protein and cytochrome c1. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 2018;1859(9):754–761.

61. Lange C, Hunte C. Crystal structure of the yeast cytochrome bc1 complex with its bound substrate cytochrome c. *Proc Natl Acad Sci.* 2002;99(5):2800–2805.
62. Avina-Zubieta JA, Esdaile JM. Antimalarial Medications. *Dubois' Lupus Erythematosus and Related Syndromes.* Elsevier. 2019; 650–660.
63. Bakshi RP, Tatham LM, Savage AC, Tripathi AK, Mlambo G, Ippolito MM, et al. Long-acting injectable atovaquone nanomedicines for malaria prophylaxis. *Nat Commun.* 2018;9:315.
64. Staines HM, Burrow R, Teo BHY, Ster IC, Kremsner PG, Krishna S. Clinical implications of *Plasmodium* resistance to atovaquone/proguanil: a systematic review and meta-analysis. *Antimicrob Chemother.* 2018;73(3):581-595.
65. Shibeshi MA, Kifle ZD, Atnafie SA. Antimalarial Drug Resistance and Novel Targets for Antimalarial Drug Discovery. *Infect Drug Resist.* 2020;13:4047–4060.
66. Barnes CBG, Dans MG, Jonsdottir TK, Crabb BS, Gilson PR. PfATP4 inhibitors in the Medicines for Malaria Venture Malaria Box and Pathogen Box block the schizont-to-ring transition by inhibiting egress rather than invasion. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022; 12:1060202.
67. Rawe S, McDonnell C. The cinchona alkaloids and the aminoquinolines. In: Patrick G, editor. *Antimalarial agents: Design and Mechanism of action.* 1st ed. Amsterdam: Elsevier. 2020; p. 65–92.
68. Mwaiswelo RO, Kabuga H, Kweka EJ, Baraka V. Is it time for Africa to adopt primaquine in the era of malaria control and elimination? *Trop Med Health.* 2022;50(1):17.
69. World Health Organization. Report on antimalarial drug efficacy, resistance and response 10 years of surveillance (2010-2019) [Internet]. Geneva; 2020. [consultado a 8/4/2023]. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240012813>
70. Foguim FT, Bogreau H, Gendrot M, Mosnier J, Fonta I, Benoit N, et al. Prevalence of mutations in the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter, PfCRT, and association with *ex vivo* susceptibility to common anti-malarial drugs against African *Plasmodium falciparum* isolates. *Malar J.* 2020;19(1):201.
71. Ross LS, Fidock DA. Elucidating Mechanisms of Drug-Resistant *Plasmodium falciparum*. *Cell Host Microbe.* 2019;26(1):35–47.
72. Roux AT, Maharaj L, Oyegoke O, Akoniyon OP, Adeleke MA, Maharaj R, et al. Chloroquine and Sulfadoxine–Pyrimethamine Resistance in Sub-Saharan Africa - A Review. *Front Genet.* 2021;12:668574.
73. Patel C, Roy D, Manzhos S. A Computational Study of Molecular Mechanism of Chloroquine Resistance by Chloroquine Resistance Transporter Protein of *Plasmodium falciparum* via Molecular Modeling and Molecular Simulations. *Physchem.* 2021; 1(3):232–242.
74. Sanchez CP, Manson EDT, Moliner Cubel S, Mandel L, Weidt SK, Barrett MP, et al. The Knock-Down of the Chloroquine Resistance Transporter PfCRT Is Linked to Oligopeptide Handling in *Plasmodium falciparum*. *Microbiol Spectr.* 2022;10(4): e0110122.

75. Kim J, Tan YZ, Wicht KJ, Erramilli SK, Dhingra SK, Okombo J, et al. Structure and Drug Resistance of the *Plasmodium falciparum* Transporter PfCRT. *Nature*. 2019; 576(7786):315-320.
76. Agarwal D, Gupta RD, Awasthi SK. Are Antimalarial Hybrid Molecules a Close Reality or a Distant Dream? *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(5):e00249-17.
77. Junior C, Barreiro E, Fraga C. Molecular Hybridization: A Useful Tool in the Design of New Drug Prototypes. *Curr Med Chem*. 2007;14(17):1829–1852.
78. Shamsuddin MA, Ali AH, Zakaria NH, Mohammat MF, Hamzah AS, Shaameri Z, et al. Synthesis, Molecular Docking, and Antimalarial Activity of Hybrid 4-Aminoquinoline-pyrano[2,3-c] pyrazole Derivatives. *Pharmaceuticals*. 2021;14(11):1174.
79. TJ Egan; R, Hunter, CH Kaschula, H.M. Marques, A. Misplon, J. Walden. Structure-function relationships in aminoquinolines: Effect of amino and chloro groups on quinoline-hematin complex formation, inhibition of  $\beta$ - hematin formation, and antiplasmodial activity. *J Med Chem*. 2000;43(2):283–291.
80. Murwih Alidmat M, Khairuddean M, Mohammad Norman N, Mohamed Asri AN, Mohd Suhaimi M, H; Sharma G. Synthesis, characterization, docking study and biological evaluation of new chalcone, pyrazoline, and pyrimidine derivatives as potent antimalarial compounds. *Arabian Journal of Chemistry*. 2021;14(9):103304.
81. Sinha S, Batovska DI, Medhi B, Radotra BD, Bhalla A, Markova N, et al. *In vitro* anti-malarial efficacy of chalcones: Cytotoxicity profile, mechanism of action and their effect on erythrocytes. *Malar J*. 2019;18(1):421.
82. Kumar S, Saini A, Gut J, Rosenthal PJ, Raj R, Kumar V. 4-Aminoquinoline-chalcone/-N-acetylpyrazoline conjugates: Synthesis and antiplasmodial evaluation. *Eur J Med Chem*. 2017;138:993–1001.
83. Kayamba F, Malimabe T, Ademola IK, Pooe OJ, Kushwaha ND, Mahlalela M, et al. Design and synthesis of quinoline-pyrimidine inspired hybrids as potential plasmodial inhibitors. *Eur J Med Chem*. 2021;217:113330.
84. Varun, Sonam, Kakkar R. Isatin and its derivatives: a survey of recent syntheses, reactions, and applications. *MedChemComm*. 2019;10(3):351–68.
85. Chiyanzu I, Clarkson C, Smith PJ, Lehman J, Gut J, Rosenthal PJ, et al. Design, synthesis and anti-plasmodial evaluation *in vitro* of new 4-aminoquinoline isatin derivatives. *Bioorg Med Chem*. 2005;13(9):3249–61.
86. Raj R, Land KM, Kumar V. 4-Aminoquinoline-hybridization en route towards the development of rationally designed antimalarial agents. *RSC Adv*. 2015;5(101):82676–82698.
87. Peric M, Pešić D, Alihodžić S, Fajdetić A, Herreros E, Gamo FJ, et al. A novel class of fast-acting antimalarial agents: Substituted 15-membered azalides. *Br J Pharmacol*. 2021 Jan;178(2):363–77.

88. Njogu Peter, Okombo, Chibale K. Designed Hybrid Compounds for Tropical Parasitic Diseases. In: Decker Michael, editor. Design of Hybrid Molecules for Drug Development 1st ed. Elsevier; p. 83-126.
89. Uddin A, Chawla M, Irfan I, Mahajan S, Singh S, Abid M. Medicinal chemistry updates on quinoline- and endoperoxide-based hybrids with potent antimalarial activity. RSC Med Chem. 2020;12(1):24-42.
90. Starčević K, Pešić D, Toplak A, Landek G, Alihodžić S, Herreros E, et al. Novel hybrid molecules based on 15-membered azalide as potential antimalarial agents. Eur J Med Chem. 2012;49:365–78.
91. Omar AH, Hajissa K, Bashir JQ, Omar AS, Faris AA, Nurhidanatasha AB. A Postulated Mechanism of the Antimalarial Effect of Free Radicals Generated by Artemisinin on *Plasmodium falciparum*. Biomed Pharmacol J. 2022;15(4):1833–6.
92. Wang J, Xu C, Wong YK, Li Y, Liao F, Jiang T, et al. Artemisinin, the Magic Drug Discovered from Traditional Chinese Medicine. Engineering. 2019;5(1):32–39.
93. Karri S, Sharma S, Kaur G. Pharmacological and analytical aspects of artemisinin for malaria: Advances and challenges. Asian Pac J Trop Med. 2019;12(8):339–346.
94. Hanboonkunupakarn B, Tarning J, Pukrittayakamee S, Chotivanich K. Artemisinin resistance and malaria elimination: Where are we now? Front Pharmacol. 2022; 13:876282.
95. Miguel O. O impacto do stress oxidativo e dos sistemas redox na malária. [dissertação]. Universidade da Beira Interior. Covilhã; 2018.
96. Heller L, E. Investigating the Mechanism of Action of Artemisinin Antimalarials and the Role of Ferriprotoporphyrin IX Heme. [dissertação]. Washington, DC: Faculty of the Graduate School of Arts and Sciences of Georgetown; 2019.
97. Adebayo JO, Tijjani H, Adegunloye AP, Ishola AA, Balogun EA, Malomo SO. Enhancing the antimalarial activity of artesunate. Parasitol Res. 2020;119(9):2749–2764.
98. Nyaaba N, Andoh NE, Amoh G, Amuzu DSY, Ansong M, Ordonez-Mena JM, et al. Comparative efficacy and safety of the artemisinin derivatives compared to quinine for treating severe malaria in children and adults: A systematic update of literature and network meta-analysis. PLoS One. 2022;17(7):e0269391.
99. Alia JD, Karl S, Kelly TD. Quantum Chemical Lipophilicities of Antimalarial Drugs in Relation to Terminal Half-Life. ACS Omega. 2020;5(12):6500–6515.
100. Aprioku JS, Obianime AW. Structure-Activity-Relationship (SAR) of Artemisinins on some Biological Systems in Male Guinea Pigs. Insight Pharm Sci. 2011;1(1):1–10.
101. Giannangelo C, Fowkes FJI, Simpson JA, Charman SA, Creek DJ. Ozonide Antimalarial Activity in the Context of Artemisinin-Resistant Malaria. Trends Parasitol. 2019; 35(7):529–543.

102. Wei C, Zhao CX, Liu S, Zhao JH, Ye Z, Wang H, et al. Activity-based protein profiling reveals that secondary-carbon-centered radicals of synthetic 1,2,4-trioxolanes are predominately responsible for modification of protein targets in malaria parasites. *Chem Commun.* 2019;55(64):9535-9538.
103. Oliveira R, Miranda D, Magalhães J, Capela R, Perry MJ, O'Neill PM, et al. From hybrid compounds to targeted drug delivery in antimalarial therapy. *Bioorg Med Chem.* 2015; 23(16):5120–30.
104. Penna-Coutinho J, da Silva Araújo M, Campos Aguiar AC, Sá PM, Rios CT, Medeiros JF, et al. MEFAS, a hybrid of artesunate-mefloquine active against asexual stages of *Plasmodium vivax* in field isolates, inhibits malaria transmission. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 2021;17:150–5.
105. Do Prado V.M, De Queiroz TB, Sá PM, Seiceira RC, Boechat N, Ferreira F, F. Mechanochemistry for the production of a hybrid salt used in the treatment of malaria. *Green Chem.* 2020;22(1):54–61.
106. Mbaba M, Golding TM, Smith GS. Recent Advances in the Biological Investigation of Organometallic Platinum-Group Metal (Ir, Ru, Rh, Os, Pd, Pt) Complexes as Antimalarial Agents. *Molecules.* 2020;25(22):5276.
107. Karges J, Stokes RW, Cohen SM. Metal Complexes for Therapeutic Applications. *Trends Chem.* 2021;3(7):523-524.
108. Britannica. Platinum | Color, Symbol, Uses, & Facts. [Internet]. [consultado a 8/07/23]. Disponível em: <https://www.britannica.com/science/platinum>
109. Williams J.A.G. Photochemistry and photophysics of coordination compounds: Platinum. In: Balzani V, Campagna S, editors. *Photochemistry and Photophysics of Coordination Compounds II.* Vol 281. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2007. p. 65–92.
110. LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury [Internet]. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Platinum Coordination Complexes. 2020. [consultado a 8/07/2023]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548788/>
111. Melis DR, Barnett CB, Wiesner L, Nordlander E, Smith GS. Quinoline-triazole half-sandwich iridium(III) complexes: synthesis, antiplasmodial activity and preliminary transfer hydrogenation studies. *Dalton Trans.* 2020;49(33):11543–11555.
112. Stringer T, Melis DR, Smith GS. N, O-Chelating quinoline-based half-sandwich organorhodium and -iridium complexes: synthesis, antiplasmodial activity and preliminary evaluation as transfer hydrogenation catalysts for the reduction of NAD<sup>+</sup>. *Dalton Trans.* 2019;48(35):13143–13148.
113. Chaudhary A, Poonia K. The redox mechanism of ferrocene and its phytochemical and biochemical compounds in anticancer therapy: A mini review. *Inorg Chem Commun.* 2021;134:109044.
114. Gansane A, Lingani M, Yeka A, Nahum A, Bouyou-Akotet M, Mombo-Ngoma G, et al. Randomized, open-label, phase 2a study to evaluate the contribution of artefenomel to the clinical and parasitocidal activity of artefenomel plus ferroquine

- in African patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Malar J.* 2023;22(1):2.
115. Kwofie SK, Broni E, Dankwa B, Enninful KS, Teye J, Davidson CR, et al. Review of Atypical Organometallic Compounds as Antimalarial Drugs. *J Chem: Hindawi.* 2020; 2020: 1-9.
  116. Peter S, Morifi E, Aderibigbe BA. Hybrid Compounds Containing a Ferrocene Scaffold as Potential Antimalarials. *ChemistrySelect.* 2021;6(8):1756–1763.
  117. Acácio I. Francisco, Maria D. Vargas. Ferroquina: O Antimalárico do Futuro. *Rev. Virtual. Quim.* 2010;2(2):118-129.
  118. Kondratskyi A, Kondratska K, Vanden Abeele F, Gordienko D, Dubois C, Toillon RA, et al. Ferroquine, the next generation antimalarial drug, has antitumor activity. *Sci Rep.* 2017;7(1):15896.
  119. Adoke Y, Zoleko-Manego R, Ouoba S, Tiono AB, Kaguthi G, Bonzela JE, et al. A randomized, double-blind, phase 2b study to investigate the efficacy, safety, tolerability and pharmacokinetics of a single-dose regimen of ferroquine with artefenomel in adults and children with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Malar J.* 2021; 20(1):222.
  120. Abubakar TA, Eke UB, Salisu A. Bioorganometallic Ferroquine and Related Compounds as Antimalarial Chemotherapeutic Agents: A Short Review. *JCSN.* 2022;47(3):573-592.
  121. JÚNIOR N. Obtenção, Caracterização Estrutural e Estudo in silico e Avaliação da Atividade Antimalárica de Novos Derivados Tiossemicarbazônicos e Tiazólicos. [dissertação]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco Centro de Ciências da Saúde; 2021.
  122. Boros E, Dyson PJ, Gasser G. Classification of Metal-Based Drugs according to Their Mechanisms of Action. *Chem.* 2020;6(1):41–60.
  123. Duarte BR. Exploring Bioorganometallic Compounds With Ruthenium Moieties As Antimalarials. [dissertação]. Universidade Nova de Lisboa; 2021.
  124. Kanaoujiya R, Srivastava S. Coordination Chemistry of Ruthenium. *Res J Chem Environ.* 2021;25(9):103–106.
  125. Pal M, Nandi U, Mukherjee D. Detailed account on activation mechanisms of ruthenium coordination complexes and their role as antineoplastic agents. *Eur J Med Chem.* 2018; 150:419–445.
  126. Sousa CC. Avaliação das Propriedades Farmacológicas de Complexos de Ruténio (III) Conjugados com as Naftoquinonas Lapachol ou Atovaquona como Candidatos a Fármacos Antimaláricos. [dissertação]. Salvador-Bahia; 2021
  127. Martínez A, Deregnaucourt C, Sinou V, Latour C, Roy D, Schrével J, et al. Synthesis of an organo-ruthenium aminoquinoline-trioxane hybrid and evaluation of its activity against *Plasmodium falciparum* and its toxicity toward normal mammalian cells. *Med Chem Res.* 2017;26:473–83.
  128. Munnik BL, Kaschula CH, Watson DJ, Wiesner L, Loots L, Chellan P. Synthesis and study of organometallic PGM complexes containing 2-(2-pyridyl)

- benzimidazole as antiplasmodial agents. *Inorganica Chim. Acta*. 2022;540:121039.
129. Li F, Liu F, Huang K, Yang S. Advancement of Gallium and Gallium-Based Compounds as Antimicrobial Agents. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022;10:827960.
  130. Marcelino PRF, Moreira MB, Lacerda TM, da Silva SS. Metal-based drugs for treatment of malaria. *Biomedical Applications of Metals*. Springer. 2018;167–193.
  131. Villarreal W, Castro W, González S, Madamet M, Amalvict R, Pradines B, et al. Copper (I)-Chloroquine Complexes: Interactions with DNA and Ferriprotoporphyrin, Inhibition of  $\beta$ -Hematin Formation and Relation to Antimalarial Activity. *Pharmaceuticals*. 2022; 15(8):921.
  132. Matsa R, Makam P, Kaushik M, Hoti SL, Kannan T. Thiosemicarbazone derivatives: Design, synthesis and *in vitro* antimalarial activity studies. *Eur J Pharm Sci*. 2019; 137:104986.
  133. Savir S, Liew JWK, Vythilingam I, Lim YAL, Tan CH, Sim KS, et al. Nickel(II) Complexes with Polyhydroxybenzaldehyde and O,N,S tridentate Thiosemicarbazone ligands: Synthesis, Cytotoxicity, Antimalarial Activity, and Molecular Docking Studies. *J Mol Struct*. 2021;1242:130815.
  134. Kaya Y, Erçağ A, Koca A. New square-planar nickel(II)-triphenylphosphine complexes containing ONS donor ligands: Synthesis, characterization, electrochemical and antioxidant properties. *J Mol Struct*. 2020;1206:127653.
  135. Ssemaganda A, Low LM, Verhoeft KR, Wambuzi M, Kawoozo B, Nabasumba SB, et al. Gold(i) phosphine compounds as parasite attenuating agents for malaria vaccine and drug development. *Metallomics*. 2018;10(3):444–454.
  136. Sánchez-Delgado RA, Navarro M, Pérez H, Urbina JA. Toward a novel metal-based chemotherapy against tropical diseases. 2. Synthesis and antimalarial activity *in vitro* and *in vivo* of new ruthenium-and rhodium-chloroquine complexes. *J Med Chem*. 1996; 39(5):1095–99.
  137. Ekengard E, Kumar K, Fogeron T, De Kock C, Smith PJ, Haukka M, et al. Pentamethylcyclopentadienyl-rhodium and iridium complexes containing (N<sup>N</sup> and N<sup>O</sup>) bound chloroquine analogue ligands: synthesis, characterization and antimalarial properties. *Dalton Trans*. 2016;45:3905–3917.
  138. Navarro M, Pekerar S, Pérez HA. Synthesis, characterization and antimalarial activity of new iridium–chloroquine complexes. *Polyhedron*. 2007;26(12):2420–2424.
  139. Renfrew AK, O'Neill ES, Hambley TW, New EJ. Harnessing the properties of cobalt coordination complexes for biological application. *Coord Chem Rev*. 2018;375:221–233.
  140. Li Y, Loureiro A, Nguyen M, Laurent M, Bijani C, Benoit-Vical F, et al. Synthesis and Antimalarial Activities of New Hybrid Atokel Molecules. *ChemistryOpen*. 2022;11(5): e202200064.
  141. Almendras I, Huentupil Y, Novoa N, Roussel P, Melis DR, Smith GS, et al. Trinuclear Ni (II), Pd (II) and Cu (II) complexes containing the 2-hydroxybenzaldehyde-ferrocenyl-sulfonylhydrazone ligand: Synthesis, structural

- characterization and antiplasmodial evaluation. *Inorganica Chim Acta*. 2019;496:119050.
142. Ahghari MR, Soltaninejad V, Maleki A. Synthesis of nickel nanoparticles by a green and convenient method as a magnetic mirror with antibacterial activities. *Sci Rep*. 2020; 10: 12627.
  143. Barabadi H, Alizadeh Z, Rahimi MT, Barac A, Maraolo AE, Robertson LJ, et al. Nanobiotechnology as an emerging approach to combat malaria: A systematic review. *Nanomedicine*. 2019;18:221–233.
  144. Avitabile E, Senes N, D’Avino C, Tsamesidis I, Pinna A, Medici S, et al. The potential antimalarial efficacy of hemocompatible silver nanoparticles from *Artemisia* species against *P. falciparum* parasite. *PLoS One*. 2020;15(9):e0238532.
  145. Hagarová I, Nemček L. Application of Metallic Nanoparticles and Their Hybrids as Innovative Sorbents for Separation and Pre-concentration of Trace Elements by Dispersive Micro-Solid Phase Extraction: A Minireview. *Front Chem*. 2021;9:672755.
  146. Das CGA, Kumar VG, Dhas TS, Karthick V, Govindaraju K, Joselin JM, et al. Antibacterial activity of silver nanoparticles (biosynthesis): A short review on recent advances. *Biocatal Agric Biotechnol*. 2020;27:101593.
  147. Neves Borgheti-Cardoso L, San Anselmo M, Lantero E, Lancelot A, Serrano JL, Hernández-Ainsa S, et al. Promising nanomaterials in the fight against malaria. *J Mater Chem B*. 2020; 8, 9428–9448.
  148. Kirtane AR, Verma M, Karandikar P, Furin J, Langer R, Traverso G. Nanotechnology approaches for global infectious diseases. *Nat. Nanotechnol*. 2021;16, 369–384.
  149. Rahman K, Khan SU, Fahad S, Chang MX, Abbas A, Khan WU, et al. Nanobiotechnology: a new approach to treat and prevent malaria. *Int J Nanomedicine*. 2019; 14:1401-1410.
  150. Murshed M, Dkhil MA, Al-Shaebi EM, Qasem MAA, Mares MM, Aljawdah HMA, et al. Biosynthesized silver nanoparticles regulate the iron status in the spleen of *Plasmodium chabaudi*-infected mice. *Environ Sci Pollut Res*. 2020;27:40054–40060.
  151. Varela-Aramburu S, Ghosh C, Goerdeler F, Priegue P, Moscovitz O, Seeberger PH. Targeting and Inhibiting *Plasmodium falciparum* Using Ultra-small Gold Nanoparticles. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2020;12(39):43380–43387.

