



UAlg **FCT**

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

**Síntese de trioxolanos e avaliação da sua atividade
antiparasitária em *Leishmania donovani* e *Toxoplasma gondii***

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Isa Cristina Barrocas de Barros

Sob orientação de:

Professora Doutora Maria de Lurdes dos Santos Cristiano

2015



**Síntese de trioxolanos e avaliação da sua atividade
antiparasitária em *Leishmania donovani* e *Toxoplasma gondii***
Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Isa Cristina Barrocas de Barros

Sob orientação de:

Professora Doutora Maria de Lurdes dos Santos Cristiano

2015

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.

Universidade do Algarve, 28 de Setembro de 2015

Isa Cristina Barrocas de Barros

© 2015 Isa Cristina Barrocas de Barros

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 objetos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Este é um espaço que dedico a quem de alguma forma foi importante na minha vida académica.

Em primeiro lugar, agradeço de forma especial à minha orientadora e professora, Doutora Maria de Lurdes Cristiano, pela total disponibilidade que apresentou para me orientar e ajudar, não só ao longo da realização deste trabalho, mas também ao longo da minha formação. É um prazer trabalhar sob a sua orientação.

À minha amiga, Lília Cabral, por toda a paciência e ajuda, pelo trabalho, pela amizade, pelas conversas, pela transmissão de conhecimento, por tudo.

Aos meus professores, que me acompanharam desde o início do meu percurso escolar, porque para além dos fantásticos professores que me formaram pela Universidade do Algarve, todos os anteriores foram os pilares daquilo que sou hoje.

À “turminha”, assim apelidada pela vivência e pela forma como me permitiram progredir enquanto pessoa, e às minhas amigas Katia Santos, Cláudia Sequeira e Patrícia Amado que estão sempre lá para mim.

À minha família, mãe, pai, irmãos, maninha e cunhado não só pelo apoio que me deram mas também por todos os sacrifícios que fizeram por mim.

À minha avó Adalgisa, que apesar de já não estar fisicamente comigo, creio ter sido a pessoa que mais me influenciou na escolha da minha profissão como farmacêutica.

A todos, um enorme obrigado...

“... é quando o homem pensa ter terminado, que tudo começa verdadeiramente.”
Santo Agostinho

Resumo

As doenças negligenciadas são patologias encontradas principalmente entre as populações mais pobres, representando um enorme obstáculo na redução da pobreza e na promoção do desenvolvimento socioeconómico global.

Entre as 17 patologias consideradas como doenças tropicais negligenciadas encontram-se a leishmaniose e a toxoplasmose, ambas provocadas por parasitas protozoários. A leishmaniose é causada por protozoários do género *Leishmania* e a infeção no Homem é transmitida pela picada de flebótomos. Existem 30 espécies de *Leishmania* que infetam mamíferos, incluindo o complexo de *L. donovani*. Por seu lado, a toxoplasmose é provocada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, que infeta a maioria das espécies de animais de sangue quente, incluindo humanos.

A prevenção e o controlo destas patologias não estão assegurados, uma vez que os fármacos atualmente usados são antigos, caros, apresentam elevada toxicidade e, por vezes, a sua eficácia está comprometida devido a seleção de estirpes resistentes.

A artemisinina e os seus derivados semissintéticos, são usados como fármacos de primeira linha no tratamento da malária, uma doença que resulta de infeção por protozoários do género *Plasmodium*. Estes compostos possuem uma ligação peróxido na estrutura, tida como essencial para a sua atividade farmacológica. O seu modo de ação é ainda objeto de debate. Porém, existem evidências da formação de espécies radicalares alquilantes, atuando através de interferência com proteínas de transporte e outros alvos específicos do parasita, com consequente perturbação da sua função mitocondrial e modulação da função imune do hospedeiro. A sua utilização no combate a doenças causadas por outros protozoários, para além de *Plasmodium*, tem sido equacionada nos últimos anos.

Os 1,2,4-trioxolanos são ozonídeos facilmente preparados por ozonólise, obtendo-se bibliotecas destes compostos com variabilidade estrutural para estudos de relação estrutura-atividade e otimização de compostos líder. Alguns trioxolanos possuem atividade antimalárica, leishmanicida e anti-toxoplasma semelhante à exibida pelas artemisininas, podendo constituir uma boa alternativa a estes fármacos.

Palavras – chave: Doenças negligenciadas, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, Fármacos antiparasíticos, Endoperóxidos, 1,2,4-trioxolanos

Abstract

Neglected tropical diseases are mainly found among the poorest populations and represent a major obstacle in reducing poverty and promoting global socio-economic development.

Among the 17 pathologies considered neglected tropical diseases are leishmaniasis and toxoplasmosis, both caused by protozoal parasites. Leishmaniasis is caused by intracellular protozoans of the genus *Leishmania* and the infection is transmitted by the bite of sand flies. There are 30 species of *Leishmania* that infect mammals, including *L. donovani* complex. Toxoplasmosis is caused by *Toxoplasma gondii* protozoans, which infect most species of warm-blooded animals, including humans.

The prevention and control of these diseases are not guaranteed, because drugs currently used are older, expensive, have high toxicity and, in some cases, their efficiency is compromised due to the selection of resistant strains.

Artemisinin and its semisynthetic derivatives, are used as first-line drugs in the treatment of malaria, a disease that results from infection by protozoan parasites of the genus Plasmodium. These compounds have a peroxide bond in the structure, considered essential to their pharmacological activity. The mode of action of artemisinin remains a subject under debate. However, there is evidence that this class of compounds yields alkylating radical species that interfere with transport proteins and other specific parasite targets, with consequent disruption of its mitochondrial function and modulation of the host immune function. Although artemisinins are clinically used in the treatment of malaria, their use against other protozoan parasites has only been considered in recent years.

1,2,4-trioxolanes, also called ozonides, are easily prepared by ozonolysis. Thus, it is easy to obtain libraries of these compounds with structural variability for structure-activity relationship studies and optimization of lead compounds. It has been shown that some trioxolanes have antimalarial, antileishmanial and anti-toxoplasma activity similar to that displayed by the artemisinins, so they could be good alternative drugs.

Key-words: Neglected diseases, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, Antiparasitic drugs, Endoperoxides, 1,2,4-trioxolanes.

Índice

AGRADECIMENTOS	III
RESUMO	IV
ABSTRACT	V
ÍNDICE	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE TABELAS	XI
ABREVIATURAS	XII
I. DOENÇAS NEGLIGENCIADAS: CONCEITO E PROBLEMÁTICA	1
1.1. LEISHMANIOSE	3
1.1.1. <i>Manifestações clínicas</i>	4
a. Leishmaniose Tegumentar ou Cutânea	4
b. Leishmaniose Mucocutânea	6
c. Leishmaniose Visceral	7
1.1.2. <i>O parasita: Leishmania</i>	9
1.1.3. <i>O vetor</i>	11
1.1.4. <i>Tratamento atual para leishmaniose visceral</i>	13
a. Antimónio pentavalente	14
b. Anfotericina B	15
c. Miltefosina	17
d. Paromomicina	18
1.2. TOXOPLASMOSE	20
1.2.1. <i>Manifestações clínicas</i>	21
1.2.2. <i>O parasita: Toxoplasma gondii</i>	23
1.2.3. <i>Tratamento atual</i>	25
a. Pirimetamina	26
b. Sulfadiazina	27
c. Ácido folínico	28
d. Clindamicina	29
e. Espiramicina	30
f. Sulfametoxazol + Trimetoprim	31
g. Atovaquona e outros fármacos	32
II. ENDOPERÓXIDOS	34
2.1. ARTEMISININA E DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS	34
2.1.1. <i>Mecanismo de ação</i>	37
2.2. 1,2,4-TRIOXOLANOS	38

2.2.1. Preparação de trioxolanos com potencial atividade antiparasitária	41
a. Síntese da adamantil-metil-Oxima (1)	42
b. Ozonólise: síntese do trioxolano (2)	44
c. Ozonólise: síntese do trioxolano (3)	45
d. Redução do éster: síntese do trioxolano (4)	46
e. Síntese do trioxolano com um grupo ftalamida, composto (5)	48
f. Síntese do trioxolano com grupo amina (6)	49
g. Hidrólise do éster: síntese do trioxolano (7)	50
h. Síntese de cloreto de sacarina (8) e do composto-alvo (9)	51
i. Síntese do composto-alvo (10)	54
j. Síntese do composto-alvo (11)	55
2.3. ATIVIDADE DOS TRIOXOLANOS EM <i>LEISHMANIA DONOVANI</i> E <i>TOXOPLASMA GONDII</i>	57
III. TESTES <i>IN VITRO</i> DE SUSCETIBILIDADE A FÁRMACOS	59
3.1. COMO SE PROCESSAM?	59
3.1.1. Testes <i>in vitro</i> em <i>Leishmania</i>	60
3.1.2. Testes <i>in vitro</i> em <i>Toxoplasma</i>	61
IV. RESULTADOS OBTIDOS PELO GRUPO DO CCMAR	63
V. CONCLUSÃO	65
VI. BIBLIOGRAFIA	66
VII. ANEXOS	79
7.1. COMPOSTO (1)	79
7.1.1. Espectro de $^1\text{H-RMN}$	79
7.1.2. Espectro de massa	79
7.2. COMPOSTO (2)	81
7.2.1. Espectro de $^1\text{H-RMN}$	81
7.2.2. Espectro de massa	82
7.3. COMPOSTO (3)	83
7.3.1. Espectro de $^1\text{H-RMN}$	83
7.3.2. Espectro de massa	84
7.4. COMPOSTO (4)	85
7.4.1. Espectro de $^1\text{H-RMN}$	85
7.4.2. Espectro de massa	86
7.5. COMPOSTO (5)	87
7.5.1. Espectro de $^1\text{H-RMN}$	87
7.5.2. Espectro de massa	88
7.6. COMPOSTO (6)	89
7.6.1. Espectro de $^1\text{H-RMN}$	89

7.6.2. Espetro de massa	90
7.7. COMPOSTO (7)	91
7.7.1. Espetro de $^1\text{H-RMN}$	91
7.7.2. Espetro de massa	92
7.8. COMPOSTO (8)	93
7.8.1. Espetro de $^1\text{H-RMN}$	93
7.9. COMPOSTO (9)	94
7.9.1. Espetro de $^1\text{H-RMN}$	94
7.9.2. Espetro de massa	95
7.10. COMPOSTO (10)	96
7.10.1. Espetro de $^1\text{H-RMN}$	96
7.10.2. Espetro de massa	97
7.11. COMPOSTO (11)	98
7.11.1. Espetro de $^1\text{H-RMN}$	98
7.11.2. Espetro de massa	99

Índice de Figuras

Figura I-1: Endemicidade de leishmaniose cutânea, em 2013. _____	6
Figura I-2: Endemicidade de leishmaniose visceral, em 2013 _____	8
Figura I-3: Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> _____	10
Figura I-4: Flebótomo _____	11
Figura I-5: Representação da estrutura química de Antimoniato de Meglumina _____	15
Figura I-6: Representação da estrutura química da anfotericina B _____	17
Figura I-7: Representação da estrutura química de miltefosina _____	18
Figura I-8: Representação da estrutura química de paromomicina _____	19
Figura I-9: Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i> _____	24
Figura I-10: Representação da estrutura química da Pirimetamina _____	27
Figura I-11: Representação da estrutura química da Sulfadiazina _____	28
Figura I-12: Representação da estrutura química do ácido fólico. _____	29
Figura I-13: Representação da estrutura química da Clindamicina _____	30
Figura I-14: Representação da estrutura química da Espiramicina _____	31
Figura I-15: Representação das estruturas químicas de Trimetoprim (A) e Sulfametoxazol (B) _____	32
Figura I-16: Representação da estrutura química da Atovaquona _____	33
Figura II-1: Representação da estrutura química da Artemisinina _____	34
Figura II-2: Representação da estrutura química da Dihidroartemisinina _____	35
Figura II-3: Representação da estrutura química do Arteméter _____	35
Figura II-4: Representação da estrutura química do Artesunato _____	36
Figura II-5: Representação da estrutura química do Ácido artelínico _____	36
Figura II-6: Representação da estrutura química do núcleo de um 1,2,4-trioxolano _____	38
Figura II-7: Representação da estrutura química do Arterolano (OZ277) _____	40
Figura II-8: Representação da estrutura química do OZ439 _____	40
Figura II-9: Representação da reação de conversão da adamantanona na sua metil-oxima. _____	43
Figura II-10: Proposta de mecanismo de reação de síntese da metil-oxima (1) _____	43
Figura II-11: Representação da reação de conversão da metil-oxima (1) no trioxolano (2) _____	44
Figura II-12: Representação da proposta do mecanismo de síntese do trioxolano (2) _____	45
Figura II-13: Representação da reação de conversão da metil-oxima (1) no trioxolano (3) _____	45
Figura II-14: Proposta de mecanismo de reação da síntese do trioxolano (3) _____	46
Figura II-15: Representação da reação de conversão do trioxolano (3) em trioxolano (4) _____	47
Figura II-16: Representação da proposta de mecanismo de reação da síntese do trioxolano (4) _____	47
Figura II-17: Representação da reação de conversão do trioxolano (4) em trioxolano (5) _____	48
Figura II-18: Representação da proposta do mecanismo da reação de síntese do trioxolano (5) _____	48
Figura II-19: Representação da reação de conversão do trioxolano (5) em trioxolano (6) _____	49
Figura II-20: Representação da proposta do mecanismo da reação de síntese do trioxolano (6) _____	49

Figura II-21: Representação da hidrólise do grupo éster, formando um ácido carboxílico (7)	50
Figura II-22: Representação da proposta do mecanismo da reação de síntese do trioxolano (7)	51
Figura II-23: Representação da reação da conversão de Sacarina em Cloreto de Sacarina (8)	51
Figura II-24: Representação da proposta do mecanismo da reação de síntese do composto (8)	52
Figura II-25: Representação da reação da síntese do trioxolano (9)	52
Figura II-26: Representação da proposta do mecanismo da reação de síntese do composto (9)	53
Figura II-27: Representação da síntese do trioxolano (10)	54
Figura II-28: Representação da proposta do mecanismo da reação de síntese do composto (10)	54
Figura II-29: Representação da reação de conversão do trioxolano (4) no trioxolano (11)	55
Figura II-30: Representação da proposta do mecanismo da reação de síntese do composto (11)	56
Figura VII-1: Espectro de ^1H -RMN do composto (1)	79
Figura VII-2: Espectro de massa do composto (1)	80
Figura VII-3: Espectro de ^1H -RMN do composto (2)	81
Figura VII-4: Espectro de massa do composto (2)	82
Figura VII-5: Espectro de ^1H -RMN do composto (3)	83
Figura VII-6: Espectro de massa do composto (3)	84
Figura VII-7: Espectro de ^1H -RMN do composto (4)	85
Figura VII-8: Espectro de massa do composto (4)	86
Figura VII-9: Espectro de ^1H -RMN do composto (5)	87
Figura VII-10: Espectro de massa do composto (5)	88
Figura VII-11: Espectro de ^1H -RMN do composto (6)	89
Figura VII-12: Espectro de massa do composto (6)	90
Figura VII-13: Espectro de ^1H -RMN do composto (7)	91
Figura VII-14: Espectro de massa do composto (7)	92
Figura VII-15: Espectro de ^1H -RMN do composto (8)	93
Figura VII-16: Espectro de ^1H -RMN do composto (9)	94
Figura VII-17: Espectro de massa do composto (9)	95
Figura VII-18: Espectro de ^1H -RMN do composto (10)	96
Figura VII-19: Espectro de massa do composto (10)	97
Figura VII-20: Espectro de ^1H -RMN do composto (11)	98
Figura VII-21: Espectro de massa do composto (11)	99

Índice de Tabelas

<i>Tabela I-1: Padrões de leishmaniose cutânea e principais agentes etiológicos, tendo em conta a região do globo.....</i>	<i>5</i>
<i>Tabela I-2: Espécies de Leishmania e os seus principais vetores tendo em conta a região geográfica e o tipo de leishmaniose que provocam.....</i>	<i>11</i>
<i>Tabela IV-1: Atividades anti maláricas de alguns endoperóxidos</i>	<i>63</i>

Abreviaturas

ADN- Ácido Desoxirribonucleico

ARN- Ácido Ribonucleico

ATPase- Adenosina-trifosfatase

CDC- Centro de Controle e Prevenção de Doenças

DCM- Diclorometano

DHA- Di-hidroartemisinina

DIAD- Dilsopropil-Azo-Dicarboxilato

DTNs- Doenças Tropicais Negligenciadas

ELISA- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

FACS - Fluorescence-activated Cell Sorting

FDA - Food and Drug Administration

Fe - Ferro

GFP- Green Fluorescent Protein (Proteína fluorescente verde)

IC₅₀ - Concentração Inibitória de 50% da população

MTS- 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-5-(3-carboxi-metoxi-fenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol

MTT- 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol

OMS- Organização Mundial de Saúde

PABA- Ácido Para-Amino Benzoico

PKDL- Leishmaniose tegumentar Pós Kalazar

RFP- Red Fluorescent Protein (Proteína fluorescente vermelha)

SAR- Relação Estrutura – Atividade

Sb- Antimónio

THF- Tetrahydrofurano

TLC- Cromatografia em camada fina

TNF- Fator de Necrose Tumoral

USAID- Agência dos Estados Unidos para o Desenvolvimento Internacional

VIH- Vírus da Imunodeficiência Humana

I. Doenças negligenciadas: conceito e problemática

O conceito de doenças negligenciadas não é consensual, sendo que diferentes organizações, entre as quais a Organização Mundial de Saúde (OMS) e centros homólogos dos Estados Unidos da América, como o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), a Agência dos Estados Unidos para o Desenvolvimento Internacional (USAID) e a Fundação Bill & Melinda Gates, definem este conjunto de doenças de forma diferente.¹

Normalmente, as doenças tropicais negligenciadas (DTNs) são consideradas como um grupo diversificado de doenças com características distintas que se desenvolvem principalmente entre as populações mais pobres do planeta.² As 17 DTNs que a OMS prioriza são endémicas em 149 países e afetam mais de 1,4 biliões de pessoas. As DTNs afetam maioritariamente populações que vivem em zonas remotas, rurais, em bairros sociais ou favelas urbanas, bem como em zonas de conflito.^{1,3}

Apesar das infeções parasitárias serem tipicamente associadas às comunidades mais pobres e serem muito mais frequentes em países em desenvolvimento, também ocorrem noutros países.⁴ Nos Estados Unidos e na Europa estas infeções ocorrem sobretudo no seio de populações que vivem em situações de pobreza que, relativamente a países em desenvolvimento, são minoritárias, pelo que são geralmente esquecidas aquando da imposição de programas de controlo de doenças negligenciadas.⁵ Um exemplo ilustrativo desta situação é a toxoplasmose.⁴ A leishmaniose e a toxoplasmose podem considerar-se “infeções negligenciadas da pobreza”, em homologia com outras doenças tropicais negligenciadas, como a malária, pois caracterizam-se pela elevada prevalência e cronicidade e pelo poder incapacitante que detêm, mas podem ocorrer fora das regiões tropicais da África, Ásia e América Latina.⁶ Tal como outras DTNs, estas infeções também promovem a pobreza, dado o seu impacto no desenvolvimento fetal e infantil, na gravidez e na produtividade dos trabalhadores.⁶

As DTNs têm um enorme impacto na saúde pública mundial, relacionado com o facto de não existirem ferramentas de controlo com uma boa relação custo-benefício e de o uso das ferramentas atualmente disponíveis (de diagnóstico, de tratamento e de acompanhamento) ser bastante limitado. As dificuldades na utilização em larga escala

destas ferramentas advêm de uma gestão difícil e com custos elevados em resultado de um conjunto de fatores, como a falta de investimento em investigação e desenvolvimento e a acessibilidade limitada ao diagnóstico e tratamento por parte dos doentes, dado o local de residência e nível pobreza.²

Por outro lado, a prevenção e o controlo destas patologias não estão assegurados, dada a escassez de fármacos adequados, específicos para as doenças em causa. Os fármacos atualmente usados são antigos, caros, apresentam elevada toxicidade e, em alguns casos, a sua eficácia está comprometida devido a seleção de estirpes resistentes. Torna-se assim imperativo o desenvolvimento de soluções alternativas.

As DTNs podem resultar de infeção por quatro tipos de organismos patogénicos: protozoários, vírus, bactérias e helmintas. As leishmanioses resultam de infeção por parasitas protozoários do género *Leishmania*.² A toxoplasmose, por sua vez, também resulta da infeção por parasitas protozoários, mas do género *Toxoplasma*.

1.1. Leishmaniose

Reconhecidas por Hotez como "das infecções provocadas por protozoários mais importante em seres humanos, após a malária", as leishmanioses são um complexo de doenças que envolvem mais de 20 espécies de parasitas, mais de 30 espécies de vetores flebótomos, e uma ampla gama de hospedeiros animais, incluindo roedores, cães e seres humanos.¹

A leishmaniose engloba múltiplos síndromas clínicos⁷ dependentes de fatores como a espécie de *Leishmania* que infecta o hospedeiro e a capacidade de resposta deste, o que reflete o estado do seu sistema imunitário.⁸

Os parasitas de *Leishmania* são transmitidos pela picada de flebótomos femininos infetados. A epidemiologia da leishmaniose depende das características das espécies de parasitas, das características ecológicas locais, da exposição atual e anterior da população humana ao parasita e do próprio comportamento humano. Cerca de 70 espécies de animais, incluindo os humanos, são hospedeiros naturais destes parasitas.⁹

A doença afeta principalmente pessoas pobres, na África, Ásia e América Latina, e está associada a desnutrição, deslocamentos da população, condições precárias de habitação, debilidade do sistema imunológico do hospedeiro e falta de recursos. Uma revisão recente demonstra que cerca de 100 países/regiões são endêmicos para leishmaniose.^{10,11} O clima e outras mudanças ambientais têm potencial para expandir a abrangência geográfica dos vetores flebótomos e as áreas onde a leishmaniose ocorre.^{9,12} Assim, trata-se de uma doença global, presente em todos os continentes, com exceção da Austrália e Antártica⁹.

A distribuição geográfica da leishmaniose é comumente dividida em duas regiões: o "velho mundo" (em inglês, "*Old World*"), que abrange áreas como o sul da Europa, a bacia do Mediterrâneo, o Médio Oriente, a Ásia e a África; e o "novo mundo" ("*New World*"), que abrange a América Latina.¹³

Os vetores para *Leishmania* são flebótomos hematófagos do sexo feminino, cujo género varia com a distribuição geográfica, com prevalência do género *Phlebotomus* na zona designada como "velho mundo" e do género *Lutzomyia* no "novo mundo".¹³

No supercontinente, muitas vezes designado por Afro-Eurásia, a leishmaniose cutânea é a principal forma da doença. No entanto, na bacia do Mediterrâneo e no

sudeste asiático a leishmaniose visceral é a mais prevalente, em que os parasitas vivem em cães e noutros animais. No leste da África verificam-se surtos de leishmaniose visceral frequentes. No entanto, em terras altas da Etiópia e em aldeias construídas sob colinas rochosas ou margens de rios¹², onde o contacto entre flebótomos e o Homem é muito superior, a leishmaniose cutânea tem incidência elevada.⁹ No continente americano, a leishmaniose é muitas vezes designada por calazar, uma forma muito semelhante à encontrada na bacia do Mediterrâneo, ou seja leishmaniose visceral.⁹

1.1.1. Manifestações clínicas

Existem três formas principais da doença: leishmaniose cutânea (restrita à pele), leishmaniose visceral ou calazar (sistema reticuloendotelial), e leishmaniose mucocutânea (membranas mucosas).⁹

Em todas, a infeção pode variar desde um padrão assintomático a grave. Nas formas cutânea e mucocutânea podem ocorrer morbilidades substanciais, enquanto que a leishmaniose visceral pode vir a ser fatal.⁷

a. Leishmaniose Tegumentar ou Cutânea

A leishmaniose cutânea é a forma mais comum de leishmaniose¹³ e é causada por várias espécies de *Leishmania*. Na maioria das vezes estas diferenças devem-se à distribuição global da doença (Tabela I-1). No hemisfério oriental, os agentes etiológicos incluem *Leishmania tropica*, *L. major*, *L. aethiopica*, *L. infantum* e *L. donovani*. As principais espécies do hemisfério ocidental são as que integram o complexo de espécies *L. mexicana* (*L. mexicana*, *L. amazonensis* e *L. venezuelensis*) ou o subgénero *Viannia* (*L. [V.] braziliensis*, *L. [V.] guyanensis*, *L. [V.] panamensis*, e *L. [V.] Peruviana*). (Tabela I-1) O subgénero *Viannia* também é referido como complexo de espécies *L. (V.) braziliensis*.⁷

Tabela I-1: Padrões de leishmaniose cutânea e principais agentes etiológicos, tendo em conta a região do globo.

Localização	Formas de leishmaniose cutânea	Agentes etiológicos
“Old World”	Leishmaniose cutânea	<i>L. tropica</i> , <i>L. aethiopica</i> , <i>L. major</i> , <i>L. infantum</i>
“New World”	Leishmaniose cutânea localizada	<i>L. [V.] braziliensis</i> , <i>L. amazonensis</i>
	Leishmaniose cutânea difusa	<i>L. amazonensis</i> , <i>L. mexicana</i>
	Leishmaniose cutânea intermédia/ disseminada	<i>L. [V.] braziliensis</i> ,
	Leishmaniose mucocutânea	<i>L. [V.] braziliensis</i> , <i>L. [V.] guyanensis</i> , <i>L. [V.] panamensis</i>

Fonte: Adaptado de “Leishmaniasis in travelers: a literature review”.¹³

Em geral, este tipo de leishmaniose, várias vezes designada como tegumentar, manifesta-se por lesões na pele, que podem persistir por meses, ou até anos. Tipicamente, as lesões evoluem de pápulas para placas nodulares e lesões ulcerativas, com uma borda elevada com depressão central, que pode ser coberta por crosta; algumas lesões persistem como nódulos. As lesões são geralmente indolores, apesar de se poderem tornar dolorosas, especialmente se forem infetadas com bactérias ou se estiverem localizadas perto de articulações.⁷ Sempre que a infeção não é controlada (por exemplo, por tratamento inadequado, má adesão à terapêutica, ou desenvolvimento de um estado imunossupressor), a leishmaniose cutânea localizada pode progredir para leishmaniose cutânea disseminada ou leishmaniose mucocutânea.¹³

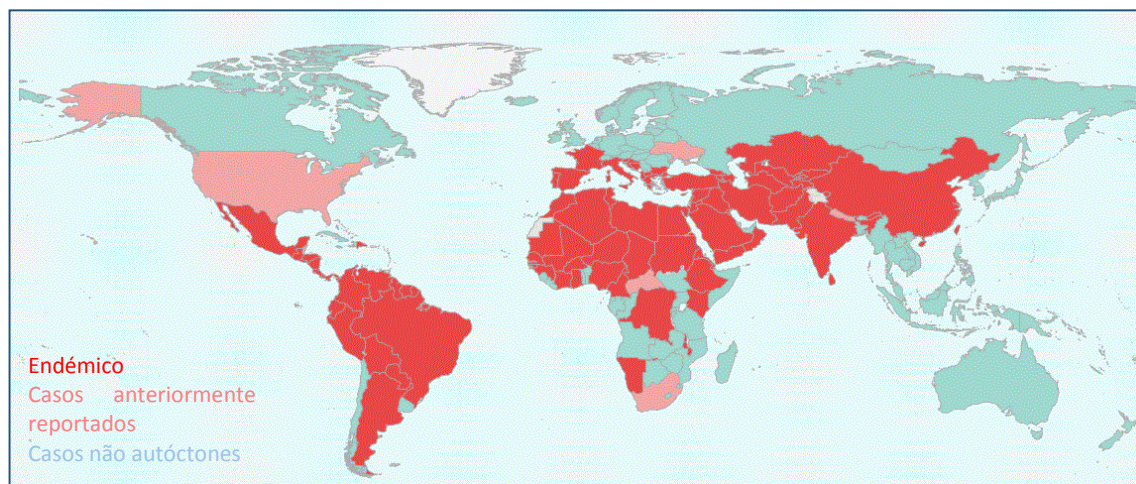


Figura I-1: Endemicidade de leishmaniose cutânea, em 2013.
Fonte: Organização mundial de saúde¹⁴

b. Leishmaniose Mucocutânea

A leishmaniose mucosa ou mucocutânea pode ser considerada como uma seqüela metastática da infecção cutânea, resultando da disseminação de parasitas da pele para a mucosa naso-orofaríngea. Esta resulta da disseminação linfática ou hematogênica do parasita *Leishmania*, partindo de uma lesão cutânea.⁸ Apenas alguns meses ou até anos após essa infecção é que poderão aparecer os sintomas de infecção do trato respiratório superior e da mucosa oral.¹⁵ As primeiras manifestações clínicas deste tipo de leishmaniose são o eritema e edema da mucosa nasal, devidos à sua inflamação, o que provoca dificuldade em respirar pelo nariz e sangramento ocasional.⁸

Uma percentagem significativa de casos de leishmaniose cutânea é assintomática, ou seja, não progride da fase subclínica, o que leva os hospedeiros a não estarem cientes da infecção anterior aquando do aparecimento de sintomatologia de leishmaniose mucosa. Para além disso, dado o intervalo potencialmente prolongado entre a resolução da doença cutânea e o desenvolvimento de lesões da mucosa, a correlação entre os dois episódios pode ser desvalorizada.¹³

Quase 90% dos casos de leishmaniose mucocutânea ocorre na Bolívia, Brasil e Peru.¹¹ Este tipo de leishmaniose é causado, maioritariamente, por espécies do subgênero *Viannia* (especialmente *L. [V.] braziliensis*, mas também *L. [V.] panamensis* e, por vezes, *L. [V.] guyanensis*); também pode ser causada por *L. amazonensis*, mas a frequência é bastante rara.⁷

Ao contrário da leishmaniose cutânea, a forma mucocutânea da doença não é autodestrutiva e, portanto, na ausência de tratamento a progressão da doença pode causar sequelas permanentes, como a destruição ulcerativa do nariz, boca, faringe e laringe, perfuração do septo nasal, e desfiguração facial.^{7,13,15}

A destruição da mucosa ulcerativa naso-orofaríngea pode ser fatal, devido ao comprometimento da via aérea.¹³

c. Leishmaniose Visceral

A leishmaniose visceral é uma forma de leishmaniose sistêmica causada pela disseminação de *L. donovani* ou *L. infantum* em todo o sistema reticuloendotelial, afetando órgãos internos, particularmente, o baço, o fígado e a medula óssea.^{7,8}

Os principais sinais e sintomas incluem febre, caquexia grave, hepato-esplenomegalia, pancitopenia e hipergamaglobulinemia.¹⁶

Quando o diagnóstico da doença é precoce, os sintomas resumem-se a febre, fraqueza, anorexia, perda de peso, palidez, hepato-esplenomegalia e linfadenopatia.¹⁷ Em casos de diagnóstico mais tardio pode ocorrer epistaxe (sangramento nasal), sangramento gengival, distensão abdominal, ascite (acumulação de líquido na cavidade abdominal) e edema periférico. Em crianças, pode também ocorrer atraso do crescimento.¹³

A principal lesão deste tipo de leishmaniose é uma pequena pápula eritematosa normalmente localizada nas pernas, sendo referida muitas vezes como um "*leishmanioma*". A xerose também é muito comum, tornando a pele seca e áspera, e os cabelos quebradiços, originando alopecia. Para além disso ocorre o escurecimento da pele, resultante do aumento da atividade dos melanócitos, provindo daí o nome de "*kala-azar*" que significa "febre negra".⁸

Os principais agentes etiológicos desta forma de leishmaniose são *L. infantum*, na bacia do Mediterrâneo, *L. donovani*, no subcontinente indiano, Ásia e África Oriental, e *L. chagasi*, na América do Sul.¹³ Mais de 90% dos casos de leishmaniose visceral ocorrem em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão, como apresentado na figura I-2.¹¹

Nos países mediterrânicos e na América do Sul a doença é zoonótica e afeta principalmente bebés e crianças entre 1 e 4 anos.¹⁵ No entanto, na bacia do

Mediterrâneo, uma taxa crescente de indivíduos adultos imuno-comprometidos e imunossuprimidos, como é o caso dos doentes com VIH e doentes sob terapias imunossupressoras, levaram ao aumento de infetados por *Leishmania*. No subcontinente indiano e em África, a doença é antroponótica, ou seja, a transmissão ocorre através de flebótomos, de humano para humano, sem o envolvimento de um hospedeiro reservatório.^{12,13}

Se não tratados, ou em casos de recaídas posteriores, a leishmaniose visceral pode ser fatal, quer diretamente, pela doença ou indiretamente, pelas complicações que provoca.⁷ Normalmente, *exitus letalis* é causado por anemia grave, infeção secundária, e hemorragia.¹³

A leishmaniose visceral será o foco desta monografia, uma vez que é causada pelo complexo *L. donovani*.

Alguns doentes desenvolvem leishmaniose tegumentar pós *kala-azar* (PKDL), uma síndrome caracterizada por lesões de pele, como mácula, pápula ou erupção nodular, geralmente no rosto, braços, tronco e noutras partes do corpo.^{7,9}

Este subtipo de leishmaniose é muitas vezes descrito como uma sequela da infeção por *L. donovani*, no sul da Ásia e na África Oriental. As pessoas com esta síndrome crónica podem ser hospedeiros e reservatórios de infeção.⁷

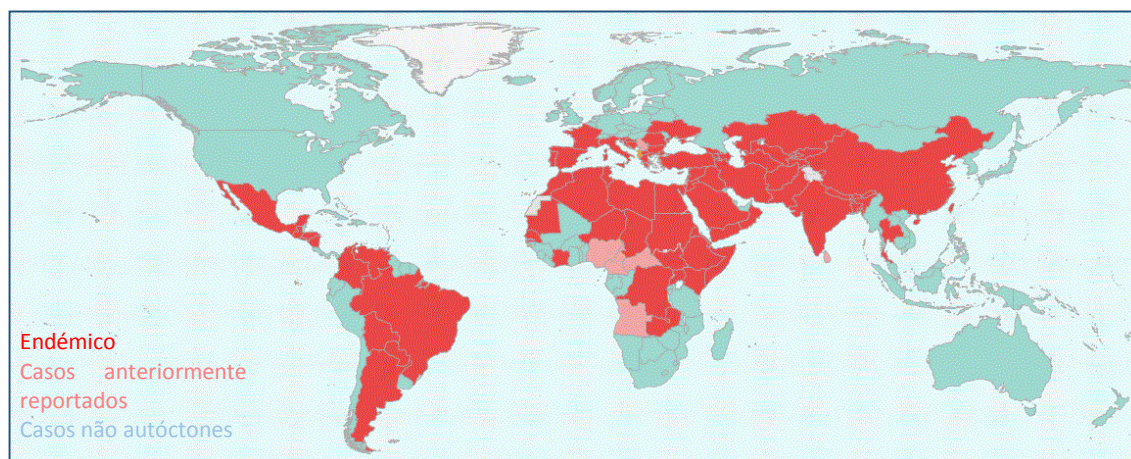


Figura I-2: Endemicidade de leishmaniose visceral, em 2013
Fonte: Organização Mundial de Saúde¹⁴

1.1.2. O parasita: *Leishmania*

Leishmania é o género de protozoários da família *Trypanosomatidae* pertencentes à ordem *Kinetoplastida*.¹⁸ Estes são parasitas dimórficos, pois apresentam dois estádios morfológicos, as formas promastigotas e as formas amastigotas.

As formas promastigotas correspondem a um estádio extracelular flagelar e as formas amastigotas correspondem ao estádio intracelular.^{8,15} A forma promastigota é flagelada e alongada, com aspeto fusiforme¹⁸ e encontra-se em vetores e/ou meios de cultura.¹⁶

A forma amastigota é esférica/ovoide, possuindo um núcleo esférico e um flagelo interno pouco desenvolvido.¹⁸ Normalmente, esta forma do parasita encontra-se em hospedeiros mamíferos.¹⁶

Os promastigotas encontram-se em ambientes aeróbios de pH neutro e utilizam na sua maioria açúcares e aminoácidos, assegurando a sua motilidade. Já os amastigotas, que são fagocitados no organismo do hospedeiro, suportam meios mais ácidos e têm como principal fonte energética ácidos gordos.¹⁹ Apesar destas diferenças, as primeiras enzimas da via glicolítica estão localizadas na membrana de um organelo comum a todas as espécies de *Leishmania*, mas ausente nos hospedeiros, o glicosoma.²⁰

A infeção humana é causada por 21 das cerca de 30 espécies que infetam os mamíferos. Estas incluem o complexo *L. donovani* com duas espécies (*L. donovani* e *L. infantum*); o complexo *L. mexicana* com três espécies principais (*L. mexicana*, *L. amazonensis* e *L. venezuelensis*); o complexo *L. tropica* (*L. tropica* e *L. aethiopica*); *L. major*; e o subgénero *Viannia* com quatro espécies principais (*L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) peruviana*). As diferentes espécies são morfológicamente indistinguíveis, mas podem ser diferenciadas isoenzimaticamente, por métodos moleculares, ou por métodos imunológicos, com anticorpos monoclonais.²¹

O ciclo de vida do parasita, representado na Figura I-3, necessita de dois tipos de hospedeiro: um inseto (vetor) e um vertebrado (reservatório).

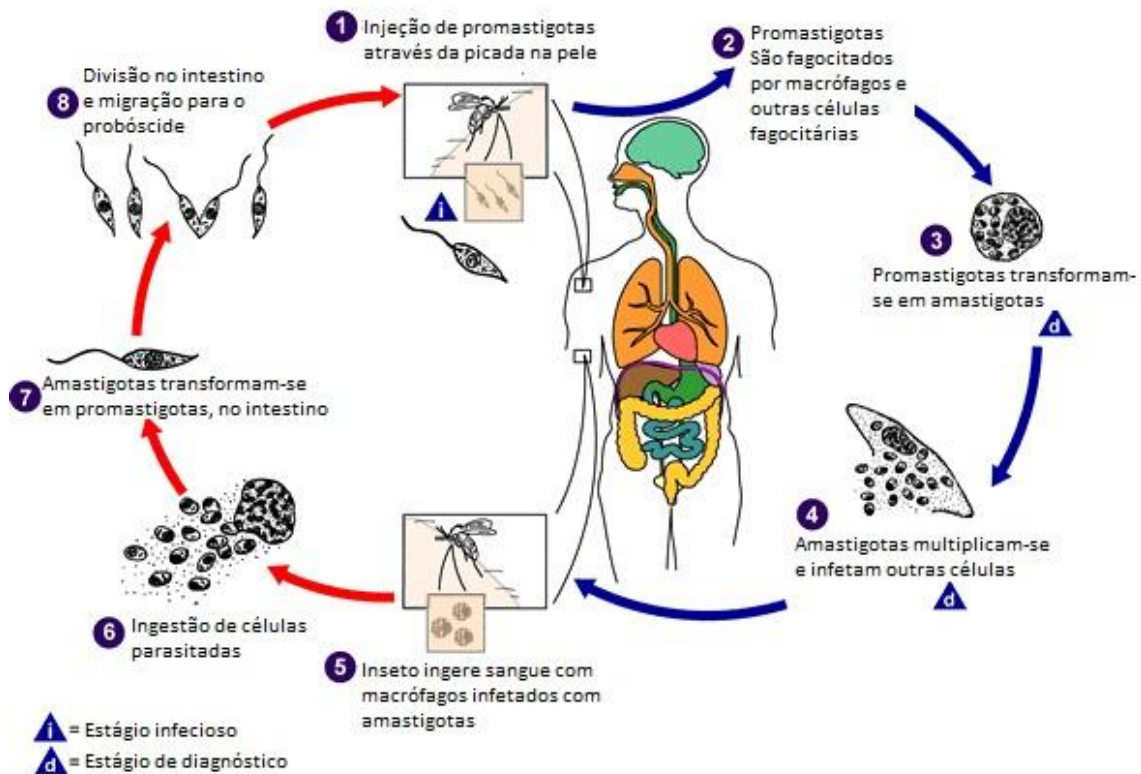


Figura I-3: Ciclo de vida de *Leishmania*

Fonte: adaptado de CDC- Centers for Disease Control and Prevention ²¹

Como representado na *Figura I-3*, o parasita é transmitido através da picada de flebotomos femininos infetados, aquando da injeção de promastigotas no vertebrado.²¹ Os parasitas sofrem fagocitose pelos macrófagos do hospedeiro, processo que os torna desflagelados, transformando-os em amastigotas.¹³ Esta nova forma do parasita permite-lhe uma rápida divisão, aumentando a carga parasitária no interior de cada macrófago.²¹

O aumento do número de amastigotas e a degradação do citoplasma dos macrófagos levam à sua lise, permitindo a libertação de uma grande quantidade de parasitas no meio intercelular, na corrente sanguínea e, subsequentemente, a infeção de outras células.¹⁵

Quando outro flebotomo pica um hospedeiro vertebrado, o inseto ingere esses amastigotas. No inseto estes migram até ao intestino, onde sofrem outro processo de diferenciação e se transformam em promastigotas, que se multiplicam por mitose. À medida que se diferenciam, os promastigotas migram para a região da probóscide do vetor, de modo a infetar um novo hospedeiro vertebrado.⁸

1.1.3. O vetor

Quando uma doença é transmitida de forma ativa ou passiva através de um ser vivo, este é designado por vetor. No caso da Leishmaniose, o vetor são flebótomos femininos dos géneros *Phlebotomus* ou *Lutzomyia*, dependendo da região geográfica (como apresentado na *tabela I-2*).¹⁵ Geralmente, o género *Phlebotomus* é responsável pela transmissão da doença no “Old World” e o género *Lutzomyia* no “New World”.



Figura I-4: Flebótomo

Fonte: OMS²²

Tabela I-2: Espécies de *Leishmania* e os seus principais vetores tendo em conta a região geográfica e o tipo de leishmaniose que provocam.

Espécie de <i>Leishmania</i>	Vetor	Áreas afetadas	Tipo de leishmaniose
<i>L. aethiopica</i>	<i>Phlebotomus</i>	Etiópia e Quênia	Cutânea localizada, difusa e mucosa
<i>L. amazonensis</i>	<i>Lutzomyia</i>	Andes	Cutânea localizada e disseminada
<i>L. braziliensis</i>	<i>Lutzomyia</i>	Andes	Cutânea e mucosa
<i>L. donovani</i>	<i>Phlebotomus</i>	Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão, Etiópia e Reino do Butão	Visceral
<i>L. guyanensis</i>	<i>Lutzomyia</i>	Andes	Cutânea e mucosa
<i>L. infantum</i>	<i>Phlebotomus</i>	Mediterrâneo	Cutânea e visceral
	<i>Lutzomyia</i>	América Latina	
<i>L. major</i>	<i>Phlebotomus</i>	Norte de África, Irão, Paquistão, Índia	Cutânea
<i>L. mexicana</i>	<i>Lutzomyia</i>	Andes	Cutânea localizada, difusa e mucosa
<i>L. panamensis</i> e <i>L. peruviana</i>	<i>Lutzomyia</i>	Andes e Peru	Cutânea e mucosa
<i>L. tropica</i>	<i>Phlebotomus</i>	Norte de África, Irão e Afeganistão	Cutânea

Fonte: adaptado de *Leishmaniasis*¹⁵ e *Leishmaniasis*⁸

Segundo a *Organização Mundial de Saúde*, são conhecidas cerca de 500 espécies de flebótomos mas, de acordo com a informação disponível na literatura, apenas 30 transmitem *Leishmania*.^{16,22}

A necessidade de sangue para o desenvolvimento dos seus ovos é a principal causa para a propagação de leishmaniose pelo flebótomo feminino. Estes vetores depositam os seus ovos em locais onde as condições de calor e humidade são propícias ao desenvolvimento dos mesmos, em ruínas, tocas de animais, entre outros. Os flebótomos são mais ativos ao final do dia e durante a noite, podendo cobrir até várias centenas de metros ao redor do seu habitat.

1.1.4. Tratamento atual para leishmaniose visceral

A possibilidade de morte iminente em doentes com manifestações de leishmaniose visceral torna da máxima importância a formulação e utilização de terapias eficazes, e de ação rápida.¹⁶ Para além disso, o tratamento da parasitose deve ser iniciado assim que é estabelecido um diagnóstico.¹³

Quando se desenvolvem novos fármacos para doenças infecciosas o princípio basilar é encontrar um alvo específico do parasita, de modo a diminuir ao máximo a toxicidade do fármaco para o hospedeiro. Assim sendo, torna-se crucial saber quais as principais diferenças metabólicas, bem como as diferenças estruturais. O conhecimento de todo o ciclo do parasita e sua localização no hospedeiro e/ou vetor torna-se da máxima importância para o desenho de uma terapêutica eficaz.

Tendo por base as recomendações da OMS para tratamento de leishmaniose visceral, verifica-se que os fármacos de primeira linha dependem do agente etiológico e da região do globo em que ocorre a doença.²³

De acordo com a informação constante da tabela I-2, a leishmaniose visceral é provocada pela *L. donovani* e *L. infantum*.

Em países do sul do continente asiático, como a Índia e o Nepal, o agente etiológico prevalente é *L. donovani*.²⁴ Nesta região, a primeira linha de tratamento é a anfotericina B lipossomal, seguida pela combinação de anfotericina B lipossomal com paromomicina ou miltefosina, ou pela combinação entre estes dois fármacos. Em casos mais complicados, resistentes a este tipo de terapêutica, a terceira linha passa pela utilização de anfotericina B convencional (desoxicolato). Noutras regiões, como na África oriental (Etiópia, por exemplo), as soluções de primeira linha contra leishmaniose visceral, segundo a OMS, são terapêuticas à base de antimónio pentavalente ou baseadas na combinação deste com paromomicina. Em segunda linha aparecem como opção as anfotericinas lipossomal e convencional e por fim a miltefosina.²³

Para o tratamento de leishmaniose visceral causada por *L. infantum*, a OMS recomenda a anfotericina B lipossomal como primeira linha, os fármacos de antimónio pentavalente em segunda linha e, em terceira, a anfotericina B convencional.²³

Face ao exposto, verifica-se que a leishmaniose visceral conta com um pequeno leque de opções terapêuticas. O custo elevado e toxicidade, a fraca eficácia em áreas

endêmicas, devido à crescente resistência e as dificuldades ao nível da via de administração tornam estas soluções muito deficientes e reforçam a necessidade de desenvolvimento de novos candidatos. Seguidamente apresentam-se as características dos fármacos antiparasíticos presentemente usados no tratamento de Leishmanioses.

a. Antimónio pentavalente

As terapêuticas baseadas em antimónio pentavalente constituíram o tratamento padrão para a leishmaniose visceral a partir de 1940.¹⁵

Os primeiros fármacos sintetizados para este tipo de tratamento foram o estibogluconato de sódio e o antimoniato de meglumina⁷ que, apesar de serem bastante eficazes contra o parasita, são cardiotóxicos, hepatotóxicos e nefrotóxicos.^{19,25}

Apesar do tratamento com antimónio permanecer a base terapêutica na maioria das regiões do globo^{15,16}, a sua elevada toxicidade, bem como as taxas crescentes de resistência observados na Europa e na Índia, levaram ao uso de medicamentos alternativos nessas regiões, tais como anfotericina B e os seus derivados lipossomais.^{15,26}

Há cerca de duas décadas, na Índia, as taxas de resistência antimonial generalizada alcançaram níveis muito elevados, apesar de noutras zonas do globo esta terapêutica continuar a apresentar taxas de eficácia na ordem dos 90 a 95%.^{13,16}

Alguns estudos indicam que a resistência da *Leishmania* a este tipo de tratamento se pode dever ao aumento do efluxo do metal e a uma diminuição na taxa de redução do antimónio pentavalente a trivalente (espécie ativa).^{20,27}

Os complexos de Sb (V) acumulam-se nas formas promastigotas e amastigotas. No entanto, estes derivados pentavalentes são descritos muitas vezes como pró-fármacos, pois a sua redução para o estado trivalente Sb (III), tanto nos macrófagos como no próprio parasita, torna-os muito mais ativos.²⁷ Ambos os estados oxidativos promovem a fragmentação do ADN, inibem processos metabólicos, e diminuem a capacidade do parasita degradar compostos tóxicos.²⁰ Está descrito na literatura que o estado trivalente inibe a expressão de genes essenciais e aumenta o efluxo dos agentes oxidativos, promovendo *stress* oxidativo. O mecanismo de ação do estado

pentavalente ainda não é totalmente conhecido, mas existem evidências de que estará associado à complexação destas moléculas com riboses que estão presentes em várias biomoléculas, incluindo no ADN.²⁸ Devido à sua hidrofília, estes fármacos não são absorvidos através da barreira lipofílica intestinal, sendo facilmente protonados em meio aquoso, o que limita a sua biodisponibilidade oral. Assim, a via de administração mais frequente para este tipo de fármacos é a via intramuscular, que é bastante dolorosa.

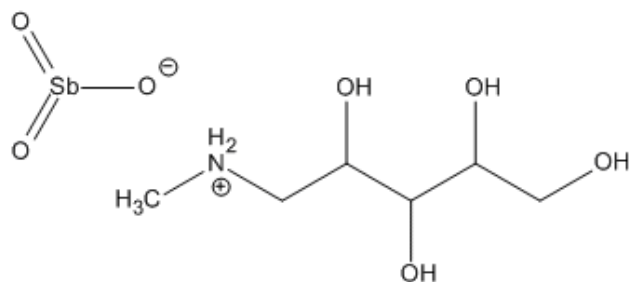


Figura I-5: Representação da estrutura química de Antimoniato de Meglumina

A principal vantagem deste tipo de tratamento é o baixo custo. No entanto, as suas desvantagens são bastante numerosas, como a via de administração (via intramuscular), a necessidade de um tratamento prolongado (durante 21 a 30 dias) e eventuais efeitos colaterais, como pancreatite, arritmias cardíacas, entre outros, que colocam a vida do hospedeiro em risco.¹³

b. Anfotericina B

A anfotericina B é um polieno com excelente atividade contra leishmaniose visceral. Em alguns locais do mundo este fármaco passou a ser a primeira linha de tratamento, uma vez que a sua eficácia é muito semelhante à dos tratamentos com antimónio pentavalente.^{13,16,17}

Mesmo considerando a sua eficácia, a anfotericina B não teria muitas vantagens sobre o antimónio pentavalente, uma vez que o tratamento obriga à hospitalização prolongada, aumentando os custos associados. A administração ocorre por perfusão e os são frequentes os efeitos colaterais, como febre e calafrios, devido à própria perfusão, nefrotoxicidade, entre outros.¹³

Com o surgimento de formulações lipídicas da anfotericina B (anfotericina B lipossomal, complexos lipídicos de anfotericina B e anfotericina B em dispersão

coloidal)¹⁷, em que vários lípidos substituíram o desoxicolato da formulação convencional, foram surgindo também mais vantagens no uso da anfotericina B. Estas formulações para além de serem altamente eficazes tornaram a terapia mais dirigida. A prevalência do fármaco em órgãos ricos em macrófagos diminui a toxicidade sistémica, reduzindo os efeitos nefrotóxicos e permitindo a redução de doses diárias e intervalos de tratamento.^{13,16}

No que respeita ao mecanismo de ação, a anfotericina B atua através da sua ação nas membranas celulares. Esta é capaz de formar poros nas membranas através da ligação a esteróis, tanto da membrana do protozoário (ergosterol) como do colesterol encontrado nas células humanas.²⁹ A ligação com o ergosterol altera a permeabilidade da membrana dos promastigotas, o que vai provocar a sua lise. No caso de macrófagos, a sua ligação com o colesterol, funciona como um biomarcador, impedindo macrófagos infetados de fagocitar mais promastigotas, o que inibe o desenvolvimento dos parasitas.^{20,29}

A FDA licenciou a anfotericina B lipossomal para o tratamento da leishmaniose visceral⁷ em 1997, recomendando-a apenas para doentes imunocompetentes.¹⁶ Assim, a anfotericina B lipossomal passou a ser usada como fármaco de primeira linha em muitos países industrializados.¹⁷ Apesar de ter sido provado que a sua eficácia dependia do estado do sistema imunitário do hospedeiro, hoje em dia, é utilizada mesmo para doentes imunodeficientes.⁷ A contrapartida desta situação é o aparecimento de parasitas resistentes a anfotericina B, numa possível recidiva, dada a perda de eficácia.

Aquando da escolha desta terapêutica devem ser tomados em conta os efeitos secundários do fármaco, que apesar de não serem tão nefastos como os do antimónio também podem ser preocupantes. Um bom exemplo é a nefrotoxicidade provocada pelas alterações de permeabilidade tubular nos rins, que colapsa o equilíbrio de pH e cálcio entre a membrana, levando à apoptose celular.²⁰

A grande problemática da utilização desta terapêutica prende-se com a questão económica, uma vez que, em relação ao antimónio, esta teria mais vantagens. No entanto, verifica-se que em países onde a leishmaniose visceral é endémica, os escassos recursos tornam este tipo de terapêutica inviável. As formulações lipídicas de anfotericina B são muito caras para os países onde são mais necessárias.¹⁶

glicosilfosfatidilinositol.^{32,34} Todos estes fatores, para além da sua semelhança com biomoléculas relacionadas com a transdução de sinais, levam à apoptose celular.³⁵ O seu envolvimento na sobrevivência das células só ocorre após entrada do fármaco no protozoário, através de determinados mediadores membranares.²⁰ Assim, facilmente se equaciona o aumento de eficácia na terapêutica combinada de anfotericina B lipossomal e miltefosina.

Sendo este fármaco bem tolerado e com biodisponibilidade oral, torna-se uma boa opção para doentes co-infetados pelo VIH, tendo em conta possíveis complicações, tais como interações medicamentosas.³⁰

Apesar de todas as vantagens garantidas por este fármaco, a miltefosina é contraindicada em grávidas, devido à sua teratogenicidade e poder abortivo. Para além disso, recomenda-se que as mães não amamentem durante 5 meses após o tratamento.⁷ A miltefosina pode também provocar efeitos secundários gastrointestinais, como diarreia, vômitos e náusea.³⁶

Muitos dos efeitos secundários deste fármaco devem-se ao tempo de semivida prolongado que apresenta. Para além disso, este fator favorece a formação de espécies de *Leishmania* resistentes.²⁰ O custo da terapêutica também é um fator limitativo da sua utilização em alguns países.³⁶

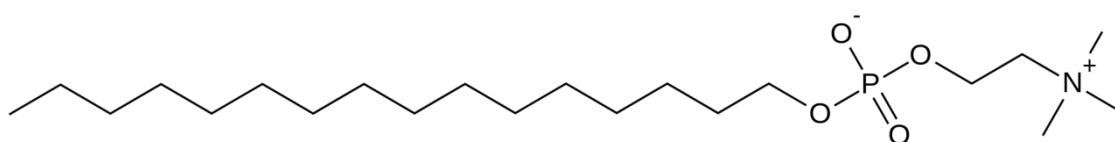


Figura I-7: Representação da estrutura química de miltefosina

d. Paromomicina

A paromomicina é um antibiótico da classe dos aminoglicosídeos cuja estrutura está representada na Figura I-8. A sua atividade terapêutica foi descoberta nos anos sessenta,³⁷ tendo sido inicialmente utilizada no tratamento tópico de leishmaniose cutânea. Atualmente também é usada no tratamento de leishmaniose visceral.^{38,39}

Em 2007 foram publicados estudos em que se verificou que a paromomicina injetável não é menos eficaz que a anfotericina B no tratamento da leishmaniose visceral.^{13,40,21}

Na Índia, onde ocorreram testes de fase III desde 2006⁴¹, a utilização de paromomicina intramuscular é hoje uma alternativa terapêutica, sendo sobretudo usada em regimes de combinação com outras terapêuticas.³⁰

A paromomicina ainda não está disponível nos Estados Unidos, sendo requisitada apenas através de mecanismos especiais.⁷

No que respeita ao seu mecanismo de ação, pensa-se que a paromomicina inibe a síntese proteica através de alterações ribossomais.^{20,42} O que torna este antibiótico especialmente interessante é o facto de ser uma terapêutica bastante direcionada, uma vez que a sua atividade é muito superior no ARN ribossomal de protozoário (tanto em formas amastigotas como promastigotas) do que no hospedeiro mamífero.³⁹

Devido a alterações do gradiente de eletrões intermembranar, a paromomicina vai progressivamente impedindo o fornecimento de energia através da cascata mitocondrial do processo respiratório.⁴³ Este processo e a inibição da dissociação das subunidades ribossomais⁴⁴, contribuem para a ação farmacológica da paromomicina.

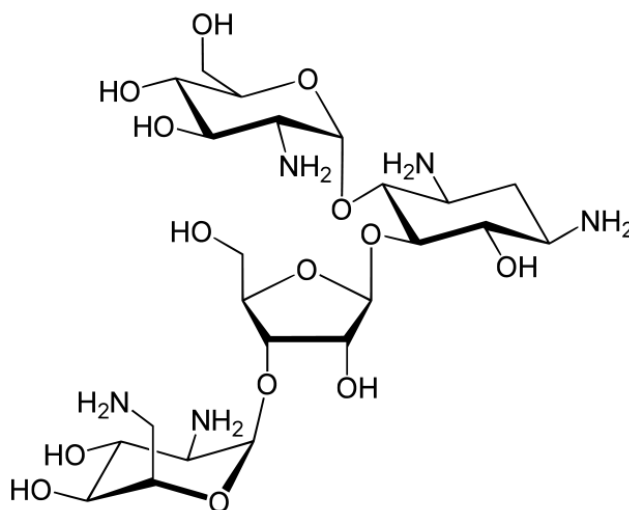


Figura I-8: Representação da estrutura química de paromomicina

1.2. Toxoplasmose

Toxoplasma gondii é um protozoário que infeta um terço da população mundial⁴⁵, sendo considerada uma das cinco Infecções Parasitárias Negligenciadas, que têm sido alvo de ação por parte do CDC.⁴⁶

A toxoplasmose é uma zoonose⁴⁷ considerada como uma das principais causas de morte atribuídas a doenças transmitidas por alimentos nos Estados Unidos da América.⁴⁶

Esta está presente em todos os países do mundo e a sua seropositividade varia de menos de 10% a mais de 90%.^{48,49} As taxas de infeção do protozoário são superiores em climas quentes e húmidos e a baixas altitudes.⁵⁰ Assim, verifica-se maior prevalência na América do Sul e em países do Médio Oriente, onde a situação económica também é bastante frágil.⁴⁹

O vasto número de pessoas imunocomprometidas, por VIH, transplantação de órgãos ou até por tratamentos com imunossuppressores, pode ser visto como um indicador propenso à reativação de agentes patogénicos como o *Toxoplasma gondii*.⁵¹

Normalmente, esta infeção é adquirida pela ingestão de alimentos ou água contaminados com oocistos ou pela ingestão de cistos em tecidos animais mal cozidos ou contidos em carne ingerida crua.^{45,52} A infeção pode também resultar do contacto direto com gatos infetados, através da ingestão de oocistos inicialmente presentes nas suas fezes.⁴⁸ A doença não é transmitida de pessoa-para-pessoa, salvo em casos de toxoplasmose congénita (mãe - filho), transfusão de sangue ou transplante de órgãos.⁵⁰

O diagnóstico de toxoplasmose é normalmente conseguido por serologia, embora os cistos possam ser analisados por biópsia. Em infeções congénitas, podem ser detetadas infeções através da análise de ADN de *T. gondii* no líquido amniótico.⁵³

Apesar da infeção aguda adquirida poder ser assintomática ou manifestar-se de forma semelhante a uma gripe, uma infeção primária em doentes imunocomprometidos ou a reativação de uma infeção crónica de toxoplasmose podem causar problemas graves, como linfadenopatias e doenças oculares.⁴⁵⁻⁴⁷

1.2.1. Manifestações clínicas

A expressão da doença está relacionada com o tamanho do inóculo, a virulência do organismo, a carga genética, o sexo, a idade⁵² e o estado imunológico⁵⁴, para além de fatores inerentes ao parasita, tais como o estadio infetante e a via de infeção.⁴⁵

Tendo em conta os vários fatores, verificam-se diferentes manifestações de toxoplasmose:

- Toxoplasmose adquirida aguda é a forma mais comum de toxoplasmose. Pode ser assintomática ou apresentar sintomas semelhantes a gripe, como febre, cefaleia, mialgias e mal-estar.⁴⁷
- Linfadenopatia é a sintomatologia mais reconhecida, podendo durar mais de seis meses.⁴⁷ O diagnóstico ocorre muitas vezes após biopsia por suspeita de linfoma, uma vez que se trata de uma hiperplasia folicular reativa.⁴⁵ Para além dos gânglios linfáticos aumentados, esta pode estar associada a febre, fadiga, dores musculares, e cefaleias.⁵⁵
- Toxoplasmose na gravidez. A infeção após conceção pode provocar algumas anomalias congénitas, como aumento ou diminuição do tamanho da cabeça.^{45,56} Esta situação é das mais graves na infeção por *Toxoplasma*.⁵⁷ Quando a infeção ocorre no início da gravidez o dano fetal é maior.⁵⁸ Para além de possibilidades de aborto, nado morto, ou a tríade clássica de toxoplasmose congénita (coriorretinite, hidrocefalia e calcificação intracerebral)^{45,47,56}, em 90% dos fetos infetados a infeção é assintomática ao nascimento, podendo ocorrer potencial perda de visão, deficiência mental e convulsões posteriormente, ao longo da vida.⁴⁷
- Coriorretinite resulta geralmente de uma infeção congénita reativada⁴⁸, mas também pode ocorrer por infeção após o nascimento. A doença no olho é provocada pela lesão inflamatória aguda da retina, provocando dor ocular, fotofobia, lacrimejamento e visão turva.⁵⁶ Ao longo do tempo, se as estruturas centrais da retina forem envolvidas pela infeção haverá perda progressiva de visão, levando a cegueira.⁵⁸

- Toxoplasmose em imunocomprometidos: após resolução de uma infecção aguda, os cistos estão presentes em vários tecidos, sendo a reativação da doença latente muito comum em situações de comprometimento do sistema imunitário, como é o caso de doenças como VIH, tratamentos com radio e quimioterapia e transplantes de órgãos.⁴⁷ Uma vez que os bradizoítos têm maior apetência para formar cistos no tecido neural, muscular e ocular, este estado de reativação pode causar encefalite⁴⁸, coriorretinite e miocardite.^{45,47,58}

1.2.2. O parasita: *Toxoplasma gondii*

A descoberta deste parasita ocorreu em 1908 mas foi em 1939 que Wolf, Cowen e Paige identificaram conclusivamente *T. gondii* como causa de doença humana.⁵⁹

Toxoplasma gondii é um protozoário ubíquo, pertencente ao filo *Apicomplexa*.⁶⁰ O seu ciclo de vida é facultativamente heteroxeno,⁵⁹ ou seja, possui hospedeiros definitivos e hospedeiros intermediários.

Este possui três formas infetantes: esporozoítos nos oocistos esporulados, bradizoítos contidos em cistos e taquizoítos. Também ocorre numa forma não infetante: merozoítos.⁶¹

Toxoplasma é um parasita intracelular obrigatório que ao longo do tempo desenvolveu a capacidade de invadir células do hospedeiro sem provocar a sua lise, evitando a ativação do sistema imunitário, permanecendo em latência e recorrendo aos nutrientes celulares do hospedeiro.⁶²

O ciclo sexuado do parasita ocorre apenas na família *Felidae*, que são os seus hospedeiros definitivos.⁶³

Através do seu ciclo de vida, representado na Figura I-9⁵³, é visível verificar que os felídeos infetados libertam oocistos não esporulados através das suas fezes.⁴⁵ Esta eliminação ocorre normalmente durante uma a duas semanas. Conclui-se que apenas as fezes dos hospedeiros definitivos são infeciosas e a propagação da doença através de outros hospedeiros só é possível através de cistos tecidulares.⁴⁷

Após os oocistos serem libertados no ambiente, as condições de pressão, temperatura e humidade permitem a esporulação, tornando-os infeciosos. Animais homeotérmicos, como ratos e pássaros, são infetados através do solo, água ou vegetais,⁵³ uma vez que os oocistos são formas parasitárias muito resistentes, que podem permanecer meses ou até anos dispersos no ambiente.⁵⁵

Após ingestão, os oocistos são rapidamente transformados em taquizoítos⁵³ que se vão alojar nos tecidos, maioritariamente nos tecidos neural e muscular, desenvolvendo cistos com bradizoítos.^{48,61}

Num hospedeiro definitivo, após ingestão, os taquizoítos invadem enterócitos e replicam-se.⁶⁴ Após cinco estágios de diferenciação ocorre a formação dos gâmetas.

Estes fundem-se e originam o ovo, que após segregar a parede cística dá origem ao oocisto não esporulado.⁶²

Num hospedeiro intermediário, os taquizoítos podem infectar e replicar-se em todas as células que contenham núcleo.⁴⁵ Estes aderem à célula do hospedeiro⁶⁵ e penetram-na, formando um vacúolo dentro do qual se dividem.⁶¹ A formação do vacúolo ocorre por invaginação da membrana celular, num processo mais rápido que a fagocitose e endocitose devido a microestruturas específicas existentes em organismos *Apicomplexa*.⁶⁶

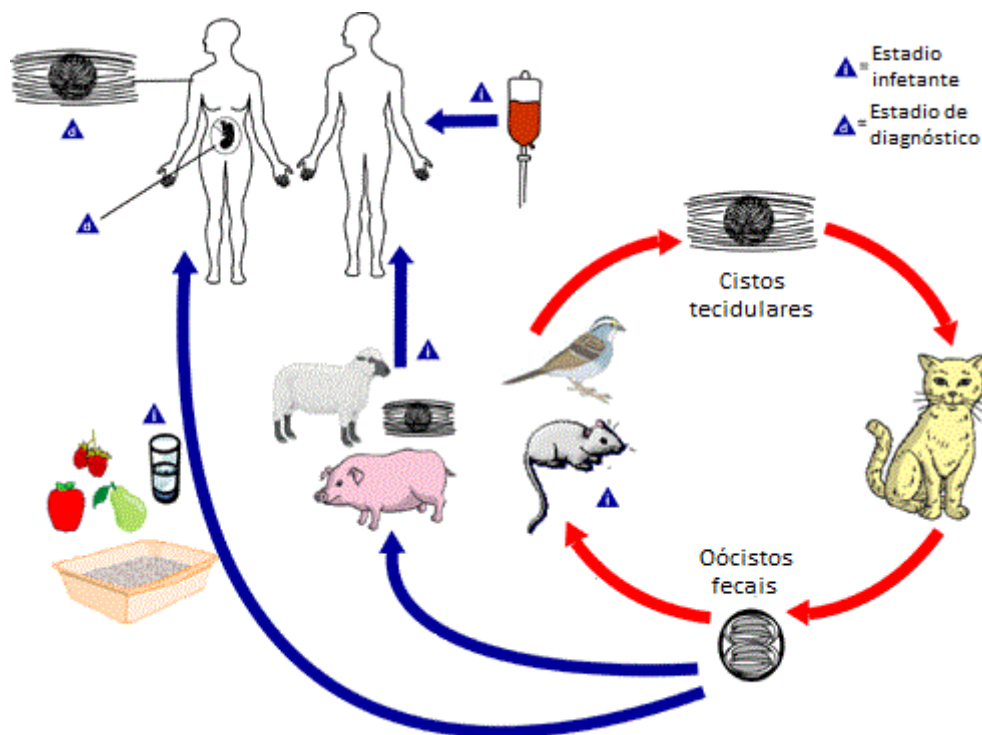


Figura I-9: Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*

Fonte: adaptado de CDC- Centers for Disease Control and Prevent

A replicação do parasita na forma de taquizoítos prossegue até à lise celular, infectando células adjacentes.⁶¹ Esta multiplicação rápida provoca respostas inflamatórias fortes, provocando as manifestações clínicas da doença. Para além disso a pressão inflamatória leva o parasita a diferenciar-se em bradizoítos, que são formas infetantes de divisão lenta.⁴⁵

Os bradizoítos permitem a permanência do parasita no hospedeiro por longos períodos, sendo a formação de cistos uma forma de fuga ao sistema imunológico.⁵⁸

No hospedeiro humano, os parasitas alojam-se comumente no músculo esquelético, miocárdio, cérebro e olhos, causando vários sintomas clínicos, incluindo encefalite, coriorretinite e mortalidade neonatal.⁵⁹

No caso de infecção primária em grávidas, o parasita passa pela placenta, permanecendo na circulação fetal. O risco de transmissão vertical é muito superior no último trimestre da gravidez.⁴⁵

1.2.3. Tratamento atual

A compreensão das principais vias de transmissão e das fontes mais prováveis de infecção é importante para o desenvolvimento de medidas de saúde pública eficazes para a prevenção e tratamento da toxoplasmose.

Como verificado anteriormente, a maioria das infecções agudas são assintomáticas e, portanto, não são tratadas. No entanto, quando há sintomatologia (como a infecção em pessoas imunocomprometidas ou grávidas) é da máxima importância tratar a toxoplasmose e prevenir a sua transmissão. O impedimento da progressão da doença ocular é outro objetivo importante do tratamento.

No desenvolvimento de agentes antimicrobianos eficazes contra os parasitas *Apicomplexa* o passo crítico é a chegada dos mesmos ao alvo. Para que consigam chegar ao alvo, os fármacos têm que atravessar células hospedeiras e o vacúolo parasitóforo para entrar nos parasitas e nos seus organelos especializados. Esta situação é provavelmente a meta mais difícil de alcançar para o *design* de novos fármacos contra a toxoplasmose, uma vez que os bradizoítos estão em cistos, o que dificulta ainda mais essa tarefa.⁶⁷

Na década de cinquenta, começaram a usar-se antimicrobianos para tratamento da toxoplasmose, tendo sido Coleman e Eyles a introduzir a pirimetamina e as sulfonamidas como terapias anti-toxoplasma.⁵⁸

Atualmente, as terapêuticas de primeira linha para o tratamento de toxoplasmose incluem pirimetamina, sulfadiazina e ácido folínico, por via oral, em terapia combinada. No entanto são também utilizados outros fármacos, como a clindamicina, a claritromicina, a azitromicina e a atovaquona.⁴⁷ Para grávidas recomenda-se a espiramicina (no primeiro e início do segundo trimestre de gravidez) ou pirimetamina / sulfadiazina no final de segundo e terceiro trimestres.⁴⁵ No caso de

lactentes potencialmente infetados, o tratamento é geralmente composto por pirimetamina, uma sulfonamida, e ácido fólico, no decorrer do primeiro ano.⁶⁸

Os fármacos usados são, maioritariamente, os referidos, mas as terapêuticas podem variar tendo em conta o grau da infeção e a capacidade imunológica da pessoa infetada. Assim, são usadas doses mais elevadas em situações agudas e tratamentos mais longos, evitando recaídas, em doentes imunocomprometidos.⁴⁷ Na doença ocular, para além dos fármacos de primeira linha, podem ser indicados corticosteroides, devido aos processos inflamatórios da mácula.⁶⁹ Em alguns países faz-se profilaxia da toxoplasmose através da utilização de cotrimoxazol ou dapsona, com pirimetamina e ácido fólico.⁴⁷

Tendo em conta a panóplia de agentes antimicrobianos que é possível usar no tratamento da toxoplasmose, poderia pensar-se que o controlo desta doença seria algo fácil de alcançar. Todavia, para além dos custos elevados destes fármacos e da falta de acessibilidade e segurança associadas ao seu uso em mulheres grávidas, a adesão à terapêutica também pode ser um problema, visto que os regimes terapêuticos podem obrigar o doente a tomar um número considerável de medicamentos por dia.⁶⁹

a. Pirimetamina

A pirimetamina, representada na Figura I-10, é um antibiótico amplamente utilizado no tratamento da toxoplasmose.⁵⁵

Este fármaco, um antimetabolito, interfere com a síntese de ácido fólico⁶⁹ através da inibição competitiva da enzima dihidrofolato redutase.⁷⁰ Este fármaco tem afinidade superior para a enzima do protozoário⁷¹, conferindo assim alguma seletividade ao tratamento. A sua utilização é mais eficaz na fase aguda da doença, ou seja, no processo de proliferação do parasita, uma vez que a necessidade de ácido fólico é superior.^{55,72}

A utilização de pirimetamina conduz ao aumento da concentração celular de dihidrofolatos não funcionais. A combinação com sulfonamidas, inibidores da síntese de dihidrofolato, permite inibir dois passos consecutivos da via de síntese do ácido fólico.^{70,71}

Durante o tratamento devem ser monitorizados alguns parâmetros sanguíneos, sendo a contagem de células sanguíneas e plaquetas procedimentos padrão. A utilização de pirimetamina provoca supressão da medula óssea e hematúria.⁷³ Para além disso, este fármaco é um antagonista da zidovudina, um antirretroviral usado no tratamento da SIDA. Assim, co-infetados com VIH em tratamento antirretroviral devem evitar este fármaco.⁶⁹

A pirimetamina também pode ser utilizada como profilaxia contra a toxoplasmose em transplante de órgãos.⁵⁸ A sua utilização durante a gravidez é possível, no entanto é categorizada como fármaco de categoria C. A sua combinação com ácido folínico, para o tratamento da toxoplasmose fetal durante o segundo e terceiro trimestre, é comum,⁷⁴ apesar de poder apresentar alguma teratogenicidade.⁷⁵

Segundo a OMS, a utilização de pirimetamina, combinada com outros fármacos, em crianças até um ano de idade⁷⁶, deve ser restrita a situações em que a relação benefício/risco é elevada. Este fármaco é excretado no leite materno, devendo ser usado com precaução em mulheres a amamentar. A segurança da pirimetamina em crianças também não foi cabalmente demonstrada. Porém, este fármaco faz parte da Lista Modelo da OMS de Medicamentos Essenciais para Crianças.⁶⁸ Outros efeitos secundários possíveis da utilização deste fármaco são erupções cutâneas, convulsões, febre, vômitos e diarreia.⁷³ Acresce que a crescente resistência microbiana é um problema a ter em conta na utilização deste tipo fármacos.

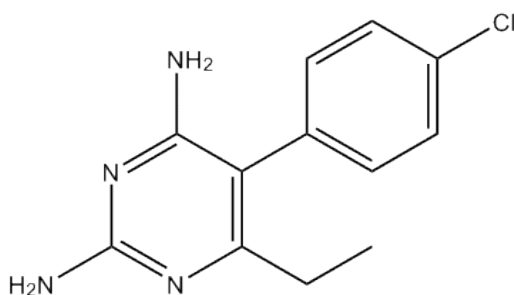


Figura I-10: Representação da estrutura química da Pirimetamina

b. Sulfadiazina

A sulfadiazina, representada na Figura I-11, é uma sulfonamida muito utilizada no tratamento da toxoplasmose, em combinação com a pirimetamina.^{55,70} A utilização

desta combinação permite a diminuição da dose efetiva, mitigando assim os efeitos secundários inerentes a essa terapêutica.⁷¹

Este fármaco atua como um antimetabolito (antifolato). Compete com o PABA (ácido para-aminobenzoico), impedindo a biossíntese de ácido fólico, importante para a síntese de precursores dos ácidos nucleicos.^{70,72} Ou seja, a utilização da sulfadiazina impede a formação de dihidrofolatos funcionais, cuja alta concentração contrariaria a eficácia da pirimetamina, uma vez que esta também atua por inibição competitiva.⁷¹

Apesar de também fazer parte da Lista Modelo da OMS de Medicamentos Essenciais para Crianças, a utilização em crianças até 2 meses de idade é contraindicada, exceto se utilizado no tratamento da toxoplasmose congênita.⁶⁸ Os principais efeitos secundários da sulfadiazina são a supressão da medula óssea, febre, erupções cutâneas, vasculite, nefropatia, vômitos e náuseas.⁷³

Os dados sobre a utilização de sulfadiazina em grávidas são limitados, sendo evitada a sua utilização após as 32 semanas de gestação. A OMS recomenda evitar a amamentação durante o tratamento com sulfadiazina, uma vez que esta é excretada pelo leite materno.⁶⁸

A possibilidade de a sulfadiazina causar reações alérgicas graves⁶⁹ aliada à sua toxicidade, levaram alguns clínicos a trocar a sulfadiazina pela dapsona.⁴⁷

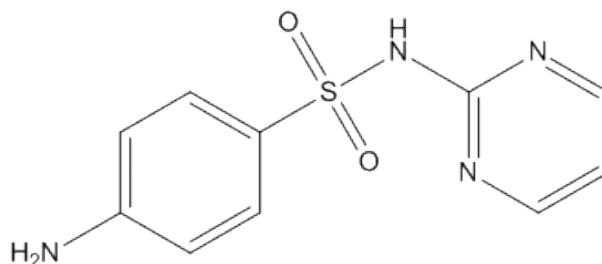


Figura I-11: Representação da estrutura química da Sulfadiazina

c. Ácido folínico

O ácido folínico, representado na figura I-12, é um derivado do ácido tetrahidrofólico, facilmente convertido no mesmo, o que permite ao fármaco intervir em vários processos metabólicos.⁷⁷ Para além de ter atividade vitamínica semelhante ao ácido fólico, a sua ação é independente da dihidrofolato-redutase, o que permite a sua ação de proteção da medula óssea, sem afetar a eficácia de fármacos que inibam a enzima.^{68,69}

O ácido folínico é usado para prevenir os efeitos tóxicos de altas doses de antimicrobianos inibidores da dihidrofolato-redutase, como o trimetoprim, a pirimetamina e sulfadiazina. No entanto, a sua utilização deve ser clinicamente bem estudada, uma vez que pode exercer um efeito antagonista da medicação anti-toxoplasma.⁷⁸

Os principais efeitos secundários da utilização de ácido folínico são a possibilidade de aparecimento de erupções cutâneas, eritemas e urticária, de provocar sibilos e trombocitose. Também pode ocorrer hipersensibilidade ao fármaco.⁷³

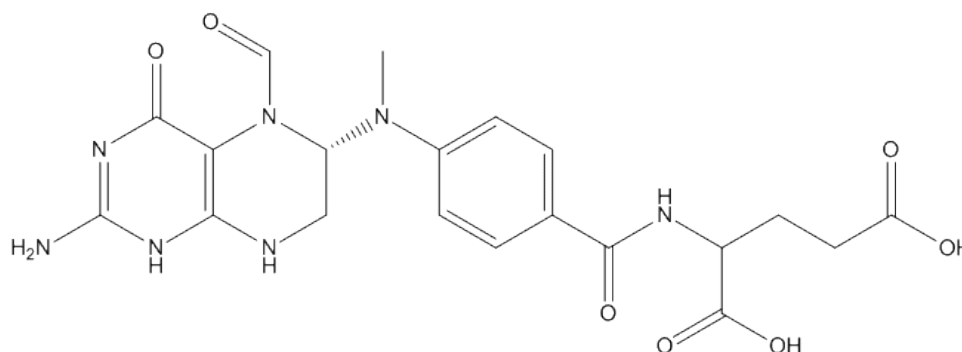


Figura I-12: Representação da estrutura química do ácido folínico.

d. Clindamicina

A clindamicina, representada na figura I-13, é um antibiótico muito usado como alternativa a sulfadiazina, em casos de evidências de toxicidade com sulfonamidas.⁴⁷ Assim, a clindamicina também é utilizada em combinação com a pirimetamina.⁶⁸

Em cerca de 40% dos casos de toxoplasmose, a combinação de pirimetamina e sulfadiazina com a adição de ácido folínico, usada como terapêutica de primeira linha, é interrompida devido a efeitos da toxicidade do tratamento. Normalmente, a toxicidade deve-se à sulfonamida, sendo esta substituída pela clindamicina.⁷⁰ Este fármaco é facilmente absorvido, alcançando concentrações intracelulares elevadas contra *T. gondii*.⁶⁹ A clindamicina é categorizada como de classe B na gravidez. É excretada pelo leite materno e a sua forma parentérica contém álcool benzílico, um composto que tem sido associado a uma síndrome fatal em prematuros.⁶⁸

No que respeita ao mecanismo de ação, pensa-se que a clindamicina é um antibiótico que altera a função ribossomal do protozoário, impedindo a síntese

proteica.^{70,79} No entanto, na literatura sugere-se outros organelos partilhados por organismos *Apicomplexa*, como possíveis alvos.⁷⁹

A colite pseudomembranosa e a supressão da medula óssea são alguns dos efeitos secundários da clindamicina, podendo também advir da sua utilização situações como hipotensão, arritmia cardíaca e erupções cutâneas.⁷³

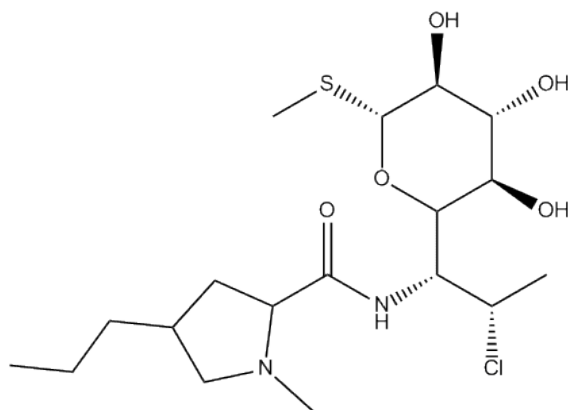


Figura I-13: Representação da estrutura química da Clindamicina

e. Espiramicina

A espiramicina é um bacteriostático do grupo dos macrólidos.⁷⁹ Os macrólidos são fármacos caracterizados pelo seu anel macrocíclico, sendo os mais importantes os que têm 14, 15 e 16 membros. A espiramicina tem 16 membros.⁸⁰

No que diz respeito à sua ação anti-toxoplasma, este fármaco, representado na figura I-14, é a alternativa ao tratamento de primeira linha durante a gravidez e em recém-nascidos,⁴⁷ uma vez que nem a sulfadiazina e nem a pirimetamina são recomendadas, exceto quando confirmada a infeção fetal.⁷⁹

Em geral, na Europa,⁷³ a espiramicina é recomendada para o primeiro e segundo trimestres da gravidez, sendo o tratamento padrão (pirimetamina / sulfadiazina e ácido fólico) usado no fim do segundo e terceiro trimestres, quando há infeção aguda fetal pelo *T. gondii*.⁶⁸

Tal como os outros fármacos com atividade anti-toxoplásmica, a espiramicina é ativa contra taquizoítos, através da ligação reversível com a subunidade 50S dos ribossomas, desestabilizando a sua ligação com os péptidos em processo de formação, através de um efeito estérico.^{79,81}

Uma vez que este fármaco se concentra no tecido placentário,⁷⁰ reduz a transmissão congênita de toxoplasmose. No entanto, caso o feto seja infetado, o tratamento com pirimetamina, sulfadiazina e ácido folínico é o mais recomendado.⁵⁸

Este fármaco não é embriotóxico ou teratogénico. No entanto pode conduzir a efeitos secundários como erupções cutâneas, colide pseudomembranosa, diarreia, náuseas, vômitos e parestesia (formigueiro).⁸²

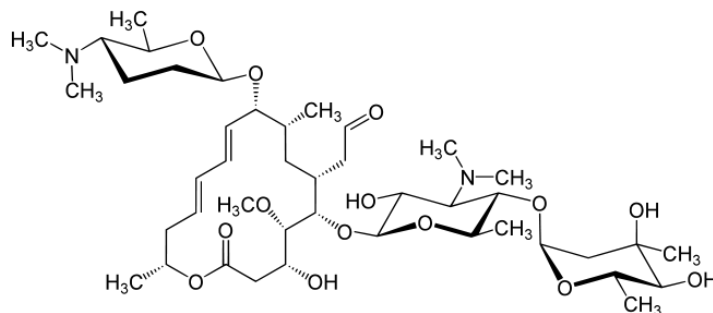


Figura I-14: Representação da estrutura química da Espiramicina

f. Sulfametoxazol + Trimetoprim

A combinação de trimetoprim com sulfametoxazol é uma alternativa à utilização de pirimetamina e sulfadiazina.⁶⁸

O mecanismo de ação desta combinação fixa de antibióticos é semelhante à combinação de pirimetamina e sulfadiazina, uma vez que interfere em dois passos da via de síntese do ácido tetra-hidrofólico. A sulfonamida (sulfametoxazol) impede a conversão do ácido para-aminobenzóico (PABA) em ácido fólico, e o trimetoprim impede a redução do dihidrofolato a tetrahidrofolato.^{70,83}

A afinidade da dihidrofolato-redutase do *Toxoplasma* pelo trimetoprim-sulfametoxazol não é tão elevada como pela pirimetamina, pelo que a sua eficácia é menor. Esta é a razão pela qual a combinação de trimetoprim com sulfametoxazol não é usada como terapêutica de primeira linha.⁷¹

Esta combinação de fármacos é categorizada na gravidez como classe C, pois atravessa a barreira placentária⁸⁴, e não deve ser usada durante a amamentação, uma vez que é excretada pelo leite materno. A utilização em crianças com menos de 2 meses de idade não é recomendada, principalmente em bebés prematuros ou com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase.⁶⁸ O trimetoprim-sulfametoxazol pode

ser utilizado como profilaxia contra a toxoplasmose em situações de transplante de órgãos.⁵⁸

Os principais efeitos secundários da utilização combinada destes dois fármacos, representados quimicamente na figura I-15, são a supressão da medula óssea, erupções cutâneas, hipotensão, febre, vômitos e náuseas.⁷³

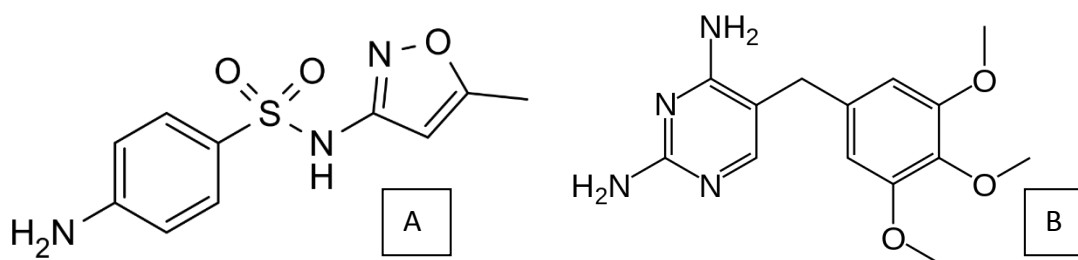


Figura I-15: Representação das estruturas químicas de Trimetoprim (A) e Sulfametoxazol (B)

g. Atovaquona e outros fármacos

A atovaquona é uma hidroxinaftoquinona, um análogo da ubiquinona protozoária, com uma potente atividade contra *Toxoplasma*.⁸⁵

A ubiquinona é uma proteína presente na membrana mitocondrial, importante para a cadeia transportadora de eletrões. A utilização da atovaquona, representada quimicamente na figura I-16, colapsa o potencial elétrico da membrana mitocondrial, uma vez que impede a ligação da ubiquinona com o citocromo bc₁.⁸⁶

A atovaquona impede o processo respiratório, o que implica imediatamente a inibição da formação de ATP. Para além disso, as enzimas da via metabólica de formação de pirimidinas para o ADN também são inibidas, levando à morte do parasita.^{70,87} A atovaquona, para além de ser eficaz contra taquizoítos, como as outras terapêuticas relatadas até agora, também é eficaz contra cistos tecidulares.^{51,79} Apesar de esta eficácia ser evidente em modelos animais, em humanos a resposta não é tão clara, verificando-se melhoras modestas no que respeita à toxoplasmose ocular, apenas quando as lesões são de pequenas dimensões.⁶⁹

A atovaquona é uma alternativa em pacientes com VIH,^{69,85} sendo muito útil no tratamento de infeções oculares e cerebrais.^{47,70} Os seus principais efeitos secundários são erupções maculopapulares cutâneas, náuseas, diarreia e dores de cabeça. Não

causa mielossupressão, o que é sem dúvida a sua grande mais-valia, para o tratamento em imunocomprometidos.⁸⁷

O grande problema relacionado com a utilização de atovaquona é a taxa de desenvolvimento de resistência ao fármaco, pelo parasita. A ação do fármaco é facilmente afetado por mutações no citocromo bc₁, baseadas na inserção de um resíduo mais volumoso na bolsa de ligação com a ubiquinona, aumentando o impedimento estérico. Isso impede a ligação com a atovaquona ou torna-a muito frágil.⁸⁶

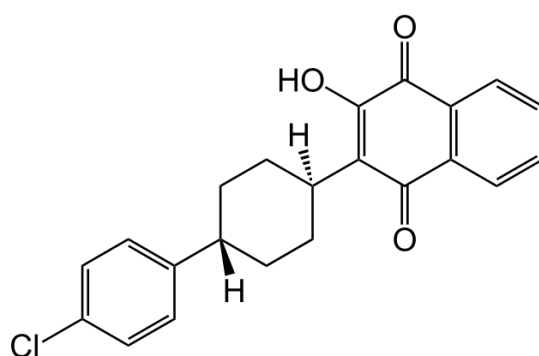


Figura I-16: Representação da estrutura química da Atovaquona

Para além dos fármacos referidos, o tratamento da toxoplasmose conta com outras classes de fármacos para aliviar os sintomas e minimizar os efeitos secundários da antibioterapia. Os corticosteroides são várias vezes prescritos para redução da sintomatologia da doença,^{45,68} como é o caso da administração intravítrea de dexametasona no tratamento adjuvante de toxoplasmose ocular.⁶⁹

A toxicidade dos medicamentos é um grande problema no tratamento da toxoplasmose, daí a importante tarefa de adequar o melhor antibiótico à situação e ao utente em causa, tendo em conta a sua situação em termos imunitários.⁴⁷

O incremento de opções terapêuticas é crucial, tanto para oferecer uma melhor qualidade de vida aos doentes como para colmatar a falha de alternativas terapêuticas, dado o crescimento exponencial de resistência aos antibióticos que se faz sentir a nível mundial.

II. Endoperóxidos

2.1. Artemisinina e derivados semissintéticos

A artemisinina é uma lactona sesquiterpénica, isolada no início da década de setenta do século passado a partir da planta chinesa *Artemisia annua*, também designada por *qinghaosu*.⁸⁸

Como se verifica pela representação estrutural da figura II-1, a artemisinina é um 1,2,4-trioxano tetracíclico que contém uma ponte de endoperóxido.⁸⁹ É um sólido inodoro, incolor e cristalino, com ponto de fusão 156 - 157 °C.⁹⁰ Desde cedo se pensou no endoperóxido da sua estrutura química como possível farmacóforo^{88,91}, no entanto, o grupo endoperóxido era à primeira vista demasiado reativo e, como tal, demasiado instável, pelo que adveio algum ceticismo científico em relação à ideia. Estudos posteriores demonstraram que esta molécula era bastante estável em condições fisiológicas e que o composto apresentava uma extraordinária atividade anti-malária, exibindo um ação rápida, segura e eficaz contra as estirpes multirresistentes.⁹²

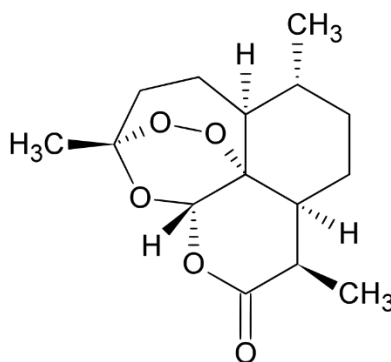


Figura II-1: Representação da estrutura química da Artemisinina

Embora eficaz, a artemisinina apresenta algumas desvantagens: semivida no plasma curta, biodisponibilidade limitada, fraca solubilidade, quer em óleo quer em água e taxa de recrudescência em doentes tratados não negligenciável.⁹³

O curto tempo de semivida deste fármaco e a taxa de recrudescência são alguns dos fatores que deixam antever a possível resistência a este tipo de fármacos, uma vez que os parasitas não são suscetíveis a concentrações sub-terapêuticas do fármaco. Dado que a evidência de resistência à artemisinina *in vivo* ainda está confinada à fronteira Tailândia-Camboja, a quimioterapia de combinação à base de

artemisinina é recomendado pela OMS, com vista a retardar a recrudescência da parasitose.⁹⁴⁻⁹⁶

A otimização de propriedades como a solubilidade e a atividade farmacológica da artemisinina conduziu ao desenvolvimento de alguns derivados, os quais se designaram como derivados de primeira geração. Estes têm uma estrutura semelhante, com modificações na posição C-10, e incluem fármacos como a dihidroartemisinina, o arteméter e o artesunato, representados nas figuras II-2, II-3 e II-4, respetivamente.⁸⁹

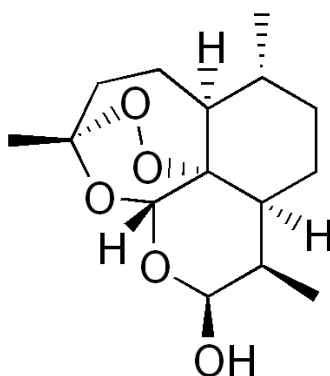


Figura II-2: Representação da estrutura química da Dihidroartemisinina

A dihidroartemisinina (DHA) pode ser obtida a partir da artemisinina, por redução com tetrahidroborato de sódio (NaBH_4), sendo muito mais potente que esta, *in vitro*.⁹³ Este composto é um metabolito ativo de todos os derivados da artemisinina. No entanto verificou-se que pode induzir neurotoxicidade em modelos animais.⁹³

De entre os derivados semissintéticos da artemisinina, os mais importantes são o arteméter e o artesunato. Em geral, os compostos mais lipofílicos são mais ativos do que os mais polares.⁹⁷

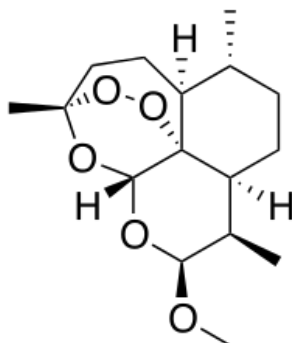


Figura II-3: Representação da estrutura química do Arteméter

O arteméter é um éter β -alquilado da dihidroartemisinina, desenvolvido para aumentar a solubilidade lipídica, o perfil farmacocinético e atividade anti malária,

relativamente ao fármaco precursor. Contudo, visto estes derivados serem metabolizados a DHA, apresentam alguma neurotoxicidade. Assim, o grande desafio tornou-se identificar estruturas de peroxídicas que combinem eficácia com propriedades biofarmacêuticas que assegurem uma boa absorção e biodisponibilidade oral e um bom perfil de segurança, tendo em conta os possíveis metabolitos.^{96,97}

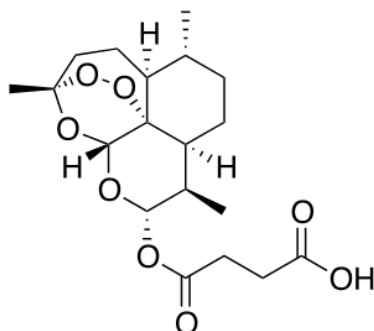


Figura II-4: Representação da estrutura química do Artesunato

O artesunato é um éster da DHA, solúvel em água, sendo rapidamente hidrolisado. A sua preparação deve ser extemporânea e deve ser administrado em dextrose ou soro fisiológico.⁷⁰

Do grupo de derivados de primeira geração, o ácido artelínico, representado na figura II-5, foi o que apresentou menor toxicidade. No entanto, a sua potência antiparasitária também é menor.⁹³

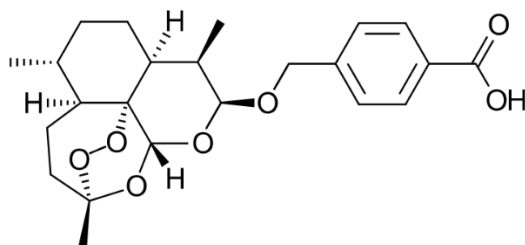


Figura II-5: Representação da estrutura química do Ácido artelínico

Com base nas evidências de que o grupo peróxido é o farmacóforo⁹³, a investigação de novos compostos focou-se no mecanismo de ação dos fármacos, de modo a potenciar a sua atividade, impedindo alterações moleculares desnecessárias. Uma das grandes observações feitas no decurso deste processo foi o facto do núcleo da artemisinina ser dispensável para a atividade antiparasitária⁹³, permitindo a conceção e síntese de estruturas peroxídicas muito mais simples.

2.1.1. Mecanismo de ação

A evolução dos derivados da artemisinina com boa atividade antiparasitária e boas características biofarmacêuticas foi marcada pela investigação do mecanismo de ação destes compostos, de modo a avaliar a relação estrutura-atividade dos mesmos, racionalizando a pesquisa e os recursos usados.

Apesar dos inúmeros trabalhos encontrados na literatura que denotam uma extensa pesquisa sobre o mecanismo de ação, este é, ainda hoje, um tópico de aceso debate, dada a sua complexidade.^{89,98,99}

Acredita-se que a atividade farmacológica dos derivados da artemisinina está dependente da ativação da ponte endoperóxido.⁸⁹ O mecanismo de ativação do endoperóxido é um dos aspetos em debate, havendo duas hipóteses principais: a cisão redutiva, em que há clivagem homolítica do peróxido, com transferência de um eletrão do Fe(II), formando radicais centrados em oxigénio que sofrem rearranjos originando radicais centrados em carbono^{100,101}; o modelo do peróxido aberto, em que o Fe(II) atua como um ácido de Lewis.¹⁰² O carbocatião formado é estabilizado pelo oxigénio que não faz parte da ligação peróxido, facilitando a abertura do anel.¹⁰³ Após reação com água, formam-se hidroperóxidos insaturados, espécies com elevada capacidade como oxidantes.¹⁰⁴

A fonte biológica de Fe(II) foi outro dos aspetos investigado pela comunidade científica, aceitando-se hoje que esta inclui Fe(II) livre, heme e hemoglobina.⁹⁸

Uma vez ativados, os endoperóxidos podem impedir múltiplas funções enzimáticas, incluindo as da via de desintoxicação do heme e as da proteína PfTCTP, uma ATPase do *Plasmodium falciparum* dependente de cálcio, presente na membrana do retículo endoplasmático e na mitocôndria, tal como foi verificado através dos trabalhos da equipa de Eckstein-Ludwig.⁹⁹

Alguns estudos têm também demonstrado que a artemisinina e seus derivados afetam respostas imunitárias através da supressão da síntese de óxido nítrico (NO). Estes estudos proporcionam evidência de que uma parte significativa do efeito da artemisinina também pode ser devido ao TNF.¹⁰¹

Todos estes fatores fazem com que muitas dúvidas acerca do mecanismo de ação desta classe de fármacos permaneçam por esclarecer.¹⁰⁵ À medida que o

conhecimento vai avançando, a complexidade do mecanismo vai sendo revelada, suscitando mais investigação.

2.2. 1,2,4-Trioxolanos

Apesar de todas as vantagens inerentes à utilização dos derivados da artemisinina, a sua utilização ainda é limitada pelo custo e disponibilidade, que acrescem a limitações farmacocinéticas, tal como acima referido.¹⁰⁶

A grande desvantagem de todos os compostos semissintéticos referidos é que a sua produção exige a artemisinina como ponto de partida. Como descrito, a artemisinina é extraída a partir da planta *Artemisia annua*. Essa extração tem baixo rendimento e requer uma produção significativa de culturas.¹⁰⁷

Com base no corpo de evidências de que o grupo peróxido é responsável pela ação antiparasitária, e de forma a contornar este problema, tem sido sintetizada e testada uma ampla gama de peróxidos sintéticos⁹³, entre os quais se enquadra o grupo dos trioxolanos.

A vantagem dos trioxolanos sintéticos sobre a artemisinina e derivados é a maior disponibilidade e menor custo. A síntese é relativamente simples e de rendimento superior, sendo a utilização destes compostos uma alternativa economicamente muito vantajosa em relação à artemisinina.¹⁰²

Os 1,2,4-trioxolanos, mais comumente conhecidos como ozonídeos secundários⁹⁷, têm um núcleo heterocíclico de 5 átomos que inclui a ponte endoperóxido, como se pode ver na Figura II-6. Estes compostos são intermediários na transformação de alcenos em compostos carbonílicos, durante a ozonólise.¹⁰⁸

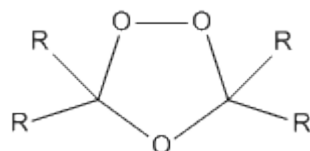


Figura II-6: Representação da estrutura química do núcleo de um 1,2,4-trioxolano

Alguns ozonídeos secundários, selecionados de uma vasta biblioteca com variabilidade estrutural apreciável, mostraram ser mais ativos que o artesunato e arteméter, além de apresentarem maiores tempos de semivida e melhor biodisponibilidade oral.¹⁰²

Estudos nesta área permitiram verificar que alterações estruturais em algumas posições conduzem a diferenças relevantes nas propriedades farmacológicas.¹⁰⁹ Os trioxolanos lipofílicos tendem a ter melhor biodisponibilidade oral do que os que têm grupos polares (tendo em conta o facto de tal fator também aumentar o possível efeito de primeira passagem), e os grupos funcionais neutros e básicos conduzem a bons perfis de atividade antimalárica.¹¹⁰ Para além disso, verificou-se que os derivados simetricamente substituídos eram significativamente menos ativos que os assimétricos.¹⁰⁸

Verificou-se que os trioxolanos sem o sistema espiro-adamantano não possuem atividade antimalárica, o que mostrou que este é essencial,^{97,108} contribuindo para a estabilidade do composto no plasma.¹⁰⁰ Conclui-se assim que, apesar de ser crucial para a atividade antiparasitária, o endoperóxido necessitava de substituintes específicos, como o anel de adamantilo e outro substituinte carbocíclico ou heterocíclico volumoso.

Tanto o grupo adamantilo como o substituinte carbocíclico são volumosos, promovendo o impedimento estérico. Tal diminui a reatividade do composto e impede a metabolização rápida do fármaco.

Foi assim encontrado o protótipo deste tipo de compostos: um derivado duplamente espirocíclico, em que o endoperóxido fica entre um grupo adamantano e um ciclohexano.¹¹¹

O grande problema dos trioxolanos é que apesar de apresentarem uma ação rápida e de baixa toxicidade, são algo limitados¹¹² em termos de absorção, semivida e biodisponibilidade.

Na sequência de trabalhos para otimização da estrutura do modelo, Vennerstrom *et al.* selecionaram o OZ277, também designado por arterolano. Este fármaco, representado na figura II-7, representou um avanço significativo, uma vez que exibiu uma ação mais prolongada do que os fármacos usados até à data (artesunato e arteméter).⁹³

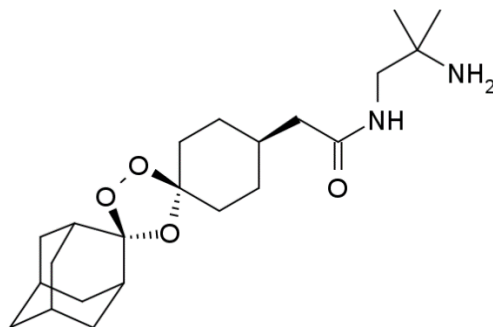


Figura II-7: Representação da estrutura química do Arterolano (OZ277)

A partir desse momento, o foco da investigação centrou-se na identificação de estratégias sintéticas para reduzir a metabolização do arterolano, aumentando o seu tempo de semivida, permitindo um tempo de exposição ao fármaco superior.¹¹³

Toxicologicamente, o arterolano apresenta baixos níveis de toxicidade mesmo a doses elevadas, sendo o fígado, sistema linfático e possivelmente os rins o alvo da sua toxicidade. Não se observaram sinais de neurotoxicidade nestes compostos, o que constitui uma enorme vantagem em relação aos derivados da artemisinina.¹¹⁴

O arterolano apresentou alguns problemas relacionados com estabilidade plasmática em doentes com malária durante a fase II dos ensaios clínicos. Contudo, foi aprovado para uso na Índia, desde Abril de 2012.¹⁰⁰

Foram identificados outros trioxolanos de estrutura similar ao arterolano, com substituintes com propriedades de base fraca (para protonação no vacúolo digestivo do parasita), com elevada eficácia antimalárica e com perfis de absorção, distribuição, metabolização e excreção (ADME) iguais ou superiores ao arterolano. Desses, o OZ439 está atualmente em fase II de ensaios clínicos, apresentando-se em todos os aspetos superior ao arterolano.^{96,113} Este composto é capaz de curar e prevenir infeções de *Plasmodium*, podendo ser usado como profilaxia.¹⁰⁰ O trioxolano OZ439 está representado na figura II-8.

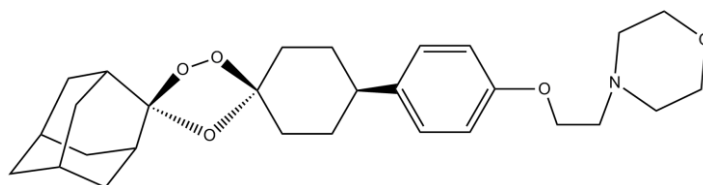


Figura II-8: Representação da estrutura química do OZ439

2.2.1. Preparação de trioxolanos com potencial atividade antiparasitária

No âmbito desta dissertação foi levado a cabo um trabalho de síntese de trioxolanos no grupo de Química Medicinal do CCMAR. Este trabalho insere-se num projeto do grupo que visa a conceção e síntese de bibliotecas de trioxolanos e tetraoxanos com estruturas otimizadas. Estes compostos são depois testados em linhas de parasitas protozoários que causam enfermidades em mamíferos, nomeadamente *Plasmodium falciparum*, *Leishmania infantum*, *Leishmania donovani*, e *Toxoplasma gondii*, e também em *Perkinsus olseni*, um parasita responsável por elevados índices de mortalidade em bivalves. O objetivo é avaliar a suscetibilidade dos vários modelos aos compostos sintetizados, extraíndo informação relativamente a relações estrutura – atividade para depois selecionar estruturas para otimização e desenvolvimento.

O trabalho de conceção e síntese realizado pela autora teve por base dados de estudos de relação estrutura-atividade (SAR) anteriormente obtidos para esta classe de ozonídeos, usando como modelo estirpes de *Plasmodium*, de onde se extraíram três aspetos cruciais: o grupo adamantilo e a ligação peróxido são cruciais para a atividade; uma maior lipofilia dos compostos permite maior biodisponibilidade; compostos neutros e básicos têm melhores perfis antimaláricos.⁹⁶ O interesse medicinal da síntese destes trioxolanos recai na sua possível atividade contra malária, leishmaniose e toxoplasmose.

A criação de uma biblioteca de compostos é fundamental para o desenvolvimento e otimização de fármacos. Apesar de muitos compostos não apresentarem atividade antiparasitária superior ao composto modelo ou de terem níveis de toxicidade inoportáveis, a sua síntese e avaliação poderão permitir o avanço de possíveis estruturas ou metodologias de síntese para outros compostos com valor terapêutico.

Com base nas pesquisas de Vennerstrom *et al.* e O'Neill *et al.* foram preparados alguns compostos partindo da adamantanona.¹¹⁵ Na generalidade, foram introduzidas variações estruturais nos substituintes do ciclohexilo. A introdução de diversidade química nos compostos permite a recolha de informação relativamente a efeitos estruturais na atividade antiparasitária e toxicidade.

As sínteses realizadas pela autora no âmbito deste trabalho estão descritas abaixo, apresentando-se o esquema reacional para cada caso. Os compostos preparados encontram-se identificados por um número, entre parêntesis.

Relativamente à estratégia de síntese convergente, usada na preparação dos compostos, o primeiro passo é a síntese da metil-oxima (1), por reação da 2-adamantanona com hidrocloreto de metoxilamina na presença de piridina.

Procede-se depois ao acoplamento da metil-oxima intermédia (1) com 1,4-ciclohexanodiona, por ozonólise, obtendo o trioxolano (2). Usando a mesma estratégia, procedeu-se ao acoplamento de (1) com 4-oxociclohexil-etil-éster para obter o trioxolano (3).

Partindo do composto (3), por redução do grupo éster usando tetrahidroborato de lítio, obtém-se o trioxolano (4), com o grupo álcool.

O grupo álcool foi depois substituído por um grupo ftalamida, numa reação exotérmica, na presença de DIAD (Dilsopropil-Azo-Dicarboxilato) e trifetilfosfina. O trioxolano obtido (5) foi depois usado como composto de partida para a síntese do trioxolano com um grupo amina (6).

A formação de um derivado ácido carboxílico (7) também foi uma das fases desta via de síntese, em que se partiu do composto (3).

A reação de cloreto de sacarina (8) com o trioxolano (4) permitiu a obtenção de um dos compostos alvo deste projeto, o trioxolano (9). Usando a mesma linha de pensamento, partiu-se do derivado amina (6) para formação do trioxolano correspondente (10).

O acoplamento de derivado álcool (4) com 5-cloro-1-feniltetrazole permitiu a preparação de um novo composto, o trioxolano (11).

a. Síntese da adamantil-metil-Oxima (1)

Na figura II-9 está representada a reação de conversão da adamantanona na adamantil-metil-oxima (1). Esta reação é crucial para toda a via de síntese, uma vez que a metil-oxima passa a ser o composto base para todas as reações seguintes de formação do núcleo de trioxolano.

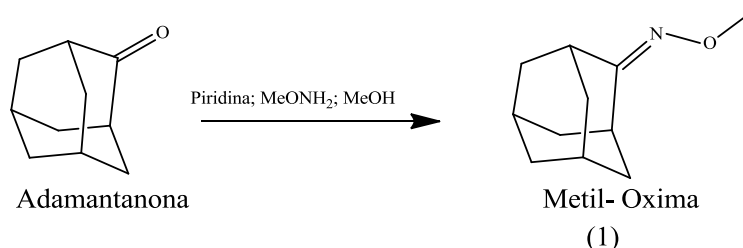


Figura II-9: Representação da reação de conversão da adamantanona na sua metil-oxima.

A proposta mecanística para a formação da metil-oxima está representada na figura II-10.

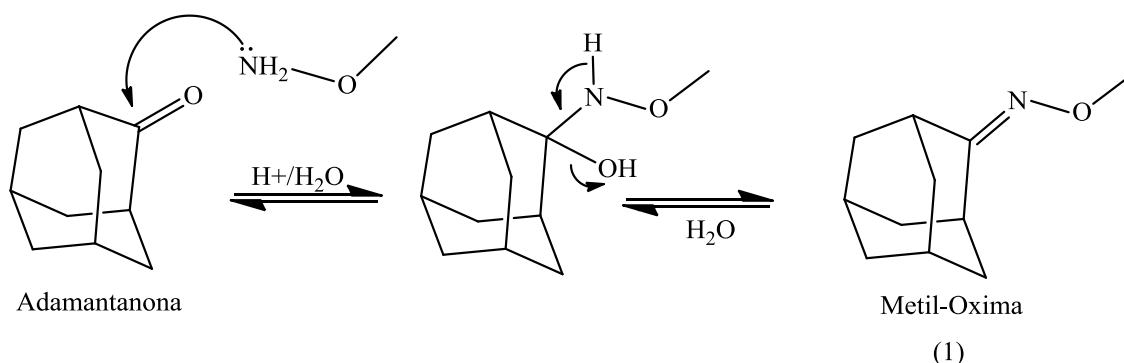


Figura II-10: Proposta de mecanismo de reação de síntese da metil-oxima (1)

No que diz respeito ao procedimento experimental, a 2-adamantanona (9.0 g, 5.99×10^{-2} mol) adicionou-se a metanol seco (50 mL), sob agitação. A piridina (8,78 g, 11.1×10^{-2} mol) e o hidrocloreto de metoxilamina (7.51 g, 8.99×10^{-2} mol), foram de seguida adicionados, muito lentamente.

A mistura permaneceu sob agitação, durante 46 horas. O progresso da reação foi controlado por TLC (cromatografia em camada fina), usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (3:7).

Quando a análise por TLC indicou o término da reação, evaporou-se o solvente e extraiu-se o composto orgânico com DCM (50 mL). A fase orgânica foi tratada com uma solução de HCl 1M e posteriormente com uma solução saturada de NaCl. Secou-se o extrato orgânico com sulfato de magnésio anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente.

Foi obtido um pó amarelado correspondente ao produto desejado (10.157 g, $5,67 \times 10^{-2}$ mol, 94%). O seu intervalo de fusão era de 69^o-70^oC, lit. 70^o-71^oC¹¹⁵; ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 3.80 (s, 3H), 3.45 (s, 1H), 2.53 (s, 1H), 1.97-1.78 (m, 12H) ppm; MS (EI) m/z 180 [M]⁺.

b. Ozonólise: síntese do trioxolano (2)

Na figura II-11 está representada a reação de conversão da metil-oxima (1) no trioxolano (2).

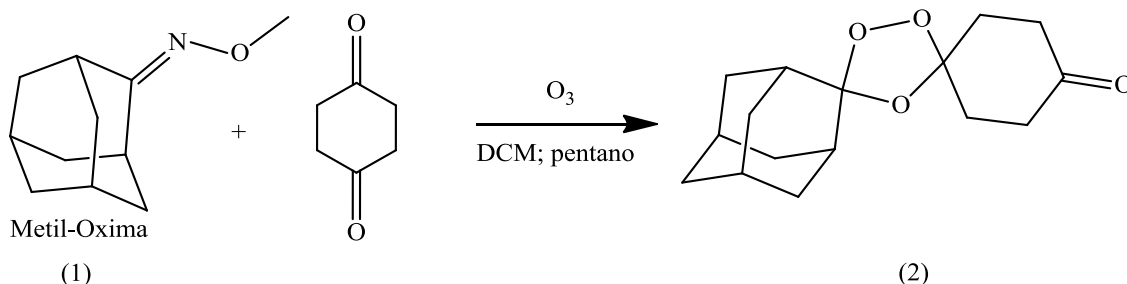


Figura II-11: Representação da reação de conversão da metil-oxima (1) no trioxolano (2)

O sistema de ozonólise é um sistema fechado, sendo da máxima importância manter um ambiente anidro. Todo o sistema é saturado com ozono antes se dar início à reação.

Dissolve-se a adamantil-metiloxima (1) (7.89g, $4,4 \times 10^{-2}$ mol) e a 1,4-dioxo-cicloexano (5.0 g, $4,46 \times 10^{-2}$ mol) numa mistura de DCM e pentano (2:3) em agitação, num banho a 0°C. Esta solução foi submetida a um fluxo de ozono, durante cerca de 2 horas. O progresso da reação foi controlado por TLC, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (1:9). Evaporou-se o solvente e purificou-se o produto, através da técnica de cromatografia em coluna, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (0.3:9.7). Recolheram-se 2 frações, sendo a segunda a correspondente ao produto, um pó branco (4.85 g, $1,74 \times 10^{-2}$ mol, 39%).

O esquema da proposta do mecanismo está apresentado na figura II-12.

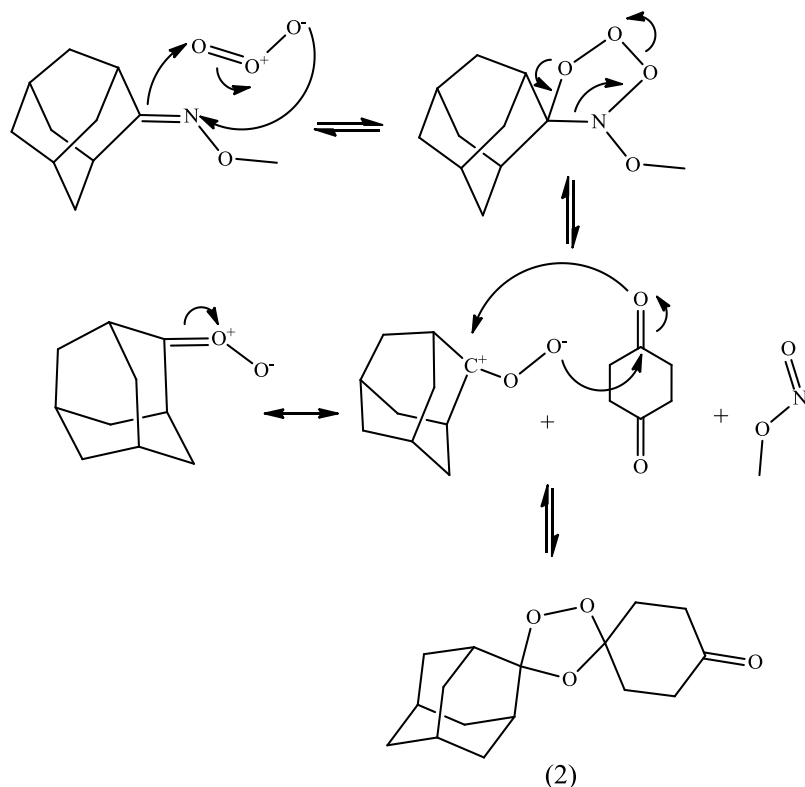


Figura II-12: Representação da proposta do mecanismo de síntese do trioxolano (2)

O trioxolano (2) apresenta um ponto de fusão de 127-128°C; lit: 126-128°C¹¹⁵
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 2.51 (t, J=7.0 Hz, 4H), 2.14 (t, J=7.0 Hz, 4H), 1.69-2.14 (m, 14H) ppm; MS (EI) m/z 278.9 [M]⁺.

c. Ozonólise: síntese do trioxolano (3)

Na figura II-13 está representada a reação de conversão da metil-oxima no trioxolano (3).

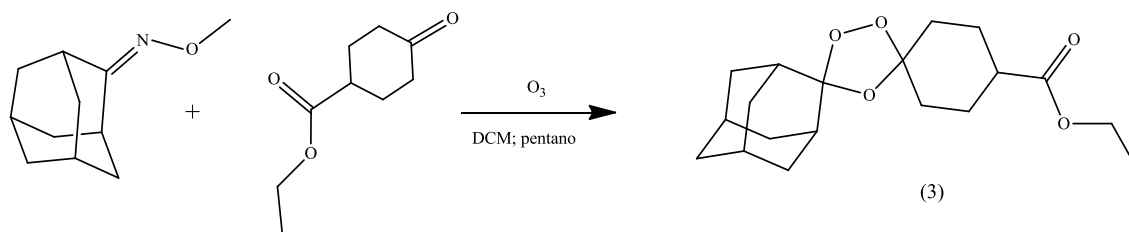


Figura II-13: Representação da reação de conversão da metil-oxima (1) no trioxolano (3)

O procedimento laboratorial seguido nesta síntese é bastante semelhante ao detalhado acima para preparação do composto (2). Dissolveu-se adamantil-metiloxima (1) (7.89 g, 4.4 x10⁻² mol) e 4-oxociclohexil-etil-éster (6.0 g, 3.53 x10⁻² mol) numa

mistura de DCM e pentano (1:4) e colocou-se a mistura de reação em agitação, num banho a 0°C. A solução foi submetida a um fluxo de ozono, durante cerca de 2 horas. O progresso da reação foi controlado por TLC, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (1:9). Evaporou-se o solvente e purificou-se o produto, recorrendo a uma cromatografia em coluna, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (0.1:9.9). Recolheram-se 2 frações: a primeira correspondente ao reagente, 4-oxociclohexil-etil-éster, e a segunda correspondente ao produto desejado. O composto (3) foi obtido como um óleo viscoso, esbranquiçado (5.59 g, 1.66×10^{-2} mol, 37.7%).

O esquema da proposta do seu mecanismo está apresentado na figura II-14.

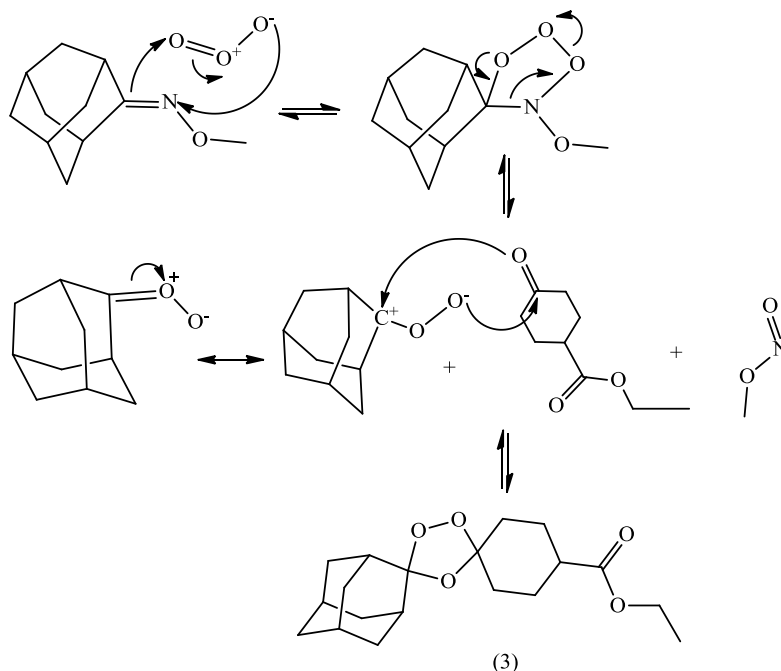


Figura II-14: Proposta de mecanismo de reação da síntese do trioxolano (3)

O trioxolano (3) foi caracterizado por: ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 4.15 (dd, $J=7.2$ Hz, $J=14.3$ Hz, 2H), 2.33 (m, 1H), 2.03-1.92 (m, 12H), 1.76-1.70 (m, 11H), 1.26 (t, $J=6.9$ Hz, 3H) ppm; MS (EI) m/z $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 359$.

d. Redução do éster: síntese do trioxolano (4)

Na figura II-15 está representada a conversão do grupo éster do trioxolano (3) em álcool, originando o ozonídeo (4).

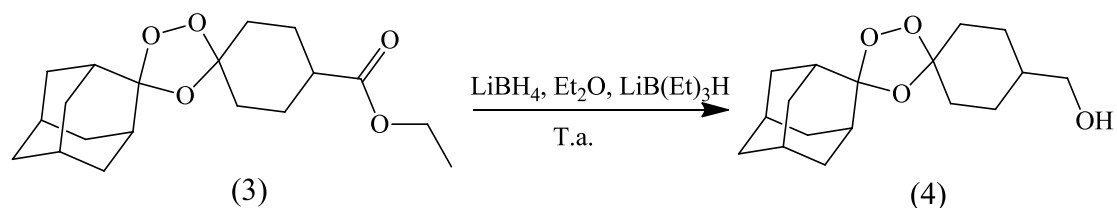


Figura II-15: Representação da reação de conversão do trioxolano (3) em trioxolano (4)

Para se proceder à síntese deste composto, dissolve-se o tetrahidroborato de Lítio (3.96 g, 0,182 mol) e o trietil-hidroborato de lítio (0,95 g, 9×10^{-3} mol) em éter seco. A reação deve permanecer à temperatura ambiente, sob atmosfera anidra, e em agitação. A reação foi controlada por TLC, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (2:8). A mistura reacional esteve nestas condições durante 22 horas, sendo adicionado mais éter, para posterior lavagem com NaOH 3 M (duas vezes), água (duas vezes) e solução aquosa saturada de NaCl. A fase orgânica deve ser seca com sulfato de magnésio, com posterior filtração e evaporação do solvente.

O esquema da proposta de mecanismo está representado na figura II-16.

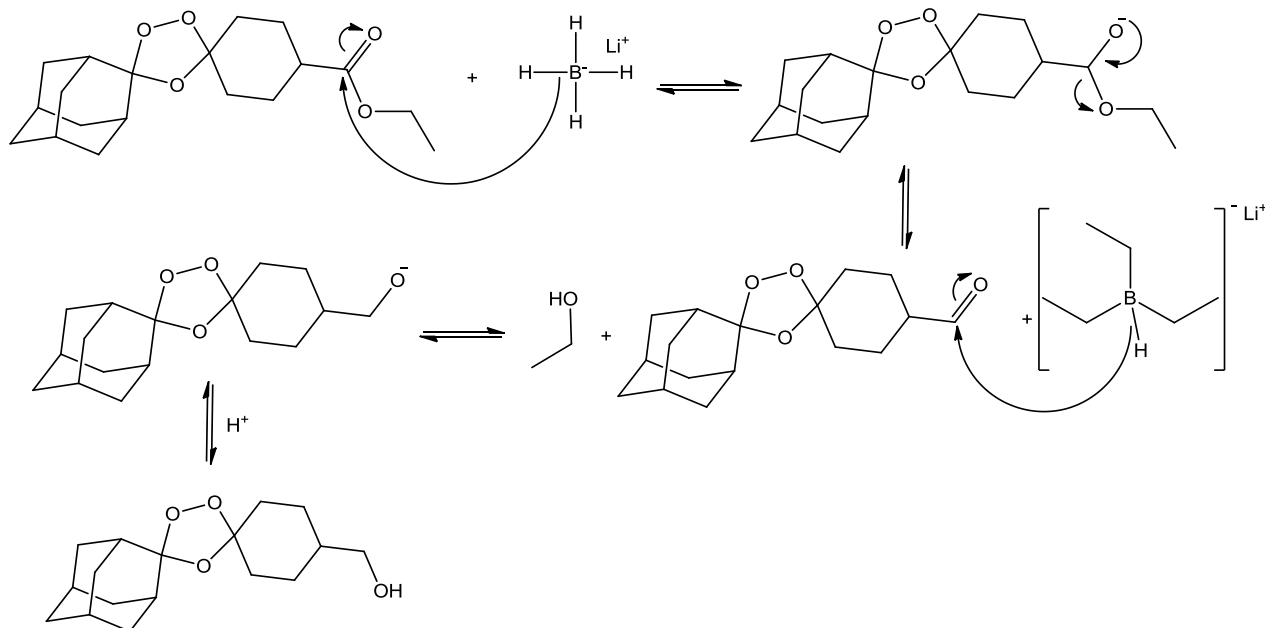


Figura II-16: Representação da proposta de mecanismo de reação da síntese do trioxolano (4)

O composto (4) é um sólido branco (3.10 g, 1.05×10^{-2} mol, 89%), com um ponto de fusão de 99-100°C, lit. 97-99°C¹¹⁵. O trioxolano (4) foi caracterizado por: ¹H - RMN (400MHz, CDCl₃): δ 3.46 (t, J=4.8 Hz, 2H), 2.08-1.51 (m, 21H), 1.25 (m, 2H) ppm; MS (EI) m/z [M+ Na]⁺ = 318.

e. Síntese do trioxolano com um grupo ftalamida, composto (5)

Na figura II-17 está representada a reação de conversão do ozonídeo (4) em (5).

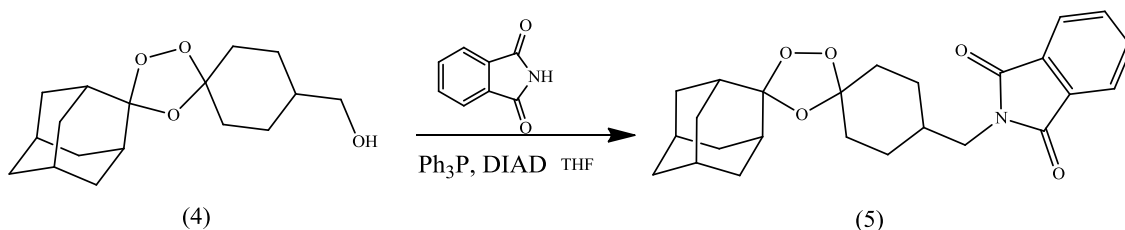


Figura II-17: Representação da reação de conversão do trioxolano (4) em trioxolano (5)

A síntese de (5) tem como composto de partida o álcool (4). O composto (4) (2.6 g, 8.83×10^{-3} mol) é dissolvido em THF seco (25 ml), num balão sob agitação, num banho a 0°C. De seguida é adicionada trifenilfosfina (3.55 g, 1.35×10^{-2} mol) e ftalamida (1.66 g, 1.13×10^{-2} mol). Lentamente, é adicionado DIAD (3.27 g, 1.62×10^{-2} mol).

A reação deve ser controlada por TLC, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (3:7). A reação durou 19 horas e 30 minutos. O produto desejado foi purificado por cromatografia em coluna, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (0.5:9.5).

O esquema da proposta do seu mecanismo está apresentado na figura II-18.

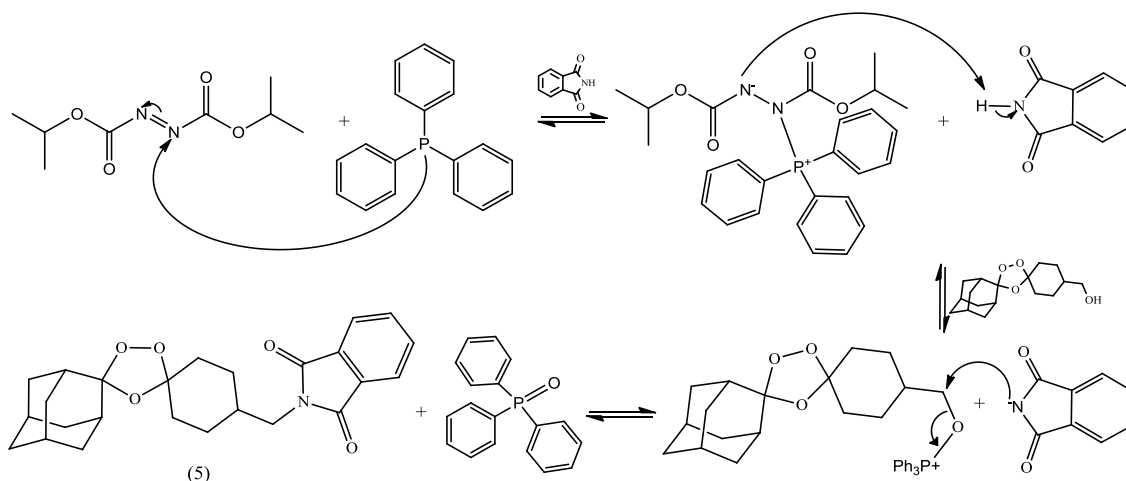


Figura II-18: Representação da proposta do mecanismo da reação de síntese do trioxolano (5)

O composto (5) é um sólido branco (2.31 g, 5.45×10^{-3} mol, 62%), apresentando um ponto de fusão de 130-133°C; lit. 140-142°. O trioxolano (5) foi caracterizado por: ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 7.84 (m, 2H), 7.71 (m, 2H), 3.55 (d, $J=7.0$ Hz, 2H), 2.08-1.51(m, 21H), 1.34-1.30 (m, 2H) ppm; MS (EI) m/z $[\text{M} + \text{K}]^+ = 462$.

f. Síntese do trioxolano com grupo amina (6)

A figura II-19 representa a conversão do trioxolano (5) no trioxolano (6).

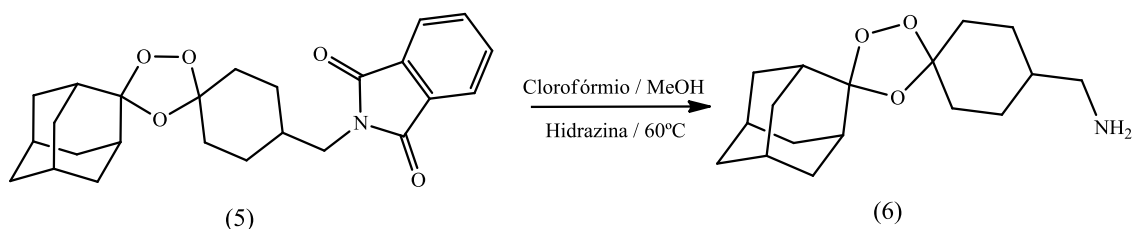


Figura II-19: Representação da reação de conversão do trioxolano (5) em trioxolano (6)

Esta reação utiliza uma metodologia semelhante à Síntese de Gabriel, em que é obtida uma amina primária a partir de haletos, via preparação de um derivado de ftalimida. O procedimento de síntese deste composto inicia-se pela dissolução do trioxolano (5) (1.23g, 2.91×10^{-3} mol) e da hidrazina (0.56g, 1.74×10^{-2} mol) numa mistura de clorofórmio e metanol (7:3). A mistura reacional permaneceu em agitação, num banho a 60°C, durante cerca de 72 horas. Uma vez que o subproduto (ftalazina-1,4-diona) precipita, tem que se filtrar e evaporar o solvente.

A proposta do mecanismo da reação está representada na figura II-20.

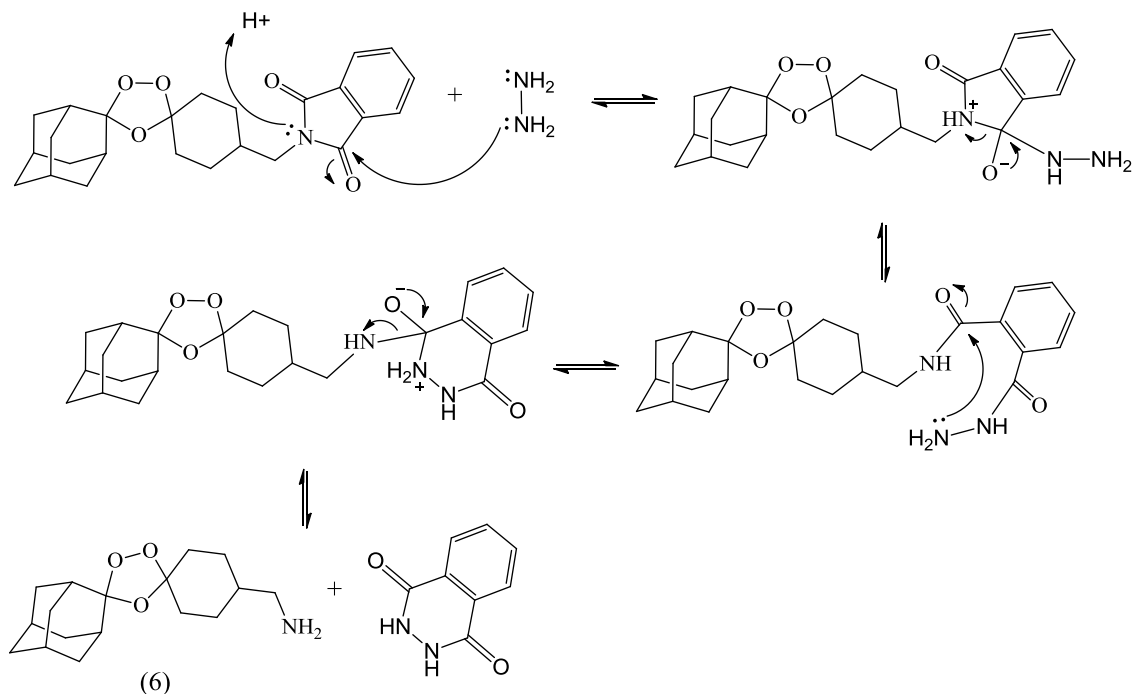


Figura II-20: Representação da proposta do mecanismo da reação de síntese do trioxolano (6)

O composto (6) foi obtido como um óleo viscoso amarelo (0.58 g, 1.98×10^{-3} mol, 68%). O trioxolano (6) foi caracterizado por: ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 2.54 (d,

J=6.4 Hz, 2H), 1.96-1.68 (m, 22H), 1.33-1.14 (m, 3H) ppm; MS (MALDI-TOF) m/z 293 [M]⁺.

g. Hidrólise do éster: síntese do trioxolano (7)

Na figura II-21 está representada a conversão do trioxolano (3) em trioxolano (7).

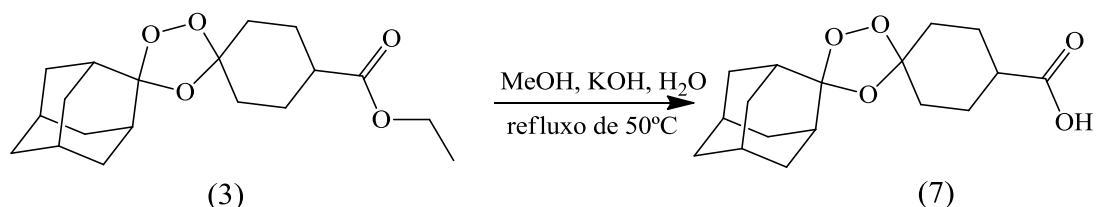


Figura II-21: Representação da hidrólise do grupo éster, formando um ácido carboxílico (7)

Num balão, sob agitação e a 50°C adicionou-se o trioxolano (3) (1.3g, 3.9 x10⁻³ mol) e o KOH (0.76g) dissolvido em água (4.6 ml). Deixou-se reagir durante um dia e controlou-se a reação por TLC, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (2:8). Retirou-se do banho, de modo a permitir o arrefecimento da reação. Acidificou-se a mistura reacional com HCl concentrado (1.92 ml) a fim de permitir a protonação do ácido, como é visível na proposta mecanística representada na figura II-22. A acidificação deve ser feita à temperatura ambiente, ou em banho de gelo, uma vez que a reação é exotérmica.

Os passos de purificação do composto envolveram uma extração por solventes, lavando a mistura reacional aquosa com DCM (3 vezes). Extraído o composto para a fase orgânica, secou-se com Sulfato de Magnésio e filtrou-se. Posteriormente, purificou-se o produto recorrendo-se a uma cromatografia em coluna de sílica gel, usando hexano e acetato de etilo (8,5:1,5) como mistura de eluição. Recolheram-se duas frações, sendo a segunda correspondente ao produto desejado.

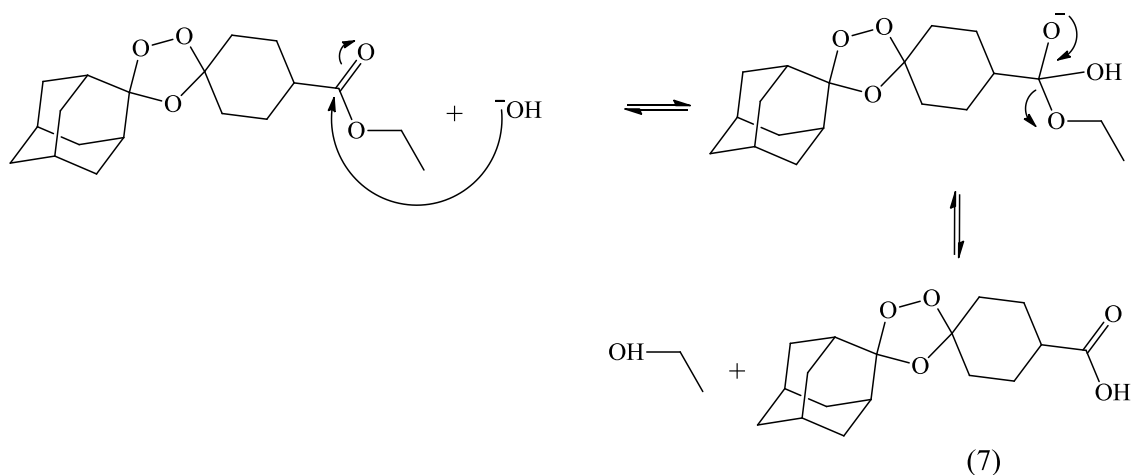


Figura II-22: Representação da proposta do mecanismo da reação de síntese do trioxolano (7)

O composto (7) é um sólido branco (0.77 g, 2.59×10^{-3} mol, 66%), com um intervalo de fusão de 156-158°C, lit. 158-159°C¹¹⁵. O trioxolano (7) foi caracterizado por: ¹H -RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 2.30 (m, 1H), 1.94-1.61 (m, 19H), 1.26-1.19 (m, 3H) ppm; MS (EI) m/z 308 [M]⁻.

h. Síntese de cloreto de sacarina (8) e do composto-alvo (9)

A sacarina é um composto relativamente barato e que pode constituir um bom grupo substituinte para ajuste de propriedades farmacológicas, uma vez que não foi relatada toxicidade no Homem. Esta é bastante usada na indústria alimentar, e por isso seria uma boa aposta.

Na figura II-23 está representada a reação de síntese do cloreto de sacarina, que teve por base a análise da literatura disponível de forma a otimizar todo o processo de síntese.¹¹⁶

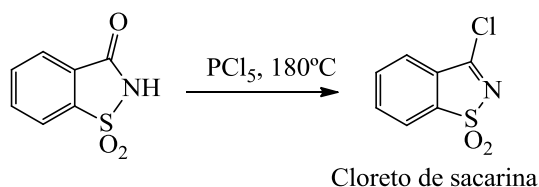


Figura II-23: Representação da reação da conversão de Sacarina em Cloreto de Sacarina (8)

Aqueceu-se sacarina (21g, 0.114 mol) e PCl₅ (26g, 0.126 mol) num balão a 180°C, em refluxo, durante três horas. Após reação é necessário evaporar o excesso de PCl₅ e OPCl₃ por destilação, a 180°C. O restante deve arrefecer até à temperatura ambiente, de modo a cristalizar. Os cristais devem ser filtrados sob pressão e lavados

com tolueno gelado. O tolueno gelado vai promover a recristalização de cloreto de sacarina no filtrado.

A proposta de mecanismo desta reação está representada na figura II-24.

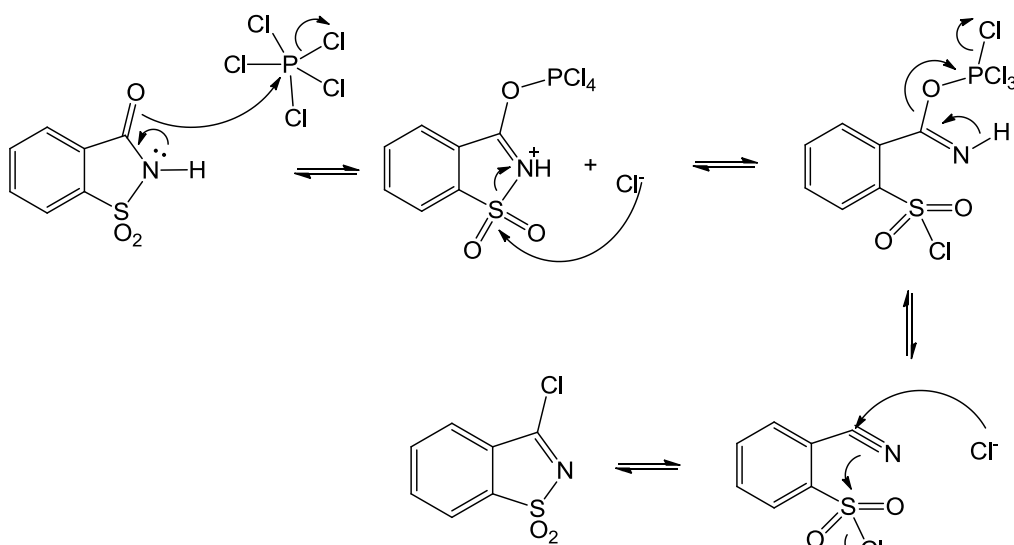


Figura II-24: Representação da proposta do mecanismo da reação de síntese do composto (8)

O cloreto de sacarina (8) tem a forma de cristais em agulha, incolor, esbranquiçados (5.29 g, 2.63×10^{-2} mol, 23%). Intervalo de fusão: 146- 147°C; lit. 143-145°C¹¹⁶. Também foi caracterizado por: ¹H -RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7.94 (m, 2H), 7.84 (m, 2H) ppm.

O cloreto de sacarina foi sintetizado com o intuito de obter o trioxolano (9) através de uma substituição nucleofílica.

Na figura II-25 está representada a reação de síntese do trioxolano (9).

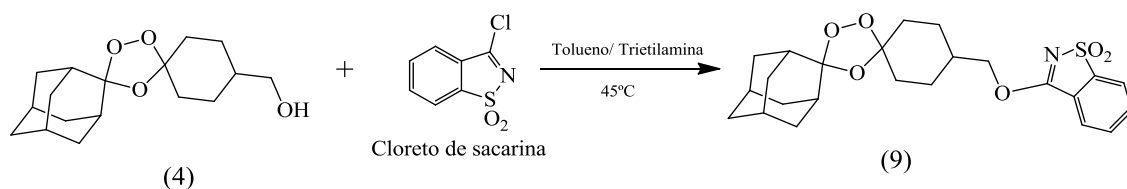


Figura II-25: Representação da reação da síntese do trioxolano (9)

Na prática, a reação inicia-se pela dissolução do álcool (4) (0.4g, 1.36×10^{-3} mol) em tolueno (20 ml), seguido de adição do cloreto de sacarina (8) (0.25g, 1.25×10^{-3} mol), num balão em agitação, num banho a 45°C. Passado 5 minutos, deve adicionar-se a trietilamina (0.25g, 2.5×10^{-3} mol).

A reação que inicialmente era incolor passa a uma coloração alaranjada. Esta deve ser mantida durante pelo menos 24 horas, até que todo o álcool seja consumido, o que é visível por TLC, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (3:7). Ao final da reação retira-se do banho e filtra-se, uma vez que o hidrocloreto de trietilaminônio precipita. A recristalização com tolueno gelado permite a obtenção do composto puro.

De acordo com a proposta mecanística esquematizada na figura II-26, ocorre um ataque nucleofílico do átomo de oxigénio ao carbono. Forma-se um intermediário zwitteriônico, carregado positivamente no oxigénio e com uma carga negativa deslocalizada para o grupo SO₂.

De seguida, há a remoção de um protão por parte da trietilamina, desencadeando um movimento concertado de eletrões pelo anel heteroaromático que culmina com a eliminação do Cl⁻ (grupo abandonante). A formação do precipitado de hidrocloreto de trietilamónio no decorrer da reação, desloca o processo no sentido da formação do trioxolano desejado.¹¹⁷

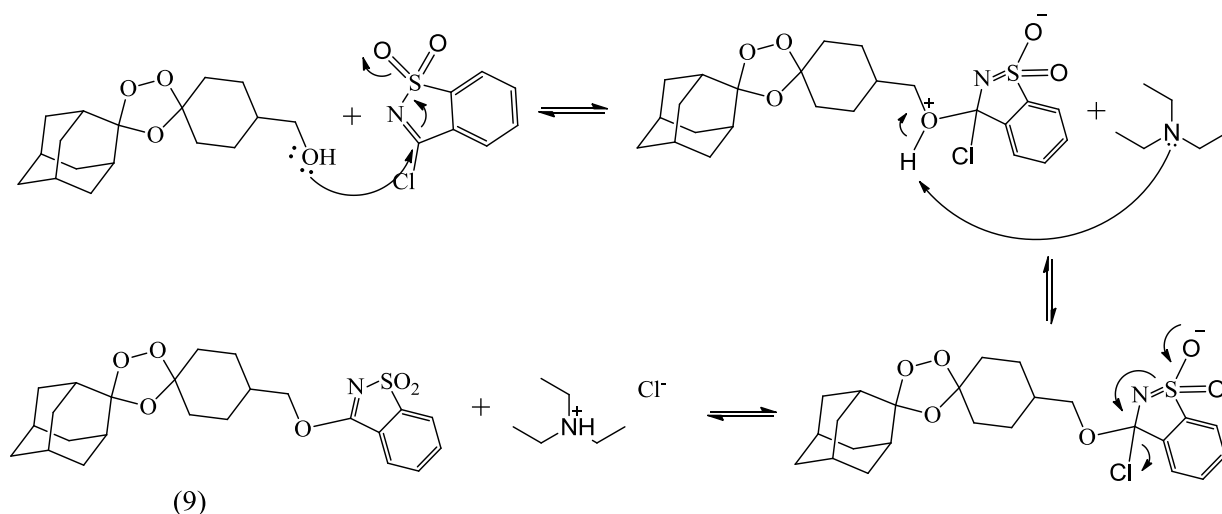


Figura II-26: Representação da proposta do mecanismo da reação de síntese do composto (9)

O trioxolano (9) foi obtido sob a forma de cristais amarelados (0.232g, 5.05×10^{-4} mol, 37%), com um intervalo de fusão de 150-151°C. Também foi caracterizado por: ¹H - RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7.91 (d, J=7.4 Hz, 1H), 7.78 (d, J=7.6 Hz, 2H), 7.74 (d, J=6.7 Hz, 1H), 4.45 (d, J=6.1 Hz, 2H), 2.05- 1.71 (m, 21H), 1.59- 1.44 (m, 2H) ppm; MS (EI) m/z [M + Na]⁺ = 482.

i. Síntese do composto-alvo (10)

O trioxolano (10) foi obtido por uma metodologia semelhante à usada para preparação do correspondente trioxolano (9), sendo o composto de partida o derivado amina (6) em vez do álcool (4). Na figura II-27 está representada a reação de síntese do trioxolano (10).

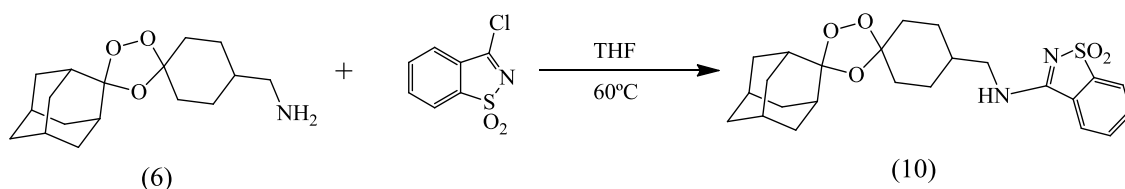


Figura II-27: Representação da síntese do trioxolano (10)

Dissolveu-se o cloreto de sacarina, em 10 ml de THF, a 60°C. Noutro balão, dissolveu-se o ozonídeo (6) (0.5g, 1.7×10^{-3} mol) em THF (10 ml) e juntou-se à solução do cloreto de sacarina. Durante os primeiros 15 minutos verifica-se a formação de precipitado, em forma de pó muito fino. A reação foi controlada por cromatografia em camada fina, com um eluente composto por acetato de etilo e hexano (4:6). A reação demorou cerca de 2 dias. No fim, purificou-se o produto através de extração por solventes, uma vez que o precipitado eram impurezas solúvel em água. A recristalização do composto (10) ocorreu em etanol.

A proposta do mecanismo desta síntese está esquematizado na figura II-28.

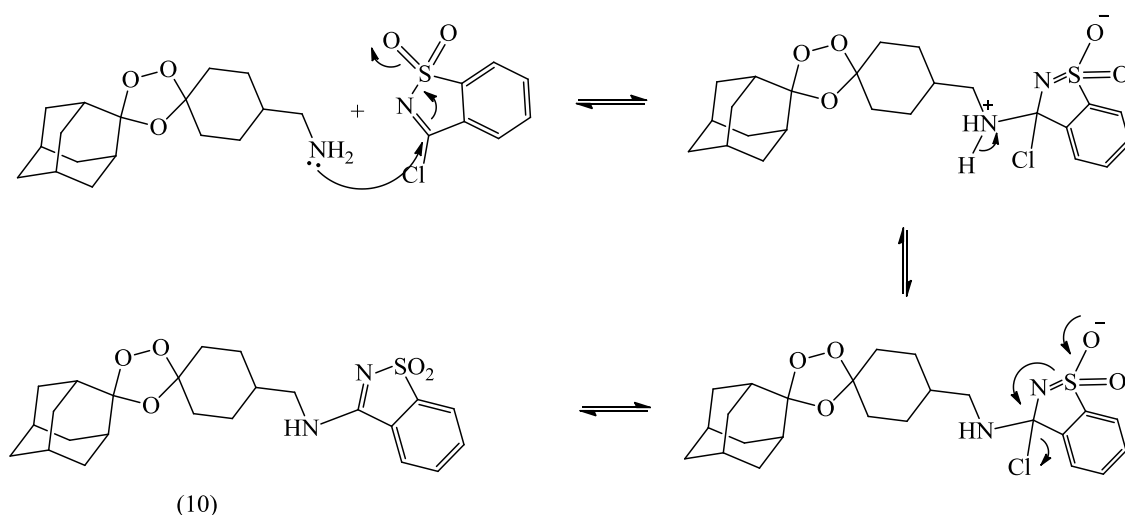


Figura II-28: Representação da proposta do mecanismo da reação de síntese do composto (10)

O trioxolano (10) foi obtido na forma de cristais alaranjados (0.115g , 2.51×10^{-4} mol, 15%). No que respeita ao seu intervalo de fusão é de 152-154°C. Também foi caracterizado por: ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 7.89 (d, $J=7.3$ Hz, 1H), 7.75 (dd, $J=7.9$

Hz, J= 16.2 Hz, 2H), 7.68 (d, J=6.8 Hz, 1H), 3.43 (s, 2H), 2.0- 1.65 (m, 22H), 1.30- 1.21 (m, 2H) ppm. MS (MALDI-TOF): m/z [M + Na]⁺ = 481.

j. Síntese do composto-alvo (11)

Na figura II-29 está representada a reação de síntese do trioxolano (11).

A utilização de um derivado do 5-feniltetrazole pareceu ser a escolha mais acertada, uma vez que o grupo fenilo aumenta a lipofilia do composto e o grupo tetrazole é biologicamente relevante para o aumento da atividade antiparasitária.¹¹⁸ Pensa-se que tal efeito poderá estar relacionado com a sua boa capacidade quelante de metais iónicos (ferro)¹¹⁹.

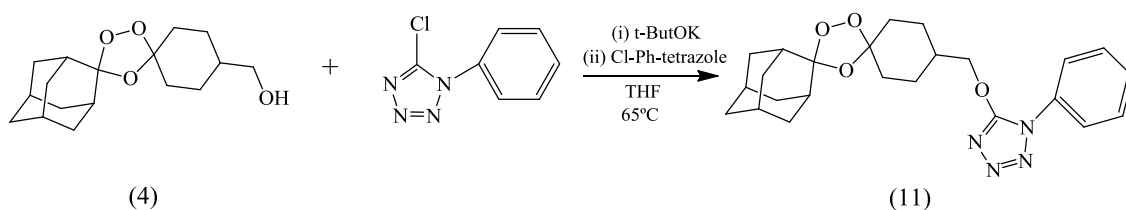


Figura II-29: Representação da reação de conversão do trioxolano (4) no trioxolano (11)

A síntese do composto (11) iniciou-se pela dissolução do álcool (4) (0.5g, 1.7×10^{-3} mol) em THF seco, num ambiente anidro, sob agitação. Após dissolução adicionou-se tert-butóxido de potássio (0.76 g, 6.8×10^{-3} mol). A ativação do álcool deve ser feita durante cerca de 4 horas. Posteriormente, adiciona-se 5-cloro-1-feniltetrazol (0.48g, 2.65×10^{-3} mol) e colocou-se a mistura reacional num banho a 65°C, em refluxo.

A reação foi controlada por TLC com um eluente composto por acetato de etilo e hexano (3:7). No fim da reação, após evaporação do solvente o produto cristalizou em DCM/ etanol (1:9).

A proposta mecanística da reação supracitada encontra-se na figura II-30.

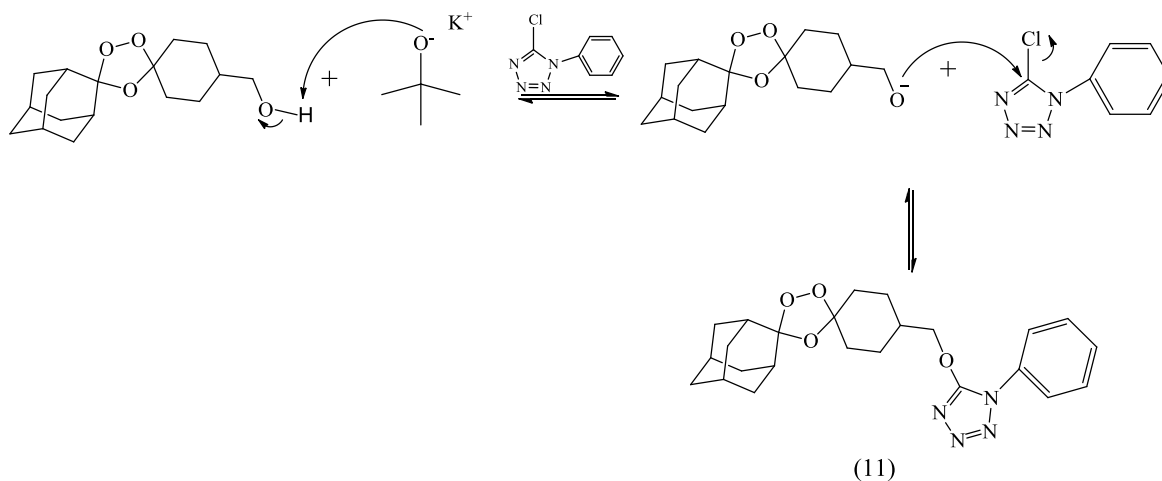


Figura II-30: Representação da proposta do mecanismo da reação de síntese do composto (11)

O tert-butóxido de potássio é uma base mais forte que o KOH, permitindo a desprotonação do álcool. O impedimento estérico impede que o tert-butóxido interfira na reação de substituição.

O composto (11) foi obtido como um sólido alaranjado (0.24g, 5.48×10^{-4} mol, 32%). O seu intervalo de fusão é de: 82-84°C e foi caracterizado por ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 7.73 (d, 2H, $J=7.7\text{Hz}$), 7.57 (t, 2H, $J=7.7\text{Hz}$), 7.48 (t, 1H, $J=7.3\text{Hz}$), 4.50 (d, 2H, $J=6.5\text{Hz}$), 2.01 (d, 7H, $J=11.3\text{Hz}$), 1.71-1.86 (m, 13H), 1.39-1.46 (m, 2H), 1.27 (s, 1H). ppm; MS (EI) m/z 438 $[\text{M}]^+$.

2.3. Atividade dos trioxolanos em *Leishmania donovani* e *Toxoplasma gondii*

A artemisinina e seus derivados e os peróxidos sintéticos têm demonstrado eficácia contra alguns parasitas protozoários, nomeadamente algumas espécies de *Plasmodium*^{95,99,120} e de *Perkinsus*.¹⁰²

Tendo por base estudos realizados por *Yang et al.*, no início da década de 90¹²¹, *Avery et al.* sugeriu a utilização da artemisinina e análogos contra a leishmaniose, abrindo a possibilidade de projeção e desenvolvimento de compostos com atividade antimalárica e também leishmanicida.¹²²

Recentemente, *Chollet et al.* estudaram a atividade leishmanicida de fluoro-artemisininas, verificando atividade, em concentrações micromolares, em promastigotas de *L. donovani*. Nesses estudos também ficou evidente a importância do grupo peróxido, uma vez que os testes com 1-desoxiartemisinina não mostraram qualquer atividade leishmanicida.¹²³

Tal como a maioria dos parasitas protozoários, a *Leishmania* requer Fe(II) para o seu crescimento em todas as fases do seu ciclo de vida. Tendo isso em mente, estudos permitiram verificar a eficácia apoptótica do arteméter em promastigotas de *L. major*, bem como a sua capacidade em inibir o crescimento de formas promastigotas e amastigotas *in vitro*.¹²⁴

Relativamente ao pH, o ambiente intra-eritrócito (*Plasmodium*) é semelhante ao intra-macrófago (*Leishmania*) sendo que a inativação dos fármacos por pH seria semelhante nos dois tipos de protozoários. No entanto, verificou-se que a potência leishmanicida de compostos com boa capacidade antimalárica é sempre menor do que contra *Plasmodium*.¹²³

Para além da atividade contra *Plasmodium* e *Leishmania*, os derivados semissintéticos e sintéticos da artemisinina mostram atividade anti protozoária contra *Schistosoma*, *Trypanosoma* e *Toxoplasma*.^{125,126} A maioria dos testes e dos trabalhos publicados restringem-se aos derivados semissintéticos usualmente utilizados como fármacos contra a malária (arteméter e artesunato).¹¹²

Recentemente, a descoberta de um plasto de *Toxoplasma gondii* e *P. falciparum* abriu novas possibilidades quanto ao modo de ação de determinados fármacos antiparasitários.¹²⁷ Apesar de já estar disponível informação importante

acerca dos mecanismos de ação da artemisinina e derivados¹²⁸ no *Plasmodium*, pouco se sabe sobre a natureza dos seus efeitos em *T. gondii*. No entanto, a presença da ligação endoperóxido como farmacóforo permanece como ponto basilar da sua ação intracelular.^{129,130}

Foram testadas deoxiartemisininas em taquizoítos de *Toxoplasma* e verificou-se que apesar de não bloquearem a sua replicação, estas inibiam, de forma moderada, a invasão das células hospedeiras pelos taquizoítos.¹²⁵ O arteéter é um composto lipofílico, capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, tornando-se por isso tentadora a sua utilização no tratamento da toxoplasmose congénita ou em doentes imunocomprometidos, em que o envolvimento do sistema nervoso central é um dos maiores problemas. Apesar da sua neurotoxicidade, foram realizados alguns testes em *T. gondii*, que revelaram alguma atividade, embora menor que a exibida contra *P.falciparum*.¹³¹

Da análise de vários estudos presentes na literatura pode concluir-se que, tal como ocorre na leishmaniose, na toxoplasmose as concentrações inibitórias (IC₅₀) deste tipo de fármacos são superiores às exibidas na malária.⁸⁴

O efeito de análogos de artemisinina sobre o crescimento de parasitas pertencentes ao género *Toxoplasma*, relatado por *Jones-Brando et al.*¹¹² e *Ou-Yang et al.*¹²⁶ sublinha a ideia de que a artemisinina pode ser um ponto de partida promissor para o desenvolvimento de medicamentos contra infeções parasitárias em geral.⁹³

III. Testes *in vitro* de suscetibilidade a fármacos

Com base em estudos da relação estrutura-atividade, muitos grupos de pesquisa têm desenhado e sintetizado endoperóxidos sintéticos. Embora alguns análogos mostrem resultados *in vitro* promissores, os seus resultados *in vivo*, muitas vezes não são tão bons quanto o esperado.¹⁰⁹

A avaliação *in vitro* facilita a análise rápida de um grande número de fármacos, no entanto, a sua eficácia resume-se a compostos com ação letal direta sobre o parasita. Quando os compostos são eficazes através dos seus metabolitos, ou a sua ação é mediada pelo sistema imunitário do hospedeiro, os testes *in vitro* não são os mais adequados.¹³²

Apesar desta desvantagem, os testes *in vitro* apresentam inúmeras vantagens, como a diminuta quantidade de composto-teste necessária, a rápida obtenção de resultados e a consistência desses resultados, uma vez que não há tantas interferências como *in vivo*.¹³³

Assim sendo, podemos ver os testes *in vitro* como o primeiro filtro das moléculas, naquele que é o processo da descoberta de um fármaco. Das centenas de compostos sintetizados que são testados *in vitro*, uma pequena parte passa para testes *in vivo* e, destes, um ou dois é selecionado para ensaios clínicos.

3.1. Como se processam?

Os pontos basilares dos testes de suscetibilidade a fármacos *in vitro* são essencialmente: a linhagem de células alvo, neste caso dos parasitas; o fármaco proposto; e os controlos da análise.

Em 1986, *Croft* delineou que os requisitos para um ensaio *in vitro* incluem o uso do estadio do parasita no mamífero, uma população parasitária em multiplicação, e a utilização de medidas quantificáveis e reprodutíveis da atividade dos fármacos teste e padrão em concentrações alcançáveis no soro/tecidos.¹³³

Independentemente do protozoário (plasmódio, leishmania ou toxoplasma) é muito importante que a fase do ciclo de vida seja bem estudada e devidamente identificada, uma vez que tal fator pode influenciar toda a análise.

3.1.1. Testes *in vitro* em *Leishmania*

Na leishmaniose, seria de esperar maior facilidade em testes com promastigotas, sendo estes estadios extracelulares. No entanto, a melhor relação entre testes *in vitro* e os resultados *in vivo* verifica-se na fase amastigota. Estes amastigotas são mantidos *in vitro* como amastigotas axénicos e/ou em cultura de macrófagos.¹³³

Testes realizados com uma estirpe de *Leishmania donovani* (MHOM / ET / 67 / L82), permitiu verificar que, em geral, os promastigotas são estadios menos sensíveis a fármacos de referência, à exceção da anfotericina B e miltefosina, pois estes fármacos afetam a integridade das membranas. Conclui-se assim que não é possível verificar a validação cruzada de testes em diferentes estadios do parasita.¹³⁴

Assim sendo, os testes em *Leishmania* devem ser realizados em promastigotas, amastigotas axénicos e amastigotas intracelulares.¹³⁵

Os testes em promastigotas são os mais simples: os promastigotas multiplicam-se em meio acelular, sendo posteriormente diluídos a uma determinada concentração. Nessa diluição são adicionados os compostos em fase de teste, os fármacos de referência ou uma solução isenta de fármaco. Três dias depois, os organismos da placa de controlo ter-se-ão multiplicado entre 3 a 6 vezes mais do que nas outras placas. Apesar de serem muito fáceis e baratos de realizar, estes testes apresentam problemas, como o facto de não ser o estadio alvo do parasita e de os promastigotas se multiplicarem a temperaturas inferiores à temperatura corporal dos mamíferos.¹³³

Os testes *in vitro* ideais para avaliar a suscetibilidade de um protozoário a um fármaco são os que simulam da melhor forma o ambiente encontrado *in vivo*. Na *Leishmania* tal ocorre com a utilização de amastigotas.¹³⁶

Os testes podem decorrer em amastigotas intracelulares ou em amastigotas axénicos (sem células no meio). Os modelos mais usados são os amastigotas intracelulares, recolhidos através de macrófagos animais (ratos) ou macrófagos humanos. Nestes testes, os macrófagos diferenciados não se dividem, e por isso facilmente se deteta a taxa de divisão do parasita em células hospedeiras e a atividade do fármaco. A atividade do fármaco é medida por técnicas de contagem microscópica de células ou por métodos colorimétricos ou fluorométricos.

Para além da lenta divisão de amastigotas de *L. donovani* e *L. infantum* neste modelo, a utilização da técnica de contagem de células pode ser vista como uma limitação deste modelo, pois aumenta o tempo e a mão-de-obra necessária para o teste.¹³⁷

O modelo de testes com amastigotas axénicos conjuga o melhor dos dois sistemas supracitados: o teste é dirigido contra a fase relevante do parasita, são mais fáceis de manipular e a quantificação da atividade do fármaco é mais simples e menos dispendiosa.¹³⁸

A atividade do fármaco pode ser analisada com vários métodos: contagem de células, avaliação da viabilidade da população celular (MTT ou MTS), determinação da atividade da ornitina descarboxilase (alterações de pH), utilização de nucleótidos radioativos, entre outros.¹³⁹

A utilização de protocolos baseados no mecanismo de redução do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolium), tem como base técnicas colorimétricas, uma vez que a mudança de cor (absorvência da solução) permite avaliar a viabilidade mitocondrial da população e por conseguinte a eficácia ou não do fármaco em questão.¹⁴⁰

A capacidade de codificar proteínas transgênicas em protozoários, tais como as proteínas GFP (Green Fluorescent Proteins), RFP (Red Fluorescent Proteins)¹³⁵ ou a luciferase (enzima que permite bioluminescência) abriu novas possibilidades para o desenvolvimento de testes de fármacos *in vitro*.^{133,136,137}

3.1.2. Testes *in vitro* em *Toxoplasma*

Apesar do *Toxoplasma* ser conhecido pela sua fácil cultura, é importante sublinhar que tal acontece em taquizoítos, e que estes necessitam de células hospedeiras.¹⁴¹

A cultura de células HeLa oferece muitas vantagens para a replicação de *Toxoplasma in vitro*. Uma vez que é uma linhagem proliferativa contínua, é difícil controlar a proliferação do protozoário na cultura de modo a prever o tempo necessário para proliferação.¹⁴²

Os métodos *in vitro* utilizados para avaliar a atividade anti-*Toxoplasma* de fármacos incluem ensaios de crescimento e/ou ensaios enzimáticos.

Tal como em *Leishmania*, podem fazer-se análises em *Toxoplasma* através da introdução de ácidos nucleicos radioativos.¹⁴³ No entanto, este tipo de testes pode representar um risco para os investigadores.¹³⁷

Outras técnicas foram surgindo ao longo do tempo, sendo que a suscetibilidade de *Toxoplasma* a fármacos pode ser avaliada através da utilização de anticorpos específicos de *T. gondii* em ensaios ELISA, da utilização da expressão transgénica do gene da beta-galactosidase bacteriana¹⁴⁴, através de ensaios baseados em FACS (técnicas de citometria em que se verifica a dispersão da luz e a fluorescência de cada molécula) ou em proteínas fluorescentes (amarela¹⁴⁵, verde ou vermelha).¹⁴⁶

IV. Resultados obtidos pelo grupo do CCMAR

Apesar do foco da presente dissertação ser a avaliação de resultados em leishmaniose e toxoplasmose, dada a história da sua descoberta e o motivo pelo qual foram descobertos, a atividade antimalárica dos endoperóxidos é sempre um fator a ter em conta. Poucos são os resultados publicados de atividades dos endoperóxidos suprarreferidos em leishmaniose e em toxoplasmose.

Na tabela IV-1 estão apresentadas as atividades antimaláricas, obtidas em testes *in vitro* contra linhas de *Plasmodium*, realizados no Instituto de Medicina Tropical, em Lisboa, com os compostos (2), (6), (9), (10) e (11). Os compostos foram testados em 4 estirpes de *Plasmodium falciparum* sensíveis (3D7) e resistentes a fármacos convencionais (Dd2).

Tabela IV-1: Atividades anti maláricas de alguns endoperóxidos

Estirpe	IC ₅₀ (nM)											
	3D7			Dd2			1240			1241		
Composto	Média	DP	n	Média	DP	n	Média	DP	n	Média	DP	N
LC50 (2)	14,0	6,7	2	23,6	8,4	3	na			na		
LC95 (6)	18,1	11,0	2	56,3	1,0	2	na			na		
LC129 (9)	42,9	3,9	3	43,2	0,8	2	na			na		
LC130 (10)	23,3	15,2	4	24,8	17,2	3	8,2	1,9	2	2,4	1,6	3
LC132 (11)	24,2	12,8	3	26,6	15,9	2	25,0	7,4	3	19,7	3,4	4
ART			0			0	33,3	8,0	3	13,3	2,2	2
DHA	4,2	1,6	4	4,2	0,5	4	6,2	1,6	3	3,7	2,0	4
ATN	5,0		1	4,6	1,4	4	3,4	0,1	2	3,9	1,2	4

DP – Desvio padrão; n – Número de ensaios (cada um em triplicado); ART – Artemisinina; DHA – Dihidroartemisinina; ATN – Artesunato.

Nota: Na tabela os compostos estão referenciados com siglas que resultam de metodologias de identificação internas da equipa.

Através dos resultados apresentados na tabela verifica-se que, em concentrações nanomolares, nas estirpes 1240 e 1241, os compostos (10) e (11) apresentam valores de IC₅₀ da mesma ordem de grandeza ou menores que os compostos padrão, ou seja, resultados muito promissores.

Atualmente, já há resultados publicados de alguns destes ozonídeos secundários em leishmaniose. Na sequência do trabalho desenvolvido pelas equipas de Campino e Cristiano verificou-se que, em concentrações micromolares, os trioxolanos

designados por LC50 e LC95 (compostos 2 e 6, respetivamente) apresentaram bons perfis de atividade e de segurança. Estes compostos mostraram elevada atividade anti-promastigota e baixa toxicidade em comparação com a terapêutica recomendada pela OMS para tratamento da leishmaniose.¹⁴⁷ Alguns dos compostos preparados pela autora, no âmbito deste trabalho, serão testados em *Leishmania infantum* e em *Toxoplasma gondii*.

V. Conclusão

Como referia no início desta dissertação, a leishmaniose e a toxoplasmose podem considerar-se “infecções negligenciadas da pobreza”, em homologia com outras doenças tropicais negligenciadas, como a malária. Apesar de não ocorrerem apenas em zonas economicamente desfavorecidas, é em países em vias de desenvolvimento que a otimização da relação benefício-custo dos fármacos é imperativa.

Atualmente, o desenvolvimento de novos fármacos, para utilização em monoterapia ou em combinações de fármacos, e de protocolos terapêuticos contra doenças tropicais e negligenciadas é de grande importância em saúde pública. A terapêutica disponível para estas doenças conta com efeitos colaterais significativos, indisponibilidade de tratamento, resistência parasitária e co-infecção com VIH, tornando-se urgente o surgimento de novas soluções.

Tendo em conta todo o conhecimento da classe de fármacos baseada na função peróxido como farmacóforo e dos resultados promissores que se vêm apresentando, antevê-se que os endoperóxidos sintéticos, principalmente os derivados de trioxolano, desempenharão um papel preponderante no combate às infecções parasitárias de grande importância a nível mundial.

A vanguarda da terapêutica de infecções parasitárias é a criação de fármacos híbridos. Trata-se de uma abordagem química racional combinando na mesma entidade química vários farmacóforos, direcionados para alvos diferentes ou para pontos diferentes dos mesmos alvos, que proporcionam estabilidade, solubilidade, potência e segurança, além de outras características necessárias tendo em conta a potencial utilização como fármacos.¹⁰⁰ Os trioxolanos poderão ser boas opções para as novas estratégias de *design* destes fármacos híbridos.

A possibilidade de sintetizar um trioxolano com atividade antiparasitária é tanto maior quanto maior a persistência e o conhecimento nesta área de investigação. A necessidade de pesquisa, investigação, síntese e análise é um atrativo para os amantes da química medicinal.

VI. Bibliografia

- (1) IOM (Institute of Medicine). *The Causes and Impacts of Neglected Tropical and Zoonotic Diseases : Opportunities for Integrated Intervention Strategies: Workshop Summary*; National Academies Press (US), 2011.
- (2) WHO. WHO | Neglected Diseases
http://www.who.int/neglected_diseases/about/en/ (acesso em 22 Janeiro, 2015).
- (3) Beyrer, C.; Villar, J. C.; Suwanvanichkij, V.; Singh, S.; Baral, S. D.; Mills, E. J. Neglected Diseases, Civil Conflicts, and the Right to Health. *Lancet* **2007**, *370*, 619–627.
- (4) CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Neglected Parasitic Infections (NPIs) in the United States <http://www.cdc.gov/parasites/npi/> (acesso em 4 Fevereiro, 2015).
- (5) Hotez, P. Neglected Diseases Amid Wealth In The United States And Europe. *Health Aff.* **2009**, *28*, 1720–1725.
- (6) Hotez, P. J. Neglected Infections of Poverty in the United States of America. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2008, *2*, e256.
- (7) CDC - Centers for Disease Control and Prevention. CDC - Leishmaniasis - Resources for Health Professionals
http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/health_professionals/index.html (acesso em 3 Fevereiro, 2015).
- (8) Grevelink, S. A.; Lerner, E. A. Leishmaniasis. *J. Am. Acad. Dermatol.* **1996**, *34*, 257–272.
- (9) World Health Organization. WHO | Leishmaniasis
<http://www.who.int/leishmaniasis/en/> (acesso em 3 Fevereiro, 2015).
- (10) Aït-Oudhia, K.; Gazanion, E.; Vergnes, B.; Oury, B.; Sereno, D. Leishmania Antimony Resistance: What We Know What We Can Learn from the Field. *Parasitol. Res.* **2011**, *109*, 1225–1232.
- (11) World Health Organization. WHO | Burden and distribution
<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/> (acesso em 31 Março, 2015).
- (12) Pigott, D. M.; Bhatt, S.; Golding, N.; Duda, K. A.; Battle, K. E.; Brady, O. J.; Messina, J. P.; Balard, Y.; Bastien, P.; Pratlong, F.; Brownstein, J. S.; Freifeld, C.

- C.; Mekaru, S. R.; Gething, P. W.; George, D. B.; Myers, M. F.; Reithinger, R.; Hay, S. I. Global Distribution Maps of the Leishmaniasis. *Elife* **2014**, *3*.
- (13) Mansueto, P.; Seidita, A.; Vitale, G.; Cascio, A. Leishmaniasis in Travelers: A Literature Review. *Travel Med. Infect. Dis.* **2014**, *12*, 563–581.
- (14) World Health Organization. Global Health Observatory (GHO) data http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/ (acesso em 31 Março, 2015).
- (15) Pace, D. Leishmaniasis. *J. Infect.* **2014**, *69*, S10–S18.
- (16) Herwaldt, B. L. Leishmaniasis. *Lancet*, 1999, *354*, 1191–1199.
- (17) Moore, E. M.; Lockwood, D. N. Leishmaniasis. *Clin. Med. (Northfield. Ill.)*. **2011**, *11*, 492–497.
- (18) Farrel, J. P. *Leishmania*; Farrell, J. P., Ed.; World Class Parasites; Springer US: Boston, MA, 2002; Vol. 4.
- (19) Balaña-Fouce, R.; Reguera, R. M.; Cubría, J. C.; Ordóñez, D. The Pharmacology of Leishmaniasis. *Gen. Pharmacol.* **1998**, *30*, 435–443.
- (20) Singh, N.; Kumar, M.; Singh, R. K. Leishmaniasis: Current Status of Available Drugs and New Potential Drug Targets. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **2012**, *5*, 485–497.
- (21) CDC - Centers for Disease Control and Prevention. CDC - Leishmaniasis - Biology <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html> (acesso em 22 Janeiro, 2015).
- (22) World Health Organization. WHO | The vector <http://www.who.int/leishmaniasis/vector/en/> (acesso em 6 Junho, 2015).
- (23) World Health Organization. *Control of the Leishmaniasis*; 2010.
- (24) Bern, C.; Maguire, J. H.; Alvar, J. Complexities of Assessing the Disease Burden Attributable to Leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2008**, *2*, e313.
- (25) Silva Junior, J. B. da. Antimoniato de Meglumina. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2001**, *34*, 103–105.
- (26) Murray, H. W.; Berman, J. D.; Davies, C. R.; Saravia, N. G. Advances in Leishmaniasis. *Lancet* **2005**, *366*, 1561–1577.
- (27) Shaked-Mishan, P.; Ulrich, N.; Ephros, M.; Zilberstein, D. Novel Intracellular SbV Reducing Activity Correlates with Antimony Susceptibility in *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 3971–3976.

- (28) Frézard, F.; Demicheli, C.; Ribeiro, R. R. Pentavalent Antimonials: New Perspectives for Old Drugs. *Molecules*, 2009, *14*, 2317–2336.
- (29) Chattopadhyay, A.; Jafurulla, M. A Novel Mechanism for an Old Drug: Amphotericin B in the Treatment of Visceral Leishmaniasis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2011, *416*, 7–12.
- (30) Dorlo, T. P. C.; Balasegaram, M.; Beijnen, J. H.; de vries, P. J. Miltefosine: A Review of Its Pharmacology and Therapeutic Efficacy in the Treatment of Leishmaniasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2012, *67*, 2576–2597.
- (31) Bhattacharya, S. K.; Sinha, P. K.; Sundar, S.; Thakur, C. P.; Jha, T. K.; Pandey, K.; Das, V. R.; Kumar, N.; Lal, C.; Verma, N.; Singh, V. P.; Ranjan, A.; Verma, R. B.; Anders, G.; Sindermann, H.; Ganguly, N. K. *Phase 4 Trial of Miltefosine for the Treatment of Indian Visceral Leishmaniasis.*; 2007; Vol. 196.
- (32) Khademvatan, S.; Gharavi, M. J.; Saki, J. Miltefosine Induces Metacaspase and PARP Genes Expression in *Leishmania Infantum*. *Brazilian J. Infect. Dis.* **2011**, *15*, 442–448.
- (33) Van der Luit, A. H.; Vink, S. R.; Klarenbeek, J. B.; Perrissoud, D.; Solary, E.; Verheij, M.; van Blitterswijk, W. J. A New Class of Anticancer Alkylphospholipids Uses Lipid Rafts as Membrane Gateways to Induce Apoptosis in Lymphoma Cells. *Mol. Cancer Ther.* **2007**, *6*, 2337–2345.
- (34) Van Blitterswijk, W. J.; Verheij, M. Anticancer Mechanisms and Clinical Application of Alkylphospholipids. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **2013**, *1831*, 663–674.
- (35) Papazafiri, P.; Avlonitis, N.; Angelou, P.; Calogeropoulou, T.; Koufaki, M.; Scoulica, E.; Fragiadaki, I. Structure-Activity Relationships of Antineoplastic Ring-Substituted Ether Phospholipid Derivatives. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2005**, *56*, 261–270.
- (36) Rosenthal, E.; Delaunay, P.; Jeandel, P.-Y.; Haas, H.; Pomares-Estran, C.; Marty, P. [Liposomal Amphotericin B as Treatment for Visceral Leishmaniasis in Europe, 2009]. *Médecine Mal. Infect.* **2009**, *39*, 741–744.
- (37) Kim, D. H.; Chung, H. J.; Bleys, J.; Ghohestani, R. F. Is Paromomycin an Effective and Safe Treatment against Cutaneous Leishmaniasis? A Meta-Analysis of 14 Randomized Controlled Trials. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2009**, *3*, e381.
- (38) Van Griensven, J.; Balasegaram, M.; Meheus, F.; Alvar, J.; Lynen, L.; Boelaert, M. Combination Therapy for Visceral Leishmaniasis. *Lancet Infect. Dis.* **2010**, *10*, 184–194.

- (39) Fernández, M. M.; Malchiodi, E. L.; Algranati, I. D. Differential Effects of Paromomycin on Ribosomes of *Leishmania Mexicana* and Mammalian Cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 86–93.
- (40) Sundar, S.; Jha, T. K.; Thakur, C. P.; Sinha, P. K.; Bhattacharya, S. K. *Injectable Paromomycin for Visceral Leishmaniasis in India.*; 2007; Vol. 356.
- (41) Le Pape, P. Development of New Antileishmanial Drugs--Current Knowledge and Future Prospects. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2008**, *23*, 708–718.
- (42) Sundar, S.; Chatterjee, M. Visceral Leishmaniasis - Current Therapeutic Modalities. *Indian J. Med. Res.* **2006**, *123*, 345–352.
- (43) Maarouf, M.; de Kouchkovsky, Y.; Brown, S.; Petit, P. X.; Robert-Gero, M. In Vivo Interference of Paromomycin with Mitochondrial Activity of *Leishmania*. *Exp. Cell Res.* **1997**, *232*, 339–348.
- (44) Maarouf, M.; Lawrence, F.; Croft, S. L.; Robert-Gero, M. Ribosomes of *Leishmania* Are a Target for the Aminoglycosides. *Parasitol. Res.* **1995**, *81*, 421–425.
- (45) Montoya, J. G.; Liesenfeld, O. Toxoplasmosis. *Lancet (London, England)* **2004**, *363*, 1965–1976.
- (46) CDC - Centers for Disease Control and Prevention. CDC - Toxoplasmosis <http://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/> (acesso em 3 Fevereiro, 2015).
- (47) Ho-Yen, D. O. Toxoplasmosis. *Medicine (Baltimore)*. **2009**, *37*, 665–667.
- (48) Torgerson, P. R.; Mastroiacovo, P. The Global Burden of Congenital Toxoplasmosis: A Systematic Review. *Bull. World Health Organ.* **2013**, *91*, 501–508.
- (49) Sydorchuk, A.; Moskaliuk, V.; Randiuk, Y.; Sydorchuk, L.; Amakye, D.; Ekta, R. Observational Study of Toxoplasmosis Distribution: Comparison of Seroprevalence Rate in Ukraine, India And Ghana. *Adv. Sci. J.* **2015**, *2015*, 25–28.
- (50) CDC - Centers for Disease Control and Prevention. CDC - Toxoplasmosis - Epidemiology & Risk Factors <http://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/epi.html> (acesso em 5 Julho, 2015).
- (51) Djurkovic-Djakovic, O. Efficacy of Atovaquone Combined with Clindamycin against Murine Infection with a Cystogenic (Me49) Strain of *Toxoplasma Gondii*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2002**, *50*, 981–987.
- (52) Jumaian, N. F. Seroprevalence and Risk Factors for *Toxoplasma* Infection in Pregnant Women in Jordan. **2005**.

- (53) CDC - Centers for Disease Control and Prevention. CDC - Toxoplasmosis - Biology <http://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/biology.html> (acesso em 22 Janeiro, 2015).
- (54) Jones, J. L.; Dubey, J. P. Foodborne Toxoplasmosis. *Clin. Infect. Dis.* **2012**, *55*, 845–851.
- (55) Hill, D.; Dubey, J. P. Toxoplasma Gondii: Transmission, Diagnosis and Prevention. *Clin. Microbiol. Infect.* **2002**, *8*, 634–640.
- (56) CDC - Centers for Disease Control and Prevention. CDC - Toxoplasmosis - Disease <http://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/disease.html> (acesso em 19 Julho, 2015).
- (57) Fallah, M.; Rabiee, S.; Matini, M.; Taherkhani, H. Seroepidemiology of Toxoplasmosis in Primigravida Women in Hamadan, Islamic Republic of Iran, 2004. *East. Mediterr. Heal. J.* **2008**, *14*, 163–171.
- (58) Weiss, L. M.; Dubey, J. P. Toxoplasmosis: A History of Clinical Observations. *Int. J. Parasitol.* **2009**, *39*, 895–901.
- (59) Tenter, A. M.; Heckeroth, A. R.; Weiss, L. M. Toxoplasma Gondii: From Animals to Humans. *Int. J. Parasitol.* **2000**, *30*, 1217–1258.
- (60) Kim, K.; Weiss, L. M. Toxoplasma Gondii: The Model Apicomplexan. *International Journal for Parasitology*, 2004, *34*, 423–432.
- (61) Dubey, J. P.; Lindsay, D. S.; Speer, C. A. Structures of Toxoplasma Gondii Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. *Clin. Microbiol. Rev.* **1998**, *11*, 267–299.
- (62) Kim, K.; Weiss, L. M. Toxoplasma: The next 100years. *Microbes Infect.* **2008**, *10*, 978–984.
- (63) Pappas, G.; Roussos, N.; Falagas, M. E. Toxoplasmosis Snapshots: Global Status of Toxoplasma Gondii Seroprevalence and Implications for Pregnancy and Congenital Toxoplasmosis. *Int. J. Parasitol.* **2009**, *39*, 1385–1394.
- (64) Dubey, J. P. History of the Discovery of the Life Cycle of Toxoplasma Gondii. *Int. J. Parasitol.* **2009**, *39*, 877–882.
- (65) Opitz, C.; Soldati, D. “The Glideosome”: A Dynamic Complex Powering Gliding Motion and Host Cell Invasion by Toxoplasma Gondii. *Mol. Microbiol.* **2002**, *45*, 597–604.
- (66) Sibley, L. D. Toxoplasma Gondii: Perfecting an Intracellular Life Style. *Traffic* **2003**, *4*, 581–586.

- (67) Samuel, B. U.; Hearn, B.; Mack, D.; Wender, P.; Rothbard, J.; Kirisits, M. J.; Mui, E.; Wernimont, S.; Roberts, C. W.; Muench, S. P.; Rice, D. W.; Prigge, S. T.; Law, A. B.; McLeod, R. Delivery of Antimicrobials into Parasites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 14281–14286.
- (68) CDC - Centers for Disease Control and Prevention. CDC - Toxoplasmosis - Resources for Health Professionals
http://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/health_professionals/index.html
(acesso em 3 Fevereiro, 2015).
- (69) de-la-Torre, A.; Stanford, M.; Curi, A.; Jaffe, G. J.; Gomez-Marin, J. E. Therapy for Ocular Toxoplasmosis. *Ocul. Immunol. Inflamm.* **2011**, *19*, 314–320.
- (70) Brunton, L.; Lazo, J.; Parker, K. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*; 11th ed.; McGraw-Hill Professional: California, 2005.
- (71) Van der Ven, A. J. A. M.; Schoondermark-van de Ven, E. M. E.; Camps, W.; Melchers, W. J. G.; Koopmans, P. P.; van der Meer, J. W. M.; Galama, J. M. D. Anti-Toxoplasma Effect of Pyrimethamine, Trimethoprim and Sulphonamides Alone and in Combination: Implications for Therapy. *J. Antimicrob. Chemother.* **1996**, *38*, 75–80.
- (72) Chen, C.; Ke, J.; Zhou, X. E.; Yi, W.; Brunzelle, J. S.; Li, J.; Yong, E.-L.; Xu, H. E.; Melcher, K. Structural Basis for Molecular Recognition of Folic Acid by Folate Receptors. *Nature* **2013**, *500*, 486–489.
- (73) Kaye, A. Toxoplasmosis: Diagnosis, Treatment, and Prevention in Congenitally Exposed Infants. *J. Pediatr. Health Care* **2011**, *25*, 355–364.
- (74) Schoondermark-Van de Ven, E.; Vree, T.; Melchers, W.; Camps, W.; Galama, J. In Vitro Effects of Sulfadiazine and Its Metabolites Alone and in Combination with Pyrimethamine on *Toxoplasma Gondii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, *39*, 763–765.
- (75) Araujo, F. G.; Shepard, R. M.; Remington, J. S. In Vivo Activity of the Macrolide Antibiotics Azithromycin, Roxithromycin and Spiramycin against *Toxoplasma Gondii*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **1991**, *10*, 519–524.
- (76) McLeod, R.; Boyer, K.; Karrison, T.; Kasza, K.; Swisher, C.; Roizen, N.; Jalbrzikowski, J.; Remington, J.; Heydemann, P.; Noble, A. G.; Mets, M.; Holfels, E.; Withers, S.; Latkany, P.; Meier, P. Outcome of Treatment for Congenital Toxoplasmosis, 1981-2004: The National Collaborative Chicago-Based, Congenital Toxoplasmosis Study. *Clin. Infect. Dis.* **2006**, *42*, 1383–1394.
- (77) Laboratório MEDINFAR - PRODUTOS FARMACÊUTICOS. Medifolin (Folheto Informativo), 2009, 1–6.

- (78) Massimine, K. M.; Doan, L. T.; Atreya, C. A.; Stedman, T. T.; Anderson, K. S.; Joiner, K. A.; Coppens, I. Toxoplasma Gondii Is Capable of Exogenous Folate Transport. A Likely Expansion of the BT1 Family of Transmembrane Proteins. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2005**, *144*, 44–54.
- (79) Grujić, J.; Djurković-Djaković, O.; Nikolić, A.; Klun, I.; Bobić, B. Effectiveness of Spiramycin in Murine Models of Acute and Chronic Toxoplasmosis. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2005**, *25*, 226–230.
- (80) Steel, H. C.; Theron, A. J.; Cockeran, R.; Anderson, R.; Feldman, C. Pathogen- and Host-Directed Anti-Inflammatory Activities of Macrolide Antibiotics. *Mediators Inflamm.* **2012**, *2012*.
- (81) Tenson, T.; Lovmar, M.; Ehrenberg, M. The Mechanism of Action of Macrolides, Lincosamides and Streptogramin B Reveals the Nascent Peptide Exit Path in the Ribosome. *J. Mol. Biol.* **2003**, *330*, 1005–1014.
- (82) Sanofi- Produtos Farmaceuticos Lda. Rovamycine (Resumo Das Caracteristicas Do Medicamento), 2013.
- (83) Richards, R. M. E.; Taylor, R. B.; Zhu, Z. Y. Mechanism for Synergism between Sulphonamides and Trimethoprim Clarified. *J. Pharm. Pharmacol.* **1996**, *48*, 981–984.
- (84) Gomes, T. C.; Andrade Júnior, H. F. de; Lescano, S. A. Z.; Amato-Neto, V. In Vitro Action of Antiparasitic Drugs, Especially Artesunate, against Toxoplasma Gondii. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2012**, *45*, 485–490.
- (85) Kovacs, J. A. Efficacy of Atovaquone in Treatment of Toxoplasmosis in Patients with AIDS. *Lancet* **1992**, *340*, 637–638.
- (86) Kessl, J. J.; Ha, K. H.; Merritt, A. K.; Meshnick, S. R.; Trumppower, B. L. Molecular Basis of Toxoplasma Gondii Atovaquone Resistance Modeled in Saccharomyces Cerevisiae. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2006**, *146*, 255–258.
- (87) Baggish, A. L.; Hill, D. R. Antiparasitic Agent Atovaquone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2002, *46*, 1163–1173.
- (88) Neto, V. A.; Braz, L. M. A.; Campos, R.; Pinto, P. L. S.; Moreira, A. A. B.; Boulos, M.; Nahkle, M. C. Estudo sobre a eventual ação da artemisinina na infecção experimental de camundongos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1991, pp. 141–143.
- (89) Antoine, T.; Fisher, N.; Amewu, R.; O’Neill, P. M.; Ward, S. A.; Biagini, G. A. Rapid Kill of Malaria Parasites by Artemisinin and Semi-Synthetic Endoperoxides Involves ROS-Dependent Depolarization of the Membrane Potential. *J. Antimicrob. Chemother.* **2014**, *69*, 1005–1016.

- (90) Dhingra, V.; Rao, K. V.; Narasu, M. L. Current Status of Artemisinin and Its Derivatives as Antimalarial Drugs. *Life Sci.* **1999**, *66*, 279–300.
- (91) Badireenath Konkimalla, V.; Blunder, M.; Korn, B.; Soomro, S. A.; Jansen, H.; Chang, W.; Posner, G. H.; Bauer, R.; Efferth, T. Effect of Artemisinins and Other Endoperoxides on Nitric Oxide-Related Signaling Pathway in RAW 264.7 Mouse Macrophage Cells. *Nitric Oxide* **2008**, *19*, 184–191.
- (92) Sriram, D.; Rao, V. S.; Chandrasekhar, K. V. G.; Yogeewari, P. Progress in the Research of Artemisinin and Its Analogues as Antimalarials: An Update. *Nat. Prod. Res.* **2004**, *18*, 503–527.
- (93) Muraleedharan, K. M.; Avery, M. A. Progress in the Development of Peroxide-Based Anti-Parasitic Agents. *Drug Discov. Today* **2009**, *14*, 793–803.
- (94) Meshnick, S. R. Artemisinin: Mechanisms of Action, Resistance and Toxicity. *Int. J. Parasitol.* **2002**, *32*, 1655–1660.
- (95) Valecha, N.; Looareesuwan, S.; Martensson, A.; Abdulla, S. M.; Krudsood, S.; Tangpukdee, N.; Mohanty, S.; Mishra, S. K.; Tyagi, P. K.; Sharma, S. K.; Moehrle, J.; Gautam, A.; Roy, A.; Paliwal, J. K.; Kothari, M.; Saha, N.; Dash, A. P.; Björkman, A. *Arterolane, a New Synthetic Trioxolane for Treatment of Uncomplicated Plasmodium Falciparum Malaria: A Phase II, Multicenter, Randomized, Dose-Finding Clinical Trial.*; 2010; Vol. 51.
- (96) Dong, Y.; Wittlin, S.; Sriraghavan, K.; Chollet, J.; Charman, S. A.; Charman, W. N.; Scheurer, C.; Urwyler, H.; Tomas, J. S.; Snyder, C.; Creek, D. J.; Morizzi, J.; Koltun, M.; Matile, H.; Wang, X.; Padmanilayam, M.; Tang, Y.; Dorn, A.; Brun, R.; Vennerstrom, J. L. The Structure - Activity Relationship of the Antimalarial Ozonide Arterolane (OZ277). *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 481–491.
- (97) Dong, Y.; Chollet, J.; Matile, H.; Charman, S. A.; Chiu, F. C. K.; Charman, W. N.; Scorneaux, B.; Urwyler, H.; Santo Tomas, J.; Scheurer, C.; Snyder, C.; Dorn, A.; Wang, X.; Karle, J. M.; Tang, Y.; Wittlin, S.; Brun, R.; Vennerstrom, J. L. Spiro and Dispiro-1,2,4-Trioxolanes as Antimalarial Peroxides: Charting a Workable Structure–Activity Relationship Using Simple Prototypes. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4953–4961.
- (98) Creek, D. J.; Ryan, E.; Charman, W. N.; Chiu, F. C. K.; Prankerd, R. J.; Vennerstrom, J. L.; Charman, S. A. Stability of Peroxide Antimalarials in the Presence of Human Hemoglobin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 3496–3500.
- (99) Abiodun, O. O.; Brun, R.; Wittlin, S. In Vitro Interaction of Artemisinin Derivatives or the Fully Synthetic Peroxidic Anti-Malarial OZ277 with Thapsigargin in Plasmodium Falciparum Strains. *Malar. J.* **2013**, *12*, 43.

- (100) Flannery, E. L.; Chatterjee, A. K.; Winzeler, E. A. Antimalarial Drug Discovery — Approaches and Progress towards New Medicines. *Nat. Rev. Microbiol.* **2013**, *11*, 849–862.
- (101) Golenser, J.; Waknine, J. H.; Krugliak, M.; Hunt, N. H.; Grau, G. E. Current Perspectives on the Mechanism of Action of Artemisinins. *International Journal for Parasitology*, 2006, *36*, 1427–1441.
- (102) Araujo, N. C. P.; Afonso, R.; Bringela, A.; Cancela, M. L.; Cristiano, M. L. S.; Leite, R. B. Peroxides with Antiplasmodial Activity Inhibit Proliferation of *Perkinsus olseni*, the Causative Agent of Perkinsosis in Bivalves. *Parasitol. Int.* **2013**, *62*, 575–582.
- (103) Olliaro, P. L.; Haynes, R. K.; Meunier, B.; Yuthavong, Y. Possible Modes of Action of the Artemisinin-Type Compounds. *Trends Parasitol.* **2001**, *17*, 122–126.
- (104) Haynes, R. K.; Krishna, S. Artemisinins: Activities and Actions. *Microbes Infect.* **2004**, *6*, 1339–1346.
- (105) Fügi, M. A.; Wittlin, S.; Dong, Y.; Vennerstrom, J. L. Probing the Antimalarial Mechanism of Artemisinin and OZ277 (arterolane) with Nonperoxidic Isosteres and Nitroxyl Radicals. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 1042–1046.
- (106) Creek, D. J.; Charman, W. N.; Chiu, F. C. K.; Prankerd, R. J.; Dong, Y.; Vennerstrom, J. L.; Charman, S. a. Relationship between Antimalarial Activity and Heme Alkylation for Spiro- and Dispiro-1,2,4-Trioxolane Antimalarials. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *52*, 1291–1296.
- (107) O'Neill, P. M.; Posner, G. H. A Medicinal Chemistry Perspective on Artemisinin and Related Endoperoxides. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2004, *47*, 2945–2964.
- (108) Opsenica, D. M.; Šolaja, B. a. Antimalarial Peroxides. *J. Serbian Chem. Soc.* **2009**, *74*, 1155–1193.
- (109) Borstnik, K.; Paik, I.; Shapiro, T. A.; Posner, G. H. Antimalarial Chemotherapeutic Peroxides: Artemisinin, Yingzhaosu A and Related Compounds. *Int. J. Parasitol.* **2002**, *32*, 1661–1667.
- (110) Dong, Y.; Tang, Y.; Chollet, J.; Matile, H.; Wittlin, S.; Charman, S. A.; Charman, W. N.; Tomas, J. S.; Scheurer, C.; Snyder, C.; Scorneaux, B.; Bajpai, S.; Alexander, S. A.; Wang, X.; Padmanilayam, M.; Cheruku, S. R.; Brun, R.; Vennerstrom, J. L. Effect of Functional Group Polarity on the Antimalarial Activity of Spiro and Dispiro-1,2,4-Trioxolanes. *Bioorganic Med. Chem.* **2006**, *14*, 6368–6382.
- (111) Jefford, C. W. New Developments in Synthetic Peroxidic Drugs as Artemisinin Mimics. *Drug Discov. Today* **2007**, *12*, 487–495.

- (112) Jones-Brando, L.; D'Angelo, J.; Posner, G. H.; Yolken, R. In Vitro Inhibition of Toxoplasma Gondii by Four New Derivatives of Artemisinin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 4206–4208.
- (113) Charman, S. A.; Arbe-Barnes, S.; Bathurst, I. C.; Brun, R.; Campbell, M.; Charman, W. N.; Chiu, F. C. K.; Chollet, J.; Craft, J. C.; Creek, D. J.; Dong, Y.; Matile, H.; Maurer, M.; Morizzi, J.; Nguyen, T.; Papastogiannidis, P.; Scheurer, C.; Shackelford, D. M.; Sriraghavan, K.; Stingelin, L.; Tang, Y.; Urwyler, H.; Wang, X.; White, K. L.; Wittlin, S.; Zhou, L.; Vennerstrom, J. L. Synthetic Ozonide Drug Candidate OZ439 Offers New Hope for a Single-Dose Cure of Uncomplicated Malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108*, 4400–4405.
- (114) Miller, L. H.; Ackerman, H. C.; Su, X.; Wellems, T. E. Malaria Biology and Disease Pathogenesis: Insights for New Treatments. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 156–167.
- (115) Vennerstrom, J. L.; Dong, Y. X.; Chollet, J.; Matilde, H. Spiro and Dispiro 1,2,4-Trioxolane Antimalarials. US Patent 6486199B1, 2002.
- (116) Brigas, A. F.; Fonseca, C. S. C.; Johnstone, R. A. W. Preparation of 3-Chloro-1,2-Benzisothiazole 1,1-Dioxide (pseudo-Saccharyl Chloride). *J. Chem. Res.* **2002**, *2002*, 299–300.
- (117) Coelho, D. V. Estudos de Reactividade Em Derivados de Compostos Heterocíclicos, Universidade do Algarve, 2008.
- (118) Faria, J. V.; Dos Santos, M. S.; Bernardino, A. M. R.; Becker, K. M.; Machado, G. M. C.; Rodrigues, R. F.; Canto-Cavalheiro, M. M.; Leon, L. L. Synthesis and Activity of Novel Tetrazole Compounds and Their Pyrazole-4-Carbonitrile Precursors against Leishmania Spp. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 6310–6312.
- (119) Pandey, S.; Agarwal, P.; Srivastava, K.; RajaKumar, S.; Puri, S. K.; Verma, P.; Saxena, J. K.; Sharma, A.; Lal, J.; Chauhan, P. M. S. Synthesis and Bioevaluation of Novel 4-Aminoquinoline-Tetrazole Derivatives as Potent Antimalarial Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *66*, 69–81.
- (120) Tang, Y.; Dong, Y.; Wittlin, S.; Charman, S. A.; Chollet, J.; Chiu, F. C. K.; Charman, W. N.; Matile, H.; Urwyler, H.; Dorn, A.; Bajpai, S.; Wang, X.; Padmanilayam, M.; Karle, J. M.; Brun, R.; Vennerstrom, J. L. Weak Base Dispiro-1,2,4-Trioxolanes: Potent Antimalarial Ozonides. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 1260–1265.
- (121) Yang, D. M.; Liew, F. Y. Effects of Qinghaosu (artemisinin) and Its Derivatives on Experimental Cutaneous Leishmaniasis. *Parasitology* **1993**.
- (122) Avery, M. A.; Muraleedharan, K. M.; Desai, P. V.; Bandyopadhyaya, A. K.; Furtado, M. M.; Tekwani, B. L. Structure–Activity Relationships of the Antimalarial Agent Artemisinin. 8. Design, Synthesis, and CoMFA Studies toward

- the Development of Artemisinin-Based Drugs against Leishmaniasis and Malaria †. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4244–4258.
- (123) Chollet, C.; Crousse, B.; Bories, C.; Bonnet-Delpon, D.; Loiseau, P. M. In Vitro Antileishmanial Activity of Fluoro-Artemisinin Derivatives against *Leishmania Donovanii*. *Biomed. Pharmacother.* **2008**, *62*, 462–465.
- (124) Ebrahimisadr, P.; Ghaffarifar, F.; Hassan, Z. M. In-Vitro Evaluation of Antileishmanial Activity and Toxicity of Artemether with Focus on Its Apoptotic Effect. *Iran. J. Pharm. Res.* **2013**, *12*, 903–909.
- (125) Hencken, C. P.; Jones-Brando, L.; Bordón, C.; Stohler, R.; Mott, B. T.; Yolken, R.; Posner, G. H.; Woodard, L. E. Thiazole, Oxadiazole, and Carboxamide Derivatives of Artemisinin Are Highly Selective and Potent Inhibitors of *Toxoplasma Gondii*. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 3594–3601.
- (126) Ou-Yang, K.; Krug, E. C.; Marr, J. J.; Berens, R. L. Inhibition of Growth of *Toxoplasma Gondii* by Qinghaosu and Derivatives. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1990**, *34*, 1961–1965.
- (127) Fichera, M. E.; Roos, D. S. A Plastid Organelle as a Drug Target in Apicomplexan Parasites. *Nature* **1997**, *390*, 407–409.
- (128) Elandaloussi, L. M.; Leite, R. B.; Rodrigues, P. M.; Afonso, R.; Nunes, P. A.; Cancela, M. L. Effect of Antiprotozoal Drugs on the Proliferation of the Bivalve Parasite *Perkinsus Olseni*. *Aquaculture* **2005**, *243*, 9–17.
- (129) Berens, R. L.; Krug, E. C.; Nash, P. B.; Curiel, T. J. Selection and Characterization of *Toxoplasma Gondii* Mutants Resistant to Artemisinin. *J. Infect. Dis.* **1998**, *177*, 1128–1131.
- (130) Chang, H. R.; Jefford, C. W.; Pechere, J. C. In Vitro Effects of Three New 1,2,4-Trioxanes (pentatroxane, Thiahexatroxane, and Hexatroxanone) on *Toxoplasma Gondii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1989**, *33*, 1748–1752.
- (131) Holfels, E.; McAuley, J.; Mack, D.; Milhous, W. K.; McLeod, R. In Vitro Effects of Artemisinin Ether, Cycloguanil Hydrochloride (alone and in Combination with Sulfadiazine), Quinine Sulfate, Mefloquine, Primaquine Phosphate, Trifluoperazine Hydrochloride, and Verapamil on *Toxoplasma Gondii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, *38*, 1392–1396.
- (132) Noedl, H.; Wongsrichanalai, C.; Wernsdorfer, W. H. Malaria Drug-Sensitivity Testing: New Assays, New Perspectives. *Trends in Parasitology*, **2003**, *19*, 175–181.
- (133) Gupta, S. Visceral Leishmaniasis: Experimental Models for Drug Discovery. *Indian J. Med. Res.* **2011**, *133*, 27–39.

- (134) Vermeersch, M.; Da Luz, R. I.; Toté, K.; Timmermans, J. P.; Cos, P.; Maes, L. In Vitro Susceptibilities of *Leishmania Donovani* Promastigote and Amastigote Stages to Antileishmanial Reference Drugs: Practical Relevance of Stage-Specific Differences. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 3855–3859.
- (135) Vacchina, P.; Morales, M. a. In Vitro Screening Test Using *Leishmania* Promastigotes Stably Expressing mCherry Protein. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 1825–1828.
- (136) Sereno, D.; Roy, G.; Loup Lemesre, J.; Papadopoulou, B.; Ouellette, M. DNA Transformation of *Leishmania Infantum* Axenic Amastigotes and Their Use in Drug Screening. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 1168–1173.
- (137) Sereno, D.; Cordeiro da Silva, A.; Mathieu-Daude, F.; Ouaiissi, A. Advances and Perspectives in *Leishmania* Cell Based Drug-Screening Procedures. *Parasitology International*, 2007, *56*, 3–7.
- (138) Callahan, H. L.; Portal, A. C.; Devereaux, R.; Grogl, M. An Axenic Amastigote System for Drug Screening. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41*, 818–822.
- (139) Shimony, O.; Jaffe, C. L. Rapid Fluorescent Assay for Screening Drugs on *Leishmania* Amastigotes. *J. Microbiol. Methods* **2008**, *75*, 196–200.
- (140) Ganguly, S.; Bandyopadhyay, S.; Sarkar, A.; Chatterjee, M. Development of a Semi-Automated Colorimetric Assay for Screening Anti-Leishmanial Agents. *J. Microbiol. Methods* **2006**, *66*, 79–86.
- (141) Weiss, L. M.; Kim, K. *Toxoplasma Gondii: The Model Apicomplexan - Perspectives and Methods*; Academic Press, 2013.
- (142) Chatterton, J. M. .; Evans, R.; Ashburn, D.; Joss, A. W. .; Ho-Yen, D. . *Toxoplasma Gondii* In Vitro Culture for Experimentation. *J. Microbiol. Methods* **2002**, *51*, 331–335.
- (143) Derouin, F.; Chastang, C. Enzyme Immunoassay to Assess Effect of Antimicrobial Agents on *Toxoplasma Gondii* in Tissue Culture. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1988**, *32*, 303–307.
- (144) McFadden, D. C.; Seeber, F.; Boothroyd, J. C. Use of *Toxoplasma Gondii* Expressing Beta-Galactosidase for Colorimetric Assessment of Drug Activity in Vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41*, 1849–1853.
- (145) Gubbels, M. J.; Li, C.; Striepen, B. High-Throughput Growth Assay for *Toxoplasma Gondii* Using Yellow Fluorescent Protein. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 309–316.

- (146) Jin, C.; Kaewintajuk, K.; Jiang, J.; Jeong, W.; Kamata, M.; KIM, H.-S.; Wataya, Y.; Park, H. Toxoplasma Gondii: A Simple High-Throughput Assay for Drug Screening in Vitro. *Exp. Parasitol.* **2009**, *121*, 132–136.
- (147) Cortes, S.; Albuquerque, A.; Cabral, L. I. L.; Lopes, L.; Campino, L.; Cristiano, M. L. S. In Vitro Susceptibility of Leishmania Infantum to Artemisinin Derivatives and Selected Trioxolanos. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 5032–5035.

VII. Anexos

7.1. Composto (1)

7.1.1. Espetro de ^1H -RMN

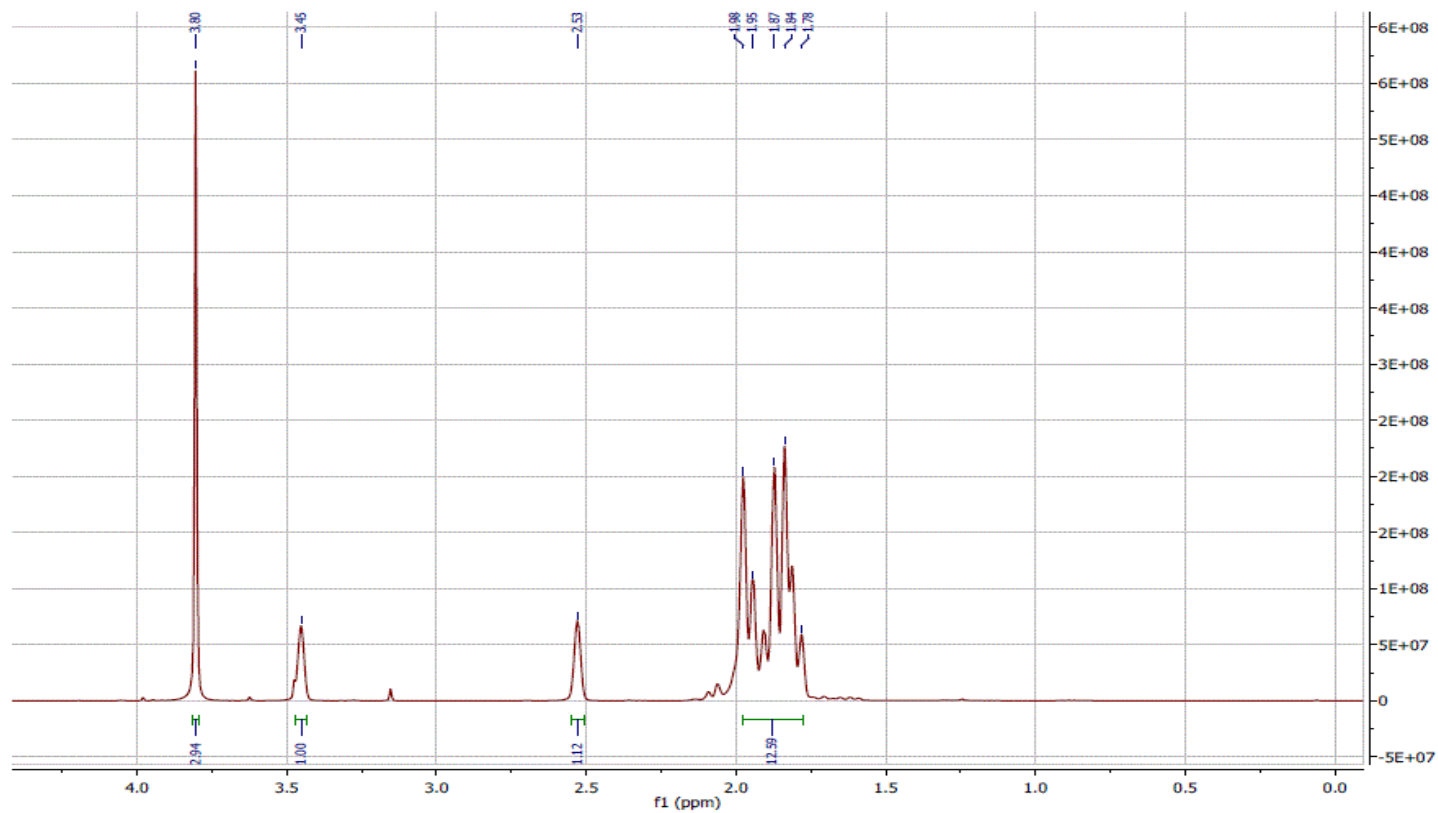
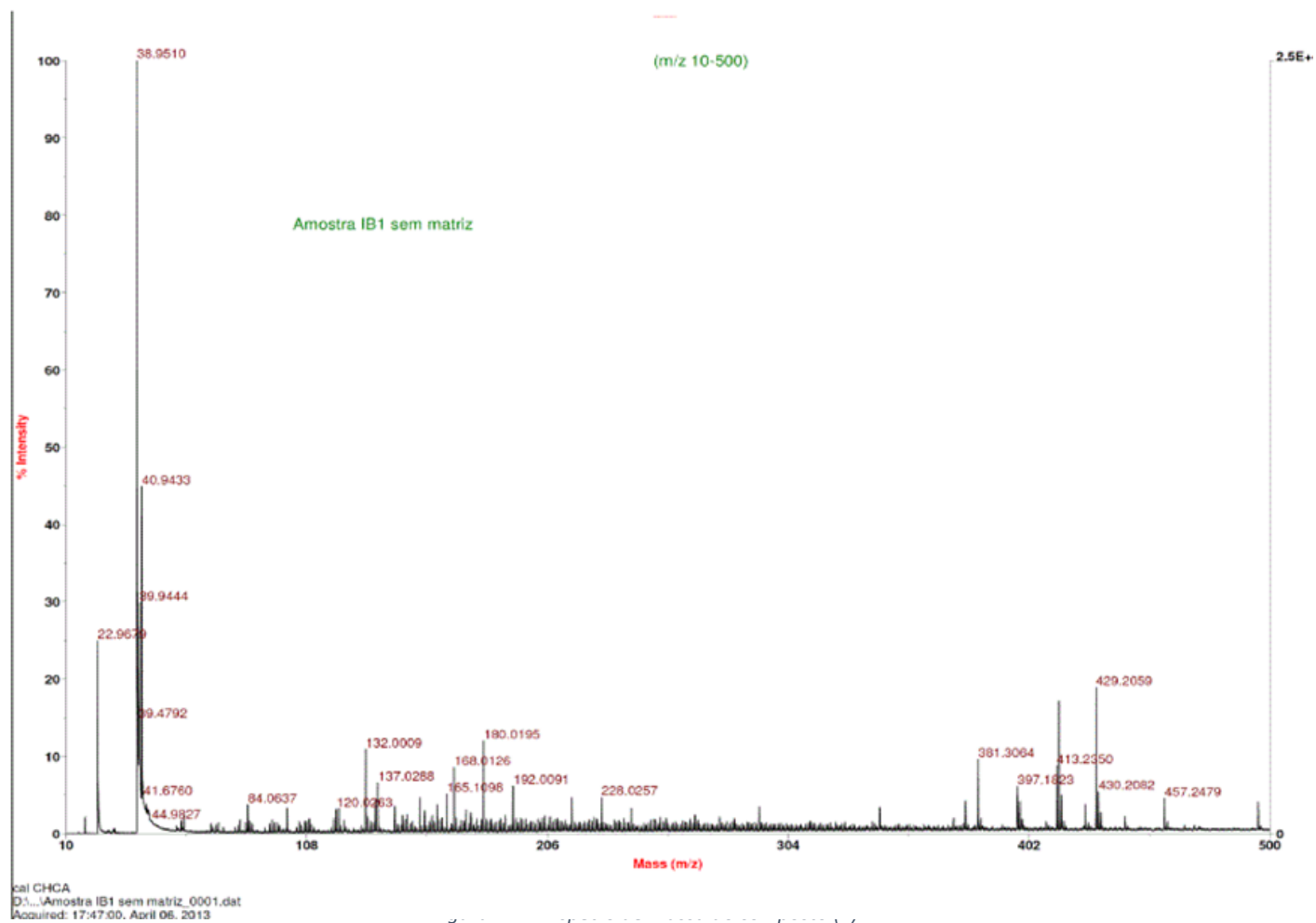


Figura VII-1: Espetro de ^1H -RMN do composto (1)

7.1.2. Espectro de massa



7.2. Composto (2)

7.2.1. Espetro de ^1H -RMN

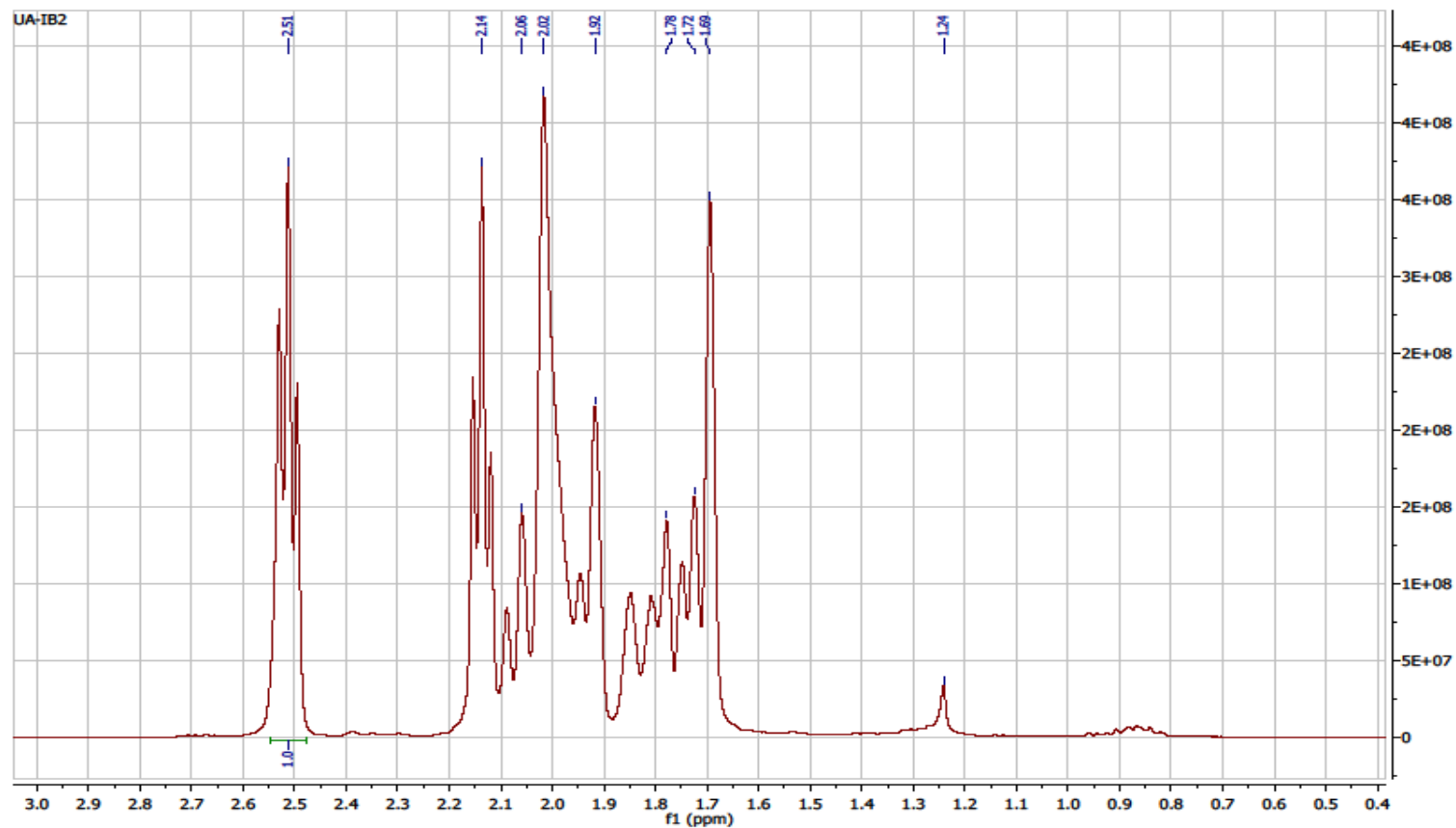


Figura VII-3: Espetro de ^1H -RMN do composto (2)

7.2.2. Espectro de massa

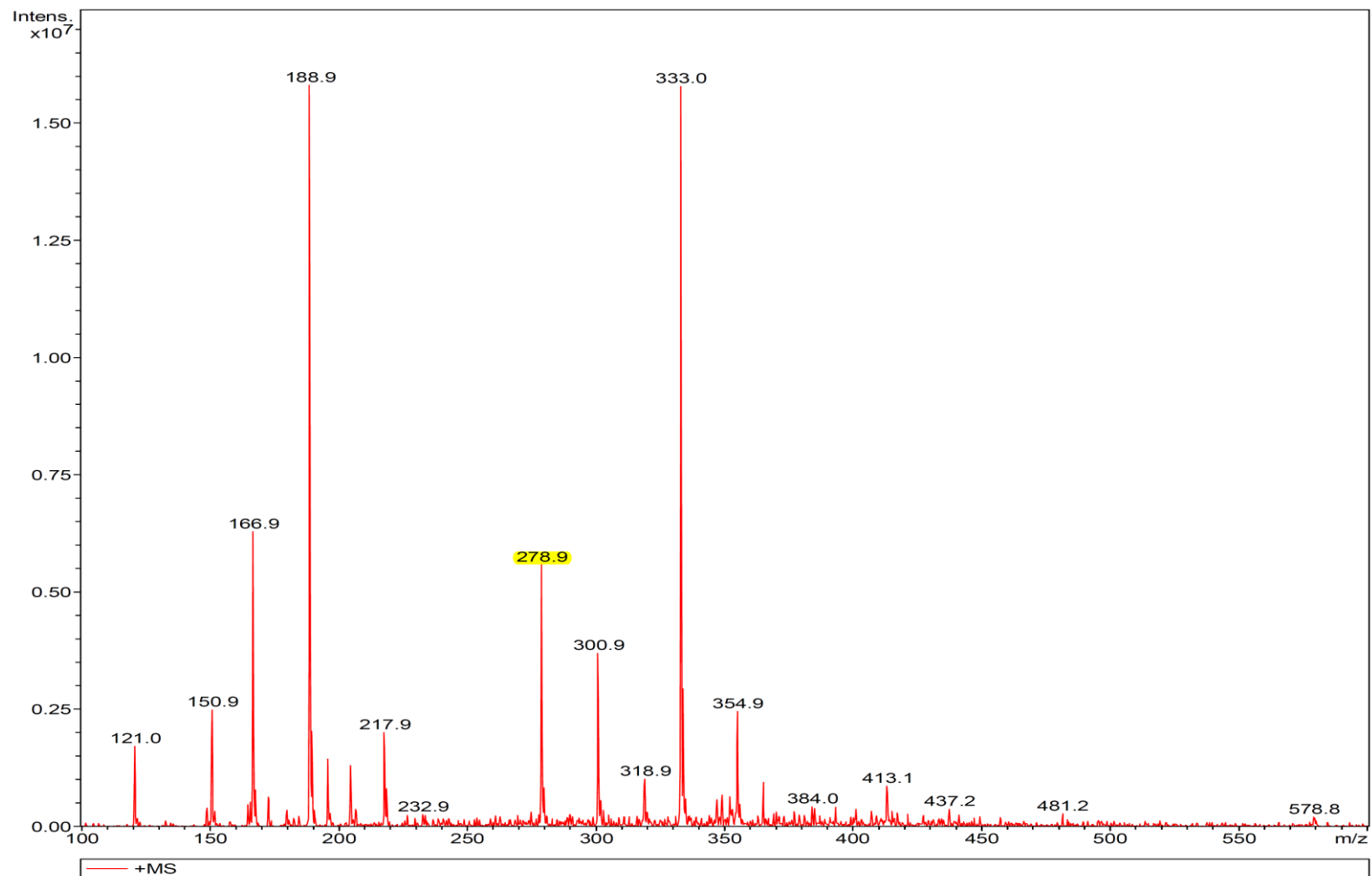


Figura VII-4: Espectro de massa do composto (2)

7.3. Composto (3)

7.3.1. Espetro de ¹H-RMN

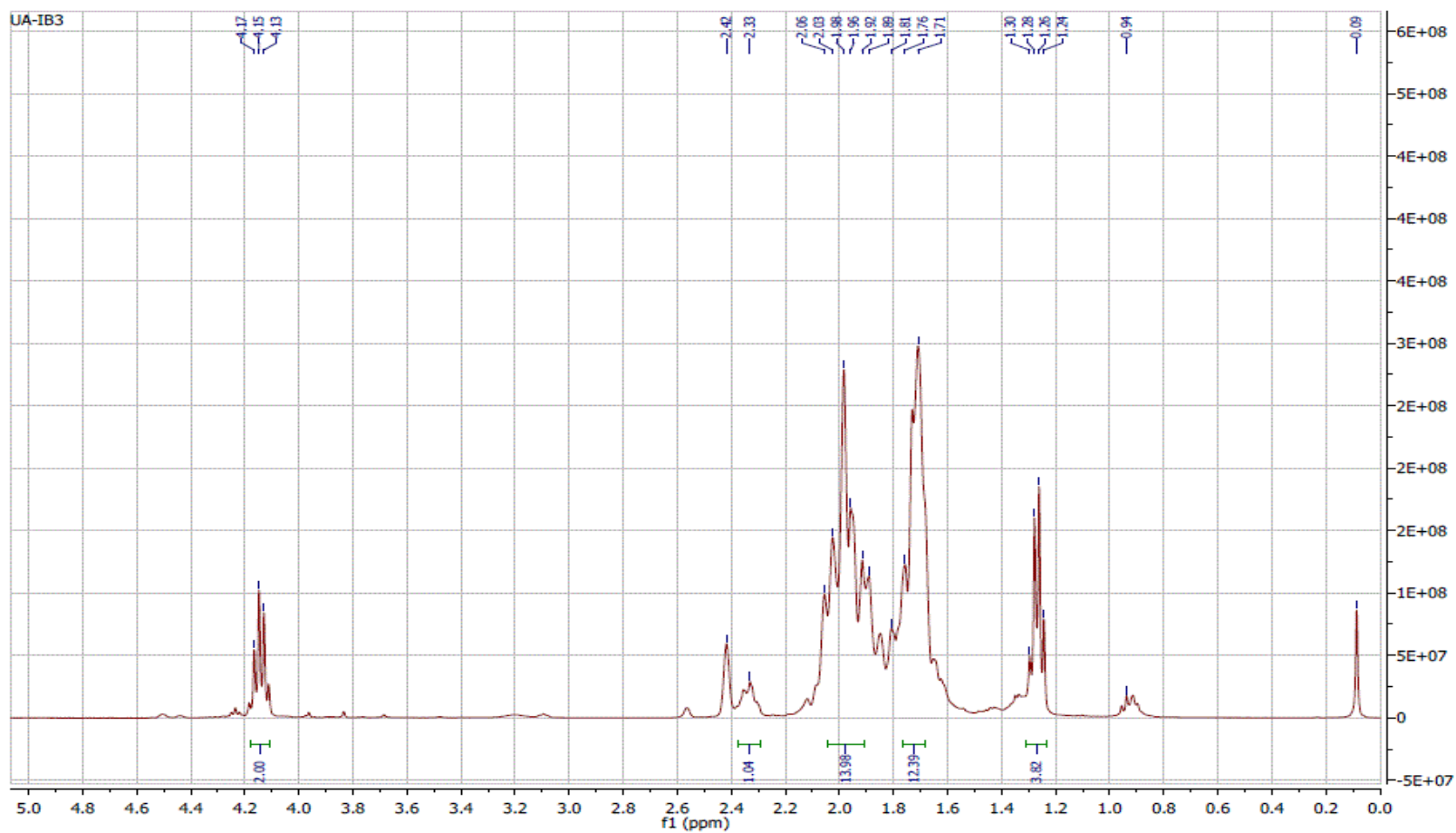


Figura VII-5: Espetro de ¹H-RMN do composto (3)

7.3.2. Espetro de massa

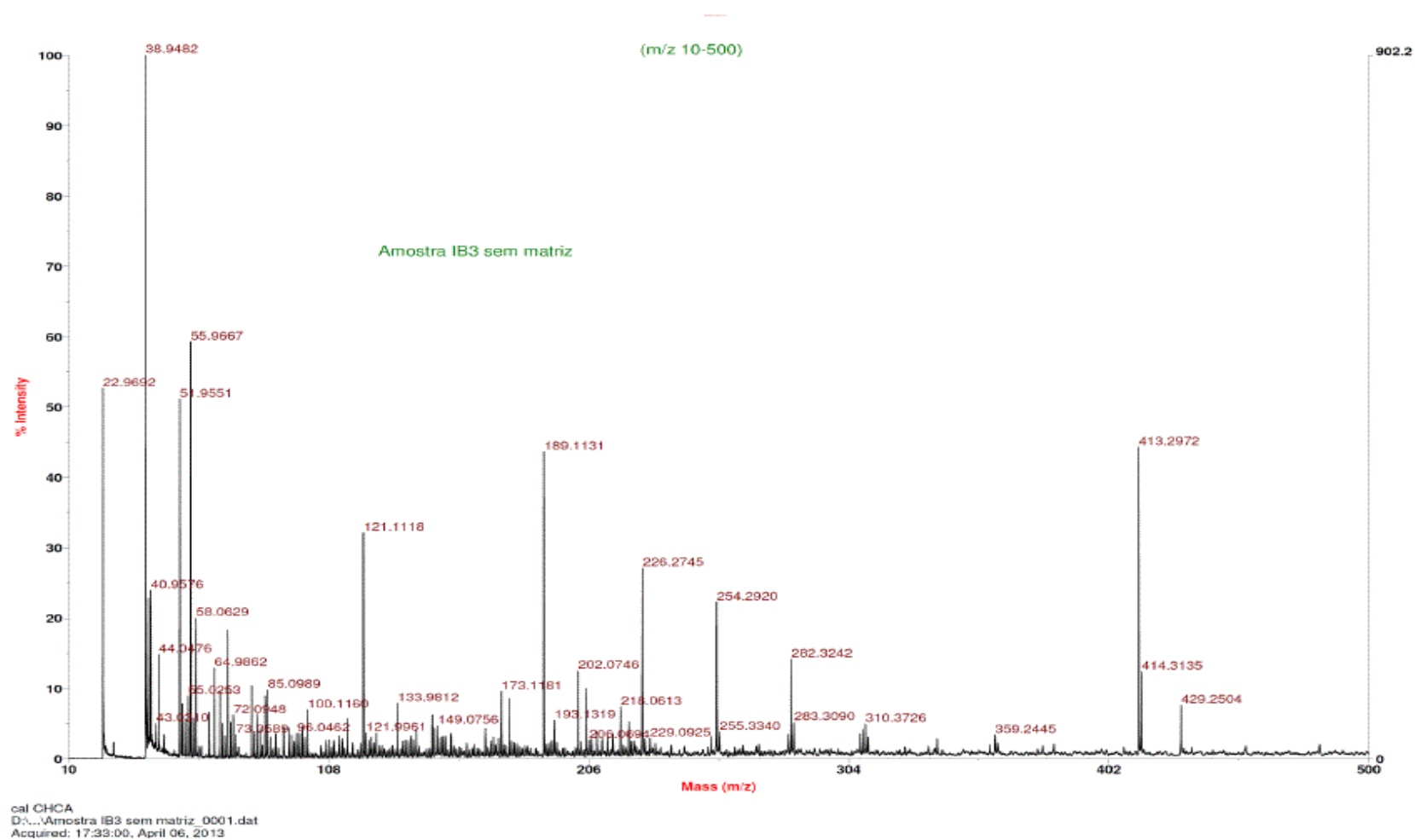


Figura VII-6: Espetro de massa do composto (3)

7.4. Composto (4)

7.4.1. Espetro de ^1H -RMN

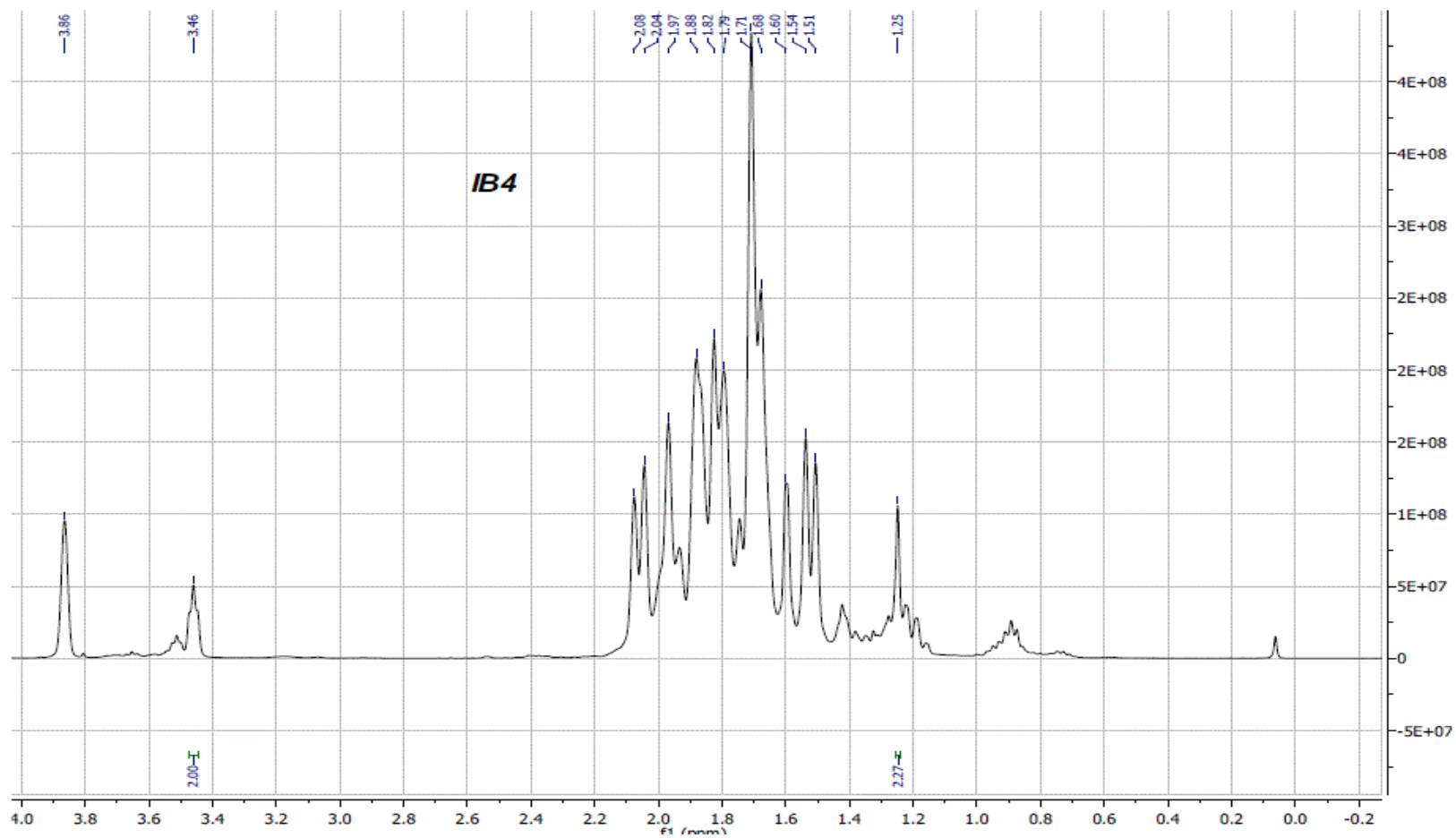


Figura VII-7: Espetro de ^1H -RMN do composto (4)

7.4.2. Espectro de massa

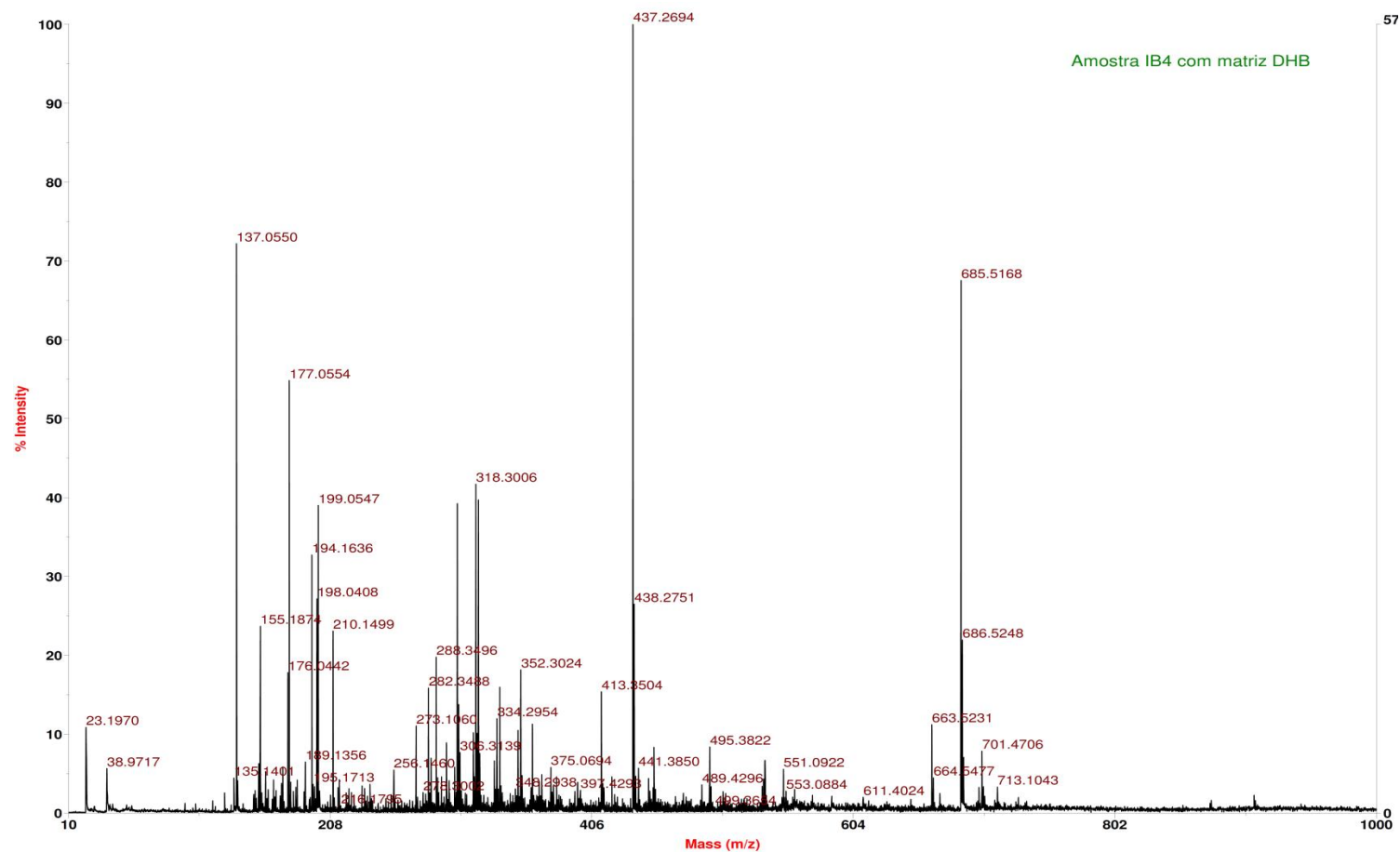


Figura VII-8: Espectro de massa do composto (4)

7.5. Composto (5)

7.5.1. Espectro de ^1H -RMN

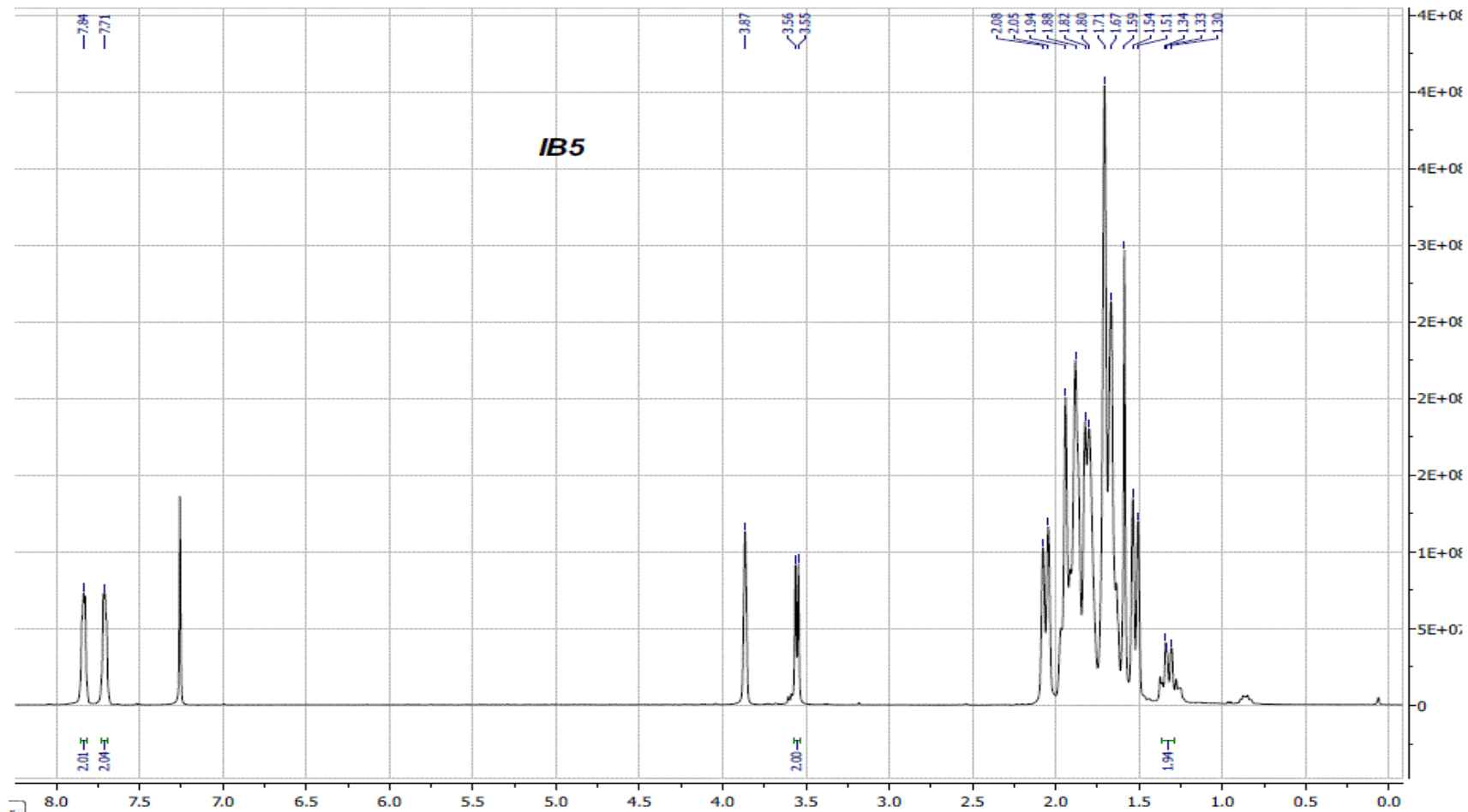


Figura VII-9: Espectro de ^1H -RMN do composto (5).

7.5.2. Espetro de massa

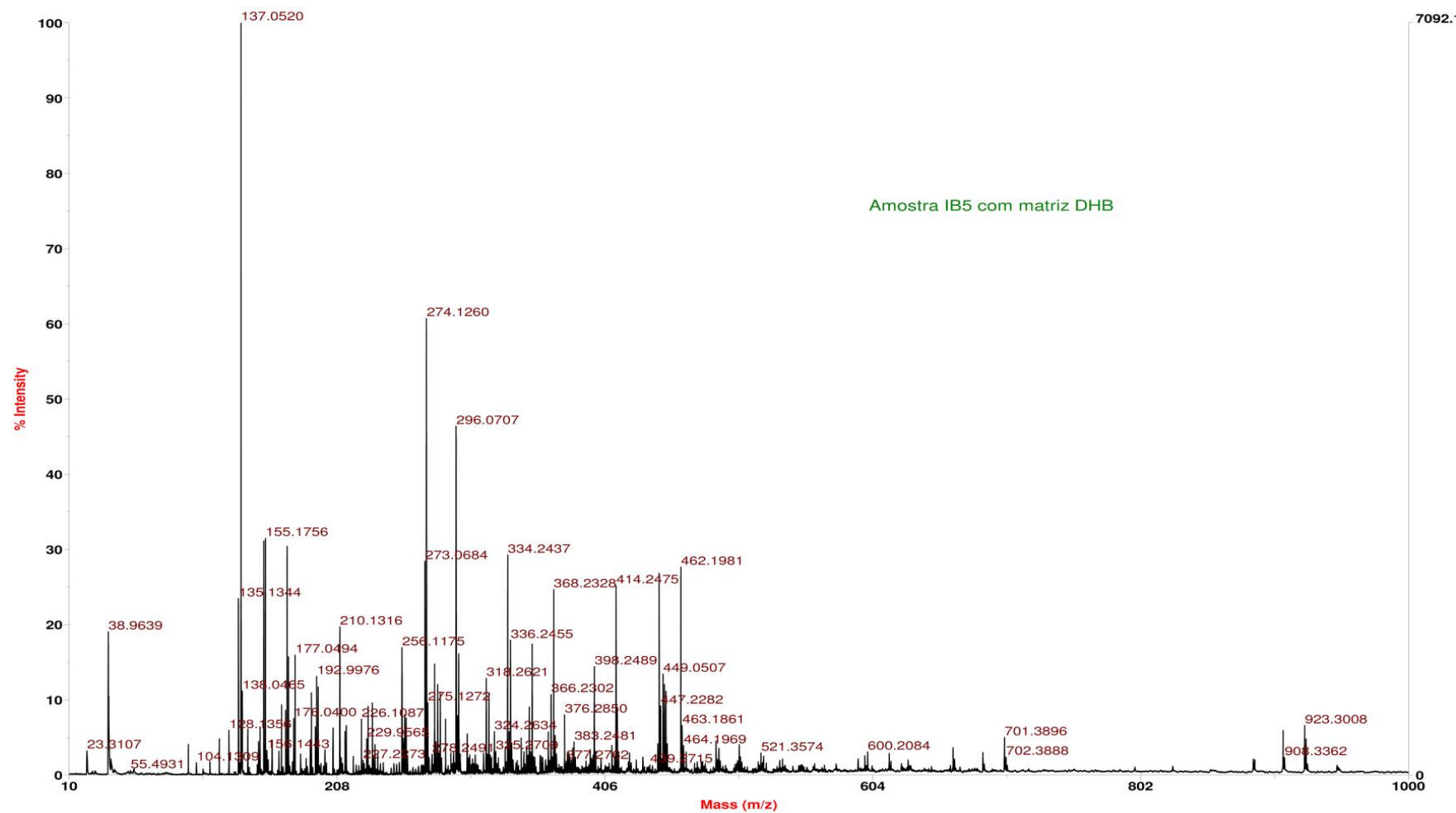


Figura VII-10: Espetro de massa do composto (5).

7.6. Composto (6)

7.6.1. Espetro de ^1H -RMN

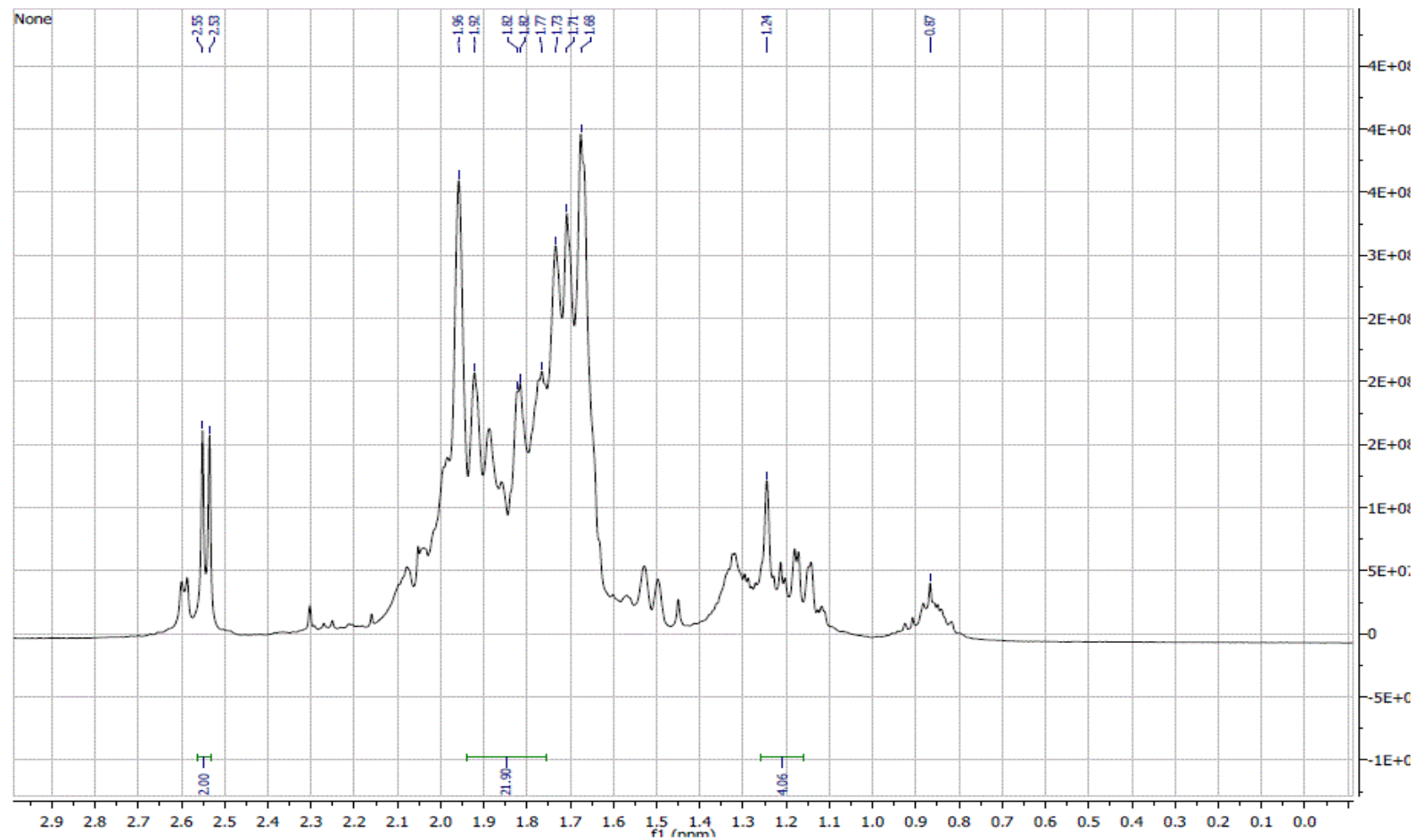


Figura VII-11: Espetro de ^1H -RMN do composto (6)

7.6.2. Espectro de massa

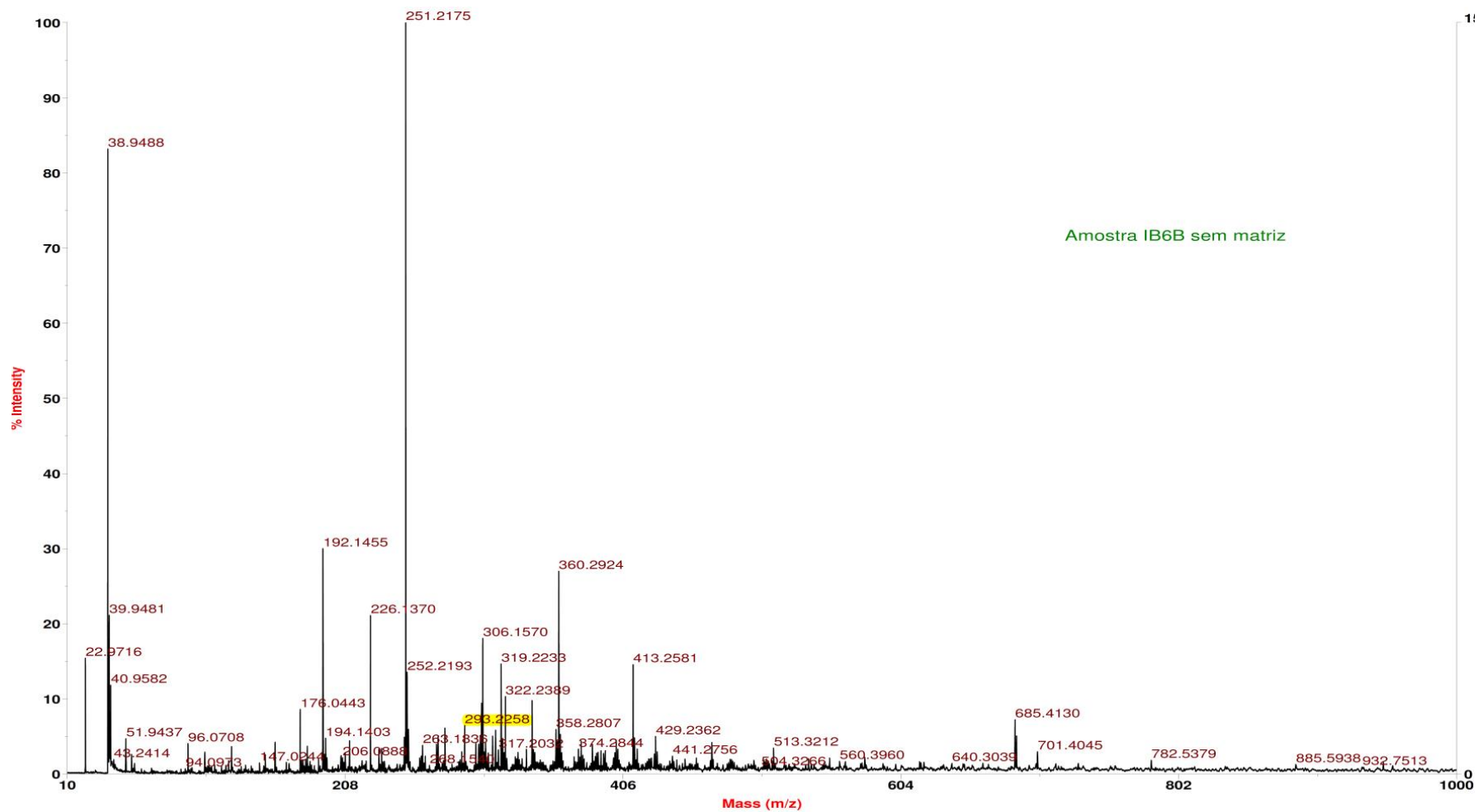


Figura VII-12: Espectro de massa do composto (6).

7.7. Composto (7)

7.7.1. Espetro de ^1H -RMN

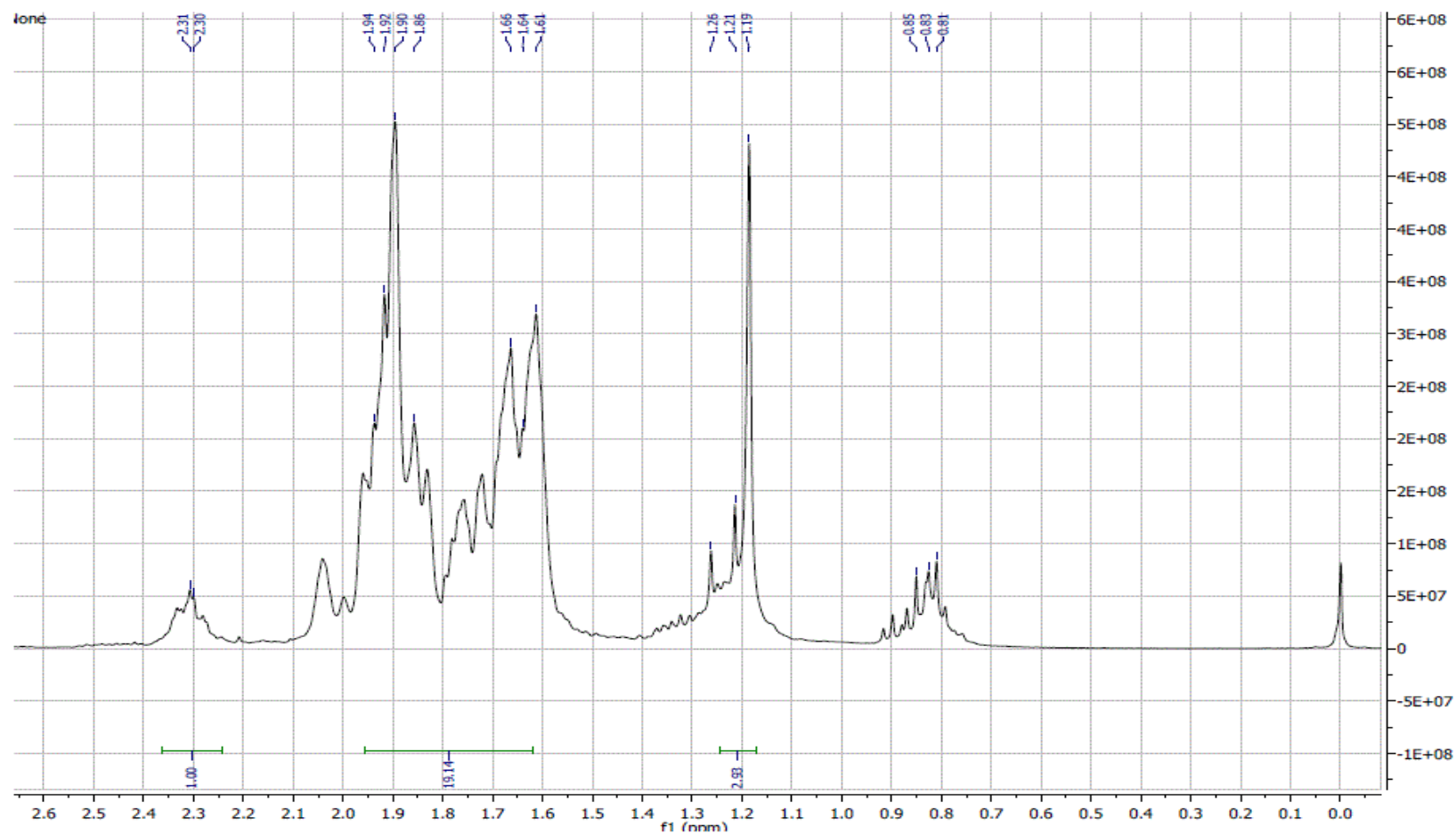


Figura VII-13: Espetro de ^1H -RMN do composto (7).

7.7.2. Espectro de massa

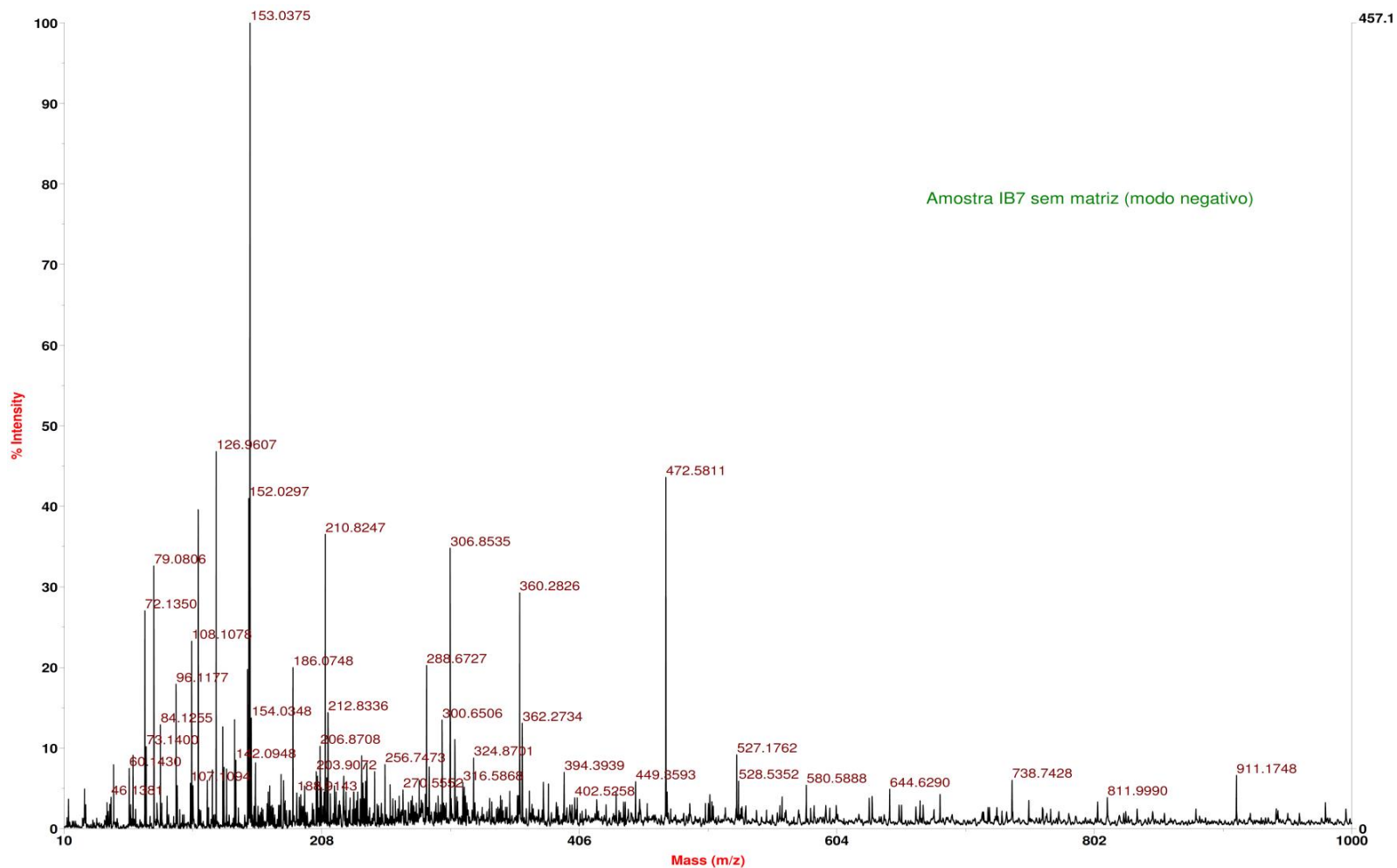


Figura VII-14: Espectro de massa do composto (7).

7.8. Composto (8)

7.8.1. Espetro de ¹H-RMN

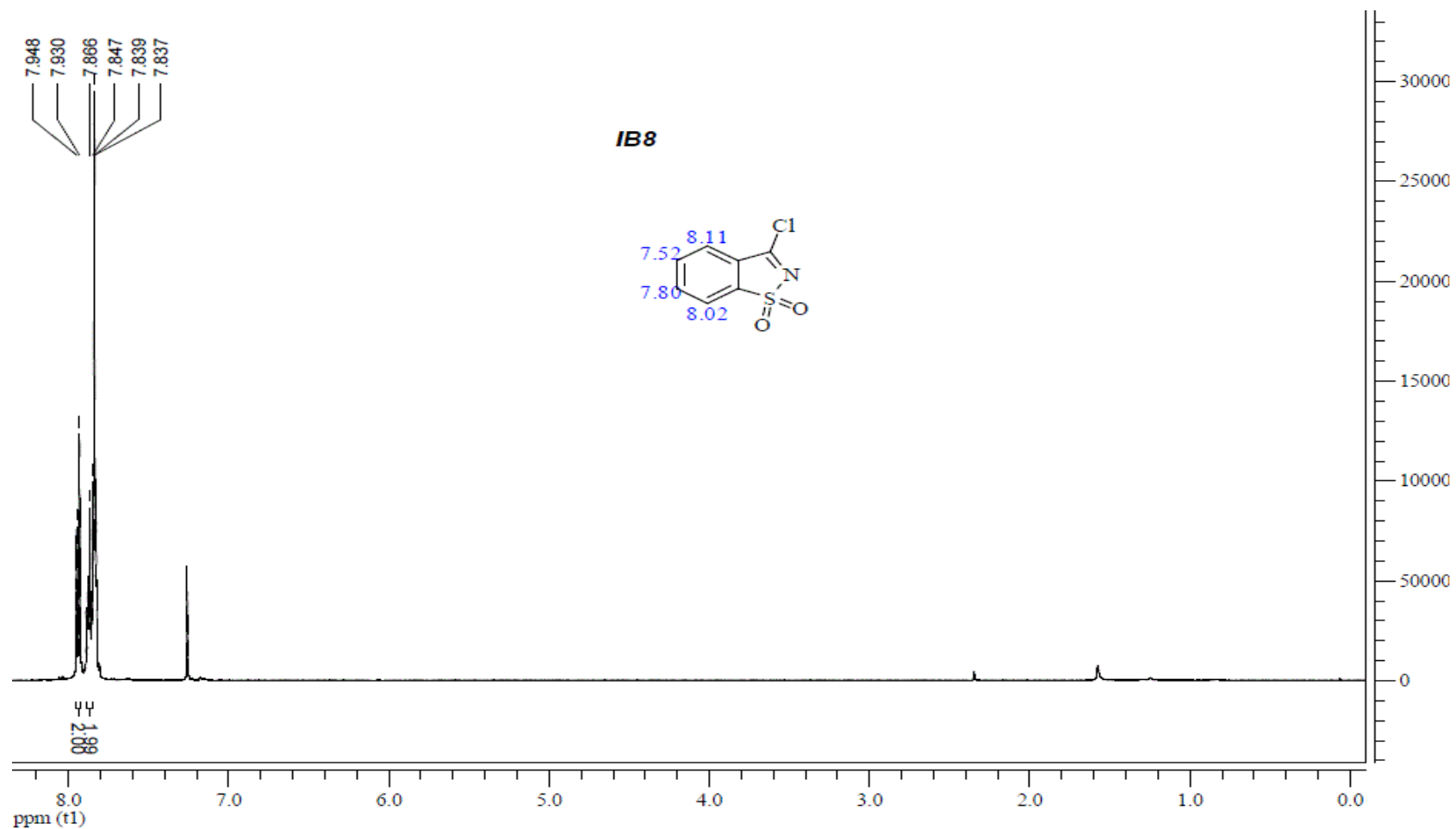


Figura VII-15: Espetro de ¹H-RMN do composto (8).

7.9. Composto (9)

7.9.1. Espetro de ¹H-RMN

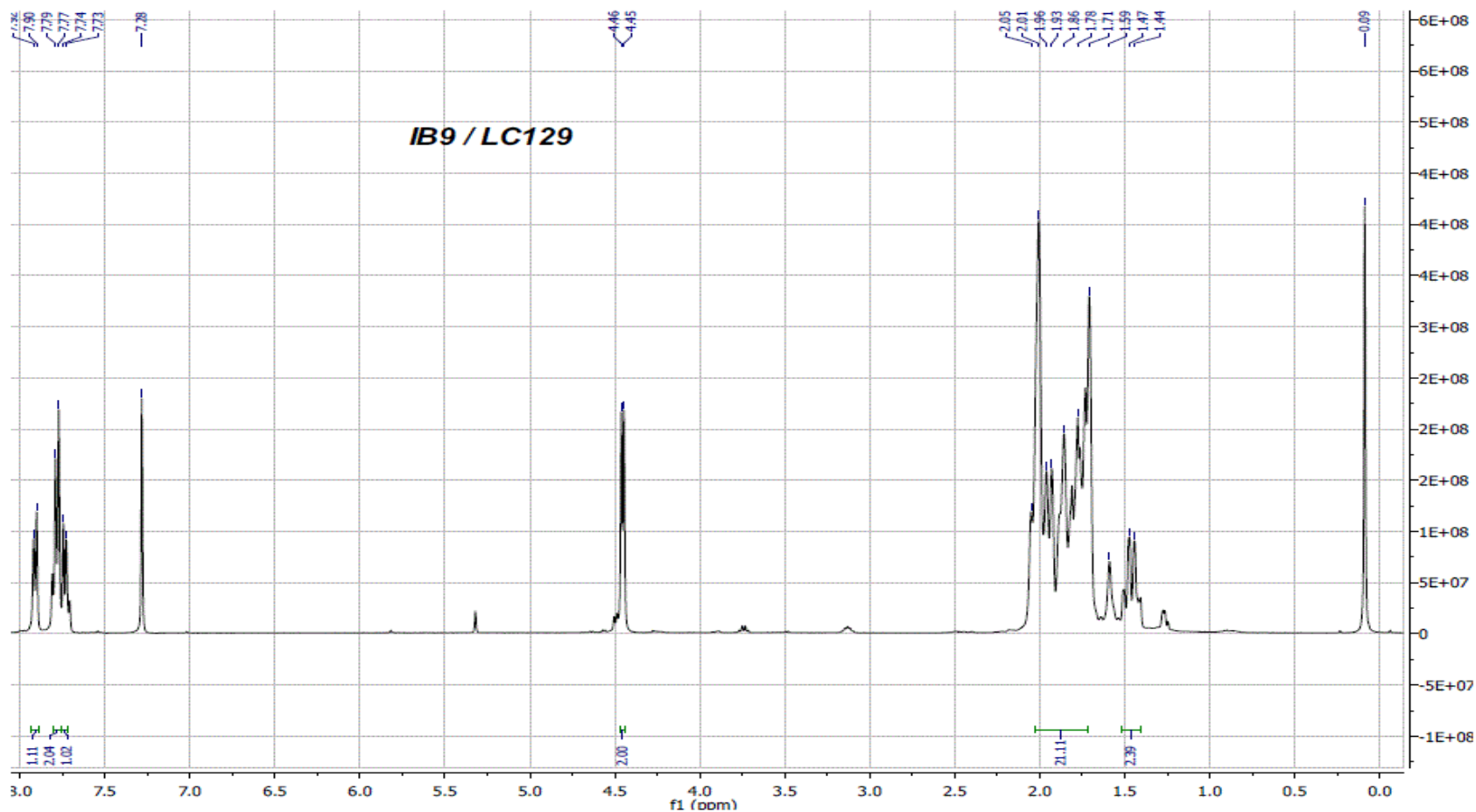


Figura VII-16: Espetro de ¹H-RMN do composto (9).

7.9.2. Espetro de massa

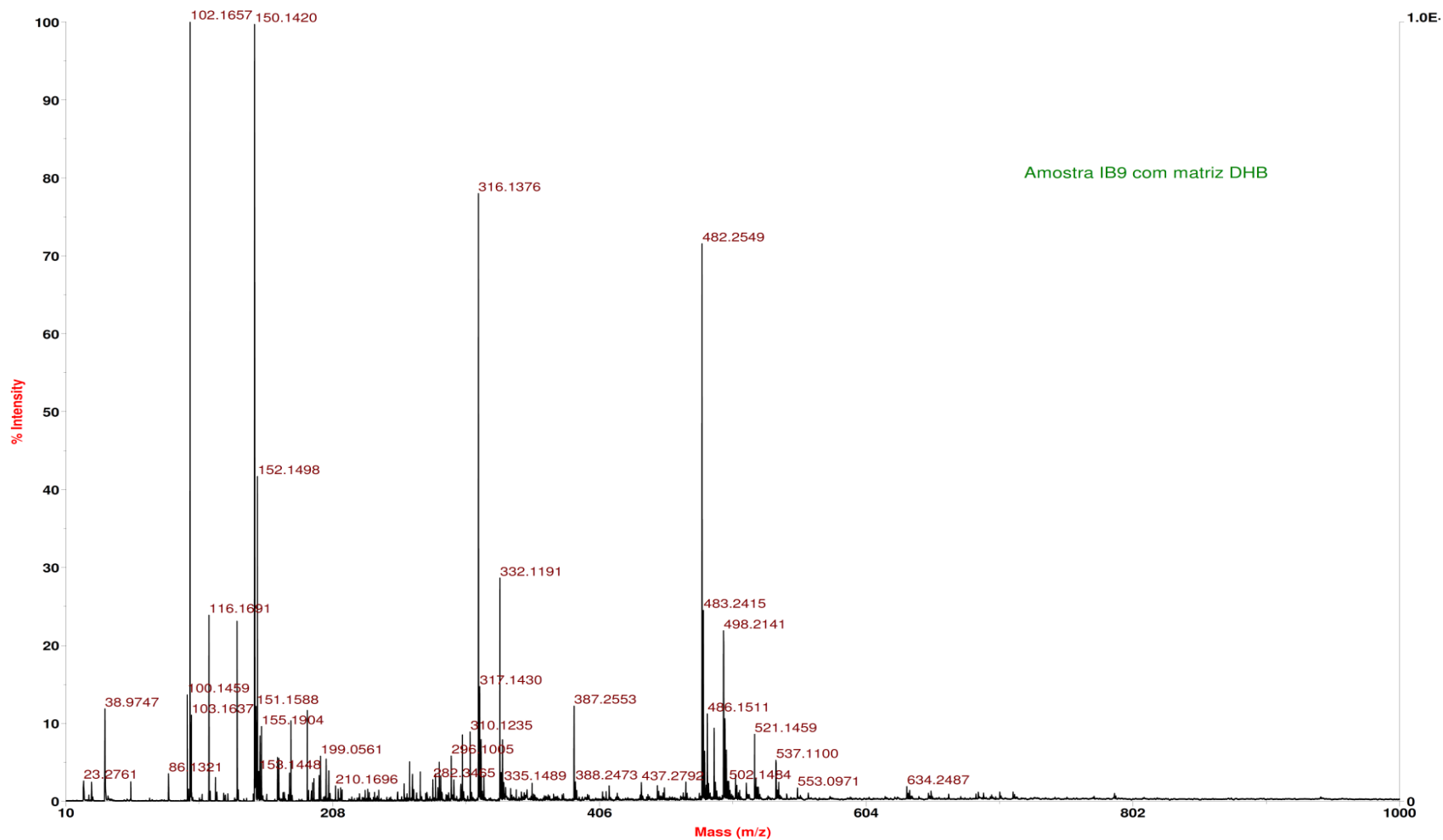


Figura VII-17: Espetro de massa do composto (9).

7.10. Composto (10)

7.10.1. Espectro de ^1H -RMN

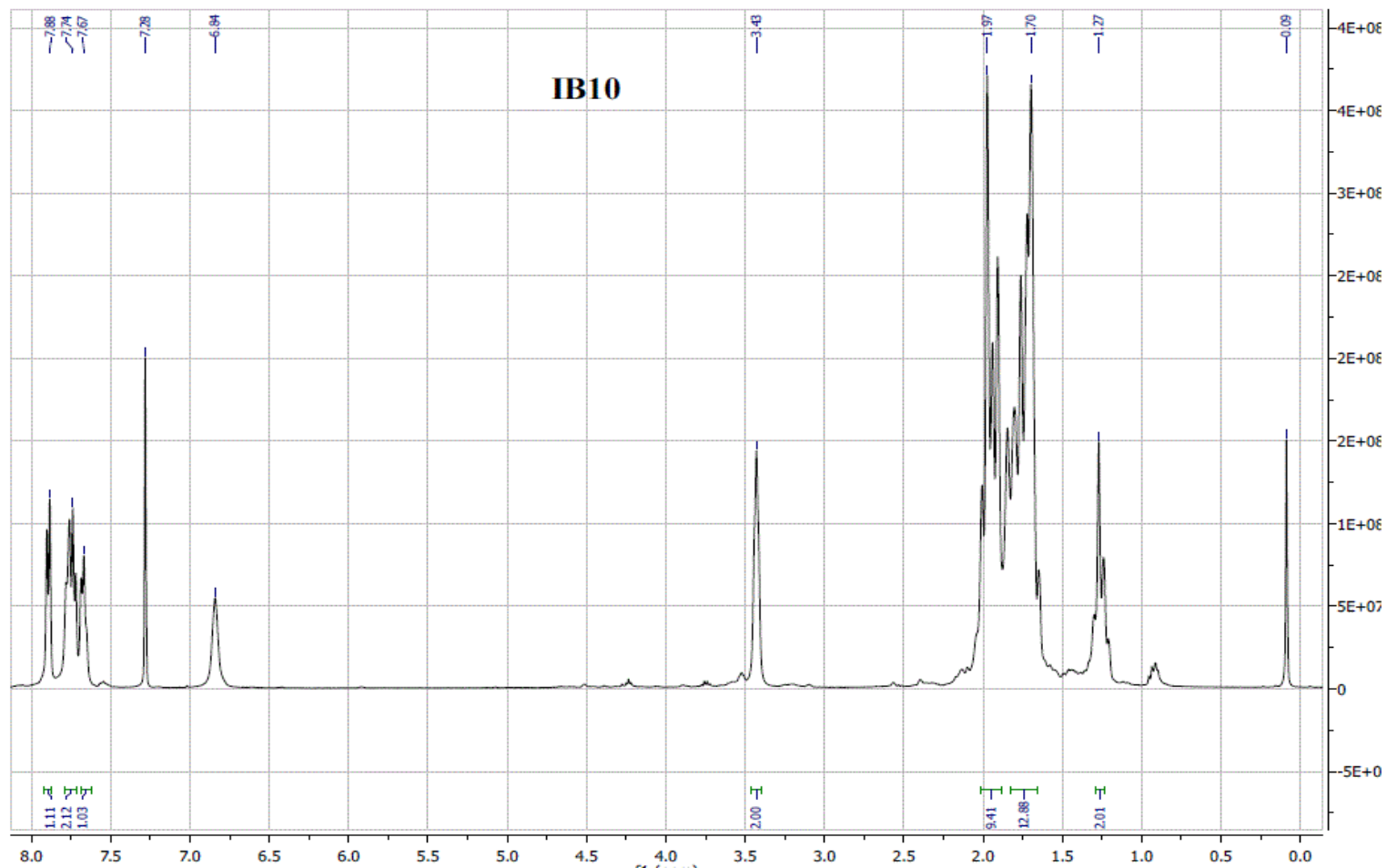


Figura VII-18: Espectro de ^1H -RMN do composto (10).

7.10.2. Espetro de massa

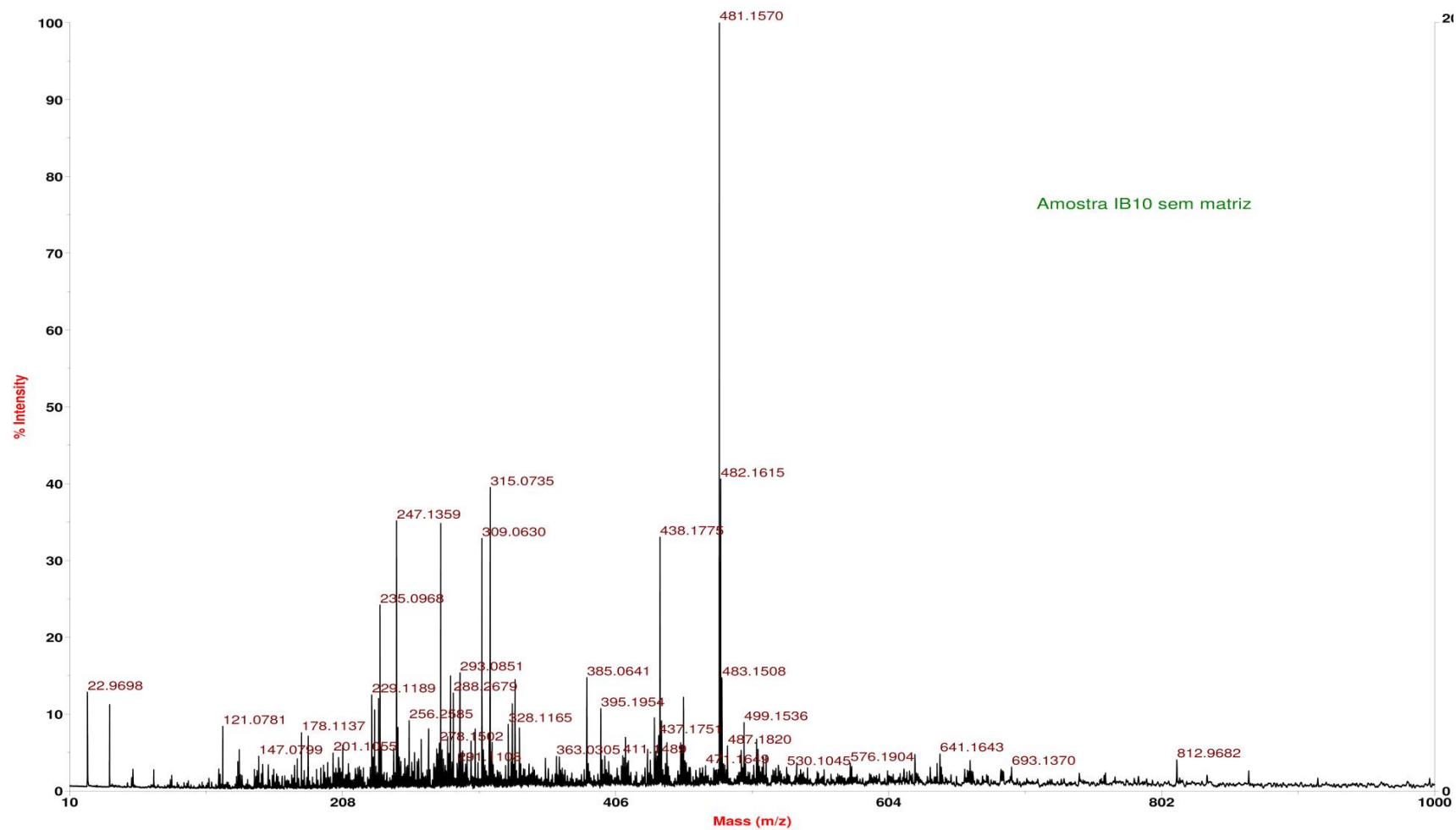


Figura VII-19: Espetro de massa do composto (10).

7.11. Composto (11)

7.11.1. Espectro de ¹H-RMN

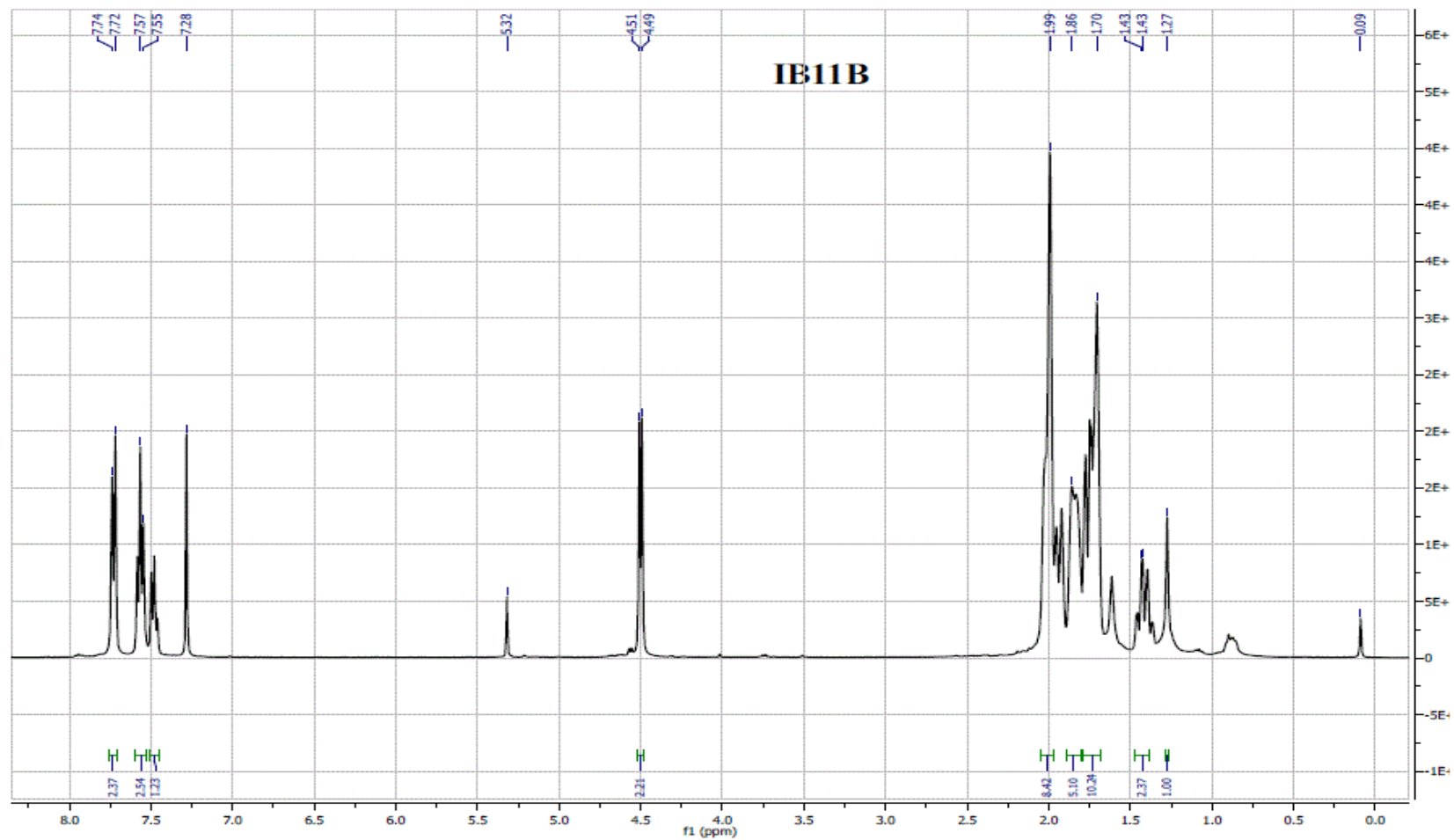


Figura VII-20: Espectro de ¹H-RMN do composto (11).

7.11.2. Espectro de massa

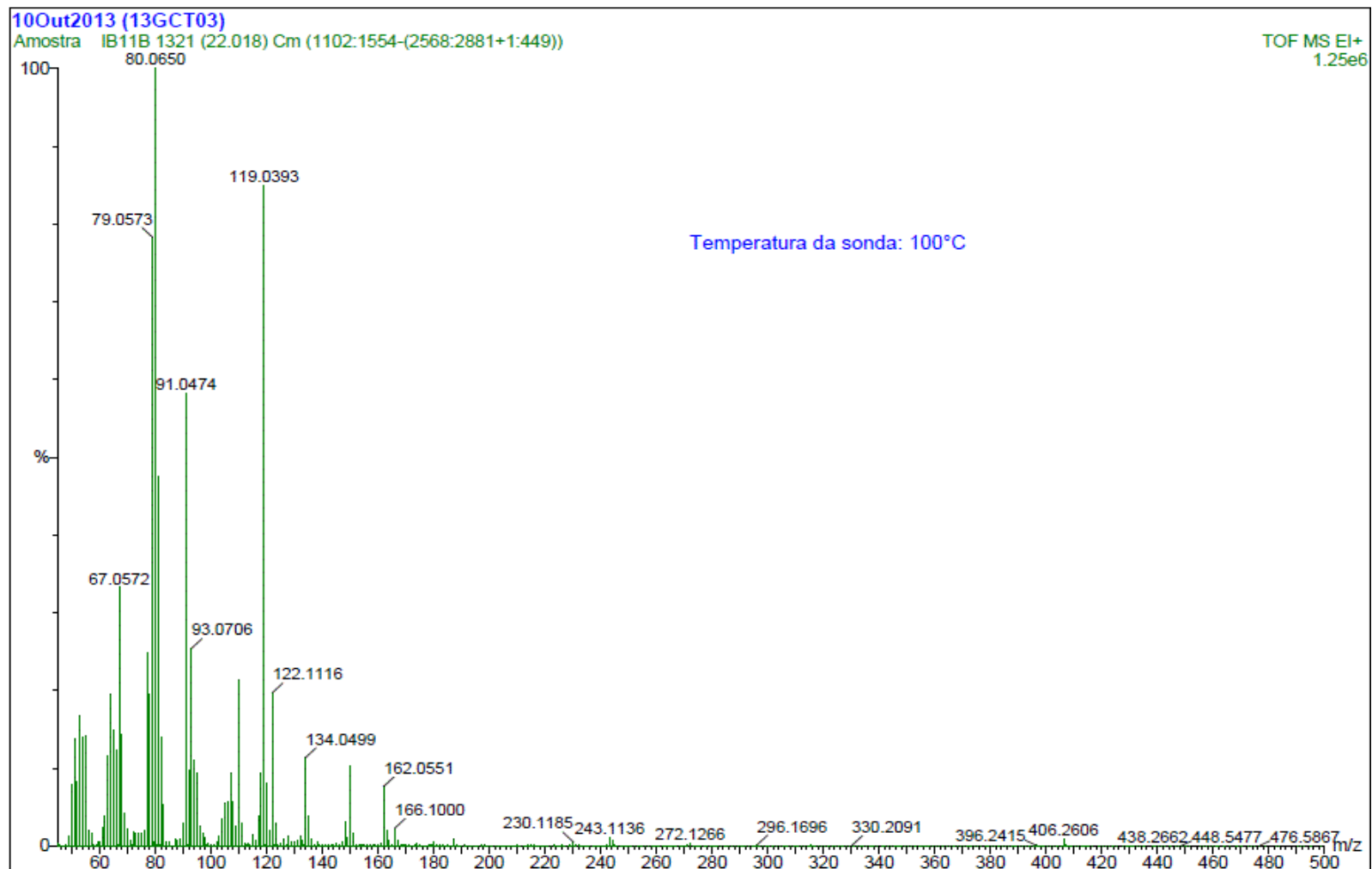


Figura VII-21: Espectro de massa do composto (11).