NOVO DERIVADO DE ESTROGÊNIO-NITROSOUREIA COMO CANDIDATO A FÁRMACO ANTINEOPLÁSICO: AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES *IN SILICO*, DOCAGEM MOLECULAR E PROPOSTA DE SÍNTESE

Gustavo Amaral Silva[1*], Gabriella da Costa Lemos Leão[1],
José Eduardo Pandini Cardoso Filho[2].

[1] Discentes de Farmácia pela Universidade Santa Cecília (UNISANTA).
[2] Docente da Universidade Santa Cecília (UNISANTA).
*E-mail: gustavoamaraldx@gmail.com.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Santa Cecília (UNISANTA), Rua Oswaldo Cruz, 277, Boqueirão, 11045-907, Santos - São Paulo, Brasil.

Resumo: A expressão de receptor de estrogênio α (ERα) em câncer de mama sugeriu a conjugação esteroide-alquilante para melhorar a terapia antineoplásica. Assim, complexos de platina ligados ao estrogênio via química *click* de azida-alcino de Cu(I) mostraram citotoxicidade, *in vitro*, superior à cisplatina, e conjugados de esteroide–nitrosoureia demonstraram resultados promissores. Porém, não foram encontradas tentativas de síntese de conjugados esteroide-nitrosoureia com química *click*. Portanto, este estudo visa prever, *in silico*, propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e *drug-likeness*, realizar docagem molecular com o ERα, e propor a síntese de um novo candidato a fármaco antineoplásico derivado de estrogênio-nitrosoureia, ligado via química *click*. As propriedades foram preditas no SwissADME. O ERα em complexo com o estrogênio foi obtido do Protein Data Bank: 1ERE. As estruturas foram preparadas no AutoDockTools 1.5.7 e no Avogadro 1.2.0. A docagem molecular foi realizada com o AutoDock 4.2.6 e analisada no Discovery Studio Visualizer v24.1.0.23298. As regras de Lipinski, Ghose, Veber e Muegge foram satisfeitas e a molécula foi classificada como *drug-like*. É esperada alta absorção oral. Foram observadas duas das três ligações de hidrogênio com os mesmos resíduos de aminoácidos que o estradiol, Arg-394 e His-524. O candidato a fármaco possui características estruturais previstas como adequadas para moléculas oralmente ativas e afinidade pelo ERα.

Palavras-chave: Compostos de Nitrosoureia; Estradiol; Química Click; Farmacocinética; Simulação de Acoplamento Molecular.

NEW ESTROGEN-NITROSOUREA DERIVATIVE AS AN ANTINEOPLASTIC DRUG CANDIDATE: EVALUATION OF IN SILICO PROPERTIES, MOLECULAR DOCKING AND PROPOSED SYNTHESIS

Abstract: The expression of estrogen receptor α (ERα) in breast cancer suggested the steroid-alkylating conjugation to improve antineoplastic therapy. Thus, platinum complexes linked to estrogen via Cu(I) azide-alkyne click chemistry showed in vitro cytotoxicity superior to cisplatin, and steroid-nitrosourea conjugates demonstrated promising results. However, no attempts were found to synthesize steroid-nitrosourea conjugates using click chemistry. Therefore, this study aims to predict, in silico, physicochemical, pharmacokinetic, and drug-likeness properties, perform molecular docking with ERα, and propose the synthesis of a new antineoplastic drug candidate derived from estrogen-nitrosourea, linked via click chemistry. The properties were predicted using SwissADME. ERα in complex with estrogen was obtained from the Protein Data Bank: 1ERE. The structures were prepared in AutoDockTools 1.5.7 and Avogadro 1.2.0. Molecular docking was performed with AutoDock 4.2.6 and analyzed in Discovery Studio Visualizer v24.1.0.23298. Lipinski, Ghose, Veber, and Muegge rules were satisfied, and the molecule was classified as drug-like. High oral absorption is expected. Two

of the three hydrogen bonds with the same amino acid residues as estradiol, Arg-394 and His-524, were observed. The drug candidate has structural characteristics predicted to be suitable for orally active molecules and affinity for ERα.

Keywords: Nitrosourea Compounds; Estradiol; Click Chemistry; Pharmacokinetics; Molecular Docking Simulation.

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama representa um desafio significativo no cenário da saúde mundial: é a neoplasia mais incidente e com o maior índice de mortalidade feminina. Estimativas do Global Cancer Observatory (Globocan), elaboradas pela International Agency for Research on Cancer (Iarc), apontam que, em 2020, ocorreram 19,3 milhões de novos casos de câncer no mundo, sendo o câncer de mama feminina o mais incidente, com 2,3 milhões de casos novos e aproximadamente 685 mil mortes em mulheres no mundo inteiro.[1] No Brasil, foram registrados, no mesmo ano, uma taxa de mortalidade de 11,84 óbitos/100.000 mulheres, sendo a primeira causa de morte por câncer na população feminina em todas as regiões, exceto na região Norte, onde o câncer do colo do útero ocupa o primeiro lugar.[2]

A maior parte dos cânceres de mama é dependente de hormônios, com células tumorais, chamadas luminais, expressando o receptor de estrogênio (ER), sendo denominados ER+. Nesses tumores, os estrogênios são sinalizadores a desempenharem um papel crucial no crescimento e progressão das células tumorais. A ação celular dos estrogênios é mediada principalmente pelos receptores nucleares ERα, ERβ e pelo receptor de membrana acoplado à proteína G (GPER, também chamado de GPR30). Os cânceres luminais são caracterizados pela expressão de ERα e a maioria dos tumores de mama expressa ERα. A expressão desregulada do ERα, sua atividade ou seus co-reguladores e genes-alvo ocupa uma posição proeminente no desenvolvimento da maioria dos cânceres de mama. Portanto, constitui um alvo interessante para a terapia antineoplásica.[3]

Nas últimas décadas, uma nova abordagem no descobrimento de agentes terapêuticos trouxe enormes avanços no processo de descoberta e desenvolvimento de antineoplásicos. Essa estratégia, chamada bioconjugação, consiste na junção de duas ou mais unidades moleculares com propriedades biológicas divergentes para formar uma nova estrutura, o "bioconjugado", que adquire as propriedades combinadas das suas unidades individuais. Nesse sentido, foi levantada a hipótese de que a conjugação dos hormônios esteroides com diferentes agentes citotóxicos poderia ser uma opção a

fim de melhorar a terapia de cânceres dependentes de hormônios, uma vez que a resposta antineoplásica é provocada diretamente no local de ação, à medida que a parte citotóxica é entregue com sucesso no local alvo pela parte esteroide. Embasado nesse conceito, foram sintetizados diversos bioconjugados ligando esteroides às moléculas citotóxicas, tais como os organometálicos e as nitrosureias.[4]

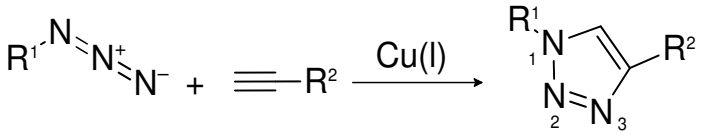
Os complexos organometálicos derivados de platina (Pt), como a cisplatina e a carboplatina, são agentes que contêm um metal, a Pt, elétron-deficiente que atrai grupos nucleofílicos ricos em elétrons do DNA (bases nitrogenadas como a guanina).[5]

Kitteringham *et al.*,[6] em 2019, exploraram a citotoxicidade, *in vitro*, de novos complexos de Pt(II) ligados ao 17β-estradiol como candidatos a fármacos antineoplásicos para o tratamento de cânceres dependentes de estrogênios. O estudo baseou-se na funcionalização desses complexos e no desenvolvimento de estratégias de conjugação a partir da química "*click*", uma nova filosofia química desenvolvida por Barry Sharpless.[7]

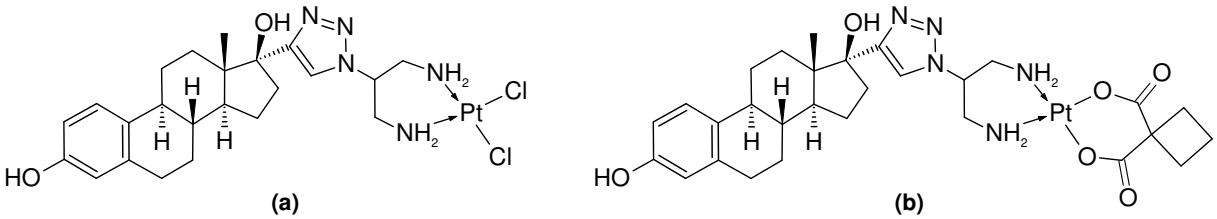
No contexto da química "*click*", Sharpless definiu os critérios que uma reação deve atender. A reação deve ser modular, abrangente em escopo, proporcionar rendimentos muito altos, gerar apenas subprodutos inofensivos que possam ser removidos por métodos não cromatográficos e ser estereoespecífica (mas não necessariamente enantiosseletiva).[7] As características necessárias do processo incluem condições de reação simples (idealmente, o processo deve ser insensível ao oxigênio e à água), materiais de partida e reagentes prontamente disponíveis, o uso de nenhum solvente ou de um solvente atóxico (como água) ou facilmente removível, e isolamento simples do produto. A purificação, se necessária, deve ser praticada por métodos não cromatográficos, como cristalização ou destilação, e o produto deve ser estável em condições fisiológicas.

A cicloadição entre azida-alcino, catalisada por Cu(I) (CuAAC), que gera o correspondente 1,4-dissubstituído 1,2,3-triazol, com excelente seletividade e alto rendimento, é sinônimo de química "*click*"[6] (Esquema 1).

Esquema 1



De forma inédita na literatura, o trabalho de Kitteringham *et al.*,[6] emprega a reação CuAAC no desenvolvimento de dois complexos ligados a esteroides para candidatos a fármacos antineoplásicos à base de Pt: [$PtCl_2$(EDiolDap)] e [Pt(CBDCA)(EDiolDap)] (Figura 1).



FONTE: Adaptado de Kitteringham, Andriollo, Gandin, Montagner e Griffith.[6]

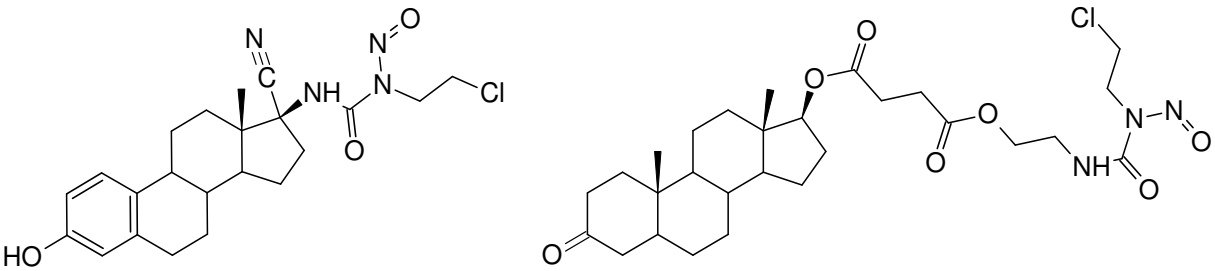
Figura 1 – Complexos de Pt(II) ligados ao 17β-estradiol; **(a)** [$PtCl_2$(EDiolDap)] e **(b)** [Pt(CBDCA)(EDiolDap)].

Os resultados do estudo de Kitteringham *et al.*[6] foram obtidos a partir da comparação realizada contra um painel de linhagens celulares humanas de câncer ER+ cervical (A431), mama (MCF-7) e ovário (2008 e A2780), bem como contra uma linhagem celular de câncer de cólon ER- (HCT-15). Ambos os complexos exibiram atividade superior em relação à cisplatina e carboplatina em cultura 2D e apresentaram aproximadamente 30 vezes mais atividade contra células ER+ em relação à linhagem de referência de câncer ER-. A cultura celular 3D é superior à tradicional 2D na modelagem de um ambiente *in vivo*. É, portanto, digno de nota que os complexos mantiveram sua atividade antineoplásica em um modelo de cultura esferoide 3D de A2780 e reduziram a viabilidade dos esferoides de células de câncer de ovário aproximadamente 9 vezes e 5 vezes melhor, respectivamente, em relação ao antineoplásico à base de Pt utilizado clinicamente, a cisplatina.

As nitrosureias são agentes alquilantes constituídos por uma função cloroetilureia ligada a um grupo nitroso. Os representantes tradicionais dessa classe química são carmustina, lomustina, semustina e estreptozocina, que são compostos que sofrem decomposição espontânea ao meio biológico, gerando duas espécies responsáveis pelos efeitos antineoplásicos. O isocianato formado reage com o nitrogênio da cadeia lateral de

resíduos de lisina em proteínas (reação de carbamoilação), podendo inativar proteínas importantes para o reparo de DNA ou para o ciclo celular. O segundo produto formado é o cloroetil-hidroxidiazeno, que culmina na formação de uma espécie altamente reativa (carbocátion), que pode ser atacado por nucleófilos, como as bases nitrogenadas do DNA, alquilando-os.[5]

Dessa forma, os derivados de nitrosoureia são agentes alquilantes estabelecidos. Conjugados de esteroide–nitrosoureia, descritos na literatura, demonstraram resultados promissores, como afinidade para o ER em útero de bezerro e alta inibição de células tumorais em carcinoma mamário de rato (Figura 2).[4]



FONTE: Adaptado de Bansal e Suryan.[4]

Figura 2 – Exemplos representativos de potentes derivados de esteroide-nitrosoureia como candidatos a fármacos antineoplásicos; **(a)** estrona e **(b)** dihidrotestosterona (DHT).

Apesar dos resultados positivos, esforços substanciais para a síntese de novos conjugados de esteroide–nitrosoureia não foram realizados nas últimas décadas.[4] Uma revisão da literatura não revelou quaisquer exemplos anteriores do uso da reação CuAAC na síntese de derivados de esteroide-nitrosoureia como potenciais agentes antineoplásicos. Assim, o presente trabalho tem como objetivo predizer as propriedades físico-químicas, farmacocinéticas, *drug-likeness* e aplicar filtros de Química Medicinal, *in silico*, proceder com uma docagem molecular com o ERα e sugerir a síntese de um novo candidato a fármaco antineoplásico derivado de estrogênio-nitrosoureia, ligado via reação CuAAC.

2. MÉTODOS

2.1. Planejamento e desenho da estrutura química

O planejamento do candidato a fármaco se embasou na revisão bibliográfica e resultados experimentais, *in vitro*, de Kitteringham *et al.*,[6] com

complexos de Pt(II) ligados ao 17β-estradiol, via reação CuAAC. A fórmula estrutural foi escrita no *software* ACD/ChemSketch (Freeware) 2023.1.2,[8] e não foi encontrada nos repositórios do PubChem, eMolecules e ChemSpider.

2.2. Avaliação das propriedades *in silico*

O candidato a fármaco foi avaliado, *in silico*, quanto às propriedades físico-químicas, farmacocinéticas, *drug-likeness* e outros filtros de químicos medicinais por intermédio da ferramenta web SwissADME,[9] utilizando a notação SMILES (*Simplified molecular-input line-entry system*) "O=NN(C(=O)NCCn1nnc(c1)[C@]1(O)CC[C@@H]2[C@]1(C)CC[C@H]1[C@H]2CCc2c1ccc(c2)O)C".

2.3. Docagem molecular

2.3.1. Preparação do ERα e do 17β-estradiol

A estrutura cristalográfica do ERα humano foi baixada do Protein Data Bank (PDB) (RCSB.org),[10] código 1ERE,[11] contendo o domínio de ligação com o ligante (LBD) em complexo com o 17β-estradiol.[12] A estrutura foi editada no *software* Discovery Studio Visualizer v24.1.0.23298,[13] com o objetivo de manter exclusivamente a cadeia de aminoácidos A, seu ligante cocristalizado e moléculas de água. A proteína foi arquivada em formato PDB. Em seguida, as interações ligante-receptor foram exibidas; o 17β-estradiol foi isolado da proteína, os hidrogênios foram adicionados e a molécula endógena foi também arquivada em PDB.

No *software* AutoDockTools 1.5.7,[14] as moléculas de água e o ligante cocristalizado foram removidos, e todos os hidrogênios foram adicionados à estrutura proteica. Na sequência, os hidrogênios não polares foram "fundidos" aos seus carbonos com a opção "*Merge Non-Polar*". Para finalizar, um total de 1,626 cargas de Kollman foram adicionadas à proteína.

2.3.2. Redocagem

A docagem molecular foi realizada com o *software* AutoDock 4.2.6.[14] A validação dos parâmetros de docagem se seguiu mediante o método de redocagem.[15] As opções da *Grid Box* foram definidas como *x-dimension: 46*, *y-dimension: 58*, *z-dimension: 56*, *x center: 9.126*, *y center: 48.12*, *z center: 130.541*. Esses números são suficientes para sobrepor os resíduos de aminoácidos que interagem com o ligante cocristalizado. Os parâmetros do algoritmo genético alterados foram *GA runs: 100*, *Population size: 300*, *Max. no of evaluations: 1000000*. Os demais

parâmetros foram aceitos como padrão e o "*Lamarckian GA(4.2)*" foi selecionado.

Após a docagem, a proteína, arquivada em PDB, e o complexo com a menor energia de ligação obtido foram sobrepostos no *software* Discovery Studio Visualizer v24.1.0.23298.[13] Estabeleceu-se que o valor do RMSD (*Root Mean Square Deviation*) entre a pose encontrada do ligante e o resultado experimental deve ser inferior a 2 Å, para que o procedimento adotado seja considerado válido.[15] Somente o 17β-estradiol foi mantido em ambas as estruturas. O RMSD foi calculado na aba "*Structure*", escolhendo-se "*RMSD*" e, enfim, "*Heavy Atoms*". O valor observado foi de 0,7632 Å, confirmando a precisão do método.

2.3.3. Preparação do ligante e docagem molecular

A geometria 3D do candidato a fármaco foi concebida e otimizada por meio do *software* Avogadro 1.2.0.[16,17] A otimização da geometria molecular foi efetuada na opção "*Auto Optimization Tool*", escolhendo-se o *Force Field* MMFF94,[18-22] e as demais configurações como padrão. Por último, a estrutura foi arquivada em PDB e a docagem molecular foi executada conforme os parâmetros previamente validados.

2.4. Proposta de síntese

A proposta de síntese do derivado de estrogênio-nitrosoureia foi fundamentada nas sínteses realizadas por Hennessy *et al.*[23] e Kitteringham *et al.*,[6] com moléculas equivalentes (em grupos funcionais). A sugestão de síntese do reagente da porção nitrosoureia, e sua inserção na molécula, foram respaldadas nas sínteses de Martinez *et al.*[24]

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Molécula do candidato a fármaco

A molécula do candidato a fármaco planejada, conforme demonstrado na Figura 3, contém 17β-estradiol, visando alcançar boa afinidade de ligação com o ERα; anel 1,2,3-triazólico 1,4-dissubstituído proveniente da reação CuAAC; e nitrosoureia como grupamento farmacofórico.

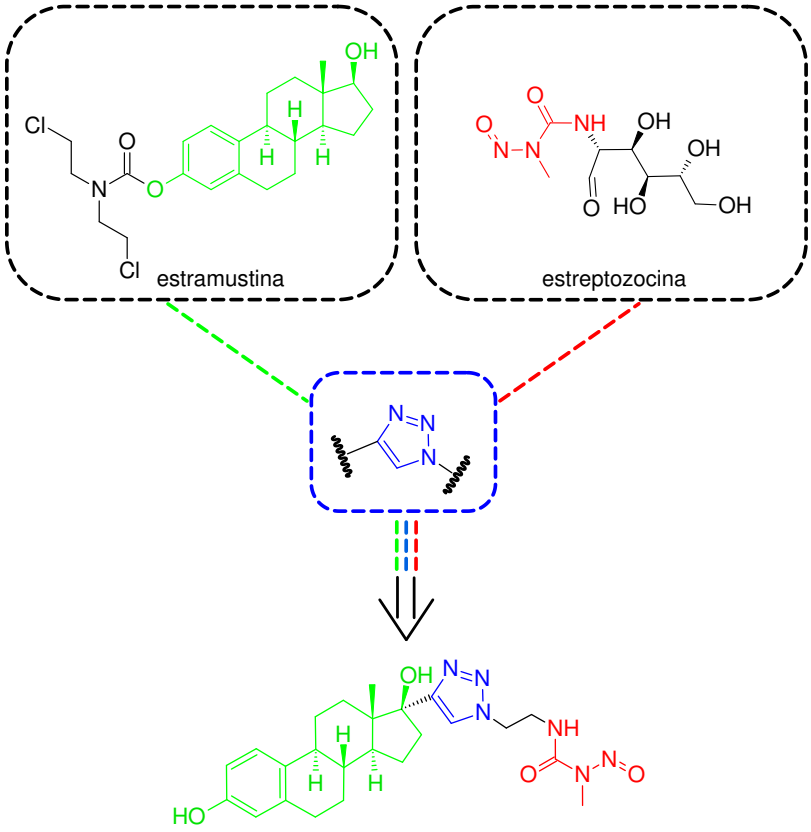


Figura 3 – Planejamento da fórmula estrutural do candidato a fármaco em fragmentos de fármacos antineoplásicos ligados pelo anel 1,2,3-triazólico 1,4-dissubstituído.

3.2. Propriedades físico-químicas

Nas propriedades físico-químicas (Tabela 1), o peso molecular (PM) está dentro do parâmetro considerado favorável para candidatos a fármacos oralmente ativos, segundo a "Regra dos 5" pioneira proposta por Lipinski *et al.*[25] (PM < 500 Da). Ainda de acordo com a regra, a molécula está dentro dos limites de doadores e aceptores de ligação de hidrogênio (≤ 5 doadores e ≤ 10 aceptores). Adicionalmente, o número de ligações rotativas e a área de superfície polar topológica (TPSA) calculada estão em concordância com Veber *et al.*,[26] que constatou a importância dessas propriedades para o perfil de biodisponibilidade (F) oral de fármacos (Núm. de ligações rotativas ≤ 10 e TPSA ≤ 140 Å²).

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas

Fórmula molecular	$C_{24}H_{32}N_6O_4$
PM	468,55 g mol^{-1}
Núm. de átomos pesados	34
Núm. de átomos pesados aromáticos	11
Fração Csp3	0,62
Núm. de ligações rotativas	7
Núm. de aceptores de ligação de hidrogênio	7
Núm. de doadores de ligação de hidrogênio	3
Rm	125,68
TPSA	132,94 Å²

Legenda: PM: peso molecular; Rm: refratividade molar; TPSA: área de superfície polar topológica.

A lipofilicidade (Tabela 2), cujo descritor clássico é o logaritmo do coeficiente de partição octanol-água (Log *P*),[9,15] foi calculada por diferentes modelos computacionais.[27] O valor consenso do Log *P* infere uma lipofilicidade ótima, geralmente estando no intervalo de 1 a 3 em virtude do equilíbrio apropriado entre a solubilidade em água e a taxa de permeabilidade por difusão passiva, refletindo critérios farmacocinéticos e farmacodinâmicos ideais para um candidato a fármaco com boa absorção intestinal.[15]

Tabela 2 – Lipofilicidade

Log *P* (iLOGP)	3,49
Log *P* (XLOGP3)	2,37
Log *P* (WLOGP)	2,94
Log *P* (MLOGP)	2,44
Log *P* (SILICOS-IT)	1,23
Consenso Log *P*	2,50

Legenda: Log *P*: logaritmo do coeficiente de partição octanol-água.

A hidrossolubilidade (Tabela 3), medida pelo Log *S* (logaritmo decimal da solubilidade aquosa em mol L^{-1}),[9] foi classificada por três modelos computacionais distintos. Em todas as estimativas, a solubilidade em água da

molécula se mostrou intermediária, o que é importante para a fase farmacêutica (desintegração, desagregação e dissolução), dado que é dependente do perfil de hidrossolubilidade do fármaco.[15]

Tabela 3 – Hidrossolubilidade

Log *S* (ESOL) Solubilidade Classe	-4,02 452e-02 mg mL^{-1} ; 9,65e-05 mol L^{-1} Moderadamente solúvel
Log *S* (Ali) Solubilidade Classe	-4,80 7,39e-03 mg mL^{-1} ; 1,58e-05 mol L^{-1} Moderadamente solúvel
Log *S* (SILICOS-IT) Solubilidade Classe	-4,47 1,59e-02 mg mL^{-1} ; 3,40e-05 mol L^{-1} Moderadamente solúvel

Legenda: Log *S*: logaritmo da solubilidade em mol L^{-1}.

3.3. Farmacocinética

Na Farmacocinética (Tabela 4), em razão de dados discutidos anteriormente, é previsto que a molécula seja bem absorvida pelo trato gastrointestinal.[28] Porém, a predição de impermeabilidade à barreira hematoencefálica (BHE) deve restringir a eficácia nos casos de metástases cerebrais.[29] Além disso, a glicoproteína-P (P-gp), um transportador apical de efluxo, transporta fármacos recém-absorvidos de volta ao lúmen intestinal, o que pode retardar a velocidade de absorção[5] e, aliado ao fato de que o efluxo de drogas quimioterápicas mediado pela P-gp leva à falha da quimioterapia no câncer de mama,[30] ser um substrato da P-gp pode representar uma limitação e uma questão a ser pesquisada. É predito que o novo derivado seja inibidor de duas isoenzimas do citocromo P450 (CYP), envolvidas no metabolismo de diversos fármacos e, por consequência, interações medicamentosas podem elevar a meia-vida e a concentração plasmática desses fármacos, ocasionando um crescimento na ocorrência de reações adversas e/ou intoxicações.[15,31] Por fim, quanto mais negativo o Log K_p (logaritmo do coeficiente de permeabilidade cutânea), com K_p em cm s^{-1}, menos permeável à pele é a molécula,[9] norteando a manipulação de fórmulas tópicas, mas não aquelas de administração oral ou parenteral.

Tabela 4 – Farmacocinética

Absorção GI	Alta
Permeável à BHE	Não
Substrato da P-gp	Sim
Inibidor da CYP1A2	Não
Inibidor da CYP2C19	Não
Inibidor da CYP2C9	Não
Inibidor da CYP2D6	Sim
Inibidor da CYP3A4	Sim
Log K_p (permeação cutânea)	-7,48 cm s^{-1}

Legenda: GI: gastrointestinal; BHE: barreira hematoencefálica; P-gp: glicoproteína-P; CYP: citocromo P450; Log K_p: logaritmo do coeficiente de permeabilidade cutânea.

3.4. Drug-likeness

Drug-likeness (Tabela 5) é uma avaliação qualitativa da chance de uma molécula se tornar um medicamento oral no que diz respeito à F. O candidato a fármaco foi analisado por cinco filtros diferentes, baseados em regras adaptadas, com bastantes faixas de propriedades dentro das quais a molécula é definida como *drug-like*: Lipinski, da Pfizer (PM ≤ 500; MLOGP ≤ 4,15; N ou O ≤ 10; NH ou OH ≤ 5), Ghose, da Amgen (160 ≤ PM ≤ 480; -0,4 ≤ WLOGP ≤ 5,6; 40 ≤ Rm ≤ 130; 20 ≤ átomos ≤ 70), Veber, da GSK (Ligações rotativas ≤ 10; TPSA ≤ 140), Egan, da Pharmacia (WLOGP ≤ 5,88; TPSA ≤ 131.6) e Muegge, da Bayer (200 ≤ PM ≤ 600; -2 ≤ XLOGP ≤ 5; TPSA ≤ 150; Núm. anéis ≤ 7; Núm. carbonos > 4; Núm. heteroátomos > 1; Núm. ligações rotativas ≤ 15; Ac. lig. H ≤ 10; Do. lig. H ≤ 5).[9] A única violação observada está relacionada à regra de Egan, em função do TPSA; muito embora a violação isolada não inviabilize a molécula, apenas destaca que experimentos adicionais sobre sua capacidade de permear as células devem ser realizados. Por último, a pontuação de F é a probabilidade de F > 10% em ratos ou permeabilidade mensurável em células Caco-2[9] e aponta para um potencial razoável de boa F oral.

Tabela 5 – *Drug-likeness*

Lipinski	Sim
Ghose	Sim
Veber	Sim
Egan	Não; 1 violação: TPSA>131,6
Muegge	Sim
Pontuação de F	0,55

Legenda: F: biodisponibilidade.

3.5. Filtros complementares de Química Medicinal

Sobre Química Medicinal (Tabela 6), PAINS (*pan assay interference compounds* ou compostos promíscuos), moléculas contendo subestruturas que exibem resposta potente em ensaios, independentemente do alvo proteico e produzem um falso positivo,[9] não correspondem à estrutura do candidato a fármaco. Evidentemente, o alerta estrutural de Brenk, que é constituído de uma lista de fragmentos marcados como potencialmente tóxicos, quimicamente reativos, metabolicamente instáveis ou que possuem propriedades causadoras de farmacocinéticas ruins,[9] detectou a presença de N-NO, como planejado, visto que a porção N-nitrosoureia é o grupamento farmacofórico do derivado e é a subunidade toxicofórica responsável pela formação de espécies reativas na biofase.[15] *Leadlikeness* é um conceito que foca nos limiares físico-químicos que definem um bom protótipo ($250 \leq PM \leq 350$; XLOGP $\leq 3,5$; Núm. ligações rotativas ≤ 7), isto é, uma estrutura química própria para otimização molecular que eventualmente pode ter o tamanho e a lipofilicidade aumentados e, como consequência, precisa ser menor e menos hidrofóbica do que as moléculas *drug-like*;[9] portanto, o candidato a fármaco é, em maior grau, *drug-like* do que um protótipo. Finalmente, a molécula é prevista como relativamente acessível do ponto de vista sintético (a acessibilidade sintética varia de 1 a 10, sendo 1 muito fácil e 10 muito difícil[9]).

Tabela 6 – Química Medicinal

PAINS	0 alertas
Brenk	1 alerta: N-nitroso
Leadlikeness	Não; 1 violação: PM>350
Acessibilidade sintética	5,16

Legenda: PAINS: *Pan Assay Interference Structures*.

3.6. Geometria molecular

O *Force Field* MMFF94, ou *Merck Molecular Force Field*, foi desenvolvido pela Merck e proporciona boa precisão em uma ampla gama de moléculas *drug-like*.[18-22] A otimização da geometria molecular gerou uma conformação teoricamente mais estável do ponto de vista termodinâmico (Figura 4a), com valor de energia potencial estacionária calculado em 139,924 kJ mol^{-1}. É possível observar uma ligação de hidrogênio intramolecular na porção de *N*-nitrosoureia, cujo comprimento da ligação é igual a 1,772 Å. Acrescentando a isso, a

partir da disponibilidade de cargas parciais e das posições atômicas, o candidato a fármaco apresentou um momento dipolar (μ) estimado de 2,345 D (Figura 4b). Dessa conformação, determinou-se a superfície de van der Waals (Figura 4c) com base no raio de van der Waals de cada átomo da molécula.[15]

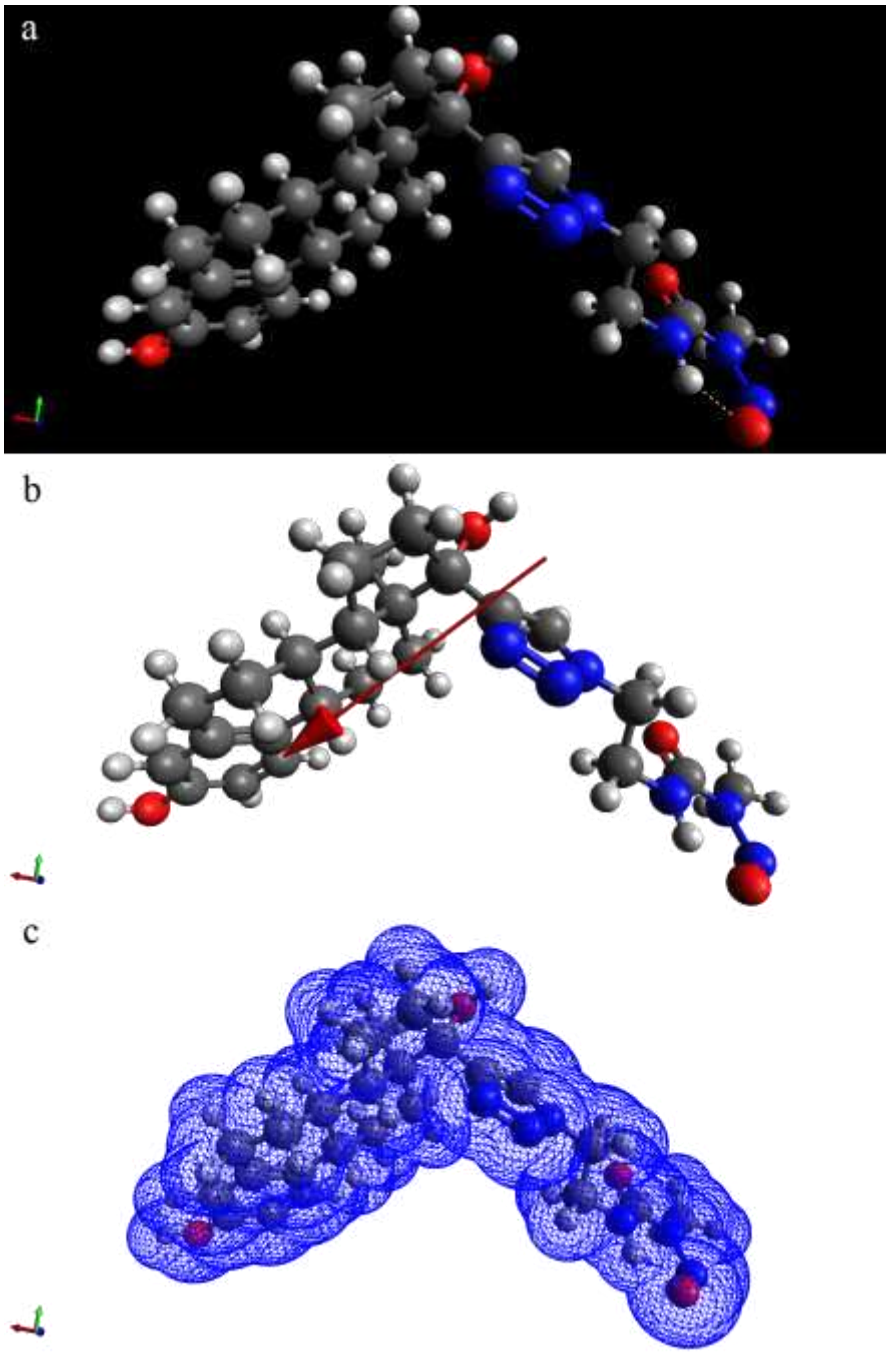


Figura 4 – **a**, Estrutura 3D otimizada do candidato a fármaco. O tracejado amarelo indica a ligação de hidrogênio intramolecular na porção nitrosoureia. **b**, Visualização do momento dipolar (μ) da molécula. **c**, Superfície de van der Waals da molécula.

3.7. Docagem molecular

O 17β-estradiol cocristalizado interage através de ligações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos do LBD do ERα do seguinte modo: a hidroxila fenólica do anel A estabelece ligações de hidrogênio diretas com o carboxilato da Glu-353 e o grupo guanidínio da Arg-394; e a hidroxila alcoólica do anel D forma uma única ligação de hidrogênio com a His-524 (Figura 5).[12]

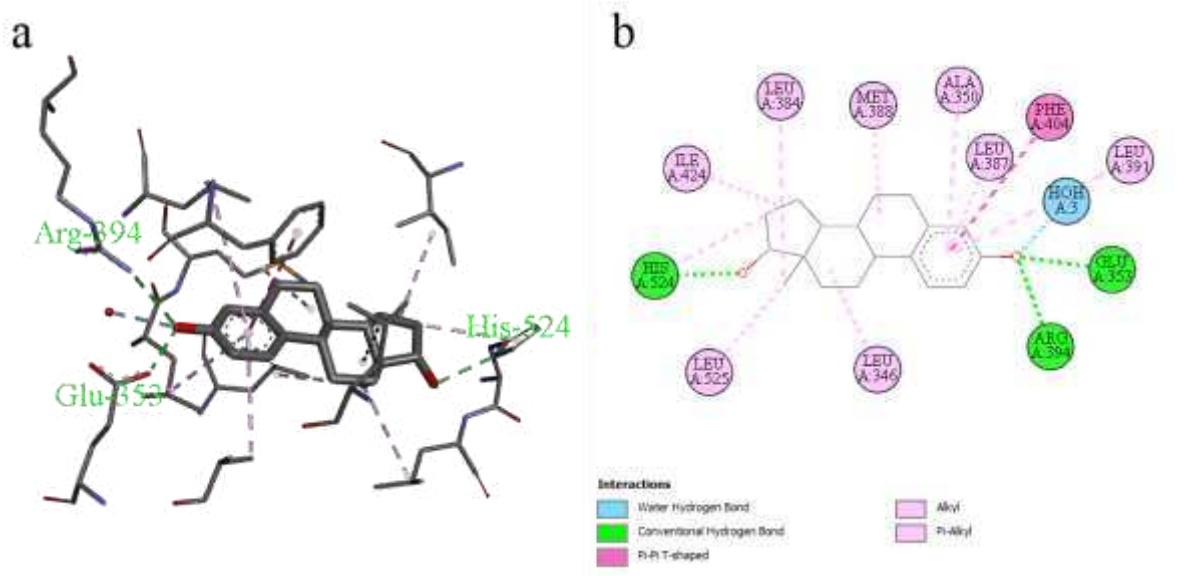


Figura 5 – **a**, Estrutura do domínio de ligação com o ligante (LBD) do receptor de estrogênio alfa (ERα) em complexo com o 17β-estradiol. **b**, Diagrama 2D das interações ligante-sítio receptor.

A docagem molecular define a orientação e a conformação, "pose", do ligante ao interagir com o receptor.[15] A pose do candidato a fármaco, com a energia de ligação mais baixa observada (Figura 6), no *cluster*, grupamento de conformações semelhantes, de menor energia e maior preferência (51% das conformações calculadas, cuja energia de ligação média é de -6,13 kcal mol^{-1}), é de -9,07 kcal mol^{-1}. Na redocagem, comparativamente, o 17β-estradiol cocristalizado retornou somente um *cluster* de energia de ligação média de -10,53 kcal mol^{-1}.

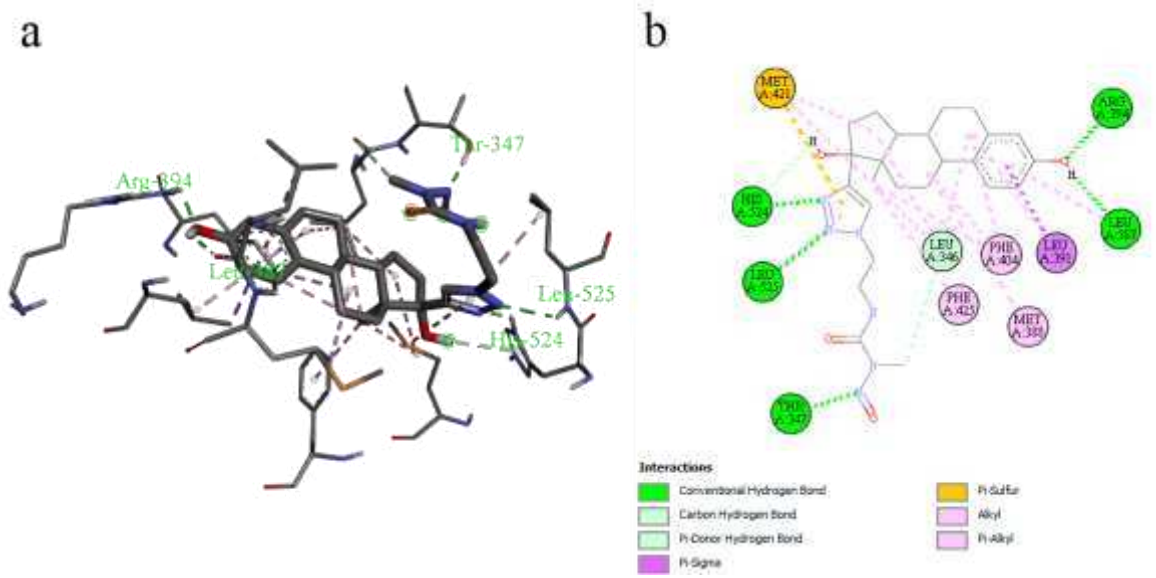


Figura 6 – **a**, Pose de menor energia do candidato a fármaco ao interagir com o domínio de ligação com o ligante (LBD) do receptor de estrogênio alfa (ERα). **b**, Diagrama 2D das interações ligante-sítio receptor.

Na docagem, é verificado que a molécula realizou duas das três ligações de hidrogênio com os mesmos resíduos de aminoácidos que o ligante endógeno cocristalizado, 17β-estradiol, exceto pela Glu-353. A interação com a His-524, contudo, é gerada pelo anel triazólico da molécula em vez da hidroxila alcoólica. Outras ligações de hidrogênio com os resíduos Leu-387, Leu-525 e Thr-347 foram observadas. Esses achados demonstraram afinidade do candidato a fármaco pelo LBD do ERα.

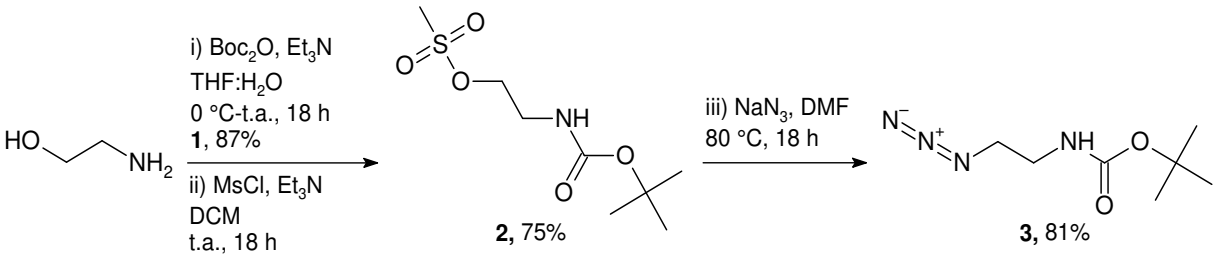
3.8. Síntese proposta

3.8.1. Síntese de terc-butil N-(2-azidoetil)carbamato (3)

Analogamente a Hennessy *et al.*,[23] a síntese de *terc*-butil *N*-(2-azidoetil)carbamato (**3**), a azida da reação CuAAC, compreenderia três etapas (Esquema 2). Primeiramente, consistiria na proteção da amina, pela qual etanolamina reagiria com dicarbonato de di-*terc*-butila (Boc_2O) em presença de trietilamina (Et_3N) como base, e uma mistura de tetraidrofurano (THF) e água (H_2O) na proporção 1:1 como solvente, entre 0 °C e temperatura ambiente (t.a.), por 18 h, produzindo *terc*-butil *N*-(2-hidroxietil)carbamato (**1**) em 87% de rendimento. Subsequentemente, o produto seria tratado com cloreto de mesila (MsCl), em presença de Et_3N, e diclorometano (DCM) como solvente, à t.a. por 18 h, fornecendo *terc*-butil *N*-(2-((metilsulfonil)oxi)etil)carbamato (**2**) em 75% de rendimento. Por fim, **2** reagiria com azida sódica (NaN_3), em uma substituição nucleofílica bimolecular (S_N2) do

metanossulfonato pela azida, em dimetilformamida (DMF) como solvente, a 80 °C por 18 h, obtendo **3** em 81% de rendimento.

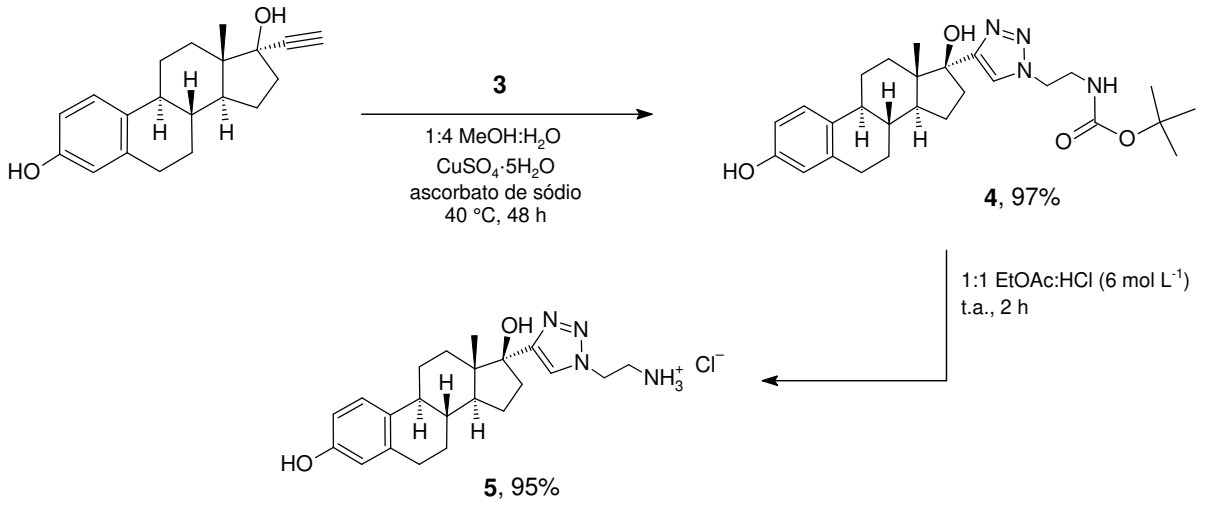
Esquema 2



*3.8.2. Síntese de cloridrato de 2-{4-[(1S,10R,11S,14S,15S)-5,14-di-hidroxi-15-metiltetraciclo[8.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]heptadeca-2(7),3,5-trien-14-il]-1H-1,2,3-triazol-1-il}etan-1-amônio (**5**)*

Similarmente a Kitteringham *et al.*,[6] a reação CuAAC envolveria 17α-etinilestradiol e **3**, resultando no correspondente 1,4-disubstituído 1,2,3-triazol, 2-{4-[(1*S*,10*R*,11*S*,14*S*,15*S*)-5,14-di-hidroxi-15-metiltetraciclo[8.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]heptadeca-2(7),3,5-trien-14-il]-1*H*-1,2,3-triazol-1-il}etil 2-metilpropano-2-carbamato (**4**) em 97% de rendimento, em um meio reacional aquecido a 40 °C por 48 h, e constituído de sulfato de cobre pentahidratado ($CuSO_4.5H_2O$), ascorbato de sódio como agente redutor do cobre e solução de metanol (MeOH) e H_2O na proporção 1:4 como solvente. Posteriormente, a desproteção da amina em condições ácidas, protegida por Boc, é alcançada com uma solução de acetato de etila (EtOAc) e ácido clorídrico concentrado (HCl) 6 mol L^{-1} na proporção 1:1, à t.a. por 2h, obtendo cloridrato de 2-{4-[(1*S*,10*R*,11*S*,14*S*,15*S*)-5,14-di-hidroxi-15-metiltetraciclo[8.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]heptadeca-2(7),3,5-trien-14-il]-1*H*-1,2,3-triazol-1-il}etan-1-amônio (**5**) em 95% de rendimento (Esquema 3).

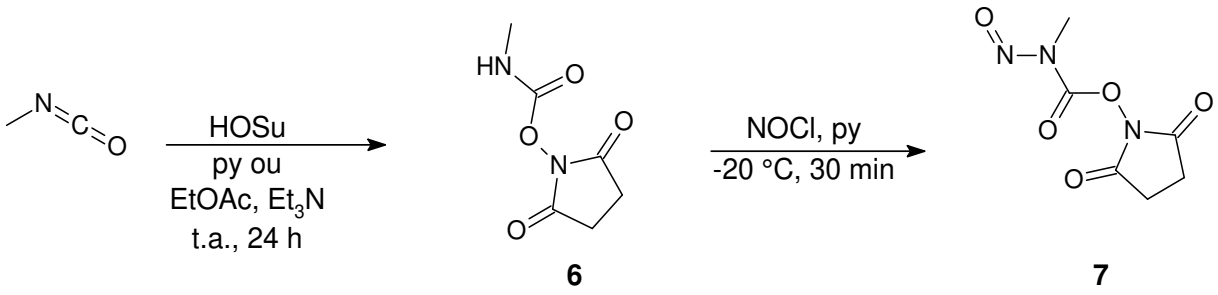
Esquema 3



3.8.3. Síntese de (2,5-dioxopirrolidin-1-il) N-metil-N-nitrosocarbamato (7)

A síntese de (2,5-dioxopirrolidin-1-il) *N*-metil-*N*-nitrosocarbamato (**7**) pode ser realizada de acordo com Martinez *et al.*[24] (Esquema 4), que isolou carbamatos *N*-alquil-*N*-nitroso ativos como compostos cristalinos e estáveis com rendimentos muito bons. A sugestão de **7** se deve pelos derivados de *N*-hidroxissuccinimida produzirem prontamente subprodutos removíveis, permitindo uma fácil purificação dos produtos. Inicialmente, em uma solução de piridina (py) a 0 °C (100 mL) ou EtOAc contendo Et_3N (ou dietilisopropilamina — 0,15 mol) e *N*-hidroxissuccinimida (HOSu — 0,1 mol, 11,5 g), adiciona-se, gota a gota, isocianato de metila (0,12 mol, 6,85 g) durante um período de 30 min sob agitação magnética. A agitação é mantida à t.a. por 24 h. A solução é concentrada a vácuo e o resíduo cristalino é recristalizado a partir de uma mistura de EtOAc e éter, gerando (2,5-dioxopirrolidin-1-il) *N*-metilcarbamato (**6**). Em seguida, em uma solução de py a -20 °C (3 mL), contendo **6** (3,44 g, 0,02 mol), adiciona-se cloreto de nitrosila (NOCl — 3 mL). A reação pode ser monitorada por cromatografia em camada delgada. Após agitar a mistura por mais 30 min a -20 °C, não se detectou a presença de reagentes. Verte-se a mistura em H_2O com gelo (200 mL), e o precipitado resultante é filtrado, lavado com H_2O e secado. O produto é recristalizado a partir de éter de petróleo leve, obtendo **7**.

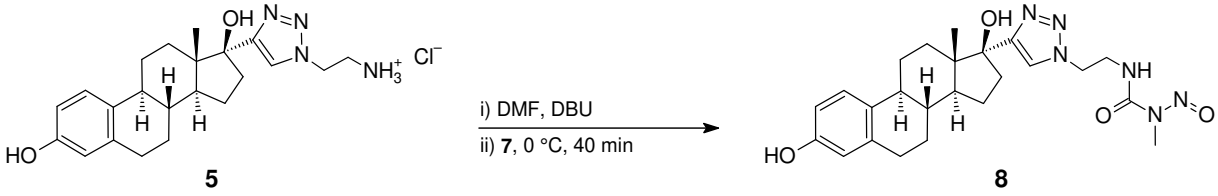
Esquema 4



*3.8.4. Síntese de (1S,10R,11S,14S,15S)-15-metil-14-{1-[2-(3-metil-3-nitrosoureia)etil]-1H-1,2,3-triazol-4-il} tetraciclo[8.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]heptadeca-2(7),3,5-trieno-5,14-diol (**8**)*

O derivado de estrogênio-nitrosoureia pode ser sintetizado em duas etapas (Esquema 5). Na primeira etapa, conforme Kitteringham *et al.*,[6] ocorreria a neutralização de **5** com 1,8-diazabiciclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU) em DMF como solvente. Na segunda etapa, segundo Martinez *et al.*,[24] a amina reagiria com **7** a 0 °C por 40 min, obtendo (1*S*,10*R*,11*S*,14*S*,15*S*)-15-metil-14-{1-[2-(3-metil-3-nitrosoureia)etil]-1*H*-1,2,3-triazol-4-il} tetraciclo[8.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]heptadeca-2(7),3,5-trieno-5,14-diol (**8**).

Esquema 5



3.9. Perspectivas futuras

As perspectivas futuras incluem a síntese, como proposta, e o estudo da citotoxicidade, *in vitro*, do novo derivado de estrogênio-nitrosoureia. A citotoxicidade, *in vitro*, do derivado de estrogênio-nitrosoureia e de ambos os complexos de Pt(II) ligados ao estrogênio, [PtCl$_2$(EDiolDap)] e [Pt(CBDCA)(EDiolDap)], como controle positivo, seria analisada contra um painel de linhagens celulares de câncer ER+ A431, MCF-7, 2008 e A2780, tal como contra uma linhagem celular de câncer ER- HCT-15.

4. CONCLUSÃO

A avaliação das propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e *drug-likeness*,

in silico, sugere que a molécula possui características promissoras como candidata a fármaco, com um bom balanceamento entre lipofilicidade e hidrossolubilidade, e um perfil que favorece a F oral, respeitando as regras de Lipinski, Ghose, Veber e Muegge. A docagem molecular evidencia uma estrutura tridimensional do candidato a fármaco adequada para ligações de hidrogênio aos resíduos de aminoácidos específicos que garantem ao 17β-estradiol afinidade ao LBD do ERα, como Arg-394 e His-524. O intermediário baseado em estrogênio, **5**, seria sintetizado pela reação CuAAC entre 17α-etinilestradiol e **3**. A reação de **5** com o derivado de *N*-hidroxissuccinimida, **7**, levaria ao correspondente derivado de estrogênio-nitrosoureia **8**.

5. REFERÊNCIAS

1. SUNG H, FERLAY J, SIEGEL RL, LAVERSANNE M, SOERJOMATARAM I, JEMAL A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2021 May-Jun;71(3):209-49. doi: 10.3322/caac.21660.

2. MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR), Instituto Nacional de Câncer, Coordenação de Prevenção e Vigilância, Divisão de Detecção Precoce e Apoio à Organização de Rede. Dados e números sobre câncer de mama: relatório anual 2022. Rio de Janeiro: INCA; 2022 Set. Disponível em: https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/dados_e_numeros_site_cancer_mama_setembro2022.pdf

3. CLUSAN L, FERRIÈRE F, FLOURIOT G, PAKDEL F. A basic review on estrogen receptor signaling pathways in breast cancer. Int J Mol Sci. 2023 Apr 6;24(7):6834. doi: 10.3390/ijms24076834.

4. BANSAL R, SURYAN A. A comprehensive review on steroidal bioconjugates as promising leads in drug discovery. ACS Bio Med Chem Au. 2022 Mar 23;2(4):340-69. doi: 10.1021/acsbiomedchemau.1c00071.

5. FERREIRA EI, BARREIRO EJ, GIAROLLA J, PARISE FILHO R. Fundamentos de química farmacêutica medicinal. 1ª ed. Santana de Parnaíba: Editora Manole; 2022. Português.

6. KITTERINGHAM E, ANDRIOLLO E, GANDIN V, MONTAGNER D, GRIFFITH DM. Synthesis, characterisation and in vitro antitumour potential of novel Pt(II) estrogen linked complexes. Inorganica Chim Acta. 2019 Sep 1;495:118944. doi: 10.1016/j.ica.2019.05.043.

7. KOLB HC, FINN MG, SHARPLESS KB. Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. Angew Chem Int Ed Engl. 2001 Jun 1;40(11):2004-2021. doi: 10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5.

8. CHEMSKETCH, version 2023.1.2, Advanced Chemistry Development, Inc. (ACD/Labs), Toronto, ON, Canada, www.acdlabs.com.

9. SWISSADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. Sci. Rep. (2017) 7:42717.

10. BERMAN H.M., WESTBROOK, J., FENG Z., GILLILAND G., BHAT T.N., WEISSIG H., SHINDYALOV I.N., BOURNE P.E. The Protein Data Bank

(2000) Nucleic Acids Research 28: 235-242 https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235.

11. BRZOZOWSKI A.M., PIKE A.C.W., Human estrogen receptor ligand-binding domain in complex with 17beta-estradiol (1997) https://doi.org/10.2210/pdb1ere/pdb.

12. BRZOZOWSKI A.M., PIKE A.C., DAUTER Z., HUBBARD R.E., BONN T., ENGSTROM O., OHMAN L., GREENE G.L., GUSTAFSSON J.A., CARLQUIST M., Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor (1997) Nature 389: 753-758 https://doi.org/10.1038/39645.

13. BIOVIA, Dassault Systèmes, BIOVIA Discovery Studio Visualizer, v24.1.0.23298, San Diego: Dassault Systèmes, 2024.

14. MORRIS, G. M., HUEY, R., LINDSTROM, W., SANNER, M. F., BELEW, R. K., GOODSELL, D. S. AND OLSON, A. J. (2009) Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexiblity. J. Computational Chemistry 2009, 16: 2785-91.

15. BARREIRO LJ, FRAGA CAM. Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2015.

16. AVOGADRO: an open-source molecular builder and visualization tool. Version 1.2.0 http://avogadro.cc/

17. MARCUS D HANWELL, DONALD E CURTIS, DAVID C LONIE, TIM VANDERMEERSCH, EVA ZUREK AND GEOFFREY R HUTCHISON; “Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform” Journal of Cheminformatics 2012, 4:17.

18. HALGREN TA. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. J Comput Chem. 1996 Apr;17(5-6):490-519. doi: 10.1002/(SICI)1096-987X(199604)17:5/6<490::AID-JCC1>3.0.CO;2-P.

19. HALGREN TA. Merck molecular force field. II. MMFF94 van der Waals and electrostatic parameters for intermolecular interactions. J Comput Chem. 1996 Apr;17(5-6):520-52. doi: 10.1002/(SICI)1096-987X(199604)17:5/6<520::AID-JCC2>3.0.CO;2-W.

20. HALGREN TA. Merck molecular force field. III. Molecular geometries and vibrational frequencies for MMFF94. J Comput Chem. 1996 Apr;17(5-6):553-86. doi: 10.1002/(SICI)1096-987X(199604)17:5/6<553::AID-JCC3>3.0.CO;2-T.

21. HALGREN TA, NACHBAR RB. Merck molecular force field. IV. Conformational energies and geometries for MMFF94. J Comput Chem. 1996 Apr;17(5-6):587-615. doi: 10.1002/(SICI)1096-987X(199604)17:5/6<587::AID-JCC4>3.0.CO;2-Q.

22. HALGREN TA. Merck molecular force field. V. Extension of MMFF94 using experimental data, additional computational data, and empirical rules. J Comput Chem. 1996 Apr;17(5-6):616-41. doi: 10.1002/(SICI)1096-987X(199604)17:5/6<616::AID-JCC5>3.0.CO;2-X.

23. HENNESSY J, MCGORMAN B, MOLPHY Z, FARRELL NP, SINGLETON D, BROWN T, et al. A click chemistry approach to targeted DNA crosslinking with cis-platinum(II)-modified triplex-forming oligonucleotides. Angew Chem Int Ed Engl. 2022 Jan 17;61(3):e202110455. doi: 10.1002/anie.202110455.

24. MARTINEZ J, OIRY J, IMBACH JL, WINTERNITZ F. ACTIVATED N-nitrosocarbamates for regioselective

synthesis of N-nitrosoureas. J Med Chem. 1982 Feb 1;25(2):178-82. doi: 10.1021/jm00344a017.

25. LIPINSKI CA, LOMBARDO F, DOMINY BW, FEENEY PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. Adv Drug Deliv Rev. 2001 Mar 1;46(1-3):3-26. doi: 10.1016/S0169-409X(00)00129-0.

26. VEBER DF, JOHNSON SR, CHENG HY, SMITH BR, WARD KW, KOPPLE KD. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. J Med Chem. 2002 Jun 6;45(12):2615-23. doi: 10.1021/jm020017n.

27. iLOGP: a simple, robust, and efficient description of n-octanol/water partition coefficient for drug design using the GB/SA approach. J. Chem. Inf. Model. (2014) 54(12):3284-3301.

28. A BOILED-Egg to predict gastrointestinal absorption and brain penetration of small molecules. ChemMedChem (2016) 11(11):1117-1121.

29. IVANIDZE J, SUBRAMANIAN K, YOUN T, CIGLER T, OSBORNE JR, MAGGE RS, et al. Utility of [18F]-fluoroestradiol (FES) PET/CT with dedicated brain acquisition in differentiating brain metastases from posttreatment change in estrogen receptor-positive breast cancer. Neurooncol Adv. 2021 Nov 30;3(1):vdab178. doi: 10.1093/noajnl/vdab178.

30. FAMTA P, SHAH S, CHATTERJEE E, SINGH H, DEY B, GURU SK, et al. Exploring new horizons in overcoming P-glycoprotein-mediated multidrug-resistant breast cancer via nanoscale drug delivery platforms. Curr Res Pharmacol Drug Discov. 2021 Sep 6;2:100054. doi: 10.1016/j.crphar.2021.100054.

31. GOLAN DE, TASHJIAN AH JR, ARMSTRONG EJ, ARMSTRONG AW. Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacologia. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2014.