



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Departamento de Química e Farmácia

**Utilização de compostos com atividade
antimalárica no tratamento de
infecções parasitárias provocadas por
*Perkinsus olsenii***

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas

Catarina Gonçalves Dias

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

2018

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, 8 de janeiro de 2018

Catarina Gonçalves Dias

© 2018 Catarina Gonçalves Dias

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar 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

Em primeiro lugar gostaria de expressar a minha gratidão à minha orientadora de tese, a professora Doutora Maria de Lurdes Cristiano, pelo facto de me ter aceitado como sua orientanda, pela sua disponibilidade para me ajudar e orientar na realização deste trabalho, pela oportunidade em termos de valorização e formação científica que me proporcionou por ter realizado o trabalho prático no seu laboratório e ter integrado parte da sua investigação, e por todos os ensinamentos académicos que prestou durante todo o meu percurso académico.

Um grande obrigada à minha amiga e “co-orientadora” de tese: a Lília! És uma pessoa muito humana e compreensiva, e foi um prazer trabalhar contigo. Felizmente a realização deste trabalho, além da valorização académica, permitiu “descobrir” uma das melhores pessoas que conheço hoje em dia. Agradeço a sua disponibilidade, os conhecimentos que me transmitiu, a sua boa disposição. Sem a sua ajuda seria muito complicada a realização da componente laboratorial, foi sem dúvida uma pessoa fundamental para a realização deste trabalho

Um agradecimento muito especial à minha amiga Teresa, que além de ter sido um grande apoio durante o meu percurso académico, também o foi, e é na minha pessoal.

Quero agradecer à minha madrinha académica, Catarina, que me ajudou desde o início do meu percurso académico, pela enorme motivação, conselhos, apoio e pela amizade que construímos.

Um muito obrigada à minha amiga Patrícia, um pilar essencial nos momentos mais críticos durante estes últimos 5 anos, pela motivação, insistência, conselhos, e apoio, não só na vida académica, mas também na vida pessoal.

Aos meus pais, um obrigada especial por me aturarem nos momentos mais complicados deste percurso académico, pela força, pelo apoio que me deram, pela paciência e tolerância.

Um agradecimento especial ao Daniel pela força, pelo ânimo e pelo apoio que me deu durante a realização deste trabalho, e nos momentos mais “críticos”...

A todos os que, de algum modo, contribuíram para a minha chegada ao fim desta etapa o meu sincero agradecimento.

RESUMO

A perkinsose é uma doença infecciosa causada pelo parasita protozoário *Perkinsus olseni*. Este parasita é responsável por elevadas taxas de mortalidade em bivalves e moluscos aquáticos, nas costas Europeia, Americana, Asiática e Australiana, com percentagens de mortalidade superiores a 50% em várias zonas da bacia mediterrânica, nomeadamente em Espanha, França, Itália e Portugal, atingindo os 80% na costa algarvia.

Ao largo da Ria Formosa e da Ria de Alvor, o cultivo de bivalves assume elevado impacto económico, uma vez que permite o emprego direto e indireto de um número elevado de pessoas. Contudo, apesar de *Perkinsus olseni* não ser directamente patológico para o ser humano, tem-se verificado uma mortalidade significativa das culturas de bivalves das espécies *Ruditapes decussatus*, *Crassostrea gigas* e *Crassostrea angulata* e de outros moluscos em aquacultura nestas regiões do Algarve, provocando um declínio na produção, com repercussões diretas a nível financeiro e social. Desta forma, a resolução deste problema assume uma elevada importância para a região algarvia.

Apesar dos esforços realizados para o controlo e eliminação da perkinsose, não existe até a data uma estratégia terapêutica eficaz de combate do parasita e as medidas profiláticas que poderiam conduzir a uma redução das perdas são de difícil implementação, não sendo praticáveis nem economicamente viáveis. No sentido de controlar as perdas por perkinsose em aquacultura foram testados alguns compostos em *Perkinsus*, nomeadamente herbicidas, agentes quelantes de ferro e alguns compostos com atividade antiprotozoária reconhecida, de entre os quais se destacam alguns antimaláricos. De entre estes, destacam-se estudos recentes com alguns derivados de artemisinina e análogos deste fármaco, tendo-se encontrado analogias com o observado em *Plasmodium*.

De entre os derivados de artemisinina destacam-se os 1,2,4 – trioxolanos e os 1,2,4,5 – tetraoxanos, compostos heterocíclicos dotados de pelo menos uma ponte peróxido. Esta classe terapêutica apresenta diversos compostos que podem constituir potenciais candidatos para o tratamento de doenças resultantes de infeções por parasitas protozoários e que estejam associadas a um impacto mais direto na saúde pública, nomeadamente a malária, a toxoplasmose e a leishmaniose. O potencial farmacológico dos trioxolanos e dos tetraoxanos impulsionou a otimização de estratégias de síntese de novos derivados, de forma a ampliar as bibliotecas de novos compostos para estudos de atividade farmacológica e possibilitar a identificação de novos candidatos a fármacos.

Desta forma, a presente dissertação descreve os esforços até agora realizados no sentido do desenvolvimento de soluções eficazes para o controlo da perkinsose, perspectivando futuros desenvolvimentos nesta área. Além disso, apresenta uma revisão bibliográfica dos aspetos relacionados com a morfologia de *Perkinsus olseni*, bem como dos fundamentos teóricos e algumas metodologias de síntese de 1,2,4-trioxolanos e 1,2,4,5-tetraoxanos.

No âmbito desta dissertação foram também descritos os trabalhos laboratoriais realizados pela autora e que envolveram a preparação de novos peróxidos sintéticos e semissintéticos, nomeadamente trioxolanos, tetraoxanos e outros derivados da artemisinina,

para posteriormente verificar o seu efeito antiproliferativo em *Perkinsus olseni*. Estes compostos podem também ser testados noutros parasitas responsáveis por doenças com impacto na saúde pública, como malária, leishmaniose e toxoplasmose. Os resultados obtidos para os compostos já avaliados apresentam valores de IC₅₀ na ordem micromolar.

Palavras chave: *aquacultura, perkinsus olseni, trioxolanos, tetraoxanos, agentes antimaláricos*

ABSTRACT

Perkinsosis is an infectious disease caused by the protozoan parasite *Perkinsus olseni* and is responsible for the high mortality rates in aquatic bivalves and mollusks on the European, American, Asian and Australian shores, with mortality rates over 50% in various parts of the Mediterranean basin, including Spain, France, Italy and Portugal, reaching 80% on the coast of Algarve.

Along the Ria Formosa and the Ria de Alvor, bivalve cultivation has a high economic impact, since it allows the direct and indirect employment of a large number of people. However, although *Perkinsus olseni* is not directly pathological for humans, there has been a significant mortality among bivalve cultures of the species *Ruditapes decussatus*, *Crassostrea gigas* and *Crassostrea angulata* and other aquaculture molluscs in these regions of the Algarve, causing a decline in production with direct financial and social repercussions. In this context, tackling the issue of perkinsosis assumes a high importance for the Algarve region.

Despite the efforts made to control and eliminate perkinsosis, it has proved very difficult, as there is no effective therapeutic strategy to fight the parasite to date. Additionally, prophylactic measures that could lead to a reduction of losses are difficult to implement, generally not feasible nor economically viable. In order to control losses in aquaculture due to perkinsosis, some compounds were tested against *Perkinsus*, like herbicides, iron chelating agents and some compounds with known antiprotozoal activity, among them some antimalarials. Of these, recent studies with some artemisinin derivatives and analogs of this drug stand out, and analogies with *Plasmodium* have been found.

Within the general family of endoperoxides, heterocyclic compounds endowed with at least one peroxide bridge, 1,2,4-trioxolanes and 1,2,4,5-tetraoxanes are especially relevant. This therapeutic class comprises compounds that may constitute potential candidates for the treatment of parasite-borne diseases other than perkinsosis, and which have a more direct impact on public health, like malaria, toxoplasmosis and leishmaniasis. The pharmacological potential of trioxolanes and tetraoxanes has led to the optimization of strategies for the synthesis of new derivatives, in order to expand the libraries of new compounds for pharmacological activity studies and to enable the identification of new drug candidates.

This dissertation reviews the efforts made so far to develop effective solutions for the control of perkinsosis, with a view to future developments in this area. In addition, a bibliographical review of the aspects related to the morphology of *Perkinsus olseni*, as well as the theoretical foundations and some synthetic methodologies to prepare 1,2,4-trioxolanes and 1,2,4,5-tetraoxanes, are presented.

In addition, the laboratory work carried out by the author, aimed at the preparation of new synthetic and semisynthetic peroxides, namely trioxolanes, tetraoxanes and other artemisinin derivatives, for assessment as antiproliferative agents against *Perkinsus olseni*, is described. The compounds prepared may also be tested against other parasites responsible for diseases that impact in public health, such as malaria, leishmaniasis, and toxoplasmosis. The results obtained for the compounds evaluated show IC_{50} values in the micromolar range.

Keywords: *aquaculture, perkinsus olsenii, trioxolanes, tetraoxanes, antiparasitic agents, drug design*

ÍNDICE REMISSIVO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii

I. INTRODUÇÃO	1
1.1 O crescimento demográfico e o setor piscícola	1
1.2 A Aquicultura.....	2
1.2.1 A aquicultura no contexto mundial.....	2
1.2.2 A aquicultura no contexto europeu	4
1.2.3 A aquicultura no contexto nacional: Portugal.....	4
1.3 Desafios e problemas associados à aquicultura.....	6
1.3.1 Desenvolvimento de doenças em aquicultura.....	8
1.3.1.1 Doenças que afetam os bivalves produzidos em aquicultura.....	9
1.4 Perkinsose	10
1.4.1 O parasita: <i>Perkinsus olseni</i>	11
1.4.1.1 Ciclo de vida de <i>Perkinsus olseni</i>	11
1.4.1.2 Consequências imunológicas e fisiológicas nos hospedeiros infetados por <i>P. olseni</i>	15
1.4.1.3 Aspectos importantes na fisiologia e no metabolismo de <i>P. olseni</i>	18
i. Apicoplasto.....	18
ii. A via do shikimato e o metabolismo dos folatos.....	19
iii. Capacidade antioxidante e a necessidade de ferro em <i>P. olseni</i>	21
1.4.1.4 Classes terapêuticas utilizadas no tratamento e na prevenção da perkinsose causada por <i>P. olseni</i>	22
i. Herbicidas.....	23
ii. Compostos quelantes do ferro.....	25
iii. Compostos antimaláricos e derivados.....	26
a. Antagonistas dos folatos	26
b. Artemisinina e análogos.....	28
iv. Outros compostos com atividade antiprotozoária em <i>P. olseni</i>	30
1.5 Doenças que afetam a saúde humana causadas por outros protozoários do grupo Alveolata.....	30
1.5.1 Malária	31
1.5.1.1 O parasita: <i>Plasmodium spp</i>	31

1.5.1.1.1	Ciclo de vida de <i>Plamodium spp</i>	32
1.5.1.2	Classes terapêuticas utilizadas no tratamento e na prevenção da malária.....	34
i.	Antimaláricos de base aminoquinolínica	35
ii.	Antifolatos	37
iii.	Antibióticos.....	38
iv.	Artemisinina e derivados sintéticos e semissintéticos	39
1.5.2	Leishmanioses	42
1.5.3	Toxoplasmose.....	44
II.	ARTEMISININA E DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS E SINTÉTICOS.....	48
2.1	Mecanismo de ação da artemisinina e dos seus derivados.....	49
2.2	Endoperóxidos semissintéticos	52
2.3	Endoperóxidos sintéticos	53
2.3.1.	1,2,4 – Trioxanos	54
2.3.1.1	Fenozan B07	55
2.3.1.2	Considerações sobre a metodologia de síntese de 1,2,4 - trioxanos.....	56
2.3.2.	1,2,4 - Trioxolanos.....	58
2.3.2.1	A evolução do OZ – 277 e o desenvolvimento do OZ – 439.....	61
2.3.2.2	Aspetos relacionados com o desenho e a síntese dos 1,2,4 - trioxolanos.....	64
2.3.3.	1,2,4,5 - Tetraoxanos.....	65
2.3.3.1	O desenvolvimento do RKA182.....	68
2.3.3.2	Aspetos relacionados com a metodologia de síntese dos 1,2,4,5- tetraoxanos. 69	
2.3.3.2.1	A importância da formação do intermediário de síntese 1,1-dihidroperóxido (<i>gem</i> – dihidroperóxido)	70
2.3.3.2.2	A formação de produtos secundários: hexaoxanos	71
2.3.3.2.3	Síntese de 1,2,4,5 – tetraoxanos simétricos e assimétricos.	72
III.	SÍNTESE DE PERÓXIDOS COM POTENCIAL ATIVIDADE CONTRA <i>PERKINSUS OLSENI</i>	83
3.1	Enquadramento da componente laboratorial	83
3.2	Aspetos relacionados com as estratégias de síntese e compostos preparados	85
3.2.1	Síntese dos 1,2,4,5-tetraoxanos CD1, CD2 e CD4, compostos (1), (2) e (4)	86
3.2.2	Síntese de desoxi-artesunato (CD3), composto (3).....	87
3.2.3	Síntese do 1,2,4,5 - tetraoxano CD5, composto (5)	89
3.2.4	Síntese do derivado 1,2,4,5-tetraoxano CD6, composto (6).....	90
3.2.5	Síntese da adamantil-metil oxima CD7, composto (7).....	93
3.2.6	Síntese dos 1, 2, 4 – trioxolanos CD8 e CD9, compostos (8) e (9).....	94

3.3 Resultados e discussão.....	95
IV. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	98
4.1 Equipamento	98
4.2 Procedimentos experimentais realizados ao longo da componente laboratorial	98
4.2.1 Síntese do 1,2,4,5-tetraoxano CD1, composto (1)	98
4.2.2 Síntese do 1,2,4,5 - tetraoxano CD2, composto (2)	99
4.2.3 Síntese do desoxi-artesunato (CD3), composto (3)	100
4.2.4 Síntese do 1,2,4,5 - tetraoxano CD4, composto (4)	100
4.2.5 Síntese do ácido carboxílico 1,2,4,5 - tetraoxano CD5, através da hidrólise do éster CD4, composto (5).....	100
4.2.6 Síntese do 1,2,4,5-tetraoxano CD6, composto (6), a partir do ácido carboxílico CD5.	101
4.2.7 Síntese da <i>O</i> -metil oxima da adamantanona CD7, composto (7)	101
4.2.8 Procedimento geral de síntese de 1, 2, 4-trioxolanos; síntese dos compostos CD8 e CD9	102
4.2.8.1 Síntese do 1, 2, 4-trioxolano CD8, composto (8).....	102
4.2.8.2 Síntese do 1, 2, 4-trioxolano CD9, composto (9).....	102
V. CONCLUSÃO	104
VI. BIBLIOGRAFIA.....	106

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I-1: Representação gráfica da produção mundial de peixe através de aquacultura e através da captura de espécies selvagens, desde 1950.....	2
Figura I-2: Evolução da produção de peixe através da captura e da aquacultura, desde os anos 80 até 2014, a nível mundial, em milhões de toneladas, e respetiva percentagem; evolução da proporção de produção de peixe proveniente de aquacultura comparativamente com a produção total, no mesmo período.	3
Figura I-3: Evolução da produção de peixe através da captura e da aquacultura na Europa, desde os anos 80 até 2014, em milhões de toneladas, e respetiva percentagem; evolução da proporção de produção de peixe proveniente de aquacultura, comparativamente com a produção total, no mesmo período.	4
Figura I-4: Esquema representativo do ciclo de vida de <i>Perkinsus spp</i> no meio aquático onde ocorre a zoosporulação (A) e no hospedeiro invertebrado (B).	13
Figura I-5: Representação das estruturas de herbicidas com efeito inibitório da proliferação de <i>P. olseni</i>	24
Figura I-6: Representação da estrutura molecular dos compostos quelantes de Fe (II) que apresentam atividade antiproliferativa em <i>P. olseni</i> : desferroxamina (DFO) e 2,2 – biperidilo.	25
Figura I-7: Representação da estrutura molecular dos antagonistas dos folatos utilizados na terapêutica da malária e testados em <i>P. olseni</i>	27
Figura I-8: Representação da estrutura molecular da artemisinina e dos seus derivados semissintéticos, utilizados no tratamento da malária.	28
Figura I-9: Representação da estrutura molecular dos endoperóxidos sintéticos (trioxolanos) que demonstraram atividade antiproliferativa em <i>P. olseni</i>	30
Figura I-10: Representação da estrutura molecular da cicloheximida.	30
Figura I-11: Esquema representativo do ciclo de vida de <i>Plasmodium spp</i> , no mosquito do género <i>Anopheles</i> e no hospedeiro vertebrado, o ser humano	34
Figura I-12: Representação da estrutura molecular do quinino e de alguns dos seus análogos.	36
Figura I-13: Representação da estrutura molecular de alguns antibióticos utilizados no tratamento da malária.	39
Figura I-14: Representação da estrutura molecular de um derivado semissintético da artemisinina e de alguns análogos sintéticos, em desenvolvimento para o tratamento da malária.....	40
Figura I-15: Esquema representativo do ciclo de vida de <i>Leishmania spp</i> , no inseto e no hospedeiro vertebrado, o ser humano	43
Figura I-16: Representação da estrutura molecular de alguns fármacos utilizados no tratamento da Leishmaniose.	44
Figura I-17: Esquema representativo do ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondi</i> , no hospedeiro definitivo e nos hospedeiros intermediários	46
Figura II-18: Representação estrutural da artemisinina.	48
Figura II-19: Representação estrutural da desoxiartemisinina.....	49
Figura II-20: Representação do mecanismo de bioativação da artemisinina mediado pela clivagem redutiva catalizada pelo Fe(II), que envolve a formação de radicais primários ou secundários, centrados em carbono	51

Figura II-21: Representação estrutural da dihidroatemisinina (DHA) e de alguns endoperóxidos semissintéticos preparados a partir da DHA.....	52
Figura II-22: Estrutura geral de 1,2,4-trioxano	54
Figura II-23: Representação estrutural do endoperóxido sintético Fenzan B07, dotado de atividade antimalárica.....	55
Figura II-24: Esquema representativo da metodologia de síntese de 1,2,4-trioxanos através de foto-oxigenação, tendo como intermediário de reação álcoois alílicos	57
Figura II-25: Estrutura geral de 1,2,4-trioxolano	58
Figura II-26: Representação estrutural de 1,2,4-trioxolanos utilizados como modelo para o estudo da estabilidade e atividade dos 1,2,4-trioxolanos	60
Figura II-27: Representação estrutural 1,2,4 – trioxolano sintético de primeira geração OZ-277	61
Figura II-28: Representação estrutural 1,2,4-trioxolano sintético de segunda geração OZ-439	63
Figura II-29: Esquema representativo da estratégia de síntese de 1,2,4 – trioxolanos tetrassubstituídos através do mecanismo de ozonólise.....	64
Figura II-30: Esquema representativo da estratégia de síntese de 1,2,4-trioxolanos através da reação de ozonólise envolvendo O-metil-2-adamantiloxima e uma ciclohexanona substituída na posição 4.....	65
Figura II-31: Representação da estrutura geral dos 1,2,4,5 – tetraoxanos	66
Figura II-32: Esquema representativo dos compostos modelo utilizados nos estudos de relação estrutura-atividade dos 1,2,4 – trioxolanos e das consequências resultantes da posterior otimização estrutural pela alteração para o núcleo 1,2,4,5 – tetraoxano.....	67
Figura II-33: Representação estrutural 1,2,4,5-tetraoxano sintético RKA182.....	68
Figura II-34: Esquema representativo da alteração estrutural aos 1,2,4,5-tetraoxanos análogos do RKA182, com posterior preparação dos derivados 1,2,4,5-tetraoxanos de segunda geração (sem ligação amida)	69
Figura II-35: Representação da estrutura geral dos intermediários de síntese: 1,1 - dihidroperóxido.....	70
Figura II-36: Representação da estrutura geral dos 1,2,4,5,7,8 – hexaóxanos	71
Figura II-37: Esquema representativo das várias metodologias de síntese dos tetraoxanos simétricos.....	73
Figura II-38: Esquema representativo das várias metodologias de síntese dos tetraoxanos assimétricos.....	74
Figura II-39: Esquema representativo da metodologia de síntese dos tetraoxanos assimétricos através do processo de ozonólise.	75
Figura II-40: Esquema representativo da metodologia de síntese dos tetraoxanos “one-pot”, através do sistema H ₂ O ₂ /MTO em álcool fluorado.....	75
Figura II-41: Esquema representativo da metodologia de síntese de DHPs através do sistema H ₂ O ₂ /I ₂ , utilizando acetonitrilo como solvente.	76
Figura II-42: Esquema representativo da metodologia de síntese de tetraoxanos através do sistema H ₂ O ₂ /I ₂ em acetonitrilo, em “one-pot”	77
Figura II-43: Esquema representativo da metodologia de síntese de 1,1-dihidroperóxidos usando o sistema H ₂ O ₂ / Re ₂ O ₇ em acetonitrilo.	78

Figura II-44: Esquema representativo do procedimento de síntese de 1,2,4,5-tetraoxanos, através de um método “one-pot” ou “two pot”, utilizando o sistema H ₂ O ₂ /Re ₂ O ₇ em acetonitrilo.....	78
Figura II-45: Esquema representativo da estratégia de síntese de DHPs através da utilização de PMA como catalisador.	79
Figura II-46: Esquema representativo da estratégia de síntese em “one-pot” de tetraoxanos assimétricos, através da utilização de PMA como catalisador e de MgSO ₄ como agente secante.	80
Figura II-47: Esquema representativo da estratégia de síntese de tetraoxanos em ponte, a partir de β-dicetonas, utilizando PMA ou PTA como catalisador.	80
Figura II-48: Esquema representativo da estratégia de síntese de DHPs usando Bi(OTf) ₃ como catalisador e da mistura CH ₃ CN/CH ₂ Cl ₂ como solventes de reação.....	81
Figura II-49: Esquema representativo do método de síntese em “one-pot” de tetraoxanos simétricos ou assimétricos através do uso de Bi(OTf) ₃ como catalisador e da mistura CH ₃ CN/CH ₂ Cl ₂ como solventes de reação.	82
Figura II-50: Esquema representativo da estratégia de síntese de DHPs usando nitrato de cério como catalisador e CH ₃ CN como solvente, à temperatura ambiente.	82
Figura III-51: Representação das estruturas de 1,2,4 – trioxolanos e 1,2,4,5 – tetraoxanos preparados.	85
Figura III-52: Esquema de síntese dos 1,2,4,5 – tetraoxanos CD1, CD2 e CD4, compostos (1), (2) e (4).	86
Figura III-53: Proposta mecanística para a formação dos 1,2,4,5-tetraoxanos CD1 (1), CD2 (2) e CD4 (4) partindo da 2-adamantanona, com ciclohexanona, 4-piperidinona, e 4-oxociclohexanocarboxilato de etilo, respetivamente.....	87
Figura III-54: Esquema de síntese do desoxi-artesunato, composto (3).	88
Figura III-55: Proposta mecanística para a formação do desoxi-artesunato CD3, composto (3).	89
Figura III-56: Esquema de síntese do 1,2,4,5-tetraoxano CD5, composto (5).....	90
Figura III-57: Proposta mecanística para a formação do 1,2,4,5-tetraoxano CD5 (5) através da hidrólise do grupo éster presente no 1,2,4,5-tetraoxano CD4.....	90
Figura III-58: Representação da estrutura de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e de 1-hidroxi-1H-benzotriazol (HOBt)	91
Figura III-59: Esquema de síntese do 1,2,4,5-tetraoxano CD6, composto (6).....	92
Figura III- 60: Proposta mecanística para a formação do 1,2,4,5 – tetraoxano CD6 (6).....	92
Figura III-61: Esquema de síntese da adamantil-metiloxima CD7, composto (7).....	93
Figura III-62: Proposta mecanística para a formação da adamantil-metiloxima CD7 (7).....	93
Figura III-63: Esquema de síntese dos 1,2,4 – trioxolanos CD8 e CD9, compostos (8) e (9).	94
Figura III-64: Proposta mecanística para a formação dos 1,2,4 – trioxolanos CD8 e CD9, partindo da adamantil-metiloxima CD7.....	95

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela III-1: Atividade anti-proliferativa dos compostos LC137/CD1, LC138/CD4, LC139/CD2, LC140, LC163 e LC165 em culturas de <i>Perkinsus olseni</i>	112
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA - Ácido abscísico

ACTs - Terapêuticas combinadas baseadas na artemisinina (do inglês: artemisinin-based combination therapies)

ADME - Absorção, distribuição, metabolização e excreção

APX - Peroxidase dependente de ascorbato

ART - Artesunato

BIP - 2,2' - bipyridilo

CH₃COOH - Ácido acético

DCM - Diclorometano

Deoxi-DHA - desoxi-dihidroartemisinina

Desoxi-ATS - desoxi-artesunato

DFO - Desferroxamina

DHA - Dihidroartemisinina

DHFR - Dihidrofolato redutase

DHP - Dihidroperóxido

DHPS - Dihidropteroato sintetase

DNA - Ácido desoxirribonucleico

ECs - Produtos extracelulares

EDC - 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

EPSP sintetase - 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfatase sintetase

EU - União Europeia (do inglês European Union)

FAO - Food and Agriculture Organization of United Nations

FAS - Ácido-gordo sintetase

H₂O₂ - Peróxido de hidrogénio

HBF₄ - ácido fluorobórico

HFIP – Hexafluoropropanol

HOBt - 1-hidroxi-1H-benzotriazol

HSP-60 - Proteína do choque térmico (do inglês: *heat shock protein*)

I₂ - Iodo molecular

KOH - Hidróxido de potássio

L. donovani - *Leishmania donovani*

L. infantum - *Leishmania infantum*

MeOH - Metanol

MEP - Via metileritritol fosfato

MEV - Via do mevalonato

mL - Mililitro

Mmol - Milimol

MTO - Trióxido de metilénio

NaCl - Cloreto de sódio

N-MM - N-metilmorfolina

NTD - Doenças Tropicais Negligenciadas (do inglês: Neglected Tropical Diseases)

O₃ - Ozono

OMS - Organização Mundial de Saúde

P. falciparum - *Plasmodium falciparum*

P. marinus - *Perkinsus marinus*

P. olseni - *Perkinsus olseni*

P. vivax - *Plasmodium vivax*

PABA - Ácido p-aminobenzóico

PI - Fosfatidilinositol

PI3P - Fosfatidilinositol – 3 fosfato

PMA - Ácido fosfomolíbico

PSAT - Fosfoserina aminotransferase

PTA - Ácido fosfotúngstico

Re₂O₇ - Óxido de rênio

RNA - Ácido ribonucleico

ROS - Espécies reativas de oxigênio

SAR - Relação estrutura-atividade

SERCA - Retículo sarcoplasmático

SOD - Superóxido dismutase

SP - associação pirimetamina – sulfadoxina

T.amb. - Temperatura ambiente

T. gondii - *Toxoplasma gondii*

TFE - Trifluoroetanol

TLC - Cromatografia em camada fina (do inglês: TLC – Thin Layer Chromatography)

TMSOTf - Trimetilsilil trifluorometanossulfonato

UN - Nações Unidas (do inglês United Nations)

Zn - Zinco

μM - Micromolar

2,4-D - Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

I. INTRODUÇÃO

1.1 O crescimento demográfico e o setor piscícola

A população mundial está em crescimento. O crescimento demográfico observado desde o século XX constitui um dos desafios mais determinantes do século XXI. ^(1,2)

Este crescimento populacional deve ser acompanhado por um desenvolvimento sustentável, sendo, por isso, fundamental agir de modo sustentável em questões como a escassez de água e de alimentos, a existência de condições habitacionais menores, o desenvolvimento de conflitos entre países, o esgotamento de recursos naturais e as alterações climáticas que desse crescimento podem decorrer. ^(2,3)

De acordo com o Relatório das Perspetivas da População Mundial de 2017, efetuado pelas Nações Unidas (do inglês *United Nations*, UN), existem, atualmente, 7,6 mil milhões de pessoas no mundo. Espera-se que até ao final do século XXI o crescimento populacional prossiga, apesar de mais lento, atingindo-se em 2050 9,8 mil milhões, e em 2100 11,2 mil milhões de pessoas no mundo. Em suma, estima-se um crescimento de 83 milhões de pessoas por ano; 3,6 mil milhões de pessoas entre 2017 e 2100. ^(1,4)

A este crescimento demográfico está associada, obrigatoriamente, uma maior necessidade da produção de alimento a nível global, inerente à existência de um maior número de pessoas. Existem ainda outros fatores que não devem ser desprezados, nomeadamente uma maior facilidade de acesso a uma dieta saudável, uma maior disponibilidade de fontes de água potável, o aumento do uso de energias renováveis e as políticas de proteção dos ecossistemas, da diversidade biológica e do clima. ^(2,3)

O sector piscícola, que inclui quer a pesca de peixe e derivados a nível selvagem quer a produção de peixe e derivados em aquacultura, apesar de relativamente pouco reconhecido, constitui uma das fontes principais de alimento para a população mundial. ⁽⁵⁾ Em 2013, o peixe constituiu 17 % da proteína animal consumida e 6,7% do total proteico consumido (inclui a proteína animal e a vegetal). ⁽⁶⁾ Das 158 milhões de toneladas de peixe obtidas, quer através da captura de espécies selvagens quer através da aquacultura, em 2012, 136 milhões tiveram como destino o consumo humano. ⁽⁷⁾

Além do reconhecimento dos benefícios nutricionais e das qualidades promotoras de saúde das espécies piscícolas, que sustentam a sua importância como alimento na saúde humana, o peixe, os produtos derivados e as actividades associadas detêm, igualmente, um papel relevante na economia local de diversas regiões do mundo, sendo frequentemente considerados como meios de subsistência fundamentais e como uma fonte criadora de emprego para as populações, em particular em regiões em desenvolvimento. ⁽⁵⁻⁹⁾

Estima-se que existam entre 660 e 820 milhões de pessoas (trabalhadores e respetivas famílias) que dependam totalmente ou parcialmente da captura de peixe selvagem, da aquacultura e de outras indústrias associadas a este setor, nomeadamente as associadas ao processamento e tratamento de peixe. ^(7,9) Além disso, de acordo com estimativas mais

recentes, em 2014 56,6 milhões de pessoas possuíam empregos diretos na captura de peixe selvagem e na aquacultura, sendo que 90% das explorações do setor correspondem a pequenas empresas ou a indivíduos particulares residentes em países em desenvolvimento. ^(6,9)

1.2 A Aquacultura

A necessidade de alimentar uma população em crescimento e o aumento da procura por espécies piscícolas conduziu a um aumento da sobre-exploração dos recursos naturais marinhos, levando à necessidade de pescas mais sustentáveis e ao desenvolvimento da aquacultura. ⁽⁹⁾

A aquacultura abrange a produção de cerca de 600 espécies de pescado (peixe, crustáceos, moluscos e outros animais) e algas, em mais de 190 países. ⁽⁵⁾ O seu desenvolvimento conduziu a um aumento da disponibilidade de várias espécies de peixe e ao consequente aumento do seu consumo em todo o mundo, permitindo satisfazer o aumento da procura por peixe e diminuir a sobre-exploração dos recursos marinhos selvagens. A aquacultura assume, deste modo, um papel essencial no suprimento das necessidades alimentares globais. ^(5,9)

Tal como se pode observar na Figura I-1, a aquacultura constituiu a principal fonte de pescado para consumo humano em 2014. ^(6,8) Contudo, pode-se igualmente inferir que a captura de peixe selvagem se manteve relativamente constante desde os anos 80. ⁽⁶⁾

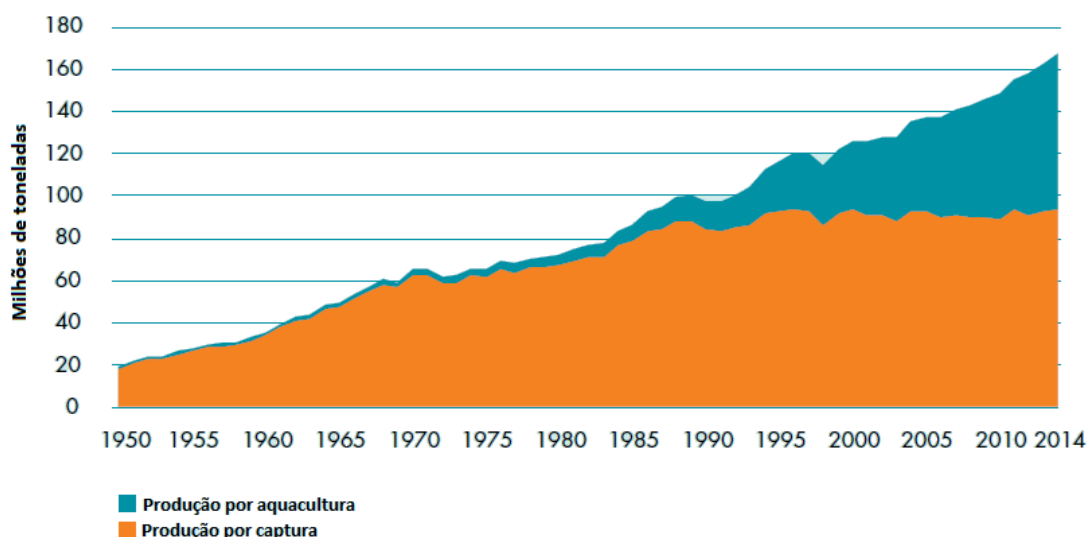


Figura I-1: Representação gráfica da produção mundial de peixe através de aquacultura e através da captura de espécies selvagens, desde 1950. *(Adaptado de ⁽⁶⁾)*

1.2.1 A aquacultura no contexto mundial

A aquacultura constitui um dos sectores de produção animal com maior crescimento a nível mundial, tendo-se observado uma taxa de crescimento anual de 5,8% entre 2005 e 2014.

A aquicultura associada à produção de peixe foi a que mais contribuiu para este crescimento anual, representando cerca de 65%.⁽⁶⁾

Em 2014 foram produzidas 73,8 milhões de toneladas de espécies piscícolas através da aquicultura (Figura I-2), das quais 49,8 milhões correspondiam a peixe, 16,1 milhões a moluscos, 6,9 milhões a crustáceos e 7,3 milhões a outras espécies animais. A maior parte da produção piscícola teve como destino o consumo humano; contudo, parte da produção teve igualmente outros fins.⁽⁶⁾ A produção global de espécies piscícolas associada à aquicultura correspondeu a 44,1% da produção total de todo o sector piscícola (referente à aquicultura e captura de espécies selvagens), apresentando um crescimento relativamente a 2012 (42,1%) e a 2004 (33,1%).^(6,8)

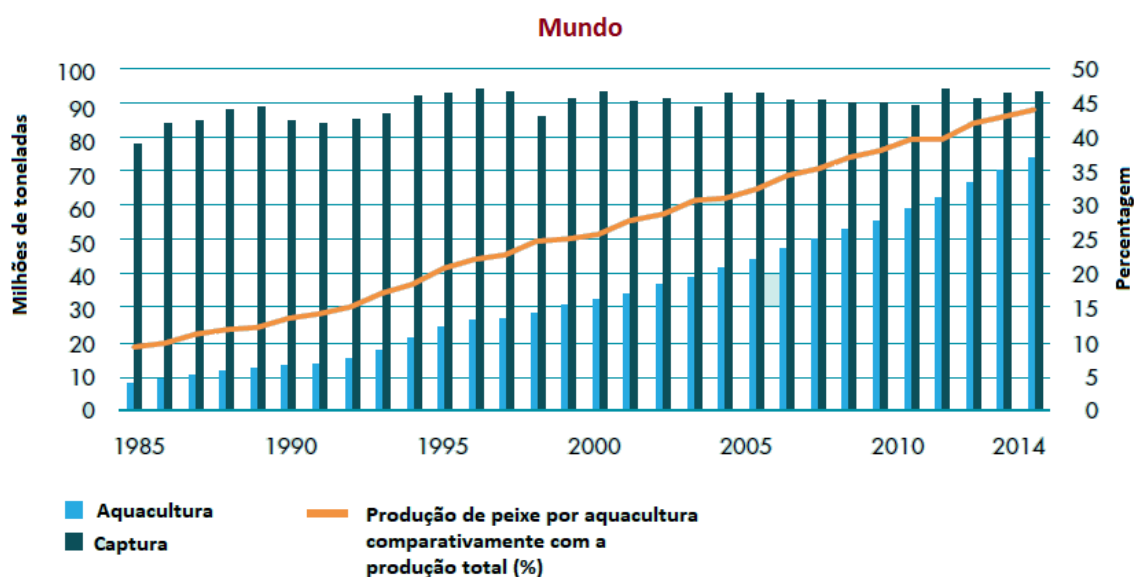


Figura I-2: Evolução da produção de peixe através da captura e da aquicultura, desde os anos 80 até 2014, a nível mundial, em milhões de toneladas, e respetiva percentagem; evolução da proporção de produção de peixe proveniente de aquicultura comparativamente com a produção total, no mesmo período. (Adaptado de⁽⁶⁾)

O continente asiático constitui o maior produtor aquícola do mundo, tendo contribuído em 89% para a produção de aquicultura para consumo humano nas últimas duas décadas.^(5,6,9) A China é o maior produtor de aquicultura do mundo, tendo produzido 45,5 milhões de toneladas de espécies piscícolas através de aquicultura em 2014, o que corresponde a mais de 60% da produção total obtida através da aquicultura no mesmo ano.⁽⁶⁾ Índia, Vietname, Egito e Bangladesh são igualmente grandes produtores de aquicultura.^(5,6,9)

De um modo geral, todos os continentes demonstraram uma tendência de crescimento da produção de espécies piscícolas através de aquicultura, excetuando-se a Oceânia, onde se verificou um decréscimo da sua produção nos últimos três anos.⁽⁶⁾

A produção de espécies piscícolas *per capita* associada à aquicultura também aumentou significativamente nas últimas três décadas, como resultado do grande

desenvolvimento da aquicultura, que acabou por ultrapassar o crescimento populacional. A Ásia constitui o continente em que se observa uma maior produção de todas as espécies piscícolas *per capita*, para consumo humano. ^(6,9)

1.2.2 A aquicultura no contexto europeu

Na última década, a aquicultura na Europa registou apenas um aumento de 0,5% na produção. Em 2015, a produção em aquicultura atingiu 2,3 milhões de toneladas, registando um aumento de 0,4% relativamente a 2014. ⁽¹⁰⁾ Neste ano, a produção europeia correspondeu a 3,97% da produção mundial em aquicultura. ⁽⁶⁾ A Figura I-3 apresenta a evolução da produção de espécies piscícolas por aquicultura na europa, comparativamente com a evolução da captura de espécies selvagens nos últimos 30 anos, em milhões de toneladas, e respectiva percentagem. ⁽⁶⁾

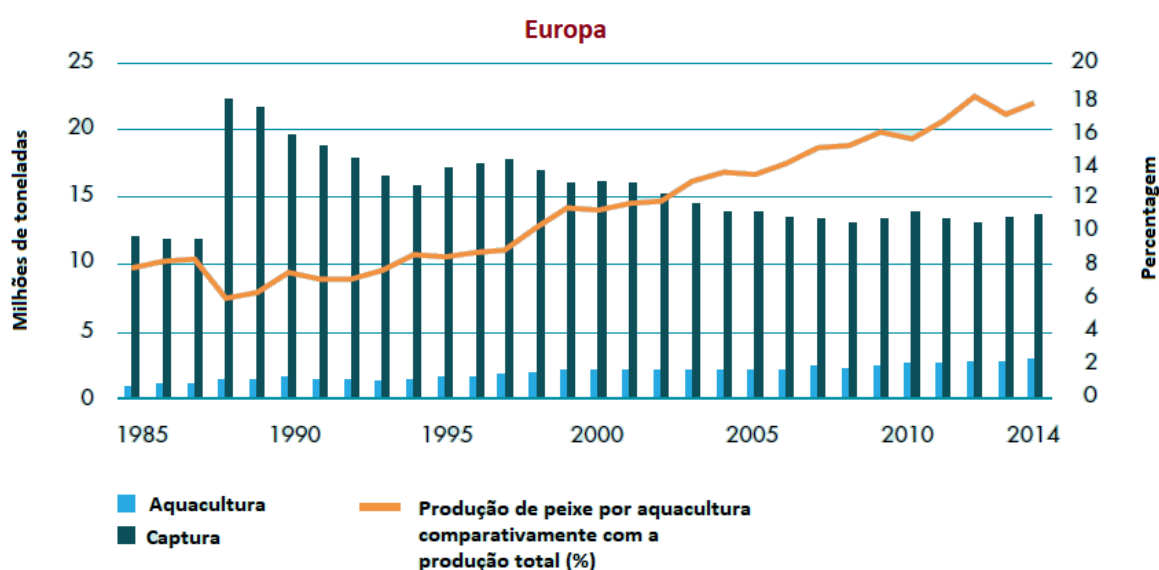


Figura I-3: Evolução da produção de peixe através da captura e da aquicultura na Europa, desde os anos 80 até 2014, em milhões de toneladas, e respetiva percentagem; evolução da proporção de produção de peixe proveniente de aquicultura, comparativamente com a produção total, no mesmo período. *(Adaptado de ⁽⁶⁾)*

A Noruega constitui o maior produtor aquícola da Europa, sendo responsável por 58% da produção total. Reino Unido, Grécia e Turquia apresentam igualmente uma grande relevância na produção de aquicultura na Europa, produzindo mais de 100 000 toneladas anualmente. ^(6,10) As principais espécies produzidas são o salmão, a truta, a dourada, o robalo e a carpa. Estas espécies representaram 94% da produção total europeia, em 2015. ⁽¹⁰⁾

1.2.3 A aquicultura no contexto nacional: Portugal

Nos anos 90 a aquicultura em Portugal limitava-se à produção de duas espécies: truta e amêijoas. O forte crescimento e modernização da aquicultura das espécies marinhas na década de 90 conduziram à produção de um maior número de espécies. Atualmente a aquicultura nacional produz várias espécies de peixe, como o robalo, a dourada, o pregado e o

linguado, e de bivalves, nomeadamente amêijoas e ostras. Os bivalves produzidos em regime extensivo constituem uma parte significativa da produção de aquacultura nacional. ^(11,12)

A aquacultura em Portugal caracteriza-se pela existência de um elevado número de explorações de pequena dimensão, nomeadamente viveiros de bivalves em zonas estuarinas ou de ria. ⁽¹¹⁻¹³⁾ Em 2014 existiam 1 551 estabelecimentos licenciados, dos quais 1460 (94%) estão ativos. ⁽¹¹⁾

Em 2014 foram produzidas 10 791 toneladas de espécies piscícolas através da aquacultura nacional, o que gerou uma receita de 50,3 milhões de euros. A produção em águas salobras e marinhas constituiu cerca de 93% da produção total, correspondendo 47,7% à produção de peixe e 45% à produção de bivalves (sendo a amêijoas o bivalve mais relevante). ⁽¹¹⁾

Em 2012, a aquacultura empregava de modo direto 2 572 pessoas, existindo apenas 5 empresas que empregavam mais de 10 pessoas. ^(11,12)

A região do Algarve é a que apresenta uma produção de aquacultura mais significativa, tendo sido responsável pela produção de 4 676 toneladas em 2014, o que representa 43,3 % da produção total nacional no mesmo ano. ⁽¹¹⁾

No Algarve, a Ria Formosa constitui a região onde se localiza um maior número de explorações aquícolas (1220 estabelecimentos ativos), nomeadamente, viveiros para a produção de moluscos bivalves, representando cerca de 88,3 % dos estabelecimentos aquícolas a nível nacional. Tem vindo a ser incentivada a instalação de estabelecimentos em mar aberto ao longo da costa algarvia, encontrando-se alguns estabelecimentos já em produção e estando prevista a instalação de novos, na região da Armona e em Monte Gordo. Estão em funcionamento três estabelecimentos de cultura de bivalves em mar aberto na zona de Sagres e um na zona de Lagos, existindo ainda uma autorização de instalação para a zona de Portimão. ⁽¹¹⁾

Embora a aquacultura constitua um importante complemento das formas tradicionais de abastecimento de pescado, em Portugal não se tem revelado, até hoje, uma alternativa ao pescado proveniente da atividade da pesca. Sendo Portugal um país com elevado consumo de espécies piscícolas *per capita*, cerca de 56,7Kg por habitante/ano, a limitada produção nacional obriga a elevados volumes de importações de pescado, de modo a satisfazer o consumo nacional. ⁽¹²⁾ Desta forma, continua a verificar-se uma elevada procura de produtos da pesca no espaço nacional, o que assegura um mercado potencial significativo para os produtos da aquacultura. ^(12,13)

Em 2030 prevê-se que a produção de espécies piscícolas supere os 187 milhões de toneladas, um aumento de, aproximadamente, 30 milhões de toneladas em relação ao que se verificou em 2012. Estes valores devem-se, essencialmente, ao aumento da produção de espécies piscícolas através de aquacultura, todavia a um ritmo de crescimento inferior ao que se tem verificado ao longo dos últimos anos. Para o mesmo período, perspectiva-se que o consumo deste género alimentício aumente, atingindo em 2022 um consumo médio mundial *per capita* de 20,7 kg/ano, um valor que se encontra acima do valor atual, 19,2 kg/ano. Face a estes dados, é possível afirmar que a produção de pescado em aquacultura será

a única forma de suportar o aumento do consumo de pescado previsto, tendo em consideração a diminuição da captura de espécies piscícolas selvagens.⁽¹³⁾

1.3 Desafios e problemas associados à aquacultura

Apesar do crescimento considerável, a aquacultura está associada a alguns constrangimentos e problemas, tal como descrito no relatório “*State of world fisheries and aquaculture*”, elaborado pela FAO (Food and Agriculture Organization of United Nations) em 2016.⁽⁶⁾

De um modo geral, a produção de espécies piscícolas por aquacultura depende de vários fatores e das interações que se estabelecem entre eles, nomeadamente, os factores climáticos, o tipo de alimento e respetivo modo de alimentação, o modo e o tipo de regime de exploração, a área de exploração, os fatores económicos e associados ao mercado, o ambiente social e as práticas de gestão das instituições responsáveis pela administração dos vários estabelecimentos aquícolas. Contudo, os resíduos alimentares, os produtos de excreção libertados pelas espécies piscícolas como resultado do seu metabolismo e o aparecimento de agentes patogénicos provenientes da aquacultura, podem acarretar consequências negativas para os produtores, para a própria atividade e para a economia, bem como gerar problemas relacionados com a segurança alimentar.⁽⁸⁾ Além disso, o desenvolvimento significativo da aquacultura levanta questões relacionadas com o seu impacto ambiental, a nível terrestre, aquático e na biodiversidade, bem como na competição da área associada à sua exploração por outros produtores de outros setores, também eles com importância económica.^(6,8)

Uma das dificuldades associada a esta atividade corresponde à indisponibilidade de matérias-primas para o fabrico de rações para alimentar as espécies piscícolas que se encontram a ser exploradas, na medida em que estas rações têm como base farinhas e óleos de peixe provenientes da captura de peixe existente em meio selvagem. Contudo, apesar do incremento do desenvolvimento da aquacultura, o qual está inerente a uma maior necessidade de alimento, será pouco expectável o aumento da captura de peixe selvagem de modo a colmatar a indisponibilidade de alimento, devido ao reduzido stock observado actualmente.^(5,14,15) Aliás, o uso de peixe capturado em meio selvagem para alimentar as espécies piscícolas de carácter omnívoro ou carnívoro (de cadeia trófica superior) constitui uma das questões mais controversas associadas à aquacultura, apesar de se ter observado um decréscimo do uso de peixe obtido através da pesca convencional para a alimentação de espécies piscícolas produzidas em aquacultura.^(5,9) A diminuição do uso de recursos aquáticos selvagens deve-se, essencialmente, ao uso de alimentos de origem vegetal, de produtos do metabolismo provenientes dos peixes ou de outro tipo de animais terrestres e à utilização de espécies selvagens com uma maior taxa de conversão.^(5,9,14) No entanto a controvérsia permanece, questionando-se se não seria preferível utilizar diretamente para consumo humano o pescado obtido através da pesca convencional, em vez de ser utilizado como alimento para as espécies piscícolas em exploração em aquacultura, mesmo tendo em conta que essa atividade conduz ao aumento do número de empregos, criados propositadamente para o tratamento do peixe que vai ser utilizado como ração.⁽⁹⁾

Por outro lado, a produção de peixe através de aquacultura e as atividades associadas podem gerar a um impacto ambiental significativo, com alterações no ecossistema circundante e na biodiversidade das espécies selvagens. Este tipo de actividade piscícola conduz à excreção de resíduos para o ambiente circundante cuja composição contém fósforo e azoto, à libertação de resíduos alimentares e de produtos químicos e ao aparecimento de agentes patogénicos, que podem, conseqüentemente, levar ao desenvolvimento e disseminação de doenças, não só nas espécies em cultivo em aquacultura mas também nas espécies marinhas selvagens.^(7,9,15) Por outro lado, existe ainda a possibilidade de as espécies piscícolas em cultivo atuarem como espécies invasoras do ambiente marinho selvagem ou de as espécies modificadas geneticamente invadirem o ambiente selvagem e estabelecerem cruzamentos com as espécies selvagens.^(7,9) A disseminação de doenças constitui uma ameaça constante para a produção aquícola e, por consequência, uma preocupação para as populações, em locais onde a aquacultura constitui um importante meio de subsistência, uma vez que pode conduzir a morte das espécies piscícolas em cultivo.^(7,9) Apesar da necessidade do uso de agentes quimioterapêuticos para combater as patologias existentes, a sua utilização constitui uma fonte de preocupação devido às consequências humanas que do seu uso podem advir. Deste modo, diversos países instituíram normas com o objectivo de regular o uso de antibióticos e de outros agentes quimioterapêuticos na produção em aquacultura.⁽⁹⁾

Sendo a aquacultura um sector relativamente recente, a área utilizada para a produção aquícola e para as atividades relacionadas pode estar associada a disputas com outros sectores cuja importância económica se encontra mais reconhecida, nomeadamente com os sectores da pesca convencional, da agricultura, do turismo, dos transportes, da construção civil (desenvolvimento urbano) e ainda do setor industrial.⁽⁶⁾ Estes sectores podem entrar em conflito com o sector da aquacultura pelo uso do espaço aquático ocupado pela produção aquícola, o que pode conduzir a confrontos e/ou a tensão social, caso não se estabeleçam políticas que regulem o acesso ao mesmo ou caso não se verifique o cumprimento das mesmas.^(6,9)

A aquacultura é uma atividade afetada negativamente por outras actividades humanas, concretamente a agricultura e a indústria, produtoras de resíduos poluentes.⁽¹⁵⁾ Quer os resíduos poluentes produzidos por estas indústrias, quer os efluentes domésticos produzidos pela população na sua generalidade podem contaminar os espaços alocados para a exploração da aquacultura, resultando, por consequência, na perda de espécies piscícolas produzidas ou na redução da sua qualidade e segurança alimentar.^(6,7,15)

As alterações climáticas que se verificam actualmente podem conduzir, igualmente, a alguns constrangimentos na produção aquícola.^(5-7,9,15) A acidificação dos oceanos, como resultado do aumento da quantidade de CO₂ e da redução do pH dos mesmos, está associada a alterações na fisiologia dos bivalves, conduzindo a problemas a nível de crescimento, reprodução, mobilidade, fertilidade, capacidade de adaptação, respiração e na qualidade e quantidade das espécies produzidas.^(7,9) Por um lado, verifica-se um aumento da ocorrência de eventos climáticos extremos, bem como da sua gravidade. Estes eventos climáticos correspondem a tempestades severas e/ou cheias, que podem danificar ou destruir as infraestruturas utilizadas para a atividade aquícola.^(6,7,15) As cheias podem ainda conduzir à perda de espécies piscícolas; à introdução das espécies produzidas em aquacultura nos

ambientes circundantes, nomeadamente no ambiente selvagem; e ao aumento dos níveis de água do mar, causando um impacto negativo na aquacultura praticada nas áreas costeiras. ^(7,15) Por outro lado, estas mudanças de clima podem gerar outras consequências indirectas, nomeadamente alterações na salinidade, na temperatura da água do mar e problemas a nível da fonte de alimento para as espécies piscícolas em aquacultura, na medida em que estas alterações climatéricas podem gerar problemas na obtenção quer dos alimentos do ambiente marinho selvagem, quer dos alimentos de origem terrestre (proteína de origem vegetal). ^(6,7,9)

As alterações climatéricas facilitam, de modo semelhante, o aparecimento de novos agentes patogénicos e das doenças associadas, e podem conduzir a uma redistribuição das doenças já existentes. Do mesmo modo, o aumento da temperatura da água do mar pode causar alterações fisiológicas nas espécies exploradas, aumentando a sua suscetibilidade para o desenvolvimento de determinadas doenças, a alterações comportamentais, à alteração e prevalência de determinados agentes patogénicos, bem como da sua virulência, e a outras alterações que conduzam a mudanças significativas na tolerância termal das espécies aquáticas exploradas. Estes dois fatores associados apresentam uma elevada importância numa perspectiva da segurança alimentar, uma vez que, desta forma, a aquacultura pode gerar espécies piscícolas cuja qualidade não é adequada para o consumo humano. As espécies piscícolas produzidas podem estar contaminadas por determinados parasitas e, por outro lado, podem surgir zoonoses, o que causa problemas a nível da saúde pública, com um impacto a nível socioeconómico. ^(6,7,9)

Desta forma, o aparecimento de agentes patogénicos (vírus, bactérias, protozoários), a consequente propagação e o desenvolvimento das respetivas doenças, constituem um dos principais problemas que afetam a aquacultura, afetando negativamente a economia regional e nacional e levantando questões relativas à segurança alimentar das espécies piscícolas produzidas que possuem como destino o consumo humano. É assim fundamental a implementação de políticas que garantam uma exploração aquífera sustentável, por parte das instituições governamentais e das empresas responsáveis por essa exploração, e o desenvolvimento de estratégias a nível quimioterapêutico que permitam combater de modo eficaz e efetivo os agentes patogénicos causadores de patologias a nível piscícola (atuar no tratamento), e que atuem de modo profilático.

1.3.1 Desenvolvimento de doenças em aquacultura

O aparecimento de doenças no setor aquícola tem gerado problemas sérios ao nível económico e ecológico, e também ao nível da segurança alimentar. O seu desenvolvimento pode conduzir a perdas do número de espécies produzidas, ao desenvolvimento de espécies aquícolas contaminadas e a grandes perdas financeiras no setor, devido ao aumento dos custos de produção e à diminuição da quantidade comercializável de espécies produzidas. ⁽¹⁶⁾

Os regimes de produção e os procedimentos praticados na aquacultura conduzem de um modo geral a uma elevada densidade populacional e a stress intrínseco da própria população, o que facilita o estabelecimento e a disseminação de doenças que podem afetar qualquer tipo de espécie produzida a nível aquícola: peixe, moluscos e crustáceos. ^(16,17)

A maior parte dos agentes patogénicos causadores de doenças a nível aquícola são provenientes do ambiente selvagem circundante ao local alocado para a exploração de aquacultura. Por norma, este tipo de agentes patogénicos não afetam gravemente o hospedeiro marinho selvagem, contudo são bastante problemáticos a nível da população aquícola.⁽¹⁸⁾

O aparecimento de determinados agentes patogénicos também pode advir das condições inerentes à própria atividade. A elevada densidade populacional associada a uma reduzida diversidade genética da própria população torna as espécies em exploração mais susceptíveis ao desenvolvimento de doenças. Além disso, o grande número de espécies associado a uma determinada área circunscrita facilita bastante a propagação do parasita entre os vários hospedeiros, uma vez que a reduzida área promove um elevado contato entre os mesmos. Adicionalmente, o stress e a diminuição da qualidade da água no ambiente de exploração são fatores que promovem esse aparecimento e disseminação por entre a população.⁽¹⁷⁻¹⁹⁾ Estas doenças desenvolvidas no meio da exploração aquícola podem ser transmitidas para as espécies marinhas selvagens, conduzindo ao desenvolvimento de doenças nestas.^(16,17)

1.3.1.1 Doenças que afetam os bivalves produzidos em aquacultura

Os moluscos bivalves são componentes essenciais dos ambientes estuarinos e marinhos, uma vez que além de contribuírem para a cadeia trófica são fundamentais para a integridade do ecossistema marinho e para a manutenção da qualidade da água. Ostras, amêijoas e mexilhões são espécies exploradas a nível comercial, quer através da pesca convencional quer através da aquacultura, em regimes intensivo, semi-intensivo ou extensivo.^(11,19) Contudo, nas últimas décadas tem-se observado uma redução da sua produção, devido, essencialmente, à poluição ambiental, a uma sobre-exploração das espécies e ao desenvolvimento de doenças.^(17,20)

Os parasitas protozoários dos géneros *Perkinsus*, *Haplosporidium*, *Marteilia* e *Bonamia* são os responsáveis por grande parte das doenças que afetam uma enorme variedade de espécies de moluscos em todo o mundo, quer a nível selvagem quer em regime de cultivo. As doenças provocadas por este tipo de parasitas têm provocado uma elevada quantidade de mortes nos bivalves, conduzindo a um decréscimo na sua produção, com um impacto económico considerável e repercussões a nível ecológico.^(17,20)

Os moluscos representam cerca de metade da produção de espécies em aquacultura da União Europeia (UE, do inglês: *European Union*, EU), sendo os mexilhões e as ostras os mais cultivados.⁽¹¹⁾ O cultivo de bivalves em Portugal é uma atividade primária que permite o emprego direto e indireto de 10 000 pessoas.⁽¹⁴⁾ Em 2014, esta atividade representou 45% da produção total de espécies em aquacultura a nível nacional.⁽¹¹⁾

A região algarvia, nomeadamente a Ria de Alvor e a Ria Formosa, são responsáveis pela quase totalidade de produção de espécies de bivalves como *Ruditapes decussatus*, *Crassostrea gigas* e *Crassostrea angulata*, reconhecidas a nível nacional como amêijoas-boa, ostra japonesa e ostra portuguesa.⁽¹⁴⁾

A produção destas espécies possui uma elevada importância na economia local e regional, contudo tem-se verificado um declínio da sua produção devido ao desenvolvimento de determinadas patologias que conduzem a elevadas taxas de mortalidade das espécies em cultivo. Estas extensas mortalidades, observadas desde a década de 80, são causadas por um parasita protozoário da espécie *Perkinsus olseni*, o agente causador de uma doença muito prevalente e incidente em bivalves, a perkinsose.⁽¹⁴⁾

O controlo da perkinsose tem-se revelado difícil, na medida em que até aos dias de hoje não surgiu uma estratégia terapêutica com eficácia no combate ao parasita. Por um lado, o desenvolvimento de vacinas para administração nos moluscos bivalves não constitui uma abordagem viável, uma vez que este tipo de invertebrados não possui uma imunidade adaptativa; por outro lado, a identificação e utilização de agentes antiprotozoários está associada a algumas dificuldades, na medida em que alguns compostos desenvolvidos apresentam alguma toxicidade a nível ambiental, surgindo dificuldades na introdução deste tipo de compostos nas práticas aquícolas.^(14,20) Além disso, as medidas profiláticas, que deveriam resultar numa diminuição do número de mortes das espécies em cultivo, têm-se revelado, igualmente, de difícil implementação.⁽¹⁴⁾

1.4 Perkinsose

A perkinsose é uma doença causada por parasitas protozoários do género *Perkinsus*. Tendo em consideração a sua sequência genética, reconhece-se, actualmente, a existência de 7 espécies pertencentes ao género *Perkinsus*: *P. marinus*, *P. olseni*, *P. qugwadi*, *P. cheaspeaki*, *P. mediterraneus*, *P. honshuensis* e *P. beihaeinsis*. Embora a maior parte das espécies de *Perkinsus* tenha a capacidade de infetar apenas bivalves, foram detetadas, na Austrália, infeções por *P. olseni*, em haliotes.^(21,22)

No género *Perkinsus*, as espécies *P. marinus* e *P. olseni* são as mais problemáticas, uma vez que são as mais destrutivas, estando associadas a elevadas taxas de mortalidade dos bivalves infetados.⁽²¹⁾

P. marinus causa a perkinsose designada como “Dermo”, mais prevalente em ostras presentes ao longo da costa este dos Estados Unidos da América e no Golfo do México. Esta patologia encontra-se bastante disseminada nestas regiões, estando associada a elevada taxa de mortalidade nas ostras da espécie *Crassostrea virginica*. Além do grande impacto económico na indústria piscícola, verifica-se uma elevada degradação dos recifes criados pelas ostras, o que conduz à degradação do ecossistema na sua generalidade, devido à redução da qualidade da água e à perda do habitat natural de outras espécies.^(18,22)

P. olseni provoca parasitoses em amêijoas da espécie *Ruditapes decussatus* na Europa e no norte de África (Tunísia) e em amêijoas do género *Manila* na Europa e na Ásia. Com uma prevalência e incidência menos intensa, outras espécies de amêijoas são infetadas, igualmente, por este protozoário, nomeadamente, *Paphia rhomboides*, *Paphia aurea*, e *Venerupis pullastra*. Este parasita infeta ainda *Ruditapes philippinarum*, em Espanha, Itália, França e também em vários países da Ásia (Coreia, China, Japão). *P. olseni* tem causado um elevado número de mortes nas populações de amêijoas e ostras, no sul de Portugal, no

noroeste da Espanha e nas regiões costeiras do Japão, Coreia e China. No Algarve, a perkinsose tem provocado elevadas taxas de mortalidade (50-80%) na espécie *R. decussatus*. Na Coreia, esta doença está associada a um decréscimo da espécie *R. philippinarum* na ordem dos 80%.^(14,21-23)

1.4.1 O parasita: *Perkinsus olseni*

P. olseni é um parasita protozoário membro ao grupo Alveolata que pertence à classe taxonómica Perkinsea.^(14,23,24) Os organismos pertencentes a esta classe taxonómica fazem parte de um ancestral comum de dinoflagelados e apicomplexas, o que foi demonstrado pela presença de determinadas vias metabólicas comuns, como a do folato e a do shikimato, e pela presença de alguns organelos comuns, nomeadamente do apicoplasto.⁽¹⁴⁾

No início da década de 80 do século passado, *P. olseni* foi classificado de *P. atlanticus*. Contudo, posteriormente, devido à identificação de semelhanças ao nível da sequência genética entre as espécies *P. atlanticus* e *P. olseni*, foi considerado tratar-se de uma só espécie, classificada como *P. olseni* (esta nomenclatura tinha prioridade sobre a de *P. atlanticus*).^(14,25)

A perkinsose causada por *P. olseni* está associada a elevadas taxas de mortalidade em bivalves, nomeadamente de *R. decussatus*, ao largo da Ria Formosa e da Ria de Alvor.^(14,21) Apesar de *P. olseni* não se apresentar como um parasita problemático para a saúde humana, uma vez que não é patogénico para o ser humano, conduz a grandes impactos a nível económico e social.^(14,25) É assim essencial o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes e adequadas para o controlo da doença, tanto ao nível do tratamento como da profilaxia.⁽¹⁴⁾

1.4.1.1 Ciclo de vida de *Perkinsus olseni*

P. olseni apresenta um ciclo de vida com um único hospedeiro, normalmente as amêijoas da espécie *R. decussatus*, não necessitando de hospedeiros intermediários para o completar.⁽²⁵⁾

São conhecidos quatro estados da vida de *P. olseni*: trofozoíto, hipnósporo (também designado de prezoosporângio), zoosporângio e zoósporo.^(21,26) O ciclo de vida de *P. olseni* ocorre em duas fases: uma ocorre no interior do hospedeiro invertebrado, as amêijoas da espécie *R. decussatus*; a outra ocorre em meio aquático.⁽²⁶⁾ Os estados de trofozoíto e de hipnósporo ocorrem no interior do hospedeiro, enquanto os zoosporângio e de zoósporo ocorrem em meio aquático.^(25,26)

O estado de trofozoíto é considerado o principal estado infeccioso, sendo o que apresenta maior relevância na transmissão da doença. Contudo, vários estudos indicam que quer o estado de hipnósporo quer o de zoósporo podem ser igualmente infecciosos.⁽²⁵⁾

O trofozoíto corresponde a uma célula esférica que contém no seu interior um vacúolo excêntrico, que ocupa a quase totalidade do volume celular, e um núcleo localizado na zona periférica.^(25,26) Este vacúolo pode conter ainda no seu interior inclusões polimórficas, denominadas de vacuoloplastos.^(14,25) Nos tecidos do hospedeiro, os trofozoítos sofrem uma

multiplicação vegetativa denominada de palintomia, em que ocorrem sucessivos ciclos de cariocinese seguidos de citocinese.⁽²⁵⁾ Deste modo, forma-se uma célula multinucleada, contendo no máximo 32 células-filhas, organizadas em forma de rosa.^(22,25,26) Estas células-filhas apresentam uma forma cuneiforme ou esférica, assumindo a forma de trofozoítos imaturos. Com a rutura da parede externa, verifica-se a libertação dos trofozoítos imaturos para o exterior.⁽²⁵⁾ Posteriormente estes trofozoítos imaturos sofrem um processo de maturação, em que aumentam o seu tamanho e em que a sua parede se torna mais grossa, dando origem ao estado de hipnósporo. O estado de hipnósporo é, igualmente, designado de prezoosporângio, uma vez que os hipnósporos são precursores do estado de zoosporângio.^(21,25)

De seguida, os hipnósporos são libertados para o ambiente aquático pelas amêijoas vivas que estão infetadas, nomeadamente através das suas pseudofezes (por exemplo), ou através da decomposição dos tecidos de amêijoas mortas que se encontravam infetadas. Os hipnósporos sofrem então ciclos sucessivos de proliferação, nomeadamente de cariocinese e de citocinese, dando origem a um estado de zoosporângio.^(21,25)

O estado de zoosporângio caracteriza-se pela presença de um elevado número de zoósporos no interior de uma célula esférica, como resultado do processo de zoosporulação.^(21,22,25) Esta célula possui, pelo menos, um tubo de descarga que é contínuo com o material da parede celular.⁽²⁷⁾

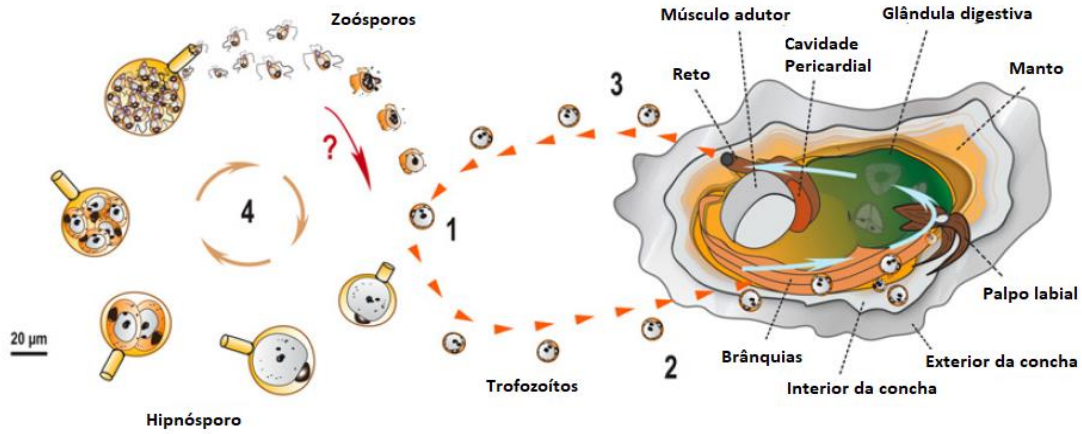
Posteriormente verifica-se a saída dos zoósporos através do tubo de descarga do interior do zoosporângio. Os zoósporos correspondem a células biflageladas com uma forma elipsoidal, sendo, deste modo, dotadas de mobilidade. Os zoósporos transformam-se posteriormente em trofozoítos, tendo estes a capacidade de infetar novos hospedeiros.^(25,27,28) A forma como os zoósporos se transformam em trofozoítos em meio aquático permanece uma questão em aberto, contudo, vários estudos indicam que o estado de zoósporo constitui igualmente um estado infecioso.^(21,25,28)

Por outro lado, desconhecem-se as condições fundamentais ou fenómenos que conduzem a que os hipnósporos libertados para o ambiente aquático iniciem a zoosporulação, para posterior produção de zoósporos.⁽²⁵⁾ Vários artigos na literatura referem que é um procedimento dependente de condicionantes externas, como a temperatura da água e a salinidade.^(21,25) Além disso referem ainda que o estado de hipnósporo constitui um estado de latência do parasita, formado quando este se encontra em condições desfavoráveis, nomeadamente quando se verifica uma reduzida quantidade de oxigénio.^(22,25) Os hipnósporos têm a capacidade de sobreviver durante muito tempo em meio aquático sem perderem a sua capacidade de zoosporulação. Quando as condições externas se afiguram favoráveis iniciam este procedimento.⁽²⁵⁾

Os hospedeiros vivos constituem uma fonte contínua de estados infeciosos, pois os tecidos do hospedeiro possuem o estado de trofozoíto. No entanto, a morte de um hospedeiro infectado não impede a transmissão do parasita para outros hospedeiros, na medida em que esta é assegurada pelo estado de hipnósporo por si próprio, ou através da formação de zoósporos, com igual capacidade infeciosa.⁽²⁵⁾

A Figura I-4 representa um esquema do ciclo de vida de *Perkinsus spp* no hospedeiro invertebrado (B), que pode ser uma amêijoia ou uma ostra, e no meio aquático, onde ocorre a zoosporulação (A).

A Meio aquático - Zoosporulação



B Entrada e infecção no hospedeiro

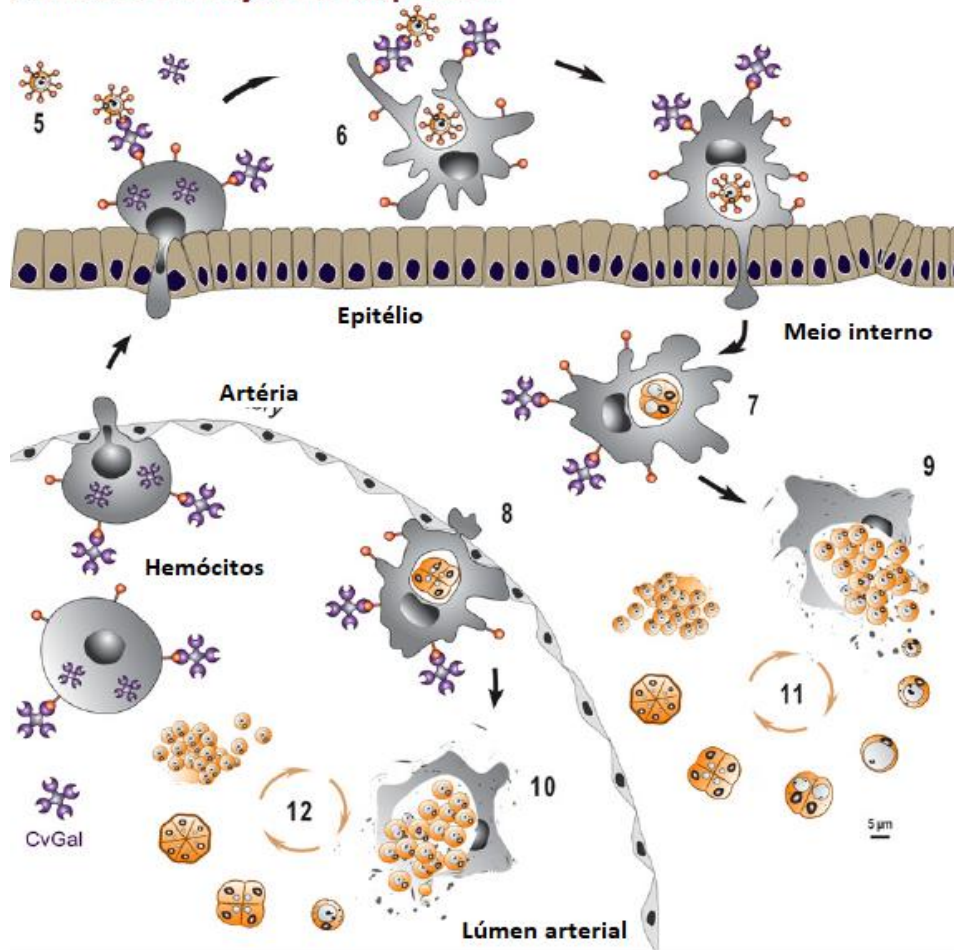


Figura I-4: Esquema representativo do ciclo de vida de *Perkinsus spp* no meio aquático onde ocorre a zoosporulação (A) e no hospedeiro invertebrado (B). (Adaptado de ⁽²⁸⁾)

No ambiente aquático **(A)**, os trofozoítos **(1)** são ingeridos pela amêijoia durante o seu processo de alimentação **(2)**. Estes atravessam o trato gastrointestinal, através das brânquias e dos palpos, até ao reto. A amêijoia-boia (*R. decussatus*), em particular, constitui um animal filtrador do ambiente em que está inserido, na medida em que durante o seu procedimento de alimentação ingere também partículas em suspensão na água, bem como materiais provenientes da ressuspensão de depósitos de natureza viária. Deste modo, a sua alimentação conduz a uma filtração do ambiente envolvente, o que é essencial para a conservação do ecossistema, consumindo, no entanto, espécies infecciosas. ⁽²⁸⁾

Após o processo de multiplicação vegetativa que ocorre no interior do hospedeiro, os hipnósporos formados são libertados para o ambiente aquático **(3)** através das pseudofezes dos hospedeiros vivos, ou devido à decomposição dos tecidos de hospedeiros mortos. ^(21,28) Os hipnósporos, através do processo de zoosporulação **(4)**, dão origem ao estado de zoosporângio. No interior do zoosporângio forma-se um elevado número de zoósporos, como resultado dos sucessivos ciclos de cariocinese seguidos de citocinese, após o que ocorre a libertação dos zoósporos para o ambiente aquático, através do tubo de descarga. ^(22,25,28)

De seguida os zoósporos adquirem a forma de trofozoíto **(1)**, constituindo a principal forma infecciosa do parasita, apesar de a forma de zoósporo também ser infecciosa. ^(25,28) O processo de transformação dos zoósporos em trofozoítos em meio aquático ainda é desconhecido. ⁽²⁸⁾

Após a ingestão pelo hospedeiro **(B)**, uma vez na cavidade paleal ou no tubo digestivo **(5)**, os trofozoítos exibem ligandos na sua superfície **(6)**. Desta forma são reconhecidos, o que conduz ao aparecimento de hemócitos que vão proceder, posteriormente, à sua fagocitose. ⁽²⁸⁾

Os hemócitos são células efectoras do sistema imunitário dos bivalves, associadas à defesa celular e humoral destes organismos. São células dotadas de mobilidade e que têm a capacidade de migrar livremente por entre os vários tecidos. Além disso, têm a capacidade de ingerir os microorganismos invasores por fagocitose ou de os encapsular, procedendo posteriormente à sua destruição. ^(21,29)

Os hemócitos contendo os trofozoítos migram para um meio interno **(7)** ou podem invadir o meio vascular **(8)**. Os trofozoítos, ao permanecerem no interior destas vesículas semelhantes a fagossomas, mantêm a sua viabilidade e procedem à sua multiplicação vegetativa, dando origem a uma célula multinucleada, contendo um elevado número de trofozoítos no seu interior **(9,10)**. ⁽²⁸⁾

De seguida, verifica-se a rutura dos hemócitos, com consequente libertação dos trofozoítos para o meio circundante. Estes trofozoítos podem ser fagocitados por outros hemócitos que se encontrem no meio circundante (procedem a uma nova multiplicação vegetativa no seu interior, dando origem a mais trofozoítos) ou podem proceder a uma nova multiplicação vegetativa no lúmen vascular ou nos tecidos mais internos **(11,12)**. Os hemócitos infetados migram facilmente para os vários tecidos do hospedeiro e, caso ocorra, a sua lise pode conduzir a uma infeção sistémica que pode resultar na morte do hospedeiro. ⁽²⁸⁾

1.4.1.2 Consequências imunológicas e fisiológicas nos hospedeiros infetados por *P. olsenii*

A infecção provocada por *P. olsenii* pode conduzir a um crescimento lento, a necrose tecidual e, em casos em que a infecção é muito intensa, resultar na morte do hospedeiro infectado (regularmente as amêijoas da espécie *R. decussatus*).^(22,25)

De um modo geral, as amêijoas infetadas apresentam um crescimento mais lento, problemas na sua reprodução e uma maior suscetibilidade a infecções causadas por outros agentes patogénicos.⁽²¹⁾ Assim, o parasitismo por *P. olsenii* está associado a elevadas taxas de mortalidade das espécies infetadas, conduzindo a um impacto socioeconómico e ambiental significativo, tendo, igualmente, um impacto negativo indireto na qualidade do produto produzido e no seu valor no mercado.^(21,25)

Nas amêijoas com perkinsose verifica-se a presença de agregados de trofozoítos, principalmente nas brânquias, nos divertículos digestivos, no manto e nos tecidos conjuntivos que formam os gónadas masculinos e femininos. Os bivalves que apresentam infecções mais intensas exibem uma elevada quantidade de nódulos brancos, provenientes da enorme resposta inflamatória, sobretudo nas brânquias e no manto.^(22,25)

A presença destes agregados de trofozoítos nas brânquias interfere com a capacidade de filtração dos bivalves, comprometendo a sua eficácia, conduzindo a dificuldades no seu desenvolvimento e a um atraso no seu crescimento.⁽²²⁾ Além disso, vários estudos publicados referem a existência de alterações no peso normal dos bivalves que apresentam perkinsose de modo mais intenso, comparativamente com o peso de outros bivalves da mesma espécie que se encontrem saudáveis (i.e. alterações no “*condition index*”).⁽²¹⁾

Por outro lado, a presença de *P. olsenii* nos tecidos conjuntivos das gónadas masculina e feminina interfere com a capacidade reprodutiva das amêijoas. Vários estudos descritos na literatura demonstram que os bivalves infetados apresentam uma menor produção de ovos e um retardamento do desenvolvimento das gónadas, conduzindo geralmente a uma redução da gametogénese e a uma menor capacidade reprodutiva.^(21,22,25) Além disso, é observada uma grande infiltração de hemócitos no tecido conjuntivo dos túbulos digestivos e nas brânquias, em bivalves que possuam infecções mais intensas. A presença deste protozoário nos túbulos digestivos causa problemas na digestão de alimentos.⁽²²⁾ A nível fisiológico, observa-se ainda um aumento do consumo de oxigénio e uma redução da capacidade de clearance.^(21,25)

A presença de *P. olsenii* conduz, igualmente, a alterações em determinados parâmetros relacionados com o sistema imunitário do hospedeiro infetado, associados à defesa humoral e à defesa celular. A determinação do impacto da infecção por *P. olsenii* nos parâmetros relacionados com a defesa humoral e com a defesa celular é muito difícil, uma vez que são parâmetros afetados por fatores ambientais (como a temperatura e as variações associadas às estações do ano), e pelo próprio estado fisiológico dos bivalves. Estas condicionantes externas podem mascarar o verdadeiro efeito da infecção a nível do sistema imunitário do bivalve, dificultando, desta forma, o estabelecimento de uma relação conclusiva entre as alterações imunológicas e a presença do parasita.^(21,25)

Os estudos presentes na literatura não apresentam resultados conclusivos quanto ao modo como a concentração de hemócitos é afetada pela infecção por *P. olseni*. Enquanto Ordás *et al.* contabilizaram em 2000 um decréscimo da sua concentração, Flye Sainte Marie *et al.* verificaram em 2009 um aumento da concentração de hemócitos após infecção por *P. olseni*. Em condições normais, o número de hemócitos presentes nos bivalves é dependente das condições ambientais em que está inserido, nomeadamente a temperatura de água, a exposição ao oxigénio e a estação do ano em que se encontra, sendo deste modo difícil estabelecer uma relação entre o número de hemócitos e a presença de perkinsose.^(21,25) Contudo, o que se pode inferir, de um modo geral, é que no início da infecção por *P. olseni*, observa-se um aumento da concentração de hemócitos como resposta à entrada de um agente infeccioso, de forma a combatê-lo, e que, posteriormente, quando a infecção já se encontra bem estabelecida, se observa um decréscimo da sua concentração, uma vez que o parasita após proceder ao seu crescimento e divisão no interior dos hemócitos por palintomia, conduz à lise dos mesmos. Verificou-se ainda uma redução da capacidade fagocitária dos hemócitos.⁽²¹⁾

Segundo Ordás *et al.* (2000)⁽³⁰⁾, a quantidade de proteínas presentes em amêijoas com perkinsose revelou-se superior, à presente em amêijoas não infetadas.⁽²¹⁾ Contudo, não foram observadas alterações na quantidade de lisozimas do hospedeiro.^(21,25) As lisozimas, em associação com as espécies reativas de oxigénio (ROS), são responsáveis pela destruição de *P. olseni* que se encontrem encapsulados, uma vez que em condições normais conduzem à destruição da parede celular do parasita. Estudos presentes na literatura referem que a encapsulação dos parasitas resulta das tentativas falhadas de fagocitose por parte dos hemócitos quando o material patogénico a fagocitar é demasiado grande, sendo comum a presença de trofozoítos encapsulados nas amêijoas infetadas por *P. olseni*.⁽²¹⁾

Por outro lado, a infecção por *P. olseni* conduz a libertação de lectinas, como MCL-1, MCL-3, MCL-4 e MCGal, por parte das amêijoas. Apesar de não se conhecer ao certo o seu papel nos bivalves, existem evidências em que as lectinas atuam como opsoninas e aglutininas. As aglutininas são substâncias solúveis que promovem a união do material parasitário, o que é fundamental para o passo de reconhecimento. Já as opsoninas ativam e facilitam a ligação do material aglutinado à superfície dos hemócitos, uma vez que se ligam aos hidratos de carbono presentes na superfície dos parasitas, promovendo a internalização do parasita. Estudos descritos na literatura apontam para um aumento da concentração de aglutininas em bivalves que se encontram infetados por *P. olseni*.^(21,25,29)

As enzimas proteolíticas, em particular as proteases serínicas, são produtos extracelulares (ECPs) libertados por *Perkinsus* com a finalidade de degradar os componentes da matriz extracelular que compõem o estroma e as membranas basais, facilitando a invasão do parasita nos tecidos dos bivalves. As proteases serínicas (tripsina e α -quimotripsina) são fundamentais no desenvolvimento do ciclo de vida de protozoários e na invasão das células sanguíneas do hospedeiro, estando associadas à elevada patogenicidade presente em *P. marinus*. Contudo, o estudo publicado por Casas *et al.* em 2009⁽³¹⁾ refere que não foi detetada a atividade de proteases serínicas em *P. olseni*, o que demonstra uma menor virulência de *P. olseni* comparativamente com *P. marinus*.^(21,25) Contudo, foi identificada a presença de quatro proteínas de *P. olseni* em amêijoas da costa espanhola, algumas com atividade como

proteases: um precursor da pepsina A, a fosfoserina aminotransferase, a peroxiredoxina V e a proteína do choque térmico (do inglês HSP-60: *heat shock protein*). O precursor da pepsina A constitui uma protease dependente de aspartato, estando relacionada com a patogenicidade característica de *P. olseni*. A fosfoserina aminotransferase (PSAT) está relacionada com a biossíntese de serina, sendo esta fundamental para a síntese proteica e participando, igualmente, em múltiplas vias metabólicas para a produção de compostos como a cisteína, a metionina, a glicina, purinas e esfingolípidos. Por outro lado, a peroxiredoxina V corresponde a uma peroxidase. As peroxidases atuam como um mecanismo de defesa desencadeado pelo parasita contra as espécies reativas de oxigénio (ROS) produzidas pelo hospedeiro, impedindo, nomeadamente, a acumulação de peróxido de hidrogénio. O papel da HSP-60 a nível extracelular não é conhecido completamente, no entanto alguns autores sugerem o seu papel na indução da imunossupressão, sendo conhecido o seu efeito na indução da inflamação, o que poderá estar associado à patogenicidade e virulência de *P.olseni*.⁽³²⁾

Quanto à dependência de ferro, verifica-se a existência de uma competição entre o parasita e o hospedeiro pela obtenção de ferro, uma vez que o ferro constitui um elemento essencial na infetividade e na proliferação do parasita no hospedeiro. De um modo geral, os parasitas protozoários satisfazem as suas necessidades em ferro através das reservas de ferro do seu hospedeiro, tal como sucede com *P. olseni*. Deste modo, *P. olseni* está dependente das reservas de ferro do seu hospedeiro, sendo suscetível à sua privação.^(21,33)

Os hemócitos do hospedeiro, de forma a destruir o parasita, procedem à sua fagocitose ou encapsulação, por mecanismos de endocitose. Primeiramente formam-se os fagossomas, local onde ocorre a destruição intracelular do parasita através de enzimas hidrolíticas provenientes de lisozimas, ao qual se associa, posteriormente, a acção de espécies reativas de oxigénio (ROS), produzidas por mecanismos internos do bivalve. Em condições normais, o parasita seria destruído através da ação conjunta destes dois fatores, o que não se verifica com *P. olseni*. Este possui uma parede celular composta por um componente proteico resistente à proteólise, acabando por sobreviver a este mecanismo de defesa por parte do sistema imunitário do hospedeiro.⁽²¹⁾ A formação das espécies reativas de oxigénio (ROS), nomeadamente dos radicais hidroxilo (OH) e dos aniões superóxido (O_2^-), envolve a participação de um complexo NADPH oxidase, que requer a utilização de ferro nas suas reacções internas de forma a dar origem a este tipo de espécies.^(21,29) Assim, pode-se inferir que o ferro é fundamental para que os hemócitos desencadeiem uma resposta oxidativa eficaz.⁽²¹⁾

As infeções por *P. olseni* associadas a elevados níveis de parasitismo conduzem a uma redução da mobilidade das amêijoas infetadas, o que conduz a uma transferência do ferro para os sedimentos, reduzindo a disponibilidade de ferro, quer para o hospedeiro quer para o parasita.⁽²¹⁾ Isto demonstra uma resposta protetora contra os potenciais danos que as ROS, induzidas pela presença *Perkinsus*, poderiam produzir no próprio hospedeiro que os gerou, e /ou uma resposta à presença do parasita, de forma a limitar a disponibilidade de ferro para o mesmo, devido às suas necessidades a nível antioxidante. Os bivalves têm a capacidade de controlar o influxo e o efluxo de ferro do ambiente externo, na medida em que esse controlo é essencial, pois vai condicionar a quantidade de ROS produzido. A produção de ROS em excesso pode causar danos oxidativos nas próprias células do hospedeiro.^(21,33)

1.4.1.3 Aspectos importantes na fisiologia e no metabolismo de *P. olsenii*

O estudo dos organelos (estruturas intracelulares) e das vias metabólicas específicas de *P. olsenii* é essencial para a identificação de possíveis alvos terapêuticos. Esta identificação constitui uma ferramenta fundamental para o desenho de novos compostos e para a otimização de outros já existentes, de modo a criar estratégias quimioterapêuticas que se afigurem eficazes e seletivas contra o parasita. Apesar de *P. olsenii* não se apresentar como patológico para o humano, permanece imperativo a descoberta de compostos para o tratamento e a profilaxia da perkinsose causada por este parasita, uma vez que as estratégias quimioterapêuticas disponíveis não se têm demonstrado eficazes. ⁽¹⁴⁾

O grupo Alveolata, no qual se insere *P. olsenii*, compreende outros parasitas que afetam a saúde humana, nomeadamente: *Plasmodium falciparum*, o agente causador das formas mais graves de malária; *Toxoplasma gondii*, o agente causador da toxoplasmose; e *Leishmania donovani*, o provocador de leishmanioses. Contrariamente a *P. olsenii*, estes parasitas possuem um elevado impacto a nível da saúde humana e animal. Desta forma, *Plasmodium*, *Toxoplasma* e *Leishmania* já foram estudados mais intensamente que *P. olsenii*, tendo-se descoberto e desenvolvido fármacos com eficácia demonstrada naqueles organismos infetantes, que atuam através da inibição de determinados alvos ou vias metabólicas específicas e essenciais para a sobrevivência dos parasitas em questão. ⁽¹⁴⁾

P. olsenii possui vias metabólicas idênticas às presentes nestes parasitas, bem como alguns organelos, como o apicoplasto. Deste modo, algumas das vias metabólicas e organelos que são considerados como alvos terapêuticos em *Plasmodium*, *Toxoplasma* e *Leishmania*, uma vez que são susceptíveis a determinados compostos, podem ser, igualmente, explorados como possíveis alvos terapêuticos em *P. olsenii*. ⁽¹⁴⁾

i. Apicoplasto

Todas as espécies pertencentes ao grupo Alveolata sofreram, durante a sua evolução, uma endossimbiose secundária que conduziu à integração de um genoma eucariota externo (proveniente de uma alga vermelha fotossintética) no genoma nuclear do organismo receptor. Durante o processo de endossimbiose, a alga ancestral fotossintética perdeu a sua capacidade de fotossíntese, dando origem ao apicoplasto. Este organelo, devido a esta característica particular, constitui um ótimo alvo terapêutico para determinados compostos, em particular os desenhados para inibir seletivamente as vias biossintéticas que ocorrem no seu interior. ^(14,28)

O apicoplasto foi identificado em trofozoítos e zoósporos de *P. olsenii*, e corresponde a um plastídeo secundário constituído por 4 membranas associadas entre si. É considerado, por isso, um elemento genético extracromossomal. ^(28,34) Está associado a diversas funções metabólicas fundamentais para a sobrevivência de *Perkinsus*: síntese de isoprenóides através da via não-mevalonato (via MEP e não MEV), síntese da enzima ácido gordo sintetase (FAS), síntese dos ácidos lipóico e abscísico (ABA). O apicoplasto está também relacionado com a biossíntese do grupo heme, funciona como um espaço onde ocorrem diversos passos da glicólise e da síntese de fosfolípidos e está associado à síntese de grupos prostéticos Fe-S. ⁽²⁸⁾

Algumas enzimas associadas a síntese de isoprenóides através da via metileritritol fosfato (MEP) foram confirmadas experimentalmente e associadas ao apicoplasto presente nos apicomplexa. Por outro lado, o apicoplasto possui uma grande importância na síntese de lípidos para o parasita, na medida em que é responsável pela síntese de enzimas fundamentais para a produção de ácidos gordos do tipo II, como a FAS, lípidos esses fundamentais para o crescimento, desenvolvimento e ciclo de vida do parasita. Tal como em *Perkinsus*, a síntese deste tipo de enzimas foi associada ao apicoplasto em *Plasmodium falciparum* e *Toxoplasma gondii*.^(28,35)

Os grupos prostéticos Fe-S são grupos com grande importância em determinados processos fisiológicos, nomeadamente na transferência de electrões, na activação e ligação de substratos, na regulação da expressão génica e na regulação da expressão e da atividade de determinadas enzimas. Além da sua síntese estar associada ao genoma mitocondrial, o apicoplasto constitui uma fonte secundária também responsável pela produção destes grupos prostéticos.⁽²⁸⁾

Além disso, o apicoplasto está associado à produção de ácido abscísico (ABA), uma hormona do stress muito frequente nas plantas. Esta hormona é igualmente encontrada noutros parasitas pertencentes ao grupo Alveolata, como em *Plasmodium spp* e *Toxoplasma spp*. Tal como acontece com estes parasitas, *Perkinsus* revela-se sensível a um herbicida com capacidade de inibir a síntese indirecta de ABA, a fluridona.⁽²⁸⁾

ii. A via do shikimato e o metabolismo dos folatos

A via do shikimato permite a formação de uma grande diversidade de compostos aromáticos em plantas, bactérias e fungos, estando, igualmente, presente em parasitas como *Plasmodium falciparum* e *Toxoplasma gondii*. A caracterização exata desta via nos parasitas Apicomplexa tem especial interesse, uma vez que é uma via que não ocorre nos animais mas que se revela, aparentemente, fundamental para a sobrevivência destes parasitas.^(28,35-37)

A via do shikimato é responsável pela conversão de eritrose 4-fosfato e de fosfoenolpiruvato em corismato, através de 7 passos catalíticos sequenciais.⁽³⁶⁾ Ao longo destas reacções em cadeia vão-se formando vários produtos intermediários, que podem dar origem a outros metabolitos secundários, sendo o corismato o produto final.^(36,37) O corismato, através de vias metabólicas distintas, conduz à formação de vários produtos, nomeadamente, a aminoácidos aromáticos como o triptofano, a fenilalanina e a tirosina; a vitamina K; a quelantes de metais contendo ácido dihidroxibenzóico; a ubiquinona e a ácido *p*-aminobenzóico (PABA). Esta via está ainda associada a formação de metabolitos como flavenonas e naftoquinonas, sendo também uma alternativa para a síntese de derivados contendo grupos amina.⁽³⁷⁾

Esta via constitui um alvo terapêutico viável para alguns herbicidas, em particular a sexta enzima interveniente na cascata de reacções, a 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfatase sintetase (EPSP sintetase).^(28,36,37) A EPSP sintetase é uma enzima susceptível à inibição por um composto herbicida, o Glifosato (*N*-fosfometil glicina), um herbicida de marca comercial Roundup®. Estudos presentes na literatura demonstram que o Glifosato tem a capacidade de

bloquear a reacção catalizada pela EPSP sintetase presente em *T. gondii* e *P. falciparum*, comprometendo o desenvolvimento de ambos os parasitas. Outras enzimas implicadas na via do shikimato foram igualmente detetadas em extractos de *T. gondii* e *P. falciparum*.⁽³⁵⁻³⁸⁾

Existem relativamente poucos estudos realizados em *P. olseni* no que diz respeito à identificação suas vias metabólicas, contrariamente ao que se verifica em *P. falciparum* e *T. gondii*. Contudo, tendo em consideração as suas semelhanças com estes parasitas apicomplexa, existem evidências da presença desta via biossintética em *P. olseni*. Além disso, Elandaloussi *et al.* (2005), demonstraram que o Glifosato inibe a proliferação de *P. olseni in vitro* e que esse efeito é antagonizado pela adição de corismato, o que aponta para a presença da via do shikimato em *P. olseni*.^(21,36,37)

Como referido anteriormente, o corismato pode originar ácido *p*-aminobenzóico, um dos precursores na síntese de folatos. A via dos folatos é essencial para a formação de vitamina B9, uma coenzima envolvida na síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA) e de ácido ribonucleico (RNA).^(21,36)

A via dos folatos compreende uma serie de reacções que culminam com a formação de tetraidrofolato. A esta via estão associadas várias enzimas, que são responsáveis por realizar várias reacções sequenciais, nomeadamente a dihidrofolato redutase (DHFR) e a dihidropteroato sintetase (DHPS), enzimas importantes para a síntese de timidilato sintetase (enzima que cataliza a formação de timina, um dos nucleótidos do DNA).⁽³⁶⁾

Os antagonistas do folato, que incluem inibidores da DHFR e da DHPS, constituem uma classe terapêutica importante na inibição da síntese de ácido fólico, de que são exemplos compostos como a pirimetamina e o cicloguanil, inibidores da DHFR, e a sulfadiazina, um inibidor da DHPS. Apesar das resistências desenvolvidas aos inibidores de DHFR e DHPS, nomeadamente à pirimetamina, ao proguanil e às sulfadoxinas, o metabolismo dos folatos tem-se revelado um alvo viável para a terapia antimalárica, tal como será descrito mais à frente.^(21,36,37)

Estudos descritos na literatura demonstram que quer a pirimetamina quer o proguanil impedem a proliferação de *P. olseni*, ao contrário do que é observado com a sulfadiazina. Contudo, o facto de não ter sido observada inibição da proliferação de *P. olseni* pela sulfadiazina pode significar que o parasita não necessita da biossíntese de folato para a sua sobrevivência, tendo a capacidade de usar folato exógeno, ou então que apresenta um mecanismo de resistência ao composto. Por outro lado, a pirimetamina, apesar de apresentar um efeito inibitório, este não foi revertido com a adição de ácido fólico, o que indica que o efeito inibitório pode não ter origem no bloqueio da DHFR mas no de outro alvo; isto é, a DHFR pode não constituir o único alvo da pirimetamina no metabolismo dos folatos.^(37,39)

Deste modo, quer a via do shikimato quer o metabolismo dos folatos correspondem a vias biossintéticas viáveis para serem consideradas como alvos terapêuticos em *P. olseni*, uma vez que são susceptíveis a vários compostos, através de diferentes mecanismos.⁽³⁷⁾

iii. Capacidade antioxidante e a necessidade de ferro em *P. olsenii*

Como resposta à infecção por *Perkinsus*, os hemócitos procedem à internalização do parasita por endocitose, o qual permanece em fagossomas. Posteriormente, os hemócitos produzem espécies reativas de oxigénio (ROS), como por exemplo: aniões superóxido, através de um complexo NADPH oxidase; peróxido de hidrogénio, através da superóxido dismutase (SOD); e também radicais hidroxilo, com o objetivo de destruir o parasita. O ferro atua como um cofactor das reacções catalizadas pelos complexos enzimáticos responsáveis pela produção de ROS. Deste modo, as reservas de ferro que o hospedeiro possui são essenciais para que os hemócitos desenvolvam uma resposta imunológica efetiva. ⁽²¹⁾

Estudos demonstram que *P. marinus* tem a capacidade de sobreviver no interior dos hemócitos, apesar dos mecanismos de defesa imunológica desenvolvidos por estes. Além disso, demonstram ainda que *P. marinus* tem a capacidade de impedir a produção de ROS por parte dos hemócitos, e de neutralizar os produtos oxidativos já formados. ⁽²¹⁾

Esta capacidade antioxidante de *P. marinus* está relacionada com a atividade de três enzimas que foram recentemente identificadas e caracterizadas, e que são responsáveis por contrariar o sistema oxidativo desenvolvido pelos hemócitos: a ácido fosfatase, a superperóxido dismutase e a peroxidase dependente de ascorbato. A ácido fosfatase impede a produção de O₂, a superóxido dismutase neutraliza os aniões superóxido e a peroxidase dependente de ascorbato é responsável pela remoção do peróxido de hidrogénio. ⁽²¹⁾

A ácido fosfatase foi encontrada em concentrações relativamente elevadas nos produtos extracelulares de *P. marinus*, tendo-se assumido possuir, hipoteticamente, uma acção antioxidante que conduzia à desfosforilação de enzimas como a NADPH, que é responsável pela produção de O₂. Por outro lado, foi detetada a presença de superperóxido dismutase (SOD) nos extractos de *P. marinus*, cujo cofactor corresponde ao ferro (Fe-SOD). Apesar da necessidade de mais fundamentos que sustentem a hipótese, determinados autores defendem que a atividade enzimática de Fe-SOD está associada à neutralização de aniões superóxido presentes no interior dos fagossomas dos hemócitos. Já a peroxidase dependente de ascorbato (APX) demonstrou contribuir para a remoção do peróxido de hidrogénio, *in vivo* e *in vitro*. ⁽²¹⁾

As evidências experimentais e empíricas sugerem que a disponibilidade de ferro constitui um fator crítico, que condiciona a proliferação e a infetividade de *P. marinus*. Além disso, a eficácia dos mecanismos de defesa desenvolvidos por este parasita, que impedem os danos oxidativos gerados pelas ROS, permite a sua sobrevivência intracelular e a sua proliferação. Estes mecanismos de defesa envolvem a acção de diversas enzimas, nomeadamente as superóxido dismutases (SOD), cujo cofactor corresponde ao ferro. A expressão e a atividade enzimática da SOD é regulada pela presença e pela disponibilidade de ferro. *P. marinus* obtém ferro a partir dos reservatórios de ferro intracelulares presentes nos hemócitos. Deste modo, a sua capacidade antioxidativa conduz ao consumo excessivo do ferro presente nas reservas dos hemócitos, e que constituía, igualmente, a fonte de ferro para a produção de ROS. Estes fatores em associação vão impedir a existência de danos oxidativos no parasita, permanecendo este viável. ^(21,40)

Estudos divulgados na literatura demonstram que quanto maior a concentração de ferro a que estão expostas as ostras infetadas por *P. marinus*, maior a intensidade da infecção causada por *P. marinus*.⁽⁴⁰⁾ Além disso, existem evidências experimentais de que a aplicação de compostos quelantes do ferro, como a transferrina, a lactoferrina e a desferroxamina (DFO), conduzem a uma inibição da replicação de *P. marinus in vitro*. Este efeito inibitório pode ser revertido pela adição de ferro na forma solúvel. Assim, pode-se inferir que *P. marinus* depende criticamente da disponibilidade de ferro, estando sujeito á quantidade de ferro presente nas reservas intracelulares do hospedeiro, sendo que qualquer alteração nos seus níveis condiciona a sua proliferação.^(21,33,40)

Tal como sucede com *P. marinus*, *P. olsenii* e outros parasitas protozoários, como *Plasmodium falciparum*, demonstram apresentar uma grande dependência de ferro. Estudos desenvolvidos em *P. olsenii* demonstram que a desferroxamina (DFO) e o 2,2 biperidilo (BIP), compostos quelantes de Fe(II), possuem uma capacidade inibitória da proliferação do parasita *in vitro*. Este efeito foi revertido através da adição de Fe(II), o que evidencia que o efeito inibitório da proliferação parasitária foi provocado pela sua sequestração. Além disso, DFO demonstrou ainda eficácia na redução de infecções por *P. olsenii* em amêijoas, *in vivo*. Desta forma, pode-se inferir que *P. olsenii* apresenta uma elevada suscetibilidade à baixa disponibilidade de ferro induzida pelo uso de compostos quelantes de ferro, uma vez que se observou um decréscimo da sua proliferação, o que evidencia que o ferro é essencial para o seu desenvolvimento. De modo similar a *P. marinus*, a proliferação de *P. olsenii* é condicionada pelos níveis de ferro presentes nas reservas do seu hospedeiro.^(21,33)

Esta dependência de ferro, observável em *P. olsenii*, constitui um óptimo alvo terapêutico para o desenho de novos compostos ou para a otimização de outros já existentes, nomeadamente dos compostos quelantes de ferro ou dos compostos com atividade antimalárica que demonstram uma capacidade antiproliferativa neste âmbito.

1.4.1.4 Classes terapêuticas utilizadas no tratamento e na prevenção da perkinsose causada por *P. olsenii*

O controlo da perkinsose tem-se afigurado complicado, dado que, até à data, não foi desenvolvida uma estratégia terapêutica que apresente efetividade no combate a *P. olsenii*. Adicionalmente, as medidas profiláticas que poderiam conduzir a um decréscimo de mortes por infecções causadas por *P. olsenii* têm-se afigurado de difícil implementação, não tendo sido encontrada uma solução praticável e com custo reduzido, apesar dos diversos estudos realizados com o objetivo de encontrar alternativas que permitam conter ou eliminar a perkinsose. Mesmo desenvolvendo um composto com excelentes resultados ao nível da inibição da proliferação do parasita *in vitro*, este pode não ser o adequado para a utilização *in vivo*. É fundamental a avaliação da sua atividade e da sua toxicidade, sendo imperativo que o composto a testar não produza um impacto negativo, quer no hospedeiro do parasita quer no ecossistema.⁽¹⁴⁾

Os principais compostos utilizados e testados em *P. olsenii* são de origem natural, sintética ou semissintética. O uso destes compostos resulta da identificação de alvos

intracelulares ou de vias biossintéticas que se apresentam fundamentais para a sobrevivência do parasita, e que se considera apresentarem suscetibilidade à inibição por esses mesmos compostos, com consequências negativas para o parasita, selectivamente.⁽¹⁴⁾ Em *P. olsenii*, os alvos intracelulares e as vias biossintéticas referidas no ponto anterior constituem as principais vias no desenvolvimento de ferramentas terapêuticas para o combate ao parasita. Compostos que tenham demonstrado atividade contra outros membros do grupo Alveolata, como *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii* e *Leishmania donovani*, têm sido testados em *P. olsenii* apresentando por vezes resultados muito promissores na inibição da proliferação do parasita.

O desenvolvimento de novos fármacos para a perkinsose é fundamental, podendo seguir duas abordagens: a) desenvolvimento de compostos análogos aos fármacos com atividade contra *P. olsenii* já estabelecida; b) identificação de novos alvos terapêuticos (alvos intracelulares que participam em vias metabólicas cruciais para a sobrevivência do parasita e que são específicos deste) e desenvolvimento de fármacos que tenham uma elevada afinidade para os mesmos, de forma a produzir uma resposta terapêutica eficaz e seletiva. O aperfeiçoamento de compostos de origem sintética cujos alvos terapêuticos já são conhecidos constitui uma grande intervenção na prevenção e controlo de *P. olsenii*. Contudo, a otimização das propriedades farmacológicas destes compostos envolve não só o aperfeiçoamento da estrutura molecular dos mesmos, de modo a melhorar a interação com o alvo terapêutico a inibir, mas também o ajuste das propriedades, como a solubilidade e biodisponibilidade no local onde se pretende que o composto desencadeie a sua ação.

As classes terapêuticas descritas até aos dias de hoje como promissoras no combate ao parasita *P. olsenii* correspondem a compostos com atividade antiprotozoária descrita. São exemplos alguns herbicidas conhecidos, alguns compostos com atividade antimalárica e derivados destes e os quelantes de ferro.⁽¹⁴⁾ Estas classes terapêuticas vão ser descritas mais pormenorizadamente de seguida.

i. Herbicidas

Vários são os estudos experimentais desenvolvidos em *P. olsenii* que envolvem o uso de herbicidas.⁽¹⁴⁾ A via do shikimato constitui um dos principais alvos terapêuticos desta classe terapêutica, sendo a EPSP sintetase a sexta enzima que intervém na cascata de reacções desta via e uma das primordiais.⁽³⁵⁾

O Glifosato é um herbicida, comercializado com a marca Roundup®, cujo alvo terapêutico é a enzima EPSP sintetase. Estudos efetuados em *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium falciparum* demonstraram que este composto, cuja estrutura molecular está esquematizada na Figura I-5, tem a capacidade de inibir a EPSP sintetase destes parasitas, conduzindo conseqüentemente à inibição da via do shikimato nos mesmos. Este efeito conduz a uma inibição do crescimento de *P. falciparum* e de *T. gondii*, existindo ainda evidências experimentais que referem que a inibição da EPSP sintetase é letal para *P. falciparum*.^(35,38)

Um estudo publicado por Elandaloussi *et al.* (2008)⁽³⁷⁾ demonstrou que *P. olsenii* é igualmente suscetível à ação do Glifosato, uma vez que foi visível uma redução da proliferação do parasita nas amêijoas infetadas com o aumento da concentração de Glifosato utilizado.⁽³⁸⁾

Contudo, para que seja observável este efeito inibitório na proliferação destes parasitas apicomplexa é necessário o uso de concentrações relativamente elevadas de Glifosato (IC_{50} para *P. olseni* é de 3400 μ M).^(37,38) Deste modo, é imperativo o desenvolvimento de outros compostos que afetem igualmente a via do shikimato, pois as elevadas concentrações de Glifosato necessárias para que seja observado um efeito podem conduzir a toxicidade, quer no hospedeiro quer no ecossistema circundante. A alteração da estrutura do Glifosato de forma a desenvolver análogos do Glifosato mais potentes não se tem demonstrado fácil.⁽³⁶⁾

Outros compostos usados como herbicidas, como o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), o Linuron, o Metolaclor e a Pendimetalina, representados na Figura I-5, apresentam também um efeito antiproliferativo sobre *P. olseni*. Apesar de todos estes compostos serem usados como herbicidas, possuem mecanismos de inibição distintos.^(14,35)

O efeito antiproliferativo da Pendimetalina, também observado em *P. falciparum*, foi atribuído à inibição da disrupção dos microtúbulos durante o desenvolvimento do parasita. O Metolaclor é um herbicida pertencente à classe das cloroacetanilidas que tem a capacidade de inibir a biossíntese de ácidos gordos de cadeia longa (VLCFA) em plantas e em algumas algas. Estudos descritos na literatura demonstram que *P. marinus* possui alguns genes relacionados com esta via de síntese de ácidos gordos, o que explica o efeito em *P. olseni*. O Linuron conduz à inibição do transporte de electrões no fotossistema II nas plantas. Apesar de *Perkinsus* não possuir este fotossistema II, o efeito inibitório observado pode dever-se à inibição do transporte de electrões noutros sistemas. O herbicida 2,4-D apresentou também um efeito antiproliferativo sobre *P. olseni*, sendo todavia necessárias concentrações mais elevadas para que o efeito fosse observado, comparativamente com os anteriores.⁽³⁵⁾

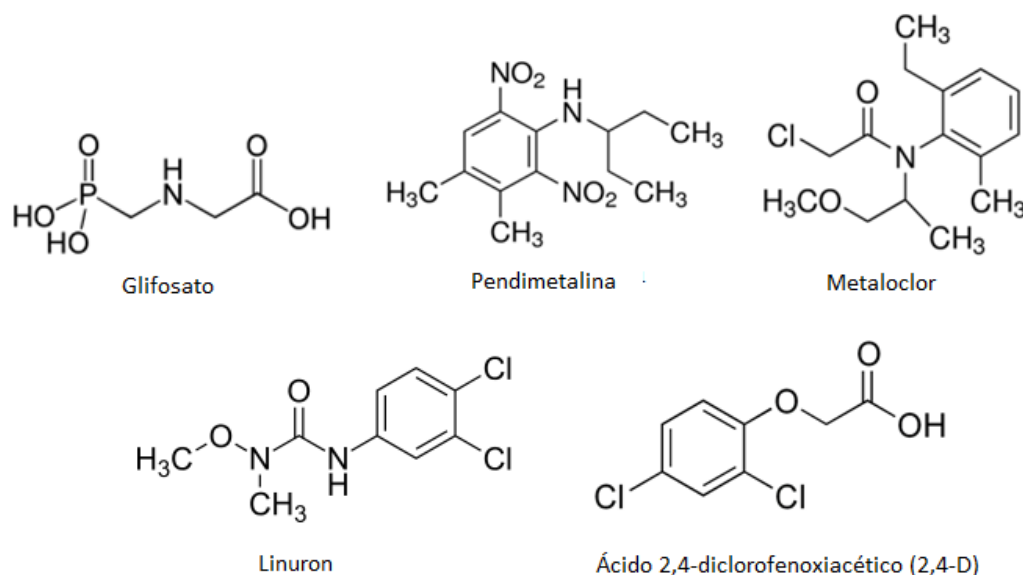


Figura I-5: Representação das estruturas de herbicidas com efeito inibitório da proliferação de *P. olseni*. (Adaptado de⁽⁴¹⁻⁴⁵⁾)

ii. Compostos quelantes do ferro

Existem várias evidências experimentais que demonstram que os compostos quelantes de ferro apresentam uma atividade inibitória da proliferação de *P. olsenii*.^(33,39) O ferro constitui um elemento essencial para a replicação do genoma e para a efetivação de determinadas atividades enzimáticas do parasita, sendo o controle da sua biodisponibilidade um dos processos a considerar no desenvolvimento de terapêuticas para controle da perkinsose. A dependência de ferro, quer por *P. olsenii* quer por *P. falciparum*, é demonstrada pelo efeito inibitório da sua proliferação *in vitro* quando estes parasitas estão sujeitos à presença de compostos com uma ação quelante de ferro. De um modo geral, os quelantes atuam através da sequestração do ferro disponível, deixando este de estar disponível para utilização nos processos anteriormente referidos.^(21,33,46)

A lactoferrina, a transferrina e a desferroxamina (DFO) são compostos de origem natural que atuam como quelantes de ferro. Estudos com estes compostos demonstraram a sua ação antiproliferativa em *P. marinus*.^(40,47) A lactoferrina é uma proteína secretada pelos neutrófilos nos mamíferos, como resposta à presença de agentes patogénicos e a DFO é um potente agente quelante de ferro que exibe uma afinidade preferencial por ferro presente em reservatórios intracelulares.^(46,47)

Estudos mais recentes evidenciam a atividade antiproliferativa da DFO e do 2,2' – bipyridilo (BIP), cujas estruturas estão representadas na Figura I- 6, em *P. olsenii*.^(33,39) Apesar de ambos apresentarem uma ação quelante de ferro, possuem capacidades de ligação a este elemento distintas, ao nível de permeabilidade, da estereoquímica ou do grau de afinidade para Fe(II) ou Fe(III). Enquanto DFO é um agente quelante hexadentado com capacidade de efetuar 6 ligações e com uma maior afinidade para Fe(III), 2,2 – BIP é um agente quelante bidentado que se liga preferencialmente a Fe(II). Ao nível da permeabilidade e da estereoquímica, a DFO é hidrofílica, sendo apenas necessária uma molécula por cada ião férrico, enquanto que o BIP se caracteriza por ser lipofílico e a complexação envolve três moléculas por cada ião férrico.^(33,46)

DFO demonstrou efetividade na redução da carga parasitária de *P. olsenii* em amêijoas com infeções bem estabelecidas *in vivo*, o que indica a suscetibilidade deste parasita protozoário a compostos quelantes de ferro. Além disso, estudos experimentais associados a possível toxicidade aguda de DFO, efetuados em amêijoas não infetadas, não conduziram à morte de nenhum dos exemplares participantes, o que evidencia uma reduzida toxicidade para o hospedeiro.⁽³⁹⁾

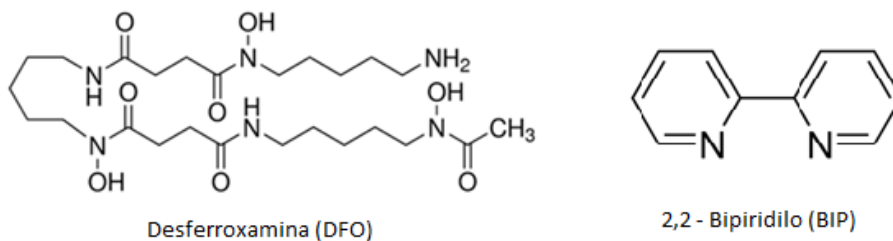


Figura I-6: Representação da estrutura molecular dos compostos quelantes de Fe (II) que

apresentam atividade antiproliferativa em *P. olseni*: desferroxamina (DFO) e 2,2 – biperidilo. (Adaptado de ^(48,49))

iii. Compostos antimaláricos e derivados

P. olseni e *Plasmodium spp* apresentam algumas vias metabólicas e organelos em comum, nomeadamente o metabolismo do shikimato e dos folatos, bem como a presença do apicoplasto. Além disso, ambos os parasitas protozoários são suscetíveis à disponibilidade de Fe(II), cuja concentração intracelular está associada de modo proporcional à proliferação e virulência dos mesmos, sendo ainda um elemento crucial noutras vias metabólicas e na defesa do parasita contra os mecanismos imunológicos desencadeados pelo hospedeiro. Deste modo, algumas das classes utilizadas no tratamento da malária constituem opções viáveis para o tratamento da perkinsose causada por *P. olseni*. ^(14,28,33,36)

Os antagonistas dos folatos e os endoperóxidos correspondem a duas classes terapêuticas com resultados positivos utilizadas no tratamento de *Plasmodium spp*. ⁽⁵⁰⁻⁵²⁾ Enquanto os antagonistas dos folatos atuam através da inibição da síntese do ácido fólico, os endoperóxidos possuem um mecanismo de ação diferente, pertencendo a um grupo de fármacos distinto, correntemente denominado artemisininas. Os compostos derivados da artemisinina atuam como profármacos, uma vez que necessitam de uma bioativação intracelular. Esta bioativação é dependente da concentração de Fe(II) intracelular. Desta forma, o controlo da disponibilidade deste cofator poderá constituir uma estratégia terapêutica útil para o domínio da proliferação de *P. olseni*. Várias evidências experimentais demonstram que compostos pertencentes a ambas as classes constituem estratégias quimioterapêuticas promissoras no controlo de *P. olseni*, como será descrito de modo mais detalhado em seguida. ^(24,37,50)

a. Antagonistas dos folatos

Os antagonistas de folatos impedem a formação de ácido fólico, cujos compostos derivados são fundamentais para a sobrevivência celular na medida em que estão implicados na síntese de purinas (um substrato muito importante na formação de DNA) e na síntese proteica. Esta classe terapêutica foi desenvolvida primeiramente como antibiótico, de forma a impedir a proliferação celular bacteriana, uma vez que as bactérias possuem uma capacidade intrínseca de sintetizar ácido fólico, que é crucial para o seu crescimento e multiplicação. O sucesso deste tipo de quimioterapia como antiproliferativo bacteriano, conduziu à sua aplicação no tratamento de outras patologias causadas por fungos e parasitas, em que se observa, igualmente, uma proliferação celular dependente de ácido fólico, como a malária, e posteriormente, a perkinsose. ⁽⁵⁰⁾

Os antagonistas dos folatos utilizados dividem-se em duas classes distintas: os antifolatos de classe I, denominados inibidores da dihidropteroato sintetase (DHPS); e os antifolatos de classe II, denominados inibidores da dihidrofolato redutase (DHFR). ⁽⁵⁰⁾ Em estratégias que envolvem terapêutica de combinação podem associar-se as duas classes.

Os inibidores da DHFR englobam fármacos como o proguanil, o cloroproguanil, o cicloguanil e a pirimetamina. Por outro lado, os inibidores da DHPS incluem algumas sulfonamidas e sulfonas, nomeadamente a dapsona, a sulfadoxina e o sulfaleno.^(50,52) Os diversos antagonistas dos folatos de classe I e II estão representados na Figura I-7.

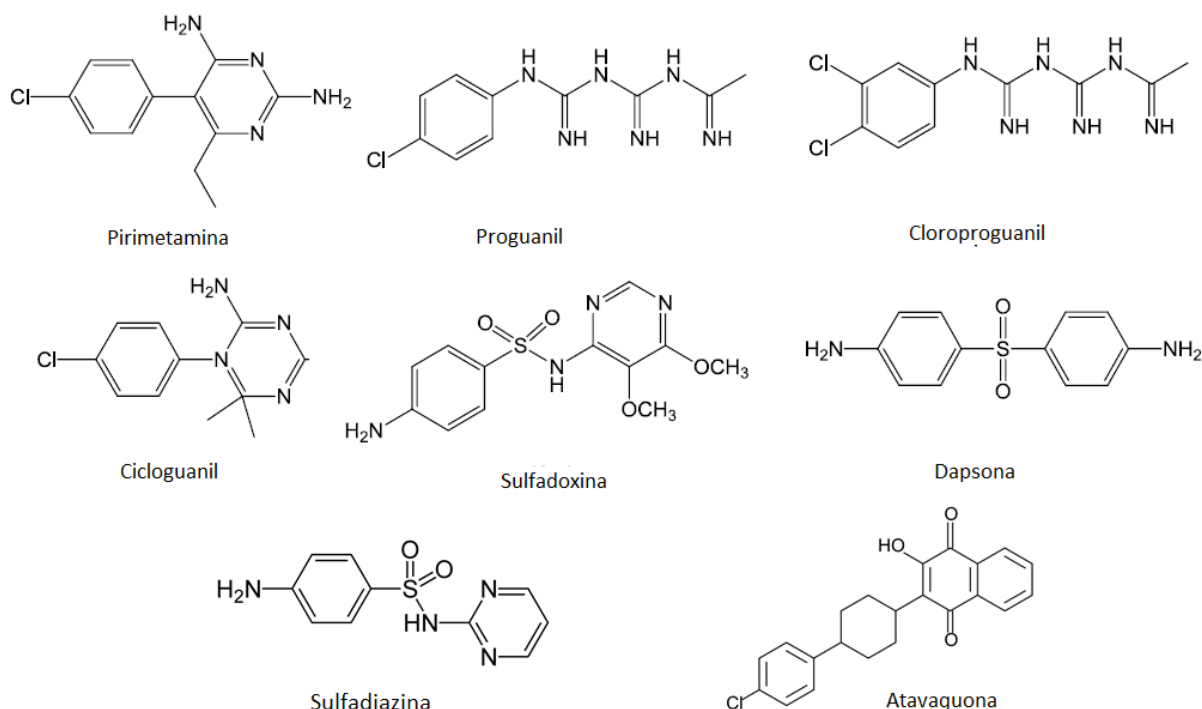


Figura I-7: Representação da estrutura molecular dos antagonistas dos folatos utilizados na terapêutica da malária e testados em *P. olsenii*. (Adaptado de⁽⁵⁰⁾)

Os inibidores da DHFR, nomeadamente, o proguanil e a pirimetamina, apresentaram capacidade inibitória em *P. olsenii*. Contudo, desconhece-se o mecanismo de atuação do proguanil em *P. olsenii*, na medida em que este, para desencadear o seu efeito inibitório em *Plasmodium falciparum*, requer primeiramente uma metabolização. Esta metabolização, mediada pelas enzimas do hospedeiro de *Plasmodium*, conduz à formação do composto dotado de atividade farmacológica, o cicloguanil. O cicloguanil tem, efectivamente, como alvo terapêutico a DHFR, tendo sido sugerindo que o proguanil atua como uma biguanida em *P. olsenii*, sendo o seu alvo terapêutico separado da DHFR. Esta proposta de mecanismo de ação do proguanil, atuando como um biguanida em *P. olsenii*, conduziu à realização de ensaios com o objetivo de desenvolver melhores inibidores de DHFR para uso como antimaláricos, nomeadamente, tentativas para a otimização do proguanil, direccionando o seu modo de ação como biguanidas em *Plasmodium*.^(14,37)

Quanto aos inibidores da DHPS, os ensaios envolvendo sulfadoxina não demonstraram inibição da proliferação de *P. olsenii*. Os autores sugerem um mecanismo de defesa desencadeado pelo parasita, ou a capacidade de o mesmo usar folato exógeno, ou uma diferente sensibilidade ao alvo terapêutico, como possíveis causas da inatividade deste composto, contrariamente ao observado em *Plasmodium*.⁽³⁷⁾

b. Artemisinina e análogos

A artemisinina (Figura I-8) é uma lactona sesquiterpénica extraída das folhas da planta *Artemisia annua*, e que contém como farmacóforo uma ponte endoperóxídica (1,2,4-trioxano), fundamental para a sua atividade farmacológica. A artemisinina e os seus derivados sintéticos e semissintéticos constituem, actualmente, uma importante classe farmacológica para a quimioterapia da malária. ^(24,53,54)

A partir dos anos 80 do século passado tornou-se imperativa a procura e desenvolvimento de novos agentes antimaláricos seguros e eficazes para o controlo da malária e para a redução da elevada taxa de mortalidade associada, devido à elevada disseminação da resistência por *P. falciparum* aos fármacos antimaláricos convencionais. Neste âmbito, a artemisinina e os seus derivados semissintéticos, igualmente com uma estrutura característica de endoperóxido, revelaram-se efetivos no controlo da doença. ^(51,55)

Os derivados semissintéticos da artemisinina de primeira geração, como o artesunato de sódio (ART), o arteméter e o arteéter, são compostos amplamente utilizados na quimioterapia da malária. A redução da lactona na artemisinina conduziu à dihidroartemisinina (DHA), que serviu de composto de partida para a preparação de éteres e ésteres de dihidroartemisinina, os compostos anteriormente referidos. A DHA constitui o metabolito ativo destes compostos, sendo o responsável pela ação farmacológica. As estruturas químicas dos endoperóxidos referenciados, bem como a indicação do farmacóforo deste grupo de moléculas, encontram-se representados na Figura I-8. ^(51,53,55)

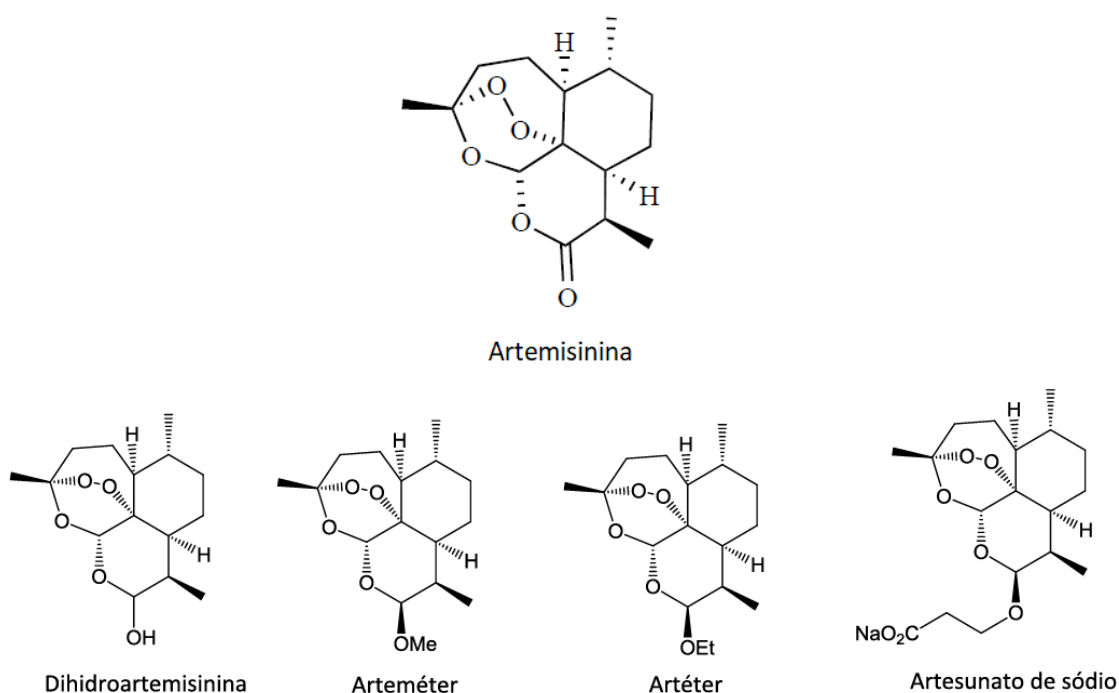


Figura I-8: Representação da estrutura molecular da artemisinina e dos seus derivados semissintéticos, utilizados no tratamento da malária. (Adaptado de ⁽⁵³⁾)

Posteriormente surgiram os análogos da artemisinina, nos quais se incluem os peróxidos sintéticos que têm como base uma estrutura 1,2 – dioxano, 1,2,3 - trioxolano, 1,2,4 – trioxolano ou 1,2,4,5 – tetraoxano. Alguns dos trioxolanos e tetraoxanos desenvolvidos apresentaram-se como candidatos promissores na quimioterapia da malária. ^(24,51)

De um modo geral, os endoperóxidos derivados da artemisinina e os seus análogos sintéticos demonstram necessitar de um mecanismo de bioativação similar, o qual é dependente da presença intracelular de Fe(II) ou heme. O Fe(II) atua como um ácido de Lewis, catalisando uma clivagem redutiva da ligação peróxido, característica destes compostos, e dando origem a espécies radicalares centradas em carbono que atuam como potentes agentes alquilantes, capazes de danificar várias biomoléculas do parasita e provocar a sua morte. ^(24,51) Os mecanismos de bioativação e ação dos endoperóxidos serão abordados de modo mais detalhado no Capítulo II.

Tal como referido anteriormente, *P. olsenii* e *P. falciparum* apresentam vias metabólicas similares, nomeadamente, na dependência por Fe(II). Tendo em consideração o ponto anterior, e o facto de a proliferação de *P. olsenii* depender dos níveis intracelulares de Fe(II), pode-se supor que os endoperóxidos podem ser ativados nas culturas de *P. olsenii*, conduzindo à formação de espécies com capacidade antiproliferativa ou que conduzam a morte do parasita. ⁽²⁴⁾

Um estudo publicado em 2013 por Araújo *et al.* demonstra a capacidade inibitória da artemisinina, da DHA, do artesunato e de alguns trioxolanos sintéticos em *P. olsenii*. O mesmo estudo demonstrou que a toxicidade da DHA em *P. olsenii* depende da presença da ponte peróxido, apontando-a como o farmacóforo. ⁽²⁴⁾

O mesmo estudo evidenciou ainda que o efeito antiproliferativo da DHA é afetado pela disponibilidade de Fe(II) no meio. A necessidade de Fe(II) evidenciada por *P. olsenii* conduz à existência de reservas de Fe(II) a nível intracelular. Assim, os compostos suscetíveis à bioativação catalisada pela presença de Fe(II) são facilmente envolvidos nas reacções redox que ocorrem a nível intracelular. Desta forma, a biodisponibilidade de Fe(II) a nível intracelular constitui um fator condicionante da toxicidade dos endoperóxidos, uma vez que o mecanismo de bioativação é dependente de Fe(II), tal como observado em *Plasmodium*. Verificou-se que um aumento das concentrações intracelulares de Fe(II) conduziu a uma bioativação mais eficiente, que, por consequência, aumentou a toxicidade e resultou num maior efeito antiproliferativo em *P. olsenii*. ⁽²⁴⁾

Os peróxidos sintéticos (trioxolanos) testados em *P. olsenii* (Figura I-9) demonstraram uma atividade antiproliferativa *in vitro*, evidenciando que o mecanismo de bioativação é dependente de Fe(II), tal como acontece com a artemisinina e com os seus derivados de primeira geração. O composto NAC29 demonstrou uma atividade inibitória da proliferação de *P. olsenii* com um IC₅₀ de 347 µM; e o composto NAC30 com um IC₅₀ de 430 µM. Ambos os compostos demonstraram uma redução dos respectivos valores de IC₅₀ após a coadição de cloreto de ferro ao meio, o que evidencia que a maior concentração de Fe(II) conduz a uma mais eficaz clivagem redutiva da ponte peróxido, resultando num maior efeito antiproliferativo. ⁽²⁴⁾

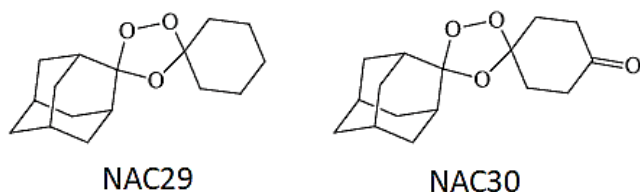


Figura I-9: Representação da estrutura molecular dos endoperoxídeos sintéticos (trioxolanos) que demonstraram atividade antiproliferativa em *P. olseni*. (Adaptado de ⁽²⁴⁾)

iv. Outros compostos com atividade antiprotozoária em *P. olseni*

A cicloheximida, cuja estrutura está representada na Figura I-10, é um inibidor da síntese proteica que atua na fase de alongação da mesma, cuja atividade antiprotozoária *in vitro* foi comprovada em *P. marinus*. Estudos efetuados em *P. olseni* demonstraram igualmente um efeito antiproliferativo por exposição à cicloheximida. ⁽³⁹⁾

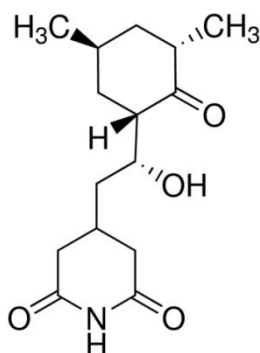


Figura I-10: Representação da estrutura molecular da cicloheximida. (Adaptado de ⁽⁵⁶⁾)

1.5 Doenças que afetam a saúde humana causadas por outros protozoários do grupo Alveolata

As doenças infecciosas causadas por parasitas protozoários constituem uma enorme ameaça para a saúde pública mundial. De um modo geral são doenças endêmicas em várias regiões no mundo, afetando particularmente os países em desenvolvimento, onde comprometem o desenvolvimento humano, social e económico. ⁽¹⁴⁾ Desta forma, a profilaxia, o controlo e o tratamento de patologias provenientes de infeções por protozoários permanece como um grande desafio, requerendo o desenvolvimento de estratégias quimioterapêuticas eficazes, seguras e economicamente acessíveis. O constante aparecimento de estirpes resistentes aos fármacos disponíveis tem-se revelado como o principal obstáculo para a eliminação destas patologias. ⁽¹⁴⁾

As doenças que necessitam de uma intervenção prioritária neste contexto são a malária, as leishmanioses e a toxoplasmose, sendo imperativo o desenvolvimento de fármacos com atividade contra os parasitas associados a cada uma das doenças.

1.5.1 Malária

A malária é uma doença infecciosa que afeta gravemente cerca de 100 países, a maioria dos quais em desenvolvimento, localizados no continente africano, na Ásia e na América Latina. É uma patologia causada por parasitas do género *Plasmodium*, transmitidos ao humano através da picada de mosquitos fêmea infetados do género *Anopheles*. Estes são considerados os vectores da doença, uma vez que são os responsáveis pela transmissão do parasita de humano para humano. Contudo, contrariamente ao humano, o mosquito não apresenta sintomatologia associada a presença do parasita.^(57,58)

Segundo o Relatório Mundial da Malária de 2016, disponibilizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2015 ocorreram 212 milhões de casos de malária em todo o mundo e cerca de 90% foram registados no continente africano. No mesmo ano verificaram-se ainda 429 000 mortes provocadas pela mesma doença, também maioritariamente no continente africano, estimando-se que 303 000 tenham ocorrido em crianças com idade inferior aos 5 anos. Contudo, de acordo com o mesmo relatório, verificou-se uma redução de 21% na incidência global da malária, acompanhada de uma redução de 29% na mortalidade causada por esta doença, entre os anos de 2010 e 2015.^(58,59)

A malária é endémica em 91 países e cerca de 3.2 mil milhões de pessoas vivem em locais em que existe um elevado risco para a transmissão.⁽⁵⁹⁾ Os sinais e sintomas da doença surgem, normalmente, 10 a 15 dias após a picada do mosquito fêmea do género *Anopheles*. O período de incubação pode variar entre 7 a 30 dias, dependendo da espécie do parasita infetante, do estado e o tipo de hospedeiro, e da espécie de mosquito transmissor.^(57,58)

Inicialmente, a sintomatologia observada inclui febre, suores, mal-estar geral, vómitos e náuseas, dores no corpo e na cabeça. Se a infeção não for tratada, ou caso o tratamento não demonstre eficácia, verifica-se um agravamento do estado clínico do doente, que pode conduzir a malária cerebral, anemia severa, falha renal, problemas a nível da coagulação sanguínea, acidose metabólica, hipoglicémia, redução da pressão sanguínea, insuficiência respiratória aguda, podendo resultar em morte.^(57,60)

1.5.1.1 O parasita: *Plasmodium spp*

Plasmodium spp pertence a uma família de parasitas intracelulares, a família Apicomplexa. São conhecidas 5 espécies de *Plasmodium* com capacidade de infetar o humano: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium ovale* (*Plasmodium ovale curtissie* e *Plasmodium ovale willikeri*) e *Plasmodium malariae*.^(61,62)

P. falciparum é considerada como espécie mais importante do ponto de vista da epidemiologia da malária, dado que é a responsável pela elevada mortalidade e morbidade associada à doença, no continente africano. Por outro lado, *P. vivax* é responsável pela maioria das mortes fora do continente africano (Ásia e América latina). Ao contrário de *P. falciparum*, que apresenta normalmente uma multiplicação rápida na corrente sanguínea, *P. vivax* pode apresentar estados latentes da doença a nível hepático. Desta forma, *P. vivax* pode conduzir a

manifestações da doença meses ou anos após a picada do mosquito, ou à reincidência do aparecimento da sintomatologia da mesma. ^(57,61,62)

A malária provocada por *P. ovale* e *P. malariae* é pouco comum, e a causada por *P. knowlesi* é mais prevalente no sudoeste da Ásia, sendo a estirpe considerada como um parasita zoonótico de macacos. No entanto já foram reportados casos de malária fatais provocados por *P. knowlesi*, uma vez que a esta estirpe está associado a um ciclo replicativo bastante rápido, cuja infecção progride rapidamente de assintomática para uma infecção muito grave. ^(61,62)

1.5.1.1.1 Ciclo de vida de *Plasmodium spp*

O ciclo de vida do parasita *Plasmodium spp* envolve dois hospedeiros diferentes: o hospedeiro definitivo, a fêmea do mosquito do género *Anopheles*, e um hospedeiro intermediário vertebrado, que neste caso é o humano. O ciclo de vida de *Plasmodium spp*, esquematicamente representado na Figura I-11, ^(61,62) envolve 3 fases distintas: uma fase sexuada, denominada de ciclo esporogónico **(C)**, e que ocorre no mosquito do género *Anopheles*; e duas fases assexuadas, que ocorrem no hospedeiro vertebrado (o humano). Estas duas fases assexuadas englobam o ciclo eritrocítico **(B)**, que se desenvolve no interior dos eritrócitos, e o ciclo exo-eritrocítico, que se dá no interior dos hepatócitos **(A)**. ⁽⁶¹⁾

A transmissão do parasita para o hospedeiro humano ocorre quando a fêmea do mosquito do género *Anopheles* faz a sua refeição sanguínea, inoculando em simultâneo os esporozoítos presentes nas suas glândulas salivares **(1)**. Os esporozoítos inoculados constituem a forma infecciosa do parasita. ⁽⁶¹⁾

Uma vez na corrente sanguínea, os esporozoítos migram rapidamente para o fígado, infectando os hepatócitos **(2)**. A nível intracelular, verifica-se uma reprodução assexuada do parasita (conduzindo a um aumento do seu número), e à sua maturação em merozoítos. Deste modo, forma-se uma célula multinucleada denominada de esquizonte **(3)**, que possui no seu interior um elevado número de merozoítos. De seguida, verifica-se a ruptura da membrana celular do hepatócito infectado, com conseqüente libertação dos merozoítos para a corrente sanguínea **(4)**. ⁽⁶¹⁾

No caso de *P. ovale* e *P. vivax* o parasita pode permanecer nas células hepáticas num estado latente ou adormecido, apenas invadindo a corrente sanguínea meses ou anos mais tarde, ou provocando reincidências da doença. Neste caso, o parasita encontra-se numa forma parasitária denominada de hipnozoíto. ⁽⁶¹⁾

Na corrente sanguínea, os merozoítos infectam os eritrócitos dando início ao ciclo eritrocítico **(5)**. Neste ciclo, o parasita pode proceder a uma nova reprodução assexuada, a esquizogonia eritrocítica, dando origem a um maior número de parasitas que podem infectar outros eritrócitos; pode também proceder à sua diferenciação em espécies sexuadas. ⁽⁶¹⁾

No interior do eritrócito, os merozoítos diferenciam-se numa forma imatura de trofozoítos. Esta forma do parasita pode seguir duas vias distintas. ⁽⁶¹⁾ Por um lado, pode

resultar numa forma madura de trofozoíto. Este sofre um processo de multiplicação intracelular, bem como de diferenciação, dando origem a uma célula multinucleada, o esquizonte, que possui no seu interior um elevado número de merozoítos. Posteriormente dá-se a rutura da membrana celular dos eritrócitos infetados **(6)**, libertando-se para a corrente sanguínea os merozoítos. Estes vão infetar, sucessivamente, novos eritrócitos, o que promove a continuidade do ciclo eritrocítico. ⁽⁶¹⁾

A sintomatologia e a patogenicidade características da doença devem-se, essencialmente, à esquizogonia eritrocítica do ciclo de vida do parasita, à libertação dos parasitas para a corrente sanguínea causada pela rutura da membrana celular dos eritrócitos e aos mecanismos de defesa desencadeados pelo hospedeiro de modo a combater o parasita bem como as suas toxinas. Enquanto se dá a multiplicação do parasita no interior do eritrócito verifica-se a acumulação de determinadas substâncias tóxicas no mesmo. Quando ocorre a lise celular dos eritrócitos, com a libertação dos merozoítos, existe a libertação destas substâncias para a corrente sanguínea. Este tipo de substâncias estimula o aparecimento de macrófagos e de outras células que produzem citocinas e de outros fatores solúveis, que induzem o aparecimento de toda a sintomatologia associada a malária. ⁽⁶⁰⁾

Por outro lado, alguns trofozoítos imaturos podem diferenciar-se em estados sexuais do parasita, os gametócitos **(7)**. ⁽⁶¹⁾ O gametócito masculino, denominado de microgametócito, e o gametócito feminino, denominado de macrogametócito, são ingeridos pelo mosquito fêmea *Anopheles* durante uma refeição sanguínea **(8)**. No mosquito fêmea do género *Anopheles* ocorre a reprodução sexuada do parasita, no denominado ciclo esporogónico. Inicialmente dá-se uma exflagelação do microgametócito e posteriormente verifica-se a penetração do macrogametócito pelo microgametócito exflagelado **(9)** no lúmen intestinal do mosquito, dando origem ao zigoto (forma diplóide do parasita). O zigoto sofre um processo de maturação, dando origem a uma forma alongada, dotada de mobilidade, denominada de oocinete **(10)**. O oocinete tem a capacidade de entrar nas células epiteliais do intestino médio do mosquito, onde permanece e se desenvolve em oocisto **(11)**. De seguida, os oocistos multiplicam-se por um processo de divisão assexuada, conduzindo a sua rutura com consequente libertação de esporozoítos **(12)**, que migram até às glândulas salivares do mosquito. ⁽⁶¹⁾

Ao realizar uma nova refeição sanguínea, o mosquito fêmea inocula os esporozoítos na corrente sanguínea do novo hospedeiro, reiniciando o ciclo **(1)**. ⁽⁶¹⁾

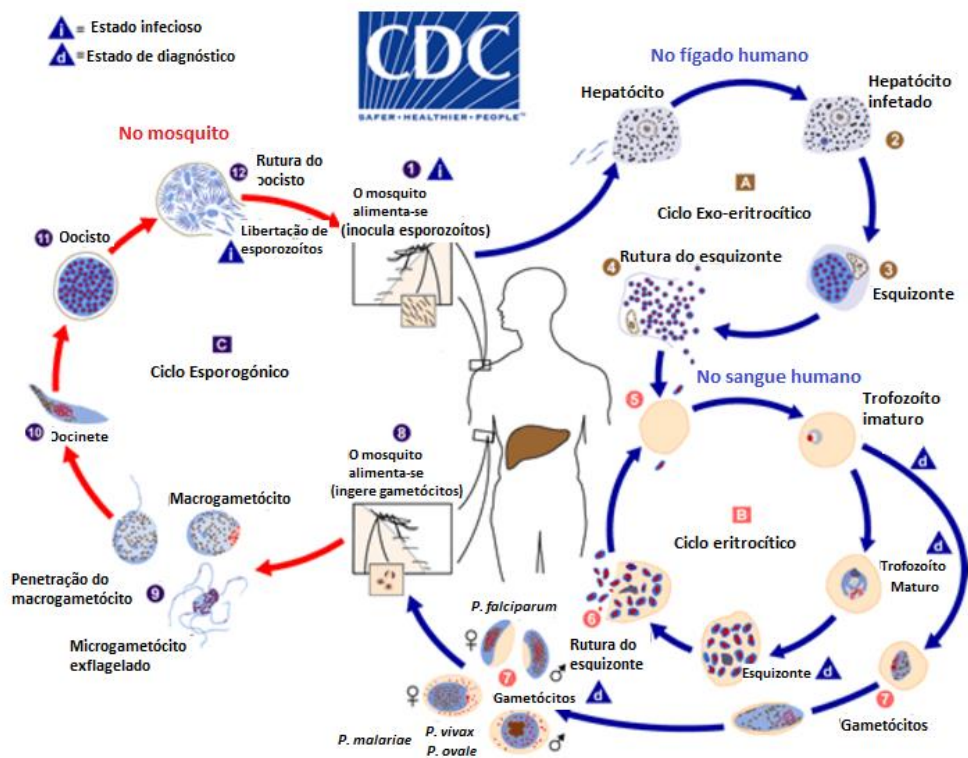


Figura I-11: Esquema representativo do ciclo de vida de *Plasmodium spp*, no mosquito do género *Anopheles* e no hospedeiro vertebrado, o ser humano. (Adaptado de ⁽⁶¹⁾)

1.5.1.2 Classes terapêuticas utilizadas no tratamento e na prevenção da malária

Atualmente, o tratamento e a prevenção da malária assentam na quimioterapia, utilizada com um objetivo antiproliferativo ou parasiticida de *Plasmodium*. Grande parte dos fármacos antimaláricos atua na fase eritrocítica do ciclo da vida do parasita, sendo esta a fase da infeção responsável pelo aparecimento dos sintomas característicos da malária. ^(63,64)

A descoberta da cloroquina em 1940 constitui um marco essencial na história do tratamento e da prevenção da malária, tendo sido um fármaco sintético fundamental no tratamento, prevenção e erradicação da malária até 1950, através da implementação do “National Malaria Control and Eradication Programme” em todo o mundo. Contudo, a eficácia terapêutica da cloroquina e os esforços para erradicar a malária foram comprometidos pelo aparecimento de estirpes parasitárias resistentes à cloroquina. Devido à inexistência de uma terapêutica acessível e eficaz para o tratamento da malária, a disseminação de estirpes resistentes à cloroquina conduziu a um aumento das mortes causadas por malária por volta dos anos 80. Desta forma, o uso da cloroquina foi substituído pela combinação sulfadoxina – pirimetamina, que se revelou rapidamente ineficaz devido, igualmente, à selecção de estirpes resistentes. ⁽⁵²⁾

Assim, o uso da terapêutica em monoterapia foi substituído pela utilização de fármacos antimaláricos em combinação, pertencentes às várias classes terapêuticas disponíveis. O uso de uma terapêutica combinada tem demonstrado uma maior eficácia terapêutica e uma redução no desenvolvimento de estirpes resistentes. Neste âmbito, as terapêuticas combinadas baseadas na artemisinina (do inglês: artemisinin-based combination therapies,

ACTs) têm sido amplamente utilizadas, tendo demonstrado efetividade no controlo da doença. No entanto, recentemente observou-se o surgimento de resistências a estas terapêuticas combinadas, sendo deste modo fundamental o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento e controlo da malária, acompanhados pelo estabelecimento de novos regimes terapêuticos acessíveis, seguros e eficazes. ^(52,65)

De seguida estão apresentadas as principais classes terapêuticas utilizadas no tratamento e controlo da malária; derivados aminoquinolínicos, antagonistas dos folatos, antibióticos e endoperoxídeos (artemisinina e seus derivados sintéticos e semissintéticos). ⁽⁵²⁾

i. Antimaláricos de base aminoquinolínica

Os antimaláricos de base aminoquinolínica têm vindo a ser utilizados no tratamento da malária bem como na sua profilaxia há várias décadas. O seu uso deve-se, essencialmente, à sua elevada eficácia, a uma relação custo de síntese-efetividade adequada e à sua fácil e simples administração. Contudo, o seu uso tem vindo a ser limitado devido ao desenvolvimento de resistências por parte do parasita. ^(52,66)

O quinino, um composto natural extraído das cascas da árvore do género *Cinchona*, constituiu o primeiro composto com elevada eficácia no tratamento da malária, devido à sua rápida ação e à sua elevada efectividade contra as formas esquizontes do parasita. ^(66,67) No entanto, está associado a alguma toxicidade e a falta de eficácia causada pela existência de estirpes resistentes do parasita. Deste modo, a estrutura aminoquinolínica característica do quinino serviu de modelo para a síntese de outros compostos análogos (4-aminoquinolínicos, 8-aminoquinolínicos, arilamino-alcóois), de que resultaram fármacos importantes, nomeadamente a cloroquina, a amodiaquina, a mefloquina, a mepacrina, a primaquina, a lumefantrina e a halofantrina, representados na Figura I-12. ⁽⁶⁵⁻⁶⁷⁾

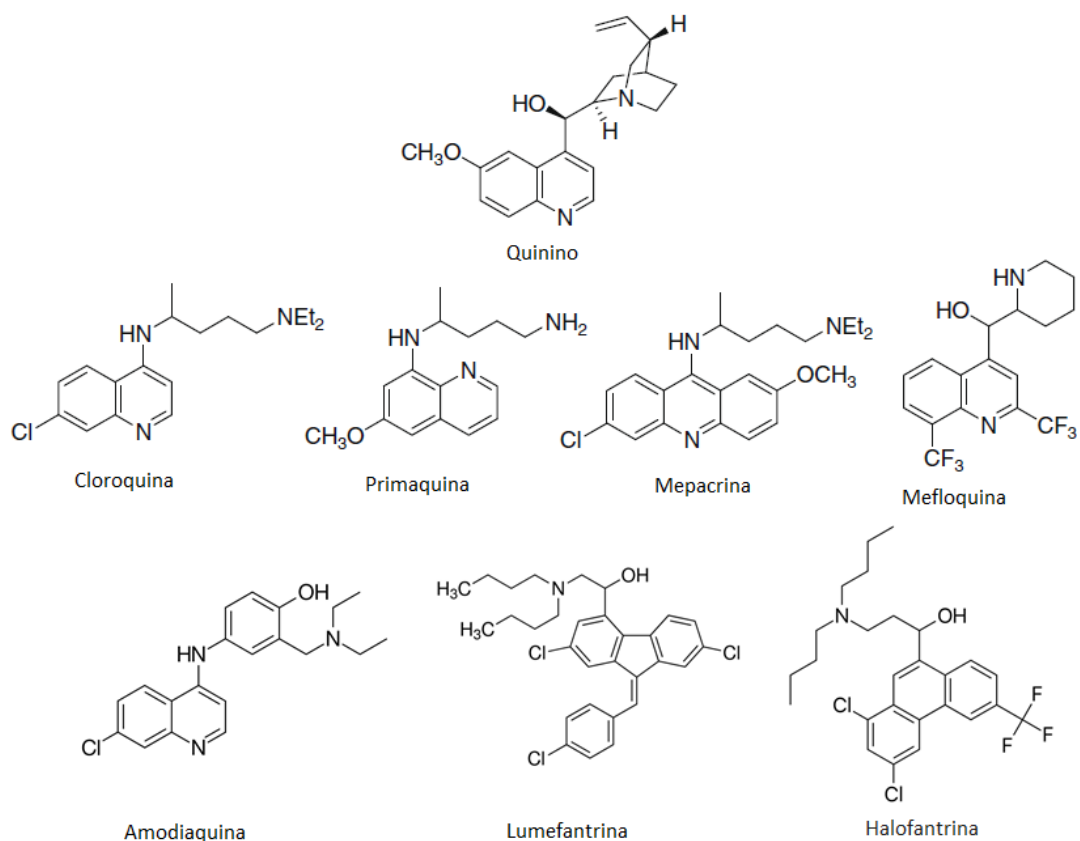


Figura I-12: Representação da estrutura molecular do quinino e de alguns dos seus análogos. (Adaptado de ⁽⁶⁶⁻⁶⁹⁾)

De entre os fármacos antimaláricos de base quinolínica desenvolvidos a cloroquina foi o que demonstrou maior sucesso, devido á sua elevada eficácia, baixa toxicidade, fácil administração e relação síntese-efetividade mais adequada, tendo sido, por isso, utilizado durante décadas. No entanto, o seu uso tem vindo a ser restringido devido ao aparecimento de um elevado número de regiões endémicas em que o parasita possui estirpes resistentes à cloroquina.^(66,67)

Mecanismo de acção

O mecanismo de ação dos fármacos antimaláricos de base quinolinica é variável para cada análogo, no entanto, todos eles intervêm no processo de alimentação do parasita, no interior do eritrócito, interferindo com a dimerização de heme, que é tóxica para o parasita na sua forma monomérica.⁽⁶⁶⁾

Como descrito acima, o parasita invade o eritrócito do hospedeiro, digerindo posteriormente a hemoglobina (hb) no interior do seu vacúolo digestivo. A hemoglobina corresponde à fonte primordial de alimento para o parasita, sendo constituída por uma subunidade multiproteica, que contém um grupo heme associado a um ião ferro.⁽⁶⁶⁾

No interior do vacúolo digestivo (com características ácidas), a hemoglobina é degradada por proteases do próprio parasita, originando o grupo heme e globina. A globina, por um processo de hidrólise, dá origem aos aminoácidos necessários para o crescimento e desenvolvimento do parasita. Contudo, o grupo heme constitui um produto tóxico para o

parasita. Apesar do parasita não possuir enzimas com capacidade de metabolizar o grupo heme, desenvolveu um mecanismo de conversão do grupo heme em hemozoina, o pigmento malárico. A hemozoina resulta da polimerização de dímeros de heme, não apresentando toxicidade para o parasita, e a sua formação é essencial para a sobrevivência do mesmo.⁽⁶⁶⁾

De um modo geral, os análogos aminoquinolínicos impedem o processo de polimerização do heme e, conseqüente, a formação de hemozoina, o que é letal para o parasita uma vez que impede o processo de destoxificação do heme, conduzindo à sua acumulação. O pH ácido do vacúolo digestivo do parasita permite que a cloroquina e seus análogos permaneçam no seu interior, uma vez que estes adquirem a forma protonada, o que dificulta a sua saída do vacúolo digestivo do parasita.^(63,66)

ii. Antifolatos

Os compostos derivados do ácido fólico são fundamentais para a replicação do DNA e para a síntese proteica, e, deste modo, para a sobrevivência celular, na medida em que são cruciais para o crescimento e divisão celular. Os folatos estão envolvidos na biossíntese de purinas, nomeadamente de timina, e atuam como cofatores na síntese de metionina.⁽⁷⁰⁾ A sobrevivência de *Plasmodium falciparum* é, tal como referido anteriormente e a par de *P. olsenii*, dependente da presença de ácido fólico. Todavia, este tem a capacidade de sintetizar folato *de novo* através do metabolismo do shikimato e dos folatos ou de o adquirir através do ambiente em que está inserido (do hospedeiro).^(36,70)

Desta forma, o metabolismo dos folatos fornece alvos terapêuticos de *Plasmodium* relevantes, sendo que determinadas enzimas implicadas nesta via, nomeadamente a dihidropteroato sintetase e a dihidrofolato redutase correspondem a alvos preferenciais de ataque.⁽⁵⁰⁾ Contrariamente a *Plasmodium*, os humanos não possuem a capacidade de produzir ácido fólico de modo intrínseco, tendo de obter o ácido fólico necessário para a sua sobrevivência através da alimentação. Desta forma, verifica-se a ausência de determinadas enzimas específicas da via metabólica dos folatos no humano, fornecendo esta classe terapêutica candidatos promissores e seletivos para o combate a este parasita. Apesar do humano possuir enzimas como a DHFR (não implicadas na síntese do ácido fólico), os inibidores da DHFR demonstram uma maior afinidade de ligação com a DHFR do *Plasmodium*, comparativamente com a afinidade de ligação com a DHFR do humano, apresentando, desta forma, uma maior especificidade para o parasita.^(36,70)

Como referido anteriormente, os antagonistas dos folatos utilizados no tratamento da malária dividem-se em duas classes: os inibidores da dihidrofolato redutase (DHFR), que englobam fármacos proguanil, clorproguanil, cicloguanil e pirimetamina; e os inibidores da dihidropteroato sintetase (DHPS), nos quais se inserem algumas sulfonamidas e sulfonas, nomeadamente a dapsona, a sulfadoxina e o sulfaleno. A dapsona constitui o inibidor da DHPS com maior eficácia descrito até aos dias de hoje. As estruturas moleculares dos vários inibidores da DHPS e da DHFR estão representadas na Figura I-7.⁽⁵⁰⁾

De um modo geral, estes fármacos são utilizados em combinação entre si ou em associação com fármacos de outras classes terapêuticas. A pirimetamina apresenta várias formulações fixas com outros antagonistas de folatos, nomeadamente com a dapsona, com a sulfadoxina ou com o sulfaleno.^(50,63,65) A associação pirimetamina - sulfadoxina (SP) é a mais utilizada, uma vez que é económica, facilmente praticável e está associada a uma elevada eficácia. Apesar de ser a combinação de primeira linha mais utilizada em muitos países africanos, apresenta uma elevada propensão para o desenvolvimento de resistências, sendo deste modo apenas utilizada em casos de malária não complicados.^(65,70)

Outras combinações utilizadas, como cloroproguanil – dapsona, apresentam uma menor selecção para resistências que a SP.⁽⁶⁵⁾ Existem ainda outras associações alternativas: a proguanil – dapsona ou atavaquona, cloroproguanil – dapsona, trimetoprim e sulfametazole – sulfaleno ou sulfametopirazina. A combinação proguanil – dapsona tem sido ainda associada ao artesunato.^(50,65)

O uso da combinação SP para a prevenção e tratamento da malária tem diminuído drasticamente devido à selecção de estirpes resistentes.⁽⁷⁰⁾ O desenvolvimento de resistências, não só relativamente a esta combinação mas também a outras, deve-se, essencialmente, à ocorrência de mutações nos genes que codificam as duas enzimas envolvidas no metabolismo dos folatos, DHFR e DHPS, que são os alvos dos fármacos da combinação, o que compromete o tratamento da doença.^(50,70)

O metabolismo que permite a síntese de folato permanece um alvo terapêutico viável para o tratamento da malária, contudo o conhecimento do modo como o parasita consegue manter a homeostasia do folato é um aspeto crucial para o desenvolvimento de novos candidatos antimaláricos que sejam antagonistas do folato, dado que o parasita tem a capacidade de adquirir folato exógeno, o que pode influenciar clinicamente a eficácia da terapêutica.^(50,70)

iii. Antibióticos

Diversas classes de antibióticos demonstraram apresentar atividade antiproliferativa em *Plasmodium spp.* Apesar de o mecanismo de ação não estar totalmente esclarecido e de apresentarem uma atividade antimalárica relativamente reduzida, alguns antibióticos são utilizados na profilaxia da malária, geralmente em associação com outros fármacos com uma ação mais rápida e efetiva no seu tratamento.^(63,71)

Várias são os antibióticos com um efeito antimalárico que exibem o seu efeito antibacteriano em concentrações clinicamente aceitáveis, nomeadamente algumas fluoroquinolonas, tetraciclina, macrólidos e lincosamidas.⁽⁷¹⁾ O seu efeito antibacteriano advém da sua interferência em alvos específicos procariotas, em particular os ribossomas 70S, DNA girases e RNA polimerases. Vários são os estudos que associam a atividade antimalárica dos antibióticos a um organelo derivado dos procariotas, o apicoplasto. O apicoplasto é responsável por várias vias metabólicas, nomeadamente a síntese de ácidos gordos do tipo II, síntese de isoprenóides pela via não-mevalonato e pela biossíntese de heme. Além disso, contém o genoma que codifica para a síntese de biomoléculas especificamente procariotas:

ribossomas 70S, DNA girases e RNA polimerases.^(63,71) Desta forma, os antibióticos constituem inibidores da síntese proteica de *Plasmodium*.⁽⁵²⁾

Os principais antibióticos utilizados são compostos da família das tetraciclina (tetraciclina e, doxiciclina), e das quinolonas (clindamicina, azitromicina, ciprofloxacina e rifampicina), cujas estruturas moleculares estão apresentadas na Figura I-13.^(63,71)

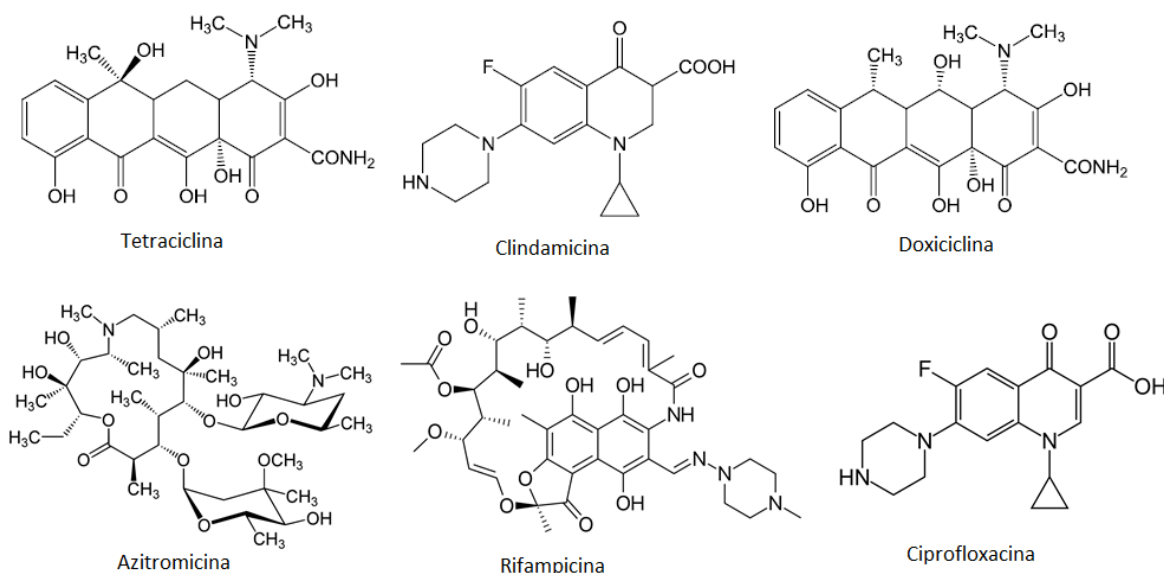


Figura I-13: Representação da estrutura molecular de alguns antibióticos utilizados no tratamento da malária. (Adaptado de^(67,72-75))

De um modo geral, os antibióticos apresentam uma atividade mais acentuada na fase eritrocítica de *Plasmodium*, o que é consistente com a sua reduzida atividade clínica.⁽⁷¹⁾

Normalmente, os antibióticos são utilizados em combinação com o quinino, de forma a aumentar a eficácia do tratamento em regiões em que se verifica o desenvolvimento de resistência a este fármaco, ou de modo a reduzir a possibilidade do aparecimento de efeitos adversos associados ao quinino, através da redução da duração do seu tratamento.⁽⁵²⁾ O desenvolvimento de resistências por parte do parasita à tetraciclina, à doxiciclina ou à clindamicina ainda não foram observados.^(52,63)

iv. Artemisinina e derivados sintéticos e semissintéticos

Inicialmente a terapêutica da malária consistia no uso de alguns derivados aminoquinolínicos, como a cloroquina e outros análogos, e de alguns antagonistas dos folatos. Contudo, nos anos 80, o aparecimento de estirpes resistentes a estas terapêuticas, na África e no sudoeste asiático, conduziu a um aumento das mortes associadas à malária, devido à inexistência de uma terapêutica antimalárica que se demonstrasse efetiva. Tal situação despoletou o desenvolvimento de novos fármacos, tendo surgido os endoperóxidos como uma classe terapêutica promissora no tratamento e controlo da doença.^(52,55)

Tal como referido anteriormente, os endoperóxidos são provenientes de um composto de origem natural: a artemisinina. A artemisinina corresponde ao constituinte ativo do extrato

da planta *Artemisia annua*, tendo demonstrado uma ação rápida contra as estirpes de *P. falciparum* que sejam resistentes a múltiplos fármacos. Atualmente, a artemisinina e os seus derivados são considerados como os fármacos com maior importância no tratamento da malária.⁽⁷²⁾

A artemisinina é o composto de partida para a síntese de derivados semissintéticos e a estrutura protótipo para a síntese de análogos sintéticos. A ponte peróxido do ciclo 1,2,4 trioxano constitui o farmacóforo da molécula, como referido anteriormente.^(51,67) Os endoperóxidos de primeira geração correspondem aos derivados semissintéticos da artemisinina, nos quais se incluem o artesunato de sódio, o arteéter, e o arteméter, cujas estruturas estão apresentadas na Figura I - 8. Os compostos anteriores foram sintetizados a partir da dihidroartemisinina (DHA), obtida por redução da artemisinina, sendo este composto dotado de atividade farmacológica.^(51,55,67)

Os endoperóxidos de segunda geração correspondem a derivados semissintéticos da artemisinina com propriedades melhoradas, nomeadamente a artemisona. Além destes, foram desenvolvidos compostos análogos que conservam a estrutura de endoperóxido, nomeadamente ozonídeos (1,2,4 – trioxolanos) ou tetraoxanos (1,2,4,5 – tetraoxano), ou apresentar estruturas 1,2 – dioxano ou 1,2,3 - trioxolano, sendo que todos eles apresentam a ponte peróxido necessária para que as moléculas sejam dotadas de atividade farmacológica. De um modo geral, estes compostos sintéticos possuem uma maior eficácia e/ou estabilidade que a artemisinina e os seus derivados semissintéticos, além da sua síntese ser mais simples, o que permitiu a síntese de uma vasta biblioteca de compostos.⁽⁵¹⁾ Alguns dos compostos sintéticos com atividade antimalárica descrita e que estão em desenvolvimento são o artefleno, o OZ 277 e o RKA 182, cujas estruturas se encontram representadas na Figura I- 14.^(51,54,55,76)

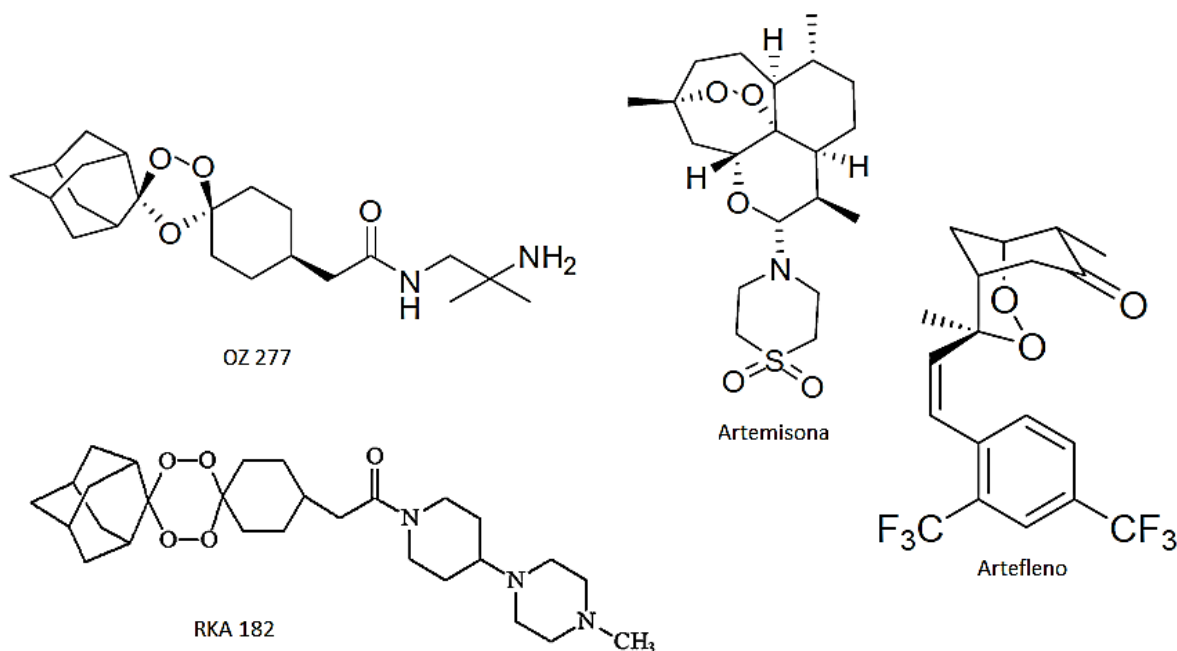


Figura I-14: Representação da estrutura molecular de um derivado semissintético da artemisinina e de alguns análogos sintéticos, em desenvolvimento para o tratamento da malária. (Adaptado de^(51,54,67,76))

Como referido anteriormente, para que a artemisinina ou alguns dos seus derivados apresentem atividade farmacológica, necessitam de uma bioativação intracelular que envolve uma clivagem redutiva da ponte peróxido catalizada pela presença de Fe (II). Como resultado formam-se espécies radicalares centradas em oxigénio, que isomerizam formando radicais centrados em carbono, que atuam como agentes alquilantes, reagindo com grupos susceptíveis presentes em proteínas e em biomoléculas do parasita, conduzindo à sua morte.^(67,72) Assim, as espécies radicalares formadas conduzem à erradicação de *Plasmodium* através da interferência em diversas vias bioquímicas do parasita, nomeadamente, através da alquilação do grupo heme, interferindo, deste modo, no processo de destoxificação do heme; da inibição da proteína PfATPase6, uma enzima ATPase responsável pelo transporte de Ca²⁺ ao nível do retículo sarcoplasmático (SERCA) de *Plasmodium*; da alquilação de proteínas presentes no citosol, como a PfTCTP (uma proteína relacionada com a replicação do parasita); e da interferência em de diversas funções mitocondriais.⁽⁵³⁾

A principal fonte de Fe(II) do parasita corresponde ao ferro presente no grupo heme, que é libertado como resultado da degradação da hemoglobina do hospedeiro. A proteólise da hemoglobina ocorre principalmente durante a fase de trofozoíto do parasita, no seu vacúolo digestivo, sendo mediada pelas protéases do mesmo. Nesta fase, *Plasmodium* transporta para o seu vacúolo digestivo uma grande quantidade de hemoglobina dos eritrócitos do hospedeiro, procedendo à sua degradação. Após a degradação da hemoglobina, grande parte do grupo heme libertado é sequestrado através da formação de dímeros de heme, contendo Fe(III), em cristais de hemozoina, que são quimicamente inertes e não tóxicos para *Plasmodium*. Contudo, parte do grupo heme está disponível na sua forma reduzida, contendo Fe(II), sendo este o responsável pela bioativação da artemisinina e dos seus análogos. Os endoperóxidos demonstram uma menor eficácia nos estados de gametócitos maduros e nos estados parasitários hepáticos, o que é consistente com o facto de existir uma reduzida ou mesmo diminuta degradação de hemoglobina nesses estados parasitários.⁽⁶⁴⁾

No entanto, um segundo activador corresponde ao Fe(II) livre e que não está associado ao heme. Este Fe(II) pode ser proveniente das reservas de ferro do próprio parasita, da degradação do heme mediada pela ação de peróxido de hidrogénio no vacúolo digestivo ou pela reacção com a glutatona reduzida no citoplasma do parasita.⁽⁶⁴⁾

De um modo geral, os endoperóxidos apresentam vantagens comparativamente com os outros fármacos antimaláricos disponíveis. Por um lado, a regiões onde foram detetadas resistências estão ainda circunscritas à fronteira Tailândia-Cambodja e não são conhecidas resistências cruzadas com outros fármacos antimaláricos, não se tendo observado ainda o desenvolvimento de resistências a nível endémico, apesar do seu amplo uso clínico. Além disso, conduzem a uma remoção mais rápida dos parasitas do sangue periférico, comparativamente com os outros fármacos existentes, No entanto, o facto de apresentarem tempos de meia-vida curtos *in vivo* conduz a que os níveis plasmáticos que resultam numa efetividade terapêutica permaneçam por pequenos períodos de tempo.⁽⁵¹⁾

De modo a prolongar o tempo de meia vida plasmático da artemisinina e dos seus análogos, a retardar o desenvolvimento de estirpes resistentes a esta classe terapêutica, e a

manter os níveis plasmáticos adequados para que se verifique uma efetividade terapêutica, os endoperóxidos são administrados em terapêuticas combinadas, em vez da terapêutica em monoterapia. Nestas terapêuticas combinadas, denominadas de terapêuticas combinadas baseadas na artemisinina (*do inglês*: ACTs), os endoperóxidos são coadministrados com outros fármacos com tempos de meia vida mais longos, pertencentes a outras classes terapêuticas, nomeadamente, com a lumefantrina, a amodiaquina, a piperquina, a mefloquina, ou com a associação sulfadoxina-pirimetamina.^(63,64) A combinação arteméter – lumefantrina é a ACT com uma maior utilização em África, seguida da associação artesunato – amodiaquina.⁽⁶³⁾

1.5.2 Leishmanioses

As leishmanioses são doenças infecciosas causadas por parasitas protozoários do género *Leishmania*.^(77,78) São classificadas como Doenças Tropicais Negligenciadas (NTD, do inglês Neglected Tropical Diseases), sendo endémicas em cerca de 97 países do mundo e estando apenas ausentes na Antártida e na Austrália. Possuem uma maior prevalência nos trópicos, subtropicos e no sul da Europa, estando mais presentes na Ásia, África e América latina, e sendo predominantemente associadas a uma população malnutrida, com condições habitacionais menores e com o sistema imunitário fragilizado, devido à falta de recursos. Segundo a OMS, as leishmanioses afetam actualmente 12 milhões de pessoas em todo o mundo, surgindo 2 milhões de casos por ano e estando 350 milhões de pessoas em risco de desenvolver infeção.^(14,77,79,80)

Existem cerca de 20 a 30 espécies de *Leishmania* com capacidade de provocar a doença no ser humano e noutros mamíferos (nomeadamente o cão), sendo a *Leishmania donovani* e a *Leishmania infantum* as espécies associadas a uma maior gravidade da doença.^(14,77,80)

A transmissão das leishmanioses é causada pela picada de flebótomos fêmea infetados.^(14,77) O ciclo de vida do parasita apresenta duas fases, pelo fato do parasita necessitar de dois hospedeiros, um vetor artóprode e um mamífero, que atua como um hospedeiro reservatório, para conseguir disseminar a doença. O parasita assume duas formas distintas durante o seu ciclo de vida: uma forma extracelular denominada de promastigota; e uma forma intracelular, denominada de amastigota. O flebótomo, ao efetuar a sua refeição sanguínea, injeta na pele do hospedeiro reservatório (ser humano, cão) saliva contendo a forma promastigota do parasita. Os promastigotas são, posteriormente, fagocitados por macrófagos, onde procedem à sua transformação em amastigotas e onde decorre também a multiplicação do parasita. Seguidamente, quando outro flebótomo fêmea procede à sua refeição sanguínea, adquire macrófagos possuindo a forma amastigota, procedendo-se à continuação do ciclo no hospedeiro invertebrado.^(77,81) O ciclo de vida de *Leishmania spp* está representado na Figura I-15.

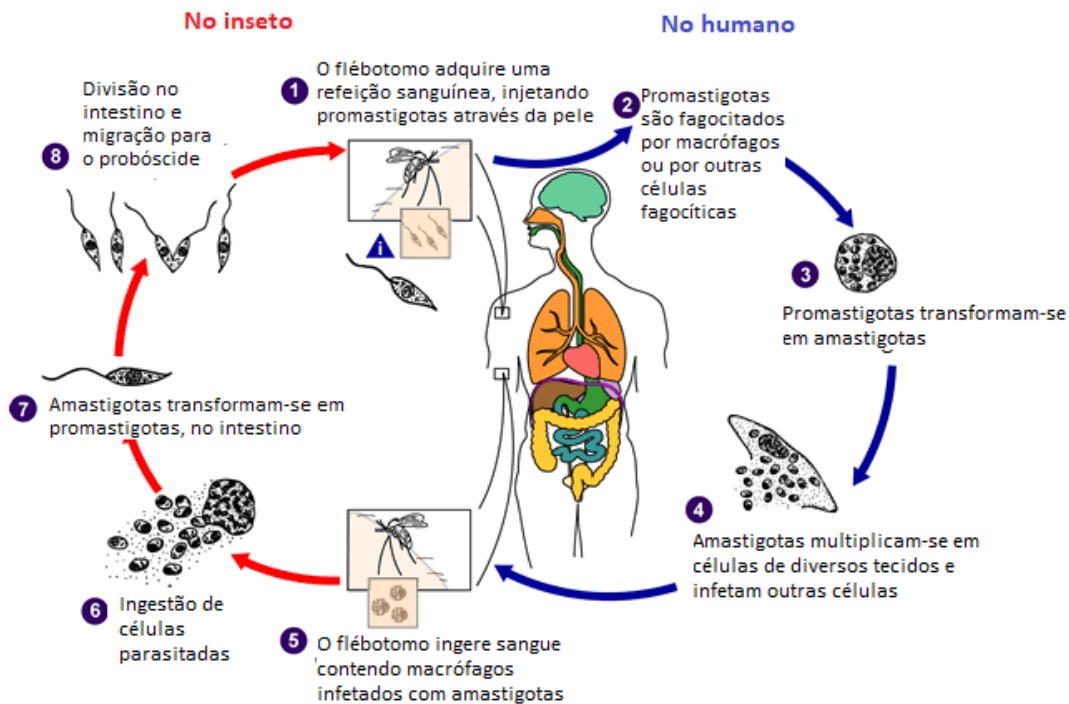


Figura I-15: Esquema representativo do ciclo de vida de *Leishmania* spp, no inseto e no hospedeiro vertebrado, o ser humano. (Adaptado de ⁽⁸²⁾)

As Leishmanioses podem manifestar-se essencialmente em três formas clínicas: a leishmaniose cutânea, que atinge a superfície da pele, provocando o aparecimento de lesões; a leishmaniose mucocutânea, que resulta da disseminação de parasitas da pele para a mucosa naso-orofaríngea, sendo esta a menos frequente; e a leishmaniose visceral, que constitui 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. Esta última é letal, se não for tratada. ^(14,77,81)

Na zona do mediterrâneo a leishmaniose constitui uma zoonose muito prevalente, sendo causada principalmente por *L. infantum*. O cão constitui o principal hospedeiro, sendo o reservatório primário para a infecção visceral no ser humano. ⁽¹⁴⁾

As estratégias quimioterapêuticas disponíveis para o tratamento da leishmaniose são muito poucas. Atualmente, o arsenal terapêutico baseia-se no uso de antimônios pentavalentes, de anfotericina B, de miltefosina e de pentamidina, cujas estruturas estão representadas na Figura I-16. ^(14,78) No entanto, estes compostos comportam problemas de toxicidade para o hospedeiro e custos elevados, existindo também alguns casos de resistências a estes fármacos em regiões onde a doença é endêmica. Apesar do desenvolvimento de uma vacina eficaz para o tratamento da leishmaniose canina, o tratamento da leishmaniose humana baseia-se apenas na quimioterapia disponível, sendo imperativo o desenvolvimento de novos fármacos que demonstrem eficácia, segurança e acessibilidade. ^(78,81)

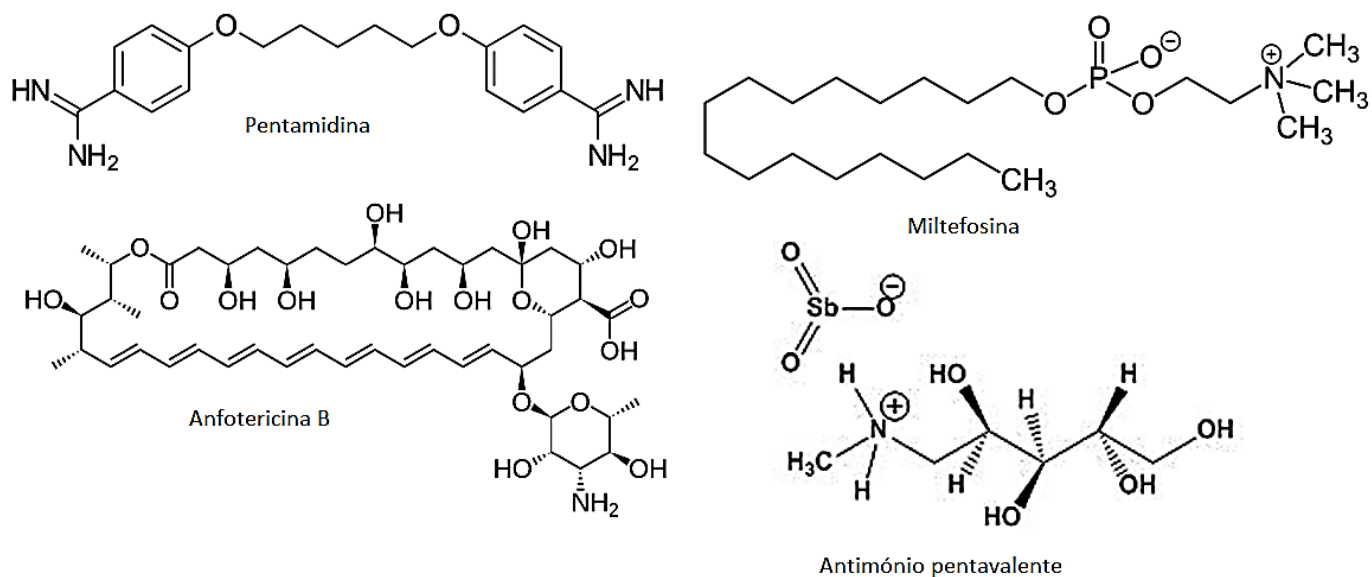


Figura I-16: Representação da estrutura molecular de alguns fármacos utilizados no tratamento da Leishmaniose. (Adaptado de ^(78,83-85))

Estudos de avaliação de possíveis candidatos a fármacos com atividade antiparasitária comprovada e que possuam um bom perfil de segurança demonstraram que as fluoroartemisininas apresentam atividade contra *L. donovani*, tendo sido, igualmente, observada a atividade de trioxolanos contra formas promastigotas e amastigotas de *L. infantum*.^(86,87) Desta forma, a artemisinina e os seus derivados semissintéticos, e alguns análogos sintéticos, constituem candidatos promissores no tratamento da leishmaniose, sendo necessária a realização de um maior número de estudos de modo a identificar alvos terapêuticos específicos deste parasita e a testar compostos de origem sintética cujos alvos terapêuticos em parasitas protozoários já são conhecidos, de forma a proceder à otimização das suas propriedades farmacológicas a nível de farmacodinamia e farmacocinética e propor candidatos para desenvolvimento no contexto da terapia das leishmanioses.⁽¹⁴⁾

1.5.3 Toxoplasmose

A toxoplasmose é uma zoonose causada pelo parasita *Toxoplasma gondii*, um protozoário Apicomplexa.^(88,89) É considerada uma das Infecções Tropicais Negligenciadas e está presente em todos os países do mundo, com maior predominância nas regiões com climas quentes, húmidos e de elevadas altitudes. Apresenta uma maior prevalência na América do sul e em alguns países do Médio Oriente associados a um menor poder económico.⁽⁸⁹⁾

Normalmente, a transmissão da doença deve-se à ingestão de alimentos ou água contaminada com oocistos, ou pela ingestão de cistos presentes em tecidos animais que se encontram mal cozinhados ou crus. A infeção pode ser ainda adquirida pelo contato direto com gatos, que podem possuir oocistos na sua superfície corporal, ou pela ingestão acidental

de oocistos presentes nas suas fezes. A doença não é transmitida de pessoa para pessoa, sendo possível contudo a transmissão da mãe para o filho durante a gravidez (toxoplasmose congénita) ou a transmissão acidental, por transfusão de sangue ou transplante de órgãos. ⁽⁸⁹⁻⁹²⁾

De um modo geral, pessoas saudáveis que sejam infetadas por *Toxoplasma* apresentam-se assintomáticas, dado que o sistema imunitário tem a capacidade de neutralizar o parasita. No entanto, quando estes indivíduos apresentam um sistema imunitário debilitado ocorrem exacerbações da doença, com sintomas semelhante aos de uma gripe: mal-estar, febre e dores musculares, que permanecem durante semanas ou meses e que posteriormente, desaparecem. Contudo, o parasita permanece no organismo num estado inactivo até que exista uma nova recaída. ^(89,91-93)

As grávidas e os indivíduos imunocomprometidos (indivíduos com HIV, indivíduos sujeitos a radio ou quimioterapia, indivíduos sujeitos a transplante de órgãos ou a transfusões sanguíneas) constituem os grupos onde a doença se afigura mais problemática. Caso uma mulher grávida adquira o parasita durante a sua gravidez, pode transpor a infeção para o seu feto, existindo ainda o risco de aborto ou de um parto prematuro. De um modo geral, as crianças que adquiriram toxoplasmose por transmissão congénita apresentam-se assintomáticas durante o nascimento, manifestando problemas oculares e neurológicos mais tarde. Os indivíduos imunocomprometidos apresentam sintomas mais severos durante uma exacerbação, nomeadamente tonturas, dores de cabeça, náuseas, febre e problemas de coordenação. ^(89,91,92,94)

Toxoplasma gondi apresenta um ciclo de vida complexo, no qual predominam três formas parasitárias infetantes: esporozoítos contidos em oocistos esporulados, bradizoítos contidos em cistos e taquizoítos; e uma não infetante, a de merozoíto. O seu ciclo celular desenvolve-se num hospedeiro definitivo e primário, os gatos domésticos e relativos pertencentes à família *Felidae*, onde decorre a sua fase sexuada, e num hospedeiro reservatório, no qual se inclui o humano e outros animais mamíferos (ovelhas, porcos), roedores e pássaros, onde decorre a sua fase assexuada. Como os gatos constituem o hospedeiro definitivo de *Toxoplasma*, apenas as fezes destes se apresentam como infeciosas, por apresentarem os oocistos resultantes da reprodução sexuada. A propagação do parasita entre os outros hospedeiros deve-se à presença de cistos tecidulares nos mesmos, onde se alojam a forma infetante de bradizoíto. ^(89,91,94)

É a forma de bradizoíto que permite a permanência do parasita nos hospedeiros intermediários por longos períodos de tempo, tal como acontece no ser humano. Esta forma infeciosa de *Toxoplasma* aloja-se em cistos tecidulares, especialmente no músculo esquelético, no miocárdio, no cérebro e nos olhos, originando por consequência problemas neurológicos e oculares graves, como encefalites e coriorretinites. ^(89,94) O ciclo de vida de *Toxoplasma gondi* está representado na Figura I-17.

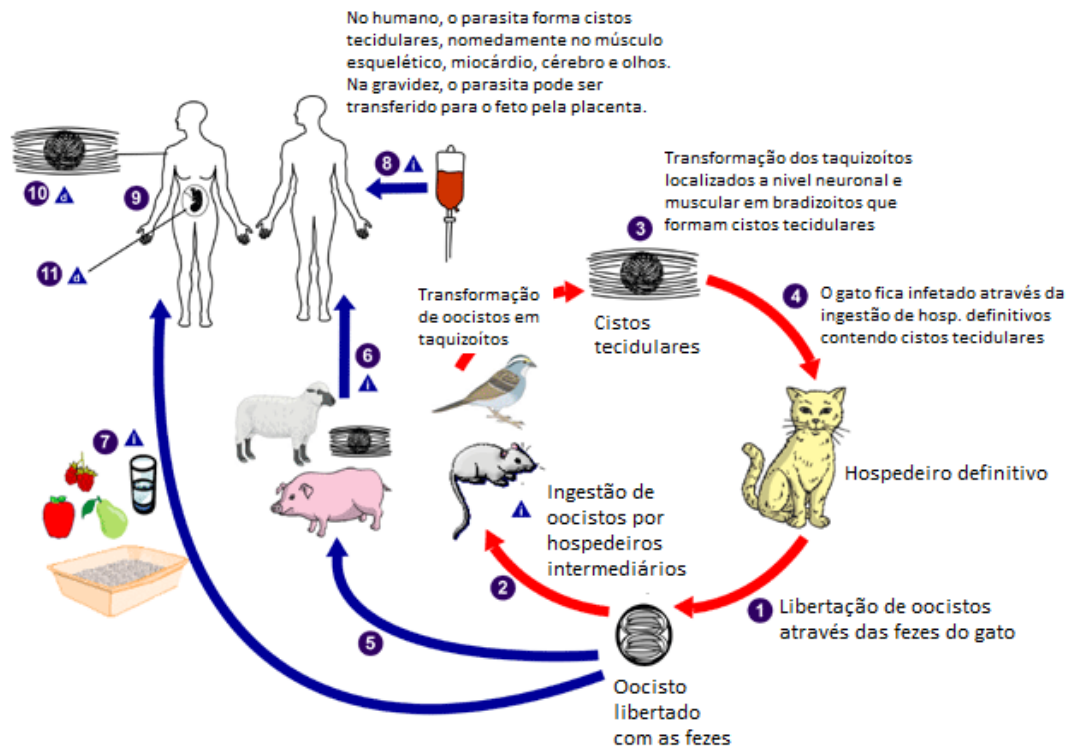


Figura I-17: Esquema representativo do ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*, no hospedeiro definitivo e nos hospedeiros intermediários. (Adaptado de ⁽⁹⁵⁾)

Atualmente, a terapêutica recomendada para o tratamento da toxoplasmose é direcionada para a forma infecciosa de taquizoíto, não atuando na forma encistada de *Toxoplasma gondii*, o bradizoíto. ^(94,96)

O arsenal terapêutico disponível para a prevenção e tratamento da toxoplasmose é muito reduzido, sendo imperativo o desenvolvimento de novos fármacos. A sulfadiazina e a pirimetamina (Figura I-7) são os dois fármacos mais utilizados, no entanto apenas demonstram um efeito positivo no controlo do parasita nas fases agudas da doença, onde se verifica uma proliferação parasitária ativa, apresentando um efeito reduzido em infeções subclínicas. As alternativas quimioterapêuticas incluem ainda a leucoverina (ácido folínico), o trimetoprim e sulfametazol, alguns antibióticos como a clindamicina e a azitromicina (Figura I-13), e outros agentes antiprotozoários, como a dapsona e atavaquona (Figura I-7). A pirimetamina é o fármaco que apresenta maior eficácia, sendo, por isso, incluído na maioria dos regimes terapêuticos, em associação com outros agentes terapêuticos, nomeadamente com a sulfadiazina, ou com antibióticos, e até com o quinino ou com outros antimaláricos. ^(92,94,96,97)

Múltiplos artigos têm demonstrado o efeito inibitório da artemisinina e análogos em *Toxoplasma gondii*, nomeadamente da DHA e do arteméter. O arteméter apresenta um IC₅₀ de 0,31 µM contra *T. gondii*, sendo cerca de 100 vezes mais potente que o trimetoprim. ^(53,98) Outros derivados também demonstraram vários graus de eficácia na inibição do crescimento

de *Toxoplasma*. Este efeito inibitório da artemisinina e análogos em *Toxoplasma* poderá ser provocado por um desequilíbrio da homeostasia de Ca^{2+} , uma vez que um dos mecanismos de ação desta classe terapêutica contra os parasitas apicomplexa consiste na inibição da enzima PfATPase6 ao nível do retículo sarcoplasmático (SERCA), o que por consequência conduz a uma sobrecarga de Ca^{2+} , e a uma inibição do crescimento. ⁽⁵³⁾

As artemisininas e derivados apresentaram uma atividade seletiva em diferentes etapas do ciclo de vida de *Toxoplasma*, pela inibição da replicação, do crescimento e da ligação e invasão de células hospedeiras, o que evidencia o seu potencial terapêutico para a prevenção e tratamento da Toxoplasmose humana. ⁽⁵³⁾

Apesar da existência de uma vacina profiláctica para os felídeos que impede a produção de oocistos no gato e, conseqüentemente, a sua libertação nas fezes do mesmo, esta possui algumas desvantagens. Não foi ainda desenvolvida uma vacina que seja efectiva na profilaxia ou no tratamento da toxoplasmose no ser humano, sendo assim fundamental a prevenção da transmissão zoonótica para impedir o desenvolvimento da infeção. ⁽⁹³⁾

As estratégias quimioterapêuticas disponíveis, apesar de reduzidas, apresentam-se relativamente eficazes no combate de *Toxoplasma*. Contudo, estão associadas a efeitos adversos graves para o ser humano, nomeadamente a supressão da medula óssea, o que pode conduzir a problemas hematológicos graves. ⁽⁹⁷⁾ Deste modo, o desenvolvimento de estratégias quimioterapêuticas que conduzam a uma menor toxicidade é fundamental.

Tal como *Plasmodium falciparum* e *Perkinsus olseni*, *Toxoplasma gondi* também pertence ao filo Apicomplexa. Deste modo, estes parasitas protozoários apresentam algumas vias metabólicas e organelos em comum, nomeadamente o apicoplasto, o que poderá constituir um ponto de partida para o desenvolvimento de fármacos eficazes e seguros a partir do aperfeiçoamento farmacológico de compostos cujos alvos terapêuticos já são conhecidos, e que são comuns aos parasitas protozoários. ⁽⁸⁸⁾

II. ARTEMISININA E DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS E SINTÉTICOS

Em 1967, o governo chinês lançou um programa com o intuito de descobrir novos fármacos promissores no tratamento da malária, tendo sido estudadas as plantas utilizadas na medicina tradicional chinesa até àquele momento. No decurso deste programa, verificou-se que a planta medicinal *Artemisia annua*, utilizada durante mais de 2000 anos pela medicina tradicional chinesa no tratamento da febre associada a malária, apresentava efetivamente atividade antimalária.^(55,99) Em 1972 foi isolada a artemisinina a partir dos extractos de *Artemisia annua*, confirmando-se este composto como o responsável pela atividade antimalária tradicionalmente atribuída às infusões da *Artemisia annua*.^(53,55,67,99,100) A artemisinina (Figura II-18) é uma lactona sesquiterpénica com uma ligação peróxido inserida numa estrutura de 1,2,4 – trioxano, à qual é atribuída a atividade antimalária e que é por isso considerada o farmacóforo da molécula.^(53,55,67,99)

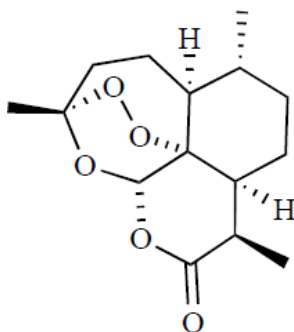


Figura II-18: Representação estrutural da artemisinina. (Adaptado de ⁽⁵³⁾)

Apesar da elevada eficácia terapêutica comprovada e da comparativamente baixa toxicidade associada à artemisinina, o seu uso terapêutico é limitado por alguns fatores que seguidamente se elencam.⁽⁶⁷⁾ a artemisinina apresenta uma baixa solubilidade, quer em solventes aquosos quer em solventes oleosos^(51,67,99); possui um curto tempo de semivida a nível plasmático e uma reduzida biodisponibilidade oral; está associada a uma elevada taxa de recrudescência após o tratamento; e, apesar dos seus procedimentos de extração e purificação serem relativamente diretos, o rendimento obtido é muito reduzido (máximo de 0,1-0,3 %), o que encarece o tratamento. Como consequência, alguns grupos de investigação procederam ao desenvolvimento de novas estratégias para a síntese total da artemisinina, que se revelaram morosas e dispendiosas, enquanto outros grupos optaram pela otimização farmacológica do composto natural, obtendo compostos derivados de artemisinina com maior solubilidade em água ou óleo, garantindo assim uma maior eficácia terapêutica.⁽⁶⁷⁾ Surgiram assim os derivados semissintéticos (análogos de primeira geração), que são hoje amplamente utilizados no combate à malária e responsáveis pela diminuição da mortalidade por malária na última década. Paralelamente, e com o objetivo de contornar o problema associado ao custo do produto, vários grupos de investigação dedicaram-se à descoberta de endoperóxidos sintéticos, estruturalmente mais simples, com atividade semelhante à das artemisininas mas com propriedades farmacológicas melhoradas e um menor custo associado.^(51,99)

2.1 Mecanismo de ação da artemisinina e dos seus derivados

Desde a descoberta da artemisinina, têm sido conduzidos estudos com o objetivo de reunir informação que permita esclarecer o seu modo de ação. Todavia, uma análise da literatura científica permite concluir que o mecanismo de ação dos endoperóxidos permanece uma temática é bastante controversa. Vários grupos de investigação se têm dedicado a averiguar esta questão, havendo contudo muitas discordâncias, nomeadamente em relação ao sítio de ação, aos possíveis alvos terapêuticos e às prováveis espécies formadas no processo de bioativação, e, de entre elas, a identificação das responsáveis pela morte do parasita. ⁽¹⁰¹⁾

A artemisinina e os seus derivados sintéticos e semissintéticos apresentam uma elevada eficácia terapêutica contra os estados parasitários presentes no ciclo eritrocítico de *Plasmodium*, incluindo as formas mais jovens e as mais maduras de trofozoíto. Adicionalmente, possuem alguma atividade contra as várias formas de gametócitos a nível sanguíneo, contribuindo para o bloqueio de transmissão. ⁽⁹⁹⁾

Foi demonstrado que a ligação peroxídica integrada na estrutura 1,2,4 – trioxano, presente na artemisinina e nos seus derivados, é fundamental para a atividade desta classe terapêutica, ^(55,99) pois o derivado da artemisinina que não possui a ligação peroxídica, a deoxiartemisinina (Figura II-19), não apresenta atividade contra *Plasmodium*. Esta evidência foi considerada a prova do conceito que atribuíra a atividade da artemisinina ao grupo endoperóxido existente na molécula, sendo por isso considerado como o farmacóforo. ⁽⁹⁹⁾

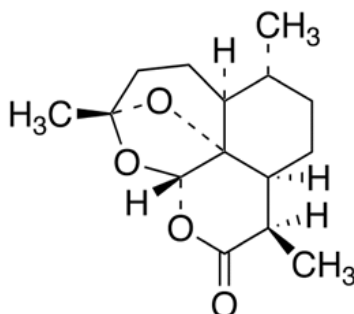


Figura II-19: Representação estrutural da desoxiartemisinina. (Adaptado de ⁽⁵³⁾)

Há um consenso alargado relativamente ao processo de bioativação das artemisininas e restantes endoperóxidos. Considera-se que a atividade requer uma bioativação prévia, através da clivagem redutiva da ligação peróxido, catalizada pelo grupo heme ou por Fe(II) livre, libertados durante o processo de degradação da hemoglobina no vacúolo digestivo do parasita. Em *Plasmodium*, o Fe(II) associado ao grupo heme desempenha um papel essencial na bioativação dos endoperóxidos, sendo o principal responsável por este mecanismo de ativação.

De um modo geral, a transferência de um electrão do Fe(II) conduz a uma clivagem redutiva da ligação O-O, com a formação de espécies radiculares livres, inicialmente centradas em oxigénio; após um rearranjo eletrónico intramolecular, as espécies radiculares centradas em oxigénio convertem-se em radicais centrados em carbono. Como consequência, o ferro

ferroso passa a ferro férrico (Fe^{3+}).^(51,55,99) Estas espécies radicalares podem causar danos ao parasita, através de vários processos moleculares que resultam na alquilação ou oxidação de proteínas e lípidos, com consequências ao nível da inibição da síntese de ácidos nucleicos e de proteínas, da interação com o citocromo oxidase e com o sistema de transporte da glutamina do parasita.⁽⁹⁹⁾

Após clivagem redutiva catalisada pelo Fe(II), o processo de bioativação pode seguir duas vias distintas, consoante o oxigénio ao qual o Fe(III) fica associado. O esquema representativo do mecanismo de bioativação da artemisinina está representado na Figura II-20.^(55,99)

Na via I, verifica-se a ligação do Fe(II) hémico ou livre ao oxigénio 1 da ponte peroxídica da artemisinina ou dos seus derivados, resultando numa espécie radicalar centrada em oxigénio denominada de radical oxilo. Este intermediário sofre um rearranjo intramolecular que conduz à clivagem de uma ligação C-C por β -cisão, resultando na formação de uma espécie intermediária radicalar centrada em carbono primário.^(55,99)

Na via II, o Fe(II) forma uma ligação com o oxigénio 2 da ponte peroxídica, formando-se igualmente uma espécie radicalar centrada em oxigénio. Esta espécie sofre posteriormente rearranjo, com uma migração 1,5 de hidrogénio, conduzindo à formação de um intermediário radicalar centrado em carbono secundário. Este intermediário constitui um dos principais precursores das espécies denominadas de “*high covalent iron oxo species*”. Os intermediários centrados em carbonos secundários por uma β -cisão dão origem a espécies como Fe(IV)=O , que coexistem em equilíbrio com Fe(III) – O . Estas espécies possuem uma elevada capacidade oxidativa, provocando danos em macromoléculas celulares, sendo, por isso, altamente tóxicas para o parasita.^(51,55,99,101)

As espécies radicalares centradas em carbono constituem potentes agentes alquilantes. Atuam como compostos eletrofílicos e reagem com grupos nucleofílicos presentes nas proteínas, formando ligações covalentes que resultam numa perda de função das mesmas, o que compromete a sobrevivência do parasita.^(64,99)

Estudos presentes na literatura referem que as proteases da família da cisteína constituem possíveis alvos moleculares dos endoperóxidos, nomeadamente as falcipainas 2 e 3, as enzimas envolvidas na degradação da hemoglobina. A artemisinina apresenta atividade inibitória contra estas proteases do parasita, o que bloqueia a degradação da hemoglobina e compromete, por consequência, o desenvolvimento do parasita.⁽⁵⁵⁾ Existem ainda evidências experimentais que demonstram a inibição da PfATP6, uma enzima existente na membrana do retículo sarcoplasmático (SERCA) responsável pela manutenção da homeostasia do Ca^{2+} .^(55,102)

A fosfatidilinositol-3-cinase de *P. falciparum* (PfPI3K) também foi proposta como um possível alvo molecular dos derivados da artemisinina. A PfPI3K é a enzima responsável pela fosforilação de fosfatidilinositol (PI), formando fosfatidilinositol – 3 fosfato (PI3P). Evidências experimentais demonstraram que a DHA conduz a uma inibição da PfPI3K, impedindo a produção de PI3P, o que tem implicações no transporte da hemoglobina para o interior do vacúolo digestivo do parasita. Tal facto demonstra a importância desta cinase na regulação do transporte da hemoglobina, principalmente durante a fase de trofozoíto do parasita.⁽⁶⁴⁾

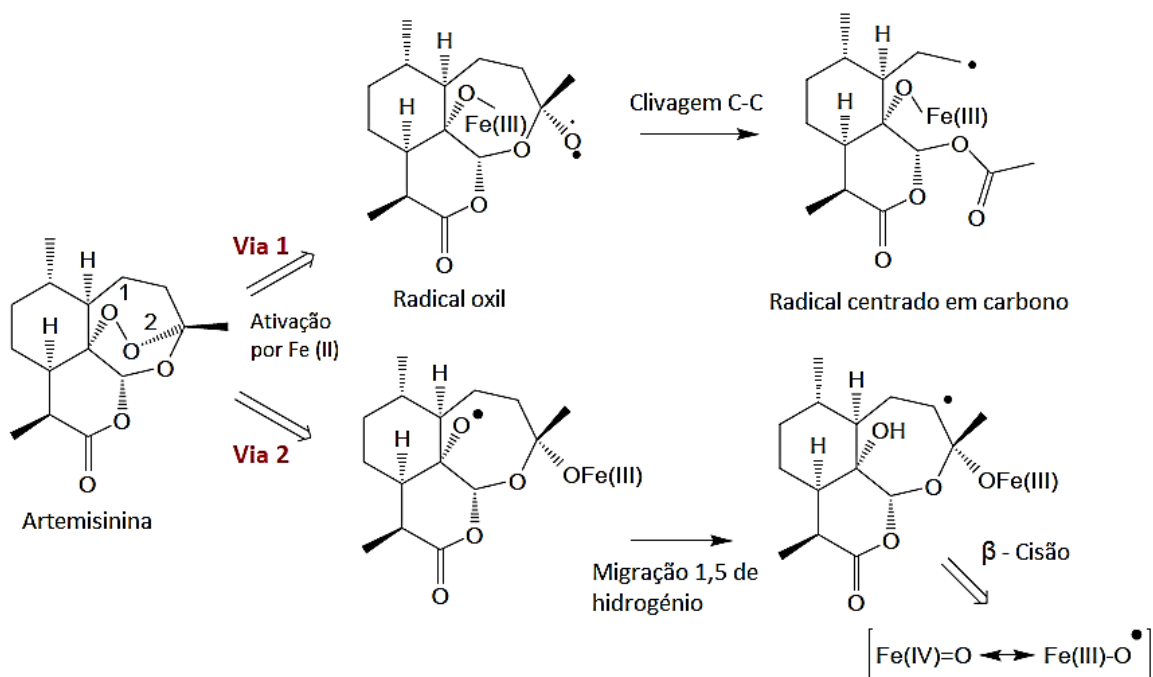


Figura II-20: Representação do mecanismo de bioativação da artemisinina mediado pela clivagem redutiva catalizada pelo Fe (II), que envolve a formação de radicais primários ou secundários, centrados em carbono. (Adaptado de ^(55,99))

Além da inativação de múltiplas proteínas com importantes funções na manutenção, no desenvolvimento e na sobrevivência do parasita, os endoperóxidos conduzem, igualmente, a danos nos lípidos.⁽⁶⁴⁾ Um dos possíveis mecanismos de ação dos endoperóxidos corresponde à peroxidação dos lípidos presentes na membrana celular do parasita. Este mecanismo de ação da artemisinina e dos seus derivados é muito comum quando as células parasitárias se encontram em stress oxidativo. O stress oxidativo é induzido pela presença de espécies radicalares de oxigénio, como os radicais hidroxilo e os aniões superóxido, resultantes de reacções intermédias que envolvem os intermediários centrados em carbono. Este mecanismo de ação é característico quando o processo de clivagem redutiva da ponte peróxido é catalisado pelo Fe(II) associado ao heme que se encontra solubilizado nos lípidos pertencentes à bicamada lipídica. As espécies intermediárias centradas em oxigénio e em carbono resultantes desta bioativação são formadas junto de carbonos contendo hidrogénios alílicos, suscetíveis de serem abstraídos, presentes nas bicamadas lipídicas não saturadas. As espécies radicalares centradas em carbono têm a capacidade de abstrair os hidrogénios alílicos presentes nos lípidos, conduzindo à formação de carbonos alílicos. A reacção desta espécie radicalar com O₂ resulta na formação de hidroperóxidos lipídicos.^(55,99)

Os hidroperóxidos lipídicos, através de uma clivagem de Fenton, dão origem a espécies reativas de oxigénio (ROS), em particular radicais hidroxilo, que possuem a capacidade de causar danos oxidativos em recetores e enzimas presentes na vizinhança da membrana lipídica.^(55,99) Alguns autores propõem que este mecanismo de ação dos endoperóxidos que conduz à formação de stress oxidativo é o responsável por danos na membrana do vacúolo digestivo do parasita, com a sua consequente rutura, conduzindo à autodigestão do parasita.⁽⁵⁵⁾

2.2 Endoperóxidos semissintéticos

Os análogos semissintéticos da artemisinina foram desenvolvidos com o objetivo de melhorar a solubilidade, quer em solventes aquosos quer em oleosos, e de resolver outros problemas relacionados com a farmacocinética.^(54,99)

A redução da artemisinina conduziu à formação da dihidroartemisinina (DHA) (Figura II-21), sendo esta o metabolito ativo da artemisinina e o composto de partida para a síntese dos derivados de primeira geração.^(54,67,99) A DHA é duas vezes mais ativa que artemisinina, sendo bastante efectiva no tratamento da malária cerebral. Contudo, está associada a uma reduzida biodisponibilidade oral e a alguma neurotoxicidade, quando administrada em elevadas doses em tratamentos prolongados, e a uma elevada probabilidade de recrudescência após o tratamento, dado o curto tempo de semivida.⁽¹⁰¹⁾

A partir da DHA sintetizaram-se outros endoperóxidos semissintéticos (Figura II-21), que podem ser agrupados em duas classes: os que apresentam uma melhor solubilidade em solventes aquosos, como o artesunato de sódio (éster da DHA) e o ácido artelínico (éster da DHA); e os que possuem uma melhor solubilidade em solventes oleosos, como o arteéter e o arteméter (éteres da DHA).^(51,54,99)

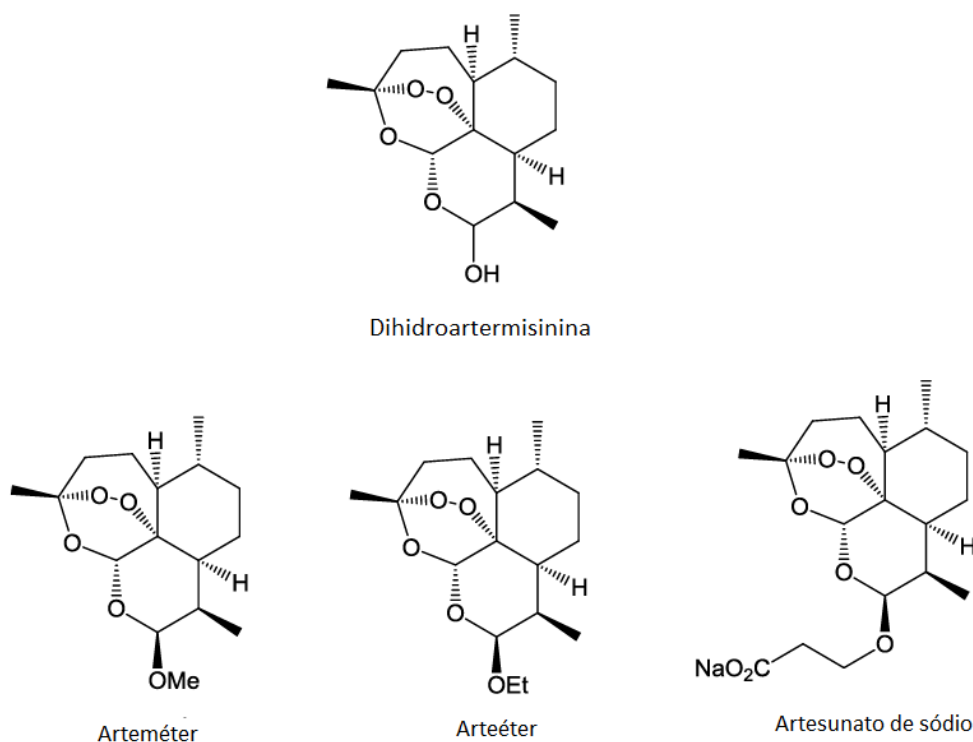


Figura II-21: Representação estrutural da dihidroartemisinina (DHA) e de alguns endoperóxidos semissintéticos preparados a partir da DHA. (Adaptado de^(53,55))

O artesunato de sódio apresenta uma elevada eficácia e uma ação muito rápida na remoção dos estados sanguíneos de *Plasmodium*. No entanto, apesar da sua solubilidade em solventes aquosos, apresenta uma reduzida estabilidade na solução aquosa de bicarbonato de sódio em dextrose, que é exigida na formulação para administração intravenosa, uma vez que

este tipo de formulação conduz a uma hidrólise da ligação éster. Por outro lado, está associado a um tempo de meia vida bastante curto, conduzindo a uma elevada recrudescência quando administrada em monoterapia, devido a sua rápida metabolização em DHA. Assim, o artesunato é utilizado em combinação com outros fármacos com tempos de meia vida mais longos, e que são eliminados mais lentamente. ^(54,55,99,101)

O ácido artelínico possui a mesma efetividade que o artesunato, apresentando contudo uma maior eficácia antimalárica e uma maior estabilidade na solução aquosa, devido ao facto de possuir uma ligação éter em vez da éster, sendo menos suscetível à hidrólise. Apresenta também um tempo de meia vida a nível plasmático mais longo e uma menor toxicidade. De todos os análogos de primeira geração, o ácido artelínico é o que apresenta maior biodisponibilidade oral, o que garante maior concentração plasmática. ^(54,101)

O arteméter e o arteéter apresentam uma maior atividade antimalárica que a artemisinina e que a DHA. Contudo, estão associados a tempos de meia vida mais reduzidos e a uma maior toxicidade hematopoiética, cardíaca e cerebral. O curto tempo de meia vida a nível plasmático e a toxicidade a nível do SNC (sistema nervoso central) poderão estar relacionados com o rápido metabolismo de conversão dos respetivos éteres em DHA, metabolismo no qual interfere o citocromo P450. ^(54,99,101) Atualmente, o arteméter é o análogo semissintético mais amplamente utilizado, através de solução oleosa ou em combinação com a lumefantrina. ⁽¹⁰¹⁾

2.3 Endoperóxidos sintéticos

Os endoperóxidos sintéticos surgiram de modo a colmatar as desvantagens associadas aos derivados de artemisinina, nomeadamente o reduzido tempo de meia vida a nível plasmático e a toxicidade a nível do SNC, resultantes do rápido metabolismo de conversão em DHA característicos dos éteres da DHA. Por outro lado, os derivados de primeira geração estão associados a uma reduzida biodisponibilidade oral e a alguma instabilidade química, uma vez que são facilmente suscetíveis a hidrólise, principalmente os derivados éster da DHA. ^(54,55,101) Além disso, os endoperóxidos semissintéticos requerem necessariamente a artemisinina como ponto de partida da sua síntese, sendo que esta, como referido anteriormente, é obtida da planta *Artemisia annua*, cujo rendimento de extração é bastante reduzido. Deste modo, é necessário a criação de uma quantidade considerável de culturas da planta em questão, o que, associado a todo o processo de extração, purificação, e, posterior síntese, conduz a um custo global de produção bastante significativo. ⁽⁵⁵⁾

Os análogos sintéticos de artemisinina apresentam uma boa eficácia clínica contra as estirpes resistentes de *P. falciparum*, uma menor toxicidade e melhores características a nível da farmacocinética comparativamente com os derivados de primeira geração. Outra grande vantagem é serem produzidos totalmente através de síntese química, o que está associado a um menor custo de produção, comparativamente com a artemisinina e derivados. ⁽⁵⁵⁾

Os endoperóxidos sintéticos, tal como os derivados da artemisinina de primeira geração, devem possuir na sua estrutura uma ponte peroxídica, uma vez que esta é crucial

para a atividade da molécula na sua globalidade. Além disso, devem ser facilmente preparados a partir de reagentes comercialmente disponíveis, e as suas estruturas devem permitir variabilidade estrutural, de modo a proporcionar a identificação de compostos líder e a otimização das suas propriedades farmacológicas.⁽⁵¹⁾

Atualmente, os endoperóxidos sintéticos com propriedades antimaláricas reconhecidas agrupam-se em quatro classes, que diferem entre si na estrutura do farmacóforo peroxídico: 1,2-dioxanos, 1,2,4-trioxanos, 1,2,4-trioxolanos (ozonídeos) e 1,2,4,5-tetraoxanos.^(24,55,99)

Na síntese deste tipo de compostos, a introdução da função peróxido é realizada usando diversas metodologias, que podem envolver processos radiculares, processos oxidantes, ou ozonólise em condições controladas.⁽⁵⁵⁾

2.3.1. 1,2,4 – Trioxanos

A estrutura 1,2,4 – trioxano corresponde à estrutura biológica e natural responsável pela atividade antimalárica da artemisinina, sendo por isso classificada como o farmacóforo da molécula na sua globalidade.⁽⁹⁹⁾

Os derivados 1,2,4 – trioxanos sintéticos foram desenvolvidos com o intuito de criar análogos da artemisinina dotados de uma estrutura mais simples, nos quais se conserva a estrutura peroxídica e determinadas porções estruturais que se verifiquem como requisitos mínimos essenciais para que os compostos criados permaneçam suficientemente ativos contra *P. falciparum*, e especialmente contra as estirpes resistentes.^(54,99) A possibilidade de síntese de inúmeros análogos que conservam a estrutura 1,2,4 – trioxano (Figura II-22) mas que apresentam diferentes características estruturais, permite inferir relativamente aos requisitos mínimos estruturais que as moléculas devem possuir, partindo destes para os requisitos que permitem a otimização, conduzindo à atividade antimalárica desejada. Além disso, permitiu concluir que pequenas diferenças ao nível da estrutura, incluindo a estereoquímica, podem ter um impacto significativo na atividade destes compostos.⁽⁹⁹⁾

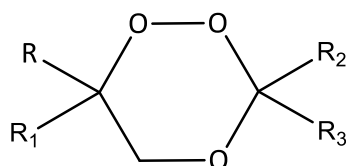


Figura II-22: Estrutura geral de 1,2,4-trioxano. (Adaptado de⁽¹⁰³⁾)

Os 1,2,4 – trioxanos sintéticos apresentam várias vantagens, principalmente, o fato de serem produzidos em grande quantidade, comparativamente com as quantidades obtidas através da extração da artemisinina.⁽⁵⁵⁾ Além disso, a sua síntese química permite a introdução de determinados grupos funcionais que conduzem a uma melhoria da biodisponibilidade e a uma redução da toxicidade. A introdução destes grupos funcionais é efetuada em etapas da síntese química, com o objetivo da otimização estrutural. Este processo baseia-se em análises da relação estrutura-atividade e permite chegar ao análogo com a estrutura desejada. Não

existe um limite nas reações a efetuar no decorrer do processo de otimização, mas são utilizados apenas os reagentes necessários e compatíveis com a ponte 1,2,4 – trioxano. Grande parte dos reagentes utilizados são bastante viáveis e económicos, até como materiais de partida de síntese. ⁽⁵⁴⁾

2.3.1.1 Fenozan B07

O Fenozan B07 (Figura II-23), também denominado de Fenozan 50F, corresponde a um 3,3'-espirociclopentano difluorinado que apresenta na sua estrutura molecular a ponte peroxídica 1,2,4 – trioxano. ^(55,104,105)

Este 1,2,4 – trioxano sintético possui uma atividade antimalárica significativa contra estirpes de *Plasmodium* resistentes e poliresistentes aos fármacos antimaláricos clássicos e convencionais. ^(104,106)

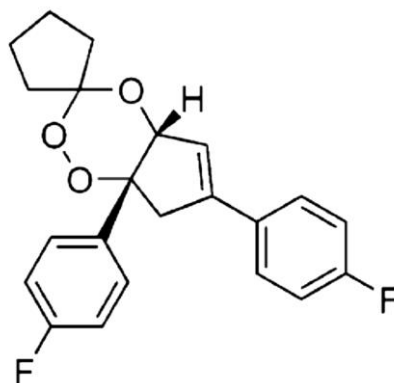


Figura II-23: Representação estrutural do endoperóxido sintético Fenozan B07, dotado de atividade antimalárica. (Adaptado de ⁽⁵⁵⁾)

Tal como a artemisinina, a sua atividade é limitada aos estados intraeritrocíticos de *Plasmodium*, impedindo o desenvolvimento quer dos estados assexuados do parasita quer dos estados sexuados do mesmo, pois apresenta atividade contra os estados de gametócito. Contudo, é um fármaco desprovido de capacidade profiláctica e não é dotado de capacidade inibitória do desenvolvimento dos estados de pré-esquizonte. ^(105,106)

Estudos presentes na literatura referem que a combinação de Fenozan B07 com artesunato revelou um efeito aditivo quando testada em *P. varix in vivo*. Além disso, foi observado um efeito sinérgico na associação Fenozan B07 e artemisinina, quando testada *in vivo* em *P. yoelli*. ^(104,106) Por outro lado, verificou-se uma modesta potenciação da sua atividade antimalárica em estirpes de *Plasmodium* resistentes à cloroquina, quando administrado em simultâneo com cloroquina, halofantrina ou mefloquina. ⁽¹⁰⁵⁾

A possibilidade de efetuar tais combinações permite limitar a toxicidade associada a cada um dos fármacos quando utilizado em monoterapia, na medida em que a dose de cada um deles a utilizar na combinação é reduzida. Além disso, estas combinações são mais efetivas que os fármacos utilizados em monoterapia, uma vez que caso a estirpe apresente resistência a um dos componentes da associação, muito dificilmente possui resistência ao outro

componente, existindo quase sempre um alvo terapêutico afetado, o que também inibe o desenvolvimento de resistências aos componentes da combinação. ⁽¹⁰⁵⁾

2.3.1.2 Considerações sobre a metodologia de síntese de 1,2,4 - trioxanos

Vários grupos de investigação em todo o mundo têm contribuído para o desenvolvimento de metodologias de síntese de trioxanos, destacando-se neste esforço os grupos de Jefford, de Vennerstrom e de Posner, pela abrangência e profundidade das investigações.

Jefford estabeleceu as condições de síntese de 1,2,4 – trioxanos sintéticos quando procedeu à síntese de trioxanos tricíclicos, cujas estruturas moleculares mimetizavam a estrutura da artemisinina. ⁽¹⁰⁷⁾ Foi dos primeiros investigadores a contribuir para o avanço nesta área, estabelecendo as condições de reação básicas para a síntese de 1,2,4 – trioxanos o que constituiu um ponto de partida fundamental para outros grupos de investigação, que basearam nos trabalhos de Jefford os esforços subsequentes para desenvolvimento de sínteses de trioxanos mais simples e económicas. ^(54,107)

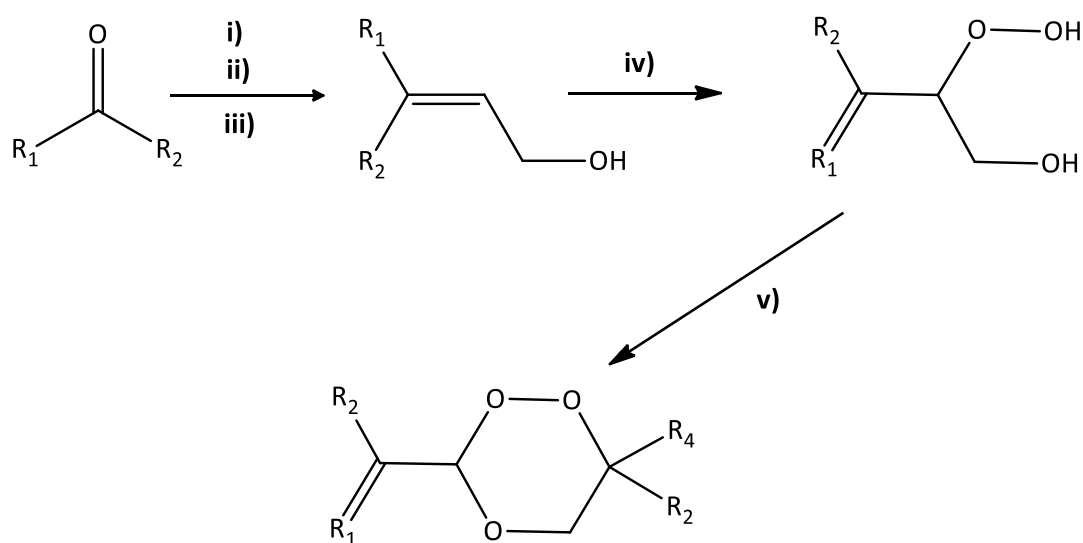
A síntese dos 1,2,4 – trioxanos descrita por Jefford pressupõe que o processo ocorra através de um mecanismo de foto-oxigenação de precursores enol-éter, escolhidos como reagentes de partida, o qual dá origem a uma espécie intermediária denominada de 1,2 – dioxetano ou *ceto* - dioxano. Num segundo passo, esta espécie intermediária reage através de um mecanismo intramolecular com uma cadeia lateral que apresente uma função carbonilo, ou através de um mecanismo intermolecular com uma molécula que apresente uma função carbonilo, nomeadamente com uma cetona ou aldeído.

Diversos estudos de relação estrutura-atividade (*SAR*) obtidos através da investigação de Jefford permitiram inferir que o anel lactona da artemisinina não é essencial para a atividade antimalárica da molécula, pelo que a sua remoção não tem implicações na eficácia da mesma. ^(54,107,108) Por outro lado, outros estudos revelam que a ponte peroxídica é crucial para a atividade da molécula, embora a função peroxídica *per si* ou o anel 1,2,4 – trioxano isolado não sejam suficientes para conferir uma atividade antimalárica significativa. ^(107,108)

Tendo em consideração os pressupostos anteriores, e dada a possibilidade de síntese de 1,2,4 – trioxanos através do rearranjo de *ceto* – dioxetanos (metodologia desenvolvida por Jefford), o grupo de investigação de Posner procedeu à preparação de uma série de trioxanos sintéticos com uma estrutura molecular mais simplificada. A síntese em questão tinha como material de partida a ciclohexanona, um reagente barato e comercialmente disponível, sendo que a função 1,2,4 – trioxano foi introduzida através de um processo de foto-oxigenação do enol-éter da ciclohexanona, catalisada por um ácido de Lewis. Obteve-se o intermediário dioxetano, o qual foi convertido no respetivo 1,2,4 - trioxano pela adição de triflato de *tert*-butildimetilsililo. O produto é 1,2,4-trioxano cuja estrutura apresenta uma cadeia 8a-hidroxiética, em que a derivação da função álcool terminal permite obter um grande número de derivados de 1,2,4 – trioxanos sintéticos com funções éter ou éster. ^(54,109)

Projetos de investigação mais recentes, com resultados publicados na literatura, contribuíram com uma variedade de 1,2,4-trioxanos 5,6-disubstituídos, com atividade antimalárica comprovada.⁽¹¹⁰⁾ Para a síntese dos 1,2,4 – trioxanos dotados de atividade antimalárica com estas características estruturais existem dois protótipos referidos na literatura que podem servir de modelo: i) os que apresentam um grupo substituinte arilvinilo na posição C-6; e, ii) os que apresentam um grupo substituinte alquilvinilo na posição C-6 e um grupo substituinte alquilo/cicloalquilo na posição C-5.⁽¹¹⁰⁾

A preparação de 1,2,4-trioxanos 5,6-disubstituídos segue uma metodologia de síntese distinta da apresentada anteriormente. Neste caso, as espécies intermediárias formadas correspondem a álcoois alílicos, produzidos a partir das correspondentes cetonas. Os álcoois alílicos constituem intermediários bastante vantajosos para a síntese de 1,2,4-trioxanos, obtidos através da peroxicetalização de hidroperóxidoalcoois. A formação de hidroperóxidos derivados de álcoois alílicos corresponde a um ponto crucial para o desenvolvimento de muitos 1,2,4-trioxanos sintéticos. A foto-oxigenação dos álcoois alílicos em acetonitrilo e clorofórmio, utilizando azul de metileno como indicador, origina β -hidroxi-hidroperóxidos. De seguida, os β -hidroxi-hidroperóxidos formados sofrem um processo de condensação (peroxicetalização) com diferentes estruturas moleculares contendo uma função cetona, dando origem a 1,2,4-trioxanos com diferentes estruturas moleculares.^(103,110) Na figura II-24 está representada uma proposta de estratégia de síntese de 1,2,4-trioxanos através de foto-oxigenação, cujos intermediários de reacção correspondem a álcoois alílicos.



i) Zn, BrCH₂COOC₂H₅, C₆H₆ (CaCl₂-seco), utilizando I₂ como catalisador, sob refluxo (reação de Reformatsky); **ii)** pTSA, C₆H₆, refluxo, 10% HCl; **iii)** LAH, éter seco, em atmosfera de N₂, e temperatura <0°C; **iv)** O₂, hv, azul e metileno, MeCN e CHCl₃, rt; **v)** cetonas/aldeídos, HCl, rt.

Figura II-24: Esquema representativo da metodologia de síntese de 1,2,4-trioxanos através de foto-oxigenação, tendo como intermediário de reacção álcoois alílicos. (Adaptado de^(103,110))

2.3.2. 1,2,4 - Trioxolanos

A quimioterapia da malária assentou durante as últimas décadas na ação de alguns derivados semissintéticos da artemisinina, nomeadamente o arteméter e o artesunato, devido à sua rápida redução da parasitémia e aos bons índices terapêuticos observados.⁽¹¹¹⁾ No entanto, estes fármacos apresentam múltiplas desvantagens que condicionam a sua eficácia, nomeadamente problemas a nível biofarmacêutico, associados à baixa biodisponibilidade e à farmacocinética limitada (tempos de meia vida reduzidos); problemas a nível químico, como a disponibilidade semissintética, a pureza e o custo de produção, uma vez que a produção destes fármacos tem como composto de partida de síntese a artemisinina, cuja única fonte permanece a planta *Artemisia annua*, sendo que a sua colheita e posterior extracção e isolamento é bastante difícil e reduzida; e problemas relacionados com o tratamento, nomeadamente a não adesão à terapêutica, e a possibilidade de recrudescência após o tratamento, causada pelo reduzido tempo de meia vida.⁽¹¹¹⁻¹¹³⁾ Além disso, são compostos que requerem uma combinação com fármacos com tempos de meia vida mais longos, de forma a maximizar as taxas de cura, tendo sido já reportados alguns casos de resistência ao tratamento com ACT envolvendo este tipo de fármacos.⁽¹¹³⁾

O desenvolvimento de novos compostos dotados de atividade antimalárica, nomeadamente de endoperóxidos cíclicos sintéticos, que superassem os problemas associados aos endoperóxidos semissintéticos e a baixa biodisponibilidade oral de alguns derivados sintéticos, baseou-se na otimização de compostos líder numa perspectiva multidimensional, o que foi possível devido à integração de informação relativa à própria doença e de dados fisicoquímicos, metabólicos, farmacocinéticos e de toxicidade, relacionados com os fármacos já conhecidos e estudados.⁽¹¹¹⁾

Desta forma, *Vennerstrom* propôs uma série de compostos sintéticos dotados de uma estrutura 1,2,4-trioxolano como potenciais candidatos a adicionar à quimioterapia antimalárica disponível.⁽¹¹¹⁾ Alguns dos 1,2,4-trioxolanos sintéticos desenvolvidos apresentam uma melhor atividade e efetividade contra todos os estados parasitários sanguíneos de *Plasmodium* que o arteméter e o artesunato, quer *in vivo* quer *in vitro*, maior rapidez de ação e melhor biodisponibilidade oral, melhor perfil de segurança ao nível da toxicidade associada, menores custos de produção e a possibilidade de cura em apenas uma toma. Além disso, o facto de apresentarem uma estrutura molecular distinta da estrutura da artemisinina torna-os numa possível alternativa para o tratamento de estirpes resistentes à artemisinina.⁽¹¹³⁾

Os 1,2,4-trioxolanos, também designados por ozonídeos secundários, são compostos heterocíclicos constituídos por 5 átomos, dotados de uma ponte peroxídica. A sua estrutura geral está representada na Figura II-25.

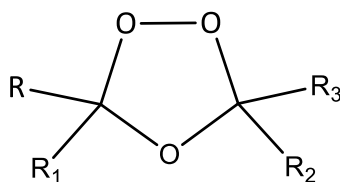


Figura II-25: Estrutura geral de 1,2,4-trioxolano (Adaptado de ⁽¹¹¹⁾).

De um modo geral, os 1,2,4-trioxolanos são estruturas tetrasubstituídas em que os grupos substituintes representados por R, R₁, R₂ e R₃ correspondem a grupos funcionais que podem estar ou não associados a sistemas cíclicos ou a estruturas alifáticas. Estes substituintes são fundamentais para a estabilidade química e metabólica do anel trioxolano, principalmente da ponte endoperóxido, uma vez que proporcionam o impedimento estéreo adequado para a manutenção da mesma. Além disso, a maior estabilidade dos 1,2,4-trioxolanos tetrasubstituídos reside no facto de não possuírem hidrogénios α, o que inibe as reacções de fragmentação heterolítica da ponte endoperóxido, que por norma seriam estimuladas pela formação de compostos carbonílicos, mais estáveis. ^(112,114,115)

Vennerstrom *et al.*, em 2004, procederam à realização de uma série de estudos de relação estrutura-atividade numa ampla gama de 1,2,4-trioxolanos sintetizados pelo mesmo grupo de investigação, de modo a determinar quais as características estruturais fundamentais que conduzem a uma atividade farmacológica adequada. O desenvolvimento de um potencial candidato com estrutura de 1,2,4-trioxolano requer uma otimização multidimensional baseada nas informações recolhidas através destes estudos de relação estrutura-atividade. ⁽¹¹¹⁾

O estudo da relação estrutura-atividade da ampla gama de 1,2,4-trioxolanos sintetizados pelo grupo de Vennerstrom permitiu a seleção de duas estruturas protótipo com atividade contra *P. falciparum*, *in vitro* e contra *P. berghei*, *in vivo*, e a identificação de alguns aspetos estruturais relevantes para a atividade dos 1,2,4-trioxolanos, nomeadamente:

- i. a associação de dois grupos substituintes ciclohexilo (**A**) ou de dois grupos substituintes adamantilo (**B**) à estrutura 1,2,4 – trioxolano conduziu a uma atividade antiparasitária nula, isto é, as estruturas moleculares representadas por **A** e **B** na Figura II-26 demonstraram ser inativas. Tal facto permite concluir que a atividade antimalárica reduz significativamente quando a ponte peroxídica está demasiado exposta ou, alternativamente, quando se encontra inacessível, por impedimento estéreo, às espécies contendo Fe(II), uma vez que é essencial o contato do átomo de oxigénio com o Fe(II) para que exista a bioativação das estruturas moleculares em questão, de modo a que se verifique atividade farmacológica. ^(111,112)
- ii. a presença de um grupo substituinte adamantilo num dos lados da estrutura 1,2,4-trioxolano e de grupo substituinte carbocíclico ou heterocíclico no outro lado, permite a estabilização química e metabólica da estrutura 1,2,4-trioxolano, o que é indispensável para que composto exerça a sua ação farmacológica. Esta estabilidade do heterociclo trioxolano é proporcionada pelo impedimento estéreo presente num dos lados da estrutura, fornecido pelo substituinte adamantilo. Por outro lado, a atividade farmacológica é garantida pela possibilidade de aproximação, energeticamente favorável, do Fe(II) ao oxigénio da ponte peroxídica, que não se encontra demasiadamente impedido estericamente. A presença de um grupo substituinte que conduza a um menor impedimento estéreo da ponte peroxídica é essencial para que seja possível a bioativação da estrutura trioxolano e, conseqüentemente, a atividade farmacológica do composto, uma vez que permite o contato do oxigénio menos impedido estericamente com o Fe(II). ^(111,112)

Diversos estudos presentes na literatura demonstram que, tal como a artemisinina, os trioxolanos requerem bioativação, catalisada por Fe(II), para que apresentem atividade antiparasitária.^(111,116,117) Assim, compreende-se que se de um lado da estrutura trioxolano estiver um grupo adamantilo, que dificulta o acesso ao átomo de oxigênio por parte do Fe(II) devido ao impedimento estérico; e se do outro lado estiver um grupo substituinte ciclohexilo, que permite o acesso do Fe(II) ao átomo de oxigênio da ponte peróxídica (condições presentes na estrutura **C** da Figura II-26, o composto irá possuir atividade antimalárica, na medida em que é possível proceder à sua bioativação, que origina espécies radicalares centradas em carbono, essenciais para que o composto apresente tal atividade.^(111,112)

Deste modo, pode-se inferir que o grupo adamantilo é essencial para a estabilidade química e metabólica da estrutura 1,2,4-trioxolano, por fornecer o impedimento estérico adequado, reduzindo a sua reatividade e retardando a sua decomposição no organismo. A conjugação adequada deste substituinte com outros permite controlar o nível de exposição da ponte endoperóxido e, deste modo, a sua reatividade.⁽¹¹¹⁾ Estudos de relação estrutura-atividade de determinados compostos sintetizados demonstram que a ausência do grupo substituinte adamantilo na estrutura trioxolano conduz a atividade antimalárica *in vitro* uma a duas ordens de grandeza inferior à da artemisinina, e ausência de atividade *in vivo*.⁽¹¹²⁾

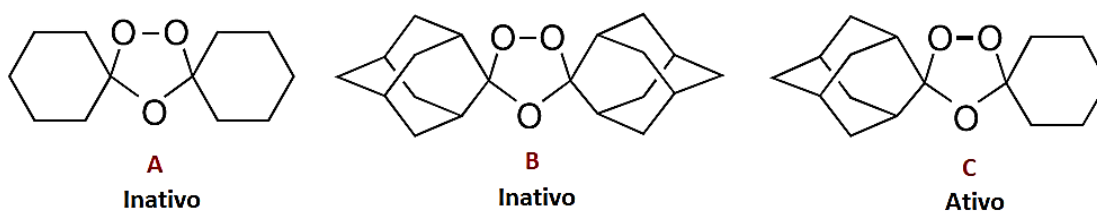


Figura II-26: Representação estrutural de 1,2,4-trioxolanos utilizados como modelo para o estudo da estabilidade e atividade dos 1,2,4-trioxolanos (*Adaptado de*⁽¹¹¹⁾).

Apesar dos 1,2,4-trioxolanos associados a um grupo substituinte adamantilo constituírem candidatos promissores como endoperóxidos sintéticos antimaláricos, possuem algumas limitações. Os compostos que apresentam a associação da estrutura trioxolano com o grupo adamantilo são altamente lipofílicos, conduzindo, deste modo, a uma biodisponibilidade oral limitada, devido à reduzida solubilidade em água, a uma maior susceptibilidade ao metabolismo e a maiores valores de excreção (*clearance*).^(111,116) Uma boa biodisponibilidade oral requer um equilíbrio entre uma boa solubilidade em água, o que é favorecido por estruturas com características mais polares, e uma boa permeabilidade membranar, o que está associado à presença de grupos com características mais lipofílicas ou apolares. Os compostos mais lipofílicos são também os mais afectados pelo efeito de primeira passagem, sendo este outro condicionante da biodisponibilidade oral.⁽¹¹⁶⁾

Vennerstrom *et al* (2006) procederam ao estudo de uma ampla gama de 1,2,4-trioxolanos, cujos grupos substituintes apresentavam uma grande variedade de polaridades, de modo a avaliar o efeito da polaridade de determinados grupos funcionais na atividade antimalárica dos trioxolanos.⁽¹¹⁶⁾ Do estudo em questão pode-se concluir que, na sua generalidade, os trioxolanos com características mais lipofílicas apresentavam uma maior

propensão para melhores atividades antimaláricas que os seus homólogos mais polares, quando administrados por via oral, sendo estes resultados consistentes com os observados em outras classes de peróxidos sintéticos e com a artemisinina.^(111,112,116) Além disso, demonstraram que os trioxolanos com grupos funcionais com características neutras e básicas apresentavam um melhor perfil antimalárico que os associados a grupos funcionais ácidos.^(114,116)

Tendo em consideração as premissas anteriores, a seleção de estruturas 1,2,4-trioxolano para desenvolvimento constitui um desafio, na medida em que as estruturas devem apresentar, em simultâneo, uma ótima atividade antimalárica e propriedades fisicoquímicas e metabólicas que assegurem uma boa absorção e biodisponibilidade oral.^(112,116)

A integração da informação recolhida através dos vários estudos de relação estrutura-atividade realizados permitiu o desenvolvimento do primeiro candidato sintético baseado na estrutura 1,2,4 – trioxolano a ser avaliado clinicamente, e que apresentou resultados bastante promissores: o maleato de arterolano, também denominado por OZ-277. Este candidato apresentava eficácia terapêutica e ação antimalárica, associada a boas propriedades biofarmacêuticas.^(111,113,115) Posteriormente, de modo a mitigar algumas limitações do OZ-277, procedeu-se à sua otimização estrutural, o que conduziu ao desenvolvimento do OZ-439.⁽¹¹³⁾

2.3.2.1 A evolução do OZ – 277 e o desenvolvimento do OZ – 439

O OZ-277, ou maleato de arterolano (Figura II-27), corresponde ao primeiro ozonídeo sintético a ser avaliado clinicamente, sendo um 1,2,4 – trioxolano de primeira geração. Em 2004, o OZ-277 progrediu dos estudos pré-clínicos para os ensaios de fase I em humanos, na forma de combinação de maleato de arterolano-fosfato de piperaquina.^(111,113,115) Em abril de 2012, a Ranbaxy®, na sequência dos bons resultados a nível de eficácia e tolerabilidade da combinação maleato de arterolano-fosfato de piperaquina nos ensaios de Fase III realizados na Tailândia, Bangladesh e Índia (comparáveis aos obtidos para a combinação arteméter/lumefantrina), introduziu no mercado o Synriam®. Synriam® é um fármaco constituído por 150 mg de maleato de arterolano e 750 mg de fosfato de piperaquina, cujo regime terapêutico consiste na toma diária de um comprimido durante três dias. Inicialmente foi introduzido na Índia, a que se seguiu, em 2015, Uganda, Nigéria, Senegal, Guiné, Quênia e Costa do Marfim. A mesma formulação encontra-se em ensaios clínicos de fase III para o tratamento da malária não severa na população pediátrica.^(118,119)

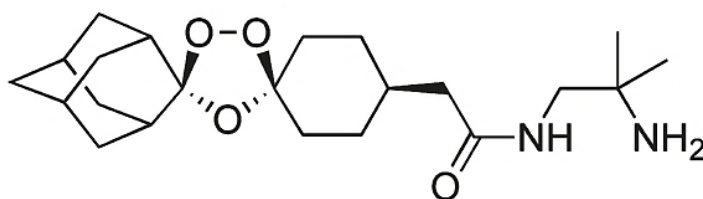


Figura II-27: Representação estrutural 1,2,4 – trioxolano sintético de primeira geração OZ-277. (Adaptado de ⁽¹¹⁵⁾)

O OZ-277 apresenta uma estrutura molecular simples, uma síntese economicamente viável e acessível e uma atividade antimalárica superior, associada a um melhor perfil biofarmacêutico que os derivados da artemisinina. Possui atividade antimalárica contra todos os estados assexuados de *P. falciparum* e um rápido início de ação.⁽¹¹¹⁾

Apesar de se apresentar como um candidato promissor para o tratamento da malária, motivo pelo qual progrediu nas diversas fases dos ensaios clínicos, sendo considerado, atualmente, como uma alternativa quimioterapêutica para o tratamento da malária, exibiu algumas limitações ao longo do processo. Na fase I dos ensaios clínicos, o tempo de meia vida era apenas duas a três vezes superior ao observado na DHA. Além disso, quando administrado em doentes com malária, em regime de monoterapia, apresentava níveis plasmáticos mais reduzidos, comparativamente aos observados nos voluntários saudáveis, nos ensaios clínicos. O arterolano possuía, desta forma, alguns problemas a nível de farmacocinética.⁽¹¹³⁾

Estudos realizados vieram demonstrar uma elevada excreção (*clearance*) do OZ-277, o que resulta numa redução do tempo de meia vida plasmático e numa diminuição da sua concentração plasmática. Os mesmos estudos confirmaram que a *clearance* do OZ-277 era dependente do metabolismo mediado pelo CYP 450 e da degradação mediada por mecanismos não relacionados com os citocromos. As investigações efetuadas indicaram que o reduzido tempo de meia vida plasmático observado resultava da degradação mediada por mecanismos não relacionados com os citocromos, resultante da reação do OZ-277 com outras fontes de Fe(II) endógeno, presente a nível sanguíneo ou em determinados tecidos. Mais tarde, verificou-se uma maior taxa de degradação do OZ-277 quando este encontrava num meio sanguíneo com um nível reduzido de parasitemia (cinco vezes superior), comparativamente com a taxa de degradação observada quando o composto se encontrava num meio sanguíneo sem parasitemia. Tais observações permitiram inferir que o aumento da taxa de degradação em doentes com malária conduziu a uma menor concentração plasmática do OZ-277, comparativamente à observada nos voluntários saudáveis. Tal facto é consistente com uma maior clivagem da ponte peróxido proveniente da presença de um maior número de espécies contendo Fe(II), que são libertadas como resultado da degradação da hemoglobina pelo parasita nos doentes com malária, o que fornece uma fonte adicional para activação dos endoperóxidos. Assim, pode-se inferir que a presença de Fe(II) catalisa a clivagem da ponte peróxido, o que é crucial não só para a uma ótima atividade antimalárica mas também para uma *clearance in vivo* adequada; pelo que a modificação estrutural de modo a otimizar o contacto do Fe(II) com a ponte peróxido deve permitir um equilíbrio entre estes mecanismos, com efeitos opostos sobre a eficácia terapêutica.⁽¹¹³⁾

Deste modo, procedeu-se à otimização estrutural do OZ – 277 de forma a obter um candidato promissor que apresentasse melhorias a nível da farmacocinética, nomeadamente uma maior estabilidade metabólica associada a uma menor suscetibilidade à degradação por mecanismos não relacionados com o citocromo. Assim, surgiram os 1,2,4 – trioxolanos de segunda geração, de entre os quais se destaca o OZ – 439.⁽¹¹³⁾

Os ozonídeos de segunda geração apresentam um grupo substituinte *cis* – 8' – fenilo, enquanto os de primeira geração apresentavam na mesma posição um grupo substituinte *cis* – alquilo. Tal alteração estrutural permite a formação de um composto que revelou ser cerca de

50 vezes mais estável à degradação mediada pelo Fe(II) que os 1,2,4 – trioxolanos de primeira geração. Os 1,2,4-trioxolanos de segunda geração apresentam melhorias a nível da estabilidade metabólica condicionada pela degradação medida pelas espécies contendo Fe(II), mantendo em simultâneo a reatividade ao Fe(II) suficiente para garantir a bioativação da ponte peróxido necessária à eficácia terapêutica. ⁽¹¹³⁾

O OZ-439, também denominado de artefenomel (Figura II-28), revelou-se um candidato antimalárico promissor, encontrando-se atualmente na fase IIa dos ensaios clínicos. Apresenta atividade contra todos os estados assexuados observáveis no ciclo eritrocítico de *P. falciparum in vitro*, com valores de IC₅₀ semelhantes aos derivados da artemisinina utilizados clinicamente. ^(113,120)

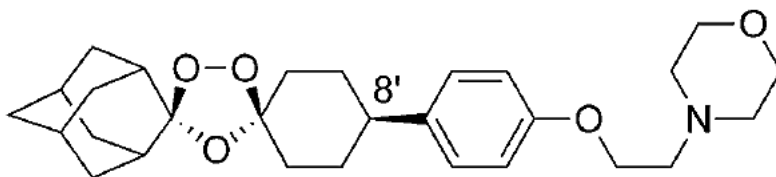


Figura II-28: Representação estrutural 1,2,4-trioxolano sintético de segunda geração OZ-439 (Adaptado de ⁽¹¹³⁾).

Comparativamente com os ozonídeos de primeira geração, nomeadamente com o OZ-277, o OZ-439 demonstra um progresso nas propriedades farmacocinéticas: maior tempo de meia vida, associado a um prolongamento das concentrações plasmáticas adequadas para que se verifique o efeito farmacológico desejado; uma redução da clearance, em grande parte devida a uma menor degradação sanguínea mediada pelas espécies contendo Fe(II); maior concentração plasmática por um maior período de tempo. ^(113,120)

Adicionalmente, o OZ-439 é dotado de uma melhor biodisponibilidade oral que os ozonídeos de primeira geração, exibindo ainda uma atividade profiláctica superior à mefloquina (o agente quimioprofilático de referência). Esta atividade profilática não é observada nos 1,2,4 – trioxolanos de primeira geração. ⁽¹¹³⁾

A eficácia antimalárica significativa e o prolongamento das concentrações plasmáticas adequadas, presentes no OZ-439, resultam de uma otimização estrutural que conduziu a uma maior estabilidade da ponte peróxídica (que é intrinsecamente instável), associada a uma redução da clearance, mantendo todavia a reatividade ao Fe(II) necessária para desencadear o processo de bioativação do composto, assegurando a ação parasiticida. ^(113,120)

Por apresentar uma eliminação (clearance) mais lenta que a artemisinina e que os seus derivados, nomeadamente, o artesunato e o OZ-277, o OZ-439 não carece de uma associação a outros compostos de modo tão premente quanto alguns derivados da artemisinina, nas ACTs, para que se verifique eficácia e efetividade terapêutica, uma vez que é um fármaco menos suscetível a recrudescências e ao desenvolvimento de estirpes resistentes. ⁽¹²⁰⁾

2.3.2.2 Aspectos relacionados com o desenho e a síntese dos 1,2,4 - trioxolanos

De um modo geral, os requisitos mínimos necessários aos 1,2,4 – trioxolanos dotados de uma relação estrutura-atividade adequada podem ser reduzidos a três aspetos fundamentais: ⁽¹¹⁵⁾

- i. a ponte peroxídica associada a um grupo substituinte adamantilo é fundamental para a atividade;
- ii. os ozonídeos com características mais lipofílicas tendem a apresentar melhor biodisponibilidade oral que os seus homólogos mais polares;
- iii. os ozonídeos que possuem grupos funcionais com características neutras e/ou básicas demonstram um melhor perfil antimalárico.

A síntese de estruturas 1,2,4-trioxolano tetrassubstituídas (as mais estáveis) segue normalmente o procedimento de ozonólise descrito por *Griesbaum et al* (1997). Griesbaum e o seu grupo de investigação determinaram as condições essenciais para o processo de preparação de ozonídeos tetrassubstituídos, o qual envolve a ciclização por ozonólise de *O*-metiloximas derivadas de cetonas cíclicas ou acíclicas, na presença de cetonas cíclicas ou acíclicas. A metodologia de síntese de 1,2,4 – trioxolanos tetrassubstituídos encontra-se apresentada na Figura II-29.

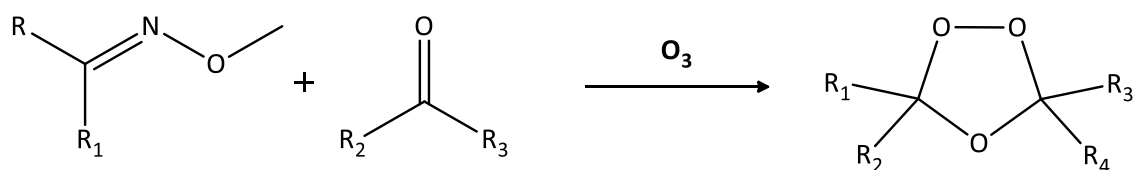


Figura II-29: Esquema representativo da estratégia de síntese de 1,2,4 – trioxolanos tetrassubstituídos através do mecanismo de ozonólise. (*Adaptado de* ^(114,121))

Grande parte dos ozonídeos sintetizados apresentam na sua estrutura o grupo adamantilo, uma vez que este permite controlar o nível de exposição e consequente reatividade da ponte peróxido. Nestes casos, a *O*-metiloxima utilizada corresponde à *O*-metil-2-adamantiloxima, o que permite a introdução direta do grupo adamantilo durante a reação de ozonólise. Na síntese de 1,2,4 – trioxolanos de primeira e segunda geração, de um modo geral, as cetonas utilizadas neste processo são cetonas cíclicas, nomeadamente, ciclohexonas que apresentam um grupo substituinte variável na posição 4, responsável pela introdução da variabilidade estrutural (Figura II-30). ^(111,114,115)

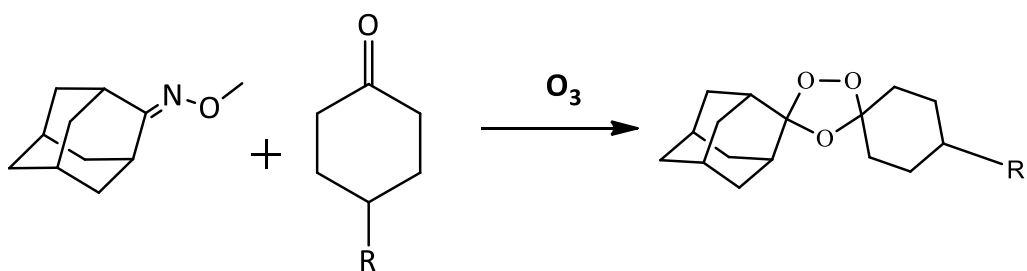


Figura II-30: Esquema representativo da estratégia de síntese de 1,2,4-trioxolanos através da reação de ozonólise envolvendo O-metil-2-adamantiloxima e uma ciclohexanona substituída na posição 4. (Adaptado de ⁽¹¹⁵⁾)

A presença desse grupo substituinte na ciclohexanona permite a preparação de 1,2,4 – trioxolanos com grande diversidade estrutural, uma vez que apresenta uma estrutura variável que pode ser alifática ou cíclica, e que pode apresentar ou não determinados grupos funcionais que determinam características gerais da molécula como o grau de polaridade, o grau de exposição da ponte peróxídica ou as propriedades mais básicas e neutras, ou ácidas, que condicionam quer a farmacocinética da molécula quer a sua eficácia terapêutica. A possibilidade de introdução de substituintes variáveis neste ciclo permite a obtenção de uma diversidade estrutural de 1,2,4-trioxolanos, o que é fundamental na construção de bibliotecas para estudos de relação estrutura atividade.

2.3.3. 1,2,4,5 - Tetraoxanos

O aparecimento de algumas estirpes resistentes ao tratamento com ACTs nas regiões do Cambodja e Tailândia revelou uma redução da sensibilidade de *Plasmodium* à artemisinina, sendo por isso imperativo o desenvolvimento de novas estratégias quimioterapêuticas eficazes no tratamento da malária.⁽¹²²⁾ O desenvolvimento de alguns derivados sintéticos da artemisinina, nomeadamente, dos 1,2,4 – trioxolanos, revelou-se crucial para colmatar essa lacuna, bem como para contornar algumas limitações observadas nos derivados semissintéticos, por apresentarem uma atividade antimalárica notável quer *in vitro* quer *in vivo*.⁽¹²³⁾

No entanto, alguns dos 1,2,4 – trioxolanos mais promissores, os quais se encontravam na Fase II dos ensaios clínicos (como o OZ-277), apresentavam algumas limitações, como a reduzida estabilidade metabólica em plasma de doentes com malária, sendo deste modo fundamental o desenvolvimento de novos compostos dotados de uma maior estabilidade química e metabólica, mas que preservassem a atividade antimalárica dos 1,2,4 – trioxolanos. Assim, foram desenvolvidos os 1,2,4,5 – tetraoxanos que permitiram colmatar as deficiências observadas nos 1,2,4 – trioxolanos.^(122,123)

Os 1,2,4,5 – tetraoxanos (Figura II-31) são compostos dotados de uma estrutura heterocíclica constituída por seis átomos e que possuem duas pontes peróxido. A par da sua aplicação como antimaláricos, alguns destes compostos são utilizados a nível industrial na

produção de lactonas e de hidrocarbonetos macrocíclicos e também como promotores da polimerização de olefinas. ^(124,125)

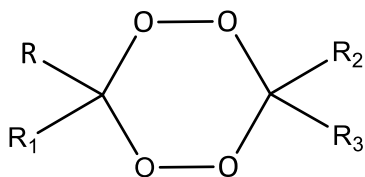


Figura II-31: Representação da estrutura geral dos 1,2,4,5 – tetraoxanos. (Adaptado de ⁽¹²³⁾)

Os 1,2,4,5-tetraoxanos constituem uma das classes de endoperóxidos com estrutura molecular mais simples, tendo sido o grupo de investigação de *Vennerstrom* um dos primeiros a explorar o potencial medicinal desta classe de compostos no tratamento da malária. *Vennerstrom et al.* revelaram que alguns dos 1,2,4,5-tetraoxanos desenvolvidos apresentavam uma atividade antimalárica equivalente à observada na artemisinina. ^(122,124) A partir das observações deste grupo, muitos foram os grupos de investigação que demonstraram interesse nesta classe de compostos, tendo sido sintetizadas bibliotecas de compostos com a estrutura 1,2,4,5-tetraoxano e avaliada a sua atividade antimalárica, demonstrando que alguns apresentam uma atividade antimalárica promissora *in vivo*. Alguns dos 1,2,4,5-tetraoxanos preparados são tetraoxanos simétricos ou assimétricos, que posteriormente sofrem algumas funcionalizações, quer por alteração dos grupos R, R₁, R₂, R₃, quer pela inclusão de grupos funcionais mais complexos. Alguns dos tetraoxanos revelaram ainda uma reduzida citotoxicidade e uma dose máxima tolerável relativamente elevada, o que torna esta classe terapêutica muito promissora para estudos de otimização estrutural posteriores. ^(122,124)

O desenvolvimento da estrutura 1,2,4,5 – tetraoxano fundamentou-se nas informações recolhidas através dos diversos estudos de relação estrutura-atividade efetuados nos 1,2,4 – trioxolanos. Comparativamente com os seus homólogos 1,2,4 – trioxanos e 1,2,4 – trioxolanos, os 1,2,4,5 – tetraoxanos revelaram uma estabilidade metabólica e química significativamente superior, o que demonstra a diferença química e biológica entre as duas classes, conduzindo a propriedades e reatividades distintas e características de cada classe. ⁽¹²³⁾

Tal como é visível no esquema apresentado na Figura II-32, quando o 1,2,4-trioxolano é simétrico (ou seja, quando apresenta dois substituintes iguais em cada um dos lados da estrutura 1,2,4-trioxolano) não possui atividade antimalárica, sendo um composto inativo. Esta inatividade foi atribuída a duas situações: a. quando a estrutura 1,2,4-trioxolano é flanqueada por dois grupos adamantilo (**A**) verifica-se um elevado impedimento estérico, o que impossibilita o contato do Fe(II) com o átomo de oxigénio da ponte peróxido, impedindo consequentemente a bioativação da molécula; b. quando a estrutura 1,2,4-trioxolano é flanqueada por dois grupos ciclohexilo (**B**) a ponte peróxido está demasiado exposta, sendo deste modo bastante reativa e instável. A inclusão de um grupo substituinte adamantilo de um dos lados da estrutura 1,2,4-trioxolano e de um grupo substituinte ciclohexilo do lado oposto origina um composto com atividade antimalárica, uma vez que o grupo adamantilo fornece o impedimento estérico adequado para o controlo da exposição e da reatividade da ponte

peróxido. Contudo, tal composto continuou a exibir alguns problemas ao nível da estabilidade metabólica da ponte peróxido quando exposto a plasma de doentes com malaria **(C)**.⁽¹²³⁾

Ao contrário do composto representado pela estrutura **(A)**, o 1,2,4,5-tetraoxano simétrico **(D)**, flanqueado por dois grupos ciclohexilo (tetraoxano simétrico homólogo), exibe atividade antimalárica a concentrações nanomolares baixas e uma maior estabilidade. Tendo em consideração que a substituição de um grupo substituinte ciclohexilo por um adamantilo conduziu a um incremento da atividade antimalárica da estrutura 1,2,4-trioxolano, a transposição de tal observação para estudos de relação estrutura-atividade dos 1,2,4,5-tetraoxanos deveria resultar num novo conjunto de compostos com melhores perfis de estabilidade, melhor farmacocinética e biodisponibilidade oral, através da otimização da estrutura da cadeia lateral (inclusão de grupos funcionais ou substituintes com características polares) apresentada na estrutura **(E)**.⁽¹²³⁾

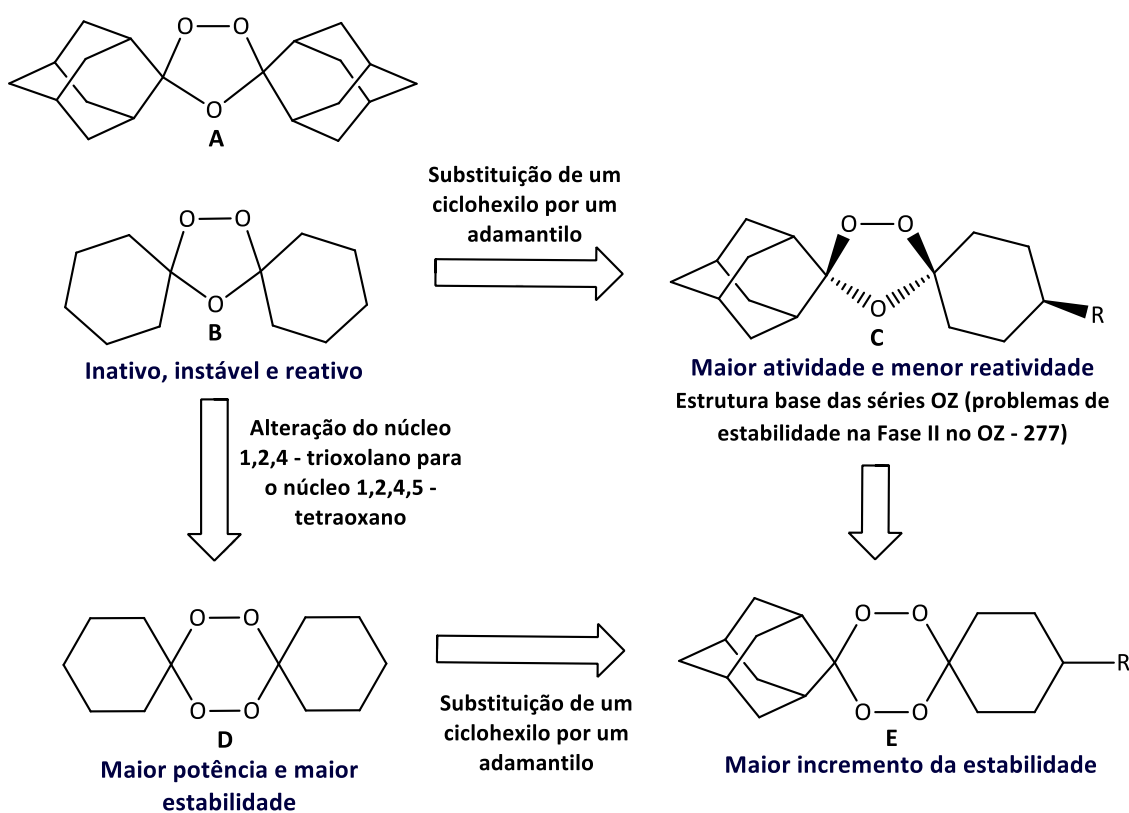


Figura II-32: Esquema representativo dos compostos modelo utilizados nos estudos de relação estrutura-atividade dos 1,2,4 – trioxolanos e das conseqüências resultantes da posterior otimização estrutural pela alteração para o núcleo 1,2,4,5 – tetraoxano. (Adaptado de⁽¹²³⁾)

Deste modo, os requisitos estruturais que conferem atividade antiparasitária nos 1,2,4,5-tetraoxanos são idênticos aos dos trioxolanos, sendo essencial que as moléculas sejam assimétricas, na medida em que devem ser flanqueados pelo grupo adamantilo e pelo ciclohexilo.^(123,124,126) Estas observações conduziram à síntese de um serie de moléculas pelo grupo de investigação de O'Neill, o que será descrito seguidamente.⁽¹²³⁾

2.3.3.1 O desenvolvimento do RKA182

O RKA182 corresponde a um 1,2,4,5-tetraoxano desenvolvido por O'Neill *et al.* em 2010, tendo constituído um dos principais progressos na área dos tetraoxanos. A identificação do RKA182 como um candidato promissor no tratamento da malária assentou nas observações que evidenciam que os 1,2,4-trioxolanos tetrasubstituídos apresentam uma menor atividade antimalárica comparativamente com 1,2,4,5-tetraoxanos tetrasubstituídos, e que a atividade antimalárica dos 1,2,4-trioxolanos é positivamente afetada pela adição do grupo adamantilo à estrutura 1,2,4-trioxolano. Deste modo, o grupo de investigação de O'Neill inferiu que a inclusão do grupo adamantilo na estrutura 1,2,4,5-tetraoxano poderia conduzir a um aumento da atividade antimalárica destes derivados sintéticos da artemisinina.^(122,123) Assim, este grupo procedeu ao desenvolvimento de uma série de compostos baseados numa estrutura 1,2,4,5-tetraoxano flanqueada por um grupo adamantilo, cada um deles associado a uma cadeia lateral polar com natureza química variável, de forma a equilibrar a lipofilicidade característica do grupo adamantilo. A síntese deste tipo de compostos foi efetuada através de cinco passos, em que o último foi divergente, o que permitiu uma síntese paralela e possibilitou a preparação de uma biblioteca de 1,2,4,5-tetraoxanos.^(122,123)

De entre os compostos preparados, o RKA182 (Figura II-33) revelou-se como o melhor composto para posterior investigação e otimização estrutural, tendo sido selecionado como um candidato promissor para desenvolvimento pré-clínico, a partir de uma série de tetraoxanos sintéticos.^(122,123)

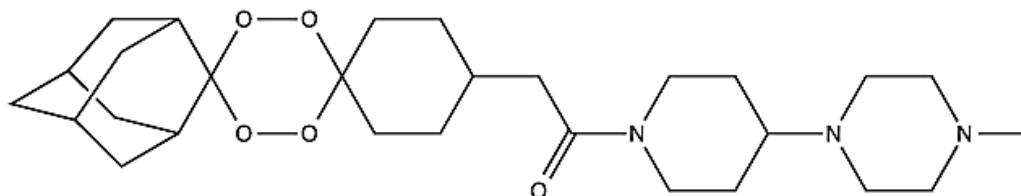


Figura II-33: Representação estrutural 1,2,4,5-tetraoxano sintético RKA182 (Adaptado de ⁽¹²²⁾).

O RKA182 demonstrou uma atividade antimalárica significativamente superior à observada no arteméter e no artesunato, quer *in vitro* quer *in vivo*, e ainda atividade contra estirpes resistentes de *P. falciparum in vitro*, com valores de IC₅₀ inferiores aos associados à cloroquina e ao artesunato. Além disso, apresentou melhores propriedades farmacocinéticas que os restantes candidatos, nomeadamente o facto de ser solúvel em água, de possuir uma estabilidade metabólica superior à observada no OZ-277, em doentes com malária, de estar associado a uma melhor biodisponibilidade oral e de possuir uma menor toxicidade e melhores propriedades ADME (absorção, distribuição, metabolização e excreção).^(76,122)

Contudo, tal como é visível na sua estrutura molecular, o RKA182 apresenta uma ligação amida, o que constitui uma potencial limitação da eficácia e da efetividade do composto de um modo geral, devido à sua instabilidade metabólica causada pela sua elevada reatividade.^(76,122)

De modo a eliminar a potencial instabilidade metabólica associada à ligação amida, O'Neill *et al.* procederam ao desenvolvimento de uma nova série de compostos derivados do RKA182, designados por RKA182 de segunda geração. A conceção destes compostos teve por objetivo eliminar a ligação amida, sendo desta forma expectável uma melhoria da estabilidade metabólica desta nova série de compostos. ^(76,122)

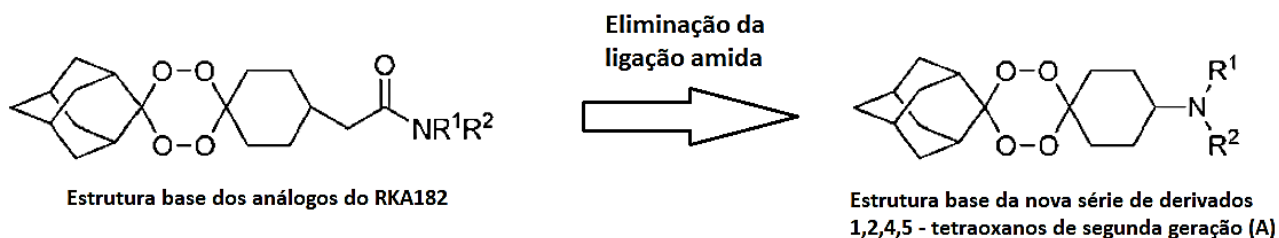


Figura II-34: Esquema representativo da alteração estrutural aos 1,2,4,5-tetraoxanos análogos do RKA182, com posterior preparação dos derivados 1,2,4,5-tetraoxanos de segunda geração (sem ligação amida). (Adaptado de ⁽⁷⁶⁾)

A nova serie de análogos 1,2,4,5-tetraoxanos, cuja estrutura geral **(A)** está apresentada na Figura II-34, demonstrou globalmente uma notável atividade antimalárica *in vitro*, com valores de IC₅₀ na gama nanomolar, associada a uma promissora biodisponibilidade oral em estudos animais. Além disso, os compostos sintetizados apresentaram uma melhor estabilidade metabólica comparativamente ao RKA182, por não serem dotados da ligação amida, estando ainda associados a um excelente perfil de atividade. ⁽⁷⁶⁾

Tal como no processo de preparação da série de compostos que culminou com a selecção do RKA182 como um candidato promissor, neste caso a síntese da biblioteca de 1,2,4,5-tetraoxanos de segunda geração envolveu a utilização de um intermediário comum a todos os tetraoxanos, o qual seguiu posteriormente um processo de síntese paralela, envolvendo o acoplamento de aminas primárias ou secundárias variáveis no último passo de síntese. ⁽⁷⁶⁾

2.3.3.2 Aspetos relacionados com a metodologia de síntese dos 1,2,4,5-tetraoxanos

De um modo geral, a síntese de compostos dotados de uma estrutura 1,2,4,5-tetraoxano é simples, sendo esta uma das vantagens da preparação desta classe terapêutica. ⁽¹²²⁾ Baseia-se numa reação de ciclocondensação de um composto carbonílico (cetona ou aldeído) com um intermediário de síntese derivado de uma cetona, denominado de *gem* – dihidroperóxido. ^(126,127)

Na literatura estão descritos diversos procedimentos experimentais para a síntese de tetraoxanos, podendo-se inferir que o processo envolve essencialmente duas etapas: i. oxidação do grupo carbonílico por ação de peróxido de hidrogénio, H₂O₂, utilizando um catalisador específico, e ii. posterior ciclização a partir de um dihidroperóxido

principais metodologias de síntese de 1,1-dihidroperóxidos descritas na literatura correspondem aos seguintes processos:

- Ozonólise de alcenos, de *O*-metil cetona oximas, enóis-éter, éteres vinílicos ou olefinas, na presença de H_2O_2 ; ^(124,125,127)
- Reação de cetais com H_2O_2 na presença de ácido túngstico ou $BF_3 \cdot OEt_2$; ^(122,127)
- Reação de cetonas, aldeídos ou éteres enólicos com H_2O_2 , sob catálise ácida, isto é, na presença de ácidos fortes ou de ácidos de Lewis. ^(122,127)

A necessidade da síntese prévia de alguns substratos de partida e da utilização de elevadas concentrações de H_2O_2 , o uso de ácidos fortes em excesso, a utilização de substratos específicos e com uma diversidade restrita e o fato de conduzirem a rendimentos de síntese moderados (que podem ser muito variáveis), constituem algumas das desvantagens destes métodos. Além disso a ozonólise apresenta seletividade reduzida, não podendo ser empregada em substratos que apresentem grupos substituintes ou funcionais sensíveis ao ozono. Assim, apesar dos vários procedimentos para a síntese dos intermediários 1,1-dihidroperóxido descritos na literatura científica, verifica-se a necessidade de desenvolver novos métodos. Gradualmente, tem-se observado o aparecimento de novas metodologias e uma otimização das metodologias já descritas, de modo a colmatar as deficiências dos métodos anteriormente descritos, o que é essencial para o desenvolvimento de novos métodos de síntese de 1,2,4,5-tetraoxanos que conduzam a rendimentos de reação mais elevados, associados a condições de reação mais simples. ⁽¹²⁷⁾

2.3.3.2.2 A formação de produtos secundários: hexaoxanos

A formação da estrutura 1,2,4,5-tetraoxano advém, de modo mais frequente, da adição de compostos carbonílicos (cetonas ou aldeídos) a um intermediário 1,1-dihidroperóxido, sob catálise ácida. Dependendo das condições da reação, o aduto formado pode sofrer a condensação desejada, dando origem ao respetivo tetraoxano, ou, em alternativa, pode conduzir à formação de produtos secundários, nomeadamente de 1,2,4,5,7,8-hexaoxanos. ⁽¹²⁴⁾

Os 1,2,4,5,7,8-hexaoxanos são compostos heterocíclicos dotados de três pontes peróxido, cuja estrutura geral está representada na Figura II-36.

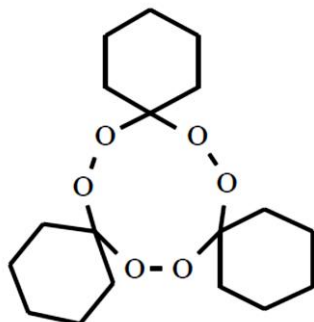


Figura II-36: Representação da estrutura geral dos 1,2,4,5,7,8 – hexaoxanos. (Adaptado de ⁽¹²⁵⁾)

O mecanismo de formação de tetraoxanos e de hexaóxanos foi descrito por *Dong* (2002).⁽¹²⁵⁾ Enquanto os hexaóxanos correspondem a produtos resultantes do controlo cinético, os tetraóxanos, termodinamicamente mais estáveis que os hexaóxanos, são produtos resultantes de controlo termodinâmico. A formação preferencial de hexaóxanos em detrimento da formação de tetraóxanos é dependente das condições químicas que se verificam durante o progresso de reação, nomeadamente a temperatura, o pH, os solventes de reação, a estrutura molecular das cetonas utilizadas, bem como o modo de adição.^(124,125)

Existem estudos publicados que avaliam a reatividade e a atividade antimalárica dos 1,2,4,5,7,8-hexaóxanos, comparativamente com a dos 1,2,4,5-tetraóxanos. Tais estudos foram efetuados por *Dong et al.* (2007) e demonstraram que os tetraóxanos apresentavam atividade contra *P. falciparum*, enquanto os hexaóxanos apresentavam uma atividade antiplasmódica mínima. Tendo em consideração que a atividade antimalárica dos tetraóxanos é dependente da bioativação da molécula através da clivagem redutiva da ponte peróxido catalisada pelo Fe(II), o mesmo grupo de investigação supôs que a atividade antimalárica bastante reduzida dos hexaóxanos poderia ser proveniente de uma distinta susceptibilidade da ponte peróxido ao Fe(II) nesta classe de compostos. De modo a validar tal hipótese, o mesmo grupo de investigação procedeu à determinação da taxa de degradação dos tetraóxanos e dos hexaóxanos quando na presença de FeSO₄ (fonte de Fe(II)). No estudo os tetraóxanos sofreram uma completa degradação quando expostos a FeSO₄, comparativamente com os hexaóxanos, que demonstram uma taxa de degradação não significativa. Tais resultados permitem concluir que a atividade pouco significativa dos hexaóxanos pode ser justificada pela reduzida bioativação molecular, o que pode ser causado pela reduzida reatividade da ponte peróxido ou pela reduzida suscetibilidade ao Fe(II). A reduzida atividade dos hexaóxanos pode ser despoletada pelo impedimento estérico das pontes peróxido exibidas nas estruturas hexaóxano, o que impede o contato do Fe(II) com os átomos de oxigénio, inibindo a ativação molecular.⁽¹²⁸⁾

Na sequência dos processos de síntese utilizados, os tetraóxanos encontram-se frequentemente contaminados com impurezas, quer por hexaóxanos quer por hidroperóxidos que não reagiram no decorrer da reação. A purificação dos tetraóxanos tem-se demonstrado um grande desafio. A remoção de hidroperóxidos é assegurada pelo uso de iodeto de potássio ou de dimetilsulfureto e os hexaóxanos podem ser eliminados por processos de recristalização, ou de lavagem da mistura reacional com metanol gelado. Se estes procedimentos não se demonstrarem efetivos, o aquecimento da mistura reacional com ácido perclórico em ácido acético permite converter os hexaóxanos nos respetivos tetraóxanos.^(124,125)

2.3.3.2.3 Síntese de 1,2,4,5 – tetraóxanos simétricos e assimétricos.

De um modo geral, a reação de ciclocondensação de cetonas e aldeídos com peróxido de hidrogénio sob catálise ácida é a via mais simples para a síntese de alguns tetraóxanos. As metodologias de síntese utilizadas na preparação de tetraóxanos simétricos são em geral distintas das metodologias utilizadas na preparação de tetraóxanos assimétricos, havendo contudo algumas metodologias comuns.^(122,124)

Os tetraoxanos simétricos podem ser obtidos através da condensação de aldeídos ou cetonas com peróxido de hidrogénio sob catálise ácida **(A)**, ou através da ciclocondensação de bis(trimetilsilil)peróxido com compostos carbonílicos, usando como catalisador trimetilsilil trifluorometanossulfonato (TMSOTf) **(B)**. Existem ainda outras metodologias de síntese, nomeadamente, a ozonólise de alcenos, de enol-éteres ou de oximas, que são utilizadas com menor frequência **(C)**.^(122,124) As várias metodologias de síntese dos tetraoxanos simétricos encontram-se representadas na Figura II-37.

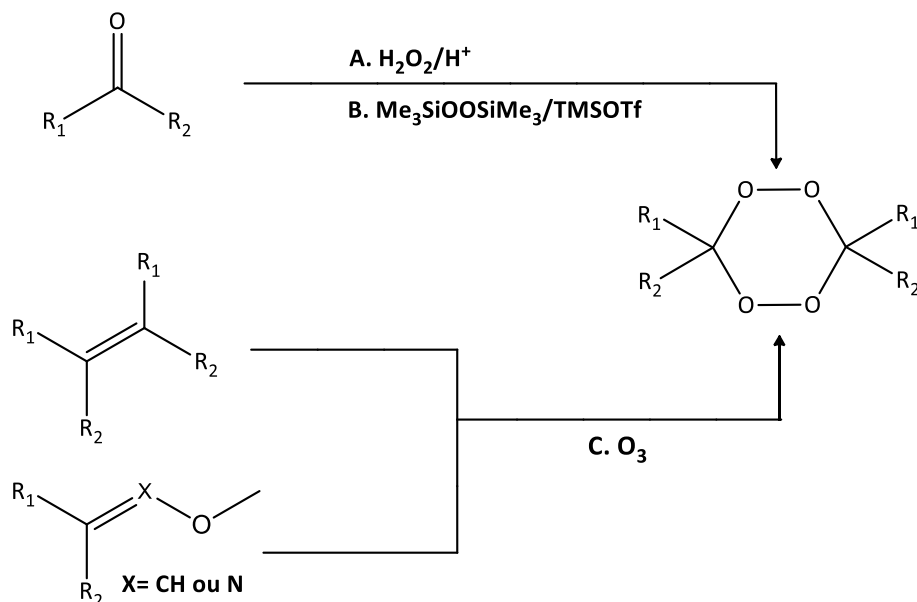


Figura II-37: Esquema representativo das várias metodologias de síntese dos tetraoxanos simétricos. (Adaptado de ⁽¹²⁴⁾)

Contudo, a diversidade de tetraoxanos simétricos que se podem sintetizar é bastante reduzida, além de estarem associados a uma menor estabilidade metabólica e química e a uma menor atividade antiparasitária que os tetraoxanos assimétricos, como referido anteriormente.⁽¹²⁶⁾

A síntese de tetraoxanos assimétricos tem-se revelado como uma das áreas mais promissoras no desenvolvimento de fármacos com potencial antimalárico. O desenvolvimento de compostos dotados de uma estrutura tetraoxano assimétrica é desejável, na medida em que possibilita o acesso a uma grande diversidade de moléculas, uma vez que este tipo de estrutura permite a incorporação de determinados grupos funcionais de modo selectivo na estrutura tetraoxano (e a incorporação de múltiplos farmacóforos numa só molécula).^(122,126) De um modo geral, os tetraoxanos assimétricos são preparados através das seguintes metodologias:

- A.** ciclocondensação de aldeídos ou cetonas com *gem*-dihidroperóxidos gerados em peróxido de hidrogénio, através de catálise ácida (utilizando por exemplo H_2SO_4 como catalisador);^(122,124)
- B.** ciclocondensação de aldeídos ou cetonas com *gem*-hidroperóxidos alifáticos ou alicíclicos, utilizando trióxido de metilrénio (MTO) e HBF_4 como catalisadores;^(122,124)

- C. ciclocondensação de aldeídos ou cetonas com *gem*-bis(trimetilsilildioxialcanos ($R_1R_2C(OOSiMe_3)_2$), utilizando trimetilsilil-trifluorometanossulfonato (TMSOTf) como catalisador. ^(122,124)

As principais metodologias de síntese dos tetraoxanos assimétricos, bem como as respectivas condições de reação estão esquematizadas na Figura II-38.

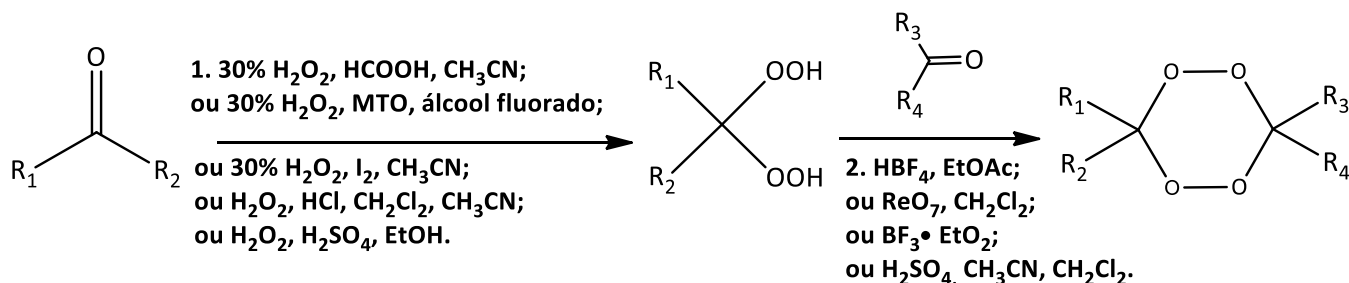


Figura II-38: Esquema representativo das várias metodologias de síntese dos tetraoxanos assimétricos. (Adaptado de ^(122,124))

Como referido anteriormente, a formação do intermediário 1,1-dihidroperóxido é fundamental para a síntese de 1,2,4,5-tetraoxanos. O grupo de investigação de Šolaja (2002) foi dos primeiros a proceder à síntese deste intermediário através do uso de H₂O₂. Na última década, o procedimento descrito por Šolaja *et al.* tem sofrido algumas alterações, nomeadamente a nível da concentração de H₂O₂ utilizada, dos catalisadores empregados, bem como dos solventes usados, de forma a proceder ao desenvolvimento de um método de síntese “one-pot”. De um modo geral, a maioria dos métodos de síntese dos tetraoxanos prefere um procedimento em “one-pot”, em que um reagente é submetido a reações químicas sucessivas sem que se verifique o isolamento dos intermediários. A possibilidade de estratégias de síntese que permitam a aplicação desta metodologia é muito útil na síntese de tetraoxanos, na medida em que evita o isolamento do intermediário 1,1 – dihidroperóxido, que apresenta uma natureza instável. Esta técnica permite uma melhoria da eficiência da reação, uma vez que evita a decomposição deste intermediário, muitas vezes provocada pela necessidade de isolamento dos intermediários de reação. ⁽¹²²⁾

Teoricamente, a preparação de tetraoxanos assimétricos é possível através da ozonólise de dois enóis-éter, de duas oximas-éter, de dois alcenos simétricos, ou de um alceno assimétrico. O sucesso desta estratégia de síntese depende da selecção cuidadosa dos reagentes de partida, bem como de uma separação eficiente dos tetraoxanos desejados dos produtos secundários indesejados. ⁽¹²⁵⁾ Estudos presentes na literatura descrevem uma metodologia de síntese de tetraoxanos assimétricos através de um procedimento de ozonólise de éteres vinílicos na presença de H₂O₂. Tal procedimento origina o DHP intermediário, que sofre posteriormente uma reação de trimetilsililação, dando origem ao *gem*-bis(trimetilsilildioxi)alceno que participa na reação de ciclocondensação com os compostos carbonílicos (aldeídos ou cetonas), catalisada por TMSOTf. ^(125,129) A estratégia de síntese de tetraoxanos assimétricos a partir de éteres vinílicos através de ozonólise está esquematizada na Figura II-39.

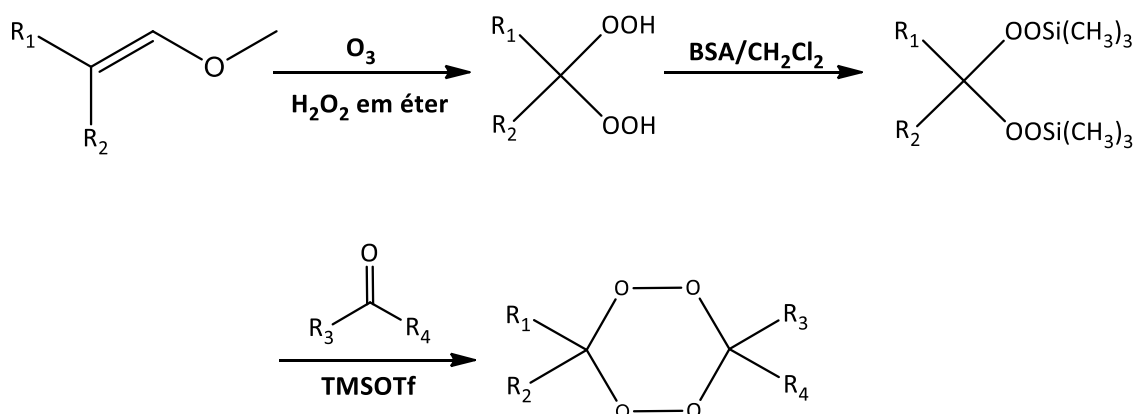


Figura II-39: Esquema representativo da metodologia de síntese dos tetraoxanos assimétricos através do processo de ozonólise. (Adaptado de ^(125,129,130))

Contudo, tal estratégia de síntese apresenta baixos rendimentos de reação, além de ser um procedimento constituído por múltiplos passos que envolve o isolamento do DHP intermediário, o que não é desejável devido à sua instabilidade. ⁽¹³⁰⁾

Iskra et al. (2003) desenvolveram uma metodologia de síntese de tetraoxanos que envolve a combinação de H_2O_2 com MTO em álcool fluorado. Esta metodologia de síntese corresponde a um procedimento em “one-pot”, que permite a conversão de uma quantidade significativa da cetona utilizada como reagente de partida no respetivo *gem*-dihidroperóxido, em condições neutras e sem a necessidade de excesso de H_2O_2 . ^(122,130)

Os principais álcoois fluorados utilizados como solventes da reação correspondem ao trifluoroetanol (TFE) e ao hexafluoropropanol (HFIP). O álcool fluorado permite uma ativação do H_2O_2 ao efectuar ligações por pontes de hidrogénio com o mesmo, o que favorece o desenvolvimento de reações de oxidação. ^(122,130) Na Figura II-40 está representada a metodologia de síntese que emprega o MTO como catalisador.

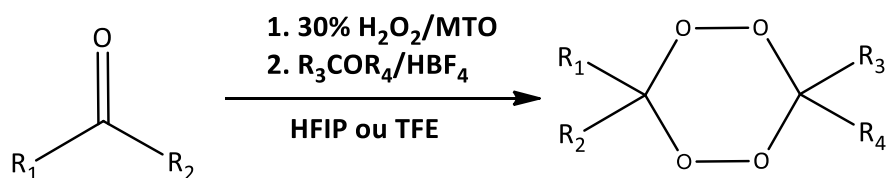


Figura II-40 - Esquema representativo da metodologia de síntese dos tetraoxanos “one-pot”, através do sistema H_2O_2 /MTO em álcool fluorado. (Adaptado de ^(130,131))

De um modo geral este sistema conduz a bons rendimentos de síntese de tetraoxanos, sendo a formação de produtos não desejados, nomeadamente de hexaoxanos, evitada, devido ao uso do álcool fluorado como solvente e à elevada selectividade presente no passo de

ciclicação do intermediário dihidroperóxido. Desta forma, os tetraoxanos correspondem aos únicos produtos de reação. Adicionalmente, a concentração de catalisador necessária para que se obtenham bons rendimentos de reação é reduzida, não sendo necessário o isolamento do intermediário de síntese, bastante instável, nem o uso de H_2O_2 em excesso.⁽¹³⁰⁾

Mais tarde, *Zmitek et al.* (2006) confirmaram a eficácia da metodologia de síntese “one-pot” desenvolvida por *Iskra et al.* através da preparação bem sucedida de um conjunto de tetraoxanos, utilizando como catalisadores o sistema oxidativo H_2O_2 com MTO, e HBF_4 no segundo passo de reação, e como álcoois fluorados HFIP e TFE.^(122,131)

O iodo molecular é um catalisador alternativo empregado nas metodologias de preparação de tetraoxanos simétricos e assimétricos, estando associado a um custo relativamente reduzido.⁽¹²²⁾ O procedimento no qual o iodo é utilizado como catalisador foi desenvolvido por *Zmitek et al.* (2006), tendo em consideração que o iodo constitui um catalisador bastante útil e eficiente na activação de compostos carbonílicos, ao atuar como um ácido de Lewis, pelo que poderia ser igualmente eficaz nas reações de peroxidação.⁽¹²⁷⁾

Tendo em conta a metodologia de síntese de tetraoxanos desenvolvida por *Iskra et al.* (2003), anteriormente descrita (30% H_2O_2 , utilizando como catalisador MTO em álcool fluorado), o grupo de investigação de *Zmitek* procedeu à sua otimização ao substituir o MTO por I_2 , utilizando como solvente o álcool fluorado TFE, tendo-se verificado uma elevada conversão da ciclohexanona no respetivo DHP (80%).⁽¹²⁷⁾

Nesta metodologia de síntese, o iodo molecular apresenta uma dupla função como catalisador, na medida em que conduz a um incremento do carácter eletrofílico do carbono do grupo carbonílico da cetona e em simultâneo aumenta o carácter nucleofílico do H_2O_2 . Ensaio efetuados para o mesmo estudo demonstraram que o acetonitrilo (MeCN) é o solvente de reação mais adequado, tendo-se observado rendimentos bastante elevados (90%) na formação de DHPs. Outros solventes testados, por exemplo o metanol, conduziram à formação de produtos secundários em grande quantidade, em particular de monoperoxicetais (em vez de dihidroperóxidos), que são os intermediários fundamentais para a preparação de 1,2,4,5 - tetraoxanos. Para que esta metodologia de síntese seja bem sucedida, as condições de reação deverão ser neutras, pois estas condições são fundamentais para que se verifique o ataque do nucleófilo (H_2O_2) ao centro eletrofílico, evitando a ocorrência de reações paralelas, além de impedir a formação de enóis a partir da cetona utilizada como reagente de partida, o que seria promovido pela catálise ácida e resultaria na α -iodinação da cetona.⁽¹²⁷⁾ A estratégia de síntese de DHPs que utiliza I_2 como catalisador está representada na Figura II-41.

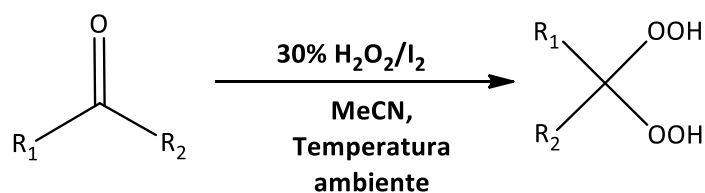


Figura II-41 - Esquema representativo da metodologia de síntese de DHPs através do sistema $\text{H}_2\text{O}_2/\text{I}_2$, utilizando acetonitrilo como solvente. (Adaptado de⁽¹²⁷⁾)

Em 2009, *Kumar et al.* desenvolveram a síntese “one-pot” de um conjunto de tetraoxanos simétricos e assimétricos, utilizando um sistema que empregava o I₂ como catalisador e o acetonitrilo como solvente de reação, a partir de aldeídos, em particular de benzaldeídos com diferentes grupos substituintes.⁽¹³²⁾ Esta estratégia de síntese está representada na Figura II-42.

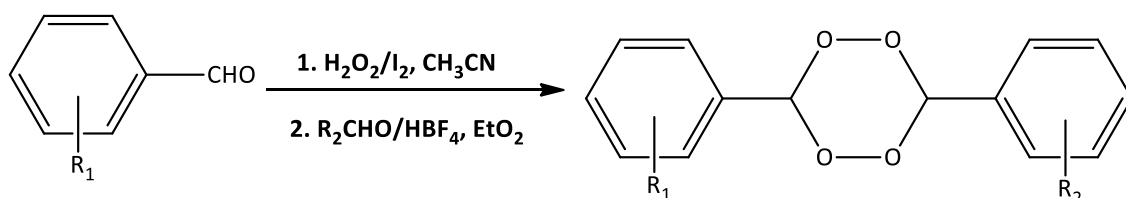


Figura II-42 - Esquema representativo da metodologia de síntese de tetraoxanos através do sistema H₂O₂/I₂ em acetonitrilo, em “one-pot”. (Adaptado de ⁽¹³²⁾)

De um modo geral, o material de partida para a preparação de tetraoxanos consiste na utilização de cetonas cíclicas. No entanto, esta classe de compostos pode ser igualmente obtida através de aldeídos aromáticos, dando origem a uma grande diversidade de tetraoxanos com estruturas químicas distintas, tal como descrito em várias publicações.^(124,132) A utilização de derivados de benzaldeído permite a incorporação seletiva de grupos funcionais distintos, ampliando a variedade estrutural da biblioteca de tetraoxanos que podem ser obtidos através da utilização da metodologia acima descrita.⁽¹³²⁾

Segundo Kumar, este método de síntese de tetraoxanos assimétricos e simétricos revelou-se bastante prático, conveniente, simples, acessível e económico, na medida em que o uso de I₂ e de acetonitrilo oferece muitas vantagens: são reagentes com um baixo custo e bastante acessíveis, não conduzem a um impacto ambiental significativo e a sua utilização conjunta, e de forma integrada, resulta numa estratégia de síntese que não necessita do uso de um excesso de H₂O₂ nem de aldeídos (do material de partida).⁽¹³²⁾ A necessidade do uso de H₂O₂ em excesso, bem como dos materiais de partida de síntese (aldeídos ou cetonas) constitui uma das maiores lacunas dos restantes métodos publicados, e que esta metodologia permite colmatar.

Atualmente, os principais catalisadores utilizados no segundo passo de reação, a formação de tetraoxanos assimétricos a partir de dihidroperóxidos intermediários, são o H₂SO₄, a associação MTO - HBF₄, o Re₂O₇ e o BF₃•OEt₂. Alguns destes catalisadores apresentam algumas desvantagens, em particular o fato de alguns serem dispendiosos ou sensíveis às condições externas, como a humidade.⁽¹²²⁾

Em 2008, *Ghorai et al.* propuseram uma nova metodologia de preparação de 1,1 – dihidroperóxidos através de um procedimento que empregava óxido de rénio (Re₂O₇) como catalisador e acetonitrilo como solvente da reação.⁽¹³³⁾

A utilização de Re₂O₇ em acetonitrilo, representada na Figura II-43, revelou-se um método bastante eficiente na formação de DHPs a partir de aldeídos, cetonas e acetais, com rendimentos superiores a 80%. Esta estratégia de síntese de DHPs tem como principais

vantagens o uso de um solvente acessível economicamente, e o fato de requerer um ligeiro excesso de H_2O_2 .⁽¹³³⁾

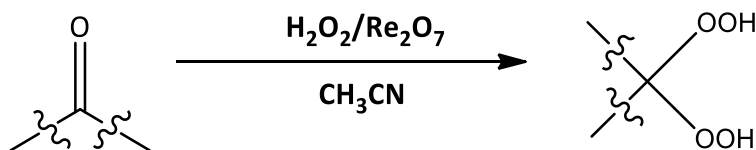
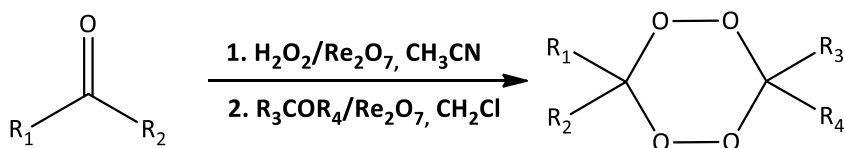


Figura II-43 - Esquema representativo da metodologia de síntese de 1,1-dihidroperóxidos usando o sistema $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Re}_2\text{O}_7$ em acetonitrilo. (Adaptado de⁽¹³³⁾)

Mais tarde, em 2009, os mesmos investigadores publicaram a utilização da metodologia anteriormente descrita na preparação de tetraoxanos, através de um procedimento “one-pot” ou “two pot”, de acordo com os esquemas de reação representados na Figura II-44.⁽¹³⁴⁾

Método “one-pot”



Método “two-pot”

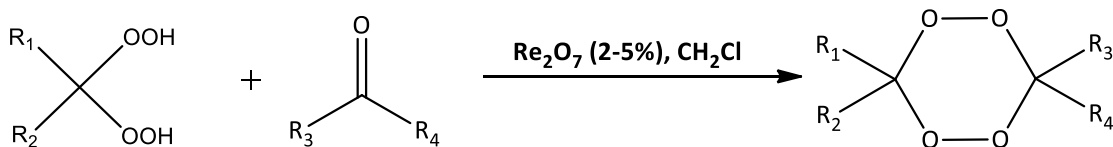


Figura II-44 - Esquema representativo do procedimento de síntese de 1,2,4,5-tetraoxanos, através de um método “one-pot” ou “two pot”, utilizando o sistema $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Re}_2\text{O}_7$ em acetonitrilo. (Adaptado de⁽¹³³⁾)

O método de preparação de tetraoxanos em “one-pot”, através desta metodologia, é preferível à abordagem sequencial (“two pot”), na medida em que não requer o isolamento do intermediário de reação, que é intrinsecamente instável e que, por consequência, sofre facilmente decomposição. Esta metodologia de síntese de tetraoxanos revelou ser bastante eficiente, conduzindo a rendimentos de síntese consideravelmente elevados. Baseia-se na utilização de acetonitrilo que, além de ser um solvente acessível e barato, tem um impacto ambiental reduzido. Apesar de não necessitar do uso de elevadas concentrações de H_2O_2 , a principal desvantagem desta metodologia reside no custo do catalisador de reação, o Re_2O_7 , que é relativamente dispendioso.⁽¹³⁴⁾

Li et al. (2009) desenvolveram uma nova estratégia de síntese de 1,1-dihidroperóxidos, que se tem revelado muito promissora na preparação de tetraoxanos, em particular de tetraoxanos assimétricos. Esta estratégia de síntese envolve a preparação de DHPs através de um sistema reacional que inclui o ácido fosfomolibdico (PMA) como catalisador, H_2O_2 como agente oxidante e Et_2O como solvente, à temperatura ambiente (Figura II-45). O PMA é um catalisador muito eficiente na formação de DHPs a partir de cetonas e cetais contendo grupos substituintes benzilo, benzoílo, metoximetilo, metoxibenzilo e alcenos, estando associado a elevadas taxas de conversão de cetonas/cetais nos respectivos DHPs, em poucas horas.⁽¹³⁵⁾

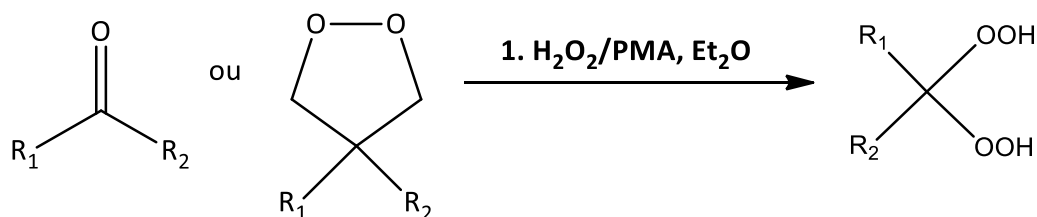


Figura II-45 - Esquema representativo da estratégia de síntese de DHPs através da utilização de PMA como catalisador. (Adaptado de⁽¹³⁵⁾)

O conjunto de condições associadas a esta metodologia, nomeadamente o pH pouco ácido e a elevada atividade catalítica, associadas à boa compatibilidade entre reagentes envolvidos no sistema reacional, permite o acoplamento de compostos de partida com outros grupos funcionais, como ésteres, nitrilos ou alcinos, à estrutura dos DHPs, permitindo uma maior flexibilidade e diversidade da estrutura molecular do DHP, que posteriormente irá ser transferida para o tetraoxano.⁽¹³⁵⁾

O PMA apresenta uma maior estabilidade em contato com o ar e com a humidade, sendo ainda mais fácil de manipular do que o sistema baseado em $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, com TMSOTf. Por outro lado, comparativamente a outros catalisadores utilizados noutras metodologias de síntese, nomeadamente o Re_2O_7 e o MTO, o PMA é muito menos dispendioso.^(122,136) Deste modo, o uso desta estratégia de síntese de DHPs constitui uma alternativa viável para a síntese de tetraoxanos, na medida em que se observa uma elevada compatibilidade entre os reagentes do sistema reacional e se obtêm rendimentos de reação elevados, além de o catalisador empregado ter um custo relativamente reduzido, comparativamente com os utilizados noutras metodologias de síntese.

Em 2011, *Qiao et al.* procederam à preparação de uma biblioteca de 1,2,4,5-tetraoxanos, através de um procedimento que envolveu a utilização de PMA como catalisador, sulfato de magnésio (MgSO_4) como agente secante e diclorometano (CH_2Cl_2) como solvente da reação, tal como representado na Figura II-46.^(122,136)

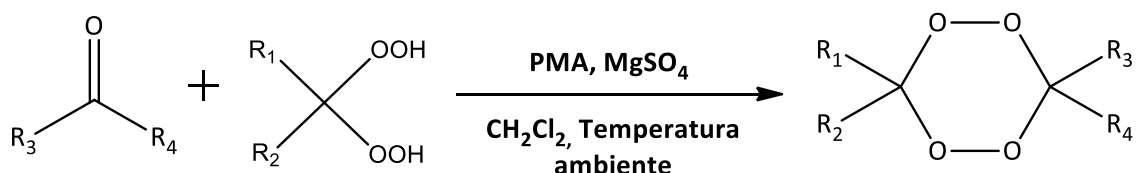


Figura II-46 - Esquema representativo da estratégia de síntese em “one-pot” de tetraoxanos assimétricos, através da utilização de PMA como catalisador e de MgSO_4 como agente secante. (Adaptado de ⁽¹³⁶⁾)

O estudo em questão permitiu inferir que o PMA permite uma estratégia de síntese muito eficiente e prática para a preparação de 1,2,4,5 – tetraoxanos através da condensação de 1,1 – dihidroperóxidos com compostos carbonílicos, na medida em que foram obtidos rendimentos de reação iguais ou superiores aos obtidos usando metodologias de síntese que empregam Re_2O_7 como catalisador. Além disso, foram necessárias menores concentrações de catalisador para que se verificassem tais rendimentos de reação, podendo-se inferir, desta forma, que o PMA apresenta uma maior eficácia catalítica que o Re_2O_7 , na reação em estudo, além de evidenciar claramente uma maior tolerância relativamente a grupos substituintes facilmente degradáveis. ⁽¹³⁶⁾

Em 2013, Terent’ev *et al.* desenvolveram um conjunto de 1,2,4,5-tetraoxanos em ponte, de modo selectivo, a partir de β -dicetonas (que apresentavam ou não grupos substituintes na posição α), através de uma metodologia “one-pot”. Esta estratégia de síntese utilizava como catalisador PMA ou ácido fosfotúngstico (PTA), com H_2O_2 como oxidante. Alguns dos tetraoxanos em ponte obtidos apresentam um grupo substituinte adamantilo, uma estrutura com reconhecida importância na atividade antiparasitária dos tetraoxanos. ⁽¹³⁷⁾

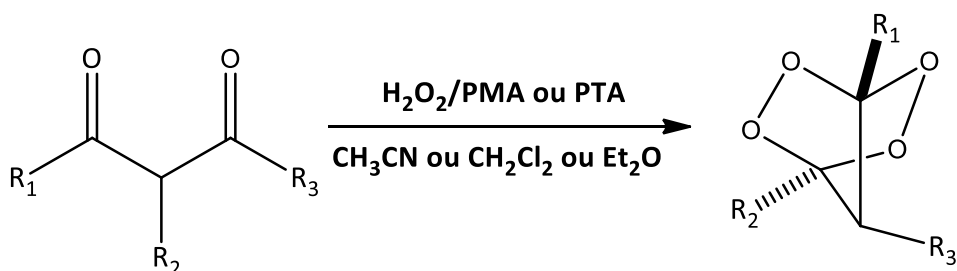


Figura II-47 - Esquema representativo da estratégia de síntese de tetraoxanos em ponte, a partir de β -dicetonas, utilizando PMA ou PTA como catalisador. (Adaptado de ⁽¹³⁷⁾)

O uso destes catalisadores conduziu a uma estratégia de síntese eficiente e seletiva para a preparação de tetraoxanos em ponte, um resultado não esperado devido ao equilíbrio verificado entre a forma cetónica e a forma enólica das β -dicetonas. Como as β -dicetonas existem predominantemente na sua forma enólica, seria esperado que o sistema H_2O_2 /PMA ou PTA conduzisse à oxidação da ligação dupla presente na forma enólica, dando origem a epóxidos que, posteriormente, sofreriam uma clivagem. No entanto tal processo não ocorreu, tendo-se verificado o ataque nucleofílico do H_2O_2 ao centro eletrofílico do grupo carbonilo, o

que foi fundamental para a síntese deste género de tetraoxanos. De um modo geral, os resultados obtidos através da peroxidação de β - dicetonas usando PMA ou PTA são idênticos, sendo que o PMA constitui o catalisador mais adequado por apresentar um peso molecular mais baixo que o do PTA. ⁽¹³⁷⁾

Em 2012, Sashidhara e o seu grupo de investigação demonstraram a formação de um conjunto de 1,2,4,5-tetraoxanos através de uma estratégia de síntese que utilizava $\text{Bi}(\text{OTf})_3$ como catalisador. ⁽¹²²⁾ Este método de síntese pode ser aplicado na preparação de tetraoxanos simétricos e assimétricos, através de um procedimento “one-pot” (Figura II-48). ^(122,138)

O desenvolvimento de uma estratégia de síntese de DHPs como precursores de tetraoxanos que empregue compostos com bismuto como catalisadores adveio do fato de este tipo de compostos apresentar resultados positivos da sua utilização como catalisadores numa grande variedade de reacções químicas, de serem compostos com um reduzido nível de toxicidade, fáceis de manusear, e de se encontrarem prontamente disponíveis. ^(122,138) Dos vários compostos com $\text{Bi}(\text{III})$ testados, o triflato de bismuto $\text{Bi}(\text{OTf})_3$ revelou-se como o melhor candidato a catalisador, associado à mistura de solventes $\text{CH}_3\text{CN}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, à temperatura ambiente. A estratégia de síntese de DHPs utilizando $\text{Bi}(\text{OTf})_3$ como catalisador está representada na Figura II-48

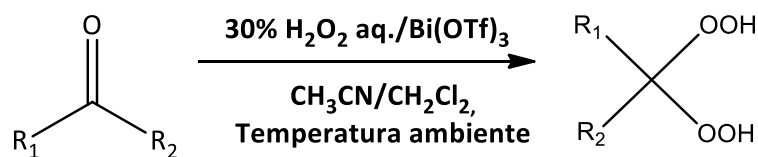


Figura II-48 - Esquema representativo da estratégia de síntese de DHPs usando $\text{Bi}(\text{OTf})_3$ como catalisador e da mistura $\text{CH}_3\text{CN}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ como solventes de reacção. (Adaptado de ⁽¹³⁸⁾)

Esta metodologia de síntese de DHPs revelou-se muito eficaz e prática, permitindo obter os tetraoxanos desejados. Adicionalmente mostrou ser bastante versátil, pois permite a preparação de tetraoxanos assimétricos e simétricos, com rendimentos aceitáveis. Além disso, este método permite a utilização de vários reagentes de partida, na medida em que é aplicável quer a cetonas como aldeídos, que podem apresentar ou não grupos substituintes. ⁽¹³⁸⁾

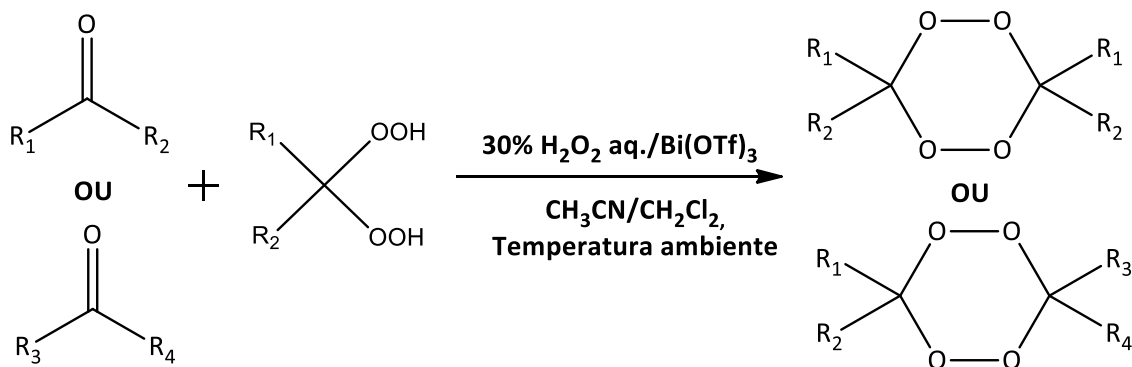


Figura II-49 - Esquema representativo do método de síntese em “one-pot” de tetraoxanos simétricos ou assimétricos através do uso de $\text{Bi}(\text{OTf})_3$ como catalisador e da mistura $\text{CH}_3\text{CN}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ como solventes de reação. (Adaptado de ⁽¹³⁸⁾)

Recentemente, *Khosnari* (2015) desenvolveu uma nova metodologia de síntese de *gem*-dihidroperóxidos a partir de aldeídos ou cetonas, usando nitrato de cério como catalisador, com H_2O_2 a 30%, em acetonitrilo, à temperatura ambiente.⁽¹³⁹⁾ Esta metodologia de preparação de DHPs encontra-se representada na Figura II-50.

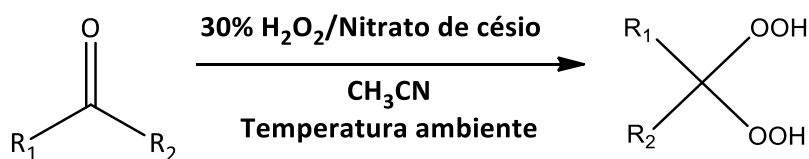


Figura II-50 - Esquema representativo da estratégia de síntese de DHPs usando nitrato de cério como catalisador e CH_3CN como solvente, à temperatura ambiente. (Adaptado de ⁽¹³⁸⁾)

Esta metodologia revelou-se muito eficaz, prática, simples e com uma relação custo-efetividade muito adequada. Os rendimentos de reação são relativamente elevados, estando ainda associada a um tempo de reação reduzido e à obtenção dos produtos de interesse com uma elevada pureza, sem que se verifique a formação de produtos secundários. O nitrato de cério corresponde é um catalisador bastante eficiente e economicamente acessível, estando facilmente disponível a nível comercial, além de não ser tóxico, o que permite a preparação de DHPs através de um procedimento menos contaminante, e com um impacto ambiental muito reduzido.⁽¹³⁹⁾

As estratégias de síntese anteriormente descritas, principalmente as associadas à preparação de 1,2,4-trioxolanos e de 1,2,4,5-tetraoxanos, são fundamentais para a preparação de endoperóxidos sintéticos dotados de atividade antimalárica. As mesmas estratégias podem ser igualmente aplicadas na preparação de compostos com atividade contra *Perkinsus olseni*, *Toxoplasma gondii*, e contra as várias espécies de *Leishmania*. No entanto, apresentam ainda algumas lacunas, sendo, deste modo, muito relevante o desenvolvimento de novas metodologias ou de estratégias de otimização das metodologias já existentes.

III. SÍNTESE DE PERÓXIDOS COM POTENCIAL ATIVIDADE CONTRA *PERKINSUS OLSENI*

No âmbito da presente dissertação foi realizada pela autora uma componente laboratorial, no grupo de Síntese e Reatividade Orgânica do CCMAR, onde se procedeu à síntese de diversos peróxidos sintéticos e semissintéticos com potencial atividade contra *Perkinsus*. Este grupo de investigação tem levado a cabo diversos projetos centrados no desenvolvimento de peróxidos semissintéticos e sintéticos com potencial utilidade no tratamento de doenças infecciosas causadas por parasitas protozoários, nomeadamente a malária e a leishmaniose.

O trabalho experimental desenvolvido pela autora da dissertação e descrito neste capítulo enquadra-se num projeto desenvolvido pelo grupo de Síntese e Reatividade Orgânica do CCMAR, o projeto *PTDC/MAR-BIO/4132/2014*; “REVERSING THE PATHOPHYSIOLOGY OF PERKINSOSIS IN CLAMS HATCHERIES THROUGH THE USE OF ANALOGUES OF ARTEMISININ”.

3.1 Enquadramento da componente laboratorial

A perkinsose é uma doença causada pelo parasita protozoário *Perkinsus olseni*, sendo responsável pelas elevadas taxas de mortalidade presentes em diversas espécies de moluscos e bivalves. ^(14,21)

A par de diversas regiões da Europa e da Ásia, o Algarve constitui uma das regiões mais afetadas pela parasitemia por *Perkinsus olseni* em diversas espécies de bivalves, quer em mar aberto quer em regime de produção em aquacultura, o que gera um impacto socioeconómico negativo na região. Desta forma, é imperativo o desenvolvimento de novas metodologias e de novos agentes antiparasitários que permitam o controlo e a eliminação desta doença nos bivalves, cuja implementação seja ecológica e economicamente viável. ⁽¹⁴⁾

Perkinsus olseni apresenta um ancestral comum com outros parasitas protozoários, nomeadamente com *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii* e *Leishmania donovani*. Como estes parasitas têm um impacto mais direto na saúde pública que *Perkinsus olseni*, foram objeto de uma investigação mais extensa, estando disponíveis resultados de vários estudos realizados que fornecem informação sobre a sua morfologia e metabolismo e também sobre as estratégias quimioterapêuticas disponíveis para o seu controlo e eliminação. ⁽¹⁴⁾ Por apresentarem um ancestral comum, os parasitas referidos possuem algumas vias biossintéticas e organelos semelhantes, tal como descrito anteriormente. Assim, afigura-se legítima a investigação de determinadas classes terapêuticas utilizadas no tratamento das patologias associadas àqueles parasitas, para posterior otimização e aplicação no controlo e eliminação da Perkinsose.

O contrário afigura-se igualmente legítimo: a investigação de compostos antiprotozoa em *Perkinsus*, utilizando este organismo como modelo para ensaios em outros organismos filogeneticamente próximos, como os dinoflagelados (algumas espécies formam marés

vermelhas e interditam banhos e captura de bivalves e peixes nas zonas afetadas) e os apicomplexa, uma vez que apresentam um ancestral comum, bem como uma retenção das vias metabólicas características destes filos, o que permitiria a utilização de *Perkinsus* para a validação recíproca de previsões feitas em dinoflagelados ou apicomplexas. A utilização de *Perkinsus* como modelo preliminar de investigação apresenta diversas vantagens: a facilidade de cultura *in vitro*, a escalabilidade dos ensaios e o fato de a cultura não ser patogênica em mamíferos, nomeadamente no ser humano. ^(14,24)

Os derivados semissintéticos e os análogos sintéticos de artemisinina constituem classes bastante promissoras para o tratamento da malária, tendo fornecido vários fármacos correntemente em uso. De entre os peróxidos sintéticos, os 1,2,4-trioxolanos (ozonídeos) e 1,2,4,5-tetraoxanos têm assumido particular relevância. ⁽²⁴⁾

Recentemente, Araújo *et al.* (2013) publicaram resultados de um estudo que demonstra o efeito inibitório por parte de alguns peróxidos com atividade antiplasmódica, sintetizados pelo mesmo grupo de investigação, na proliferação de *Perkinsus olseni in vitro*. O mesmo estudo demonstrou a importância da ponte peroxídica para a atividade dos 1,2,4-trioxolanos preparados e avaliados, e a relevância da concentração intracelular de ferro como um cofator essencial na ativação dos peróxidos em *P. olseni*. Além disso, os resultados deste mesmo estudo permitiram inferir que o mecanismo de bioativação deste tipo de compostos em *P. olseni* apresenta semelhanças com o observado em *Plasmodium*. ⁽²⁴⁾ Deste modo, tendo em consideração os resultados obtidos, que demonstram que os 1,2,4-trioxolanos correspondem a derivados sintéticos promissores no controlo e eliminação da perkinsose, é proposto o desenvolvimento de novas moléculas, de forma a obter candidatos líder para posterior otimização estrutural.

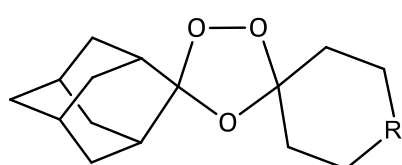
A par dos 1,2,4-trioxolanos, os 1,2,4,5-tetraoxanos apresentam uma atividade antiproliferativa de *Plasmodium*, pelo que constituem uma possível classe com atividade inibitória de *P. olseni*. Tal como os 1,2,4-trioxolanos, apresentam uma bioativação molecular dependente da concentração de Fe(II), exibindo contudo uma maior estabilidade química e metabólica, comparativamente com os seus análogos trioxolanos. Deste modo, é pertinente o desenvolvimento de 1,2,4,5-tetraoxanos com estruturas optimizadas, tendo em consideração os resultados e a informação recolhida através dos diversos estudos realizados nesta classe de peróxidos nas linhas parasitárias de *Plasmodium*. Tais peróxidos deveriam ser testados em culturas de *Perkinsus olseni*, de modo a avaliar a sua atividade e a determinar possíveis candidatos promissores para o tratamento da perkinsose.

O trabalho experimental realizado pela autora da presente dissertação focou-se no desenvolvimento de novos peróxidos sintéticos e semissintéticos, nomeadamente trioxolanos, tetraoxanos e derivados de artemisinina, para posteriormente avaliar o seu efeito antiproliferativo em *Perkinsus olseni*. Estes compostos podem também ser testados noutros parasitas responsáveis por doenças com impacto na saúde pública, como malária, leishmaniose e toxoplasmose. Deste modo, foi preparada uma pequena biblioteca de trioxolanos, tetraoxanos e derivados da artemisinina com diversidade estrutural, de modo a obter informações sobre a relação estrutura-atividade para posterior seleção e otimização de moléculas líder.

3.2 Aspetos relacionados com as estratégias de síntese e compostos preparados

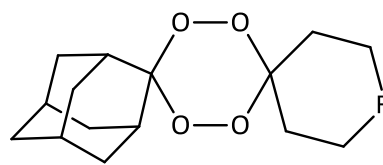
Na componente laboratorial pretendeu-se desenvolver novos peróxidos sintéticos (trioxolanos e tetraoxanos), com características estruturais semelhantes mas exibindo alguma diversidade estrutural ao nível dos substituintes do sistema ciclohexilo, e derivados da artemisinina, para posterior avaliação da sua atividade em modelos de *Perkinsus olseni*. Assim, procedeu-se à preparação de uma pequena biblioteca de compostos que podem constituir novas possibilidades para o desenvolvimento de estratégias inovadoras no controlo e eliminação da perkinsose, numa perspetiva de design racional de fármacos.

Como referido no Capítulo II, quer nos trioxolanos quer nos tetraoxanos, a presença de um grupo substituinte adamantilo nas posições R_1 e R_2 e de um grupo ciclohexilo nas posições R_3 e R_4 está associada a um aumento significativo da estabilidade das estruturas trioxolano e tetraoxano, bem como da sua atividade antimalárica. Deste modo, procedeu-se à transposição desta informação para o desenvolvimento de estruturas com núcleo trioxolano e tetraoxano desenvolvidas neste trabalho experimental. As estruturas base utilizadas na preparação de 1,2,4,5-tetraoxanos e 1,2,4-trioxolanos no decurso deste trabalho de investigação, tendo em conta a otimização e diversificação estrutural, estão representadas na Figura III-51.



1,2,4 - Trioxolano

CD8: R=CO; CD9: R=CHCOOCH₂CH₃



1,2,4,5 - Tetraoxano

CD1: R=CH₂; CD2: R= NH; CD4: R=CHCOOCH₂CH₃;
CD5: R=CHCOOH

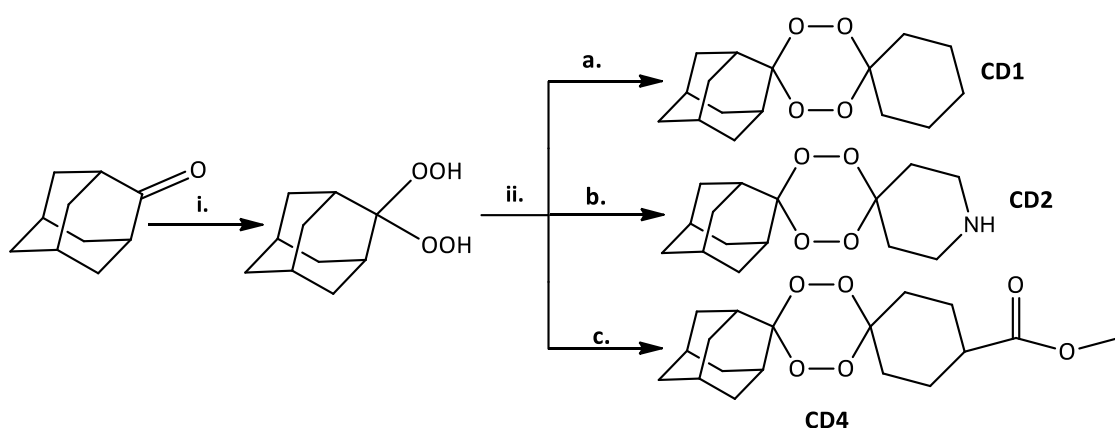
Figura III-51 - Representação das estruturas de 1,2,4 – trioxolanos e 1,2,4,5 – tetraoxanos preparados.

3.2.1 Síntese dos 1,2,4,5-tetraoxanos CD1, CD2 e CD4, compostos (1), (2) e (4)

As várias metodologias de preparação de tetraoxanos descritas na literatura, apresentadas no Capítulo II, requerem a formação de um *gem*-dihidroperóxido (DHP) intermediário obtido por oxidação do composto de partida. A posterior ciclização do DHP intermediário permite obter as diversas estruturas tetraoxano, cuja diversidade estrutural é dependente dos reagentes utilizados como compostos de partida e do composto que é adicionado ao meio reacional para acoplamento com o DHP.

A metodologia de síntese dos compostos CD1, CD2 e CD4 baseou-se na estratégia descrita por O'Neill *et al.*⁽¹²³⁾, a qual envolve dois passos de síntese: o primeiro passo consiste na oxidação do grupo carbonílico mediada por peróxido de hidrogénio (H₂O₂), utilizando um catalisador adequado; o passo de ciclização envolve o acoplamento do DHP intermediário com um derivado da ciclohexanona adicionado ao meio reacional.

Para obter os 1,2,4,5-tetraoxanos CD1, CD2 e CD4 fez-se reagir primeiramente adamantanona com peróxido de hidrogénio a 50% e ácido fórmico (HCO₂H), em acetonitrilo (CH₃CN), a 0°C. Ao dihidroperóxido formado foi adicionada uma mistura contendo ciclohexanona e ácido fluoroborónico (HBF₄) em diclorometano (DCM), formando-se o 1,2,4,5-tetraoxano CD1 (**1**), com um rendimento de 60%. Para obter o 1,2,4,5-tetraoxano CD2 (**2**) adicionou-se ao dihidroperóxido formado uma mistura contendo 4-piperidinona e HBF₄ em DCM, formando-se o composto CD2 com um rendimento de 44%. Por último, para a formação do 1,2,4,5-tetraoxano CD4, adicionou-se ao dihidroperóxido formado uma mistura contendo 4-oxociclohexanocarboxilato de etilo (cicloéster) e HBF₄ em DCM, obtendo-se o composto CD4 com um rendimento de 53%. Os esquemas de síntese dos 1,2,4,5 – tetraoxanos CD1, CD2 e CD4, e as respetivas estruturas moleculares estão representados na Figura III-52.



i. HCO₂H, CH₃CN, H₂O₂ 50%, 0° C; ii. a. Ciclohexanona; b. 4 - Piperidinona ; c. 4 - oxociclohexanocarboxilato de etilo; HBF₄, DCM, Temperatura ambiente

Figura III-52 - Esquema de síntese dos 1,2,4,5 – tetraoxanos CD1, CD2 e CD4, compostos (1), (2) e (4).

▪ **Proposta mecanística para a reação de síntese dos 1,2,4,5 – tetraoxanos preparados**

O mecanismo proposto para a síntese dos 1,2,4,5 - tetraoxanos CD1, CD2 e CD4 partindo da 2 - adamantanona, está representado na Figura III-53.

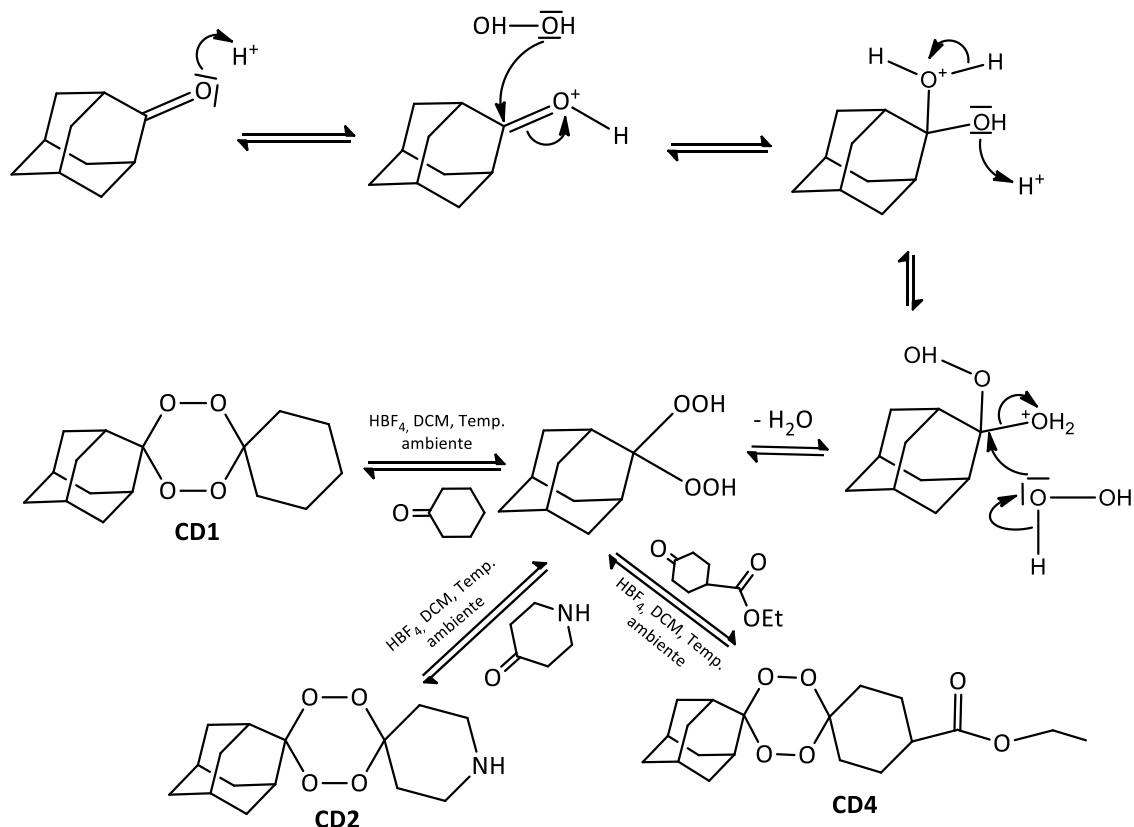


Figura III-53 - Proposta mecanística para a formação dos 1,2,4,5-tetraoxanos CD1 (1), CD2 (2) e CD4 (4) partindo da 2-adamantanona, com ciclohexanona, 4-piperidinona, e 4-oxociclohexanocarboxilato de etilo, respetivamente.

3.2.2 Síntese de desoxi-artesunato (CD3), composto (3)

Apesar da ausência de consenso acerca do mecanismo (ou mecanismos) que suportam a ação farmacológica da artemisinina e dos seus derivados, foi demonstrado através de diversos estudos que a ligação endoperóxido presente na estrutura 1,2,4-trioxano da artemisinina é essencial para a atividade antimalárica destes compostos, tendo sido classificada como o farmacóforo desta classe. A importância da ligação peróxido é demonstrada pela ausência de atividade antimalárica nas estruturas moleculares que resultam após substituição da ligação endoperóxido por uma ligação éter.⁽¹⁴⁰⁾

Estudos publicados sobre a avaliação da atividade antiproliferativa de desoxi-dihidroartemisinina (deoxi-DHA) e de desoxi-artesunato (desoxi-ATS) em parasitas do género *Leishmania* e *Plasmodium* reportam valores de IC_{50} muito elevados, muito superiores aos observados para os seus homólogos com estrutura peróxídica, o que evidencia a importância

da ligação peróxido na atividade desta classe terapêutica, relacionando esta estrutura como o provável farmacóforo. ^(87,141)

A síntese do desoxi-artesunato (deoxi-ATS) no âmbito da investigação aqui descrita foi realizada de forma a proporcionar uma prova de conceito em relação ao envolvimento da ligação peróxido na ação antiparasítica das moléculas desta classe terapêutica em *P. olsenii*.

A metodologia utilizada para proceder à conversão do ATS no desoxi-ATS envolveu uma redução catalisada por zinco em ácido acético glacial. Esta associação de reagentes atua como um agente redutor, sendo usada na eliminação reductiva de heteroátomos vicinais ou de heteroátomos α -carbonil substituídos, na clivagem de ligações entre dois heteroátomos, em reduções alílicas ou benzílicas e na ativação de grupos carbonilo ou de alcenos. ⁽¹⁴²⁾

Para obter o desoxi-ATS CD3 adicionou-se zinco em pó a uma porção de ATS em ácido acético glacial, sob agitação, a 60°C. A mistura reacional permaneceu sob agitação durante 23 horas. Após filtração sobre Celite[®] e purificação, obteve-se o desoxi-ATS CD3 (**3**), representado na Figura III-54, com um rendimento de 12%.

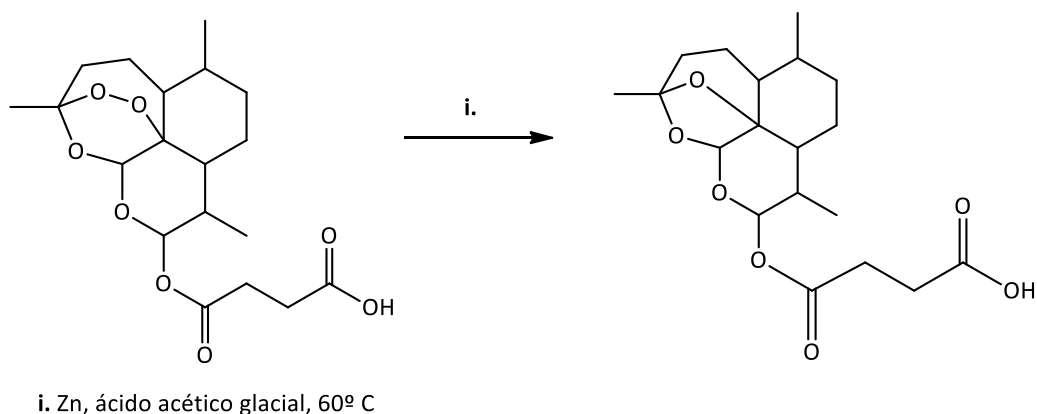


Figura III-54 - Esquema de síntese do desoxi-artesunato, composto (3).

▪ **Proposta mecanística da síntese do composto CD3**

O mecanismo proposto para a formação do desoxi-ATS, CD3, utilizando como reagente de partida o artesunato, encontra-se apresentado na Figura III-55.

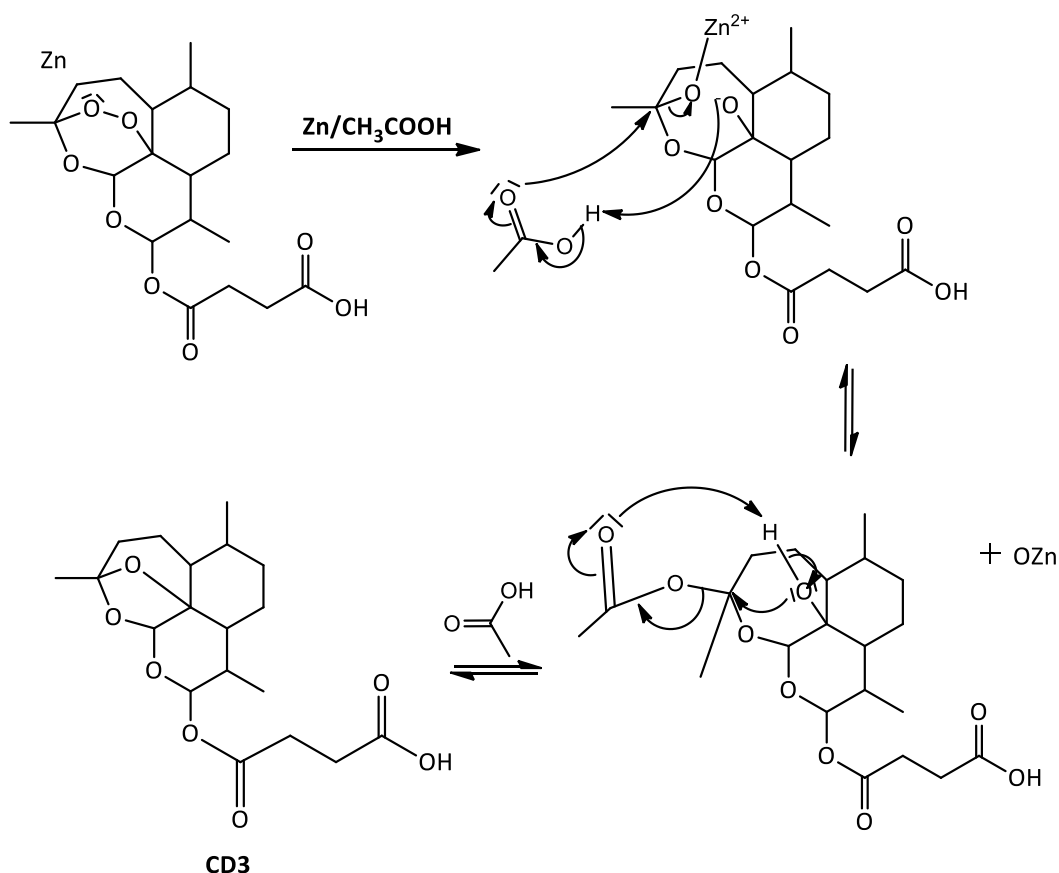
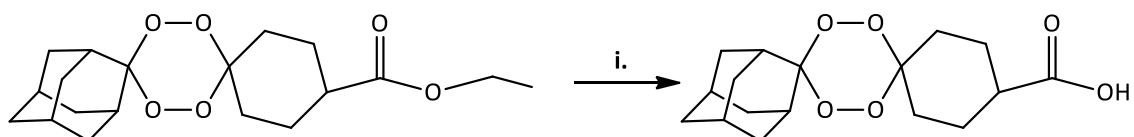


Figura III-55 - Proposta mecanística para a formação do desoxi-artesunato CD3, composto (3).

3.2.3 Síntese do 1,2,4,5 - tetraoxano CD5, composto (5)

De modo a obter o derivado 1,2,4,5-tetraoxano CD6, o qual incorpora uma ligação amida, formada por reação de butilamina com um grupo ácido ligado ao anel tetraoxano CD5, foi necessário preparar este composto a partir do composto CD4, por hidrólise da função éster.

O procedimento de hidrólise do éster CD4 envolveu a utilização hidróxido de potássio (KOH) e encontra-se representado na Figura III-56. A escolha de um processo de hidrólise envolvendo uma base forte baseou-se nas informações recolhidas através dos estudos realizados pelo grupo de investigação de Opsenica⁽¹⁴³⁾ que referem que os tetraoxanos são compostos estáveis em condições básicas ou ácidas.



i. KOH 3M, MeOH, 60° C

Figura III-56 - Esquema de síntese do 1,2,4,5-tetraoxano CD5, composto (5).

▪ **Proposta mecanística da reação de hidrólise do éster CD4, com consequente formação do ácido carboxílico CD5**

O mecanismo proposto para a síntese do ácido carboxílico 1,2,4,5-tetraoxano CD5, através da hidrólise do éster em CD4, está representado na Figura III-57.

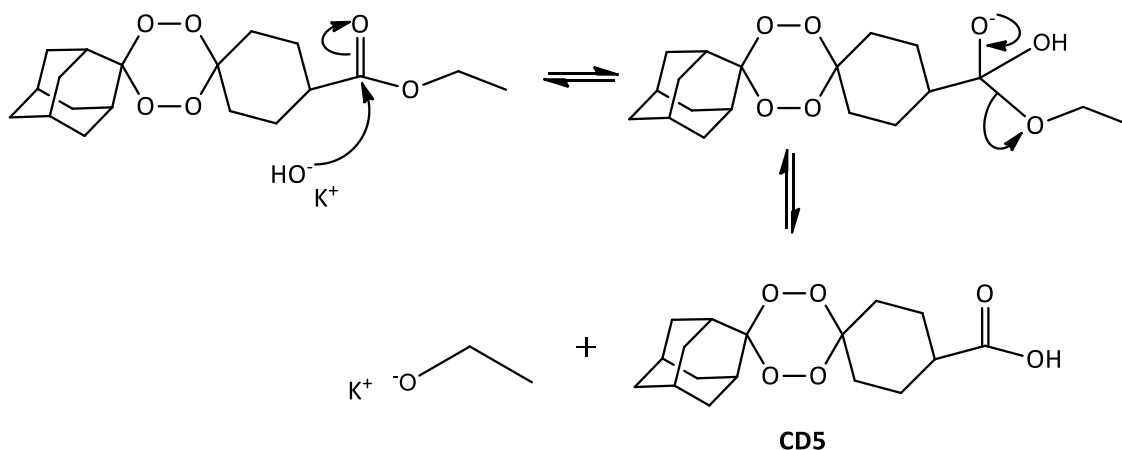


Figura III-57 - Proposta mecanística para a formação do 1,2,4,5-tetraoxano CD5 (5) através da hidrólise do grupo éster presente no 1,2,4,5-tetraoxano CD4.

3.2.4 Síntese do derivado 1,2,4,5-tetraoxano CD6, composto (6)

As funções amida desempenham um papel fundamental na composição dos sistemas biológicos. Por exemplo, é através de ligações amida que os aminoácidos se ligam entre si para formar as proteínas. Além disso, sendo as proteínas poliamidas, e desempenhando estas funções fundamentais nos organismos vivos, entre os quais o humano, não surpreende que as ligações amida surjam frequentemente em fármacos e candidatos a fármacos, de que são exemplo valsartan, atorvastatina, lisinopril e diltiazem.⁽¹⁴⁴⁾

A formação de ligações amida, vulgarmente denominada por acoplamento peptídico, resulta da reação de uma função ácido carboxílico com uma função amina. Contudo, tal processo não ocorre espontaneamente à temperatura ambiente, sendo necessária uma temperatura superior a 200 °C para que ocorra o acoplamento, com eliminação da água formada do meio reacional, uma vez que esta pode atuar como nucleófilo após o processo de

acoplamento peptídico, favorecendo a reação inversa. Para facilitar o processo, é comum utilizar estratégias que envolvem a ativação do ácido, ou derivados do ácido mais reativos, como o cloreto de ácido ou o anidrido. Devido á relevância do processo de acoplamento peptídico, foram desenvolvidos vários processos que visam a formação de ligações peptídicas através da ativação do grupo carboxílico, sendo as carbodiimidas os primeiros reagentes usados com esse objetivo e amplamente utilizadas em síntese de péptidos. ⁽¹⁴⁴⁾

Deste modo, no âmbito do trabalho aqui descrito foi efetuada uma ativação prévia da função ácido carboxílico presente no composto CD5, convertendo o grupo –OH do ácido carboxílico num bom grupo abandonante, antes da adição da amina ao meio reacional. ⁽¹⁴⁴⁾

De forma a proceder à formação do 1,2,4,5-tetraoxano CD6 utilizou-se a 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), cuja estrutura está representada na Figura III -58, que permite a ativação do grupo carboxílico presente no composto CD5 para que a reação com a butilamina proceda mais rapidamente. O EDC atua igualmente como um agente de desidratação, pois ao reagir com a água forma ureia. Deste modo, a água é removida à medida que se forma, deslocando o processo no sentido da formação do produto pretendido. ⁽¹⁴⁴⁾

Outro reagente utilizado no processo de preparação do 1,2,4,5 – tetraoxano CD6 foi o 1-hidroxi-1H-benzotriazol (HOBt). De modo a reduzir o nível de epimerização resultante do uso de carbodiimidas como agentes promotores do acopolamento peptídico, Koenig e Geigen introduziram na metodologia de preparação de amidas o HOBt. Estes investigadores demonstraram que a introdução deste composto, cuja estrutura está representada na Figura III -58, conduzia a rendimentos superiores, reduzia a reatividade do intermediário activado, e evitava a ocorrência de reacções secundárias, estando também associado a menores níveis de epimerização. ⁽¹⁴⁴⁾

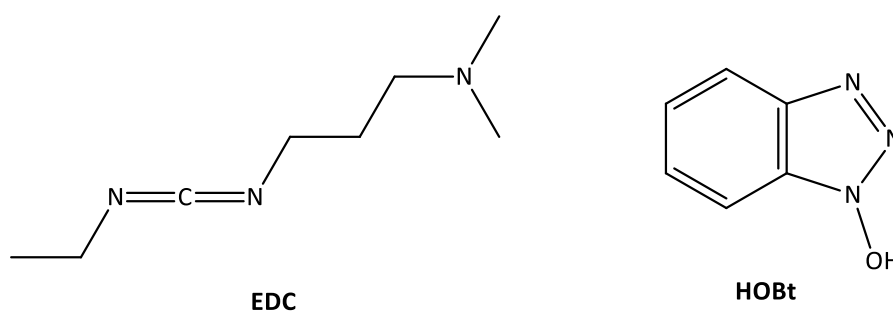
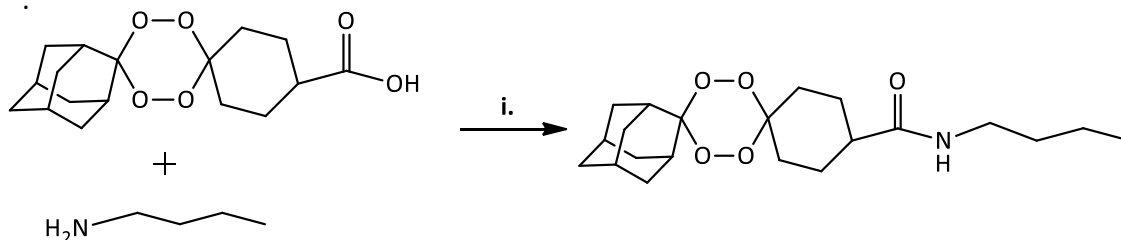


Figura III-58 - Representação da estrutura de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e de 1-hidroxi-1H-benzotriazol (HOBt) (*Adaptado de* ⁽¹⁴⁴⁾).

Na metodologia de formação de ligações amida por nós adotada para preparação do composto CD6 foi também utilizada N-metilmorfolina (N-MM), que atua como uma base orgânica, permitindo a remoção do próton do grupo carboxílico e facilitando a reação com o EDC.

Para obter o 1,2,4,5-tetraoxano CD6 fez-se reagir primeiramente o composto CD5, dissolvido em DCM, com HOBt, N-MM e, por último, EDC, durante cerca de 4 horas, à

temperatura ambiente. Esta primeira parte é essencial, pois permite a activação do grupo carboxílico presente no composto CD5. De seguida foi adicionada butilamina à mistura reacional. O 1,2,4,5-tetraoxano CD6 (**6**), representado na Figura III-59, foi recuperado com um rendimento de 53%.



i. EDC, HO-Bt, N-MM, DCM, Temperatura ambiente

Figura III-59 - Esquema de síntese do 1,2,4,5-tetraoxano CD6, composto (6).

▪ **Proposta mecanística da síntese do 1,2,4,5 – tetraoxano CD6 através do acoplamento peptídico do ácido carboxílico CD5 com a butilamina**

Os mecanismos propostos para as etapas envolvidas na preparação do 1,2,4,5-tetraoxano CD6, a partir de CD5 e de butilamina, encontram-se representadas na Figura III-60.

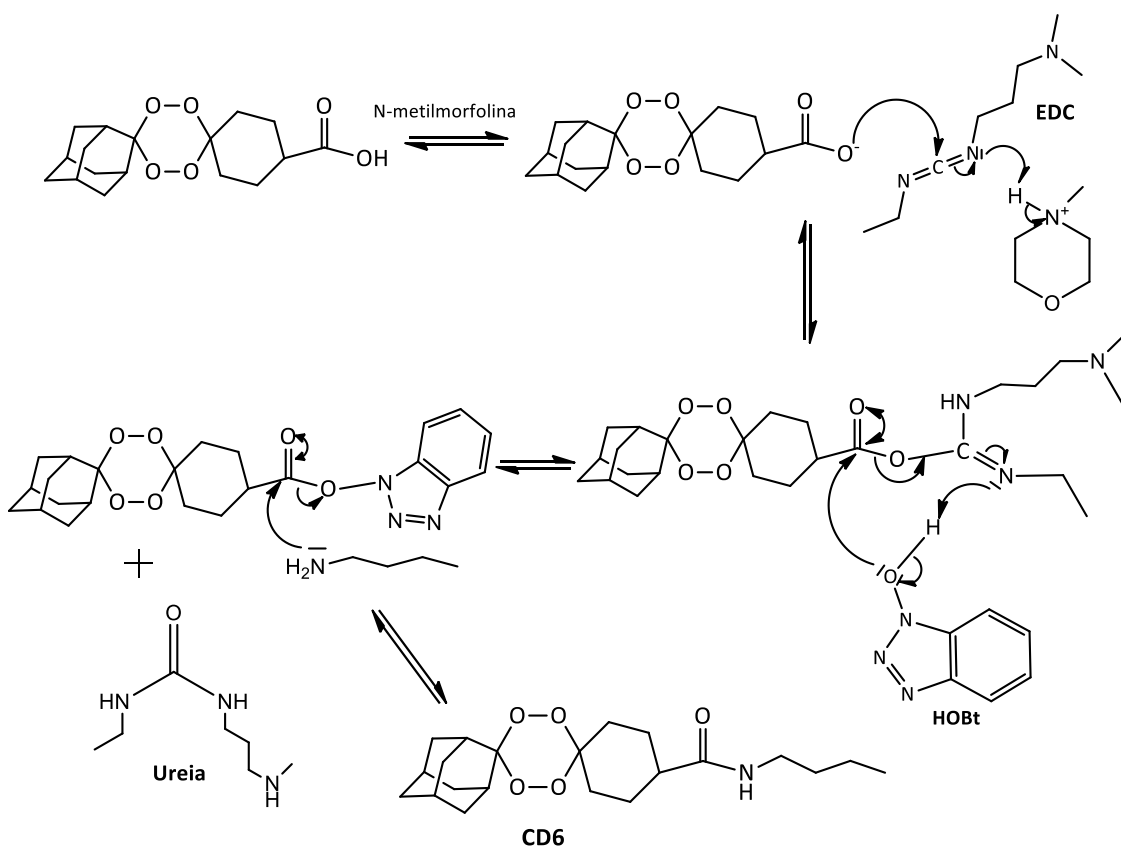


Figura III- 60 - Proposta mecanística para a formação do 1,2,4,5 – tetraoxano CD6 (6).

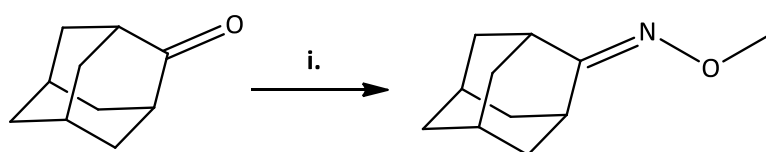
3.2.5 Síntese da adamantil-metil oxima CD7, composto (7)

A metodologia de síntese de 1,2,4 – trioxolanos envolveu um processo de ozonólise, acoplado *O*-metil oximas, preparadas a partir de cetonas cíclicas ou acíclicas, com cetonas, tal como descrito por Griesbaum *et al.* ⁽¹²¹⁾

Grande parte dos ozonídeos sintetizados apresentam na sua estrutura o grupo adamantilo, uma vez que estabiliza o ozonídeo, permitindo controlar o nível de exposição e, conseqüente, a reatividade da ponte peróxido. Assim, a *O*-metil oxima utilizada com uma maior frequência nos processos de ozonólise para a preparação de 1,2,4 - trioxolanos é a *O*-metil-2-adamantil oxima ou adamantil-metiloxima.

No presente trabalho experimental preparou-se a adamantil-metiloxima, que posteriormente foi utilizada como reagente de partida para a síntese dos compostos (8) e (9). A reação de conversão da 2-adamantanona na respetiva adamantil-metiloxima é fundamental para toda a via de síntese, uma vez que a metiloxima passa a ser o composto base para todas as reações de formação do núcleo trioxolano.

De modo a proceder à conversão da 2-adamantanona na respetiva adamantil-metiloxima CD7, adicionou-se a uma solução de 2 – adamantanona em metanol, piridina e cloridrato de metoxilamina, sequencialmente, à temperatura ambiente. Obteve-se a *O*-metiloxima da adamantanona CD7 (**7**), representada na Figura III-61, com um rendimento de 96%.



i. Piridina, MeONH₂, MeOH

Figura III-61 - Esquema de síntese da adamantil-metiloxima CD7, composto (7).

▪ Proposta mecanística da síntese da adamantil-metiloxima CD7 a partir da 2 - adamantanona

O mecanismo proposto para a formação da adamantil-metiloxima CD7 encontra-se apresentado na Figura III-62.

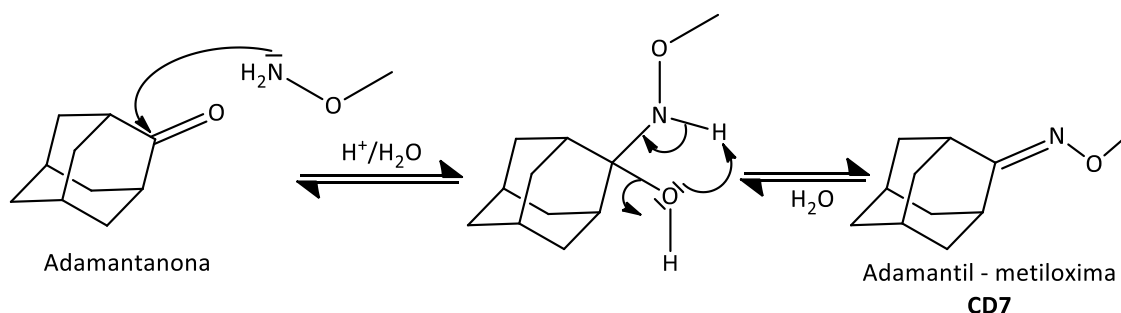


Figura III-62 - Proposta mecanística para a formação da adamantil-metiloxima CD7 (7).

3.2.6 Síntese dos 1, 2, 4 – trioxolanos CD8 e CD9, compostos (8) e (9)

Tal como referido no Capítulo II, a síntese de compostos com um núcleo 1,2,4 – trioxolano segue, normalmente, o procedimento de ozonólise descrito por *Griesbaum et al* (1997).⁽¹²¹⁾ Griesbaum e o seu grupo de investigação desenvolveram uma metodologia de preparação de ozonídeos tetrasubstituídos, a qual envolve o acoplamento por ozonólise de *O* – metil – oximas com cetonas cíclicas ou acíclicas, tendo esta estratégia de síntese sido adaptada à preparação dos trioxolanos CD8 e CD9 do presente trabalho experimental.

A *O*-metil oxima utilizada nos procedimentos de ozonólise associados aos compostos CD8 e CD9 corresponde à *O*-metiloxima da adamantanona (adamantil-metiloxima) igualmente preparada na componente laboratorial, correspondendo ao composto referenciado como CD7.

Para obter o 1,2,4-trioxolano CD8 submeteu-se uma solução contendo adamantil-metiloxima e 1,4-ciclohexadiona numa mistura de pentano/diclorometano (1:1) a um fluxo de ozono, durante 1 hora e 30 minutos, a 0°C. Formou-se o 1,2,4-trioxolano CD8 (**8**), representado na Figura III-63, que se recuperou com um rendimento de 40% após purificação por cromatografia em coluna de sílica.

A metodologia seguida na preparação de CD8 foi aplicada à preparação do 1,2,4-trioxolano CD9, partindo de adamantil-metiloxima e 4 - oxociclohexancarboxilato de etilo numa mistura de pentano/diclorometano (1:1), submetida a um fluxo de ozono durante 4 horas, a 0°C. Após purificação, recuperou-se o 1,2,4-trioxolano CD9 (**9**), representado na Figura III-63, com um rendimento de 46%.

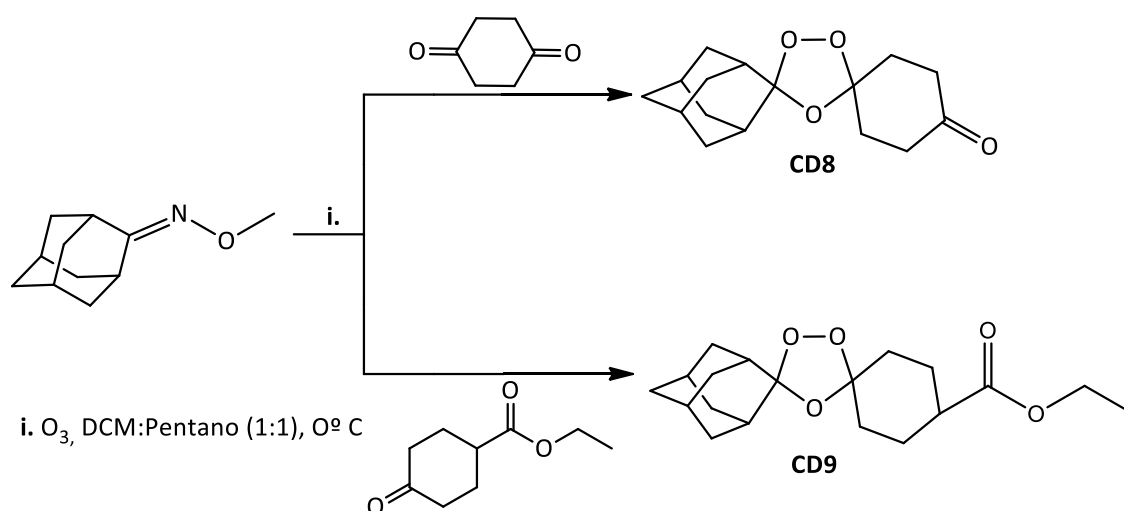


Figura III-63: Esquema de síntese dos 1,2,4 – trioxolanos CD8 e CD9, compostos (8) e (9).

▪ **Proposta mecanística da síntese dos 1,2,4 – trioxolanos CD8 e CD9**

O mecanismo proposto para a formação dos 1,2,4 – trioxolanos CD8 e CD9, por ozonólise, partindo da adamantil-metiloxima CD7, encontra-se apresentado na Figura III-64.

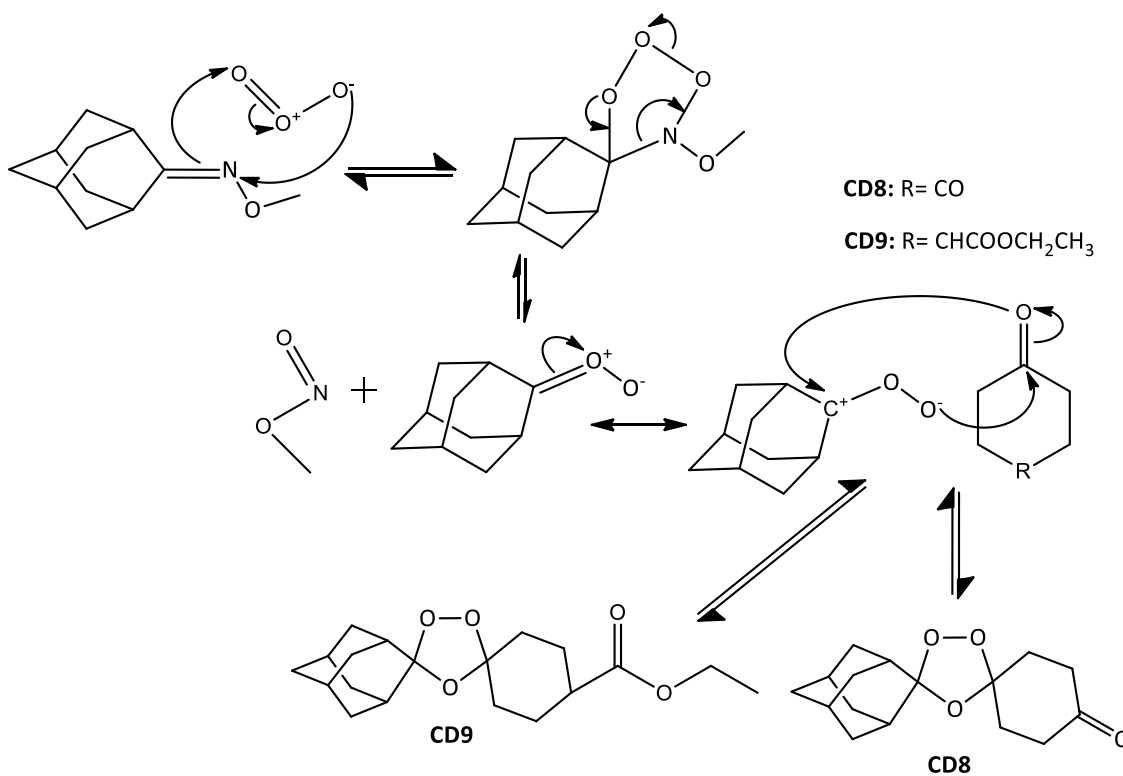


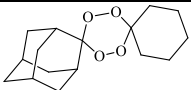
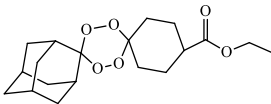
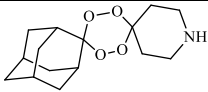
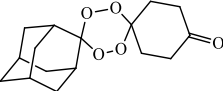
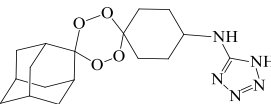
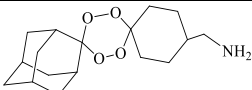
Figura III-64 - Proposta mecanística para a formação dos 1,2,4 – trioxolanos CD8 e CD9, partindo da adamantil-metiloxima CD7.

3.3 Resultados e discussão

Alguns dos compostos sintetizados pela autora da presente dissertação foram submetidos a ensaios *in vitro* em culturas de *Perkinsus olseni*, nomeadamente os compostos CD1 (LC137), CD2 (LC139) e CD4 (LC138). Foram também testados os tetraoxanos LC140, LC163 e LC165. As estruturas moleculares dos compostos testados em *Perkinsus olseni*, bem como os respetivos valores de IC₅₀, encontram-se apresentados Tabela III – 1.

De salientar que a avaliação da capacidade antiproliferativa dos tetraoxanos submetidos aos ensaios *in vitro* em *Perkinsus olseni* foi efetuada no Instituto Calouste Gulbenkian, pelo Grupo de Genómica Computacional, parceiro no projeto *PTDC/MAR-BIO/4132/2014*. Este projeto tem como objetivo a avaliação do potencial quimioterapêutico de trioxolanos e de tetraoxanos no tratamento da perkinsose.

Tabela III-1: Atividade anti-proliferativa dos compostos LC137/CD1, LC138/CD4, LC139/CD2, LC140, LC163 e LC165 em culturas de *Perkinsus olseni*.

Compostos	Estruturas moleculares	IC ₅₀ (μM)
LC137/CD1		58,54
LC138/CD4		48,70
LC139/CD2		2412,00
LC140		23,69
LC163		100-250
LC165		184,00

O valor de IC₅₀ corresponde à concentração necessária do composto testado para provocar uma inibição em 50% do crescimento celular. Deste modo, indica a capacidade antiproliferativa provocada por um dado composto em teste. Quanto menor o seu valor, maior será a capacidade de provocar um efeito antiproliferativo da cultura em ensaio, ou seja, maior será a sua potência de inibição.

Os valores de IC₅₀ para os compostos sintetizados pela autora da presente monografia são: 58,54; 48,70; e 2412,00 para o LC137/CD1, LC138/CD4 e LC139/CD2, respetivamente.

Excetuando o composto LC139/CD2, todos os compostos submetidos para avaliação da capacidade antiproliferativa em *Perkinsus olseni* apresentaram um efeito inibitório a concentrações na gama micromolar, como é visível na Tabela III-1, ou seja, dos 6 compostos apresentados, 5 têm a capacidade de inibir a proliferação de *Perkinsus* a concentrações micromolares. Os resultados indicam também que o composto LC140 é o mais ativo *in vitro*, mas os compostos LC137/CD1, LC138/CD4 apresentam valores de IC₅₀ na mesma ordem de grandeza. Assim, estes 3 compostos apresentaram resultados promissores, indicando maior potência de inibição da proliferação de *P. olseni*, pelo que foram seleccionados para testes posteriores ao nível de análise transcriptómica e do mecanismo de acumulação e ação.

Encontram-se em progresso mais estudos no sentido de avaliar a atividade antiproliferativa dos outros compostos propostos neste projeto científico, nomeadamente, a análise de trioxolanos em *P. olseni*.

Os resultados obtidos através destes estudos em *P. olseni* correspondem a resultados preliminares da capacidade inibitória da proliferação de tetraoxanos, pelo que é necessário a

realização de mais estudos, que envolvam a análise de um maior número de moléculas com uma maior diversidade estrutural. O objetivo da realização destes ensaios é, essencialmente, a recolha de informação sobre as estruturas mais promissoras para desenvolvimento como agentes quimioterapêuticos para o combate da perkinsose, mas também para outras doenças que apresentem o mesmo ancestral em comum, como a malária e a leishmaniose.

A informação recolhida neste projeto poderá contribuir para a otimização estrutural que conduza à descoberta de moléculas mais eficazes, menos tóxicas, e mais seguras, com aplicabilidade no tratamento da perkinsose, e no tratamento de outras doenças parasitárias.

IV. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Neste capítulo será descrito todo o trabalho experimental efetuado durante o projeto de investigação laboratorial.

De um modo geral, os compostos de partida foram utilizados tal como comercialmente disponibilizados. O seguimento e o controlo do progresso das reações associadas à síntese de cada um dos compostos foram realizados com recurso a cromatografia em camada fina (*do inglês*: TLC – Thin Layer Chromatography), utilizando placas de sílica gel e um sistema eluente cuja composição foi previamente ajustada à reação em causa.

A caracterização dos compostos sintetizados foi efectuada através das seguintes técnicas: ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria de massa e ponto de fusão.

4.1 Equipamento

Os dados de análises por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de protão (^1H -RMN) e espectrometria de massa foram disponibilizados pelo serviço de análises do laboratório REQUIMTE, alocado no Departamento de Química e Bioquímica da Universidade Nova de Lisboa.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de protão (^1H -RMN) foram obtidos para os compostos em solução, utilizando como solventes clorofórmio ou metanol deuterados. Os valores de desvio químico, δH , encontram-se de acordo com a seguinte norma: desvio químico (δ em ppm, relativamente ao TMS); multiplicidade do sinal, apresentando-se como s (singuleto), d (duplete), dd (duplo de dupletos), t (tripleto), ou m (multiplete).

As análises por espectrometria de massa (EM) foram realizadas num espectrómetro Micromass LCT Mass Spectrometer.

Os pontos de fusão, não corrigidos, foram obtidos num aparelho “Melting Point Apparatus SMP3, da Bibby Stuart Scientific”.

O software ChemDraw® V12.0.2.1076 foi utilizado para desenhar as estruturas químicas apresentadas, associadas às diversas reações efetuadas.

4.2 Procedimentos experimentais realizados ao longo da componente laboratorial

4.2.1 Síntese do 1,2,4,5-tetraoxano CD1, composto (1)

A uma solução de adamantanona (3,095 g, 20,60 mmol) em acetonitrilo (22 mL), arrefecida até aos 0°C , sob agitação, adicionou-se muito lentamente ácido fórmico (14,8 mL, 392,27 mmol) e peróxido de hidrogénio (50%, 8 mL, 277,63 mmol). A mistura permaneceu sob

agitação em atmosfera de azoto durante aproximadamente 22 horas, deixando-se atingir a temperatura ambiente. A reação foi controlada por TLC, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (2:8). Evaporou-se a mistura reacional até à secura, no evaporador rotativo, obtendo-se o correspondente *gem*-dihidroperóxido. Esta mistura (A) foi dissolvida em diclorometano (20 mL). Dissolveu-se ciclohexanona (2,12 ml, 20,45 mmol) em diclorometano (20 mL), e a solução resultante foi arrefecida a 0°C. Adicionou-se a esta solução HBF₄ (0,5 mL, 3,64 mmol) e deixou-se a mistura a reagir durante aproximadamente 15 min (balão B). A mistura (A) foi adicionada lentamente ao balão B. A mistura reacional resultante permaneceu sob agitação, numa atmosfera de azoto, durante cerca de 28 horas. A reação foi controlada por TLC, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (2:8). Evaporou-se o solvente, e recorreu-se a uma cromatografia em coluna de sílica gel, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (2:8) para separar os componentes orgânicos. O produto puro foi recuperado na forma de sólido branco (3,441 g, 12,27 mmol, 60 % de rendimento). Ponto de fusão: 165-167°C. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.28 (d, 4H), 2.06 (dd, 16H), 2.56 (s, 4H) ppm; MS (MALDI-TOF), *m/z* calculado para C₁₆H₂₄O₄, 280,36; encontrado, 319,25 [M+K]⁺.

4.2.2 Síntese do 1,2,4,5 - tetraoxano CD₂, composto (2)

A uma solução de adamantanona (2,947 g, 19,62 mmol) em acetonitrilo (33 mL), arrefecida até aos 0°C, sob agitação, adicionou-se muito lentamente ácido fórmico (22 mL, 585,75 mmol) e peróxido de hidrogénio (50%, 12 mL, 416,23 mmol). A mistura permaneceu sob agitação em atmosfera de azoto durante aproximadamente 22 horas, deixando-se atingir a temperatura ambiente. A reação foi controlada por TLC, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (3:7). Evaporou-se a mistura reacional até à secura, no evaporador rotativo, obtendo-se o correspondente *gem*-dihidroperóxido. Esta mistura (A) foi dissolvida em diclorometano (10 mL). Dissolveu-se 4 - piperidinona (3,06 g, 19,91 mmol) em diclorometano (10 mL), e a solução resultante foi arrefecida até aos 0°C. Adicionou-se a esta solução HBF₄ (2,25 mL, 16,40 mmol), e deixou-se a reagir durante aproximadamente 15 min (balão B). A mistura (A) foi adicionada lentamente ao balão B. A mistura reacional resultante permaneceu sob agitação, numa atmosfera de azoto, durante cerca de 48 horas. A reação foi controlada por TLC, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (3:7). Evaporou-se o solvente, e recorreu-se a uma cromatografia em coluna de sílica gel, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (2:8) para separar os componentes orgânicos. O produto puro foi recuperado na forma de sólido amarelo (2,445 g, 8,70 mmol 44% de rendimento). Ponto de fusão: 180-181°C. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.25 (s, 1H), 1.80 (d, 6H), 2.02 (dd, 14H), 3.08 (t, 2H) ppm; MS (MALDI-TOF), *m/z* calculado para C₁₆H₂₃NO₄, 281,16; encontrado 282.29 [M]⁺.

4.2.3 Síntese do desoxi-artesunato (CD3), composto (3)

A uma porção de artesunato (5,003 g, 13,01 mmol) em ácido acético glacial (40 ml), sob agitação, adicionou-se zinco em pó (5,932 g, 90,73 mmol). A mistura resultante permaneceu sob agitação *overnight*, à temperatura de 60° C. A reação foi controlada por TLC, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (3:7). A mistura permaneceu em reação durante 23H. A solução obtida foi posteriormente filtrada sobre Celite® e lavada com diclorometano e acetato de etilo. Recorreu-se a uma cromatografia em coluna de sílica gel, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (1:9) para separar os componentes orgânicos. O produto puro foi recuperado na forma de um óleo amarelo. (0,5580 g, 1,54 mmol, 12% de rendimento). MS (EI), *m/z* Calculado para C₁₉H₂₈O₇, 368,42; encontrado, 367,1 [M]⁺.

4.2.4 Síntese do 1,2,4,5 - tetraoxano CD4, composto (4)

A uma solução de adamantanona (6,038 g, 40,19 mmol) em acetonitrilo (76,2 mL), arrefecida até aos 0° C, sob agitação, adicionou-se muito lentamente ácido fórmico (45,3 mL, 1,20 mol) e peróxido de hidrogénio (50%, 24,50 mL, 849,8 mmol). A mistura permaneceu sob agitação durante aproximadamente 23 horas, deixando-se atingir a temperatura ambiente. A reação foi controlada por TLC, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (3:7). Evaporou-se a mistura reacional até à *secura*, no evaporador rotativo, obtendo-se o correspondente *gem*-dihidroperóxido, mais concentrado. Esta mistura (A) foi dissolvida em diclorometano (23 mL). Dissolveu-se 4-oxociclohexanocarboxilato de etilo (6,40 mL, 39,91 mmol) em diclorometano (70 mL), e a solução resultante foi arrefecida a 0°C. Adicionou-se a esta solução HBF₄ (0,6 mL, 4,37 mmol), e deixou-se a reagir durante aproximadamente 15 min (balão B). A mistura (A) foi adicionada lentamente ao balão B. A mistura reacional resultante permaneceu sob agitação, numa atmosfera de azoto, durante cerca de 72 horas. A reação foi controlada por TLC, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (3:7). Evaporou-se o solvente, e recorreu-se a uma cromatografia em coluna de sílica gel, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (2:8) para separar os componentes orgânicos. O produto puro foi recuperado na forma de sólido branco (7,461 g, 21,18 mmol, 53% de rendimento). Ponto de fusão: 74-75°C. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.26 (d, 3H), 1.72-2.10 (m, 21H), 3.06 (t, 2H), 4.47 (dd, 2H) ppm; MS (MALDI-TOF), *m/z* calculado para C₁₉H₂₈O₆, 352,19; encontrado, 393,47 [M+K]⁺.

4.2.5 Síntese do ácido carboxílico 1,2,4,5 - tetraoxano CD5, através da hidrólise do éster CD4, composto (5)

A uma solução do composto CD4 (2,000 g, 5,68 mmol) em metanol (40 mL), adicionou-se, sob agitação, uma solução aquosa de hidróxido de potássio (3M, 6,86 mL) previamente

preparada. A mistura resultante permaneceu sob agitação, num banho de parafina e em refluxo a 60° C, durante 24 horas. A reação foi controlada por TLC, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (3:7). Posteriormente, a solução arrefeceu até à temperatura ambiente, e foi concentrada sob pressão reduzida. O produto em bruto foi retirado em água (50 ml) e lavado com diclorometano (30 ml). A fase aquosa foi acidificada até pH 1 com ácido clorídrico concentrado (HCl), e posteriormente extraída com diclorometano (3 x 40 ml). As fases orgânicas foram agrupadas e lavadas com uma solução aquosa de NaCl (cloreto de sódio) concentrada (30 ml). Por fim, secou-se a fase orgânica final com Na₂SO₄, filtrou-se e concentrou-se a solução resultante sob pressão reduzida, obtendo-se o composto puro na forma de um sólido branco (1,421 g, 4,37 mmol, 77 % de rendimento). Ponto de fusão: 179-182 °C. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.18-1.85 (m, 20H), 2.29-2.30 (m, 1H), 2.90 (brs, 1H), 3.17 (brs, 1H) ppm; MS (EI), *m/z* calculado para C₁₇H₂₄O₆, 324,96; encontrado, 358,31 [M+Cl]⁻.

4.2.6 Síntese do 1,2,4,5-tetraoxano CD6, composto (6), a partir do ácido carboxílico CD5.

A uma solução do composto CD5 (1,134 g, 3,49 mmol) em diclorometano (20 mL) adicionou-se, sob agitação e a 0° C, HO-Bt (0,700 g, 5,25 mmol), N-MM (0,557 mL, 0,531 g, 5,25 mmol), e EDC.HCl (1,006g, 5,25 mmol), sequencialmente. A mistura reacional permaneceu sob agitação em atmosfera de azoto, durante 4 horas, à temperatura ambiente. A reação foi controlada por TLC, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (6:4). Posteriormente adicionou-se à mistura reacional butilamina (0,528 mL, 0,389 g, 5,25 mmol). A mistura reacional resultante permaneceu sob agitação, em atmosfera de azoto, durante 12 horas. Lavou-se a mistura final com água (50 mL), e retirou-se o produto em bruto através de uma extração com éter etílico (3 x 30 mL). As fases orgânicas foram combinadas, e secas sobre Na₂SO₄. A fase orgânica final foi filtrada e o solvente foi em seguida evaporado, usando um evaporador rotativo, sob pressão reduzida. Recorreu-se a uma cromatografia em coluna de sílica gel, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (2:8), para separar os componentes orgânicos. O produto puro foi recuperado na forma de um óleo amarelo claro (0,7014 g, 1,85 mmol, 53% de rendimento). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.18-1.22 (m, 3H), 1.66 (s, 4H), 1.65-1.76 (m, 6H), 1.77-1.91 (m, 10H), 2.02-2.06 (m, 6H), 2.44 (m, 2H), 2.99 (t, 2H) ppm; MS (EI), *m/z* calculado para C₂₁H₃₃NO₅, 379,24; encontrado, 413,26 [M+Cl]⁻.

4.2.7 Síntese da O-metil oxima da adamantanona CD7, composto (7)

A uma solução de 2-adamantanona (14,00 g, 93,2 mmol) em metanol (40 mL) adicionou-se piridina (13,62 mL, 13,32 g, 168,4 mmol) e cloridrato de metoxilamina (10 g, 119,7 mmol). A mistura reacional permaneceu sob agitação à temperatura ambiente em atmosfera de azoto, durante 48 horas. A solução final foi concentrada, e seguidamente diluída com diclorometano (30 ml). Separou-se a fase orgânica da fase aquosa, extraindo-se novamente a fase aquosa com diclorometano (30 ml). As fases orgânicas combinadas foram lavadas com ácido clorídrico concentrado (2 M; 2 x 30 ml) e de seguida com uma solução aquosa saturada de cloreto de sódio (NaCl). Secou-se a fase orgânica final com MgSO₄, filtrou-

se e evaporou-se o solvente sob pressão reduzida, tendo-se obtido a respectiva *O*-metil-2-adamantanona oxima, na forma de um sólido incolor (16,071 g, 89,12 mmol, 96 % de rendimento). Ponto de fusão: 69-70°C. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.78-1.97 (12H, m), 2.53 (1H, s), 3.45 (1H, s), 3.81 (3H, s) ppm; MS (MALDI-TOF), *m/z* calculado para C₁₁H₁₇NO, 179,13; encontrado, 180,02 [M]⁺.

4.2.8 Procedimento geral de síntese de 1, 2, 4-trioxolanos; síntese dos compostos CD8 e CD9

Os 1, 2, 4-trioxolanos CD8 e CD9 foram preparados através do acoplamento por ozonólise da *O*-metil-2-adamantanona oxima (CD7), anteriormente preparada, com um derivado da ciclohexanona.

O ozono, produzido por um gerador de ozono Sander Labor-Ozonizator 301.7 (0,5 L/min O₂, 140 V), atravessou uma solução de diclorometano a – 78° C, corando uma solução contendo a *O*-metil-2-adamantanona oxima e um derivado da ciclohexanona, numa mistura de pentano e diclorometano (1:1), a 0° C, que se encontrava sob agitação. Após o término da reação, a solução foi purgada com azoto durante 5 minutos. Evaporou-se o solvente sob pressão reduzida, à temperatura ambiente, e seguidamente purificou-se o produto em bruto, através de uma cromatografia em coluna de sílica gel, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano.

4.2.8.1 Síntese do 1, 2, 4-trioxolano CD8, composto (8)

Uma solução de *O*-metil-2-adamantanona oxima (composto CD7) (5,121 g, 28,59 mmol) e de 1, 4-ciclohexadiona (4,500 g, 40,13 mmol), numa mistura de pentano e diclorometano (1:1), foi tratada com ozono, de acordo com as condições de reação anteriormente descritas, durante 1 hora e 30 minutos. A reação foi controlada por TLC, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (2:8). O produto em bruto foi purificado através de uma cromatografia em coluna de sílica gel, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (1:9). Obteve-se o produto CD8 na forma de um sólido incolor. (4,47 g, 16,05 mmol, 40 % de rendimento) Ponto de fusão: 127-128°C; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.69-2.02 (m, 14H), 2.14 (t, 4H), 2.51 (t, 4H) ppm; ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): 25.9, 26.31, 31.09, 32.59, 34.25, 35.70, 36.18, 37.35, 106.46, 111.95, 208.90 ppm; MS (EI), *m/z* Calculado para C₁₆H₂₂O₄ 278,34; Encontrado 278,9 [M]⁺.

4.2.8.2 Síntese do 1, 2, 4-trioxolano CD9, composto (9)

Uma solução de *O*-metil-2-adamantanona oxima (composto CD7) (13,086 g, 73,05 mmol) e de 4 - oxociclohexanocarboxilato de etilo (10,00 g, 58,75 mmol), numa mistura de pentano e diclorometano (1:1), foi tratada com ozono, de acordo com as condições de reação anteriormente descritas, durante 4 horas. A reação foi controlada por TLC, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (1:9). O produto em bruto foi purificado através de uma cromatografia em coluna de sílica gel, usando como eluente uma mistura de

acetato de etilo e hexano (1:9). Obteve-se o produto CD9 na forma de um óleo incolor (9,086 g, 27,03 mmol, 46 % de rendimento). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 1.26 (3H, t), 1.70-1.76 (11H, m), 1.92-2.03 (12H, m), 2.33 (1H, m), 4.15 (2H, dd) ppm; MS (MALDI-TOF), m/z calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_5$, 336,19; encontrado 337,34 $[\text{M}]^+$.

V. CONCLUSÃO

Atualmente, a aquacultura constitui uma atividade piscícola com grande potencial de desenvolvimento, sendo crucial para o suprimento das necessidades alimentares da população em crescimento e para satisfazer o aumento da procura por espécies piscícolas.

Contudo, esta atividade piscícola é condicionada por diversos problemas, entre os quais o desenvolvimento de doenças nas populações piscícolas em exploração, o que conduz a um impacto socioeconómico significativo. Entre as doenças observadas, a perkinsose apresenta particular relevância, uma vez que conduz a elevadas taxas de mortalidade em explorações de moluscos e bivalves em aquacultura, nomeadamente nas explorações localizadas no Algarve, ao largo da ria de Alvor e da ria Formosa, e também noutras locais das costas Europeia, Australiana, Asiática e Americana. Apesar dos esforços realizados para controlar ou mesmo eliminar a doença, as medidas profiláticas revelaram-se de difícil implementação e as estratégias quimioterapêuticas até agora implementadas não têm apresentado a eficácia requerida, além de não se ter ainda desenvolvido uma alternativa que possua um custo baixo e que seja facilmente praticável para a eliminação e controlo da perkinsose. Deste modo, é imperativo o desenvolvimento de alternativas quimioterapêuticas que se demonstrem eficazes no controlo e eliminação desta doença, uma vez que esta conduz a consequências bastante significativas numa atividade de grande importância para a população humana, não só por ser responsável pela produção de uma elevada quantidade de alimento para suprir as necessidades alimentares mas também por ser responsável pela produção de empregos diretos e indiretos para um grande número de pessoas, apresentando um impacto muito significativo na economia.

A perkinsose é uma doença infecciosa causada pelo parasita protozoário *Perkinsus olseni*. Este parasita protozoário apresenta um ancestral comum com outros parasitas mais estudados, como *Plasmodium falciparum*, o agente etiológico responsável pela malária; *Leishmania donovani*, responsável pela leishmaniose visceral; e *Toxoplasma gondii*, responsável pela toxoplasmose. Assim, estes parasitas apresentam algumas vias metabólicas e alguns organelos (como o apicoplasto) em comum, o que permite a transposição da informação recolhida através do estudo num determinado parasita para os outros, tornando mais simples e mais rápidos os processos de desenvolvimento de soluções, pois são possíveis algumas analogias nos pressupostos.

As estratégias quimioterapêuticas até agora utilizadas para o controlo e eliminação de *Perkinsus* envolvem o uso de herbicidas, de compostos quelantes de ferro e de compostos antimaláricos, os quais englobam a artemisinina e os seus derivados sintéticos e semissintéticos e também antagonistas dos folatos.

Tal como referido ao longo desta dissertação, alguns derivados semissintéticos e análogos sintéticos de artemisinina apresentaram resultados muito promissores para o tratamento da perkinsose. Recentemente, alguns trioxolanos e tetraoxanos demonstraram um efeito inibitório da proliferação em culturas de *Perkinsus olseni*, validando o químiotipo peroxídico como ferramenta no desenvolvimento de novas estratégias para o controlo ou eliminação deste parasita.

A estrutura endoperóxido característica da artemisinina e dos seus derivados sintéticos e semissintéticos apresenta especial relevância para o efeito farmacológico desta classe de fármacos, sendo por isso considerada como o farmacóforo destas moléculas. Tal como em *Plasmodium*, a concentração intracelular de ferro constitui um fator crucial para a bioativação molecular, e conseqüentemente para a eficácia desta classe terapêutica em *Perkinsus olseni*.

Foi desenvolvida uma componente experimental pela autora da presente dissertação, na qual foi preparada uma pequena biblioteca de derivados semissintéticos e de análogos sintéticos da artemisinina, nos quais se encontram alguns trioxolanos e tetraoxanos. De entre os compostos sintetizados, os já avaliados apresentam valores de IC₅₀ a concentrações micromolares baixas. Estes resultados correspondem a uma avaliação preliminar da capacidade antiproliferativa desta classe de compostos em *P. olseni*, pelo que é necessário o desenvolvimento de um maior número de estudos que envolvam a preparação de moléculas com uma maior diversidade estrutural, de forma a obter informação adequada a nível de relação estrutura-atividade, para prosseguir para o desenvolvimento de novas moléculas que sejam promissoras para o tratamento desta patologia dos bivalves, usando a abordagem do *design* racional de fármacos.

A par da necessidade de novas moléculas que se apresentem efectivas no controlo e eliminação de *P. olseni*, é necessário adequar as características destes compostos a nível da solubilidade em água e da biodisponibilidade, e garantir que o tempo de ação é compatível com o tempo de filtração dos bivalves, para que esta classe de compostos constitua uma alternativa quimioterapêutica praticável e efetiva em aquacultura.

Tendo em conta os resultados promissores que se têm observado na artemisinina e nos seus derivados sintéticos e semissintéticos, prevê-se que os endoperóxidos sintéticos, principalmente os derivados de trioxolano e tetraoxano, poderão desempenhar um papel preponderante no combate às infeções parasitárias, causadoras de graves problemas no mundo. *Perkinsus olseni* pode também constituir um modelo para ensaios de outros organismos filogeneticamente próximos, como *Plasmodium*, *Leishmania* e *Toxoplasma*, devido à ancestralidade comum e à presença de determinadas vias metabólicas idênticas, o que permite a validação recíproca de previsões nesses parasitas.

VI. BIBLIOGRAFIA

1. Sparrow P, Brewster C, Harris H. Demographic component of future population growth [Internet]. Technical Paper No 2013/3. Nova Iorque; 2013. Available from: <http://eprints.lancs.ac.uk/29226/>
2. NATO. O crescimento da população: o desafio determinante do século XXI. [Internet]. Revista da Nato. 2017 [cited 2017 Sep 11]. Available from: http://www.nato.int/docu/review/2011/Climate-Action/Population_growth_challenge/PT/index.htm
3. Schneider UA, Havlík P, Schmid E, Valin H, Mosnier A, Obersteiner M, et al. Impacts of population growth, economic development, and technical change on global food production and consumption. *Agric Syst.* 2011;104(2):204–15.
4. World Population Prospects The 2017 Revision Key Findings and Advance Tables. Nova Iorque: United Nations; 2017. p. 53.
5. Muir JF. Fish, feeds, and food security. *Anim Front* [Internet]. 2013;3(1):28–34. Available from: <http://www.animalsciencepublications.org/publications/af/abstracts/3/1/28>
6. Ababouch L, Alder J, Anganuzzi A, Barg U, Bartley D, Bernal M, et al. The state of world fisheries and aquaculture. 2016. 1-192 p.
7. Lynch AJ, MacMillan JR. The Role of Fish in a Globally Changing Food System. *Agroclimatol Link Agric to Clim* [Internet]. 2017;83316:Monograph 60. Available from: <https://dl.sciencesocieties.org/publications/books/abstracts/agronomymonogra/agronmonogr60/agronmonogr60.2014.0059>
8. Nadarajah S, Flaaten O. Global aquaculture growth and institutional quality. *Mar Policy* [Internet]. 2017;84(July):142–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpol.2017.07.018>
9. High Level Panel of Experts on World Food Security. Sustainable fisheries and aquaculture for food security and nutrition. *Fao* [Internet]. 2014;(June):1–119. Available from: <http://www.fao.org/3/a-i3844e.pdf>
10. Arla Foods X. Annual Report 2016. Bélgica: Federation of European Aquaculture Producers; 2016. Report No.: PDF.
11. República Portuguesa Mar. Aquicultura em Portugal – Espaço Aquicultura [Internet]. [cited 2017 Sep 11]. Available from: <https://eaquicultura.pt/aquicultura-em-portugal/>
12. Governo de Portugal. Plano Estratégico para a Aquicultura Portuguesa 2014 - 2020 [Internet]. 2014. Available from: https://www.dgrm.mm.gov.pt/xeo/attachfileu.jsp?look_parentBoui=4830001&att_display=n&att_download=y
13. Moura, A, Martins C. Aquicultura em Portugal: um Setor em Crescimento. *TecnoAlimentar* [Internet]. 2015; Available from: <http://www.tecnoalimentar.pt/noticias/aquicultura-em-portugal-um-setor-em-crescimento/>.
14. Universidade do Algarve. A Europa e o Mar: Inovação e Investigação Científica em Portugal. Centro de. Universidade do Algarve, editor. Faro; 2016.

15. Edwards P. Aquaculture environment interactions: Past, present and likely future trends. *Aquaculture* [Internet]. 2015;447:2–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.02.001>
16. Murray AG, Peeler EJ. A framework for understanding the potential for emerging diseases in aquaculture. *Prev Vet Med*. 2005;67(2–3 SPEC. ISS.):223–35.
17. Nowak BF. Parasitic diseases in marine cage culture - An example of experimental evolution of parasites? *Int J Parasitol*. 2007;37(6):581–8.
18. Lafferty KD, Harvell CD, Conrad JM, Friedman CS, Kent ML, Kuris AM, et al. Infectious Diseases Affect Marine Fisheries and Aquaculture Economics. *Ann Rev Mar Sci* [Internet]. 2015;7(1):471–96. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-marine-010814-015646>
19. Kennedy DA, Kurath G, Brito IL, Purcell MK, Read AF, Winton JR, et al. Potential drivers of virulence evolution in aquaculture. *Evol Appl*. 2016;9(2):344–54.
20. Fernández Robledo JA, Vasta GR, Record NR. Protozoan parasites of bivalve molluscs: Literature follows culture. *PLoS One*. 2014;9(6):1–9.
21. Soudant P, E. Chu F-L, Volety A. Host–parasite interactions: Marine bivalve molluscs and protozoan parasites, Perkinsus species. *J Invertebr Pathol* [Internet]. 2013;114(2):196–216. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002220111300089X>
22. Choi K-S, Park K-I. Review on the Protozoan Parasite Perkinsus olseni (Lester and Davis 1981) Infection in Asian Waters. *Coast Environ Ecosyst Issues East China Sea*. 2010;269–81.
23. Ruano F, Batista FM, Arcangeli G. Perkinsosis in the clams *Ruditapes decussatus* and *R. philippinarum* in the Northeastern Atlantic and Mediterranean Sea: A review. *J Invertebr Pathol* [Internet]. 2015;131:58–67. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.015>
24. Araujo NCP, Afonso R, Bringela A, Cancela ML, Cristiano MLS, Leite RB. Peroxides with antiplasmodial activity inhibit proliferation of Perkinsus olseni, the causative agent of Perkinsosis in bivalves. *Parasitol Int*. 2013;62(6):575–82.
25. Villalba A, Reece KS, Camino Ordás M, Casas SM, Figueras A. Perkinsosis in molluscs; A review. *Aquat Living Resour*. 2004;17(4):411–32.
26. Sanil NK, Vijayan KK, Kripa V, Mohamed KS. Occurrence of the protozoan parasite, Perkinsus olseni in the wild and farmed Pearl Oyster, Pinctada fucata (Gould) from the Southeast coast of India. *Aquaculture*. 2010;299(1–4):8–14.
27. Azevedo C, Corral L, Cachola R. Fine structure of zoosporulation in Perkinsus atlanticus (Apicomplexa: Perkinsea). *Parasitology*. 1990;100(Pt 3):351–8.
28. Fernández Robledo JA, Caler E, Matsuzaki M, Keeling PJ, Shanmugam D, Roos DS, et al. The search for the missing link: A relic plastid in Perkinsus? *Int J Parasitol*. 2011;41(12):1217–29.
29. Donaghy L, Lambert C, Choi K, Soudant P, Donaghy L, Lambert C, et al. Hemocytes of the carpet shell clam (Ruditapes decussatus) and the Manila clam (Ruditapes philippinarum): Current knowledge and future prospects To cite this version : 2010;
30. Ordás MC, Ordás a, Beloso C, Figueras a. Immune parameters in carpet shell clams

- naturally infected with *Perkinsus atlanticus*. *Fish Shellfish Immunol* [Internet]. 2000;10(7):597–609. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11081437>
31. Casas S, Li Y, La Peyre J. Comparison of protein and enzyme profiles in supernatants of *Perkinsus olseni*, *Perkinsus chesapeaki* and *P. marinus* cultures. *J Shellfish Res.* 2009;28:687.
 32. Fernandez-Boo S, Villalba A, Cao A. Variable protein profiles in extracellular products of the protistan parasite *Perkinsus olseni* among regions of the Spanish coast. *J Invertebr Pathol.* 2015;132:233–41.
 33. Elandalloussi LM, Afonso R, Nunes PA, Cancela ML. Effect of desferrioxamine and 2,2'-bipyridyl on the proliferation of *Perkinsus atlanticus*. *Biomol Eng.* 2003;20(4–6):349–54.
 34. Leonor Teles-Grilo M, Tato-Costa J, Duarte SM, Maia A, Casal G, Azevedo C. Is there a plastid in *Perkinsus atlanticus* (Phylum Perkinsozoa)? *Eur J Protistol.* 2007;43(2):163–7.
 35. Leite R, Afonso R, Cancela M. Herbicides and Protozoan Parasite Growth Control: Implications for New Drug Development. *Herbic Theory Appl* [Internet]. 2011;(September 2017):567–80. Available from: http://cdn.intechopen.com/pdfs/13155/InTech-Herbicides_and_protozoan_parasite_growth_control_implications_for_new_drug_development.pdf
 36. Roberts CW, Roberts F, Lyons RE, Kirisits MJ, Mui EJ, Finnerty J, et al. The shikimate pathway and its branches in apicomplexan parasites. *J Infect Dis* [Internet]. 2002;185 Suppl(September):S25-36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11865437>
 37. Elandalloussi LM, Rodrigues PM, Afonso R, Leite RB, Nunes PA, Cancela ML. Shikimate and folate pathways in the protozoan parasite, *Perkinsus olseni*. *Mol Biochem Parasitol.* 2005;142(1):106–9.
 38. Elandalloussi LM, Leite RB, Rodrigues PM, Afonso R, Cancela ML. Effect of the herbicide Roundup on *Perkinsus olseni* in vitro proliferation and in vivo survival when infecting a permissive host, the clam *Ruditapes decussatus*. *Bull Environ Contam Toxicol.* 2008;80(6):512–5.
 39. Elandalloussi LM, Leite RB, Rodrigues PM, Afonso R, Nunes PA, Cancela ML. Effect of antiprotozoal drugs on the proliferation of the bivalve parasite *Perkinsus olseni*. *Aquaculture.* 2005;243(1–4):9–17.
 40. Lin Z, Cellier MFM, Vasta GR. Protozoan Parasite *Perkinsus marinus* Mediates Iron Uptake. 2011;6340–55.
 41. Sigma-Aldrich. Glyphosate | Sigma-Aldrich [Internet]. [cited 2017 Sep 29]. Available from: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/glyphosate16907107183611?lang=pt®ion=PT>
 42. Pubchem.ncbi. PENDIMETHALIN [Internet]. [cited 2017 Sep 29]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/pendimethalin#section=Top>
 43. Pubchem.ncbi. Metolachlor [Internet]. [cited 2017 Sep 29]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4169#section=2D-Structure>

44. Pubchem.ncbi. LINURON [Internet]. [cited 2017 Sep 29]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9502#section=Top>
45. Pubchem.ncbi. 2,4-dichlorophenoxyacetic acid [Internet]. [cited 2017 Sep 29]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1486#section=Top>
46. Symeonidis A, Marangos M. Iron and Microbial Growth. *Insight Control Infect Dis Glob Scenar* [Internet]. Available from: www.intechopen.com
47. Gauthier JD, Vasta GR. Inhibition of in vitro replication of the oyster parasite *Perkinsus marinus* by the natural iron chelators transferrin, lactoferrin, and desferrioxamine. *Dev Comp Immunol*. 1994;18(4):277–86.
48. Pubchem.ncbi. Deferoxamine [Internet]. [cited 2017 Sep 29]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2973#section=2D-Structure>
49. Pubchem.ncbi. 2,2 - BIPYRIDINE [Internet]. [cited 2017 Sep 30]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1474#section=2D-Structure>
50. Nzila A. The past, present and future of antifolates in the treatment of *Plasmodium falciparum* infection. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2006;57(6):1043–54. Available from: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=16617066&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers2://publication/doi/10.1093/jac/dkl104>
51. Meshnick SR, Taylor TE, Kamchonwongpaisan S. Artemisinin and the antimalarial endoperoxides: from herbal remedy to targeted chemotherapy. *Microbiol Rev*. 1996;60(2):301–15.
52. Antony HA, Parija SC. Antimalarial drug resistance: An overview. *Trop Parasitol* [Internet]. 2016;6(1):30–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26998432%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4778180>
53. Ho WE, Peh HY, Chan TK, Wong WSF. Artemisinins: Pharmacological actions beyond anti-malarial. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2014;142(1):126–39. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.12.001>
54. Ploypradith P. Development of artemisinin and its structurally simplified trioxane derivatives as antimalarial drugs. *Acta Trop*. 2004;89(3):329–42.
55. O'Neill PM, Posner GH. A medicinal chemistry perspective on artemisinin and related endoperoxides. *J Med Chem*. 2004;47(12):2945–64.
56. Pubchem.ncbi. Cycloheximide [Internet]. [cited 2017 Sep 28]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6197#section=Top>
57. World Health Organization. Malaria - Fact sheet about Malaria [Internet]. [cited 2017 Aug 15]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>
58. CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Malaria - About Malaria - Biology - Ecology of Malaria [Internet]. 2015. Available from: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/ecology.html>
59. WHO. World Malaria Report 2016. Geneva; 2016.
60. CDC - Centers for Disease Control and Prevention. CDC - Malaria - About Malaria -

- Disease. (2015) [Internet]. 2015 [cited 2017 Aug 15]. Available from: <https://www.cdc.gov/malaria/about/disease.html>
61. CDC - Centers for Disease Control and Prevention. CDC - Malaria - About Malaria - Biology [Internet]. 2015 [cited 2017 Aug 15]. Available from: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>
 62. Cowman AF, Tonkin CJ, Tham W-H, Duraisingh MT. The Molecular Basis of Erythrocyte Invasion by Malaria Parasites. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2017;22(2):232–45. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S193131281730286X>
 63. Travassos M, K. Laufer M. Antimalarial drugs: An overview [Internet]. 2017 [cited 2017 Aug 20]. Available from: <https://www.uptodate.com/contents/antimalarial-drugs-an-overview>
 64. Tilley L, Straimer J, Gnädig NF, Ralph SA, Fidock DA. Artemisinin Action and Resistance in *Plasmodium falciparum*. Vol. 32, *Trends in Parasitology*. 2016. p. 682–96.
 65. Winstanley PA. Chemotherapy for falciparum malaria: The armoury, the problems and the prospects. *Parasitol Today*. 2000;16(4):146–53.
 66. Parhizgar AR. Introducing new antimalarial analogues of chloroquine and amodiaquine: A narrative review. *Iran J Med Sci*. 2017;42(2):115–28.
 67. Kumar V, Mahajan A, Chibale K. Synthetic medicinal chemistry of selected antimalarial natural products. *Bioorganic Med Chem* [Internet]. 2009;17(6):2236–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2008.10.072>
 68. Pubchem.ncbi. Lumefantrine.
 69. Pubchem.ncbi. Halofantrine [Internet]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/37393#section=Top%0A>
 70. Heinberg A, Kirkman L. The molecular basis of antifolate resistance in *Plasmodium falciparum*: Looking beyond point mutations. *Ann N Y Acad Sci*. 2015;1342(1):10–8.
 71. Dahl EL, Rosenthal PJ. Multiple antibiotics exert delayed effects against the *Plasmodium falciparum* apicoplast. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(10):3485–90.
 72. Rudrapal M. A brief review on malaria and current antimalarial drugs. *Curr Pharma Res*. 2011;1(3):286–92.
 73. Pubchem.ncbi. Azithromycin [Internet]. [cited 2017 Dec 5]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/447043#section=Top>
 74. Pubchem.ncbi. Rifampicin. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5381226>
 75. Pubchem.ncbi. Ciprofloxacin [Internet]. [cited 2017 Dec 5]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2764>
 76. Marti F, Chadwick J, Amewu RK, Burrell-Saward H, Srivastava A, Ward S a., et al. Second generation analogues of RKA182: synthetic tetraoxanes with outstanding in vitro and in vivo antimalarial activities. *Medchemcomm* [Internet]. 2011;2(7):661. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c1md00102g>
 77. CDC. CDC - Leishmaniasis [Internet]. [cited 2017 Oct 1]. Available from:

<https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/>

78. Monzote L. Current treatment of leishmaniasis: a review. *Open Antimicrob Agents J* [Internet]. 2009;1(August):9–19. Available from: <http://ftp.benthamsience.com/open/toantimj/articles/V001/9TOANTIMJ.pdf>
79. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 2012;7(5).
80. Wha R, Assembly WH, States M, States M, Obser GH. Global leishmaniasis update , 2006 – 2015 : a turning point in leishmaniasis surveillance Le point sur la situation mondiale de la leishmaniose , 2006-2015 : un tournant dans la surveillance de la maladie. 2016;557–65.
81. Grevelink SA, Lerner EA. Leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol* [Internet]. 1996;34(2):257–72. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0190962296801216>
82. CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Parasites - Leishmaniasis [Internet]. Available from: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>
83. Pubchem.ncbi. Pentamidina [Internet]. [cited 2017 Jan 1]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4735#section=Top>
84. Pubchem.ncbi. Miltefosina [Internet]. [cited 2017 Sep 29]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Miltefosine#section=Top>
85. Falci DR, Pasqualotto AC. Anfotericina B: uma revisão sobre suas diferentes formulações, efeitos adversos e toxicidade. *Clin Biomed Res* [Internet]. 2015;35(2):65–82. Available from: <http://doi.editoracubo.com.br/10.4322/2357-9730.56021>
86. Chollet C, Crousse B, Bories C, Bonnet-Delpon D, Loiseau PM. In vitro antileishmanial activity of fluoro-artemisinin derivatives against *Leishmania donovani*. *Biomed Pharmacother*. 2008;62(7):462–5.
87. Cortes S, Albuquerque A, Cabral LIL, Lopes L, Campino L, Cristiano MLS. In vitro susceptibility of *Leishmania infantum* to artemisinin derivatives and selected trioxolanes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(8):5032–5.
88. Kim K, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: The model apicomplexan. *Int J Parasitol*. 2004;34(3):423–32.
89. CDC. Toxoplasmosis [Internet]. [cited 2017 Oct 1]. Available from: <https://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/index.html>
90. Subauste CS, Ajzenberg D, Kijlstra A. Review of the Series “Disease of the Year 2011: Toxoplasmosis” Pathophysiology of Toxoplasmosis. *Ocul Immunol Inflamm*. 2011;19(5):297–306.
91. Dubey JP, Jones JL. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *Int J Parasitol*. 2008;38(11):1257–78.
92. Auwaerter PG, Spacek LA. *Toxoplasma gondii*. *Johns Hoptinks Medicine ABX Guides*.
93. Elmore SA, Jones JL, Conrad PA, Patton S, Lindsay DS, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. *Trends Parasitol* [Internet]. 2010;26(4):190–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2010.01.009>

94. Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: Transmission, diagnosis, and prevention. *Clin Microbiol Infect*. 2002;8(10):634–40.
95. CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Parasites - Toxoplasmosis [Internet]. [cited 2017 Dec 5]. Available from: <https://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/biology.html>
96. Hökelek M. Toxoplasmosis Medication [Internet]. Medscape. 2017 [cited 2017 Sep 30]. Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/229969-medication#1>
97. Kaye A. Toxoplasmosis: Diagnosis, treatment, and prevention in congenitally exposed infants. *J Pediatr Heal Care* [Internet]. 2011;25(6):355–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pedhc.2010.04.008>
98. Hencken CP, Jones-Brando L, Bordón C, Stohler R, Mott BT, Yolken R, et al. Thiazole, oxadiazole, and carboxamide derivatives of artemisinin are highly selective and potent inhibitors of *Toxoplasma gondii*. *J Med Chem*. 2010;53(9):3594–601.
99. Rudrapal M, Chetia D. Endoperoxide antimalarials: Development, structural diversity and pharmacodynamic aspects with reference to 1,2,4-trioxane-based structural scaffold. *Drug Des Devel Ther*. 2016;10:3575–90.
100. Opsenica DM, Šolaja BA. Antimalarial peroxides Available online at www.shd.org.rs/JSCS/ Available online at www.shd.org.rs/JSCS/. 2009;74(11):1155–93.
101. Opsenica DM, Šolaja BA. Artemisinins and synthetic peroxides as highly efficient antimalarials. *Maced J Chem Chem Eng*. 2012;31(2):137–82.
102. Krishna S, Pulcini S, Fatih F, Staines H. Artemisinins and the biological basis for the PfATP6/SERCA hypothesis. *Trends Parasitol*. 2010;26(11):517–23.
103. Gupta AK, Varshney K, Kumar V, Srivastava K, Pant AB, Puri SK, et al. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel 1,2,4-Trioxanes as Potential Antimalarial Agents. *Arch Pharm (Weinheim)*. 2017;350(3–4):1–9.
104. Fleck SL, Robinson BL, Peters W, Thevin F, Boulard Y, Glenat C, et al. The chemotherapy of rodent malaria. LIII. “Fenozan B07” (Fenozan-50F), a difluorinated 3,3'-spirocyclopentane 1,2,4-trioxane: comparison with some compounds of the artemisinin series. *Ann Trop Med Parasitol* [Internet]. 1997;91(1):25–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=9093426>
105. Fleck SL, Robinson BL, Peters W. The chemotherapy of rodent malaria. LIV. Combinations of “Fenozan B07” (Fenozan-50F), a difluorinated 3,3'-spirocyclopentane 1,2,4-trioxane, with other drugs against drug-sensitive and drug-resistant parasites. *Ann Trop Med Parasitol* [Internet]. 1997;91(1):33–9. Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=med4&NEWS=N&AN=9093427>
106. Li Q, Hickman MR. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of antimalarial drugs used in combination therapy. Bentham Science Publishers; 2015. 550 p.
107. Jefford CW, Velarde JA, Bernardinelli G, Bray DH, Warhurst DC, Milhous WK. Synthesis, Structure, and Antimalarial Activity of Tricyclic 1,2,4-Trioxanes Related to Artemisinin. *Helv Chim Acta*. 1993;76(8):2775–88.

108. Jefford CW. Why artemisinin and certain synthetic peroxides are potent antimalarials. Implications for the mode of action. *Curr Med Chem* [Internet]. 2001;8(15):1803–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11772352>
109. Posner GH, Oh CH, Gerena L, Milhous WK. Extraordinarily Potent Antimalarial Compounds: New, Structurally Simple, Easily Synthesized, Tricyclic 1,2,4-Trioxanes. *J Med Chem*. 1992;35(13):2459–67.
110. Activity A, Maurya R, Soni A, Anand D, Ravi M, Raju KSR, et al. Synthesis and Antimalarial Activity of 3,3-Spiroanellated 5,6- Disubstituted 1,2,4-Trioxanes. 2013;
111. Vennerstrom JL, Arbe-Barnes S, Brun R, Charman SA, Chiu FCK, Chollet J, et al. Identification of an antimalarial synthetic trioxolane drug development candidate. *Nature* [Internet]. 2004;430(7002):900–4. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature02779>
112. Dong Y, Chollet J, Matile H, Charman SA, Chiu FCK, Charman WN, et al. Spiro and dispiro-1,2,4-trioxolanes as antimalarial peroxides: Charting a workable structure-activity relationship using simple prototypes. *J Med Chem*. 2005;48(15):4953–61.
113. Charman SA, Arbe-Barnes S, Bathurst IC, Brun R, Campbell M, Charman WN, et al. Synthetic ozonide drug candidate OZ439 offers new hope for a single-dose cure of uncomplicated malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2011;108(11):4400–5. Available from: <http://www.pnas.org/content/108/11/4400.short>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3060245&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
114. Tang Y, Dong Y, Wittlin S, Charman SA, Chollet J, Chiu FCK, et al. Weak base dispiro-1,2,4-trioxolanes: Potent antimalarial ozonides. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2007;17(5):1260–5.
115. Dong Y, Wittlin S, Sriraghavan K, Chollet J, Charman SA, Charman WN, et al. The structure - Activity relationship of the antimalarial ozonide arterolane (OZ277). *J Med Chem*. 2010;53(1):481–91.
116. Dong Y, Tang Y, Chollet J, Matile H, Wittlin S, Charman SA, et al. Effect of functional group polarity on the antimalarial activity of spiro and dispiro-1,2,4-trioxolanes. *Bioorganic Med Chem*. 2006;14(18):6368–82.
117. Fügen MA, Wittlin S, Dong Y, Vennerstrom JL. Probing the antimalarial mechanism of artemisinin and OZ277 (arterolane) with nonperoxidic isosteres and nitroxyl radicals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(3):1042–6.
118. Pharmaceutical-technology.com. Ranbaxy to introduce malarial treatment Synriam in African nations [Internet]. 2014 [cited 2017 Oct 20]. Available from: <http://www.pharmaceutical-technology.com/news/newsmalarial-treatment-synriam-4471331>
119. DAIICHI SANKYO COMPANY. RANBAXY LAUNCHES SYNRIAM(TM) – INDIA'S FIRST NEW DRUG [Internet]. 2012 [cited 2017 Oct 20]. Available from: http://www.daiichisankyo.com/media_investors/media_relations/press_releases/detail/005898.html
120. Phyo AP, Jittamala P, Nosten FH, Pukrittayakamee S, Imwong M, White NJ, et al. Antimalarial activity of artefenomel (OZ439), a novel synthetic antimalarial endoperoxide, in patients with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria:

an open-label phase 2 trial. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(1):61–9.

121. Griesbaum K, Liu X, Kassiaris A, Scherer M. Ozonolyses of O-Alkylated Ketoximes in the Presence of Carbonyl Groups: A Facile Access to Ozonides. *Liebigs Ann* [Internet]. 1997;1997(7):1381–90. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jlac.199719970715>
122. Fisher LC, Blackie MA. Tetraoxanes as antimalarials: harnessing the endoperoxide. *Mini Rev Med Chem*. 2014;14(2):123–35.
123. O'Neill PM, Amewu RK, Nixon GL, ElGarah FB, Mungthin M, Chadwick J, et al. Identification of a 1,2,4,5-tetraoxane antimalarial drug-development candidate (RKA 182) with superior properties to the semisynthetic artemisinin. *Angew Chemie - Int Ed*. 2010;49(33):5693–7.
124. Kumar N, Singh R, Rawat DS. Tetraoxanes: Synthetic and Medicinal Chemistry Perspective. *Med Res Rev*. 2010;
125. Dong Y. Synthesis and Antimalarial Activity of 1,2,4,5-Tetraoxanes. *Mini Rev Med Chem*. 2002;113–23.
126. Das AM, Hazarika MP. Synthesis of some novel steroidal 1,2,4,5-tetraoxanes. *RSC Adv* [Internet]. 2015;5(26):19818–22. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5RA00169B>
127. Žmitek K, Zupan M, Stavber S, Iskra J. Iodine as a catalyst for efficient conversion of ketones to gem-dihydroperoxides by aqueous hydrogen peroxide. *Org Lett*. 2006;8(12):2491–4.
128. Dong Y, Creek D, Chollet J, Matile H, Charman SA, Wittlin S, et al. Comparative antimalarial activities of six pairs of 1,2,4,5-tetraoxanes (peroxide dimers) and 1,2,4,5,7,8-hexaoxonanes (peroxide trimers). *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(8):3033–5.
129. Kim H-S, Tsuchiya K, Shibata Y, Wataya Y, Ushigoe Y, Masuyama A, et al. Synthetic methods for unsymmetrically-substituted 1,2,4,5-tetraoxanes and of 1,2,4,5,7-pentaoxonanes. *J Chem Soc Perkin Trans 1* [Internet]. 1999;27(13):1867–70. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=a900826h>
130. Iskra J, Bonnet-Delpon D, Bégué JP. One-pot synthesis of non-symmetric tetraoxanes with the H₂O₂/MTO/fluorous alcohol system. *Tetrahedron Lett*. 2003;44(33):6309–12.
131. Žmitek K, Stavber S, Zupan M, Bonnet-Delpon D, Charneau S, Grellier P, et al. Synthesis and antimalarial activities of novel 3,3,6,6-tetraalkyl-1,2,4,5-tetraoxanes. *Bioorganic Med Chem*. 2006;14(23):7790–5.
132. Kumar N, Khan SI, Sharma M, Atheaya H, Rawat DS. Iodine-catalyzed one-pot synthesis and antimalarial activity evaluation of symmetrically and asymmetrically substituted 3,6-diphenyl[1,2,4,5]tetraoxanes. *Bioorganic Med Chem Lett* [Internet]. 2009;19(6):1675–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.01.103>
133. Ghorai P, Dussault PH. Mild and efficient Re(VII)-catalyzed synthesis of 1,1-dihydroperoxides. *Org Lett*. 2008;10(20):4577–9.
134. Ghorai P, Dussault PH. Broadly applicable synthesis of 1,2,4,5-tetraoxanes. *Org Lett*. 2009;11(1):213–6.

135. Li Y, Hao H, Zhang Q, Wu Y. A Broadly Applicable Mild Method for the Synthesis of gem-Diperoxides from Corresponding Ketones or 1,3-Dioxolanes. 2009;4.
136. Yan X, Chen J, Zhu YT, Qiao C. Phosphomolybdic acid catalyzed synthesis of 1,2,4,5-tetraoxanes. *Synlett*. 2011;4(19):2827–30.
137. Terent'ev AO, Yaremenko IA, Vil' VA, Moiseev IK, Kon'kov SA, Dembitsky VM, et al. Phosphomolybdic and phosphotungstic acids as efficient catalysts for the synthesis of bridged 1,2,4,5-tetraoxanes from β -diketones and hydrogen peroxide. *Org Biomol Chem* [Internet]. 2013;11(16):2613. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3ob27239g>
138. Sashidhara K V., Avula SR, Ravithey Singh L, Palnati GR. A facile and efficient Bi(III) catalyzed synthesis of 1,1-dihydroperoxides and 1,2,4,5-tetraoxanes. *Tetrahedron Lett* [Internet]. 2012;53(36):4880–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetlet.2012.07.001>
139. Khosravi K, Weaver G. Cesium nitrate: As an efficient catalyst for synthesis of gem-dihydroperoxides from aldehydes and ketones using aqueous 30% H₂O₂. *Cogent Chem* [Internet]. 2015;1(1):1002339. Available from: <http://cogentoa.tandfonline.com/doi/full/10.1080/23312009.2014.1002339>
140. Copple I, Mercer A. <Title/>. *Mol Med* [Internet]. 2012;18(7):1. Available from: http://www.molmed.org/content/pdfstore/12_154_Copple.pdf
141. Stocks PA, Bray PG, Barton VE, Al-Helal M, Jones M, Araújo N, Gibbons P, Ward SA, Hughes RH, Biagini GA, Davies J, Amewu R O, PM. N. A common “free iron” dependent mechanism of activation among diverse antimalarial endoperoxide structures. *Angew Chem Int*. 2007;119.
142. Ham P, S. Pilgrim B, J. G. Simon RJGS. Zinc-Acetic acid. In: *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*. 2001.
143. Opsenica I, Opsenica D, Smith KS, Milhous WK, Šolaja BA. Chemical stability of the peroxide bond enables diversified synthesis of potent tetraoxane antimalarials. *J Med Chem*. 2008;51(7):2261–6.
144. Valeur E, Bradley M. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chem Soc Rev* [Internet]. 2009;38(2):606–31. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=B701677H>