

ESTUDO TEÓRICO DA INTERAÇÃO EXISTENTE ENTRE A ARTEMISININA E O HEME

Mírian da Silva Costa, Rudolf Kiralj e Márcia M. C. Ferreira*

Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, 13084-971 Campinas - SP, Brasil

Recebido em 22/8/05; aceito em 25/4/06; publicado na web em 30/8/06

THEORETICAL STUDY OF THE INTERACTION BETWEEN ARTEMISININ AND HEME. The purpose of this work is to study theoretically stereoelectronic aspects of the interaction between heme and artemisinin in the transitional heme-artemisinin complex. Through semi-empirical calculations using the PM3 method, the potential energy barrier of artemisinin rotation relative to heme in the heme-artemisinin complex was studied in vacuum and in the partially solvated state. The minimum heat of formation obtained for the complex with and without water molecules is -702.39 and -100.86 kcal mol⁻¹, respectively, which corresponds to the dihedral angle C-Fe-O1-O2 of 43.93° and 51.90° around the iron-oxygen O1 bond, respectively. The water molecules bind to heme via 13 hydrogen bonds and O-H...O and 6 C-H...O interactions, which accounts for -67.23 kcal mol⁻¹. It is observed that the inclusion of water molecules does not affect significantly the stability of the heme-artemisinin complex.

Keywords: artemisinin; heme; PM3.

INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, hoje em dia, a malária é de longe a doença tropical e parasitária que mais causa problemas sociais e econômicos no mundo e só é superada em número de mortes pela AIDS. A malária ainda é uma das doenças que mais crescem no mundo. O *Plasmodium falciparum*, responsável pela malária mais grave, afeta severamente a população mundial, causando de 1-1,5 milhões de mortes a cada ano, sendo a maioria crianças de até 5 anos de idade¹. A malária ocorre principalmente nos países da África, Ásia e América Latina, devido às inadequadas estruturas na área da saúde e baixas condições socioeconômicas.

Na década de 40, ocorriam cerca de 6 milhões de casos de malária ao ano no Brasil, número que foi reduzido a 52 mil casos em 1970, graças a campanhas federais e estaduais de combate à doença². Os dados da Fundação Nacional de Saúde (Funasa) do ano de 2002, até abril, indicam que o número de casos de malária caiu 14% em relação ao mesmo período de 2001.

Existem quatro membros do gênero *Plasmodium*, que afetam os seres humanos. A malária é transmitida através da picada do mosquito fêmea do gênero *Anopheles* infectado³. Após a infecção do indivíduo pela picada do mosquito, os parasitas *Plasmodium* primeiramente se acumulam nos hepatócitos (células do fígado) na forma de esporozoítos, onde se desenvolvem e tornam-se merozoítos. Em seguida, os merozoítos invadem os eritrócitos para o próximo estágio de sua maturação. Neste estágio os merozoítos desenvolvem-se, tornando-se trofozoítos maduros (forma anelar) e, em seguida, tornam-se esquizontes. Após alguns dias, as células vermelhas infectadas arrebentam e os merozoítos são liberados, causando as febres periódicas da malária. Cada esquizonte libera de 8-24 merozoítos e estes infectam novos eritrócitos, dando seqüência a um ciclo⁴.

Dentro dos eritrócitos o parasita degrada grande parte da hemoglobina, liberando uma porção protéica (globina) e o heme (complexo ferro-porfirina). Em humanos, os parasitas da malária digerem mais de 70% da hemoglobina dentro das células vermelhas infectadas do sangue⁵. Cerca de 30% ou mais desta globina é digerida pelo parasita e usada como fonte de aminoácidos para a

síntese de suas próprias proteínas. O heme proveniente da hemoglobina é tóxico para o parasita, que o converte no pigmento malarial. Neste processo, o parasita é destoxificado ao polimerizar o heme, com o auxílio da enzima heme polimerase, produzindo o pigmento da malária (hemozoína)⁶. A Figura 1 mostra a estrutura do heme, onde o átomo de Fe se encontra no estado de oxidação +2 e os propionatos, na forma iônica.

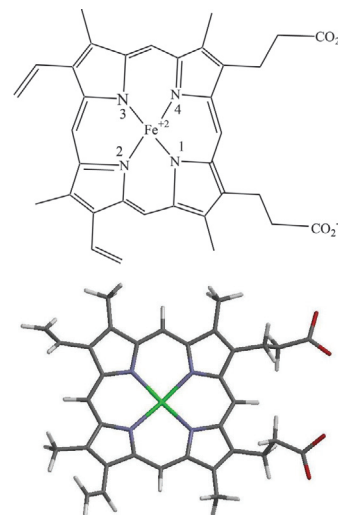


Figura 1. Estrutura do heme

Os parasitas estão se tornando resistentes aos fármacos já existentes, como por ex., a cloroquina, a quinina e a mefloquina^{7,8}. A artemisinina (Figura 2), também conhecida como qinghaosu (QHS), proveniente da *Artemisia annua*, é um potente agente antimalárico e foi isolada pela primeira vez em 1972, por pesquisadores chineses⁹. Os fármacos antimaláricos atuais contêm um sistema anelar heterocíclico contendo nitrogênio. Já a artemisinina é uma lactona sesquiterpênica que possui uma função endoperóxido, a qual tem se demonstrado essencial para a atividade antimalárica¹⁰. Este fármaco tem uma estrutura química peculiar, alta estabilidade térmica⁹, baixa toxicidade e alta eficiência contra os parasitas resistentes à cloroquina.

*e-mail: marcia@iqm.unicamp.br

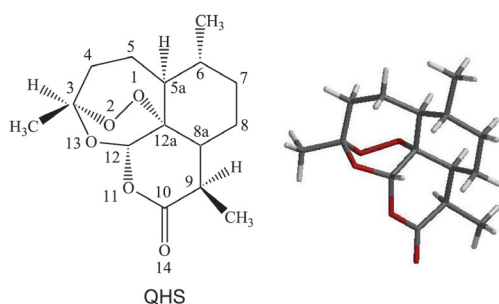


Figura 2. Estrutura da artemisinina

Conhecer o mecanismo de ação é de suma importância para o desenvolvimento e descobrimento de um novo fármaco. Normalmente, o fármaco tem seu efeito mediado por um alvo específico, um receptor. Caso a estrutura do complexo receptor-fármaco seja conhecida, as interações entre ambos podem ser investigadas com mais detalhes. Estudos computacionais e quantitativos que correlacionam a estrutura química e a atividade biológica de uma série de fármacos e análogos têm apontado para os mecanismos de ação e têm dado diretrizes para a síntese de novos derivados mais eficientes¹¹⁻¹⁷.

No caso específico do tratamento da malária com artemisinina, há evidências experimentais de que o mecanismo de ação do fármaco envolve a formação de um complexo de transição heme-artemisinina. A oxidação da artemisinina mediada pelo heme é apontada como uma etapa crítica na atividade biológica deste fármaco¹⁸⁻²³.

A literatura sugere várias hipóteses sobre a interação entre o heme e a artemisinina neste complexo transitório. Tonmuphean e colaboradores¹⁴ estudaram teoricamente a interação da artemisinina e 29 derivados com o heme, no vácuo (método *ab initio* a nível HF). Os resultados mostraram que eles se aproximam do heme preferencialmente por intermédio do átomo de oxigênio O1 da ligação endoperóxido, em direção ao átomo de Fe do receptor heme. Este resultado difere do proposto anteriormente por Shukla e colaboradores²⁴, os quais sugeriram que o átomo de oxigênio O2 da artemisinina e não O1 se liga ao ferro do grupo heme. Isto mostra a importância da interação entre o Fe do heme e o grupo endoperóxido da artemisinina ou de seus derivados. Tonmuphean e colaboradores¹¹, em outro estudo, utilizaram cinco tipos diferentes de estruturas do heme interagindo com a artemisinina. Estes cálculos mostraram que, em todas as interações, o átomo de oxigênio O1 da ligação endoperóxido da artemisinina se aproxima preferencialmente do átomo de Fe do heme e este mecanismo de aproximação é controlado por efeito estereoeletrônico. Ligantes próximos que aumentam o efeito estérico na posição do átomo de ferro afetam significativamente as interações, como é o caso do desoxi-heme. Este heme possui uma estrutura na forma de “tigela”, devido à presença de um grupo histidina ligado ao Fe, fazendo com que a interação entre o endoperóxido da artemisinina e o átomo de ferro do heme seja menos favorável. Em outro estudo recente, Tonmuphean e colaboradores²⁵ demonstraram novamente que o ataque da artemisinina ao ferro do grupo heme ocorre via O1.

Pinheiro e colaboradores¹³ analisaram a interação existente entre a artemisinina e quatro análogos da mesma com o heme, utilizando o método de mecânica molecular. Diferenças significativas foram observadas na conformação do ligante e na sua orientação com relação ao heme e na conformação das cadeias livres do heme. As cadeias laterais livres do heme (as quais não foram congeladas durante os cálculos) dirigiram-se em direção aos substituintes ligados em C9 e C10 (Figura 2) da QHS.

Atualmente, o mecanismo mais aceito para a ação da artemisinina envolve a formação do complexo de transição, por intermédio dos átomos de ferro do heme e O1 do endoperóxido. A

posição relativa da artemisinina com respeito ao heme é determinada por interações estereoeletrônicas entre ambos, as quais afetam o rearranjo do complexo até o rompimento da ligação Fe-O. Portanto, a investigação em maiores detalhes de tais interações no complexo é importante do ponto de vista do reconhecimento molecular do heme com respeito à artemisinina. Os objetivos do presente trabalho são estudar a posição relativa da artemisinina com respeito ao heme no vácuo e parcialmente solvatado, e as interações estereoeletrônicas envolvidas no complexo de transição. Este tipo de estudo pode auxiliar na descoberta de novos fármacos mais eficientes contra a malária, já que para tal, torna-se necessário saber como eles interagem com seus respectivos receptores.

MÉTODOS COMPUTACIONAIS

Utilizou-se o método semi-empírico PM3²⁶ implementado nos programas SPARTAN²⁷ e TITAN²⁸, para realizar os cálculos da entalpia de formação entre o fármaco (QHS) e o receptor (heme). A estrutura do heme da oxi-hemoglobina (1THB, resolução 1,50 Å, R=19,6%)²⁹ foi retirada do banco de dados cristalográficos “Protein Data Bank” (PDB)³⁰. A estrutura da artemisinina (QNGHSU03)³¹ disponível no banco de dados “Cambridge Structural Database” (CSD)³² foi utilizada para os cálculos da barreira de energia potencial da rotação da artemisinina em relação ao heme ao longo do eixo Fe-O1.

A molécula de oxigênio coordenada ao átomo de ferro do heme (1THB)²⁹ foi usada para construir o complexo heme-artemisinina. O heme e a artemisinina foram orientados, isto é, posicionados paralelamente, com o auxílio do programa MATLAB³³. A molécula de oxigênio serviu para ligar o heme à artemisinina.

A distância O1-Fe foi fixada em 2,7 Å, a mesma encontrada em outros estudos teóricos realizados por Tonmuphean e colaboradores^{11,14} e por Cheng e colaboradores¹⁵. A orientação da molécula de artemisinina foi corrigida, fixando-se o ângulo O2-O1-Fe em 115°. Este ângulo foi escolhido com base no ângulo Fe-O1-C12a que era desta ordem de grandeza e, assim, a molécula da artemisinina ficou em uma posição aproximadamente paralela em relação ao plano do heme, com os ângulos das ligações Fe-O1-O2 e Fe-O1-C12a quase trigonais. A Figura 3 mostra uma visão estérica do complexo, indicando os ângulos mencionados.

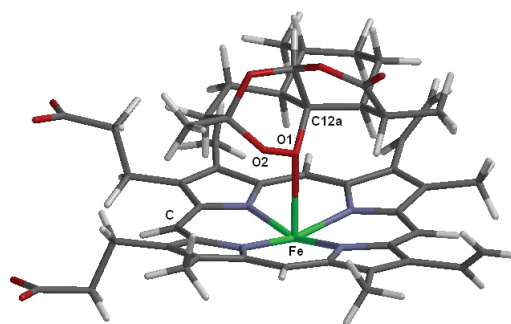


Figura 3. Visão do complexo artemisinina-heme (átomos: cinza - C; branco - H; vermelho - O; violeta - N; verde - Fe)

Durante os cálculos, alguns átomos tanto da artemisinina quanto do heme foram congelados. Na molécula de heme foram fixados o átomo de ferro, o anel rígido da porfirina, quatro carbonos metilênicos, dois carbonos etilênicos, três carbonos de cada grupo propionato e um átomo de hidrogênio do carbono que está entre os dois grupos propionato. Este átomo de H foi fixado apenas em al-

guns dos cálculos de otimização, para evitar o aparecimento de um comprimento irreal da ligação C-H. Os grupos propionato na forma aniônica foram fixados pois, durante as otimizações de geometria no vácuo, eles se aproximaram muito dos átomos da QHS, devido à ausência de outros grupos ou moléculas presentes na estrutura cristalina com os quais pudessem interagir. Este método difere do estudo feito por Cheng e colaboradores¹⁵, os quais consideraram a flexibilidade destes grupos, onde ambos os grupos se posicionaram para cima. Por outro lado, Shukla e colaboradores²⁴ também não consideraram a flexibilidade das cadeias laterais do heme durante a simulação da interação QHS-heme, semelhante ao estudo em questão. Já na artemisinina foram fixados somente quatro átomos: O1, O2 e dois carbonos adjacentes a estes átomos.

Foi selecionado o ângulo diedro C-Fe-O1-O2 (Figura 3) para a análise conformacional do complexo, onde C é o átomo de carbono aromático do heme, situado entre os dois grupos propionato. O valor inicial do ângulo diedro foi +170,60° (-189,40°). Para cada ângulo de rotação, otimizou-se a geometria do complexo heme-artemisinina obtendo como resultado o calor de formação de cada conformação. A variação do ângulo diedro C-Fe-O1-O2 foi realizada de 10 em 10°, usando a ligação C-Fe como referência (Figura 3). O objetivo desta análise computacional foi investigar qual conformação do complexo era energeticamente mais favorável e, portanto, a mais provável para a ativação da artemisinina. Antes de cada otimização de geometria com o método PM3, realizou-se um cálculo de mecânica molecular, baseado no campo de força MMFF94³⁴⁻³⁷ para haver melhor acomodação dos átomos livres de ambas as estruturas.

Duas abordagens foram adotadas nos cálculos da análise conformacional. Na primeira delas, as rotações foram feitas partindo sempre da estrutura otimizada anterior. Na segunda, as rotações foram feitas utilizando sempre uma mesma estrutura original (ângulo diedro = +170,60°). A seguir, foi feita uma análise do perfil do calor de formação com respeito ao ângulo diedro e a região de menor energia foi refinada, variando-se o ângulo diedro de 1 ou 2°.

Posteriormente, com intuito de avaliar melhor o efeito do solvente água nas interações fármaco-receptor, foram realizadas novas otimizações de geometria, seguindo os mesmos procedimentos computacionais citados acima, mas com a presença de algumas moléculas de água. A conformação de menor calor de formação do complexo no vácuo, obtida nos cálculos acima, foi utilizada como estrutura inicial para este estudo. A seguir, as dez moléculas de água mais próximas do heme, segundo a estrutura do heme (1THB)²⁹, foram incluídas no sistema. Em seguida, foram realizadas rotações em torno de 25° para a direita e 25° para a esquerda, tomando como base o ângulo diedro C-Fe-O1-O2 (Figura 3). Os cálculos foram realizados variando o ângulo diedro de 2 a 4°. Este procedimento foi adotado para que os resultados pudessem ser comparados com os cálculos conformacionais anteriores no vácuo. Portanto, cálculos de dinâmica molecular não foram incluídos neste trabalho.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A maior região de carga negativa da artemisinina localiza-se ao redor da ligação peróxido e a maior região de carga positiva do heme localiza-se ao redor do íon Fe²⁺. A intuição química indica que estas duas regiões devem interagir quando a artemisinina se aproxima do heme. Isto está de acordo com experimentos relacionados à ação antimalárica da artemisinina, que indicaram a produção de uma série de radicais de oxigênio e carbono originados da transferência de elétrons de Fe²⁺ para o grupo peróxido quando a artemisinina interage com o heme³⁸. Conforme citado na introdução, os estudos anteriores indicaram que a interação mais provável entre a artemisinina e o heme ocorre por intermédio do átomo O1

da ligação endoperóxido. Portanto, neste artigo optou-se por estudar somente a interação O1-Fe, inclusive por ser esta a interação mais favorável do ponto de vista energético²⁵.

No vácuo, um total de 72 cálculos foi realizado, sendo 36 para cada uma das abordagens utilizadas, isto é, a otimização de geometria partindo sempre da estrutura anterior e a otimização utilizando sempre uma mesma estrutura inicial. Todos os cálculos convergiram normalmente e forneceram resultados semelhantes. Estes resultados podem ser vistos na Figura 4, que mostra o perfil do calor de formação obtido pelas duas abordagens. Percebe-se que a barreira de energia entre o conformero menos estável e o mais estável é ligeiramente menor quando os cálculos são realizados partindo sempre da estrutura anterior.

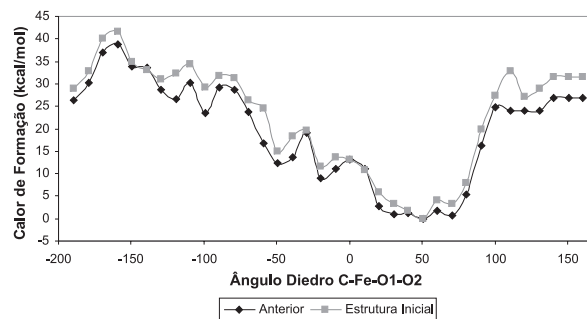


Figura 4. Perfil de energia potencial do complexo QHS-heme em função do ângulo diedro C-Fe-O1-O2

Esta região de menor energia compreende os ângulos de rotação no intervalo entre 20,00 e 80,59°. Sendo assim, foi realizado o refinamento do perfil da energia potencial (calor de formação) neste intervalo, com incrementos de 1 ou 2° no ângulo diedro. Os resultados são mostrados na Figura 5.

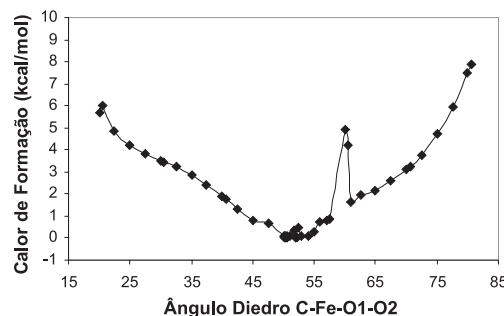


Figura 5. Perfil de energia potencial do complexo de transição QHS-heme na região de menor energia

Este refinamento serviu para detalhar a região do mínimo de energia. Ao analisar os resultados obtidos para o calor de formação, observa-se que a conformação de menor energia ($\Delta H_f = -100,86$ kcal mol⁻¹) existente no complexo QHS-heme (Figura 6) corresponde ao ângulo diedro de 51,90°.

Em geral, para existência de uma interação (intra- ou intermolecular) entre um átomo de H de uma ligação C-H e orbitais π (C,N), a distância C-H... π deve ser no máximo de 3,1 Å e o ângulo C-H... π próximo de 180°, *i. e.*, o orbital do átomo de hidrogênio deve estar próximo e adequadamente orientado na direção dos orbitais π ³⁹ (orbitais atômicos p_z dos átomos do sistema π). Isto decorre do fato de que o comprimento de uma ligação C-H está em torno de 1,1 a 1,2 Å e os raios de van der Waals do átomo de carbono medem aproximadamente de 1,7 a 1,8 Å. Portanto, a distância destas interações C-H... π deve ser bem próxima da soma de ambos (comprimento da ligação C-H e o raio

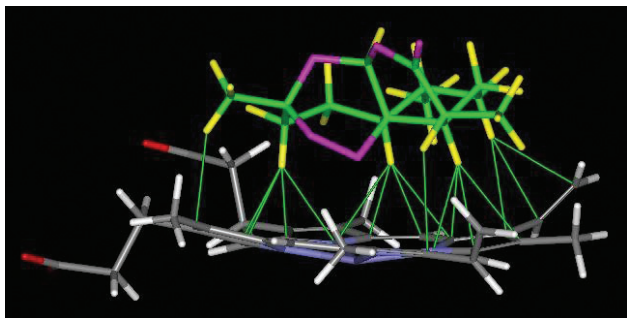


Figura 6. Conformação de menor energia do complexo heme-artemisinina no vácuo, mostrando as 17 interações C-H...C,N(π)

de van der Waals do átomo de carbono), variando entre 2,8 e 3,0 Å, com uma tolerância de $\pm 0,1$ Å³⁹. Tais interações são importantes em sínteses orgânicas, empacotamentos cristalinos e eventos de caráter biológico, especialmente na hemoglobina onde ocorrem interações entre os aminoácidos e o heme. A importância destas interações está relacionada com a estabilidade conferida à hemoglobina.

Na configuração de menor energia do complexo heme-artemisinina (Figura 6) foram encontradas 17 interações C-H... π , uma vez que um único átomo de hidrogênio da artemisinina pode interagir com mais de um orbital π do anel porfirínico. Assumindo que os métodos semi-empíricos não são muito adequados para descrever interações fracas, novas distâncias H...C,N(π) foram adotadas (2,1 a 2,8 Å), bem como novos ângulos de interação, C-H...C,N(π). Estes ângulos devem ser maiores que 130°, visto que um átomo de hidrogênio pode interagir com mais de um átomo do heme. Esta escolha de parâmetros geométricos se encontra dentro dos intervalos sugeridos por Jeffrey⁴⁰, que para as interações X-H... π (X=C, O, N) e C-H...O/N são distâncias H...aceptor 2,2 – 3,2 Å; ângulos doador-H-aceptor 90 – 150° e energias menores que 4 kcal mol⁻¹.

As interações C-H...C,N(π) ocorreram principalmente por intermédio dos átomos de H ligados aos átomos de carbono C9, C8a, C5a, C4 e C7 da QHS, além de um átomo de hidrogênio pertencente ao grupo metila ligado a C3 (Figuras 2 e 6). Os resultados obtidos neste trabalho concordam com os de Cheng e colaboradores¹⁵, os quais também detectaram interações entre átomos de H da QHS e o anel porfirínico do heme em um estudo de docking flexível e QSAR-3D, ao considerar a flexibilidade das cadeias laterais do heme. Esta é uma indicação de que a interação fármaco-receptor não é drasticamente afetada ao se fixarem estas cadeias, como foi feito neste estudo. No presente trabalho, as duas interações mais efetivas ocorrem entre os átomos de H ligados aos átomos de carbono C4 e C5a da artemisinina e átomos de carbono do anel porfirínico do heme (Figura 2). Resultados semelhantes foram encontrados por Pinheiro e colaboradores¹³, que observaram 19 interações C-H... π entre átomos de hidrogênio da artemisinina e a estrutura planar do heme. A importância das interações heme-substrato é evidente e foi notada por Ziegler *et al.*⁴¹, ao afirmarem que partes da porfirina são mais importantes para o reconhecimento molecular que, especificamente, o seu metal.

Analisando o potencial eletrostático da conformação mais estável do complexo QHS-heme (Figura 7A), tem-se uma idéia da distribuição das regiões de maior densidade eletrônica (em vermelho).

A região que se encontra ao redor da ligação peróxido possui alta densidade eletrônica e é considerada como sendo de extrema importância no mecanismo de ação da artemisinina. Os dois grupos propionato do heme se posicionaram perpendicularmente ao anel porfirínico, um grupo para cima, enquanto que o outro se posicionou para baixo. Ainda neste estudo da interação QHS-heme considerou-se a flexibilidade das cadeias de éster e éter da artemisinina, o que favorece melhor interação na formação do complexo transitório. A orientação da artemisinina com

relação ao heme exibe boa regularidade quando observada no estudo conformacional usando o método semi-empírico PM3: as partes polares e hidrofóbicas (grupos metil) do fármaco estão, respectivamente, direcionadas para as partes polares (área central Fe-N) e hidrofóbicas (grupos metil e etil) do receptor heme (Figura 7A).

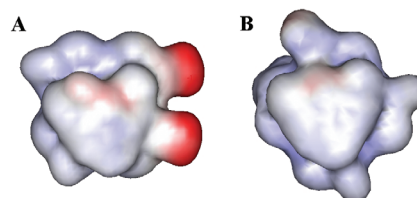


Figura 7. Potencial eletrostático do complexo de transição heme-artemisinina. A: potencial eletrostático obtido neste estudo; B: potencial eletrostático obtido em trabalho anterior¹³

Resultados diferentes foram encontrados em estudo anterior realizado por Pinheiro *et al.*¹³, no qual a região polar da artemisinina (ligação peróxido e carbonila) interage por meio de uma interação polar com um dos grupos propionato do heme (parte polar) (Figura 7B). Esta diferença nos resultados está relacionada com a metodologia computacional adotada por aqueles autores, em que o anel porfirínico do heme permaneceu fixo, enquanto que os grupos metil e vinil, um dos grupos propionato do heme, bem como a artemisinina, permaneceram totalmente livres durante a otimização de geometria em nível de mecânica molecular. Além disto, os grupos propionato estavam na forma neutra e a histidina ligada ao ferro foi incluída nos cálculos. No presente trabalho, devido os grupos propionato na forma aniônica estarem fixos durante os cálculos, não se observaram interações efetivas entre os átomos de oxigênio destes grupos e os átomos de hidrogênio da artemisinina.

Os resultados discutidos acima referem-se ao complexo de transição heme-QHS formado no vácuo. A mesma metodologia de cálculos foi aplicada para obtenção do complexo parcialmente solvatado, considerando as dez moléculas de água mais próximas do heme, segundo a estrutura extraída do banco cristalográfico PDB²⁹. Ao analisar os resultados obtidos para o perfil de energia potencial (Figura 8), observou-se que o intervalo de menor calor de formação do complexo parcialmente solvatado se encontra entre 25 e 75°. Fora desta região, os calores de formação têm valores significativamente altos (resultados não apresentados). Observa-se nesta Figura que 43,93° é o ângulo diedro que forneceu o menor calor de formação. Este resultado está próximo do obtido sem a inclusão de moléculas de água (51,90°). Estes resultados indicam que a inclusão de moléculas de água não afeta significativamente a estrutura do complexo heme-artemisinina.

Na configuração de menor energia do complexo heme-QHS par-

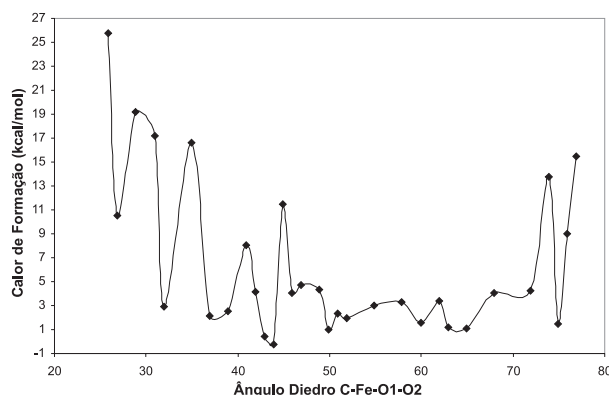


Figura 8. Perfil de energia potencial do complexo QHS-heme solvatado em função do ângulo diedro C-Fe-O1-O2-, na região de menor energia

cialmente solvatado (Figura 9) foram identificadas 13 interações efetivas C-H...C,N(π), adotando os mesmos critérios usados anteriormente. As principais interações ocorrem nos átomos de H ligados aos átomos de carbono C8a, C5a, C4 e C7 da QHS, além de um átomo de hidrogênio pertencente ao grupo metila ligado a C3 (Figuras 2 e 9). A grande diferença entre as interações C-H... π , em ambos os complexos, está relacionada com o decréscimo do número de interações efetivas causado pela inclusão das moléculas de água no sistema.

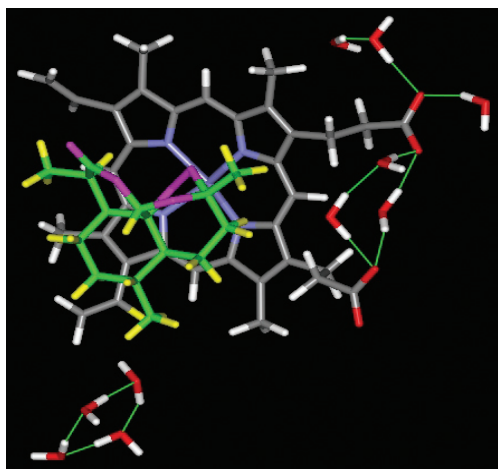


Figura 9. Conformação de menor energia para o complexo de transição heme-QHS parcialmente solvatado, onde as ligações de hidrogênio aparecem em verde e a artemisinina em cores

A conformação de menor energia do complexo parcialmente solvatado possui seis ligações de hidrogênio entre as moléculas de água, e seis entre as moléculas de água e os grupos propionato, como pode ser visto na Figura 9. Segundo Jeffrey⁴⁰, estas interações são moderadamente fortes, com energias variando entre 4 e 15 kcal mol⁻¹. É razoável esperar que as moléculas de água na vizinhança dos grupos carboxílicos formem ligações de hidrogênio com os mesmos e entre si. Esta seria a situação esperada no interior da célula do parasita. Portanto, estas ligações de hidrogênio observadas dificilmente se constituiriam em um artefato do método PM3. Foram detectadas também uma ligação de hidrogênio fraca entre uma molécula de água e

um grupo propionato e outras seis interações C-H...O entre as moléculas de água e os grupos hidrofóbicos do heme. Todas estas interações mencionadas conferem maior estabilidade ao complexo.

Foi feito um cálculo semi-empírico (PM3) para a molécula de água e obtido o seu calor de formação (-53,43 kcal mol⁻¹). Um simples cálculo deste valor juntamente com os calores de formação dos complexos parcialmente solvatados ($\Delta H_f = -702,39$ kcal mol⁻¹) e no vácuo ($\Delta H_f = -100,86$ kcal mol⁻¹) mostra que a energia de interação água – complexo QHS-heme é -67,23 kcal mol⁻¹. Foi feita uma análise mais detalhada das energias das ligações de hidrogênio e outras interações intermoleculares água-heme, e os resultados encontram-se na Tabela 1. Esta Tabela contém uma descrição da natureza da interação envolvida, enquanto que a segunda e terceira colunas contêm, respectivamente, o número e as distâncias características de cada tipo de interação. As duas últimas colunas mostram, em detalhes, as estimativas das energias envolvidas no processo de formação do complexo (pelos métodos 1 e 2), onde os valores atribuídos às contribuições das ligações de hidrogênio moderadamente fortes foram extraídos de diferentes fontes da literatura^{40,42,43}. Conforme os resultados da Tabela 1, uma ligação de hidrogênio moderadamente forte contribui para a estabilidade do complexo com 4-5 kcal mol⁻¹, enquanto que a ligação de hidrogênio fraca contribui com 0,5 kcal mol⁻¹ e uma interação C-H...O com 1-2 kcal mol⁻¹. No total, as energias destas interações foram estimadas como sendo 3 kcal mol⁻¹ menor (quando calculada pelo método 1) e quase 4 kcal mol⁻¹ maior (quando calculada pelo método 2) que o valor obtido pelo método PM3 (-67,23 kcal mol⁻¹). Em resumo, estas energias estimadas para cada interação em particular estão de acordo com as sugeridas por Jeffrey⁴⁰.

O potencial eletrostático para o complexo parcialmente solvatado é semelhante ao obtido para o complexo no vácuo (resultado não mostrado). Observou-se que as partes polares e hidrofóbicas (grupos metil) da artemisinina estão direcionadas, respectivamente, para as partes polares e hidrofóbicas do heme em ambos os complexos. Houve apenas uma pequena rotação da artemisinina (7,97°) com respeito ao complexo no vácuo, que é visível quando se superpõem as estruturas dos dois complexos (Figura 10). Esta pequena rotação é decorrente do aparecimento das interações heme-água e, por conseguinte, afeta as interações mais fracas intermediadas por átomos de hidrogênio, que são aquelas do tipo C-H...N,C(π).

Tabela 1. Estimativa aproximada das energias de interação não covalentes envolvendo o átomo de hidrogênio, no complexo de transição heme-artemisinina parcialmente solvatado

Tipo de interação	Número de interações	Distâncias características / Å	Energia / kcal mol ⁻¹ , método 1	Energia / kcal mol ⁻¹ , método 2
Ligações de hidrogênio moderadamente fortes (água-água)	6	1,78-1,79 ^a	-30,11 ^c	-27,06 ^e
Ligações de hidrogênio moderadamente fortes (água-propionato)	6	1,78-1,79 ^a	-30,76 ^d	-27,06 ^e
Ligações de hidrogênio fracas (água-propionato)	1	2,70 ^a	-0,53 ^d	-0,53 ^d
Interações C-H...O (água-heme)	6	3,33-3,74 ^b	-8,79 ^f	-8,79 ^f
Total	19	-	-70,19	-63,44
Diferença (estimado - PM3)	-	-	-2,96	+3,79

^aDistância H...O; ^bDistância C...O; ^cFoi usado o potencial empírico de Gavezzotti para a ligação de hidrogênio com álcool⁴²: E/kcal mol⁻¹ = 4509750*exp(-7,78*R/Å) - 298*(R/Å)⁻⁶, onde R é a distância H...O em Å; ^dFoi usado o potencial empírico de Gavezzotti para a ligação de hidrogênio com ácido carboxílico⁴²: E/kcal mol⁻¹ = 6313670*exp(-8,75*R/Å) - 205*(R/Å)⁻⁶, onde R é a distância H...O em Å; ^eO valor -4,51 kcal mol⁻¹ de energia de interação água-água⁴³ foi usada para todas ligações de hidrogênio moderadamente fortes; ^fA função de potencial foi estabelecida baseando-se nos dados da literatura⁴³ para interação C-H...O (valina-água): E/kcal mol⁻¹ = -3,35 + 2,5 *(R/Å) para R > 3,35 Å e E/kcal mol⁻¹ = -3,35 - 2,5 *(R/Å) para R < 3,35 Å. R é a distância C...O em Å.

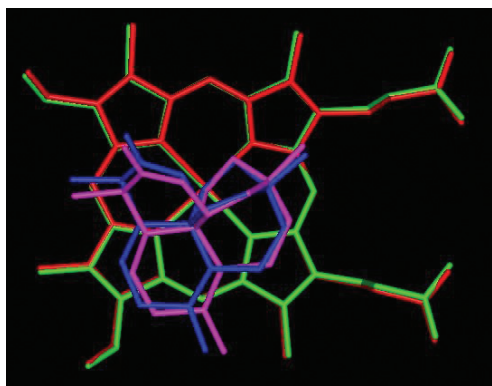


Figura 10. Visão estérica da sobreposição dos complexos de transição heme-artemisinina no vácuo (heme em vermelho e artemisinina em azul) e parcialmente solvatado (heme em verde e artemisinina em magenta)

Um estudo mais acurado e minucioso utilizando métodos *ab initio* é recomendado para futuras investigações da interação existente entre o heme e artemisininas.

Os resultados da análise conformacional do complexo no vácuo, como mostrado neste trabalho, são quase idênticos aos da literatura¹⁴. Por outro lado, a inclusão das moléculas de água pode provocar variações visíveis mas não substanciais no ângulo diedro C-Fe-O1-O2, que irão afetar interações não covalentes entre o heme e a artemisinina (C-H•••π, hidrofóbicas, de dispersão, de correlação eletrônica, etc). Este fenômeno pode ser considerado como um efeito solvente do reconhecimento molecular QHS-heme. Esperase um comportamento semelhante da artemisinina e também de seus derivados nos sistemas aquosos biológicos.

Estendendo os resultados obtidos para os derivados da artemisinina, deve-se considerar a influência que a presença de substituintes e outras transformações estruturais na artemisinina podem causar no perfil de energia potencial dos complexos heme-derivados da artemisinina. Um impedimento estérico da ligação peróxido vai influenciar negativamente na atividade biológica dos derivados da artemisinina^{18,19,44,45}. Conseqüentemente, estes complexos terão diferente estabilidade e reatividade e, portanto, uma diferente atividade biológica, em comparação com a artemisinina. As características do complexo de transição heme – derivados de artemisinina são cruciais para sua atividade biológica e, portanto, importantes do ponto de vista computacional. Concluindo, a atividade biológica das artemisininas por intermédio do seu reconhecimento molecular e ativação pelo heme é muito mais afetada por mudanças estruturais na artemisinina que por efeitos do solvente.

CONCLUSÕES

Após o estudo teórico da interação existente entre a artemisinina e o heme, usando o método semi-empírico PM3, chegou-se à conclusão de que as interações mais efetivas entre os átomos de H da artemisinina e o anel porfirínico do heme ocorrem nos átomos de H ligados aos átomos de carbono C9, C8a, C5a, C4 e C7 da QHS. Estas interações são importantes, especialmente para o reconhecimento molecular da artemisinina pelo heme. Assim, todas essas interações estabilizam a estrutura do complexo, fazendo com que a reatividade e a atividade do fármaco sejam efetivas durante sua ação no meio biológico. O ângulo diedro do complexo artemisinina-heme no vácuo é de 51,90° e no complexo hidratado é de 43,93°. As moléculas de água interagem com o heme através de seis ligações de hidrogênio moderadamente fortes, uma ligação de hidrogênio fraca e seis interações C-H•••O.

A parte polar da artemisinina, que compreende a região na qual se encontram os átomos de oxigênio, está do lado oposto ao grupo propionato do heme. Este fato foi observado em ambos os estudos, isto é, cálculos no vácuo e na presença de água, o que está de acordo com os conhecimentos químicos.

Os resultados obtidos neste trabalho concordam com os obtidos na literatura e com a intuição química. A água interage com o heme por meio dos grupos propionato no interior do parasita. Este trabalho teve como um dos objetivos estudar este aspecto; os resultados obtidos se mostraram satisfatórios. A atividade biológica das artemisininas é muito mais afetada por mudanças estruturais na artemisinina que por efeitos do solvente.

AGRADECIMENTOS

Ao CENAPAD-SP e FAPESP pelo suporte proveniente de recursos computacionais para os cálculos semi-empíricos e à pesquisadora Dra K. F. M. Pasqualato pelo auxílio dado em alguns cálculos.

REFERÊNCIAS

- World Health Organization (WHO); *The World Health Report 2002: reducing risks, promoting healthy life*, Geneva, 2002.
- www.estadao.com.br/ciencia/noticias/2002/jul/12/16.htm, acessada em Setembro 2003.
- Bowman, S.; Lawson, D.; Brown, D.; Chillingworth, T.; Churcher, C. M.; Craig, A.; Davies, R. M.; Devlin, K.; Squares, R.; Squares, S.; Sulston, J. E.; Whitehead, S.; Woodward, J. R.; Newbold, C.; Barrell, B. G.; *Nature* **1999**, *400*, 532.
- O'Neill, P. M.; Bray, P. G.; Hawley, S. R.; Ward, S. A.; Park, B. K.; *Pharmacol. Ther.* **1998**, *77*, 29.
- Francis, S. E.; Sullivan, D. J.; Goldberg, D. E.; *Annu. Rev. Microbiol.* **1997**, *51*, 97.
- Slater, A. F. G.; *Pharmacol. Ther.* **1993**, *57*, 203.
- Moore, D. V.; Lanier, J. E.; *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1961**, *10*, 5.
- Mockenhaupt, F. P.; *Parasitol. Today* **1995**, *11*, 248.
- Klayman, D. L.; *Science* **1985**, *228*, 1049.
- China Cooperative Research Group on Qinghaosu and Its Derivatives as Antimalarials, Chemical Studies on Qinghaosu (Artemisinine); *J. Trad. Chin. Med.* **1982**, *2*, 3.
- Tonmuphean, S.; Parasuk, V.; Kokpol, S.; *J. Mol. Graphics Modell.* **2001**, *7*, 26.
- Pinheiro, J. C.; Ferreira, M. M. C.; Romero, O. A. S.; *J. Mol. Struct. (Theochem)* **2001**, *572*, 35.
- Pinheiro, J. C.; Kiralj, R.; Ferreira, M. M. C.; *QSAR Comb. Sci.* **2003**, *22*, 830.
- Tonmuphean, S.; Parasuk, V.; Kokpol, S.; *Quant. Struct. Act. Relat.* **2000**, *19*, 475.
- Cheng, F.; Shen, J.; Luo, X.; Zhu, W.; Gu, J.; Ji, R.; Jiang, H.; Chen, K.; *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 2883.
- Avery, M. A.; Alvim-Gaston, M.; Rodrigues, C. R.; Barreiro, E. J.; Cohen, F. E.; Sabnis, Y. A.; Woolfrey, J. R.; *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 292.
- Grigorov, M.; Weber, J.; Tronchet, J. M. J.; Jefford, C. W.; Milhous, W. K.; Maric, D.; *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1997**, *37*, 124.
- Posner, G. H.; Cummings, J. N.; Ploypradith, P.; Oh, C. H.; *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5885.
- Posner, G. H.; Oh, C. H.; Wang, D.; Gerena, L.; Milhous, W. K.; Meshnick, S. R.; Asawamahasadka, W.; *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1256.
- Krishna, S.; Uhlemann, A. C.; Haynes, R. K.; *Drug Resist. Updates* **2004**, *7*, 233.
- Robert, A.; Benoit-Vical, F.; Meunier, B.; *Coord. Chem. Rev.* **2005**, *249*, 1927.
- Robert, A.; Cazelles, J.; Meunier, B.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 1954.
- Meshnick, S. R.; *Int. J. Parasitol.* **2002**, *32*, 1655.
- Shukla, K. L.; Gund, T. M.; Meshnick, S. R.; *J. Mol. Graphics Modell.* **1995**, *13*, 215.
- Tonmuphean, S.; Parasuk, V.; Kokpol, S.; *J. Mol. Struct. (Theochem)* **2005**, *724*, 99.
- Stewart, J. J. P.; *J. Comput. Chem.* **1989**, *10*, 209.
- PC Spartan Pro, Wavefunction, Inc., 1999.
- Titan; version 1; Wavefunction; Inc.; Irvine, 2000.
- Waller, D. A.; Liddington, R. C.; *Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Sci.* **1990**, *46*, 409.
- http://www.rcsb.org/pdb/, acessada em Agosto 2005.

31. Lisgarten, J. N.; Potter, B. S.; Bantuzeko, C.; Palmer, R. A.; *J. Chem. Crystallogr.* **1998**, *28*, 539.
32. The Cambridge Structural Database (November 2004 Release), Cambridge Crystallographic Data Centre, University of Cambridge, Cambridge, UK.
33. *Matlab*, Mathworks Inc., Natick, M. A., 1998.
34. Szabo, A.; Ostlund, N. S.; *Modern Quantum Chemistry: Introduction to Advanced Electronic Structure Theory*, McGraw-Hill: New York, 1989.
35. Jensen, F.; *Introduction to Computational Chemistry*, John Wiley & Sons: New York, 1999.
36. Clark, T.; *A Handbook of Computational Chemistry*, John Wiley & Sons: New York, 1985.
37. Levine, I. N.; *Quantum Chemistry*, Prentice-Hall: New Jersey, 1991.
38. Wu, W.-M.; Wu, Y.; Wu, Y.-L.; Yao, Z.-J.; Zhou, C.-M.; Li, Y.; Shan, F.; *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3316.
39. Nishio, M.; Hirota, M.; Umezawa, Y.; *The CH/π Interaction*, Wiley-VCH: New York, 1998.
40. Jeffrey, G. A.; *An Introduction to Hydrogen Bonding*, Oxford University Press: New York, 1997.
41. Ziegler, J.; Chang, R. T.; Wright, D. W.; *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2395.
42. Gavezzotti, A.; *Acc. Chem. Res.* **1994**, *27*, 309.
43. Scheiner, S.; Kar, T.; Gu, Y.; *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 9832.
44. Woolfrey, J. R.; Avery, M. A.; Doweyko, A. M.; *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1998**, *12*, 165.
45. Posner, G. H.; Oh, C. H.; *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8328.