

Estudo e determinação teórica de propriedades físico-químicas de fármacos anti-hipertensivos inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina

Cruz, L.R.¹; Souza, E. de^{2*}

¹Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

²Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

Recebido 25/03/2010 / Aceito 09/08/2010

RESUMO

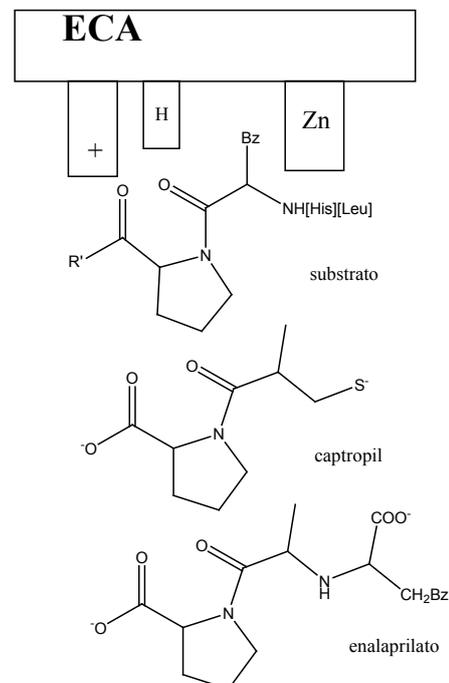
O pacote de softwares SpartanTM vs 04 foi utilizado para calcular algumas propriedades físico-químicas de uma série de inibidores da Enzima Conversora de Angiotensinogênio ECA. Simultaneamente, o pacote MarvinSketch 5.0.0 foi empregado para calcular o Coeficiente de Partição P dos inibidores. Através da análise dos resultados, conclui-se que: a) o arranjo termodinâmico mais estável desses inibidores mimetiza aquele dos resíduos pré-terminais da angiotensina II, b) há grande similaridade entre as cargas dos átomos que se ligam à macromolécula e c) os cálculos mostram diferenças significativas entre os valores de P para os inibidores. Portanto, as diferenças farmacológicas existentes entre os inibidores estão mais intimamente relacionadas ao coeficiente de partição do que à capacidade destes de inibir o sítio ativo da ECA.

Palavras-chave: ECA. Ab initio. Equilíbrio conformacional. Lipofilicidade

INTRODUÇÃO

O Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA) é ativado em resposta à redução da pressão arterial. Por sua vez, a ativação desse sistema produz uma série de respostas que atuam de forma a restaurar a pressão arterial ao seu valor normal. Uma das etapas desse sistema é a conversão da angiotensina I em angiotensina II, reação catalisada pela Enzima Conversora de Angiotensina (ECA, do inglês ACE – *Angiotensin Converting Enzyme*). Alguns fármacos que bloqueiam a resposta fisiológica são antagonistas dessa enzima e foram desenvolvidos com o

objetivo de tratar pacientes hipertensivos (Pina & Roque, 2009). O primeiro entre esses fármacos foi o captopril, derivado de estudos sobre os efeitos do veneno de jararaca, *Bothrops jararaca*, em humanos. Esse fármaco mimetiza os aminoácidos prolina e fenilalanina presentes na angiotensina I e inibe, quando se liga à enzima, a clivagem dos dois últimos aminoácidos da angiotensina I, histidina, leucina e, conseqüentemente, todo o SRAA, como mostrado na Figura 1 (Cushman et al., 1977; Redelinghuys et al., 2005). A partir desses estudos, uma série de fármacos carboxialcanoílicos e mercaptoalcanoílicos foi produzida com o intuito de inibir a clivagem da angiotensina I em angiotensina II, no SRAA (Brunton et al., 2006).



R'=[As][Arg][Val]{Tyr}[Ile][His] -

Figura 1 Sítio ativo da ECA, pontos de ligação com os ligantes, substrato endógeno e dois inibidores.

O reconhecimento molecular do fármaco pela enzima depende do arranjo espacial dos grupamentos funcionais e das propriedades estruturais do inibidor, que devem ser complementares ao sítio receptor em casos de inibições competitivas (Brew, 2003). Esse reconhecimento é fundamental para que a inibição seja eficiente. Por exemplo, a ECA contém zinco e, portanto, é necessário que o inibidor possua um grupo funcional capaz de interagir com esse metal (Cushman et al., 1977). Nessa mesma linha, um sítio carregado positivamente em uma enzima implicaria na existência de um sítio de alta densidade eletrônica em seus possíveis inibidores. Ainda no que concerne ao arranjo molecular dos grupos, é essencial o estudo do equilíbrio conformacional cis-trans, pois este se relaciona à probabilidade do “encaixe” entre a enzima e o inibidor (Thorsett et al., 1986), como mostra a Figura 2.

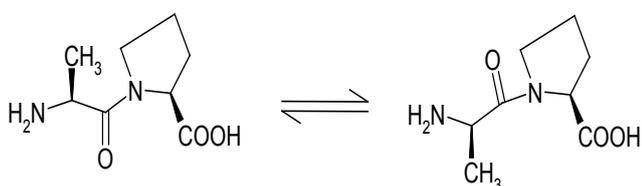


Figura 2 Equilíbrio conformacional da N-alanilprolina.

No planejamento da síntese desses fármacos, é necessário, também, considerar a forma de eliminação dos mesmos. A lipofilicidade de um fármaco é definida pelo seu coeficiente de partição, verificada entre uma fase aquosa e uma fase orgânica (geralmente o octanol) e está intimamente ligada à eliminação de fármacos. Já o coeficiente de partição é definido como a razão entre a concentração da substância na fase orgânica e sua concentração na fase aquosa, em um sistema em equilíbrio (Ranadive et al., 1992). Os fármacos que apresentam maior coeficiente de partição e, conseqüentemente, maior lipofilicidade, podem apresentar a circulação entero-hepática, o que pode ser um fator favorável em alguns estados patológicos, como o de insuficiência renal. Por exemplo, no caso de fármacos que atuam no SRAA, deve-se levar em conta que os pacientes que sofrem de hipertensão podem, muito possivelmente, sofrer de (ou apresentar sintomas associados à) disfunção renal. Logo, o tratamento com um fármaco pode causar sérios problemas colaterais ou invalidar o tratamento como um todo, caso esses possuam uma rota de excreção predominantemente renal, como acontece com os fármacos tiólicos, similares ao captopril, e carboxialcanoílicos, similares ao enalapril (Marshall et al., 1989). Essas considerações e problemas estão, por exemplo, na base do planejamento e do desenvolvimento de um fármaco, o utibapril, no qual a substituição da prolina por um grupo tiadiazólico favoreceria uma excreção essencialmente biliar do mesmo (Bennion et al., 1991; Buijema, 1997).

Em suma, o planejamento deve levar em conta o provável coeficiente de partição do fármaco, por este ser uma indicação da transferência da substância através de uma membrana lipoproteica e, portanto, uma indicação da eficácia desse inibidor. Considerando o exposto, o

planejamento de um fármaco tem de passar pela previsão de várias das suas propriedades físico-químicas e não mais, como acontecia, pela determinação das mesmas “após a síntese” dos compostos em questão, uma abordagem dispendiosa envolvendo erros e acertos. Ou seja, é primordial se empregar, no mínimo para economia de tempo e dinheiro, os mais variados e adequados recursos disponíveis do campo da química computacional na previsão das propriedades físico-químicas de determinados alvos, bem como para o planejamento de rotas sintéticas plausíveis (Barreiro & Fraga, 2008).

MATERIAL E MÉTODOS

Cálculos semiempíricos e *ab initio*

Como um todo, foi utilizado o pacote de programas Spartan™ vs 04' (Wavefunction, Inc., Irvine, CA) para os cálculos. O método semiempírico utilizado foi o PM3 (parametric method 3) e o *ab initio* foi, primordialmente, o Hartree-Fock 3.21G. Através desses programas, foram feitos o estudo da estabilidade conformacional, a otimização geométrica e a determinação computacional das propriedades termodinâmicas, incluindo o valor das cargas eletrostáticas dos átomos que potencialmente se ligam aos pontos de contato do sítio ativo da ECA.

Com o mesmo pacote de programas e utilizando o método *ab initio* Hartree-Fock com a base 6.31G, as propriedades termodinâmicas dos fármacos enalapril e captopril (Figura 3) foram determinadas. Para esses fármacos, também se fez a otimização geométrica, obtendo-se os fossos de energia para os conformeros cis e trans, os perfis de energia dos conformeros gerados a partir de possíveis rotações em torno da ligação C-N amídica e as extensões da prevalência entre os isômeros desses compostos.

Os fármacos captopril e lisinopril, os pró-fármacos enalapril, benazepril, fosinopril, quinapril, e utibapril, bem como seus respectivos fármacos ativados enalaprilato, benazeprilato, fosinoprilato, quinaprilato e utibaprilato (Figuras 3 e 4), foram submetidos a cálculos de equilíbrio geométrico e posterior determinação das respectivas energias de formação e afins, ambos feitos pela suite Spartan 04' com o método *ab initio* Hartree-Fock 3.21G.

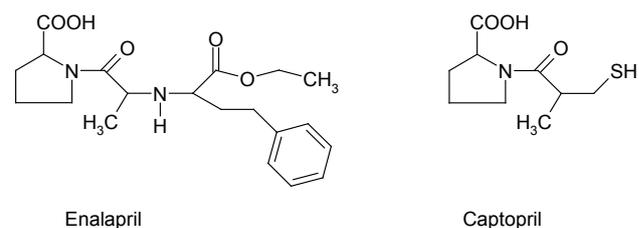


Figura 3 Enalapril e Captopril.

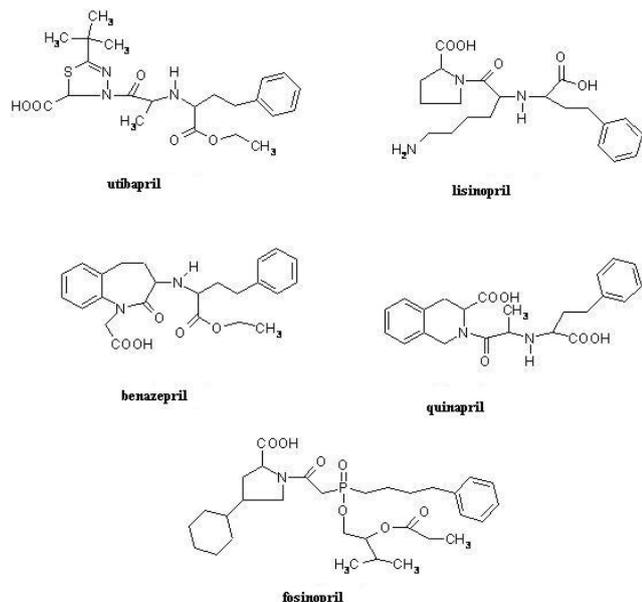


Figura 4 Lisinopril, Utibapril, Benazepril, Quinapril e Fosinopril.

Tendo em vista o sítio ativo da ECA e os locais de ligação do inibidor, as cargas de cada átomo dos fármacos e pró-fármacos foram calculadas e analisadas de acordo com a carga do local de ligação na enzima (Figura 5).

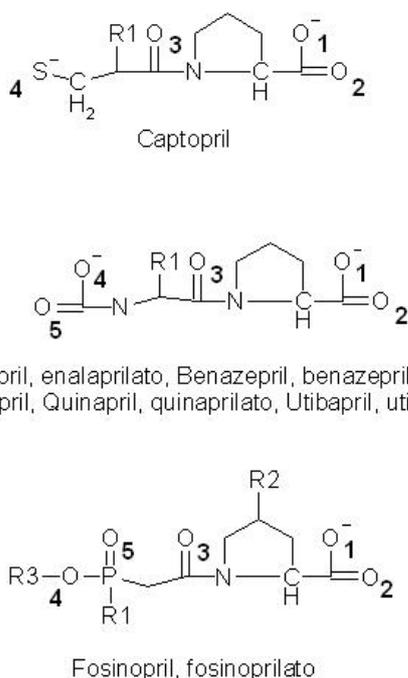


Figura 5 Átomos de oxigênio que se ligam à ECA.

Lipofilicidade

Nesse trabalho, utilizou-se o pacote de programas MarvinSketch Version 5.0.0 (ChemAxon Ltd., <http://www.chemaxon.com>) para a determinação do coeficientes de partição dos fármacos e pró-fármacos estudados.

RESULTADOS

Otimização geométrica de Captopril e Enalapril

A partir da otimização geométrica dos fármacos captopril e enalapril, bem como da determinação dos mínimos de energia, concluiu-se que não há uma rotação livre em torno da ligação amídica dos fármacos. Ou seja, existe uma conformação em comum mais estável para os dois fármacos (Green et al., 1991), notadamente para o enalapril (Figura 2), e uma barreira rotacional muito grande que torna, em termos termodinâmicos, improvável a conversão destes nos confôrmeros menos estáveis.

Ou seja, através da análise dos dados da Tabela 1, que foram encontrados a partir dos mínimos de energia e da determinação da extensão dos isômeros cis e trans de cada fármaco, conclui-se que o fármaco captopril apresenta-se praticamente na mesma extensão para os dois isômeros. Por sua vez, o confôrmero trans do enalapril apresenta $\xi = 0.95$ (95% da população). Desse forma, pode-se dizer que o arranjo trans é o predominante.

Tabela 1 Propriedades termodinâmicas molares, variação da Energia Livre, constantes de equilíbrio e extensão dos isômeros dos fármacos Captopril e Enalapril, medidas a 298.15 K e 1.00 atm

	Entalpia kJ/mol	Entropia J/mol.K	Cv J/mol.K	Energia livre kJ/mol	$\Delta G_{cis-trans}$ kJ/mol	K	ξ
trans-Captopril	718.65	512.87	213.94	565.74	0,1	0.96	0.49
cis-Captopril	718.56	512.91	213.84	565.63			
trans-Enalapril	1391.68	766.64	393.31	1163.10	-7.14	17.82	0.95
cis-Enalapril	1392.16	792.22	394.20	1155.96			

Propriedades termodinâmicas dos inibidores

A Energia Livre das conformações de menor energia de cada fármaco estão na Tabela 2. As cargas eletrostáticas (da função *electrostatic charges* do programa MarvinSketch Version 5.0.0 e do método *ab initio* pertinente) dos oxigênios que supostamente se ligam ao sítio ativo são mostradas na Tabela 3. De um modo geral, não se notam significativas variações na distribuição de cargas eletrônicas entre os átomos dos fármacos que se ligariam aos pontos seletivos do sítio ativo da ECA. Por exemplo, a carga no oxigênio da carbonila amídica no captopril (oxigênio 3, Figura 5) é de -0.609 e no mesmo oxigênio do benazepril é de -0.644 (~6 % de diferença).

Tabela 2 Energia Livre dos fármacos estudados a 298.15 K e 1.00 atm. Parâmetros: [Cl⁻] = 0.1; [K⁺,Na⁺] = 0.1

Inibidores	Energia Livre kJ/mol
Captopril	563.42
Enalapril	1167.15
Lisinopril	1356.03
Benazepril	1229.94
Quinapril	1217.70
Fosinopril	1868.59
Utibapril	1275.30

Tabela 3 Cargas eletrostáticas dos átomos de oxigênio que se ligam à ECA a 298.15 K e 1.00 atm

Cargas eletrônicas	O1	O2	O3	O4	O5
Captopril	-0.769	-0.617	-0.609	-0.318 (S4)	-
Enalapril	-0.677	-0.649	-0.584	-0.440	-0.633
Enalaprilato	-0.827	-0.702	-0.642	-0.759	-0.698
Benazepril	-0.813	-0.621	-0.644	-0.669	-0.670
Benazeprilato	-0.812	-0.626	-0.666	-0.818	-0.624
Lisinopril	-0.792	-0.596	-0.754	-0.751	-0.672
Quinapril	-0.798	-0.607	-0.674	-0.643	-0.680
Quinaprilato	-0.795	-0.606	-0.680	-0.849	-0.654
Utibapril	-0.769	-0.580	-0.541	-0.562	-0.662
Utibaprilato	-0.771	-0.578	-0.553	-0.767	-0.673
Fosinopril	-0.826	-0.621	-0.684	-0.741	-0.823
Fosinoprilato	-0.585	-0.631	-0.648	-0.961	-1.046

Lipofilicidade

Os coeficientes de partição ($\log P$) de cada fármaco e pró-fármaco são mostrados na Tabela 4. O pró-fármaco fosinopril e seu correspondente hidrolisado, o fosinoprilato, apresentam um alto coeficiente de lipofilicidade, confirmando dados de que o fosinopril apresenta as duas formas de excreção: biliar e renal (Goodman, 2007).

O utibaprilato, obtido através da hidrólise do utibapril, tem o maior coeficiente de partição (4.15) e é eliminado pela via biliar, preferencialmente (Remko, 2007; Bennion et al., 1991; Carr et al., 1990). Por outro lado, o captopril, com um coeficiente de 0.51, e o enalapril, com um coeficiente de 2.10, confirmam que a baixa lipofilicidade está diretamente ligada à excreção pela via renal.

Tabela 4 Valores de $\log P$ para os pró-fármacos e seus respectivos fármacos medidos a 298.15 K e 1.00 atm. Parâmetros: $[Cl^-] = 0.1$; $[K^+, Na^+] = 0.1$.

Compostos	$\log P_{\text{calculado}}$	$\log P_{\text{experimental}}$	Classificação quanto à eliminação
Benazepril	3.30	-	-
Benazeprilato	2.92	-	Renal
Captopril	0.51	0.34	Renal
Enalapril	2.10	-	-
Enalaprilato	1.73	-0.74	Renal
Lisinopril	1.49	-1.22	Renal
Quinapril	3.53	-	-
Quinaprilato	3.16	-	Renal
Fosinopril	3.67	>5	-
Fosinoprilato	1.18	3.69	Renal e biliar
Utibapril	4.52	-	-
Utibaprilato	4.15	-	Biliar

DISCUSSÃO

Dado o grande aumento da qualidade e eficiência dos computadores e programas para cálculos estruturais e

propriedades físico-químicas de substâncias, não é surpresa que simulações computacionais tenham se tornado passo essencial no planejamento de fármacos. Por outro lado, esse planejamento e essas simulações passam, necessariamente, pelo crivo da sua confiabilidade, mostrando suas capacidades de se reproduzirem e se tornarem instrumentos para a explicação do comportamento e das propriedades reais dessas substâncias ou de grupos afins.

Cálculos *ab initio* e semiempíricos são recursos da química computacional utilizados para vários fins, inclusive na determinação das propriedades físico-químicas relevantes em planejamentos de fármacos. O método semiempírico utiliza parâmetros pré-determinados, baseados em dados experimentais, e ignora algumas das soluções empregadas na Equação de *Schrödinger*. Por outro lado, o método *ab initio* está associado ao cálculo de inúmeras integrais e, conseqüentemente, requer maior demanda computacional e de tempo.

No presente estudo, os métodos semiempíricos serviram como guia aos cálculos *ab initio*. Os primeiros foram utilizados por apresentarem resultados qualitativos altamente condizentes com estudos já publicados para esse grupo de inibidores e os métodos *ab initio* por serem particularmente úteis na determinação de propriedades moleculares inacessíveis experimentalmente e para a interpretação de dados experimentais (Folkers et al., 2008).

As metodologias mistas deste trabalho, empregadas no estudo teórico de uma série de fármacos e pró-fármacos com reconhecida atividade inibidora da ECA, levam às seguintes conclusões: esses inibidores coexistem em duas formas com relação à distribuição dos grupos em torno da ligação amídica; os confôrmeros mais estáveis são aqueles denominados “trans”, em que a carbonila amídica e a carboxila α a esse grupo se encontram em posições opostas; esses confôrmeros são, de fato, verdadeiros isômeros geométricos, já que a rotação em torno da ligação amídica desses compostos é proibida em termos termodinâmicos; a densidade eletrônica dos sítios passíveis de interagir com o sítio ativo da ECA é, basicamente, a mesma em todos os fármacos e pró-fármacos estudados e, por sua vez, o coeficiente de partição desses fármacos e pró-fármacos varia significativamente no conjunto estudado.

Em suma, o estudo teórico indica, com base somente nas propriedades físico-químicas calculadas, que esses fármacos possuem a mesma capacidade de interação com o sítio ativo da ECA. Entretanto, Patrick (1998) relata que, no desenvolvimento do enalapril, a presença do substituinte benzila favorece a interação deste com um sítio hidrofóbico na proteína. Esta interação aumentou em mais de 1.000 vezes a potência inibitória do enalapril em relação ao seu precursor. No estudo, não se encontrou esse resultado, pois os métodos utilizados não preveem as interações hidrofóbicas entre os fármacos e a macromolécula. Programas que promovem a compreensão dos mecanismos de reconhecimento molecular receptor-ligante poderiam ser mais eficientes para prever essas interações. Especificamente, métodos de *docking* receptor-ligante são peça-chave na área de Desenho Racional de fármacos Baseado em Estrutura (DRBE) (Scherrer & Howard, 1977). Esse método consiste na predição do modo de ligação de uma pequena molécula ligante (inibidor) na região de ligação (sítio ativo) de um alvo molecular, bem

como na quantificação da afinidade da ligação entre o receptor e o ligante.

Assim, o planejamento molecular e o desenvolvimento racional de fármacos (inclui-se aqui todos os processos, como predição e modificação de propriedades físico-químicas, desenho racional baseado em estrutura, relação estrutura-atividade, entre outros) são estratégias modernas utilizadas por indústrias e laboratórios para a obtenção de novos compostos biologicamente ativos.

ABSTRACT

Theoretical study and determination of physicochemical properties of antihypertensive angiotensin-converting enzyme inhibitors

The software package Spartan™ 4.0 was employed to calculate some physicochemical properties of a series of available ACE inhibitors. Simultaneously, the program MarvinSketch 5.0.0 was employed to calculate the partition coefficients (P) of the same compounds. After analyzing the results, we conclude that: a) from a thermodynamic point of view, the most stable conformer of each inhibitor resembles, as expected, the most stable spatial arrangement of the preterminal residues of angiotensin II; b) there is great similarity among the charge profiles of the potential binding sites of all the inhibitors; c) there are large differences in P among these compounds. Summing up, the pharmacological differences reported between the inhibitors are more closely linked to their lipophilic properties than to their capacity to block the ACE active center.

Keywords: ACE. Ab initio. Conformational equilibrium. Lipophilicity.

REFERÊNCIAS

- Barreiro EJ, Fraga CAM. Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos. 2ª ed. Porto Alegre: Art Med Editora; 2008.
- Bennion C, Brown RC, Cook AR, Manners CN, Payling DW, Robinson DH. Design, synthesis, and physicochemical properties of a novel conformationally restricted 2,3-dihydro-1,3,4-thiadiazole- containing angiotensin converting enzyme inhibitor which is preferentially eliminated by the biliary route in rats. *J Med Chem.* 1991;34(1):439-47.
- Brew K. Structure of human ACE gives new insights into inhibitor binding and design. *Trends Pharmacol Sci.* 2003;24(8):391-4.
- Brunton LL, Lazo JS, Parker KL, Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica. 11ª ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill; 2006.
- Buijema H, Geel PP van, Gilst WH van, Graeff PA, Langen CDJ, Rooks G, Pinto YM. Differential inhibition of plasma versus tissue ACE by Utibapril: biochemical and functional evidence for inhibition of vascular ACE activity. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1997;29(5):684-91.
- Carr RD, Cooper AE, Hutchinson R, Mann J, O'Connor SE, Robinson DH, Wells E. Preferential biliary elimination of FPL 63547, a novel inhibitor of angiotensin-converting enzyme, in the rat. *Br J Pharmacol.* 1990;100:90-4.
- Carr RD, Higgs L, Killenglack PG, Nicol AK, O'Connor SE, Simpson WT, Wells E. Pharmacological properties of FPL 63547, a novel inhibitor of angiotensin converting enzyme. *Br J Pharmacol.* 1990;100:83-9.
- Cushman DW, Cheung HS, Sabo EF, Ondetti MA. Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme. *Biochemistry* 1977;16:5484-91.
- Folkers G, Höltje HD, Sippl W, Rognan D. Molecular modeling: basic principles and applications. 3ª ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2008.
- Goodman LS. Manual of pharmacology and therapeutics. 11th. ed. New York: Macmilan; 2007.
- Green DVS, Gensmantel N, Hillier IH, Morris GA, Payling DW, Robinson DH. A semiempirical molecular orbital and dynamic NMR study of conformational isomerism in angiotensin-converting enzyme inhibitors. *J Molar Struct (Theochem)* 1991;251:173-93.
- Marshall T, Williams J, Williams KM. Heterogeneity of serum creatine kinase isoenzymes MM in myocardial infarction: clinical significance and post-synthetic conversion of "abnormal" sub-bands. *Clin Chem.* 1989;35(2):206-10.
- MarvinSketch. Version 5.0.0. ChemAxon Ltd.
- Patrick GL. An Introduction to medicinal chemistry. 2nd. ed. Oxford: Oxford University Press; 1998.
- Pina AS, Roque ACA. Studies on the molecular recognition between bioactive peptides and angiotensin-converting enzyme. *J Mol Recognit.* 2009;22:162-8.
- Ranadive SA, Chen AX, Serajuddin ATM. Relative lipophilicities and structural-pharmacological considerations of various angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors. *Pharm Res.* 1992;9(11):1480-506.
- Redelinghuys P, Nchinda AT, Sturrock ED. Development of domain-selective angiotensin I-converting enzyme inhibitors. *Ann NY Acad Sci.* 2005;1056:160-75.
- Remko M. Acidity, lipophilicity, solubility, absorption and polar surface area of some ACE inhibitors. *Chem Pap.* 2007;61(2):133-41.
- Scherrer RA, Howard SM. Use of distribution coefficients in quantitative structure-activity relations. *J Med Chem.* 1977; 20(1): 53-8.
- Spartan. Version 04. Irvine, CA: Wavefunction, Inc.
- Thorsett ED. Conformationally restricted inhibitors of angiotensin converting enzyme: synthesis and computations. *J Med Chem.* 1986; 29: 251-60.

