



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

MARIA LETÍCIA GOMES DE ALMEIDA

**AVALIAÇÃO *IN SILICO* E *IN VITRO* DE NOVOS DERIVADOS
DE BENZOILTIOUREIA PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA
DE CHAGAS**

Recife
2024

MARIA LETÍCIA GOMES DE ALMEIDA

**AVALIAÇÃO *IN SILICO* E *IN VITRO* DE NOVOS DERIVADOS
DE BENZOILTIOUREIA PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA
DE CHAGAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Dra. Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo

Coorientador: Msc. Lucas Eduardo Bezerra de Lima

Recife
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Almeida, Maria Letícia Gomes de .

Avaliação in silico e in vitro de novos derivados de benzoiltioureia para o tratamento da Doença de Chagas / Maria Letícia Gomes de Almeida. - Recife, 2024.

52 p. : il., tab.

Orientador(a): Regina Celia Bressan Queiroz de Figueiredo

Coorientador(a): Lucas Eduardo Bezerra de Lima

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2024.

1. Trypanosoma cruzi. 2. Benzoiltioureia. 3. Otimização. 4. Citotoxicidade. 5. Atividade antiparasitária. I. Figueiredo, Regina Celia Bressan Queiroz de. (Orientação). II. Lima, Lucas Eduardo Bezerra de. (Coorientação). IV. Título.

570 CDD (22.ed.)

MARIA LETÍCIA GOMES DE ALMEIDA

**AVALIAÇÃO *IN SILICO* E *IN VITRO* DE NOVOS DERIVADOS
DE BENZOILTIOUREIA PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA
DE CHAGAS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Biomedicina da Universidade
Federal de Pernambuco, como
pré-requisito à obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo
Instituto Aggeu Magalhães (Fiocruz - PE)/Departamento de Microbiologia

Prof. Dr. Wheverton Ricardo Correia do Nascimento
Universidade Federal de Pernambuco/Área Acadêmica de Medicina Tropical

Dr. Tiago Henrique dos Santos Souza
Universidade Federal de Pernambuco/Departamento de Biofísica e Radiobiologia

Dedico este trabalho aos meus pais, que não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida, e à minha irmã, meu companheiro e meus amigos, que com muito carinho e apoio me acolheram para que eu pudesse concluí-la.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dr^a Regina Bressan, pela oportunidade, incentivo, e por sempre fazer o possível para resolver todas as intercorrências.

Ao meu coorientador, Msc. Lucas Lima, por todo o conhecimento repassado, paciência, disponibilidade e guia durante a trajetória.

A todos os que compõem o Laboratório de Biologia Celular de Patógenos do Instituto Aggeu Magalhães, pela convivência e por fazerem do laboratório um ambiente acolhedor, e em especial à Gleicyane Gomes, por ser a irmã que a ciência me deu, por ser minha parceira na bancada e nas dificuldades, e por ter feito a jornada ser muito mais leve.

Ao Prof. Dr. Wheverton Nascimento, por ter marcado de maneira significativa minha graduação despertando o interesse pela parasitologia, e por sempre ter sido muito solícito.

A Fundação Oswaldo Cruz pelo fomento à minha pesquisa e toda a infraestrutura que permitiu sua realização.

Agradeço também a meus pais, Cícera e Luiz Carlos, por fazerem o possível e o impossível para que eu pudesse alcançar e concluir a minha graduação, pelo amor e confiança depositada em mim, e por terem me ensinado que não há vitória sem sacrifício.

A minha irmã, Júlia Lorena, por ser minha maior razão para me manter firme com meu propósito, e a quem almejo ser fonte de inspiração e orgulho.

Ao meu namorado, Lucas Eduardo, por ser meu braço direito, por sempre estar ao meu lado vibrando minhas conquistas e confortando meus medos, por todo o amor e carinho.

Ao restante da minha família, materna e paterna, e aos amigos de Arapiraca, pelas palavras de apoio e por sempre acreditarem que eu chegaria longe.

Por fim, agradeço por tudo aos amigos que fiz durante a jornada, João Victor, Gabriel, Mariana, Samara, João Gabriel, Letícia e Lucas, que me acolheram e se tornaram minha segunda família, que não me deixaram desistir e estiveram comigo passando por todas as flores e pedras no caminho, e a quem devo todas as boas memórias, as boas risadas, os choros no ombro, os abraços e o amor.

“Mesmo a menor pessoa pode mudar o curso da história.”

(J.R.R. Tolkien, **O Senhor dos Anéis**)

ALMEIDA, Maria Letícia Gomes de. **Avaliação *in silico* e *in vitro* de novos derivados de benzoiltioureia para o tratamento da Doença de Chagas**. 2024. 51 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

RESUMO

A Doença de Chagas (DC), causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, é uma doença tropical negligenciada, configurando-se como um agravamento para a saúde pública na América Latina. O atual tratamento para a DC é baseado nos medicamentos Nifurtimox e Benznidazol (BNZ), que apresentam severos efeitos colaterais, baixa biodisponibilidade oral e pouca eficácia na fase crônica da doença. Em acréscimo, o surgimento de cepas do parasito resistentes ao tratamento é comumente reportado. Desta forma, a descoberta de novos candidatos a fármacos que sejam mais seletivos para o parasito, menos tóxicos para o paciente e com melhor perfil farmacocinético é imprescindível para o tratamento das populações acometidas. Nesse sentido, moléculas derivadas de tioureia se apresentam como potencial alternativa para o tratamento da DC, demonstrando um amplo espectro de atividades farmacológicas tais como: anticâncer, antifúngica, antibacteriana, antiinflamatória, antiviral, entre outras. Ademais, quando complexadas à grupamentos benzoil, formando os derivados benzoiltioureia, demonstraram baixa citotoxicidade. Dessa forma, o tema central do presente trabalho consiste na avaliação das propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e do potencial tripanocida e citotóxico de seis novos compostos derivados de benzoiltioureia, selecionados por otimização hit-to-lead, uma estratégia que consiste em rastrear e elevar uma molécula bioativa (hit) à categoria de composto líder, e tem sido utilizada com êxito no planejamento de compostos com atividade contra tripanosomatídeos. Foi realizado o estudo das propriedades ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) dos derivados, em que foi observado que os compostos possuem uma menor hepatotoxicidade humana, maior capacidade de permeação nas membranas celulares, menor mutagenicidade e carcinogenicidade, e são mais lipofílicos quando comparados ao BNZ. Destes, o derivado ADS 04 é o mais lipofílico ($\text{Logp} = 5.915$), menos carcinogênico e com a menor probabilidade de penetração da barreira hematoencefálica, características vantajosas em relação ao medicamento de referência. Ademais, a avaliação do perfil citotóxico demonstrou que os compostos apresentam baixa citotoxicidade, em que o derivado ADS 04 foi também a molécula menos citotóxica, identificado com base na determinação da CC_{50} ($2987,7 \mu\text{M}$) e então selecionado para a investigação da ação tripanocida em diferentes concentrações contra as formas do parasito para a determinação do índice de seletividade (IS). Para as formas tripomastigotas, a LC_{50} foi de $52,73 \mu\text{M}$ e $\text{IS} = 56,6$; para amastigotas, $\text{IC}_{50} = 70,02 \mu\text{M}$ e $\text{IS} = 42,7$. Dessa forma, o derivado se comportou como altamente seletivo para o parasito e pouco tóxico para as células, sendo uma molécula com potencial promissor no tratamento da DC. Espera-se que os resultados obtidos deste trabalho possam dar suporte científico na elaboração de novas drogas que sejam eficazes contra o agente etiológico da DC e que não causem efeitos colaterais aos pacientes submetidos ao tratamento.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*. Benzoiltioureia. Citotoxicidade. Atividade antiparasitária.

ALMEIDA, Maria Letícia Gomes de. ***In silico* and *in vitro* evaluation of new benzoylthiourea derivatives for the treatment of Chagas Disease**. 2024. 51 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

ABSTRACT

Chagas Disease (CD), caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, is a neglected tropical disease, posing a public health concern in Latin America. The current treatment for CD is based on the drugs Nifurtimox and Benznidazole (BNZ), which have severe side effects, low oral bioavailability, and limited efficacy in the chronic phase of the disease. Additionally, the emergence of parasite strains resistant to treatment is commonly reported. Therefore, the discovery of new drug candidates that are more selective for the parasite, less toxic to the patient, and with better pharmacokinetic profiles is essential for treating affected populations. In this regard, molecules derived from thiourea emerge as a potential alternative for CD treatment, demonstrating a broad spectrum of pharmacological activities such as anticancer, antifungal, antibacterial, anti-inflammatory, antiviral, among others. Furthermore, when complexed with benzoyl groups, forming benzoylthiourea derivatives, they have shown low cytotoxicity. Thus, the central theme of this study is the evaluation of the physicochemical, pharmacokinetic properties, and the trypanocidal and cytotoxic potential of six new compounds derived from benzoylthiourea, selected through hit-to-lead optimization, a strategy that involves screening and elevating a bioactive molecule (hit) to the category of lead compound, which has been successfully used in planning compounds with activity against trypanosomatids. The study of ADMET (absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity) properties of the derivatives revealed that the compounds have lower human hepatotoxicity, higher permeation capacity in cell membranes, lower mutagenicity and carcinogenicity, and are more lipophilic compared to BNZ. Among these, the derivative ADS 04 is the most lipophilic (LogP = 5.915), less carcinogenic, and with the lowest probability of crossing the blood-brain barrier, advantageous characteristics compared to the reference drug. Additionally, the evaluation of the cytotoxic profile showed that the compounds have low cytotoxicity, with ADS 04 being the least cytotoxic molecule, identified based on determination of CC_{50} (2987.7 μ M), and thus selected for investigating trypanocidal action at different concentrations against parasite forms to determine the selectivity index (SI). For trypomastigote forms, LC_{50} was 52.73 μ M and SI = 56.6; for amastigotes, IC_{50} = 70.02 μ M and SI = 42.7. Thus, the derivative behaved as highly selective for the parasite and minimally toxic to cells, being a molecule with promising potential in CD treatment. It is hoped that the results of this study can provide scientific support in developing new drugs that are effective against the etiological agent of CD and do not cause side effects in treated patients.

Key words: *Trypanosoma cruzi*. Benzoylthiourea. Cytotoxicity. Antiparasitic activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Distribuição global da Doença de Chagas	15
Figura 2 – Formas evolutivas do <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
Figura 3 – Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	23
Figura 4 – Estrutura de um derivado de benzoiltioureia. (N,N-((ethane-1,2-diylbis(azanediy))bis(carbonothioyl))dibenzamide)	26
Figura 5 – Efeito dos derivados de benzoiltioureia sobre a viabilidade de cardiomioblastos (H9c2)	38
Figura 6 – Estrutura química dos derivados de benzoiltioureia	39
Figura 7 – Efeito do derivado ADS 04 sobre tripomastigotas e amastigotas de <i>T. cruzi</i>	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Predição <i>in silico</i> das propriedades físico-químicas e farmacocinéticas dos derivados de benzoiltiourea	34
Tabela 2 – Predição <i>in silico</i> do potencial citotóxico dos derivados de benzoiltiourea	36
Tabela 3 – Predição <i>in silico</i> da interação dos derivados de benzoiltiourea com as enzimas do citocromo P450	37
Tabela 4 – Concentração dos derivados de benzoiltiourea citotóxica para 50% de cardiomioblastos (H9c2)	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADMET	Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção de Toxicidade
AMES	Mutagenicidade
BBB	Penetração da Barreira Hematoencefálica
BNZ	Benznidazol
CC ₅₀	Concentração Citotóxica Média
CL	Clearance
CYP450	Citocromo P450
DC	Doença de Chagas
DILI	Injúria Hepática Induzida por Droga
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
H-HT	Hepatotoxicidade Humana
HAI	Hemaglutinação indireta
HIA	Absorção Intestinal Humana
IFI	Imunofluorescência indireta
IC ₅₀	Concentração Inibitória Média
IS	Índice de Seletividade
LC ₅₀	Concentração Letal Média
LogP	Coefficiente de Partição
µM	Micromolar
MW	Peso Molecular
nHA	Número de Átomos Aceptores de Ligação de Hidrogênio
nHD	Número de Átomos Doadores de Ligação de Hidrogênio
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PCR	Polymerase Chain Reaction
SUS	Sistema único de Saúde
TPSA	Área de Superfície Polar Topológica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	DOENÇA DE CHAGAS	15
2.1.1	Definição	15
2.1.2	Epidemiologia	16
2.1.3	Transmissão	16
2.1.4	Sintomas	18
2.1.5	Diagnóstico	19
2.1.6	Tratamento	20
2.2	TRYPANOSOMA CRUZI	20
2.2.1	Taxonomia	20
2.2.2	Formas Evolutivas	21
2.2.3	Ciclo Biológico	23
2.2.4	Fisiopatologia e Histopatologia	24
2.3	TIOUREIAS	25
2.3.1	Definição	25
2.3.2	Benzoiltiureias	25
2.3.3	Hit-to-lead	26
3	OBJETIVOS	28
3.1	Objetivo geral	28
3.2	Objetivos específicos	28
4	METODOLOGIA	29
4.1	COMPOSTOS	29
4.2	PREDIÇÃO DAS PROPRIEDADES ADMET	29
4.3	CULTIVO DAS CÉLULAS DE MAMÍFERO	29
4.4	CULTIVO DOS PARASITOS	29
4.5	CITOTOXICIDADE	30
4.6	ATIVIDADE TRIPANOCIDA	30
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	31

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1	PROPRIEDADES ADMET	32
5.2	CITOTOXICIDADE DOS COMPOSTOS	38
5.3	ATIVIDADE TRIPANOCIDA	40
6	CONCLUSÃO	43
	REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

A Doença de Chagas (DC), causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, se configura como um agravo para a saúde pública da América Latina, sendo considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma doença tropical negligenciada (PEREIRA-SILVA, 2022). A DC afeta predominantemente populações em situação de pobreza e vulnerabilidade, resultando em grande impacto nos níveis de morbidade e mortalidade. Dessa forma, é um problema intimamente relacionado a estigmas sociais, levando à uma carência de investimento científico na busca pela sua resolução (PÉREZ-MOLINA, 2018).

A forma mais comum de infecção pelo *T. cruzi* em humanos ainda se dá pela picada e liberação de parasitos na forma tripomastigota nas fezes e urina dos insetos triatomíneos durante o repasto sanguíneo; estes parasitos, uma vez próximos a região lesionada ou da mucosa do hospedeiro vertebrado, invadem os tecidos e caem na corrente sanguínea, iniciando um ciclo de vida complexo com formas evolutivas distintas. Uma vez no hospedeiro vertebrado, o protozoário pode assumir duas formas evolutivas: tripomastigota, forma infectante flagelada, e amastigota, forma intracelular replicativa (PÉREZ-MOLINA, 2018).

Quando estabelecida, a DC apresenta as fases clínicas aguda e crônica. Na fase aguda, geralmente assintomática, podem surgir manifestações clínicas como: febre, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia e inflamações características no sítio de inoculação, como o chagoma de inoculação e sinal de Romaña, sendo raras as formas graves. A forma crônica, consequente em indivíduos não tratados na fase inicial da doença, podem apresentar sintomas que surgem de 10 a 30 anos após a infecção, como cardiomiopatia (mais comum) e distúrbios digestivos caracterizados pelos quadros de cardiomegalia e megacólon, respectivamente. (CAMPOS *et al.*, 2016; PÉREZ-MOLINA *et al.*, 2021).

O atual tratamento para a infecção por *T. cruzi* é sustentado pelos medicamentos Nifurtimox e Benznidazol, que apresentam condições de segurança questionáveis devido aos severos efeitos colaterais durante a administração, além de possuírem alto custo e pouca eficácia terapêutica na fase crônica da doença (CECING *et al.*, 2012). Em relação ao Benznidazol, medicamento utilizado no Brasil, os efeitos adversos estão relacionados a heterogeneidade e resistência do parasito ao tratamento, somadas à baixa solubilidade e biodisponibilidade do fármaco,

características farmacocinéticas que não favorecem a ação antiparasitária (MORENO, 2015). Desta forma, a busca por novos candidatos a fármacos no combate a DC é imprescindível, visto a necessidade de compostos mais seletivos para o parasito, menos tóxicos para o paciente e com melhor perfil farmacocinético, além de apresentar eficácia contra cepas do parasito resistentes ao tratamento com as drogas disponíveis e ser acessível para as populações acometidas.

Nos últimos anos, com o advento tecnológico no campo da química orgânica, diversas moléculas com potencial antiparasitário têm emergido; dentre essas, os derivados de tioureia, que demonstraram resultados promissores em ensaios *in vitro* contra as formas epimastigota, tripomastigota e amastigota de *T. cruzi* (PEREIRA *et al.*, 2021). As tiouréias são uma classe de compostos orgânicos que contêm uma ligação dupla entre enxofre e carbono em sua fórmula geral, em que o restante das ligações com o carbono são completadas por nitrogênio $[(R1R2N)(R3R4N)C=S]$, numa estrutura que muito se assemelha à da ureia, com a substituição do átomo de oxigênio pelo de enxofre (SHAKEEL *et al.*, 2016). Derivados contendo tiouréia têm relatada atividade anticâncer (SAEED *et al.*, 2010), antifúngica (LESSA, 2022), antibacteriana (PILOTO, 2016), antiinflamatória (CALIXTO *et al.*, 2022), antiviral (CHEN *et al.*, 2009) entre outras; e quando complexados à grupamentos benzoil, formando as benzoiltioureias, apresentaram baixa citotoxicidade (CUNHA *et al.*, 2007). Dessa forma, essas moléculas têm despertado interesse na aplicação em diversas áreas da química medicinal, inclusive, no combate a doenças tropicais negligenciadas causadas por parasitos.

No desenvolvimento de novos fármacos, uma variedade de abordagens podem ser empregadas, e dentre essas, ganha destaque a otimização “hit-to-lead”, que consiste em elevar uma molécula bioativa (hit) à categoria de composto líder (lead). Hits designam moléculas na estrutura de um composto que possuem atividade específica contra um alvo selecionado, e uma vez identificadas, são otimizadas e transformadas em leads, em um processo que consiste em elevar o composto à categoria de líder aumentando sua potência e melhorando suas propriedades farmacocinéticas por meio de alterações químicas (PARADELA, 2021). Em adição, essa metodologia tem sido amplamente utilizada no planejamento de novos fármacos (HERCOS, 2023).

Assim, a avaliação do potencial tripanocida de compostos derivados de benzoiltioureia, otimizados por hit-to-lead, que possuam alta especificidade contra *T.*

cruzi e sejam pouco tóxicos para células de mamífero, se configura como tema relevante na prospecção de novos fármacos voltados para o tratamento da Doença de Chagas.

2.1.2 Epidemiologia

De acordo com dados da OPAS (Organização Pan-Americana da Saúde), a DC acomete entre 6 e 7 milhões de pessoas em todo mundo, sendo a maior parte dessa população concentrada na América Latina, com 30 mil novos casos e 10 mil mortes relatadas por ano. Ainda segundo a organização, menos de 10% dos indivíduos com DC são diagnosticados antes que a fase crônica da doença se desenvolva (OPAS/OMS, 2023).

No Brasil, a doença atinge cerca de 40% do território nacional, em que os maiores índices de casos estão localizados nos estados de Minas Gerais, Goiás, Bahia, São Paulo, Acre, Amazonas e Amapá. Nesses locais, a ocorrência da doença se dá predominantemente na região rural, uma vez que a principal via de transmissão é a vetorial, e o inseto vetor (triatomíneo) encontra nas habitações rurais um ambiente favorável à sua procriação, caracterizadas por serem rústicas, de pau a pique e taipa, com pouca iluminação e rachaduras nas paredes (DE SOUZA LIMA, 2019).

Outra forma de transmissão que contribui para o elevado número de infecções no país é a ingestão de alimentos contaminados, principalmente na região Norte, onde há o forte consumo de caldo de cana, açaí, palmito de babaçu, jaci, bacaba e buriti, alimentos que são cultivados no hábitat ideal para o inseto vetor. A contaminação é principalmente associada à manipulação semi-industrializada dos alimentos e à preparação artesanal do meio comunitário familiar (SOUSA JUNIOR *et al.*, 2017; DA CUNHA *et al.*, 2021).

2.1.3 Transmissão

A transmissão da DC para o hospedeiro mamífero se dá, principalmente, pelo vetor triatomíneo, um inseto da subfamília *Triatominae* conhecido popularmente como barbeiro, que ao se alimentar de animais infectados por *T. cruzi* durante o repasto sanguíneo ingerem e passam a carrear o parasita, infectando outros indivíduos na próxima alimentação. Essa forma de infecção é devida à eliminação do parasito nas fezes e urina do inseto ao realizar o repasto sanguíneo, que em contato com o orifício da picada penetra a pele e infecta o hospedeiro humano (SCHUSTER; SCHAUB, 2000).

Além da vetorial, outra forma de transmissão da DC é a vertical, que ocorre principalmente pela via transplacentária durante a gestação ou no momento do parto (BRASIL, 2019). Segundo a OPAS, cerca de 1,1 milhão de mulheres em idade fértil são infectadas pelo parasita na América Latina, e a cada ano 9 mil crianças contraem a DC por transmissão vertical (OPAS/OMS, 2023).

A transmissão também pode se dar por via oral, na ingestão de alimentos contaminados com o parasito, seja pela presença do triatomíneo ou de suas fezes. Por essa rota, os parasitas se replicam nas células epiteliais da mucosa gástrica. Essa via de transmissão está associada à negligência em relação a boas práticas de higiene na manipulação de alimentos, e também à invasão humana dos habitats silvestres, aumentando a proximidade com os vetores (DE MEIS, 2013).

Outra mucosa que pode ser contaminada é a conjuntiva, resultante do contato do *T. cruzi* com a superfície ocular. Após a inoculação conjuntival, os parasitas drenam com as lágrimas para ducto nasolacrimal e cavidade nasal, onde penetram os tecidos epiteliais proximais e iniciam sua diferenciação e replicação. Esta via resulta em conjuntivite esquizotripanossômica unilateral bipalpebral, um sinal patognomônico da fase aguda da doença de Chagas, conhecido como sinal de Romaña (GIDDINGS *et al.*, 2006).

No contexto do transplante de órgãos, a transmissão pode ocorrer a partir de um doador chagásico, sendo documentada em transplantes de coração, fígado, pâncreas, rim e medula óssea. Pode ocorrer também pela reativação da parasitemia em um paciente receptor de órgãos previamente infectado (DIAS; AMATO NETO, 2011).

A via transfusional, apesar de ser um importante meio de propagação da doença em centros urbanos, tem seu impacto controlado no Brasil devido à efetividade do controle dos serviços de hemoterapia, garantido um maior controle de qualidade do sangue a ser transfundido. Há ainda a transmissão através de acidentes laboratoriais, por contato com culturas de *T. cruzi*, exposição à fezes de triatomíneo infectadas ou sangue contendo formas infectantes do parasito (BRASIL, 2019).

2.1.4 Sintomas

A manifestação clínica da DC possui duas fases: aguda e crônica. A fase aguda geralmente é assintomática, no entanto, quando presentes os sintomas, é caracterizada por uma alta parasitemia, e tem como principal manifestação a febre constante, podendo persistir por até 12 semanas. Nessa fase os sinais clínicos podem desaparecer de forma espontânea antes que a doença possa ser diagnosticada e tratada, encaminhando-se para a fase crônica, que pode durar anos. A detecção de anticorpos IgM também é possível, havendo um aumento gradativo da detecção de IgG com a redução da parasitemia ao longo das semanas (da quarta à sexta semana de infecção). A sintomatologia inespecífica nesta fase pode incluir: prostração, diarreia, vômitos, inapetência, cefaléia, mialgia, aumento dos linfonodos e exantema cutâneo de aparecimento fugaz. Em relação à sintomatologia específica, sinais e sintomas de miocardite difusa, pericardite, derrame pericárdico, tamponamento cardíaco, insuficiência cardíaca e derrame pleural podem surgir; além de edema de face, membros superiores ou generalizado, tosse, dispnéia, arritmias, palpitações, hepatomegalia e esplenomegalia de intensidade moderada (UMEZAWA, 1996; BRASIL, 2019).

O sinal de Romaña (edema bipalpebral unilateral) e o chagoma de inoculação (lesão furunculoide, descamativa e não supurativa nos membros, tronco ou face) são reações inflamatórias ocasionadas pela penetração do parasito e se configuram com sinais de porta de entrada, porém são pouco frequentes (COSTA *et al.*, 2013).

Já a fase crônica é caracterizada por parasitemia baixa e intermitente, inicialmente assintomática, podendo apresentar-se nas formas indeterminada, cardíaca, digestiva e associada ou mista. Na forma indeterminada, o infectado é assintomático e não apresenta comprometimento do aparelho circulatório ou digestivo, de modo que esse quadro pode perdurar por toda a vida do indivíduo ou evoluir para uma das outras formas. A forma cardíaca apresenta um acometimento cardíaco que evolui para miocardiopatia dilatada e insuficiência cardíaca congestiva, sendo a principal responsável pela frequência de óbitos da fase crônica da DC. Na forma digestiva, o aparelho digestivo acometido pode evoluir para quadros de megaesôfago e megacólon, e na forma associada ou mista, ocorrem lesões compatíveis com um acometimento cardiodigestivo concomitante (BRASIL, 2019).

2.1.5 Diagnóstico

Em ambas as fases de manifestação clínica da DC, o diagnóstico pode se basear na detecção do parasito, por métodos parasitológicos diretos ou indiretos, e na identificação de anticorpos no soro, através de testes sorológicos como a imunofluorescência indireta (IFI), hemaglutinação indireta (HAI) e ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática, do inglês Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Podem também ser realizados testes utilizando PCR (reação em cadeia polimerase, do inglês Polymerase Chain Reaction), indicado quando os testes sorológicos apresentam resultado indeterminado e para o acompanhamento da cura pós-tratamento (GOMES, 2017).

O diagnóstico laboratorial na fase aguda consiste na pesquisa do parasito em sangue periférico, podendo ser realizada, principalmente, por meio do teste direto a fresco ou a técnica da gota espessa. Em caso de negatividade, métodos parasitológicos indiretos de concentração, como micro-hematócrito e Strout, podem ser utilizados em situações de forte suspeita (ALVES *et al.*, 2018).

Já na fase crônica, métodos parasitológicos diretos não são recomendados devido à ausência de parasitemia, além de que métodos indiretos que podem ser utilizados, como o xenodiagnóstico, apresentam baixa sensibilidade. Desse modo, o diagnóstico durante essa fase é essencialmente sorológico e se dá pela detecção de IgG específica para *T. cruzi*, devendo ser realizado utilizando-se dois testes de métodos diferentes, sendo um com elevada especificidade e outro com elevada sensibilidade, como ELISA com antígenos recombinantes e com antígenos totais, respectivamente (GOMES, 2017).

Na via de transmissão vertical, o diagnóstico consiste na pesquisa da sorologia da mãe, e no caso de positividade, é realizado o exame parasitológico no recém-nascido. Se positivo, a criança é submetida ao tratamento etiológico de maneira imediata; se negativo, a criança deve retornar entre seis e nove meses para realização de testes sorológicos para confirmar ou afastar a possível transmissão vertical (GONZÁLES-TOMÉ, 2013).

2.1.6 Tratamento

Apesar do elevado número de indivíduos acometidos pela doença no mundo inteiro, as opções terapêuticas para a DC são limitadas, de forma que atualmente o tratamento dispõe-se de apenas dois fármacos: Benznidazol (BNZ) e Nifurtimox. No Brasil, apenas o BNZ está disponível para o combate à DC, podendo ser obtido pelo Sistema único de Saúde (SUS) (FERREIRA, 2019).

Ambas as drogas são eficazes na fase aguda da doença, na reativação da infecção no caso de imunossupressão e na fase crônica inicial (URBINA, 2009). No entanto, possuem eficácia diminuída na fase crônica tardia, além de que algumas cepas do parasito resistentes à nitroderivados também diminuem os índices de cura terapêutica na utilização desses fármacos. Somado a esses fatores, essas drogas apresentam ainda efeitos colaterais severos o suficiente para a interrupção do tratamento, como dermatite esfoliativa, polineurite periférica, parestesias, manifestações neuropsíquicas, erupção cutânea, neuropatia periférica e distúrbios gastrointestinais. (COURA *et al.*, 1997; CENCIG, 2012).

Em relação ao BNZ, medicamento disponibilizado no Brasil, as propriedades farmacocinéticas desfavoráveis também se apresentam como pontos negativos na utilização da droga, que possui baixa biodisponibilidade oral e baixa solubilidade aquosa (MORENO, 2015). Dessa forma, o caráter negligenciado, o elevado número de indivíduos infectados e opções limitadas e desfavoráveis para o tratamento da DC, justificam a urgência na busca por novos fármacos eficazes no combate à doença.

2.2 TRYPANOSOMA CRUZI

2.2.1 Taxonomia

O *Trypanosoma cruzi* (reino Protista, filo Sarcomastigophora, classe Zoomastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae) é um protozoário de larga distribuição na natureza, tendo sua circulação vinculada principalmente a insetos vetores e mamíferos (DIAS, 2006). Em termos de nutrição, o parasita é capaz de sobreviver no sangue e em meios pobres de nutrição por vários dias, desde que não haja dessecação ou agressões físico-químicas,

retirando do meio o provimento de glicose, frutose e outros açúcares superiores, que são metabolizados por via glicolítica ou de pentoses (CERISOLA, 1972).

O metabolismo energético é realizado pelas vias oxidativa e anaeróbica, com grande consumo de O₂ a 37°C por tripomastigotas, que diminui em temperaturas menores e nas formas amastigotas. Além disso, o parasita sintetiza aspartato, alanina, glutamato, pirimidina e outros aminoácidos e bases; contudo, não consegue realizar a síntese de purina e colesterol, buscando em seus hospedeiros (DIAS, 2006; DUMOULIN *et al.*, 2022).

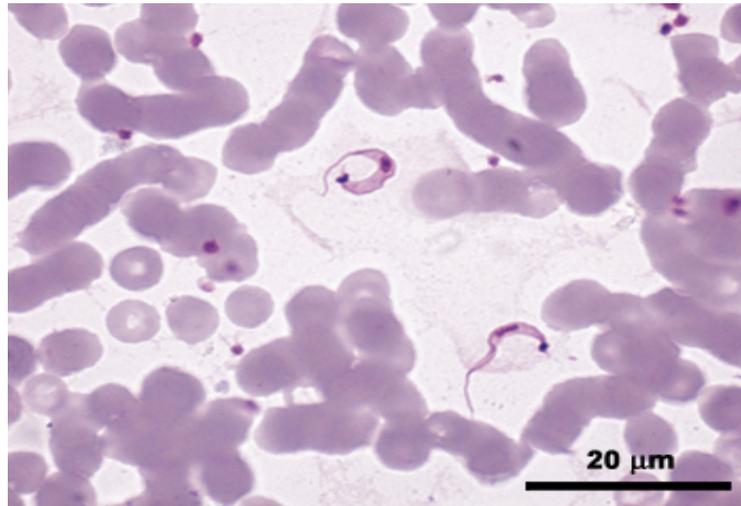
2.2.2 Formas Evolutivas

A observação através da microscopia óptica permite a identificação de três formas evolutivas bem definidas para *T. cruzi*: tripomastigota, amastigota e epimastigota. A tripomastigota se caracteriza por ser uma forma alongada, com cinetoplasto arredondado e localizado posteriormente ao núcleo. Possui um flagelo que emerge da bolsa flagelar (não visível à microscopia óptica) localizado lateralmente e aderido ao corpo do parasito, tornando-se livre na região anterior (Figura 2-A). Sendo a forma infectante, pode ser encontrada na porção posterior do intestino do inseto vetor, no sangue e no espaço intercelular dos hospedeiros vertebrados (TÉCIA, 2017).

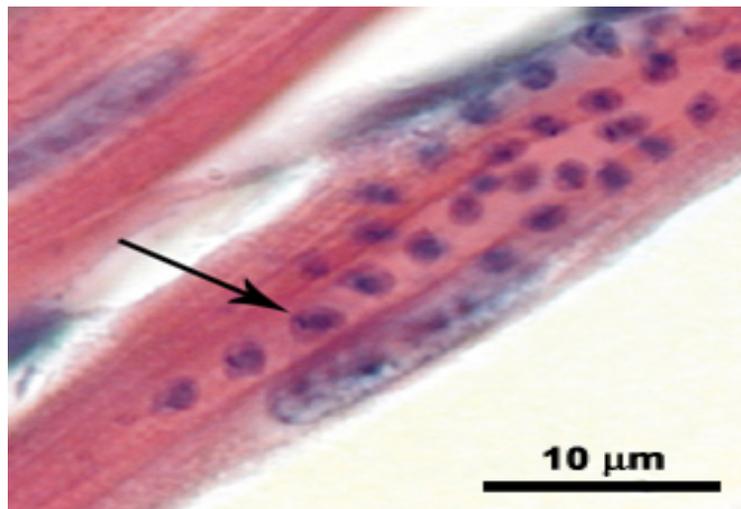
A amastigota, forma intracelular do parasito, é arredondada, possui cinetoplasto em formato de bastão localizado na região anterior ao núcleo, e flagelo curto que emerge da bolsa flagelar (não visível à microscopia óptica) (Figura 2-B). Já a forma epimastigota é alongada e possui cinetoplasto em bastão anterior ao núcleo. O flagelo, que emerge da bolsa flagelar com abertura lateral, percorre aderido ao longo do parasita e se torna livre na região anterior. É uma forma encontrada no tubo digestivo do inseto vetor (Figura 2-C) (TÉCIA, 2017).

Figura 2. Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*. (A) Formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*. (B) Formas amastigotas (seta preta) em músculo cardíaco de camundongo infectado com *T. cruzi*. (C) Formas epimastigotas de *T. cruzi*.

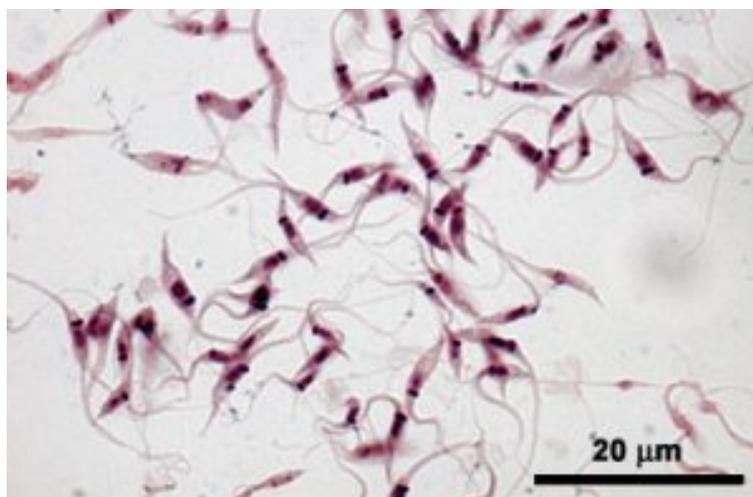
A



B



C



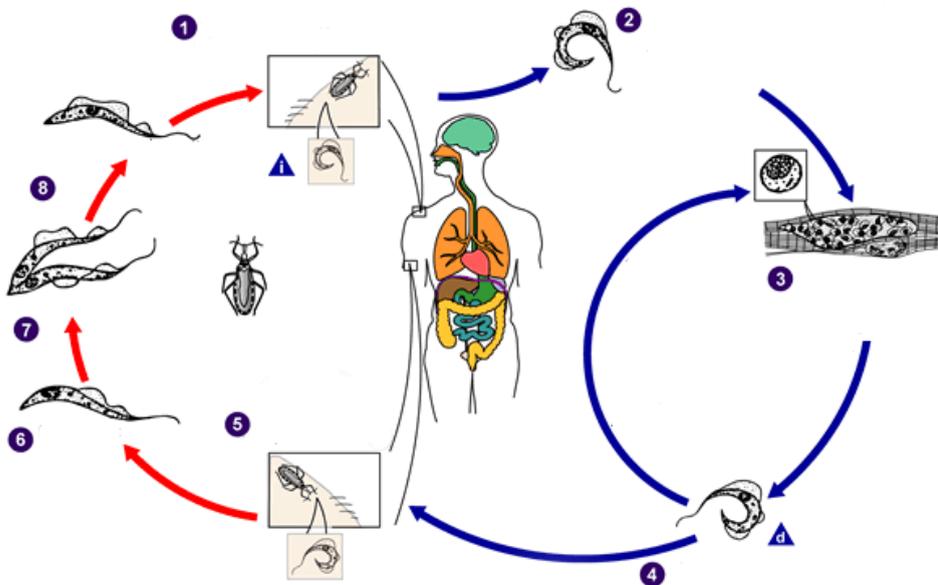
Fonte: Portal da Doença de Chagas (adaptado).

2.2.3 Ciclo Biológico

Levando em consideração o mecanismo natural de infecção por *T. cruzi*, o ciclo de vida do parasito (Figura 3) é iniciado com a eliminação dos tripomastigotas metacíclicos nas fezes e urina do inseto vetor (triatomíneo) durante o repasto sanguíneo. Essa forma infectante penetra o hospedeiro vertebrado pelo local da picada do inseto, e em seguida interage com as células do sistema mononuclear fagocitário da pele ou mucosas. Dentro dessas células, o parasito sofre diferenciação das formas tripomastigotas para amastigotas, que multiplicam-se por divisão binária simples e diferenciam-se novamente em tripomastigotas. Ao longo desse amadurecimento, o parasito libera enzimas que digerem o citoesqueleto, a rede de filamentos que dá forma e sustentação à célula, de modo que, na etapa final de diferenciação, a fragilidade do citoesqueleto permite que a movimentação dos parasitos flagelados rompa a membrana celular, sendo liberados dessa forma do espaço intracelular para o intersticial. Ao alcançarem a corrente circulatória, atingem células de diferentes tecidos e órgãos para cumprir um novo ciclo celular caso não sejam destruídas por mecanismos imunológicos do hospedeiro, e podem ainda ser ingeridas pelo inseto triatomíneo, dando início ao ciclo extracelular (FERREIRA, *et al.* 2021; NEVES, 2022).

Ao ingerir formas tripomastigotas da corrente circulatória do hospedeiro vertebrado, o inseto vetor se infecta durante o repasto sanguíneo. No estômago do triatomíneo, tripomastigotas diferenciam-se em epimastigotas, que no intestino médio multiplicam-se por divisão binária simples. Por fim, na porção final do tubo digestivo do inseto, epimastigotas diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos (infectantes), e são eliminados nas fezes e urina do triatomíneo (NEVES, 2022).

Figura 3 - Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. (1) Repasto sanguíneo do triatomíneo e eliminação das formas tripomastigotas de *T. cruzi*. (2) Penetração das tripomastigotas na corrente sanguínea. (3) Diferenciação em amastigotas no interior das células e replicação do parasito. (4) Diferenciação de em tripomastigotas e rompimento da célula, atingindo novamente a corrente sanguínea. (5) Repasto sanguíneo do triatomíneo e ingestão de tripomastigotas. (6) Diferenciação em epimastigotas no interior do inseto. (7) Replicação de epimastigotas. (8) Diferenciação em tripomastigotas. i = estágio infectante; d = estágio diagnóstico.



Fonte: Centers for Disease Control and Prevention (adaptado).

2.2.4 Fisiopatologia e Histopatologia

Após a penetração no hospedeiro vertebrado através do orifício da picada do inseto, tripomastigotas infecciosos são encontrados na corrente sanguínea. A forma amastigota, presente inicialmente em macrófagos, após diferenciação em tripomastigotas e interação com diferentes tecidos e órgãos, pode ser observada no interior de células musculares ou nervosas, havendo uma predileção pelo miocárdio ou plexo mioentérico do trato gastrointestinal. Desse modo, também podem ser observadas em macrófagos fixos obtidos do baço, linfonodos, medula óssea, fígado, e em filas ou dilatações císticas dentro da fibra do miocárdio (NGUYEN, 2023).

Na fase aguda (8-12 semanas), a lesão primária apresenta histiócitos, células inflamatórias e áreas de necrose granulosa. A multiplicação do parasita ocorre em macrófagos próximos e resulta na invasão de músculos cardíacos e lisos, neurônios, células da glia e adipócitos (NGUYEN, 2023).

Na fase crônica indeterminada (geralmente nos primeiros 10-30 anos), a sorologia é positiva, porém, o paciente se apresenta assintomático. Eventualmente há progressão para formas determinantes que podem envolver coração e trato gastrointestinal. Na doença cardíaca, há hipertrofia e dilatação generalizadas, trombo mural na aurícula direita e ápice do ventrículo esquerdo. A nível microscópico, há fibrose, áreas de necrose e degeneração celular e edema

interfibrilar. Já a doença gastrointestinal apresentará megaesôfago e megacólon devido à fibrose e degeneração dos gânglios autônomos do plexo mioentérico (NGUYEN, 2023).

2.3 TIoureias

2.3.1 Definição

A tioureia é uma molécula orgânica análoga a ureia, sintetizada pela primeira vez pelo químico polonês Marcell Nencki, que apresenta em sua composição química o átomo de enxofre em detrimento do oxigênio (ureia), sendo sua fórmula geral $(R_1R_2N)(R_3R_4N)C=S$. Apesar da semelhança estrutural com as ureias, a diferença na substituição do átomo de oxigênio da ureia pelo átomo de enxofre na tioureia é determinante para que essas duas moléculas possuam propriedades químicas distintas (SHAKEEL, 2016).

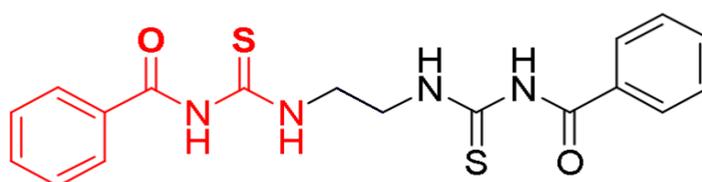
Devido à sua grande versatilidade sintética e biológica, tioureias desempenham um papel importante na descoberta de medicamentos, uma vez que compostos contendo a molécula possuem uma ampla variedade de atividades biológicas (PEREIRA, 2021). Entre as aplicações, derivados de tioureia podem ser utilizados como antioxidantes (VENKATESH, 2009), antialérgicos (HARGRAVE, 1983), como medicamentos antitireoidianos (ROSOVE, 1977), anticancerígenos (RICHTER, 1945), antiepilépticos (MASEREEL, 1997) e anti-hipertensivos (LOEV, 1972); possuem relatada atividade antibacteriana (SHAKEEL, 2016), antiinflamatória (SONDHI, 2000), antidiabética (FAIDALLAH, 2016), antifúngica e antiviral (WU, 2012). Além disso, há relatos na literatura indicando que a estrutura da tiouréia poderia representar um farmacóforo promissor na busca por novas terapias contra doenças protozoárias, como malária (SUNDURU, 2009), leishmaniose (HARIKANDEU, 2020) e doença de Chagas (PEREIRA, 2023).

2.3.2 Benzoiltioureias

Desse modo, derivados de tioureias têm atraído o interesse de grupos de pesquisa devido ao seu potencial medicinal (CUNHA, 2007). Entre esses derivados, aqueles contendo N-benzofila, formando as benzoiltioureias ($C_8H_8N_2OS$) (Figura 4), chamam a atenção por apresentarem interessantes atividades biológicas (XU, 2003;

PUBCHEM, 2024). Os grupos carbonila e tiomaida podem se ligar a vários íons metálicos, e seus complexos metálicos são blocos potenciais para arquiteturas supramoleculares (HARTMANN, 1985). Além dessas propriedades, resultados previamente publicados indicam a baixa citotoxicidade dessas moléculas, sugerindo seu potencial na síntese de novos fármacos (YADAVA, 1989; CUNHA, 2007; HUANG, 2013).

Figura 4. Estrutura de um derivado de benzoiltioureia. (N,N-((ethane-1,2-diy)bis(azanediy))bis(carbonothioyl))dibenzamide). Em vermelho, o grupamento benzoiltioureia.



2.3.3 Hit-to-lead

O elevado custo da introdução de um novo medicamento no mercado, em grande parte atribuído ao número e a complexidade de ensaios clínicos para satisfazer as exigências de segurança, eficácia e benefício farmacoeconômico das autoridades regulatórias, além de altas taxas de desistência na fase clínica, justificam o crescimento e a urgência da busca por processos inovadores no desenvolvimento de medicamentos (ALANINE, 2003; BLEICHER, 2003). Nesse sentido, estratégias de baixo custo e alto rendimento na síntese de novos fármacos despertam o interesse da indústria farmacêutica, e dentre essas estratégias, a otimização hit-to-lead ganha destaque (JÚNIOR, 2023).

O principal objetivo da otimização hit-to-lead é encontrar, através de avaliações *in silico*, um composto ativo *in vivo* com um perfil farmacológico favorável, apresentando boas características de ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) (JÚNIOR, 2023). Esse processo consiste no rastreamento de moléculas que interagem com um alvo molecular biológico de interesse, e o resultado dessa triagem é a seleção daquelas que demonstram atividade específica na proteína alvo, designadas como hits. Os hits formam a base de um programa

químico para a otimização em leads, aumentando a potência da atividade na proteína alvo (PARADELA, 2017). Um lead representa a estrutura química ou série de estruturas de uma molécula responsável pela atividade específica contra um alvo determinado, e sua obtenção se dá por meio da redução da complexidade molecular ao menor grupo farmacofórico ativo. Uma vez que a estrutura é minimizada, ela é então elaborada e expandida com base na exploração da relação estrutura-atividade, ajustando e melhorando *in vitro* suas propriedades físico-químicas contra o alvo selecionado (ALANINE, 2003).

Dessa forma, a otimização hit-to-lead aperfeiçoa o processo de produção de novos medicamentos, e por possibilitar a filtragem das estruturas moleculares que apresentam atividades específicas, diminui o período de busca por aquelas que atuam sobre alvos de interesse, sendo muito útil na pesquisa por candidatos à fármacos e na redução do tempo necessário para a introdução destes no mercado (ALANINE, 2003).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar derivados de benzoiltioureia, a partir da avaliação de hits contra *T. cruzi*, como potenciais agentes quimioterápicos no tratamento da Doença de Chagas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o perfil ADMET *in silico* dos novos derivados benzoiltioureia;
- Investigar o efeito citotóxico dos compostos em cardiomioblastos (H9c2);
- Avaliar o efeito do composto menos citotóxico contra as formas amastigotas e tripomastigotas do *T. cruzi*.

4 METODOLOGIA

4.1 COMPOSTOS

Seis derivados de benzoiltiourea (ADS 04, ADS 05, ADS 06, ADS 07, ADS 08 e ADS 12) foram sintetizados pela Dra. Ana María Plutín Stevens (Laboratorio de Síntesis Orgánica, Facultad de Química, Universidad de La Habana), e a predição dos hits dos compostos foi feita utilizando-se o serviço *in silico* web SOMP, que mostra os sítios mais suscetíveis ao metabolismo pelas enzimas do citocromo P450s: CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 e CYP3A4. Cada composto foi dissolvido em DMSO na concentração de 100 mM, e posteriormente diluído em meio de cultivo DMEM em diferentes concentrações para utilização nos ensaios, com a concentração de DMSO ficando abaixo de 1%.

4.2 PREDIÇÃO DAS PROPRIEDADES ADMET

O estudo físico-químico das propriedades farmacocinéticas dos compostos foi feito por meio das análises de ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade), utilizando a plataforma online ADMETLab 2.0 (<https://admet.scbdd.com/>).

4.3 CULTIVO DAS CÉLULAS DE MAMÍFERO

Células Vero e foram mantidas em meio RPMI (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino, enquanto cardiomioblastos da linhagem H9c2 foram mantidos em meio DMEM (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino. As células foram incubadas a 37°C em atmosfera úmida a 5% CO₂.

4.4 CULTIVO DOS PARASITOS

As formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram obtidas de culturas de célula Vero infectadas com tripomastigotas no 5° dia após a infecção. Formas amastigotas intracelulares de cultura foram obtidas a partir da inoculação de tripomastigotas em culturas de H9c2, mantidas em meio a 37°C e utilizadas nos ensaios de atividade biológica dos compostos, conforme descrito a seguir.

4.5 CITOTOXICIDADE

O ensaio de citotoxicidade foi realizado em cardiomioblastos (H9c2). As células (10^5 células/mL) foram incubadas em placas de 96 poços à 37°C na presença das concentrações de $800\mu\text{M}$, $400\mu\text{M}$, $200\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$ e $50\mu\text{M}$ dos compostos por 24 horas. Após a incubação, as células foram lavadas e submetidas ao ensaio de viabilidade celular utilizando o kit CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability, conforme as instruções do fabricante. A luminescência emitida foi mensurada através do equipamento GloMax Luminometer (Promega Corporation, USA). Células não tratadas foram utilizadas como controle da reação. A CC_{50} (concentração citotóxica do composto capaz de inibir 50% das células) foi determinada por análise de regressão linear. Os testes foram feitos em triplicata em três experimentos independentes.

4.6 ATIVIDADE TRIPANOCIDA

Para avaliar o efeito dos compostos-testes sobre as formas amastigotas, cardiomioblastos mantidos em meio DMEM foram semeados em placas de cultivo de 24 poços (10^5 células/mL), contendo uma lamínula de vidro por poço, e mantidos a 37°C . Após 24h, as culturas, aderidas às lamínulas, foram infectadas com formas tripomastigotas na concentração de 2×10^6 parasitos/mL, por 24 horas. Após este período, as células foram lavadas duas vezes com PBS para remoção dos parasitos não internalizados, e posteriormente incubadas na presença dos compostos-teste na concentração de $50\mu\text{M}$. Foi selecionado o composto menos citotóxico para cardiomioblastos e com atividade tripanocida em amastigotas $>60\%$. O derivado mais promissor foi avaliado em diferentes concentrações ($100\mu\text{M}$, $50\mu\text{M}$, $25\mu\text{M}$, $12,5\mu\text{M}$ e $6,25\mu\text{M}$) por 24 horas. As células foram então fixadas e coradas utilizando o kit Panótico Rápido, e foram contadas através da microscopia óptica convencional para determinação das células infectadas, não infectadas e o número de amastigotas. A partir desta contagem, foi determinada a IC_{50} (concentração inibitória média de 50% dos amastigotas) por regressão linear. Células infectadas não tratadas foram utilizadas como controle.

Para avaliação do efeito em tripomastigotas, os parasitos nessa forma foram incubados (10^6 células/mL) em placas de 96 poços à 37°C na presença das

concentrações de 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 12,5 μ M e 6,25 μ M por 24h do composto-teste selecionado. Após a incubação, as tripomastigotas foram submetidas ao ensaio de viabilidade celular utilizando o kit CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability, conforme as instruções do fabricante. A luminescência emitida foi mensurada através do equipamento GloMax Luminometer (Promega Corporation, USA). Células não tratadas foram utilizadas como controle da reação. A LC₅₀ (concentração letal para 50% dos parasitos) foi determinada por análise de regressão linear. Cada teste foi feito em triplicata em três experimentos independentes.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi realizada através do ANOVA e pelo teste de Bonferroni, utilizando o programa GraphPad Prism 8. Diferenças entre os grupos foram consideradas significantes para $p \leq 0.05$. Todos os experimentos foram feitos em triplicata em três experimentos diferentes.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PROPRIEDADES ADMET

A predição *in silico* das propriedades farmacocinéticas e farmacológicas de substâncias químicas é uma importante ferramenta para prospecção de novos fármacos; através da análise de ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade), é possível prever a interação dos compostos químicos com o organismo vivo, trazendo economia de tempo e recursos na busca por moléculas bioativas (FERREIRA, 2019). Nesse sentido, os derivados de benzoiltiourea utilizados neste estudo foram analisados por meio da plataforma ADMETLab 2.0, com o objetivo de investigar o comportamento dos compostos em contato com o organismo humano através de parâmetros que predizem esta interação. Além disso, as propriedades das moléculas também foram comparadas com as do Benznidazol, principal medicamento utilizado no tratamento etiológico da DC.

A análise do coeficiente de partição (LopP), parâmetro utilizado como medida da lipofilicidade de compostos bioativos (MALVEZZI, 2000), revelou que todos os compostos apresentaram lipofilicidade maior que a do BNZ, sendo o composto ADS 04 o mais lipofílico (LogP = 5.915); por outro lado, o composto menos lipofílico foi o ADS 12 (LogP = 1.431). Os demais compostos apresentaram coeficiente de LogP entre 3.385 - 4.886 (Tabela 1). LogP é determinado pela razão entre a concentração da substância em um solvente não polar e a concentração da mesma substância em água. Quanto maior o valor de LogP, maior a lipofilicidade da substância, indicando uma maior capacidade de se dissolver em solventes não polares em relação à água. Dessa forma, a partição de um composto nas fases aquosa e não aquosa pode influenciar sua passagem através das membranas biológicas, uma vez que quanto mais lipofílico um composto se apresenta, mais propenso ao transporte passivo através das membranas ele será (AMARAL, 2003).

Outro parâmetro analisado foi a área de superfície polar topológica (TPSA), que se refere à área da superfície do composto ocupada por átomos de nitrogênio e oxigênio ligados ou não ao hidrogênio, estando associada à capacidade de formação de ligações de hidrogênio e à polaridade, envolvidas no transporte molecular passivo através de membranas celulares e sua porção lipídica (RODRIGUES, 2021). Dentre os compostos, o ADS 07 apresentou a maior TPSA

(82.260), que representa a formação de um elevado número de ligações de hidrogênio e uma alta polaridade, significando que a molécula tem uma pobre capacidade de permeação nas membranas celulares. Os demais compostos, no entanto, apresentaram uma TPSA menor que a do BZN (90.060), tendo todos uma melhor capacidade de absorção pelas membranas que a droga de referência (Tabela 1).

A capacidade de penetração da barreira hematoencefálica (BBB) também foi analisada, em que o composto ADS 04 apresentou a menor capacidade de penetração, indicando probabilidade reduzida de geração de efeitos colaterais no sistema nervoso central, uma característica vantajosa em relação ao BNZ, tendo em vista que a neurotoxicidade é uma das complicações da utilização da droga. Por outro lado, os compostos ADS 06 e ADS 12 apresentaram maior capacidade de transpor a BBB, superando o BNZ, podendo interagir com o sistema nervoso central (FLORES-VIEIRA; BARREIRA, 1997; DE LANGE, 2002) (Tabela 1).

Quando avaliada a absorção intestinal humana (HIA), os compostos ADS 07 e ADS 04 apresentaram absorção alta e intermediária, respectivamente, indicando que estes compostos podem ser melhor absorvidos pelo intestino humano após a administração oral; por outro lado, os outros derivados não apresentaram boa absorção intestinal, assim como BNZ (NISHA, 2016). Outro parâmetro analisado foi a interação com a glicoproteína P, que é uma bomba de efluxo presente na superfície da membrana plasmática de enterócitos, hepatócitos e células endoteliais da barreira hematoencefálica, sendo expressa nos pontos de entrada dos xenobióticos efetuando o transporte destes para o exterior das células (ARAÚJO, 2015). Dessa forma, fármacos passíveis da ação da glicoproteína apresentam uma menor biodisponibilidade, e esse perfil foi observado em dois dos derivados testados, ADS 07 e ADS 08 (Tabela 1). A análise o *clearance* (CL) indicou que todos os compostos possuem uma velocidade de depuração menor que a do BNZ, de forma que são eliminados lentamente e permanecem por mais tempo no organismo, sugerindo a possibilidade de um intervalo de tempo maior entre as doses necessárias para efetividade das drogas, sendo o composto ADS 12 aquele com o maior tempo de meia-vida ($T_{1/2}$) (WERLE; BERNKOP-SCHNÜRCH, 2006) (Tabela 1).

Tendo em vista que a doença de Chagas afeta majoritariamente comunidades carentes que vivem distantes dos grandes centros urbanos, onde há pouca

disponibilidade de profissionais da saúde e infraestrutura médico-hospitalar, um novo candidato a fármaco precisa ser acessível para essa população. Medicamentos que possam ser administrados por via oral são preferíveis, uma vez que essa é uma via que não necessita da intervenção de profissionais da saúde para ser concretizada, além de que a deglutição é um ato natural e um método não invasivo, de modo que o paciente em uso da droga não encontra dificuldades durante a administração (SCHELLACK, 2006). Nesse sentido, a regra dos cinco de Lipinski é uma forma simples de avaliação teórica da biodisponibilidade oral de um composto. De acordo com a regra, uma melhor absorção oral está associada a substâncias com massa molecular (MW) <500, coeficiente de partição (cLogP) <5, número de átomos doadores de ligação de hidrogênio (nHD) <5 e número de átomos aceptores de ligação de hidrogênio (nHA) <10. Compostos enquadrados nesta regra precisam obedecer a pelo menos três desses quesitos (LIPINSKI *et al.* 2012).

Dentre os compostos avaliados, apenas o derivado ADS 04 fere a regra de Lipinski (Tabela 1), por possuir massa molecular superior a 500 g/mol (MW = 643.210) e coeficiente de partição superior a 5 (LogP = 5.915), indicando uma reduzida probabilidade de ser biodisponível oralmente, numa condição que pode, no entanto, ser contornada através do emprego de uma série de estratégias, como a utilização de promotores de absorção, modificações químicas e encapsulação em sistemas de partículas, visando o aumento da biodisponibilidade do futuro fármaco (SILVA *et al.* 2002). Ademais, o composto dispõe de outras características que favorecem a biodisponibilidade, como a HIA elevada e o TPSA < 140 Å² (Tabela 1), de forma que não deve ser descartado como potencial medicamento (VEBER *et al.*, 2002).

Tabela 1 - Predição *in silico* das propriedades físico-químicas e farmacocinéticas dos derivados de benzoiltiourea.

Derivado	MW (g/mol)	LogP	TPSA	BBB	Pgp - substrate	HIA	CL (mL/min/kg)	T ½ (h)	nHA	nHD
ADS 04	643.210	5.915	77.570	---	-	+	4.694	0.294	7	2
ADS 05	347.000	4.554	54.020	++	---	--	2.676	0.146	4	2

ADS 06	274.06 0	3.385	41.130	+++	---	--	5.946	0.747	3	2
ADS 07	434.09 0	4.255	82.260	-	+	+++	2.689	0.834	6	4
ADS 08	400.14 0	4.886	58.950	+	+	---	4.831	0.488	5	2
ADS 12	258.06 0	1.431	66.910	+++	---	---	2.240	0.845	5	2
BNZ	260.09 0	0.739	90.060	+	---	---	8.615	0.816	7	1

MW (g/mol): massa molar em grama por mol; LogP: coeficiente de partição; TPSA: área de superfície polar topológica; BBB: penetração da barreira hematoencefálica; Pgp-substrate: substrato de glicoproteína P; HIA: absorção intestinal humana; CL: clearance; T $\frac{1}{2}$: tempo de meia-vida; nHA: número de átomos aceptores de ligação de hidrogênio; nHD: número de átomos doadores de ligação de hidrogênio. Valores de predição de probabilidade: 0-0.1(---); 0.1-0.3(--); 0.3-0.5(-); 0.5-0.7(+); 0.7-0.9(++); 0.9-1.0(+++).

Em adição, também verificamos o potencial citotóxico dos compostos estudados, por meio da análise dos parâmetros de hepatotoxicidade humana (H-HT), injúria hepática induzida por droga (DILI), mutagenicidade (AMES), carcinogenicidade e inibição de hERG (Tabela 2). Com exceção do composto ADS 08, todos os compostos apresentaram baixo potencial hepatotóxico, enquanto que o BZN apresentou uma hepatotoxicidade relativamente alta (++) , inclusive em relação ao ADS 08. No entanto, o perfil é inverso em relação à indução de injúria hepática, em que as moléculas apresentaram uma DILI maior que a da droga de referência.

Quando avaliado o potencial mutagênico, apenas o composto ADS 08 apresentou possível indução de mutagenicidade, ao passo que o ADS 07 e ADS 04 também não apresentaram carcinogenicidade, sendo este último o que possui a menor probabilidade de induzir a carcinogênese, somando-se a outros derivados de tiourea com característica anticâncer relatados na literatura (RICHTER, 1945; SAEED *et al.*, 2010).

Também foi incluída à análise a capacidade de inibição do gene hERG, que está relacionado à função cardíaca por codificar um canal de potássio que contribui com a atividade elétrica do coração e atua na repolarização, de modo que inibição pode acarretar no prolongamento do potencial de ação cardíaco e causar arritmias fatais (BJERREGAARD, 2018). Nenhum dos compostos testados apresentou potencial bloqueio da expressão de hERG.

Tabela 2 - Predição *in silico* do potencial citotóxico dos derivados de benzoiltiourea.

Derivado	H-HT	DILI	AMES	carcinogenicity	hERG blocker
ADS 04	--	+++	---	---	--
ADS 05	-	+++	--	+	---
ADS 06	-	+++	--	+	---
ADS 07	--	+++	--	-	---
ADS 08	+	+++	++	+	---
ADS 12	--	+++	---	+	---
BNZ	++	++	+++	++	---

H-HT: Hepatotoxicidade humana; DILI: injúria hepática induzida por droga; AMES: mutagenicidade; carcinogenicity: carcinogenicidade; hERG blocker: inibidor de hERG. Valores de predição de probabilidade: 0-0.1(---); 0.1-0.3(--); 0.3-0.5(-); 0.5-0.7(+); 0.7-0.9(++); 0.9-1.0(+++).

Somando-se às propriedades farmacocinéticas analisadas *in silico*, também foi presumida a interação dos derivados de benzoiltiourea com a família de proteínas que compõem o sistema enzimático denominado citocromo P450 (CYP450). Estas enzimas encontram-se ancoradas na bicamada lipídica do retículo endoplasmático liso dos hepatócitos, e estão envolvidas na conversão de moléculas hidrofóbicas em substâncias hidrossolúveis, a fim de facilitar sua excreção por via urinária, bile, suor, leite ou saliva. Tal conversão exige que as moléculas sofram modificações químicas, que levam à biotransformação de xenobióticos. Como consequência, ocorre a ativação ou inativação dos agentes terapêuticos, o que pode interferir na eficácia dos compostos ou até mesmo convertê-los em espécies químicas causadoras de danos celulares/teciduais em potencial (DEVLIN, 2021).

Por um lado, medicamentos substratos dessas enzimas têm a velocidade de metabolização aumentada, por outro lado, possuem efeito menos duradouro e exigem doses maiores. Já os inibidores dessas enzimas possuem uma velocidade menor de metabolização e por isso tendem a se acumular no organismo; porém, o acúmulo pode potencializar o efeito das drogas, de forma que são necessárias

concentrações menores e um intervalo maior entre as doses para que o medicamento atinja sua eficácia (FLOCKHART *et al.*, 2021).

Os compostos analisados neste estudo apresentaram uma tendência maior à inibição na interação com as enzimas CYP450, sendo o composto ADS 04 aquele com a maior probabilidade de inibição, indicando que fármacos derivados dessas moléculas podem apresentar uma velocidade de metabolização menor e, por isso, requerem doses menores e mais espaçadas ao longo da administração (Tabela 3).

Tabela 3 - Predição *in silico* da interação dos derivados de benzoiltioureia com as enzimas do citocromo P450.

Derivado	CYP1 A2 inibidor	CYP1 A2 substrato	CYP2 C19 inibidor	CYP2 C19 substrato	CYP2 C9 inibidor	CYP2 C9 substrato	CYP2 D6 inibidor	CYP2 D6 substrato	CYP3 A4 inibidor	CYP3 A4 substrato
ADS 04	--	---	+++	---	+++	-	++	+	+++	++
ADS 05	++	--	+++	---	++	++	--	+	--	--
ADS 06	+++	--	+++	--	+++	++	---	+	--	--
ADS 07	-	---	++	---	+++	+++	---	++	+	--
ADS 08	+	--	+++	---	+++	++	--	-	-	--
ADS 12	++	---	--	---	---	++	---	-	---	--
BNZ	--	---	-	---	--	+	---	-	---	--

Valores de predição de probabilidade: 0-0.1(---); 0.1-0.3(--); 0.3-0.5(-); 0.5-0.7(+); 0.7-0.9(++); 0.9-1.0(+++).

5.2 CITOTOXICIDADE DOS COMPOSTOS

A investigação do potencial citotóxico dos derivados de benzoiltioureia contra células de mamífero se deu pela mensuração da viabilidade celular de cardiomioblastos da linhagem H9c2 após o tratamento com diferentes concentrações dos compostos. Dentre os compostos testados, o derivado ADS 04 apresentou a menor citotoxicidade, com redução discreta da viabilidade celular apenas nas maiores concentrações testadas, 400 μ M e 800 μ M, enquanto nas demais não houve redução da viabilidade em comparação ao controle (Figura 5-A). Para o composto ADS 08 também só pôde ser observada significância nas duas maiores concentrações, porém, com uma variação maior a 800 μ M em comparação ao ADS 04 (Figura 5-E). O composto ADS 05 se comportou como o mais citotóxico, apresentando redução significativa da viabilidade celular em relação ao controle a partir de 100 μ M (Figura 5-B).

Compostos heterocíclicos (que possuem em sua estrutura um anel formado por dois tipos de átomos diferentes) com membros aromáticos contendo átomos de nitrogênio têm sido empregados em química medicinal no planejamento de substâncias bioativas, havendo relatos na literatura de atividade antimicrobiana destes compostos e baixa citotoxicidade contra células de mamífero (QUEIROZ, 2019; SILVA *et al.*, 2019). O composto ADS 04 apresenta em sua composição um número de estruturas aromáticas e nitrogenadas superior ao dos demais compostos, podendo esta característica estar relacionada à baixa citotoxicidade (Figura 6). Por outro lado, o ADS 05, composto com a maior citotoxicidade, apresenta em sua estrutura um átomo de cloro, corroborando trabalhos na literatura que indicam estruturas contendo este átomo como causadoras de injúria celular (MONTEIRO, 2023).

Figura 5. Efeito dos derivados de benzoiltioureia sobre a viabilidade de cardiomioblastos (H9c2). As colunas representam a viabilidade celular em diferentes concentrações. (A) ADS 04; (B) ADS 05; (C) ADS 06; (D) ADS 07; (E) ADS 08; (F) ADS 12. Valores estatísticos *($p \leq 0,05$) **($p \leq 0,003$) ***($p \leq 0,0001$) por One-way ANOVA test seguido de Bonferroni post test. RLU - Unidade Relativa de Luminescência.

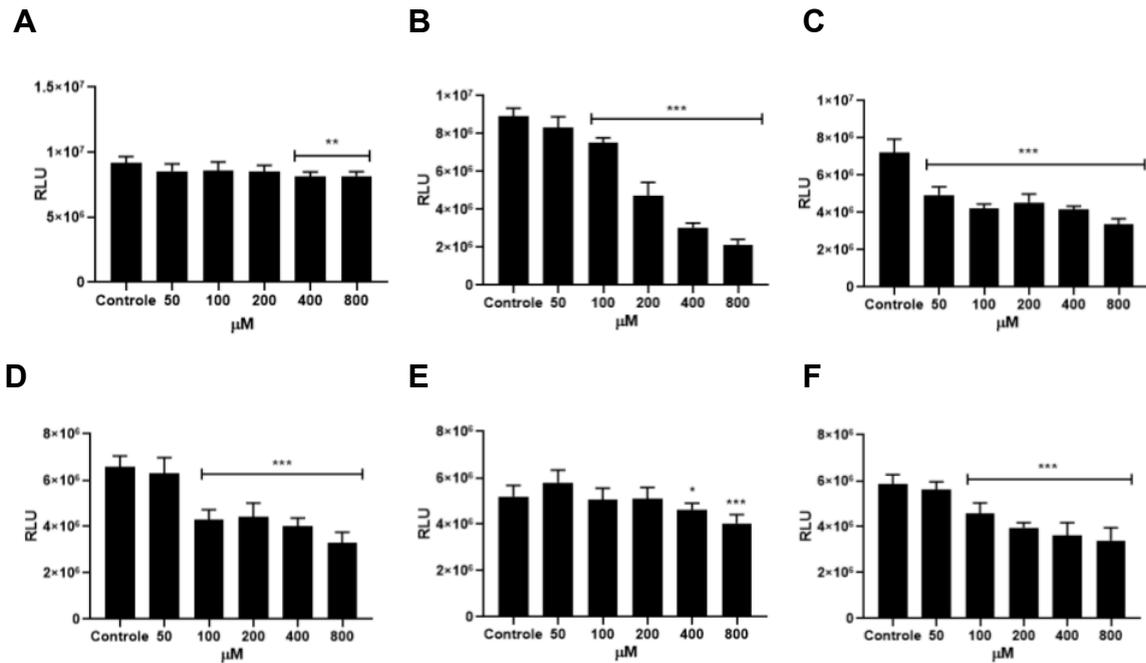
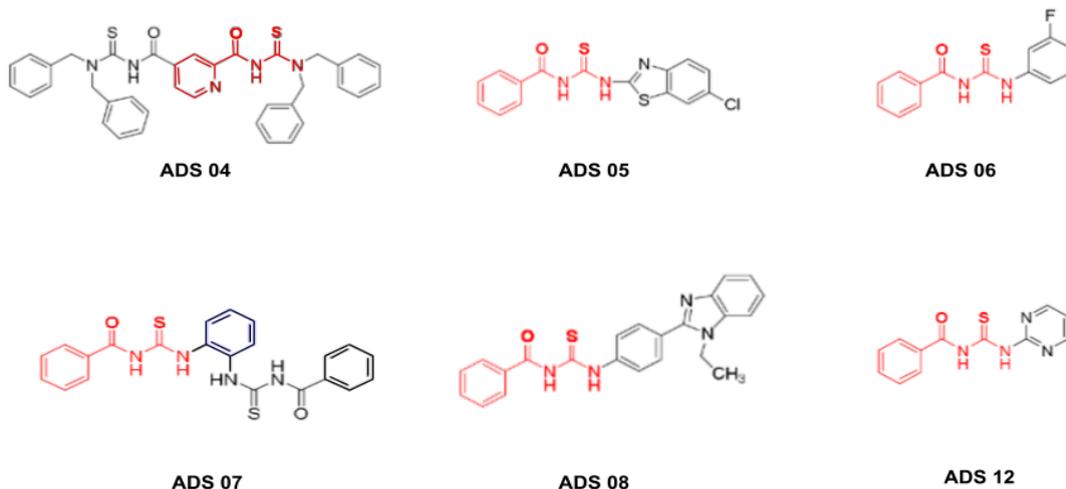


Figura 6. Estrutura química dos derivados de benzoilthioureia. Em vermelho, o grupamento benzoilthioureia.



A partir da mensuração dos índices de viabilidade para as 5 concentrações testadas de cada derivado de benzoilthioureia, a concentração citotóxica para 50% dos cardiomioblastos (CC_{50}) foi determinada por análise de regressão linear (Tabela 4). O composto ADS 04 apresentou a maior CC_{50} , 2987,7 μM, indicando que são necessárias altas concentrações para inviabilizar 50% das células, característico da baixa citotoxicidade. Em relação aos outros derivados, a CC_{50} variou de 417,7 a 1159,7 μM, revelando um perfil tóxico distinto entre as moléculas.

Tabela 4 - Concentração dos derivados de benzoiltiourea citotóxica para 50% de cardiomioblastos (H9c2).

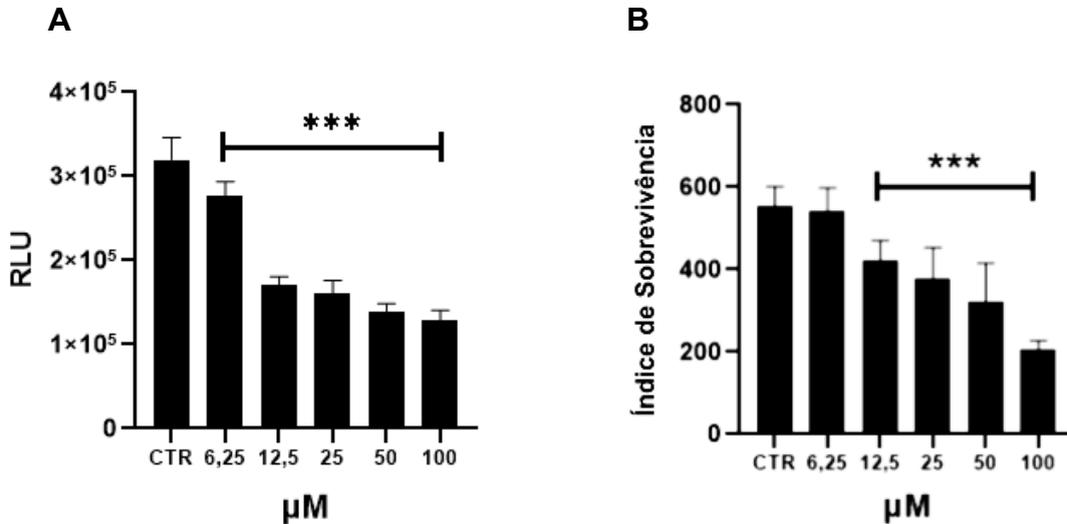
Derivado	CC ₅₀ (µM)
ADS 04	2987,7
ADS 05	417,7
ADS 06	623
ADS 07	679,6
ADS 08	1159,4
ADS 12	849,5

CC₅₀ - Concentração citotóxica para 50% dos cardiomioblastos.

5.3 ATIVIDADE TRIPANOCIDA

Uma vez que o ADS 04 apresentou a menor citotoxicidade entre as moléculas testadas, ele foi o derivado selecionado para a investigação da atividade sobre *T. cruzi*, que foi avaliada para as formas tripomastigota e amastigota do parasito. A investigação do potencial tripanocida para tripomastigotas se deu pela mensuração da luminescência em ensaio de viabilidade celular, após tratamento por 24h com diferentes concentrações do composto. A variação de viabilidade dos parasitos em relação ao grupo controle (não tratado) foi significativa para todas as concentrações testadas, indicando que o composto possui atividade tripanocida para tripomastigotas nas menores concentrações do derivado (Figura 7-A). A determinação da concentração letal para 50% dos parasitos (LC₅₀) por regressão linear indicou que o derivado ADS 04 possui LC₅₀ = 52,73 µM, em uma concentração muito menor que a necessária para atingir o mesmo percentual em cardiomioblastos (CC₅₀ = 2987,7). Além disso, o cálculo do índice de seletividade (IS) em relação à cardiomioblastos (IS = CC₅₀/LC₅₀) demonstrou que o composto é aproximadamente 56,6 vezes mais seletivo para o parasita que para as células cardíacas.

Figura 7. Efeito do derivado ADS 04 sobre tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*. (A) Viabilidade de tripomastigotas tratadas com diferentes concentrações do composto ADS 04. (B) Viabilidade de amastigotas tratadas com diferentes concentrações do composto ADS 04. As colunas representam a viabilidade celular em diferentes concentrações. Valores estatísticos *($p \leq 0,05$) **($p \leq 0,003$) ***($p \leq 0,0001$) por One-way ANOVA test seguido de Bonferroni post test. RLU - Unidade Relativa de Luminescência. CTR – controle.



A avaliação da atividade do composto para as amastigotas foi realizada pela análise da infecção de cardiomioblastos H9c2 por tripomastigotas seguida do tratamento com diferentes concentrações do derivado. Através da contagem das células não infectadas, infectadas e do número de parasitas que se interiorizaram para cada uma das concentrações testadas, foi possível observar a variação na viabilidade de amastigotas, em que o ADS 04 apresentou toxicidade significativa em relação ao controle a partir da concentração de 12,57 µM (Figura 7-B). A concentração inibitória do ADS 04 para 50% de amastigotas (IC₅₀) foi de 70,02 µM, e o índice de seletividade demonstrou que o composto é 42,7 vezes mais seletivo para a forma amastigota que para as células testadas.

Propriedades como a alta lipofilicidade da molécula de ADS 04 (LogP = 5.915, Tabela 1) sugerem que a mesma está sujeita ao transporte passivo através das membranas celulares, de modo que a facilidade de permeabilização do composto nas células infectadas permite sua maior interação com as formas amastigotas do parasito, que são dispostas no espaço intracelular, acentuando a atividade antiparasitária do derivado (AMARAL, 2003). Dessa forma, tanto para tripomastigotas quanto para amastigotas, o derivado ADS 04 foi mais tóxico contra *T. cruzi* que para cardiomioblastos, apresentando valores de IS > 42. Segundo a

literatura, compostos com $IS > 10$ possuem grande potencial como agentes quimioterápicos (DON; IOSET, 2014). Além disso, o derivado não só respeita essa preconização como também está conforme o recomendado para a triagem de drogas contra a Doença de Chagas (ROMANHA *et al.*, 2010), em que um composto em potencial deve: (i) ser ativo contra as formas intra e extracelular do parasito, (ii) apresentar propriedades iguais ou melhores em comparação aos medicamentos vigentes e (iii) possuir um elevado índice de seletividade.

6 CONCLUSÃO

Compostos contendo núcleos de benzoiltiourea surgem no cenário da Doença de Chagas como opções na pesquisa por drogas alternativas no combate à doença, possuindo versatilidade biológica tal que chama o interesse para aplicações em diversas áreas da química medicinal. Seis novos derivados da molécula foram analisados neste estudo, e demonstraram *in silico* características farmacocinéticas vantajosas em relação ao medicamento de referência, sendo mais lipofílicos, menos mutagênicos e carcinogênicos e com maior absorção intestinal; destacando-se entre eles o derivado ADS 04, que apresentou a menor probabilidade de penetração da barreira hematoencefálica, além de uma performance *in vitro* que demonstra um alto índice de seletividade em baixas concentrações para as duas formas evolutivas de importância clínica do *T. cruzi*, com elevada atividade antiparasitária e baixa citotoxicidade contra células de mamífero.

Nesse contexto, os resultados desta pesquisa revelam uma abordagem promissora na busca por novos medicamentos contra a DC, em que identificamos novos derivados de benzoiltiourea como compostos com potencial terapêutico, oferecendo uma nova perspectiva no tratamento dessa patologia. Além disso, enfatizamos a necessidade de estudos mais aprofundados que visem elucidar o mecanismo de ação dessas moléculas, uma vez que a análise detalhada pode fornecer informações cruciais sobre como esses compostos interagem com o parasita e, assim, otimizar a eficácia terapêutica e minimizar possíveis efeitos colaterais adversos.

Portanto, acreditamos que pesquisas futuras utilizando derivados de benzoiltiourea podem oferecer uma contribuição significativa para o campo da quimioterapia da Doença de Chagas, em uma abordagem pode abrir caminho para o desenvolvimento de drogas que sejam mais seguras, mais eficazes, menos tóxicas e, em última análise, capazes de melhorar significativamente a qualidade de vida dos pacientes afetados por essa doença.

REFERÊNCIAS

ALANINE, Alexander *et al.* Lead generation-enhancing the success of drug discovery by investing in the hit to lead process. **Combinatorial chemistry & high throughput screening**, v. 6, n. 1, p. 51-66, 2003.

ALVES, Daniela Ferreira *et al.* Métodos de diagnóstico para a doença de Chagas: uma atualização. **Rev. Bras. An. Clin. [Internet]**, v. 50, n. 4, p. 330-3, 2018.

BLEICHER, Konrad H. *et al.* Hit and lead generation: beyond high-throughput screening. **Nature reviews Drug discovery**, v. 2, n. 5, p. 369-378, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de Vigilância em Saúde**. 3ª edição. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2019.

CALIXTO, Sanderson Dias *et al.* Atividade antimicobacteriana e anti-inflamatória de tioureias como estratégia de tratamento para a tuberculose pulmonar grave. In: **Congresso Fluminense de Pós-Graduação-CONPG**. 2021.

CAMPOS, Braian R. *et al.* TRIPANOSSOMOSE AMERICANA: uma revisão sistemática. 2016.

CENCIG, S. *et al.* Evaluation of benznidazole treatment combined with nifurtimox, posaconazole or AmBisome® in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains. **International journal of antimicrobial agents**, v. 40, n. 6, p. 527–532, out. 2012.

CERISOLA, J. A. *et al.* Enfermedad de Chagas y la transfusión de sangre. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana (OSP)**, set. 1972. (CERISOLA, 1972)

CHEN, Mei-Hang *et al.* Synthesis and antiviral activities of chiral thiourea derivatives containing an α -aminophosphonate moiety. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 4, p. 1383-1388, 2009.

COSTA, Milce *et al.* Doença de chagas: uma revisão bibliográfica. **Revista Eletrônica da Faculdade Evangélica de Ceres**, v. 2, n. 1, 2013.

COURA, José Rodrigues *et al.* Estudo comparativo controlado com emprego de benznidazole, nifurtimox e placebo, na forma crônica da doença de Chagas, em uma área de campo com transmissão interrompida. I. Avaliação preliminar. **Revista da sociedade brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, p. 139-144, 1997.

CUNHA, Silvio *et al.* Antimicrobial activity and structural study of disubstituted thiourea derivatives. **Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly**, v. 138, p. 511-516, 2007.

DA CUNHA, Laisy Nazaré Araújo *et al.* A ascendência da doença de Chagas aguda como uma doença veiculada por alimentos na região Norte do Brasil The ancestry of acute Chagas disease as a foodborne illness in the northern region of Brazil. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 12, p. 117507-117524, 2021.

DE MEIS, Juliana *et al.* Trypanosoma cruzi entrance through systemic or mucosal infection sites differentially modulates regional immune response following acute infection in mice. **Frontiers in immunology**, v. 4, p. 216, 2013.

DE SOUSA LIMA, Ronildo. Doença de Chagas: uma atualização bibliográfica. **RBAC**, v. 51, n. 2, p. 103-06, 2019

DIAS, J. C. P.. Notas sobre o Trypanosoma cruzi e suas características bio-ecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 4, p. 370–375, jul. 2006.

DIAS, João Carlos Pinto; AMATO NETO, Vicente. Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do Trypanosoma cruzi no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, p. 68-72, 2011.

DON, R. O. B.; IOSET, Jean-Robert. Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections. **Parasitology**, v. 141, n. 1, p. 140-146, 2014.

DUMOULIN, Peter C. *et al.* Endogenous sterol synthesis is dispensable for Trypanosoma cruzi epimastigote growth but not stress tolerance. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 937910, 2022.

FAIDALLAH, Hassan M. *et al.* Synthesis and biological evaluation of fluoropyrazolesulfonylurea and thiourea derivatives as possible antidiabetic agents. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 31, n. sup1, p. 157-163, 2016.

FERREIRA, A. M. *et al.* Reações adversas ao benzonidazol no tratamento da Doença de Chagas: revisão sistemática de ensaios clínicos randomizados e controlados. **Cadernos Saúde Coletiva**, v. 27, n. 3, p. 354–362, jul. 2019.

FERREIRA, Eden R. *et al.* Parasite-mediated remodeling of the host microfilament cytoskeleton enables rapid egress of Trypanosoma cruzi following membrane rupture. **Mbio**, v. 12, n. 3, p. 10.1128/mbio. 00988-21, 2021.

FLOCKHART, D. A. *et al.* The flockhart cytochrome P450 drug-drug interaction table. **Division of Clinical Pharmacology, Indiana University School of Medicine**, 2021.

FLORES-VIEIRA, Carmen Lucia Leite; BARREIRA, Amilton Antunes. Experimental benzimidazole encephalopathy: I. Clinical-neurological alterations. **Journal of the neurological sciences**, v. 150, n. 1, p. 3-11, 1997.

GIDDINGS, O. K. *et al.* Anatomical route of invasion and protective mucosal immunity in *Trypanosoma cruzi* conjunctival infection. **Infection and immunity**, v. 74, n. 10, p. 5549-5560, 2006.

GOMES, Y. M. **Diagnóstico**. Disponível em: <<https://chagas.fiocruz.br/doenca/diagnostico>>. Acesso em: 22 nov. 2023.

GONZÁLEZ-TOMÉ, María Isabel *et al.* Recomendaciones para el diagnóstico, seguimiento y tratamiento de la embarazada y del niño con enfermedad de Chagas. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 31, n. 8, p. 535-542, 2013.

HARGRAVE, Karl D.; HESS, Friedrich K.; OLIVER, James T. N-(4-Substituted-thiazolyl) oxamic acid derivatives, new series of potent, orally active antiallergy agents. **Journal of medicinal chemistry**, v. 26, n. 8, p. 1158-1163, 1983.

HARIKANDEI, Kosar Babanezhad *et al.* Synthesis, in-vitro antiprotozoal activity and molecular docking study of isothiocyanate derivatives. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 28, n. 1, p. 115185, 2020.

HARTMANN, Horst; LIEBSCHER, Jürgen; CZERNEY, Peter. Reaction of N-acylthioureas with electrophilic reagents: synthesis of 1, 3, 5-oxadiazinium salts, 1, 3, 5-thiadiazinium salts, 1, 2, 4-dithiazolium salts and benzothiazoles. **Tetrahedron**, v. 41, n. 22, p. 5371-5376, 1985.

HERCOS, Guilherme Freitas de Lima. **Otimização de uma classe de benzenossulfonamidas como agentes anti-trypanosomatidae: planejamento, síntese e avaliação biológica contra *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania infantum***. 2023. 94 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2023.

HUANG, Yao-Dong *et al.* Structure–property correlation of benzoyl thiourea derivatives as organogelators. **Journal of Molecular Structure**, v. 1031, p. 43-48, 2013.

JÚNIOR, Celso de Oliveira Rezende *et al.* Hit-to-lead optimization of a 2-aminobenzimidazole series as new candidates for chagas disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 246, p. 114925, 2023.

LESSA, Juliana Barros de Araújo. **Avaliação in vitro e in silico de derivados de tioureias contendo piperazina com potencial atividade antifúngica**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) – Instituto de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Macaé, 2022.

LIPINSKI, Christopher A. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced drug delivery reviews**, v. 64, p. 4-17, 2012.

LOEV, Bernard *et al.* Amidines. 3. Thioureas possessing antihypertensive activity. **Journal of medicinal chemistry**, v. 15, n. 10, p. 1024-1027, 1972.

MASEREEL, Bernard *et al.* Anticonvulsant activity of pyrid-3-yl-sulfonyl ureas and thioureas. **Epilepsia**, v. 38, n. 3, p. 334-337, 1997.

MONTEIRO, Melquisedeque Mateus. **Análise in vitro da citotoxicidade do clorito e avaliação do seu potencial antileishmania e antineoplásica**. 2023.

MORENO, C. J. G. **Estabelecimento do modelo murino para a modulação de toxicidade do Benzonidazol durante a terapêutica da Doença de Chagas (Trypanosoma cruzi)**. R. da Junqueira 100, 1349-008 Lisboa, Portugal: Universidade de Nova Lisboa, 2015.

NEVES, D. P. *et al.* **Parasitologia Humana**. 14ª edição. R. Maria Paula, 123 - 18º andar - Bela Vista, São Paulo - SP, 01319-001: Editora Atheneu, 2022.

NGUYEN, T.; WASEEM, M. **Chagas Disease**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459272/#_article-19271_s5_>. Acesso em: 15 dez. 2023.

OMS. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Disponível em: <<https://www.who.int/health-topics/chagas-disease>>. Acesso em: 7 dez. 2023.

OPAS/OMS. **Menos de 10% das pessoas com Chagas recebem um diagnóstico**. Disponível em: <<https://www.paho.org>>. Acesso em: 7 dez. 2023.

PARADELA, L. S. **Busca de novos inibidores da enzima glutaminase**. Biblioteca do Instituto de Biologia: Universidade Estadual de Campinas, 8 jan. 2017. (PARADELA, 2017)

PEREIRA, Patrícia Morais Lopes *et al.* Antiprotozoal Activity of Benzoylthiourea Derivatives against *Trypanosoma cruzi*: Insights into Mechanism of Action. **Pathogens**, v. 12, n. 8, p. 1012, 2023.

PEREIRA, P. M. L. *et al.* In vitro evaluation of antitrypanosomal activity and molecular docking of benzoylthioureas. **Parasitology international**, v. 80, n. 102225, p. 102225, 2021.

PEREIRA-SILVA, F. S.; MELLO, M. L. B. C. DE; ARAÚJO-JORGE, T. C. DE. Doença de Chagas: enfrentando a invisibilidade pela análise de histórias de vida de portadores crônicos. **Ciencia & saude coletiva**, v. 27, n. 5, p. 1939–1949, 2022.

PÉREZ-MOLINA, J. A., Clara Crespillo-Andújar, Pau Bosch-Nicolau, Israel Molina. Trypanocidal treatment of Chagas disease. **Enfermedades infecciosas y microbiología clinica** (English ed), v. 39, n. 9, p. 458–470, 2021.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **Lancet**, v. 391, n. 10115, p. 82–94, 2018.

PILOTO, Maria de Fátima da Silva. **Procura de novos antibióticos. Síntese, caracterização e determinação de atividade biológica**. Dissertação (Mestrado em Química Bioorgânica) - Universidade Nova, 2016.

PUBCHEM. National Center for Biotechnology Information. **Benzoylthiourea**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Benzoylthiourea>>. Acesso em: 18 fev. 2024.

QUEIROZ, Camila Marques. **Avaliação da atividade in vitro de novos compostos heterocíclicos frente às formas promastigotas e amastigotas de leishmania infantum** (Nicolle, 1908). 2019.

RICHTER, Curt P. The development and use of alpha-naphthyl thiourea (ANTU) as a rat poison. **Journal of the American Medical Association**, v. 129, n. 14, p. 927-931, 1945.

ROMANHA, Alvaro José *et al.* In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 233-238, 2010.

ROSOVE, Michael H. Agranulocytosis and antithyroid drugs. **Western Journal of Medicine**, v. 126, n. 5, p. 339, 1977.

SAEED, S. *et al.* Synthesis, characterization and biological evaluation of some thiourea derivatives bearing benzothiazole moiety as potential antimicrobial and

anticancer agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 45, n. 4, p. 1323–1331, 2010.

SCHELLACK, G. Farmacologia na prática clínica da área de saúde. **São Paulo, SP: Fundamento Educacional**, 2006.

SCHUSTER, Juliane P.; SCHAUB, Günter A. Trypanosoma cruzi: skin-penetration kinetics of vector-derived metacyclic trypomastigotes. **International journal for parasitology**, v. 30, n. 14, p. 1475-1479, 2000.

SHAKEEL, A. *et al.* Thiourea Derivatives in Drug Design and Medicinal Chemistry: A Short Review. **Journal of Drug Design and Medicinal Chemistry**, v. 2, n. 1, p. 10–20, mar. 2016.

SILVA, Catarina *et al.* Administração oral de peptídios e proteínas: I. Estratégias gerais para aumento da biodisponibilidade oral. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, p. 125-140, 2002.

SILVA, Wanda Juliana Lopes *et al.* **Pirimidinas: síntese de novos derivados e avaliação das atividades biológicas**. 2019. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

SONDHI, S. M. *et al.* Synthesis and anti-inflammatory activity evaluation of some acridinyl amino antipyrine, acridinyl amino anthraquinone, acridino thiourea and thiazolino thiourea derivatives. **Phosphorus, sulfur, and silicon and the Related Elements**, v. 156, n. 1, p. 21-33, 2000.

SOUSA JÚNIOR, A. S. *et al.* Análise espaço-temporal da doença de Chagas e seus fatores de risco ambientais e demográficos no município de Barcarena, Pará, Brasil. **Revista Brasileira de epidemiologia**, v. 20, p. 742-755, 2017.

SUNDURU, Naresh *et al.* Synthesis of novel thiourea, thiazolidinedione and thioparabanic acid derivatives of 4-aminoquinoline as potent antimalarials. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 9, p. 2570-2573, 2009. (SUNDURU, 2009)

TÉCIA, U. C. **Organização Estrutural**. Disponível em: <<https://chagas.fiocruz.br/parasita/organizacao-estrutural/>>. Acesso em: 22 nov. 2023.

UMEZAWA, Eufrosina S. *et al.* Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of Trypanosoma cruzi in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas' disease. **Journal of clinical microbiology**, v. 34, n. 9, p. 2143, 1996.

URBINA, J. A. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. **Acta tropica**, v. 115, n. 1–2, p. 55–68, nov. 2009.

VEBER, Daniel F. *et al.* Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of medicinal chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615-2623, 2002.

VENKATESH, P.; PANDEYA, S. N. Synthesis and anti-oxidant activity of some N-(anilinocarbothioyl) benzamide and heterocyclic based thiourea derivatives. **International Journal of ChemTech Research**, v. 1, n. 3, p. 733-741, 2009.

WERLE, M.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Strategies to improve plasma half life time of peptide and protein drugs. **Amino acids**, v. 30, p. 351-367, 2006.

WU, Jian *et al.* Synthesis and bioactivity of pyrazole acyl thiourea derivatives. **Molecules**, v. 17, n. 5, p. 5139-5150, 2012.

XU, Xiaoyong *et al.* Synthesis and insecticidal activity of new substituted N-aryl-N'-benzoylthiourea compounds. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 121, n. 1, p. 51-54, 2003.

YADAVA, B. P. Synthesis and structural studies on the complex of copper (II) with N-(p-Tolyl)-N'-benzoyl thiocarbamide. **Current Science**, v. 58, n. 18, p. 1026-1028, 1989.