

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCIÊNCIAS
APLICADAS A FARMÁCIA

CHRISTIAN SHLEIDER CARNERO CANALES

Desenvolvimento e avaliação de peptídeos análogos da Plectasina: Síntese, Conjugação a Nanopartículas de Sílica Mesoporosas e Avaliação Biológica contra o *Mycobacterium tuberculosis*

ARARAQUARA – SP

Fevereiro/2024

CHRISTIAN SHLEIDER CARNERO CANALES

**Desenvolvimento e avaliação de peptídeos análogos da Plectasina: Síntese,
Conjugação a Nanopartículas de Sílica Mesoporosas e Avaliação Biológica
contra o *Mycobacterium tuberculosis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestrado em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia.

Área de concentração: Bacteriologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan

Coorientador: Dr. Rafael Miguel Sábio

ARARAQUARA – SP

Fevereiro/2024

C212d

Canales, Christian Shleider Carnero.

Desenvolvimento e avaliação de peptídeos análogos da plectasina: síntese, conjugação a nanopartículas de sílica mesoporosas e avaliação biológica contra o *Mycobacterium tuberculosis* / Christian Shleider Carnero Canales. – Araraquara, 2024.
73 f. : il.

Orientador: Fernando Rogério Pavan.

Coorientador: Rafael Miguel Sábio.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de pesquisa: Bacteriologia.

1. Tuberculose. 2. *Mycobacterium tuberculosis*. 3. Peptídeos. 4. *In silico*. 5. Plectasina. I. Pavan, Fernando Rogério, orient. II. Sábio, Rafael Miguel, coorient. III. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030081P7

Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Desenvolvimento e avaliação de peptídeos análogos da Plectasina: Síntese, Conjugação a Nanopartículas de Sílica Mesoporosas e Avaliação Biológica contra o *Mycobacterium tuberculosis*

AUTOR: CHRISTIAN SHLEIDER CARNERO CANALES

ORIENTADOR: FERNANDO ROGERIO PAVAN

COORIENTADOR: RAFAEL MIGUEL SÁBIO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências, área de conhecimento: Saúde Pública pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. FERNANDO ROGERIO PAVAN (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Prof. Dr. NORIVAL ALVES SANTOS FILHO (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química do Campus de Araraquara da Unesp

Profa. Dra. DANIELA FERNANDES RAMOS (Participação Virtual)
Faculdade de Medicina / Universidade Federal do Rio Grande (FURG)

Araraquara, 19 de março de 2024

Dedicatória

Aos meus irmãos Angel, Milagros e Luigi; Meus pais Aleyda e Moises

Agradecimentos

Com profundo respeito e sincera gratidão, estendo meus agradecimentos àqueles cuja presença foi fundamental na realização deste trabalho.

Começo expressando minha mais profunda gratidão aos meus pais, verdadeiras fontes de inspiração e apoio incondicional em cada etapa da minha vida. Da mesma forma, aos meus irmãos, com quem compartilhei mais que a vida, que foram pilares de força e alegria constante.

Aos meus amigos da ciência, colegas de incontáveis jornadas de descoberta e aprendizado, agradeço por enriquecer minha trajetória acadêmica com sua amizade e colaboração. Cada um de vocês deixou uma marca indelével na minha formação.

Minha gratidão se estende aos colegas do Grupo de Pesquisa em Tuberculose, cuja companhia e colaboração mútua foram indispensáveis. Juntos, compartilhamos desafios e sucessos que fortaleceram nosso compromisso com a ciência.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, incluindo tanto o corpo docente quanto discente, assim como à Secretaria de Pós-Graduação, agradeço enormemente por todo o apoio fornecido. Sua excelência acadêmica e administrativa foi essencial para minha formação e sucesso.

Finalmente, meu mais sincero agradecimento ao Professor Doutor Fernando Rogério Pavan, meu orientador, pela sua compreensão, orientação e apoio inabalável. Sua mentoria não só me permitiu superar desafios acadêmicos e pessoais, mas também facilitou meu crescimento em todos os aspectos da minha vida. Estou profundamente grato por ter tido a oportunidade de aprender e me desenvolver sob sua tutela.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

.

.

Resumo

A resistência antimicrobiana representa um dos maiores desafios para a saúde pública mundial, exigindo o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos eficazes contra patógenos resistentes a múltiplos fármacos. Neste contexto, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) emergem como promissores candidatos devido à sua especificidade e mecanismo de ação diferenciado. Este estudo focou na avaliação de análogos da Plectasina, particularmente o peptídeo DC05, para explorar sua atividade antimicrobiana, biocompatibilidade e capacidade de inibir bombas de efluxo em *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) e outras bactérias patogênicas. Os resultados demonstraram que o DC05 possui atividade antimicrobiana notável contra Mtb, com uma concentração inibitória mínima (CIM) de 12 μ M, além de eficácia contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella Typhi*. Este perfil sugere a aplicabilidade do DC05 como um amplo espectro de agente antimicrobiano, com um foco particular em bactérias gram-negativas e micobactérias. Além disso, a análise da biocompatibilidade em diversas linhas celulares confirmou um perfil de segurança favorável, permitindo o uso terapêutico dos peptídeos sintetizados sem causar danos celulares significativos. Um achado crucial foi a capacidade do DC05 de aumentar o acúmulo de brometo de etídio em Mtb, indicando uma inibição efetiva das bombas de efluxo. Este mecanismo propõe o uso potencial de peptídeos como adjuvantes em terapias combinadas com antibióticos tradicionais, potencializando sua eficácia. A variabilidade na estabilidade dos peptídeos em diferentes modelos biológicos *in silico* ressalta a necessidade de otimização das sequências para aumentar sua meia-vida e eficácia terapêutica.

Palavras chave: Tuberculose; *Mycobacterium tuberculosis*; peptídeos; *in silico*; plectasina

Abstract

Antimicrobial resistance represents one of the biggest challenges to global public health, necessitating the development of new therapeutic agents effective against pathogens resistant to multiple drugs. In this context, antimicrobial peptides (AMPs) emerge as promising candidates due to their specificity and differentiated mechanism of action. This study focused on the evaluation of plectasin analogs, particularly the DC05 peptide, to explore its antimicrobial activity, biocompatibility, and ability to inhibit efflux pumps in *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) and other pathogenic bacteria. The results demonstrated that DC05 possesses remarkable antimicrobial activity against Mtb, with a minimum inhibitory concentration (MIC) of 12 μ M, in addition to efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella Typhi*. This profile suggests the applicability of DC05 as a broad-spectrum antimicrobial agent, with a particular focus on gram-negative bacteria and mycobacteria. Furthermore, biocompatibility analysis in various cell lines confirmed a favorable safety profile, allowing for the therapeutic use of the synthesized peptides without causing significant cellular damage. A crucial finding was the ability of DC05 to increase the accumulation of ethidium bromide in Mtb, indicating effective inhibition of efflux pumps. This mechanism proposes the potential use of peptides as adjuvants in combination therapies with traditional antibiotics, enhancing their efficacy. The variability in peptide stability across different biological models *in silico* highlights the need for sequence optimization to increase their half-life and therapeutic efficacy.

Keywords: Tuberculosis; *Mycobacterium tuberculosis*; peptides; *in silico*; plectasin

Sumario

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	9
2.1 Objetivo geral.....	9
2.2 Objetivos específicos.....	9
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1 Análises <i>in silico</i>	10
3.1.1 Seleção de PAMs com potencial contra Mtb e modelagem estrutural.....	11
3.1.2 Estudo <i>in silico</i> do potencial biológico de uma biblioteca de peptídeos análogos de plectasina	12
3.1.3 Predição de Propriedades Farmacocinéticas	12
3.1.4 Previsão do tempo de meia-vida.....	13
3.2 Análises <i>in vitro</i>	13
3.2.1 Síntese de PAMs selecionados, purificação e caracterização.....	13
3.2.2 Ensaio de microtitulação de resazurina.....	14
3.2.3 Ensaios de citotoxicidade <i>in vitro</i>	14
3.2.4 Acúmulo de brometo de etídio	15
3.2.5 Ensaios hemolíticos.....	16
3.2.6 Determinação de bolsões farmacológicos	17
3.2.7 Docking Molecular	17
3.2.8 Visualização e análise de interações	17
3.2.9 Quantificação de citocinas	18
3.2.10 Ensaio de mutação gênica reversa	19
3.2.11 Síntese de nanopartículas de sílica mesoporosas	20
3.2.12 Funcionalização de MSNs com 3-mercaptopropiltrimetoxisilano	20
3.2.13 Caracterização morfológica das MSNs, Potencial Z e tamanho hidrodinâmico das MSNs.....	21
3.2.14 Estudos FT-IR e Ensaios termogravimétricos	21
3.2.15 Quantificação de grupos tiol livres.....	21
3.2.16 Funcionalização de MSN-MTPES com tuftsina	22
3.2.17 Eficiência de Funcionalização	22
3.2.18 Eficiência de Encapsulação e Quantidade de Carga	23

3.2.19 Liberação de DC05 em meio biológico simulado	23
3.3 Análises <i>in vivo</i>	24
3.3.1 Toxicidade em Larvas de <i>Galleria mellonella</i>	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1 A Plectasina é um PAM extenso que pode ser reduzido	24
4.2 Os análogos da Plectasina analisados por métodos <i>in silico</i> são ativos contra Mtb	25
4.3 Previsão de propriedades farmacocinéticas dos PAMs	26
4.4 O tempo de meia-vida dos peptídeos sugere uma notável resistência à degradação	29
4.5 Síntese e caracterização dos PAMs	30
4.6 Apenas um análogo da Plectasina apresenta atividade considerável contra Mtb	31
4.7 Os análogos mostram ser biocompatíveis com diversas linhagens celulares	33
4.8 O acúmulo de brometo de etídio dentro do MTB indica inibição nas bombas de efluxo	34
4.9 PAMs não mostraram atividades hemolíticas.....	35
4.10 Determinação de bolsas farmacológicas	37
4.11 Docking molecular e análise de interação.....	37
4.12 Quantificação de citocinas	45
4.13 DC05 não é mutagênico.....	46
4.14 Síntese, funcionalização e caracterização de nanopartículas de sílica mesoporosas	47
4.15 Quantificação de grupos tiol livres.....	49
4.16 PPC é eficientemente funcionalizado na superfície do MSN-MTPES.....	49
4.17 Eficiência de encapsulamento e quantidade de carga	50
4.18 Liberação de DC05 em diferentes meios biológicos simulados	50
4.19 DC05 não causa toxicidade em <i>Galleria mellonella</i>	52
5 CONCLUSÃO.....	53
6 PERSPECTIVAS	54
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) continua sendo uma das principais ameaças à saúde mundial, classificada como uma das doenças infecciosas mais letais e prevalentes causada por um único patógeno (Sankineni *et al.*, 2023; World Health Organization, 2023). Estima-se que, globalmente, 10,6 milhões de pessoas contraíram TB em 2022, o que representa uma tendência ascendente em comparação com os anos anteriores; especificamente, foram registrados 10,3 milhões de casos em 2021 e 10 milhões em 2020. Esse aumento indica uma mudança significativa, revertendo a tendência de declínio que havia sido mantida por muitos anos até 2020. Além disso, a taxa de incidência de TB registrou um aumento de 3,9% entre 2020 e 2022, após ter registrado uma diminuição aproximada de 2% ao ano entre 2010 e 2020. Esse aumento marca um ponto de inflexão importante no cenário global da TB (World Health Organization, 2023)

A primeira linha de defesa contra o *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) é a mucosa respiratória, que contém uma série de moléculas protetoras como imunoglobulinas A, peptídeos anti-microbianos (PAMs), anticorpos, citocinas e quimiocinas. Quando estas moléculas não conseguem controlar a invasão como primeira instância, o Mtb é disseminado nos alvéolos pulmonares logo em seguida os macrófagos alveolares, células dendríticas e neutrófilos são ativados para tentar erradicar a infecção (Lerner, Borel e Gutierrez, 2015).

Os macrófagos têm a capacidade de internalizar o Mtb, permitindo que viva dentro dos fagossomos; permanecendo inativo e podendo causar infecções recorrentes ou crônicas dependendo das condições imunológicas do hospedeiro (Buccini, Cardoso e Franco, 2021). Os macrófagos produzem principalmente PAMs e citocinas para eliminar este patógeno (Rao Muvva *et al.*, 2021). As citocinas, TNF- α , IFN- γ , são capazes de inibir a proliferação das micobactérias, responsáveis pela TB. Essa resposta ocorre através da indução de apoptose e a geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Pelo contrário, algumas citocinas têm um efeito imunossupressor. Entre elas, encontram-se a IL-10 e o TGF- β . Essas moléculas podem atenuar as funções protetoras dos macrófagos, o que resulta em uma maior proliferação bacteriana dentro dessas células. Além disso, reduz a produção de óxido nítrico, um poderoso agente antimicrobiano produzido pelos macrófagos que atuam dentro do fagossomo onde reside o Mtb. Em particular, o TGF- β tem um papel relevante na regulação da resposta imune no granuloma tuberculoso, esta citocina pode limitar a expansão, sobrevivência e função das células T, componentes essenciais do sistema

imunológico. Por fim, a presença de TGF- β pode resultar em uma resposta imune insuficiente frente à infecção por micobactérias. É por isso que a importância de analisar estas citocinas (Gern *et al.*, 2021; Shi *et al.*, 2016)

O tratamento convencional para a TB é poliquimioterápico, é tratado com uma combinação de 4 medicamentos por pelo menos 6 meses, nos primeiros 2 meses são fornecidos isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol, nos 4 meses seguintes apenas rifampicina e isoniazida são usados para alcançar a eliminação do patógeno e tentar prevenir a resistência aos medicamentos (Caminero Luna, 2016). A exposição ao longo prazo em concentrações não adequadas de agentes antimicobacterianos facilitaria a seleção de mutantes resistentes, e essa resistência nos levaria a usar fármacos de segunda linha, mais caros, tóxicos e menos tolerantes (Harouna Hamidou, Mamadou e Saad, 2021; Kwok *et al.*, 2015).

A urgência crescente em encontrar novos compostos farmacêuticos para combater a TB destaca a necessidade de inovar nas estratégias de descoberta de medicamentos. Embora as técnicas tradicionais tenham sido fundamentais no desenvolvimento de novas terapias, o percurso desde a identificação inicial de candidatos até a sua validação em ensaios clínicos é frequentemente longo, ultrapassando muitas vezes uma década e acarretando um custo médio estimado em 1,8 bilhão de dólares (Shaker *et al.*, 2021). Esse cenário ganha relevância especial diante do "Relatório Mundial sobre Tuberculose 2023", que aponta que, do orçamento estimado necessário de 13 bilhões de dólares para combater a TB em 2022, apenas 5,8 bilhões foram efetivamente financiados. Ademais, dos 2 bilhões destinados à pesquisa, somente metade foi realmente investida (World Health Organization, 2023). Diante dessa realidade, o Desenho de Fármacos Assistido por Computador (CADD, na sigla em inglês) emerge como uma alternativa valiosa, com potencial para reduzir significativamente tanto o tempo de desenvolvimento quanto os custos associados (Yu, Wang e Wang, 2022).

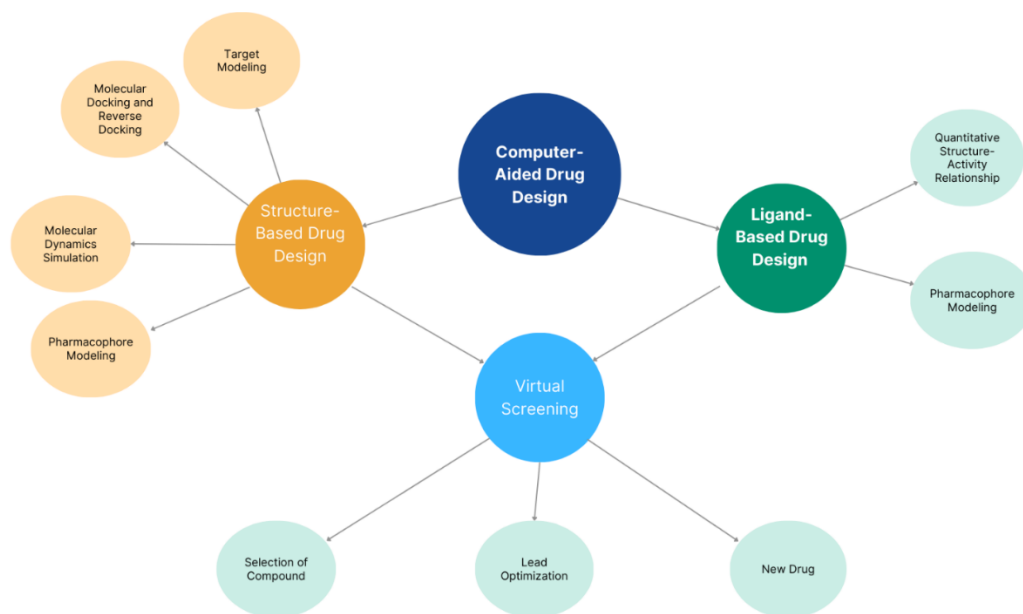
As metodologias de CADD se adaptam de forma eficaz à qualidade e quantidade dos dados experimentais disponíveis, oferecendo vantagens como redução de custos, a possibilidade de explorar virtualmente um amplo espectro de opções químicas, e um aumento na rapidez e eficiência do processo de desenho e desenvolvimento de novos medicamentos (Canales *et al.*, 2024). Predominantemente, há dois enfoques principais no CADD: o Desenho de Fármacos Baseado na Estrutura do Alvo (SBDD) e o Desenho Baseado em Ligantes (LBDD) (**Figura 1**). O SBDD utiliza

o conhecimento da estrutura tridimensional do alvo terapêutico para descobrir ou aprimorar compostos que interajam com alta afinidade e especificidade, sendo a disponibilidade de um modelo tridimensional do alvo essencial. Na ausência da estrutura experimental do alvo, a previsão *in silico*, por meio de modelos de homologia baseados em proteínas estruturalmente similares, torna-se uma prática comum. (Turzo, Hantz e Lindert, 2022)

Por outro lado, o LBDD foca na identificação de compostos ativos que se alinham com descritores químicos específicos de ligantes previamente caracterizados, embora sua precisão possa variar conforme a exatidão das aproximações e a confiabilidade das funções de pontuação utilizadas (Gautam *et al.*, 2023).

No cenário atual de descoberta de fármacos, com uma grande diversidade de ferramentas e dados estruturais disponíveis, tem-se adotado cada vez mais um enfoque híbrido que combina os métodos baseados na estrutura e em ligantes. Essa abordagem integrada geralmente produz resultados superiores, graças a uma exploração mais eficaz e abrangente do espaço químico e biológico disponível. Atualmente, existe uma ampla gama de ferramentas para o desenho de novos PAMs, como antiTBpred, pkCSM, Modeller, Autodock Vina, HADDOCK, que permitem prever a atividade anti-Mtb, farmacocinética, modelagem de moléculas e até simulação de docking molecular para estudar os sítios de acoplamento específicos ligante-receptor, respectivamente. Essas ferramentas simplificam o trabalho laboratorial, permitindo a análise simultânea de centenas de biomoléculas sem a necessidade de síntese prévia (Iman e Davood, 2014)

Figura 1. Ferramentas do Desenho de Fármacos Assistido por Computador



Fonte: (Canales *et al.*, 2024)

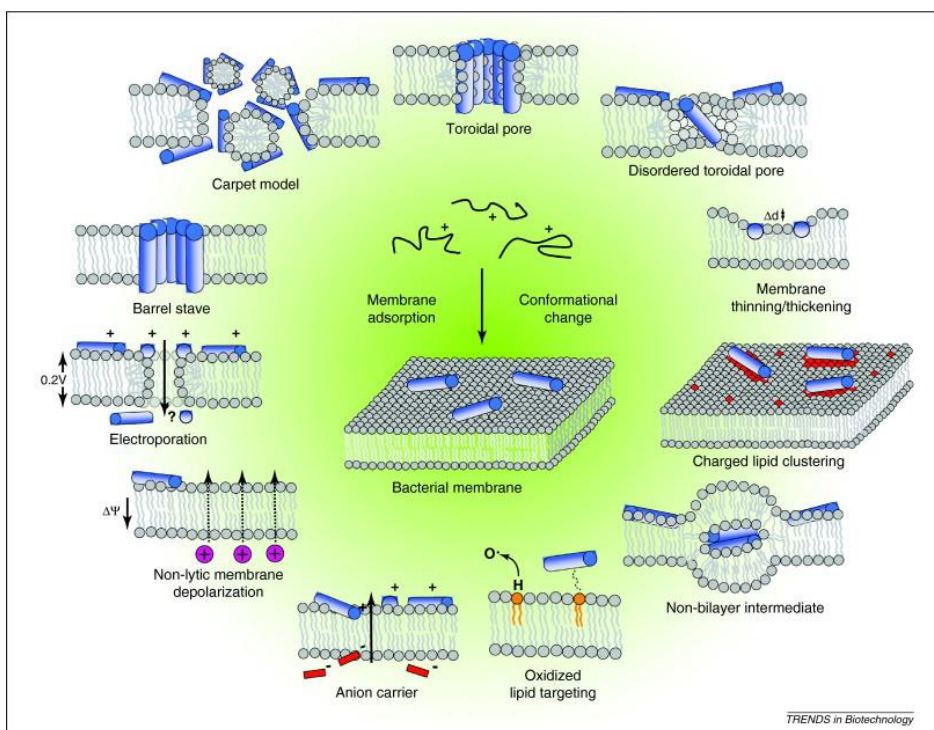
Os PAMs surgem como uma excelente alternativa contra a TB devido ao seu mecanismo de ação único e específico contra as bactérias, o que reduz significativamente a probabilidade de desenvolvimento de resistência. Além disso, sua capacidade de agir rapidamente e seu espectro de atividade potencialmente mais amplo os tornam candidatos ideais para superar as limitações dos tratamentos convencionais, oferecendo possibilidades para tratamentos mais curtos e com menos efeitos colaterais. (Chanci *et al.*, 2022; Huang *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2022)

Os PAMs são pequenas proteínas compostas por menos de 100 aminoácidos, também são conhecidos como peptídeos de defesa do hospedeiro, produzidos naturalmente por organismos vivos como proteção contra patógenos (Han e Wang, 2021; Priyadarshini *et al.*, 2022). Os PAMs fazem parte do sistema imunológico inato da maioria dos organismos vivos e eles tem como alvo penetrar a membrana microbiana interagindo de diversas formas (Silveira, Roque-Borda e Vicente, 2021; Zhang *et al.*, 2021).

Geralmente, os PAMs geram desestabilização da membrana, ligação de DNA e inibição da síntese proteica, a ação não só se limita a bactérias, também combate fungos e vírus (Silva-Carvalho *et al.*, 2021); inclusive podem eliminar bactérias resistentes a medicamentos, como *Staphylococcus*

aureus resistente à metilicina/vancomicina e *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenems. Foram descritas pelo menos 9 hipóteses de mecanismos de ação: 1) eletroporação; 2) modelo de tapete, 3) afinamento ou espessamento da membrana, 4) despolarização da membrana não lífica, 5) poros toroidais, 6) direção do lipídio oxidado 7) *barril-stave* 8) poros toroidal desordenados e 9) intermediário não bicamada (**Figura 2**) (Silveira, Roque-Borda e Vicente, 2021).

Figura 2. Principais mecanismos de ação dos PAMs baseados em perturbação de membranas



Fonte: (Nguyen, Haney e Vogel, 2011)

Dos mecanismos previamente descritos, os mais estudados são: o modelo de *barril-stave*, o modelo toroidal e o modelo de tapete; i) no modelo de *barril-stave* os peptídeos são agrupados em uma bicamada, peptídeos hidrofóbicos alinhados com o centro lipídico, e a extremidade hidrofílica cria uma abertura dentro da membrana ii) no modelo toroidal, os peptídeos se acumulam e fazem com que a camada lipídica se dobre para formar poros, iii) o modelo de tapete, os peptídeos criam uma abertura na membrana externa (AlMatar *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2021); mas a destruição das membranas não são os únicos mecanismos de ação, estudos recentes relatam a interação de PAMs com alvos de membrana e citoplasmáticos onde podem se ligar a RNA ou DNA (Haney, Straus e Hancock, 2019).

Os PAMs podem ativar um ou mais mecanismos de ação dependendo de fatores como temperatura, tempo de exposição, concentração de peptídeos, entre outros (Priyadarshini *et al.*, 2022). Os PAMs dependem de fatores como carga líquida, hidrofóbica, propensão estrutural e anfipaticidade, entre estas algumas são descritas a continuação:

A) O aumento da carga positiva nos peptídeos favorece a interação com lipopolissacarídeos, ácido lipoteicoico e manoproteínas, porém, uma carga de +7 a +10 tem sido demonstrada para reduzir a seletividade, além de aumentar a atividade hemolítica e a toxicidade. B) A hidrofobicidade deve ser mantida abaixo de 70%; ao exceder esse limite, os PAMs podem começar a interagir de forma não seletiva tanto com as membranas bacterianas quanto com as membranas celulares do hospedeiro. Além disso, observou-se que a alanina aumenta a atividade antimicrobiana, diferentemente de outros aminoácidos hidrofóbicos que diminuem a atividade. C) A destruição da estrutura secundária eleva a seletividade e diminui a toxicidade. D) Uma estrutura anfipática ideal potencializa a atividade antimicrobiana, mas também aumenta a citotoxicidade (Tan, Fu e Ma, 2021)

Além de ter um efeito antimicrobiano potencial, os PAMs também apresentam atividade antibiofilme, anticâncer, antitrombótica, cicatrizante, imunomodulatória, antioxidante e anti-inflamatória (Gera, Kankuri e Kogermann, 2021; Um *et al.*, 2021). Os primeiros PAMs encontrados em organismos multicelulares (insetos e secreções de sapos) foram descobertos em 1980, atualmente as pesquisas aumentaram e nas últimas décadas foram registrados mais de 3.100 PAMs (Han *et al.*, 2021).

A plectasina, um peptídeo composto por 40 aminoácidos (GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGGYCAKGGFVCKCY), emerge como uma molécula fascinante. Originária de um fungo saprofítico, isolada inicialmente da *Pseudopectania nigrella* e integrante da família das defensinas, a plectasina possui uma carga líquida positiva de +1.8. Sua eficácia em inibir o crescimento de patógenos notórios como o *Streptococcus pneumoniae*, o *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina e o Mtb *in vitro* foi destacada por Brinch *et al.* (2009), colocando-a como um potencial agente antimicrobiano. Diante dessas descobertas, torna-se crucial aprimorar sua concentração inibitória mínima (CIM) e explorar a possibilidade de reduzir a extensão de sua sequência. Esse esforço de otimização visa não apenas

diminuir os custos de produção, mas também acelerar a descoberta de novos medicamentos, respondendo à constante demanda por terapias mais eficazes.

Além dos PAMs, existem também outros peptídeos notáveis por sua capacidade de penetrar nas membranas celulares. Estes são conhecidos como Peptídeos Penetrantes de Células (PPCs). O mecanismo de ação desses PPCs varia e é influenciado por diversos fatores, incluindo a natureza da carga elétrica do peptídeo, o tipo específico de célula-alvo, a composição da membrana celular e a concentração do peptídeo presente. A penetração dos PPCs através da membrana celular pode ocorrer por meio de diferentes vias: diretamente atravessando a membrana, através de processos de endocitose, ou pela formação de poros transitórios na membrana, permitindo assim sua entrada na célula. (Khan, Filipczak e Torchilin, 2021).

Dentro deste grupo, a tuftsina se destaca como um peptídeo tetrapeptídico (TKPR) com uma habilidade específica para atuar como vetor de entrega de fármacos. Sua ação é mediada através da ligação aos receptores de neuropilina (NRP), que não apenas permite sua entrada específica nas células, mas também confere propriedades imunoestimulantes ao peptídeo. A tuftsina não apenas facilita a ligação específica aos NRPs, mas também exerce um efeito potencializador sobre a fagocitose, ampliando significativamente suas aplicações potenciais (Borbála Horváth *et al.*, 2022). A abordagem combinada de utilizar a tuftsina juntamente com os PAMs oferece uma estratégia integrada para combater o Mtb intracelular. A tuftsina poderia induzir a fagocitose e melhorar a capacidade dos macrófagos de eliminar o patógeno de dentro, enquanto os PAMs poderiam agir destruindo diretamente as bactérias ou interferindo em sua capacidade de se replicar. Esta sinergia entre a indução da fagocitose pela tuftsina e a ação antimicrobiana direta dos PAMs sublinha o potencial de uma estratégia terapêutica combinada.

No entanto, a implementação eficaz desta estratégia requer a superação de desafios significativos, especialmente no que diz respeito à administração desses peptídeos. O desenvolvimento de um sistema de administração de fármacos capaz de entregar esses dois tipos de peptídeos de maneira eficiente e direcionada é crucial.

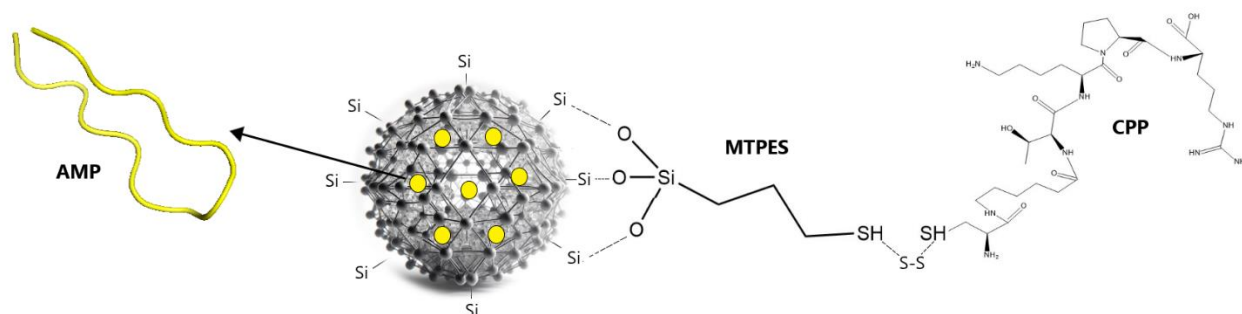
As nanopartículas de sílica mesoporosa (MSNs) possuem uma rica concentração de grupos silanol, que promovem a funcionalização com diversas moléculas, incluindo os PPCs. Elas também se destacam por uma disposição sistemática de poros, com tamanhos variando de 2 a 50 nm, um volume de poros significativo e uma vasta área de superfície específica. A estrutura das partículas

e dos poros pode ser facilmente ajustada de acordo com a escolha dos parâmetros de síntese (Gisbert-Garzarán, Lozano e Vallet-Regí, 2020; Gomes *et al.*, 2022). Esses nanossistemas ajustáveis podem carregar moléculas hidrofóbicas e hidrofílicas dentro dos mesoporos, além de serem facilmente funcionalizados para projetar plataformas nanotecnológicas de entrega de fármacos controlada e responsiva a estímulos (por exemplo, pH, enzimas, ultrassom e luz) para fins terapêuticos (Bakhshian Nik *et al.*, 2020; Mohamed Isa *et al.*, 2021; Stephen *et al.*, 2022). Graças à sua grande área de superfície e alta porosidade, elas podem realçar notavelmente as interações com membranas microbianas. Isso pode levar ao estresse oxidativo em microorganismos e à sua destruição por meio de contato físico e/ou liberação eficiente de agentes antimicrobianos (Miguel Sábio *et al.*, 2023).

Além disso, as MSNs são capazes de melhorar a imunomodulação de albuminas séricas visando as mitocôndrias em experimentos *in vitro* e *in vivo*. Essa atividade está associada à liberação de mediadores pró-inflamatórios, incluindo fator de necrose tumoral α , óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio (Li *et al.*, 2023). Essas moléculas desempenham um papel direto na eliminação do Mtb. As MSNs mostram alta capacidade de carregamento de drogas como os PAMs, boa biocompatibilidade, biodegradabilidade e eliminação (Ahmed *et al.*, 2022; Yong *et al.*, 2019).

Mas, o aspecto mais relevante dessas nanopartículas pode ser a estabilidade proteolítica que conferem ao peptídeo carregado, protegendo-o da degradação enzimática e prolongando sua vida útil no organismo. Essa característica é especialmente benéfica no contexto pulmonar, onde o peptídeo pode ser mais suscetível à degradação. Além disso, a capacidade de retenção das MSNs nos pulmões potencializa seu impacto terapêutico, permitindo uma liberação localizada e prolongada do agente terapêutico diretamente no sítio de infecção ou inflamação. Isso é particularmente importante para o tratamento de doenças respiratórias como a TB, onde a entrega direcionada e eficaz de fármacos aos pulmões pode significar um avanço significativo no tratamento. (Braun *et al.*, 2016; García-Fernández, Sancenón e Martínez-Máñez, 2021). Este estudo apresenta uma estratégia para o tratamento da infecção por Mtb, propondo a encapsulação de um peptídeo análogo da plectasina em nanopartículas de sílica mesoporosa, seguido de sua funcionalização com tuftsina (**Figura 3**).

Figura 3. Esquema de Encapsulação de peptídeos análogos da plectasina em carregados em MSNs com Funcionalização de tuftsina.



Fonte: autor

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudo *in silico* de peptídeos análogos da plectasina, síntese dos mais promissores conjugados a nanopartículas de sílica mesoporosas e estudo biológico frente ao *Mycobacterium tuberculosis*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar *in silico* o potencial biológico de uma biblioteca de peptídeos análogos de Plectasina contra Mtb;
- Sintetizar e caracterizar os PAMs promissores do estudo *in silico*;
- Determinar a atividade anti-Mtb dos PAMs por meio do ensaio de microtitulação com resazurina (REMA).
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos PAMs;
- Determinar o potencial de inibição de bombas de efluxo de Mtb;
- Realizar ensaios hemolíticos dos PAMs;
- Realizar *docking molecular* entre os peptídeos selecionados e receptores de interesse;
- Quantificar a produção de citocinas em macrófagos em resposta à administração de PAMs;
- Investigar a capacidade mutagênica dos PAMs por meio do ensaio de mutação gênica reversa (AMES);
- Sintetizar, caracterizar, funcionalizar e carregar nanopartículas de MSN como veículos de entrega para os PAMs;

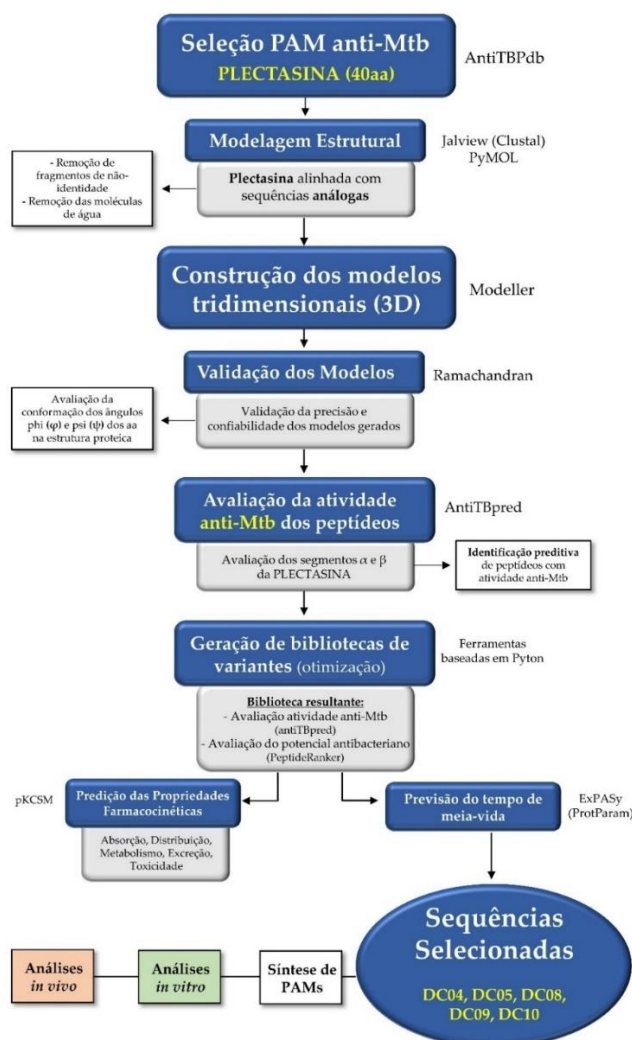
- Caracterizar morfologicamente as MSN, mediante FT-IR, ensaios termogravimétricos, potencial Z, tamanho hidrodinâmico.
- Determinar a eficiência de funcionalização da tuftsina;
- Determinar a eficiência de encapsulamento e quantidade de carga;
- Avaliar a toxicidade das MSN modificadas e do PAM DC05 em larvas de *Galleria mellonella*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Análises *in silico*

As análises *in silico* foram realizadas seguindo uma série de etapas resumidas na **Figura 4**.

Figura 4. Fluxograma dos ensaios *in silico* realizados para a seleção dos análogos mais promissores da plectasina



Fonte: autor

3.1.1 Seleção de PAMs com potencial contra Mtb e modelagem estrutural

Realizou-se uma busca na base de dados especializada AntiTBPdb, que hospeda uma ampla coleção de peptídeos com atividade contra anti-Mtb, acessível através do portal AntiTBPdb (<https://webs.iiitd.edu.in/raghava/antitbpdn/category.php>). Esta pesquisa focou na identificação de peptídeos com propriedades anti-Mtb notáveis, prestando atenção especial ao seu potencial citotóxico e terapêutico. Para a seleção inicial, escolheu-se a Plectasina como sequência padrão, devido à conhecida atividade de seus análogos contra Mtb (Manavalan *et al.*, 2019).

Para a modelagem estrutural, seguiu-se a metodologia de Iman e Davood (2014) onde a sequência de referência (plectasina) foi alinhada com sequências análogas usando a ferramenta Clustal, integrada no software Jalview. Esse passo permitiu identificar e comparar regiões conservadas e variáveis entre a sequência de interesse e seus análogos, facilitando a seleção de regiões relevantes para a pesquisa. Posteriormente, procedeu-se à eliminação dos fragmentos que não apresentavam identidade com nossa molécula de interesse, focando em conservar apenas as regiões com potencial significativo para o estudo. Para a preparação das moléculas para modelagem, utilizou-se o PyMOL para remover as moléculas de água associadas às estruturas cristalográficas, otimizando assim as estruturas para análises subsequentes. Este passo é crucial para evitar interferências na modelagem das estruturas tridimensionais e assegurar resultados mais precisos.

Com as estruturas adequadamente preparadas, desenvolveu-se e executou-se um *script* personalizado no Modeller. Este script foi projetado para gerar modelos tridimensionais das sequências de interesse, baseando-se nos alinhamentos previamente realizados. O Modeller é capaz de construir modelos de alta qualidade através da otimização de funções de energia que simulam as interações físicas dentro da molécula, resultando em estruturas tridimensionais coerentes com as propriedades físico-químicas das proteínas (Webb e Sali, 2021).

Para validar a precisão e confiabilidade dos modelos estruturais gerados, utilizou-se o plot de Ramachandran (<https://saves.mbi.ucla.edu/>). Esta análise permite avaliar a conformação dos ângulos phi (ϕ) e psi (ψ) dos aminoácidos na estrutura proteica, identificando possíveis desvios das conformações permitidas que indicariam áreas da estrutura modelada que não se ajustam às conformações naturais observadas em proteínas. O uso deste plot é fundamental para garantir que as estruturas modeladas possuam uma conformação espacial viável e funcional.

3.1.2 Estudo *in silico* do potencial biológico de uma biblioteca de peptídeos análogos de plectasina

Considerando que a plectasina é constituída por 40 aminoácidos e com o objetivo de determinar a região da biomolécula mais ativa contra Mtb, a Plectasina foi dividida em dois segmentos: o primeiro composto por sua estrutura de alfa hélice e o segundo por sua conformação de folha beta. Ambos os fragmentos foram analisados individualmente através do AntiTBPred para identificar qual deles exibia maior atividade anti-Mtb.

Após identificar o fragmento com as propriedades mais promissoras, procedeu-se a uma etapa de otimização usando ferramentas computacionais baseadas em Python. Esta fase envolveu a geração de uma biblioteca de variantes do fragmento selecionado, onde foram realizadas permutações de aminoácidos em posições específicas, substituindo cisteínas e glicinas por outros aminoácidos. Este passo foi crucial para evitar reações espontâneas do grupo tiol da cisteína, que podem comprometer a estabilidade e reatividade da molécula em condições fisiológicas.

A biblioteca resultante foi submetida novamente a análise preditiva para avaliar a atividade anti-Mtb de cada variante, utilizando tanto o AntiTBPred quanto testes complementares de bioatividade e potencial antibacteriano por meio dos softwares PeptideRanker (<http://distilldeep.ucd.ie/PeptideRanker/>) e CAMP (<http://www.camp.bicnirrh.res.in/ncbiBlast/>) respectivamente, que fornece uma estimativa da bioatividade e atividade bacteriana de peptídeos baseada em estruturas e sequências conhecidas (Purcell, Packer e Hayes, 2023).

3.1.3 Predição de Propriedades Farmacocinéticas

As sequências de aminoácidos correspondentes aos peptídeos de interesse, codificadas pela notação de uma única letra, foram transformadas para o formato de Sistema de Entrada de Moléculas Simplificado (SMILES) usando a ferramenta online PepSMI, fornecida pela NovoPro Bioscience Inc. (disponível em <https://www.novoprolabs.com/tools/convert-peptide-to-smiles-string>) (Rajpoot *et al.*, 2022).

Usando as sequências convertidas para o formato SMILES, procedeu-se com a predição *in silico* das propriedades farmacocinéticas dos peptídeos através do servidor web pKCSM (acessível em <https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsml/prediction>). Esta análise permitiu a avaliação abrangente de diversas propriedades farmacocinéticas, organizadas nas seguintes categorias:

Absorção: Avalia a solubilidade em água, absorção intestinal, permeabilidade em pele e permeabilidade Caco-2.

Distribuição: Determina a permeabilidade ao sistema nervoso central (SNC), permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE), volume de distribuição em estado estacionário (Vdss) e a fração não ligada no plasma.

Metabolismo: Identifica se os peptídeos agem como substratos para CYP2D6, CYP3A4, ou inibidores de CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4.

Excreção: Analisa o clearance total e a identificação como substrato de OCT2 renal.

Toxicidade: Avalia a toxicidade AMES, a dose máxima tolerada em humanos, inibição de canais hERG I e II e toxicidade aguda oral em ratos (Pires, Blundell e Ascher, 2015).

3.1.4 Previsão do tempo de meia-vida

O tempo de meia-vida de cinco sequências peptídicas selecionadas na etapa anterior foi determinado usando a ferramenta ProtParam do ExPASy (Análise de Parâmetros Proteicos do ExPASy). ProtParam é uma ferramenta acessível através de <https://web.expasy.org/protparam/>, projetada para fornecer uma avaliação detalhada de vários parâmetros biofísicos das proteínas a partir de suas sequências de aminoácidos, incluindo o tempo de meia-vida (Gasteiger *et al.*, 2005).

Esta análise foi realizada empregando três modelos organismos representativos para avaliar a estabilidade dos peptídeos: reticulócitos de mamífero, *Escherichia coli* e leveduras. Cada um desses modelos oferece um contexto distinto para a degradação proteica, permitindo assim uma aproximação mais completa à estabilidade dos peptídeos em diversos ambientes biológicos.

3.2 Análises *in vitro*

3.2.1 Síntese de PAMs selecionados, purificação e caracterização

A síntese dos peptídeos foi realizada por meio da técnica de síntese química em fase sólida F-moc, seguindo o método descrito por Roque-Borda *et al.*, (2022). Inicialmente, a resina rink amida foi pré-condicionada em dimetilformamida/ diclorometano (DMF/DCM) por 15 minutos. A desproteção do grupo Fmoc foi realizada utilizando 4-metilpiperidina a 20% em DMF. O acoplamento de cada aminoácido foi realizado de forma individual, empregando

hidroxibenzotriazol (HobT) e diisopropilcarbodiimida (DIC) como agentes de acoplamento e agitando a mistura por 2 horas à temperatura ambiente, utilizando DMF e DCM para as lavagens. Após cada acoplamento, realizou-se o teste de Kaiser para verificar a integridade do mesmo, onde os acoplamentos bem-sucedidos eram identificados pela transparência da resina e os falhos, por uma cor azul. Ao finalizar a síntese, os PAMs foram liberados da resina por hidrólise utilizando um coquetel de ácido trifluoroacético (TFA), Triisopropilsilano (TIS), 1,2-Etanditiol (EDT) e água, seguido de uma liofilização.

Para a purificação e caracterização, empregou-se a cromatografia líquida de alta resolução (HPLC). As amostras foram injetadas em um sistema HPLC Shimadzu Prominence, utilizando uma coluna de fase reversa C18 da Shimadzu. Foram usados como eluentes uma solução aquosa com 0.045% de TFA e acetonitrilo com 0.036% de TFA, mantendo um fluxo de 1 mL/min durante 30 minutos. As frações de peptídeos puros foram coletadas, liofilizadas e armazenadas a -20 °C. A confirmação da molécula foi realizada por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS) usando um sistema Shimadzu/Bruker (Prominence/Amazon SL), com parâmetros similares ao sistema HPLC e um gradiente de eluente B de 5 a 95% durante 30 minutos. As amostras foram analisadas em modo de duplo comprimento de onda a 220/280 nm (Serrano *et al.*, 2013).

3.2.2 Ensaio de microtitulação de resazurina

O ensaio de REMA foi realizado de acordo com a Palomino *et al.*, (2002) Preparou-se uma suspensão de Mtb H₃₇Rv (ATCC 27294) a uma densidade de 10⁵ UFC/mL. Desta preparação, dispensaram-se 100 µL em cada poço de uma placa de 96 poços, com exceção daqueles reservados para controles de compostos e meio. Em seguida, adicionaram-se os compostos designados em um volume de 100 µL, submetendo-se posteriormente a diluições seriadas. As placas foram incubadas por 7 dias a 37 °C em uma atmosfera de 5% CO₂. Ao concluir este período, adicionaram-se 30 µL de resazurina a 0.01%, previamente solubilizada em água destilada estéril, a cada poço. Vinte e quatro horas após este passo, avaliou-se a intensidade da fluorescência nos poços com o dispositivo Cytation 3 da Biotek®. O ensaio foi realizado em triplicata, refletindo o resultado a média dos três ensaios independentes.

3.2.3 Ensaios de citotoxicidade *in vitro*

Os ensaios de atividade citotóxica *in vitro* foram realizados conforme a metodologia estabelecida por Pavan *et al.*, (2010). Utilizaram-se três linhagens celulares: MRC-5, cultivadas em meio DMEM (Vitrocell®); macrófagos J774.A1, em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino; ambos meios complementados com 50 mg/L de sulfato de gentamicina e 2 mg/L de anfotericina B para prevenir contaminações bacterianas e fúngicas. As células foram incubadas em frascos de cultura a 37 °C em uma atmosfera controlada com 5% CO₂ até alcançar confluência completa, garantindo assim condições ótimas para seu crescimento e propagação.

Posteriormente, ajustou-se a densidade celular a $2,5 \times 10^5$ células/mL e distribuíram-se em placas de 96 poços, destinando 100 µL por poço para assegurar uniformidade na semeadura. Após 24 horas de incubação sob as condições previamente mencionadas, verificou-se a adequada adesão celular antes de proceder com o tratamento. Administraram-se várias concentrações dos compostos em estudo, de 3,9 até 1000 µg/mL, e incubaram-se por períodos de 24 horas em um ambiente com 5% CO₂, em meios livres de agentes antimicrobianos e antifúngicos.

Finalizada a incubação, adicionaram-se 30 µL de solução de resazurina a 0,01% a cada poço. Três horas depois, quantificou-se a fluorescência gerada por meio do equipamento Synergy H1 da Biotek®. Este procedimento foi realizado em triplicata, e os resultados obtidos foram expressos como a média das três réplicas independentes.

3.2.4 Acúmulo de brometo de etídio

O teste de acúmulo de brometo de etídio foi realizado de acordo com a metodologia de Hegeto *et al.*, (2018). Iniciamos o estudo cultivando H37Rv em meio 7H9 enriquecido com OADC por um período de 15 a 21 dias. Este processo começou com a diluição de aproximadamente 1 mL do cultivo bacteriano prévio em 5 mL de meio, ajustando a densidade óptica do cultivo a uma faixa de 0,6 a 0,8 a 600 nm (DO₆₀₀). Com o objetivo de obter uma quantidade adequada de inóculo, aproximadamente 6 mL, o cultivo foi centrifugado a 2880 g por 10 minutos. Posteriormente, descartou-se o sobrenadante e o pellet foi lavado em 6 mL de PBS com Tween 80 a 0,05%, seguido de uma homogeneização em vortex e uma nova centrifugação sob as mesmas condições. Finalmente, o pellet foi ressuspenso em 1 mL de PBS com Tween 80 a 0,05%, ajustando a densidade a uma DO₆₀₀ de 0,44 para seu posterior uso nos ensaios. Para a próxima etapa, foram necessárias as CIMs de nossos peptídeos, incluindo o Brometo de Etídio e o Verapamil como controle, para ajustar a concentração final a ½ CIM em relação à densidade bacteriana. Em um

volume final de 200 μL , adicionamos 100 μL da suspensão bacteriana ajustada juntamente com 50 μL de cada droga, preparada em uma concentração que, ao ser adicionada ao poço, resultasse na proporção desejada de $\frac{1}{2}$ CIM em relação à $\text{DO}_{600}=0,44$. Os controles e amostras foram preparados utilizando uma microplaca escura para proteger o brometo de etídio da luz. Estabeleceu-se para avaliar a atividade da bomba de efluxo, incluindo combinações específicas de PBS, EtBr, Verapamil e os PAMs em estudo. Após a preparação, a microplaca foi coberta e protegida da luz, mantendo-se à temperatura ambiente até a leitura no leitor de placas. As condições de leitura foram ajustadas especificamente para este ensaio, realizando medições a cada 3 minutos durante uma hora. Calculou-se a média de fluorescência para cada ponto temporal, ajustamos pela fluorescência basal e determinamos a fração de fluorescência relativa (FFR) para cada amostra em comparação com os controles.

3.2.5 Ensaios hemolíticos

A metodologia implementada foi baseada no protocolo descrito por Castro *et al.*, (2009). Iniciou-se coletando sangue humano, o qual foi submetido a uma lavagem tripla com solução de Tris-HCl 0,01 M, ajustada a um pH de 7,4 e suplementada com NaCl 0,15 M, denominada a partir de agora como solução Tri-salina. Em seguida, preparou-se uma suspensão de eritrócitos a 1% (v/v), utilizando células vermelhas concentradas e re-suspensas na solução Tri-salina mencionada. Os PAMs foram inicialmente dissolvidos na mesma solução Tri-salina a uma concentração de 1024 μM . Esta solução foi posteriormente diluída em uma série de concentrações decrescentes para determinar sua concentração hemolítica 50 (HC_{50}), definida como a concentração necessária para induzir 50% de hemólise na amostra. Para o ensaio, alíquotas de 100 μL da suspensão eritrocítica foram incubadas com 100 μL de PAMs em diferentes concentrações. Triton X-100 a 1% (v/v) foi usado como controle positivo para assegurar uma lise completa (100%). As amostras foram incubadas a 37 °C por uma hora e, posteriormente, centrifugadas a 3000 g por 2 minutos. Uma alíquota de 100 μL do sobrenadante foi cuidadosamente transferida para placas de microtitulação de 96 poços, e a absorbância foi medida a 540 nm utilizando um leitor de microplacas BioRad modelo 3550. O ensaio foi realizado em triplicata para assegurar a reprodutibilidade dos resultados. A determinação do valor de HC_{50} foi realizada por análise de regressão logarítmica, permitindo uma quantificação precisa da potência hemolítica dos PAMs em estudo.

3.2.6 Determinação de bolsões farmacológicos

O PockDrug, foi usado para prever os bolsões farmacológicos da proteína receptora, estabelecendo um limiar de probabilidade acima de 80% e uma proximidade de 5,5 Å, seguindo a metodologia proposta por Primo *et al.* (2023). As estruturas cristalinas das moléculas receptoras, especificamente Ag85B (1F0P), EmbC (3PTY), GyrB (6GAU) e LDT2 (3TUR), foram obtidas do Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>). Esta abordagem permite uma identificação precisa e detalhada dos sítios de interação potencial nas proteínas alvo, facilitando o desenvolvimento de estratégias de design de medicamentos baseadas na estrutura molecular.

3.2.7 Docking Molecular

A simulação de docking molecular entre ligantes peptídicos foi realizada por meio da ferramenta de Docking Biomolecular Dirigido por Alta Ambiguidade (High Ambiguity Driven Biomolecular Docking, HADDOCK), acessível na plataforma online (<https://wenmr.science.uu.nl/haddock2.4/>). Este método foi implementado com o objetivo de prever as interações ligante-receptor e selecionar o peptídeo de maior afinidade para posterior síntese em laboratório. O processo de docking focou em aminoácidos específicos dentro do bolsão farmacológico dos receptores, identificados previamente pelo uso do PockDrug. Durante a análise, diversas interações foram avaliadas, incluindo energias de Van der Waals, eletrostáticas, de solvatação e o escore Z, para determinar com precisão a afinidade e especificidade do acoplamento entre o peptídeo DC05 e os receptores (Honorato *et al.*, 2021; Zundert, van *et al.*, 2016).

3.2.8 Visualização e análise de interações

A análise das interações entre o ligante e aminoácidos específicos dos receptores foi realizado com software Discovery Studio Visualizer. Adicionalmente, com o objetivo de oferecer uma representação visual detalhada e clara do processo de acoplamento, recorreremos ao Pymol para visualizações em 3D, o que enriquece nossa compreensão da dinâmica de ligação, conforme descrito por (Pawar e Rohane, 2021). Esta abordagem integrada melhora significativamente nossa capacidade de analisar e visualizar interações moleculares, facilitando a interpretação dos complexos mecanismos de ligação no contexto da pesquisa biomolecular.

3.2.9 Quantificação de citocinas

Inicialmente, procedeu-se à infecção de macrófagos usando a metodologia de Halicki *et al.*, (2022). Foram utilizados macrófagos a partir da terceira passagem, que depois foram submetidos a centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi removido, e o pellet celular foi ressuspenso em meio RPMI complementado com um regime de antibióticos, agentes antifúngicos e soro fetal bovino. Por meio do uso da câmara de Neubauer, procedeu-se à contagem celular, ajustando a densidade a 1×10^6 células/mL para sua semeadura em placas de cultivo de 24 poços, as quais foram incubadas a 37°C sob uma atmosfera enriquecida com CO₂ por 24 horas. Para os processos de fagocitose, preparou-se uma suspensão bacteriana ajustada a uma densidade de 2×10^6 UFC/mL, partindo de uma concentração base de 1 MacFarland. Adicionou-se 1 mL desta suspensão a cada poço, após a remoção do meio de cultivo anterior. As placas foram incubadas sob as mesmas condições por um período de 2 horas. Posteriormente, a suspensão bacteriana foi removida e os poços foram lavados com PBS 1x. Preparou-se uma solução de amicacina a 200 µg/mL em meio RPMI, diluindo uma solução mãe de 1000 µg/mL e ajustando a concentração final de acordo com o peso molecular do sulfato de amicacina. Essa solução foi adicionada aos poços para uma incubação adicional de 2 horas. Após o processo de esterilização, realizaram-se lavagens com PBS antes da adição de diferentes concentrações do composto de interesse, avaliando em duplicata técnica múltiplos da CIM₉₀ (1X, 5X, 10X). Foram preparados volumes de 2,5 mL de cada diluição do composto, considerando um volume excedente para minimizar perdas. As diluições foram realizadas em meio RPMI e adicionadas imediatamente às placas de cultivo. A incubação da placa experimental foi realizada a 37°C e 5% de CO₂ por 72 horas. Em seguida, os sobrenadantes de cada poço foram filtrados para eliminar as micobactérias e permitir a quantificação de óxido nítrico e TGF-β por meio do teste de Elisa. Brevemente, a quantificação da produção de TGF-β no sobrenadante da cultura de macrófagos foi determinada utilizando uma técnica imunoenzimática seguindo as instruções do fabricante. O kit utilizado em nosso estudo foi o Anti-mouse TGF-beta DuoSet ELISA (nº do catálogo: DY1679). As concentrações mínimas detectáveis para TGF-β são de 31,2 pg/ml (R&D Systems)(Niño-Castaño *et al.*, 2022). A produção de óxido nítrico foi avaliada medindo seu produto final estável, o nitrito, pela reação de Griess usando uma mistura de igual volume de sulfanilamida e dicloridrato de N-1-naftiletilenodiamina (NEED). As concentrações de nitrito foram estimadas usando uma curva padrão de nitrito de concentrações conhecidas (Griess, 1879).

3.2.10 Ensaio de mutação gênica reversa

O ensaio de mutação gênica reversa, conhecido como Teste de Ames, foi realizado utilizando as cepas TA100, TA98, TA102 e TA97a de *Salmonella Typhimurium* para avaliar a atividade mutagênica, tanto na presença (+S9) quanto na ausência de ativação metabólica (-S9), seguindo a metodologia de pré-incubação proposta por Maron e Ames (1983). A preparação do inóculo envolveu a semeadura de uma pequena quantidade de cultura congelada em 30 mL de caldo nutriente (Oxoid nº 2), incubando-se a 37°C por 12-16 horas com agitação (160 rpm), para alcançar uma densidade de $1-2 \times 10^9$ bactérias/mL. Posteriormente, diluições do composto DC05 (12,5 a 100 µg/placa) foram misturadas com 0,5 mL de tampão fosfato 0,2M (pH 7,4) ou com fração S9 e 0,1 mL de cultura bacteriana, incubando-se por 30 minutos a 37°C. A seleção de concentrações baseou-se na toxicidade observada em ensaios preliminares, evidenciada pela redução no número de revertentes His⁺ ou no crescimento de fundo nas placas de ágar mínimo com a cepa TA98. A fração microssomal S9, preparada a partir de fígados de ratas Sprague Dawley tratadas com Aroclor 1254 e adquirida em forma liofilizada da Moltox Molecular Toxicology Inc., foi empregada para determinar a necessidade de metabolização da amostra para sua atividade mutagênica. O sistema de ativação metabólica consistiu em 4% da fração S9, complementado com 1% de cloreto de magnésio 0,4 M, 1% de cloreto de potássio 1,65 M, 0,5% de glicose-6-fosfato 1 M, 4% de b-nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato 0,1 M, 50% de tampão fosfato 0,2 M pH 7,4 e 39,5% de água destilada estéril. Após a incubação, adicionou-se a cada amostra 2 mL de top agar suplementado com L-histidina e D-biotina, vertendo-se sobre placas de ágar mínimo glicosado e incubando-se a 37°C por 48 horas. A contagem de colônias revertentes foi realizada ao final deste período. Para confirmar a capacidade de reversão e especificidade mutagênica de cada cepa, agentes mutagênicos padrão foram empregados tanto na ausência quanto na presença da mistura S9, incluindo 4-nitro-o-fenilenodiamina (10 µg/placa) para TA98 e TA97a, azida sódica (1,25 µg/placa) para TA100, mitomicina C (0,5 µg/placa) para TA102 na ausência de S9, e 2-antramina (1,25 µg/placa) para TA98, TA97a, TA100 e 2-aminofluoreno (10 µg/placa) para TA102 com S9. O DMSO foi utilizado como controle negativo. Os resultados foram processados pelo software estatístico Salanal, adotando o modelo de Bernstein *et al.* (1982), os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e regressão linear para avaliar os dados de revertentes por placa. Calculou-se o índice de mutagenicidade (IM) para cada concentração, considerando-se mutagênica a amostra quando o IM era maior ou igual a dois em pelo menos uma das doses testadas, seguindo

o critério de relação dose-resposta entre as concentrações testadas e o número de revertentes induzidos (Mortelmans e Zeiger, 2000).

3.2.11 Síntese de nanopartículas de sílica mesoporosas

A síntese foi realizada dissolvendo-se 0,606 g de CTAB em 180 mL de água desionizada, agitando-se magneticamente a 60 °C em um balão volumétrico de 250 mL por 30 minutos sob uma atmosfera de N₂, até obter uma solução homogênea. A esta solução, adicionou-se sequencialmente 55,8 mL de octano e 105 µL de estireno, previamente purificado com NaOH 2,5 M para eliminar o estabilizador e facilitar a polimerização, lavando-se o estireno com NaOH três vezes. Em seguida, incorporaram-se 0,1381 g de L-Lisina e 6,42 mL de TEOS de forma gradual, seguidos pela adição de 0,2017 g de AIBA ao sistema reacional. A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética constante por 3 horas em ambiente inerte a 60 °C. Após a síntese, a suspensão resultante foi transferida para um funil de separação e deixada em repouso até a separação de fases. A fase de cor azul claro, contendo as MSN, foi isolada e submetida a centrifugação a 15.000 rpm por 15 minutos. As MSN foram lavadas cinco vezes com etanol e água para remover impurezas e resíduos de reagentes não reagidos. A remoção de surfactantes e agentes formadores de poros foi realizada dispersando as MSN em 60 mL de metanol, 1,5 mL de ácido clorídrico concentrado (37%) e 15 mL de clorofórmio, sob agitação magnética e refluxo a 58 °C por 6 horas. Finalmente, a suspensão foi centrifugada a 15.000 rpm por 10 minutos, seguida de lavagens alternadas com etanol e água (duas vezes cada um), e secas em forno a 60 °C por 12 horas (Nandiyanto *et al.*, 2009).

3.2.12 Funcionalização de MSNs com 3-mercaptopropiltrimetoxissilano

A funcionalização de MSN com 3-mercaptopropiltrimetoxissilano (MPTMS) foi investigada utilizando dois enfoques distintos. Seguindo a metodologia modificada de Mauline *et al.* (2013), procedeu-se à adição de 1 mL de MPTMS a 100 mL de acetonitrila anidra, à qual foram incorporados 500 mg de MSN. A reação foi realizada sob refluxo e uma atmosfera protetora de N₂ a 80 °C por 24 horas. Posteriormente, os nanossistemas obtidos foram centrifugados e submetidos a múltiplas lavagens, pelo menos três vezes com etanol e duas vezes com água destilada, para finalmente serem secos em estufa a 65 °C por 12 horas.

3.2.13 Caracterização morfológica das MSNs, Potencial Z e tamanho hidrodinâmico das MSNs

A caracterização morfológica das MSNs foi realizada usando Microscopia Eletrônica de Transmissão de Alta Resolução (HR-TEM), utilizando um microscópio TEM-FEG da JEOL. Para a preparação das amostras, os pós foram primeiramente dispersos em etanol, utilizando um banho de ultrassom por 15 minutos para assegurar uma dispersão homogênea. Em seguida, 3 µL desta suspensão foram cuidadosamente depositados sobre uma rede de suporte de cobre, permitindo que a amostra secasse ao ar em temperatura ambiente. Este processo garante a adesão ótima das partículas à rede e melhora a qualidade das imagens obtidas, facilitando uma avaliação detalhada da estrutura e morfologia das MSNs (Quan *et al.*, 2015). Para avaliar o tamanho hidrodinâmico e o potencial zeta das MSNs, incluindo variantes modificadas como MSN-CPP, MSP-CPP@DC e MSP@DC, utilizou-se um Zetasizer Malvern Nano ZS. De forma concisa, dispersaram-se 0,5 mg de cada tipo de nanopartícula em 1 ml de tampão HEPES (10 mM, pH 7,4). Posteriormente, transferiram-se 700 µL de cada dispersão para as cubetas de medição do equipamento.

3.2.14 Estudos FT-IR e Ensaios termogravimétricos

Os espectros do espectrômetro infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) dos MSNs obtidos e dos MSNs carregados com PTX foram coletados em um espectrômetro FT-IR (Bruker vertex 70, alemão). Os espectros IR, em modo de absorbância, foram obtidos na região espectral de 400–4000 cm⁻¹ (Jia *et al.*, 2012). Para avaliar as propriedades térmicas das amostras de MSNs em cada etapa de sua preparação, realizaram-se análises termogravimétricas (TGA) e de calorimetria diferencial de varredura (DSC). As amostras foram colocadas em crisóis de alumina e submetidas a um fluxo constante de nitrogênio atmosférico a 100 ml/min. Os experimentos foram realizados aumentando a temperatura de 0 °C até 600 °C a uma taxa de aquecimento uniforme de 5 °C/min. Para a análise e processamento dos dados, utilizou-se um equipamento integrado DSC-TGA (modelo SDT Q600 V20.9 Build 20, da TA Instruments), operado pelo software Universal Analysis 2000.

3.2.15 Quantificação de grupos tiol livres

Para quantificar os grupos tiol (-SH) livres no conjugado, implementou-se um protocolo metuculoso utilizando o reagente de Ellman (5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico)). Adicionaram-se 250

μL deste reagente (0,3 mg/mL dissolvido em tampão fosfato 0,5 M, pH 8,0) a 250 μL de MSN-MTPES (1 mg/mL), e procedeu-se a medições de absorbância a 450 nm após um período de incubação de 2 horas, mantendo as amostras protegidas da luz durante todo o processo. as análises foram realizadas em triplicata para assegurar a reprodutibilidade dos resultados. Para a calibração e determinação precisa da concentração de grupos tiol, elaborou-se uma curva de calibração utilizando MTPES em concentrações que variaram de 0,125 mM a 1,25 mM. (Roque-Borda *et al.*, 2023a).

3.2.16 Funcionalização de MSN-MTPES com tuftsina

A funcionalização de tuftsina com MSN-MPTES foi realizada através do acoplamento de tióis para gerar ligações dissulfeto entre esses dois componentes. Esta estratégia baseou-se no uso de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como agente oxidante e iodeto de sódio (NaI) como catalisador, adaptando a metodologia de Wang *et al.*, (2016). Inicialmente, preparou-se um tampão HEPES (20mM em H_2O , pH 7,0, contendo 3M de NaCl) e uma solução de NaI (0,03 mg mL^{-1}). Foram tomados 10 mg de MSN-MTPES e adicionados 1 mL do tampão HEPES, seguido de sonicação por 5 minutos. A esta solução, incorporaram-se 1000 μL de tuftsina (1mg/ml), 50 μL de NaI e, finalmente, 110 μL de H_2O_2 a 0,3%, em tubos Eppendorf de 5 mL. A reação foi mantida sob agitação orbital por 2 horas. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos e lavadas pelo menos seis vezes com tampão HEPES.

3.2.17 Eficiência de Funcionalização

Para determinar a eficiência de funcionalização da tuftsina, quantificou-se a tuftsina livre no sobrenadante obtido na etapa anterior. Em uma placa de microtitulação de 96 poços, adicionaram-se 90 μL do sobrenadante juntamente com 10 μL de fluorescamina (concentração de 5 mg/ml em acetona), preparando as amostras em triplicado para garantir a reprodutibilidade dos resultados. As amostras foram incubadas por 5 minutos a 37 °C, otimizando a interação entre a fluorescamina e os grupos NH_2 livres na superfície da tuftsina. A fluorescência gerada foi medida a um comprimento de onda de emissão de 465 nm, utilizando um comprimento de onda de excitação de 360 nm (Tenland *et al.*, 2019).

3.2.18 Eficiência de Encapsulação e Quantidade de Carga

O ensaio de eficiência de encapsulamento e capacidade de carregamento dos MSNs foi realizado utilizando a metodologia de Wagner *et al.*,(2020). com pequenas modificações. Brevemente, dispersou-se 1 mg dessas nanopartículas em 100 µL de tampão HEPES (10 mM, pH 7.4). A mistura foi incubada por 3 horas à temperatura ambiente com diferentes concentrações de peptídeo: 0,14, 0,29, 0,43, 0,714 e 1 mg, para avaliar a capacidade de adsorção em função da quantidade de peptídeo presente. Após a incubação, procedeu-se à separação das nanopartículas por centrifugação, e quantificou-se a quantidade de peptídeo adsorvido examinando 90 µL do sobrenadante em combinação com 10 µL de fluorescamina, permitindo uma determinação precisa através da avaliação da fluorescência resultante.

3.2.19 Liberação de DC05 em meio biológico simulado

Os ensaios para avaliar a liberação de DC05 foram realizados em diferentes meios que simulam condições biológicas. O líquido pulmonar intersticial simulado (SPF) foi preparado dissolvendo 9,85 mg de MgCl₂, 603,2 mg de NaCl, 40,4 mg de KCl, 43,6 mg de Na₂HPO₄, 259,6 mg de NaHCO₃, 8,3 mg de Na₂SO₄, 35,9 mg de CaCl₂, 60,7 mg de C₂H₃NaO₂ e 11,5 mg de citrato de sódio em 100 ml de água destilada, alcançando um pH de 7,40 (Galdopórpora *et al.*, 2022). Para o meio gástrico simulado (SGF), utilizou-se uma solução de HCl 0,1 mol/L, ajustando o pH para aproximadamente 2. O meio intestinal simulado (SIF) foi preparado com tampão fosfato de Sorensen, alcançando um pH final de 7,4. Após a preparação desses meios, seguiu-se uma metodologia que integra os procedimentos propostos por Roque-Borda *et al.* (2023) com as adaptações de Tenland *et al.*, (2018). De forma resumida, pesaram-se 1 mg de MSN-CPP@DC05 em triplicata para cada um dos meios biológicos, dispersando-os em 1 ml do respectivo meio. Extraíu-se uma alíquota de 90 µl, que foi posteriormente adicionada a uma placa de microdiluição de 96 poços. Esta placa foi incubada com 10 µl de fluorescamina. As medições de fluorescência foram realizadas a cada minuto durante os primeiros 30 minutos e, em seguida, a cada 15 minutos durante as próximas 8 horas. Para essas medições, utilizou-se o modo cinético do leitor de placas, registrando a intensidade de fluorescência a 465 nm após excitação a 360 nm.

3.3 Análises *in vivo*

3.3.1 Toxicidade em Larvas de *Galleria mellonella*

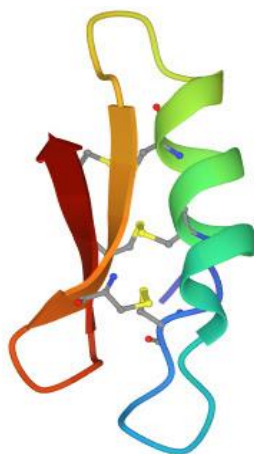
O ensaio de toxicidade foi realizado utilizando larvas de *Galleria mellonella*, seguindo metodologias previamente estabelecidas por Allegra *et al.*, (2018). Selecionaram-se larvas com peso aproximado de 0,2 g para administração de 10 µl dos compostos de interesse, bem como PBS para o grupo controle, por injeção no hemocele inferior esquerdo utilizando microseringas de precisão (Hamilton Ltd). As concentrações do peptídeo DC05 avaliadas foram de 50 mg/ml, 100mg/ml e 200mg/ml. Devido à baixa solubilidade das nanopartículas de sílica mesoporosas, as concentrações avaliadas foram levadas ao limite de sua solubilidade, sendo 25 mg/ml, 50 mg/ml e 100 mg/ml. Cada concentração foi administrada a grupos de 10 larvas, com três réplicas por tratamento. A incubação das larvas foi realizada à temperatura ambiente controlada (28°C), e a mortalidade foi registrada em intervalos de 24, 48, 72 e 96 horas após a injeção. Os parâmetros avaliados para determinar a toxicidade incluíram melanização, mobilidade e mortalidade das larvas, permitindo uma avaliação integral do efeito dos compostos químicos sobre a viabilidade e resposta fisiológica das larvas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 A Plectasina é um PAM extenso que pode ser reduzido

Plectasina, um PAM de 40 aminoácidos, demonstra especificidade para bactérias gram-positivas, embora certos análogos tenham revelado atividade contra Mtb. Uma limitação significativa desse PAM é o seu tamanho considerável, o que complica e encarece sua síntese, representando um desafio para sua pesquisa. Diante dessa situação, recorreu-se à modelagem tridimensional da Plectasina para identificar quais regiões de sua estrutura contribuem principalmente para sua atividade contra Mtb. As análises revelaram que a Plectasina consiste em dois domínios altamente conservados: uma folha β e uma hélice α (**Figura 5**).

Figura 5. Estrutura tridimensional da plectasina evidencia uma folha beta e uma hélice alfa.



Fonte: autor

Uma avaliação inicial da sequência completa da Plectasina para prever sua atividade anti-Mtb resultou em uma pontuação de -0.47, sugerindo uma inatividade intrínseca sem modificações específicas. No entanto, ao decompor e analisar os fragmentos da Plectasina, descobriu-se que a folha beta exibe uma atividade moderada contra Mtb, com uma pontuação de 0.37. Em contraste, a hélice alfa mostrou uma pontuação de -1.24, indicando uma menor afinidade por Mtb. É crucial notar que valores negativos denotam ausência de atividade, enquanto pontuações acima de 0,5 apontam para a presença de atividade antimicobacteriana, sendo que quanto maior o valor, maior a probabilidade de atividade efetiva. Portanto, optou-se por concentrar os esforços de modificação neste segmento positivo, buscando melhorar sua atividade contra Mtb e superar as limitações apresentadas pelo tamanho do PAM original. Esta abordagem estratégica não apenas permite refinar a especificidade e eficácia da Plectasina contra Mtb, mas também abre novos caminhos para a otimização de PAMs com base em sua estrutura.

4.2 Os análogos da Plectasina analisados por métodos *in silico* são ativos contra Mtb

A engenharia de sequências peptídicas através da substituição de resíduos de cisteína e glicina provou ser uma estratégia eficaz para superar desafios inerentes ao design de peptídeos antimicrobianos. As modificações foram direcionadas para mitigar reações espontâneas adversas, como ciclizações e formação de dímeros, que limitam a aplicação prática dos peptídeos.

As sequências selecionadas para síntese química (**Tabela 1**) identificadas a partir de um conjunto de mais de dez mil variantes geradas após permutações, foram avaliadas por análises preditivas de sua atividade antimicrobiana, potencial contra Mtb e bioatividade.

Tabela 1. Sequências peptídicas selecionadas para síntese química

Sequências selecionadas				
Código	Sequência	Anti-Mtb	Bioatividade	Antimicrobiano
DC04	GWYRAKLGFVWKRY	1.857	0.826	0.901
DC05	GWYRAKRGFVWKRY	1.819	0.783	0.965
DC08	GEYRAKRGFVWKRY	1.705	0.613	0.867
DC09	GRYRAKEGFVWKRY	1.576	0.617	0.585
DC10	GRYRAKMGFVWKRY	1.629	0.663	0.576
Plectasina	GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGGY CAKGGFVCKCY	-0.47	0.999	0.900

Fonte: autor

As sequências DC04 e DC05 destacam-se devido à inclusão de uma lisina e uma arginina, respectivamente, na oitava posição (da extremidade C à N terminal), contribuindo para suas proeminentes propriedades antimicrobianas. Sant *et al.*, (2018) informaram que sequências peptídicas enriquecidas com leucina apresentam uma afinidade significativamente elevada para com as bicamadas lipídicas e demonstram uma capacidade potente de inibir o crescimento bacteriano por meio da desestabilização de suas membranas. No entanto, sua hidrofobicidade pode aumentar a atividade hemolítica e citotoxicidade. Por outro lado, a arginina é notável por formar múltiplas interações electrostáticas e ligações de hidrogênio com as cabeças de fosfato dos lípidos, devido à sua cadeia lateral guanidínio, promovendo uma ligação mais forte e uma maior perturbação da membrana bacteriana (Cutrona *et al.*, 2015).

4.3 Previsão de propriedades farmacocinéticas dos PAMs

A avaliação farmacocinética dos compostos DC04 a DC10 indica consistência nas propriedades de absorção com baixa solubilidade em água e permeabilidade da membrana intestinal Caco-2. A impermeabilidade da pele e a ausência de absorção intestinal sugerem desafios na administração oral e transdérmica. Todos os compostos são substratos da glicoproteína-P, não inibem a glicoproteína P e mostram uma baixa ligação a proteínas plasmáticas com uma distribuição volumétrica moderada. A permeabilidade limitada através da barreira

hematoencefálica (BBB) e do sistema nervoso central (SNC) aponta para uma baixa probabilidade de efeitos neurotóxicos. O perfil metabólico revela que nenhum é substrato do CYP2D6, mas todos são para o CYP3A4, o que poderia implicar em interações medicamentosas e afetar o metabolismo. A excreção varia entre os compostos, com o DC10 mostrando uma maior depuração total (**Tabela 2**).

Tabela 2. Propriedades farmacocinéticas dos análogos da plectasina

Propriedades farmacocinéticas			DC04	DC05	DC08	DC09	DC10
Propriedade	Nome do modelo	Unidade	Valor previsto				
Absorção	Solubilidade em água	Numérico (log mol/L)	-2.892	-2.892	-2.892	-2.892	-2.892
Absorção	Permeabilidade ao Caco2	Numérico (log Papp em 10 ⁻⁶ cm/s)	-1.11	-1.318	-1.337	-1.335	-1.169
Absorção	Absorção intestinal (humana)	Numérico (% absorvido)	0	0	0	0	0
Absorção	Permeabilidade da pele	Numérico (log Kp)	-2.735	-2.735	-2.735	-2.735	-2.735
Absorção	Substrato de glicoproteína-P	Categórico (Sim/Não)	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Absorção	Inibidor da glicoproteína P I	Categórico (Sim/Não)	Não	Não	Não	Não	Não
Absorção	Inibidor da glicoproteína P II	Categórico (Sim/Não)	Não	Não	Não	Não	Não
Distribuição	VDss (humano)	Numérico (log L/kg)	0.007	0.01	0.01	0.01	0.01
Distribuição	Fração não ligada (humana)	Numérico (Fu)	0.381	0.381	0.381	0.381	0.381
Distribuição	Permeabilidade BHE	Numérico (log BB)	-4.401	-4.974	-5.191	-5.193	-5.06
Distribuição	Permeabilidade do SNC	Numérico (log PS)	-9.306	-	-	-	-
				10.092	10.529	10.523	10.205
Metabolismo	Substrato do CYP2D6	Categórico (Sim/Não)	Não	Não	Não	Não	Não
Metabolismo	Substrato do CYP3A4	Categórico (Sim/Não)	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Metabolismo	Inibidor do CYP1A2	Categórico (Sim/Não)	Não	Não	Não	Não	Não
Metabolismo	inibidor CYP2C19	Categórico (Sim/Não)	Não	Não	Não	Não	Não

Metabolismo	Inibidor do CYP2C9	Catagórico (Sim/Não)	Não	Não	Não	Não	Não
Metabolismo	Inibidor do CYP2D6	Catagórico (Sim/Não)	Não	Não	Não	Não	Não
Metabolismo	Inibidor do CYP3A4	Catagórico (Sim/Não)	Não	Não	Não	Não	Não
Excreção	Desembaraço Total	Numérico (log ml/min/kg)	-1.236	-1.319	-1.471	-1.445	-0.961
Excreção	Substrato renal OCT2	Catagórico (Sim/Não)	Não	Não	Não	Não	Não
Toxicidade	Toxicidade do AMES	Catagórico (Sim/Não)	Não	Não	Não	Não	Não
Toxicidade	Dose máxima tolerada (humana)	Numérico (log mg/kg/dia)	0.438	0.438	0.438	0.438	0.438
Toxicidade	inibidor de hERG I	Catagórico (Sim/Não)	Não	Não	Não	Não	Não
Toxicidade	inibidor do hERG II	Catagórico (Sim/Não)	Não	Não	Não	Não	Sim
Toxicidade	Toxicidade aguda oral em ratos (DL50)	Numérico (mol/kg)	2.482	2.482	2.482	2.482	2.482
Toxicidade	Toxicidade Crônica Oral em Rato (LOAEL)	Numérico (log mg/kg_bw/dia)	18.98 8	20.16 4	17.69 3	17.44 6	16.94 3
Toxicidade	Hepatotoxicidade	Catagórico (Sim/Não)	Sim	Não	Não	Não	Sim
Toxicidade	sensibilização cutânea	Catagórico (Sim/Não)	Não	Não	Não	Não	Não
Toxicidade	Toxicidade por T.Pyriformis	Numérico (log ug/L)	0.285	0.285	0.285	0.285	0.285
Toxicidade	Toxicidade do minnow	Numérico (log mM)	29.40 9	31.35	32.55 5	34.93 8	33.52 6

* Permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE), sistema nervoso central (SNC), Volume de distribuição em estado estacionário (VDss). Fonte: autor

Os padrões de solubilidade e permeabilidade observados levantam a necessidade de explorar estratégias de formulação, como sistemas de entrega autoemulsificantes ou complexos de inclusão com ciclodextrinas, para melhorar a biodisponibilidade oral (Williams *et al.*, 2013). A alta fração não ligada favorece uma distribuição sistêmica adequada, embora a baixa permeabilidade BHE limite a penetração no SNC, uma propriedade desejável para evitar efeitos adversos no sistema nervoso. O metabolismo exclusivo via CYP3A4 destaca o risco de interações farmacológicas, que deve ser monitorado cuidadosamente. A variabilidade na excreção sugere

diferentes perfis de eliminação que poderiam influenciar na dosagem e frequência de administração. A ausência de toxicidade de AMES indica um perfil de segurança favorável para alguns compostos, enquanto o potencial inibidor de hERG II em DC10 merece atenção particular devido ao risco de arritmias cardíacas. Essas características são cruciais para a seleção de candidatos para desenvolvimento clínico e devem ser balanceadas com sua eficácia terapêutica.

4.4 O tempo de meia-vida dos peptídeos sugere uma notável resistência à degradação

Os dados indicam que as sequências de peptídeos apresentam uma ampla variabilidade em sua estabilidade em diferentes sistemas biológicos. Especificamente, a sequência 4 mostra uma meia-vida de 2,8 horas em reticulócitos de mamíferos, diminuindo drasticamente para 10 minutos em leveduras e para apenas 2 minutos em *E. coli*. Esta tendência é consistente nas sequências DC08 e DC10, onde também se observa uma maior estabilidade nos reticulócitos de mamíferos em comparação com os outros dois modelos. Por outro lado, as sequências DC05 e DC09 exibem uma meia-vida significativamente maior, excedendo 20 horas em leveduras e 10 horas em *E. coli*, sugerindo uma notável resistência à degradação nesses modelos (**Tabela3**).

Tabela 3. Tempo de meia vida em diversos modelos

SEQÜÊNCIA	MEIA-VIDA	
	Modelo	TMV
DC04	Reticulócitos de mamíferos	2.8 H
	Levedura	10 min
	<i>E.coli</i>	2min
DC05	Reticulócitos de mamíferos	30 H
	Levedura	>20 H
	<i>E.coli</i>	>10 H
DC08	Reticulócitos de mamíferos	2.8 H
	Levedura	10 min
	<i>E.coli</i>	2min
DC09	Reticulócitos de mamíferos	30 H
	Levedura	>20 H
	<i>E.coli</i>	>10 H
DC10	Reticulócitos de mamíferos	1 H
	Levedura	2 min

E.coli

2 min

*TVM: tempo de meia vida. Fonte: autor

A variabilidade na meia-vida das sequências entre os diferentes modelos sugere diferenças nos mecanismos de degradação peptídica e a presença de proteases específicas. Em reticulócitos de mamíferos, a meia-vida prolongada das sequências DC05 e DC09 pode estar relacionada com a compatibilidade dos peptídeos com os sistemas enzimáticos de mamíferos, possivelmente devido à semelhança com peptídeos endógenos que evitam a degradação rápida.

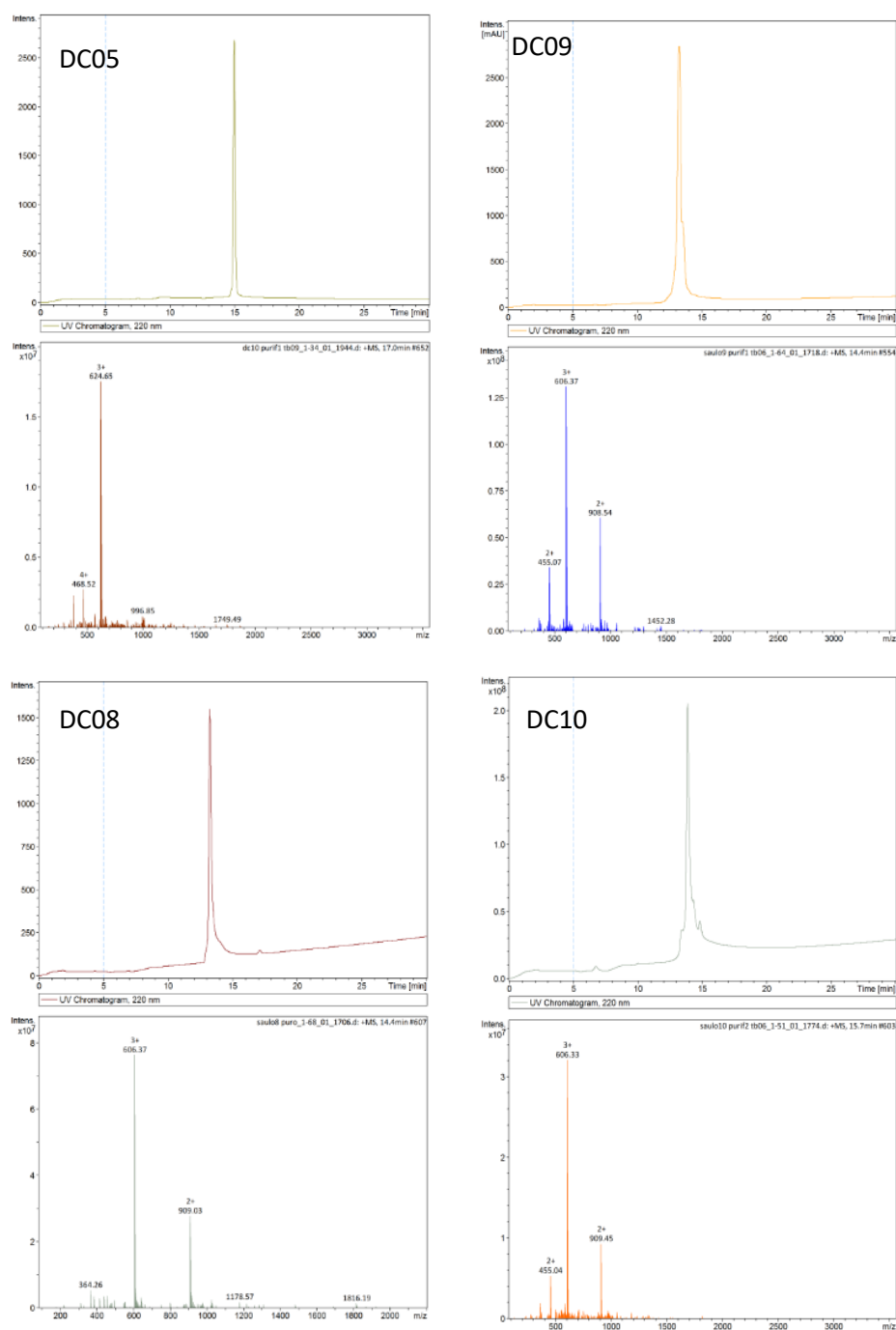
A considerável estabilidade em reticulócitos de mamíferos da sequência DC10 (1 hora), em comparação com sua rápida degradação em leveduras e *E. coli* (2 minutos), destaca a importância de selecionar o modelo biológico adequado ao investigar a farmacocinética dos peptídeos. Esses resultados podem orientar a otimização de sequências para aumentar sua meia-vida em modelos biológicos relevantes, contribuindo para a eficácia terapêutica dos PAMs.

Esses achados são essenciais para compreender o perfil de estabilidade dos peptídeos e podem orientar futuras modificações na sequência para melhorar sua resistência à degradação, o que é crucial para sua aplicação clínica potencial. A seleção de sequências para síntese e teste deve considerar não apenas a atividade antimicrobiana, mas também a estabilidade, para maximizar a eficácia terapêutica e a conveniência de dosagem no desenvolvimento de novos tratamentos antimicrobianos.

4.5 Síntese e caracterização dos PAMs

Os peptídeos sintetizados manualmente foram rigorosamente caracterizados por espectrometria de massa e HPLC para verificar sua síntese e avaliar sua pureza. Os resultados obtidos na espectrometria de massa coincidiram precisamente com as massas moleculares teoricamente esperadas, o que é um indicativo claro da síntese bem-sucedida. Após confirmar a identidade dos peptídeos, procedeu-se à sua purificação para eliminar quaisquer impurezas residuais e preparar os compostos para estudos posteriores de atividade biológica (**Figura 6**).

Figura 6. Perfil de LC/MS dos Peptídeos Sintetizados. A massa teórica corresponde à massa obtida pelo espectro de massas, sugerindo que o processo de síntese foi realizado corretamente. O perfil do espectro indica uma pureza aceitável



Fonte: autor

4.6 Apenas um análogo da Plectasina apresenta atividade considerável contra Mtb

Análises de atividade antimicrobiana revelaram que o peptídeo DC05 possui atividade contra Mtb com uma CIM de 12 μ M, sugerindo uma maior eficácia em comparação com o DC10,

que tem uma CIM de 24 μM . Esse achado posiciona o DC05 como um candidato promissor para o tratamento contra Mtb. Além disso, o DC05 mostrou atividade significativa contra *Pseudomonas aeruginosa* (P.A) com uma CIM de 0.5 μM , e boa atividade contra *Salmonella Typhi* (S.T) com 4 μM . O composto DC04, embora menos eficaz que o DC05 contra Mtb, também mostrou potência contra *E. coli* e S.T, com CIMs de 3 μM e 1.5 μM respectivamente, mas uma atividade limitada contra *Staphylococcus aureus* (S.A) (**Tabela 4**).

Tabela 4. Atividade Antimicrobiana contra Bactérias Gram-Positivas, Gram-Negativas e *Mycobacterium*

PAM	<i>E.coli</i> (μM)	S.T (μM)	P.A (μM)	S.A (μM)	H37Rv (μM)
DC04	3	1.5	2	25	25
DC05	15	4	0.5	>65	12
DC08	>65	65	60	>65	37
DC09	>65	>65	>65	>65	49
DC10	>65	15	60	25	24

Fonte: autor

O perfil de atividade dos PAMs sintetizados sugere uma tendência dos DC04 e DC05 para eficácia contra bactérias gram-negativas, o que pode refletir uma afinidade estrutural ou um mecanismo de ação particularmente eficaz contra as membranas externas desses patógenos. A superioridade do DC05 na inibição de Mtb abre caminhos promissores para seu desenvolvimento como um agente terapêutico na luta contra a TB, uma doença que apresenta desafios significativos devido à emergência de cepas resistentes aos medicamentos.

O equilíbrio entre o espectro antimicrobiano amplo e a especificidade é um tema recorrente no design de PAMs. Enquanto um espectro amplo é benéfico para tratar infecções não diferenciadas ou polimicrobianas, uma alta especificidade pode reduzir o risco de resistência e a perturbação da microbiota benéfica. Os resultados atuais indicam que o DC05 pode ser otimizado para aumentar sua atividade contra Mtb, aproveitando sua capacidade existente de interagir com bactérias gram-negativas.

É imperativo destacar que a pesquisa iniciou com um peptídeo que carecia de atividade contra Mtb, mostrando eficácia apenas frente a bactérias Gram-positivas. No entanto, através da seleção de uma estrutura que evidenciava uma atividade moderada contra Mtb, conseguiu-se uma significativa ampliação de sua efetividade contra esse patógeno. As análises preditivas colocavam o DC04 como o PAM de maior atividade. No entanto, é crucial considerar que as ferramentas *in*

silico nos oferecem apenas aproximações; conseqüentemente, torna-se essencial complementar essas aproximações com análises biológicas para validar e enriquecer nossas descobertas. A discrepância entre os resultados *in silico* e *in vitro* poderia ser explicada pelo modo como a guanidina da arginina aumenta a solubilidade e estabilidade peptídica em meios aquosos, através da sua capacidade de formar ligações de hidrogênio e aglomerados. Isso não apenas estabiliza as estruturas peptídicas, mas também melhora as interações com proteínas. Simultaneamente, a presença de arginina no DC05 aprimora sua capacidade de penetrar e perturbar membranas (Mamsa e Meloni, 2021; Oba *et al.*, 2019).

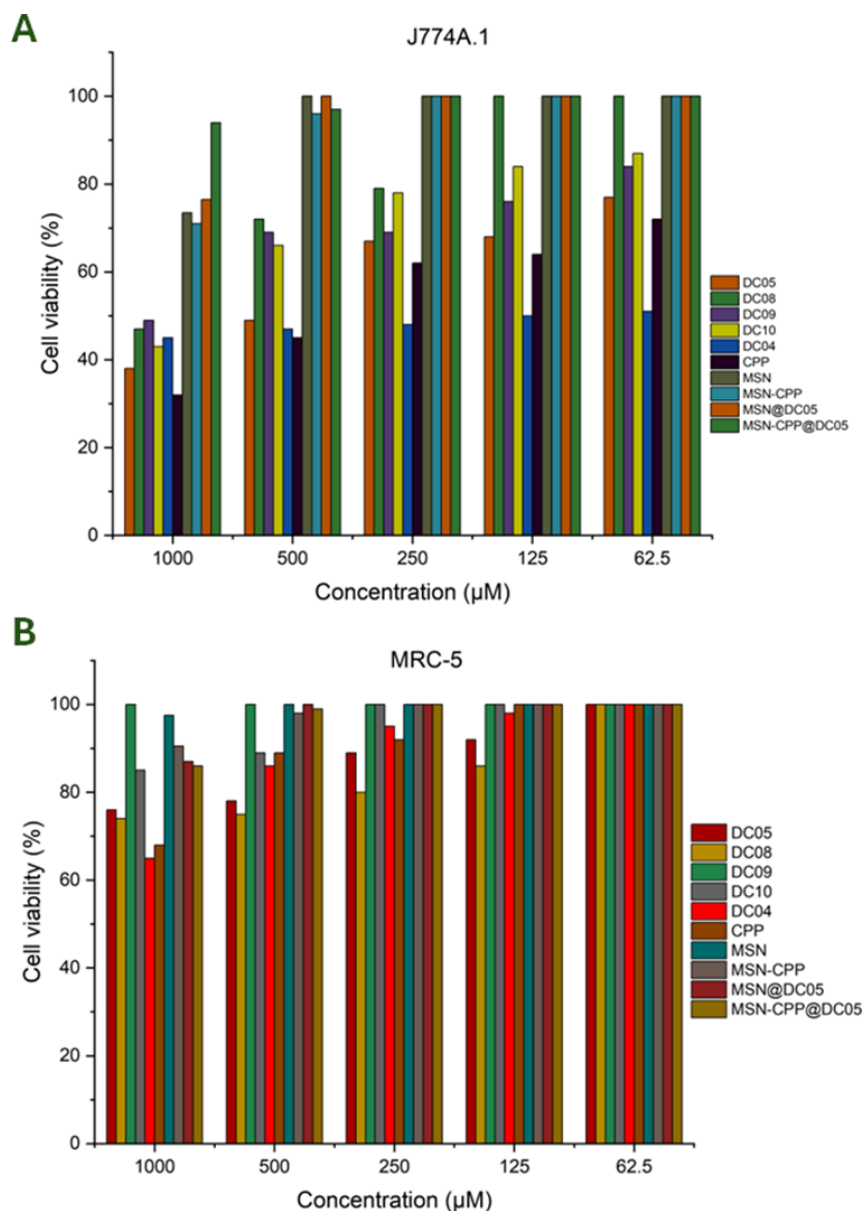
De acordo com esses resultados, o DC05 emerge como o composto líder para futuros desenvolvimentos voltados à terapia anti-Mtb, com consideração cuidadosa de sua eficácia contra outras bactérias gram-negativas importantes como S.T e P.A.

Esses achados sublinham a importância de uma avaliação detalhada da atividade antimicrobiana para cada peptídeo candidato, não apenas no contexto de Mtb mas também em um escopo mais amplo que inclua patógenos clinicamente relevantes.

4.7 Os análogos mostram ser biocompatíveis com diversas linhagens celulares

Os ensaios de citotoxicidade em células MRC-5 e J774.A1 revelam que os peptídeos antimicrobianos sintetizados apresentam um perfil de segurança promissor, mantendo alta viabilidade celular até concentrações de 1000 μ M. Isso é evidenciado pelos dados de fibroblastos, embora em macrófagos, os peptídeos mostraram maior citotoxicidade, apesar de um IC50 dentro de faixas aceitáveis. Além disso, a encapsulação do peptídeo DC05 em MSNs aumentou a biocompatibilidade, mesmo em concentrações de 1000 μ M, alinhando-se aos resultados do Gounani *et al.*, (2019) que carregaram polimixina B e vancomicina em MSNs, atenuando sua citotoxicidade. Esses achados destacam o potencial terapêutico dos análogos de plectasina e tuftsina para uso *in vitro*, com margem de segurança para concentrações clinicamente relevantes sem danos celular significativo. A baixa toxicidade é um sinal encorajador para continuar com ensaios de eficácia e estudos de segurança aprofundados, cruciais para a validação de novos medicamentos terapêuticos.

Figura 7. Os peptídeos sintetizados são biocompatíveis com diversas linhagens celulares.



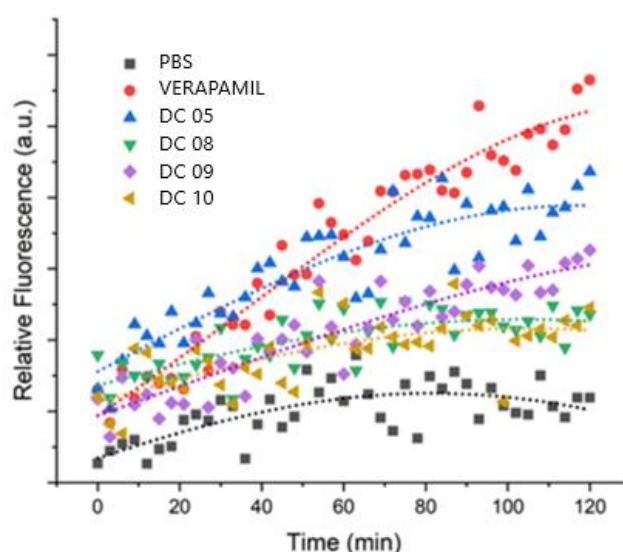
Fonte: autor

4.8 O acúmulo de brometo de etídio dentro do MTB indica inibição nas bombas de efluxo

O acúmulo de brometo de etídio, utilizada como indicador da inibição das bombas de efluxo, foi monitorada na presença dos peptídeos DC05, DC08, DC09 e DC10, juntamente com um controle positivo de verapamil (VP), um conhecido inibidor de bombas de efluxo. As medições de fluorescência relativa mostraram que todos os peptídeos testados aumentaram o acúmulo de brometo de etídio ao longo do tempo, indicando uma inibição das bombas de efluxo (**Figura 8**). O

VP mostrou o maior aumento, como esperado de um inibidor eficaz. No entanto, o DC05 também mostra uma capacidade potencial para inibir as bombas de efluxo.

Figura 8. Acúmulo potencializado de brometo de etídio na presença de PAMs derivados da plectasina a 50% da CIM.



Fonte: autor

É importante destacar que a inibição das bombas de efluxo é um mecanismo valioso para aumentar a concentração intracelular de antibióticos, que pode ser particularmente útil contra bactérias resistentes a múltiplos fármacos e até mesmo contra células cancerígenas (Nishino *et al.*, 2021).

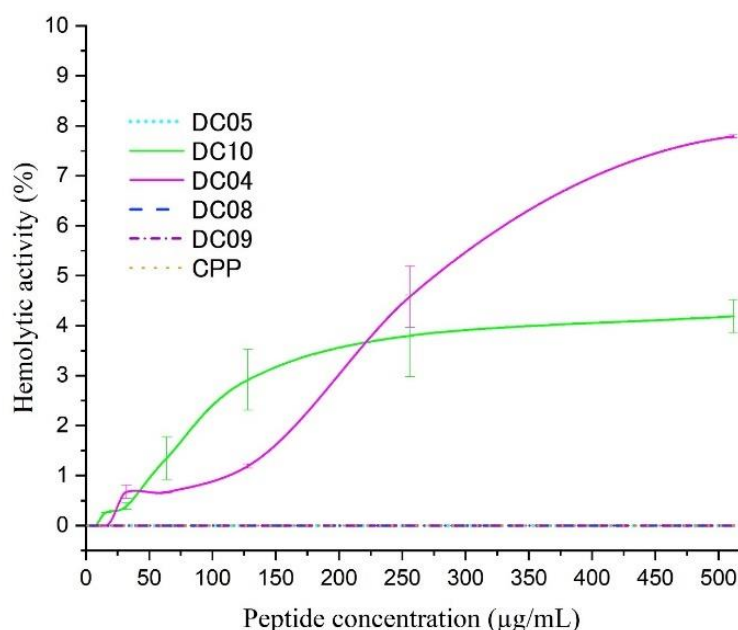
A superioridade do VP neste ensaio reforça seu papel como inibidor de bombas de efluxo e serve como um padrão de referência útil para avaliar a eficácia de novos agentes. Enquanto isso, o desempenho dos peptídeos indica que eles podem ser úteis como adjuvantes em terapias combinadas com antibióticos tradicionais, potencializando sua efetividade ao prevenir a expulsão do fármaco das células bacterianas.

4.9 PAMs não mostraram atividades hemolíticas

Nenhum dos peptídeos testados mostrou uma atividade hemolítica significativa nas concentrações avaliadas (**Figura 9**). Isso é evidenciado pelo fato de que as porcentagens de

hemólise permaneceram próximas a 0% em todas as concentrações testadas. Estes resultados são promissores, pois indicam que os peptídeos, nas concentrações estudadas, possuem baixa probabilidade de causar danos às membranas celulares dos eritrócitos, um dos efeitos colaterais indesejados em potenciais tratamentos terapêuticos.

Figura 9. Atividade hemolítica de peptídeos em concentrações seriais.



Fonte: autor

Embora muitos autores apontem que há uma relação entre a carga líquida positiva dos peptídeos e a hemólise, o estudo de Ye *et al.*, (2023) destacou a importância da hidrofobicidade, em vez da carga líquida ou anfifilicidade, na determinação da atividade hemolítica dos peptídeos.

A falta de atividade hemolítica nos peptídeos pode ser atribuída a uma variedade de fatores relacionados à sua estrutura e à forma como interagem com as membranas lipídicas. Peptídeos antimicrobianos geralmente atuam nas membranas bacterianas através de mecanismos que podem ser prejudiciais se também lise células humanas. No entanto, a especificidade dos peptídeos testados, conforme sugerido pelos resultados, implica que eles podem discriminar entre as membranas das células eucarióticas e procariontes, uma característica desejável para a aplicação clínica.

Com base em todos os resultados anteriores, decidiu-se continuar a experimentação apenas com o peptídeo DC05 e que mostra maior atividade antimicobacteriana e um bom perfil de segurança

4.10 Determinação de bolsas farmacológicas

Foram identificados três bolsões farmacológicos com probabilidade acima de 80% no receptor Ag85B, um em LDT2 e outro em GyrB. Embora o volume desses bolsões seja bastante reduzido, o que poderia complicar a ligação específica de fármacos, o Ag85B apresenta um bolsão de tamanho significativo, o que pode ser mais propício à interação com moléculas farmacêuticas (Tabela 5).

Tabela 5. Informações detalhadas sobre os bolsas farmacológicas encontradas nos receptores de MTB

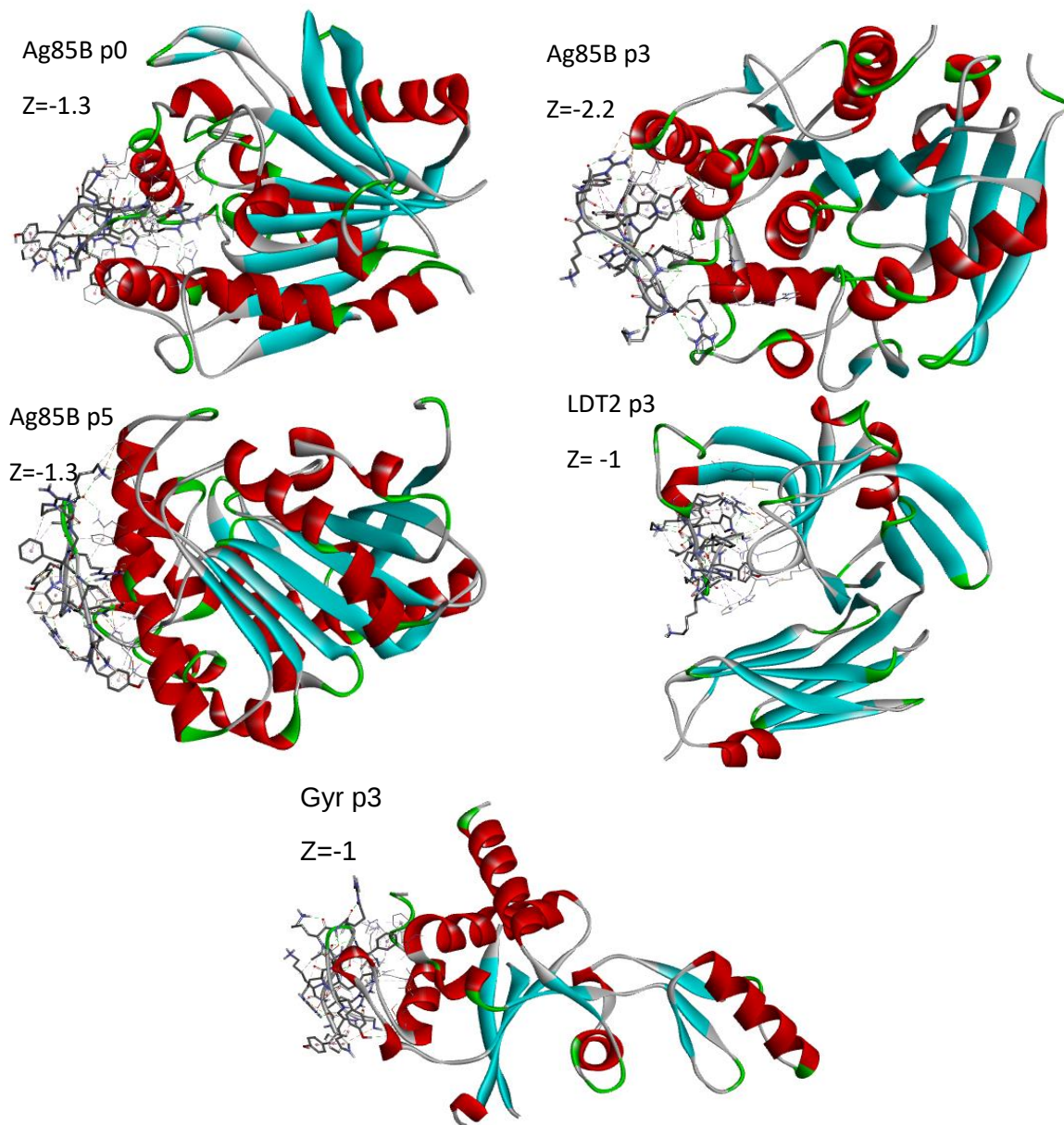
Receptor	Pockets	Vol. Hull*	Hydrophob. Kyte*	Polar Res.*	Aromatic Res.*	Otyr atom	Nb. Res.*	Drugg Prob*	Standard Deviation
Ag85B	P 0	1349.16	1.64	0.25	0.2	0	20	1	0
	P 3°	300.09	-0.05	0.7	0.3	0	10	0.84	0.08
	P 5	446.14	0.27	0.42	0.08	0	12	0.83	0.02
GyrB	P 3	397.16	3.77	0	0.08	0	12	1	0
LDT2	P 3	388.05	0.12	0.58	0.25	0.07	12	0.93	0.03

Vol. Hull* = Volume do Invólucro; Hydrophob. Kyte* = Hidrofobicidade de Kyte; Polar Res. * = Proporção de Resíduos Polares; Aromatic Res. * = Proporção de Resíduos Aromáticos; Drugg Prob* = Probabilidade de ser drogável; Nb. Res. * = Número de Resíduos do Bolsão. Fonte: autor

4.11 Docking molecular e análise de interação

Os resultados indicam um escore Z de -1 para os receptores LDT2 e GyrB, valor que, segundo os padrões do fabricante, é classificado como de baixa afinidade. De forma semelhante, os bolsões farmacológicos 0 e 5 do receptor Ag85B apresentam um escore Z de -1.3 (**figura 10**). Por outro lado, o bolsão 3 mostra um escore Z de -2.2, o que indica uma afinidade consideravelmente boa entre DC05 e esse local específico. Portanto, é plausível supor que nosso PAM poderia se integrar de maneira eficaz na proteína receptora, especificamente no bolsão 3.

Figura 10. Visualização de interações entre DC05 e as proteínas receptoras avaliadas.



Fonte: autor

Os escores Z negativos, especialmente no contexto da bioinformática e da química computacional, são indicativos da afinidade de um ligante para com seu receptor. Um escore mais negativo sugere uma maior afinidade, o que implica uma interação mais forte e potencialmente mais efetiva entre o ligante e o receptor. Neste caso, o escore Z de -1 para os receptores LDT2 e GyrB sugere uma baixa afinidade, o que poderia indicar que o PAM tem uma capacidade limitada

de interagir eficazmente com esses alvos. Isso é relevante, visto que tanto LDT2 quanto GyrB são cruciais para a sobrevivência e resistência de Mtb.

O receptor LDT2, crucial na biossíntese da camada de peptidoglicano da bactéria, apresenta um desafio particular. A dependência de Mtb na L,D-transpeptidase 2 para a manutenção de sua estrutura peptidoglicana sublinha a necessidade de encontrar inibidores eficazes que superem a resistência conferida pelas enzimas convencionais D,D-transpeptidases. O escore Z de -1 sugere que são necessárias moléculas com maior afinidade por este receptor para combater eficazmente a bactéria (Erdemli *et al.*, 2012).

Por outro lado, GyrB, uma subunidade da DNA girase, é um alvo primordial para os fluoroquinolonas. A baixa afinidade indicada pelo escore Z poderia refletir uma limitação na capacidade do PAM de inibir essa enzima essencial, o que é crucial para o desenvolvimento de resistência aos fluoroquinolonas. No entanto, mutações em GyrB e GyrA são conhecidas por contribuir para a resistência aos antibióticos, o que destaca a importância de desenvolver compostos com alta especificidade e afinidade por essas proteínas (Avalos *et al.*, 2015; Petrella *et al.*, 2019).

Em contraste, o bolsão 3 do receptor Ag85B mostra um escore Z de -2.2, indicando uma afinidade consideravelmente boa. Isso é especialmente significativo dado o papel de Ag85B na síntese da parede celular de Mtb, facilitando a transferência de micolatos e a formação de estruturas essenciais para a viabilidade bacteriana. Uma alta afinidade por este receptor sugere que o PAM poderia ser um inibidor potente de Ag85B, oferecendo uma via promissora para o desenvolvimento de novos tratamentos (Ernst, Cornelius e Bolz, 2019). A inibição eficaz de Ag85B não só afetaria a integridade estrutural da bactéria, mas também poderia comprometer sua capacidade de evadir a resposta imune do hospedeiro. Esta afinidade é evidenciada pela análise detalhada das interações geradas entre DC05 e o bolsão 3 de Ag85B. DC05 originou 18 interações com o bolsão 0 do receptor Ag85B, das quais 3 foram de ligação hidrogênio-eletrostática tipo ponte de sal-atração de carga, 7 de interações de hidrogênio convencionais e 8 hidrofóbicas, estas últimas caracterizadas por serem fracas. Ressalta-se a Arg7 do DC05 que gerou 5 interações de diferentes tipos com o receptor (**Tabela 6**).

Tabela 6. Interações detalhadas entre os aminoácidos de DC05 e as bolsas farmacológicas dos receptores

Receptor	Interação	Distância	Categoria	Tipo
Ag85 p0	B:LYS6:HZ1 - A:ASP170:OD2	2.30035	Ligação de Hidrogênio;Eletrostática	Ponte Salina;Carga Atrativa
	B:LYS6:HZ3 - A:ASP170:OD1	1.66879	Ligação de Hidrogênio;Eletrostática	Ponte Salina;Carga Atrativa
	B:LYS12:HZ2 - A:ASP170:OD1	2.4156	Ligação de Hidrogênio;Eletrostática	Ponte Salina;Carga Atrativa
	A:ARG43:HE - B:ARG7:O	2.26614	Ligação de Hidrogênio	Ligação Convencional de Hidrogênio
	A:ARG43:HH21 - B:LYS6:O	1.89488	Ligação de Hidrogênio	Ligação Convencional de Hidrogênio
	B:ARG7:HE - A:HIS262:O	2.80514	Ligação de Hidrogênio	Ligação Convencional de Hidrogênio
	B:ARG7:HH22 - A:SER126:OG	2.75887	Ligação de Hidrogênio	Ligação Convencional de Hidrogênio
	B:LYS12:HZ1 - A:LEU166:O	1.78803	Ligação de Hidrogênio	Ligação Convencional de Hidrogênio
	B:ARG13:HE - A:MET159:SD	2.07343	Ligação de Hidrogênio	Ligação Convencional de Hidrogênio
	B:ARG13:HH22 - A:MET159:SD	2.96498	Ligação de Hidrogênio	Ligação Convencional de Hidrogênio
	A:LEU163:CD2 - B:TRP11	3.81215	Hidrofóbico	Pi-Sigma
	A:PHE228 - B:TYR3	4.1377	Hidrofóbico	Pi-Pi Stacked
	B:ALA5 - A:PRO225	5.12923	Hidrofóbico	Alquila
	B:ALA5 - A:LEU229	4.63061	Hidrofóbico	Alquila
	B:ARG7 - A:LEU229	4.85987	Hidrofóbico	Alquila
	B:LYS12 - A:LEU166	4.95798	Hidrofóbico	Alquila
	A:HIS262 - B:ARG7	5.47691	Hidrofóbico	Pi-Alquila

Ag85 3	B:PHE9 - A:LEU42	4.59359	Hidrofóbico	Pi-Alquila
	B:ARG13:HH12 - A:ASP242:OD2	1.97978	Ligação de Hidrogênio;Eletrostática	Ponte Salina;Carga Atrativa
	B:ARG13:HH21 - A:ASP242:OD2	1.76549	Ligação de Hidrogênio;Eletrostática	Ponte Salina;Carga Atrativa
	B:GLY1:N - A:ASP242:OD2	4.95352	Eletrostática	Carga Atrativa
	B:ARG13:NH1 - A:ASP242:OD1	3.16206	Eletrostática	Carga Atrativa
	A:GLN157:HE22 - B:ARG4:O	1.92841	Ligação de Hidrogênio	Ligação Convencional de Hidrogênio
	A:LYS239:HZ2 - B:TYR14:OH	1.98989	Ligação de Hidrogênio	Ligação Convencional de Hidrogênio
	B:TYR3:HH - A:SER236:O	3.06651	Ligação de Hidrogênio	Ligação Convencional de Hidrogênio
	B:ARG4:HN - A:GLN157:OE1	2.0689	Ligação de Hidrogênio	Ligação Convencional de Hidrogênio
	B:ARG4:HH22 - A:GLN157:OE1	2.57022	Ligação de Hidrogênio	Ligação Convencional de Hidrogênio
	B:LYS6:HN - A:GLU189:OE2	1.72008	Ligação de Hidrogênio	Ligação Convencional de Hidrogênio
	B:ARG7:HN - A:GLU189:OE2	1.79482	Ligação de Hidrogênio	Ligação Convencional de Hidrogênio
	B:ARG7:HH11 - A:PRO186:O	2.18705	Ligação de Hidrogênio	Ligação Convencional de Hidrogênio
	B:GLY8:HN - A:GLN195:OE1	2.98014	Ligação de Hidrogênio	Ligação Convencional de Hidrogênio
	B:PHE9:HN - A:GLN195:OE1	2.80854	Ligação de Hidrogênio	Ligação Convencional de Hidrogênio
	B:TRP11:HE1 - A:THR194:O	1.95873	Ligação de Hidrogênio	Ligação Convencional de Hidrogênio

	B:ARG7:CD - A:PRO186:O	3.06071	Ligação de Hidrogênio	Ligação de Carbon Hidrogênio
	A:LYS239:NZ - B:TRP2	4.22461	Eletrostática	Pi-Cation
	A:THR194:CG2 - B:TYR3	3.41214	Hidrofóbico	Pi-Sigma
	A:ARG190 - B:ARG7	5.18429	Hidrofóbico	Alquila
	B:PHE9 - A:PRO198	4.28655	Hidrofóbico	Pi-Alquila
	B:PHE9 - A:LYS199	5.35554	Hidrofóbico	Pi-Alquila
	B:TRP11 - A:ALA243	4.60331	Hidrofóbico	Pi-Alquila
	B:TRP11 - A:ILE197	5.2073	Hidrofóbico	Pi-Alquila
	B:TRP11 - A:ALA243	4.11883	Hidrofóbico	Pi-Alquila
	B:TRP11 - A:ALA247	5.04046	Hidrofóbico	Pi-Alquila
Ag85B 5	B:LYS6:HZ2 - A:GLU227:OE1	3.04788	Ligação de Hidrogênio;Eletrostática	Ponte Salina;Carga Atrativa
	B:LYS12:NZ - A:ASP242:OD1	2.65469	Eletrostática	Carga Atrativa
	A:ASN231:HD21 - B:LYS6:O	2.33737	Ligação de Hidrogênio	Conventional Hydrogen Bond
	A:LYS239:HZ3 - B:ARG13:O	1.91981	Ligação de Hidrogênio	Conventional Hydrogen Bond
	B:TRP2:HE1 - A:GLN157:O	1.92325	Ligação de Hidrogênio	Conventional Hydrogen Bond
	B:ARG4:HH12 - A:PHE232:O	1.67144	Ligação de Hidrogênio	Conventional Hydrogen Bond
	B:LYS6:HZ2 - A:GLY214:O	2.39361	Ligação de Hidrogênio	Conventional Hydrogen Bond
	B:LYS6:HZ3 - A:GLY214:O	2.07667	Ligação de Hidrogênio	Conventional Hydrogen Bond
	B:ARG4:CD - A:PHE232:O	2.96762	Ligação de Hidrogênio	Carbon Hydrogen Bond
	B:LYS6:CE - A:GLU227:OE1	2.96212	Ligação de Hidrogênio	Carbon Hydrogen Bond
	B:GLY8:CA - A:ASN231:OD1	3.33479	Ligação de Hidrogênio	Carbon Hydrogen Bond
	A:LYS239:NZ - B:TRP2	4.0877	Eletrostática	Pi-Cation

Gyr p3	A:LYS239:HZ2 - B:TRP2	2.39809	Ligação de Hidrogênio;Eletrostática	Pi-Cation;Pi- Donor Ligação de Hidrogênio
	A:MET159:SD - B:TYR3	4.74032	Outro	Pi-Enxofre
	B:VAL10 - A:LEU238	5.05417	Hidrofóbico	Alquila
	B:LYS12 - A:LEU238	5.39348	Hidrofóbico	Alquila
	A:PHE232 - B:ARG4	4.41432	Hidrofóbico	Pi-Alquila
	B:TYR14 - A:LYS239	5.27645	Hidrofóbico	Pi-Alquila
	B:ARG4:HH11 - A:GLU516:OE1	2.05386	Ligação de Hidrogênio;Eletrostática	Ponte Salina;Carga Atrativa
	B:ARG4:HH21 - A:GLU516:OE1	1.76452	Ligação de Hidrogênio;Eletrostática	Ponte Salina;Carga Atrativa
	B:ARG4:NH1 - A:GLU516:OE2	2.95955	Eletrostática	Carga Atrativa
	B:GLY1:HT1 - A:THR507:O	2.76881	Ligação de Hidrogênio	Ligação Convencional de Hidrogênio
	B:TYR3:HH - A:GLY510:O	1.72929	Ligação de Hidrogênio	Ligação Convencional de Hidrogênio
	B:ARG4:HN - A:GLU516:OE2	1.74863	Ligação de Hidrogênio	Ligação Convencional de Hidrogênio
	B:LYS6:HN - A:ASP515:OD2	1.66466	Ligação de Hidrogênio	Ligação Convencional de Hidrogênio
	B:LYS6:HZ1 - B:LYS6:O	1.7058	Ligação de Hidrogênio	Ligação Convencional de Hidrogênio
	B:ARG7:HN - A:ASP515:OD1	2.11741	Ligação de Hidrogênio	Ligação Convencional de Hidrogênio
	B:ARG13:HE - A:GLN503:OE1	2.29685	Ligação de Hidrogênio	Ligação Convencional de Hidrogênio
	B:ARG13:HH22 - A:GLN503:OE1	1.61628	Ligação de Hidrogênio	Ligação Convencional de Hidrogênio

	A:ILE513:CG2 - B:PHE9	3.73514	Hidrofóbico	Pi-Sigma
	A:PHE551 - B:PHE9	4.66481	Hidrofóbico	Pi-Pi T-shaped
	B:ALA5 - A:ILE513	3.99181	Hidrofóbico	Alquila
	A:HIS514 - B:ARG7	4.61839	Hidrofóbico	Pi-Alquila
	A:PHE551 - B:ARG7	4.99893	Hidrofóbico	Pi-Alquila
	B:PHE9 - A:LEU497	4.44699	Hidrofóbico	Pi-Alquila
	B:TRP11 - A:ILE506	5.2445	Hidrofóbico	Pi-Alquila
	B:TRP11 - A:LEU497	5.34421	Hidrofóbico	Pi-Alquila
LDT2 p3	B:ARG13:HH12 - A:GLU170:OE1	1.94008	Ligação de Hidrogênio;Eletrostática	Ponte Salina;Carga Atrativa
	B:ARG13:HH21 - A:GLU170:OE1	1.68052	Ligação de Hidrogênio;Eletrostática	Ponte Salina;Carga Atrativa
	B:GLY1:N - A:GLU170:OE2	3.94216	Electrostatic	Carga Atrativa
	B:ARG13:NH1 - A:GLU170:OE2	4.88847	Electrostatic	Carga Atrativa
	A:ARG199:HH12 - B:GLY1:O	2.23228	Ligação de Hidrogênio	Ligação Convencional de Hidrogênio
	B:VAL10:HN - A:THR179:O	1.9907	Ligação de Hidrogênio	Ligação Convencional de Hidrogênio
	B:TRP11:HE1 - A:SER203:O	1.9826	Ligação de Hidrogênio	Ligação Convencional de Hidrogênio
	B:LYS12:HZ2 - A:THR179:O	2.95329	Ligação de Hidrogênio	Ligação Convencional de Hidrogênio
	B:ARG13:HH22 - A:TYR206:OH	3.01536	Ligação de Hidrogênio	Ligação Convencional de Hidrogênio
	A:THR179:CB - B:VAL10:O	3.14856	Ligação de Hidrogênio	Carbon Hydrogen Bond
	B:GLY1:CA - A:GLU170:OE2	3.31683	Ligação de Hidrogênio	Carbon Hydrogen Bond
	B:LYS6:HN - A:TRP202	2.97626	Ligação de Hidrogênio	Pi-Donor Hydrogen Bond

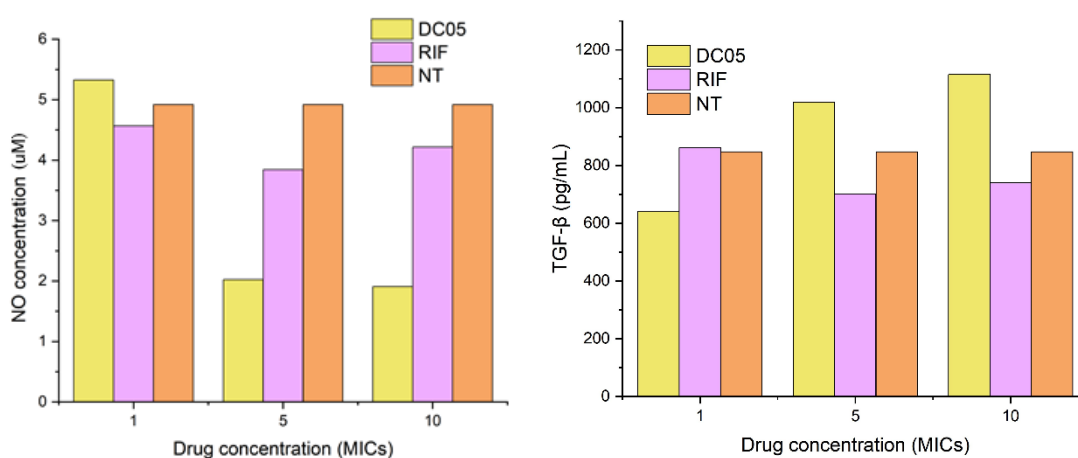
B:ALA5:CB - A:TRP202	3.99667	Hidrofóbico	Pi-Sigma
B:ALA5:CB - A:TRP202	3.88921	Hidrofóbico	Pi-Sigma
B:ARG13 - A:VAL174	4.57733	Hidrofóbico	Alquila
B:TYR3 - A:MET167	5.15635	Hidrofóbico	Pi-Alquila
B:PHE9 - A:ILE180	4.66277	Hidrofóbico	Pi-Alquila

Fonte: autor

4.12 Quantificação de citocinas

Os resultados indicam que o peptídeo DC05 possui a capacidade de diminuir a produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos de maneira dose-dependente. Em contraste, observa-se um efeito dose-dependente inverso na produção de TGF- β , que aumenta proporcionalmente com a dose de DC05 (**Figura 11**). Por comparação, tanto a rifampicina quanto o grupo não tratado não apresentam variações significativas nos níveis de NO e TGF- β que possam ser atribuídas às diferentes concentrações do fármaco.

Figura 11. Quantificação de NO e TGF- β produzidos por macrófagos infectados com MTB e tratados com DC05, rifampicina e não tratados.



Fonte: autor

O óxido nítrico é uma molécula efetora importante na resposta imune contra infecções bacterianas, incluindo MTB. É produzido por macrófagos e possui atividades antimicrobianas. No entanto, níveis excessivos de NO podem ser prejudiciais e contribuir para a patologia da doença. No

contexto da TB, um equilíbrio adequado de NO é crucial para controlar a infecção sem causar dano tecidual excessivo (López-García *et al.*, 2015).

O TGF- β é uma citocina que desempenha um papel na modulação da resposta imune e inflamação. Na TB, demonstrou-se que o TGF- β tem um efeito duplo: pode ajudar na contenção da infecção ao promover a formação de granulomas, mas também pode suprimir a resposta imune e favorecer a persistência da bactéria (Fatima, Kumari e Dwivedi, 2021).

O peptídeo DC05 parece ter um efeito imunomodulador sobre macrófagos infectados, induzindo a produção de NO e TGF- β a níveis que podem ser benéficos para conter a infecção sem provocar danos excessivos. Contudo, em concentrações maiores, o efeito do DC05 diminui, o que pode refletir uma saturação da resposta ou mecanismos de retroalimentação negativa (Park *et al.*, 2022). Para entender melhor a regulação imunitária induzida pelo DC05, é crítico analisar outras citocinas-chave como IL-10, IL-12 e TNF, que oferecerão uma visão mais detalhada do perfil imunológico resultante e da eficácia terapêutica do peptídeo.

4.13 DC05 não é mutagênico

Os resultados com relação ao potencial mutagênico estão apresentados na tabela 7 que mostra a média do número de revertentes/placa (M), o desvio padrão (DP) e o índice de mutagenicidade (IM) dos diferentes tratamentos com a amostra-teste DC05, nas linhagens de *S. Typhimurium*.

De acordo com os resultados obtidos, DC05 não provocou um aumento estatisticamente significativo no número de revertentes em relação ao controle negativo, em nenhuma das concentrações e cepas de *S. Typhimurium* analisadas, comprovando a ausência de atividade mutagênica nas condições experimentais utilizadas (**Tabela 7**). O IM manteve-se abaixo do limiar de 2 para todas as concentrações e linhagens, tanto na presença quanto na ausência de metabolização. Esse valor é geralmente aceito como critério indicativo de não mutagenicidade. Além disso, a ausência de uma tendência ascendente no número de revertentes com o aumento da concentração indica que não há relação dose-dependente na atividade mutagênica do peptídeo.

Tabela 7. Atividade mutagênica expressa pela média e desvio padrão do número de revertentes/placa e índice de mutagenicidade nas linhagens TA97a, TA98, TA100 e TA102 de *Salmonella Typhimurium* após o tratamento com diferentes concentrações da amostra-teste DC05, em experimentos sem (-S9) e com (+S9) ativação metabólica.

Número de revertentes (M±DP)/ placa e IM								
Tratamentos	TA97a		TA98		TA100		TA102	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
C-	136 ± 12	140 ± 26	27 ± 4	20 ± 6	91 ± 13	108 ± 19	296 ± 42	299 ± 41
C+	1439 ± 102a	1228 ± 140d	682 ± 75a	837 ± 53d	1109 ± 118b	1301 ± 120d	1042 ± 99c	1423 ± 81e
μM/ placa	DC05							
25	140 ± 11 (1,03)	164 ± 27 (1,17)	30 ± 6 (1,11)	22 ± 4 (1,08)	102 ± 18 (1,12)	112 ± 24 (1,04)	344 ± 26 (1,16)	368 ± 49 (1,23)
50	138 ± 18 (1,01)	150 ± 12 (1,07)	28 ± 5 (1,04)	22 ± 6 (1,10)	104 ± 11 (1,14)	120 ± 18 (1,11)	300 ± 18 (1,01)	350 ± 28 (1,17)
100	124 ± 22 (0,91)	122 ± 20 (0,87)	27 ± 1 (0,98)	21 ± 4 (1,05)	93 ± 24 (1,02)	114 ± 12 (1,06)	302 ± 31 (1,02)	316 ± 39 (1,06)
150	131 ± 10 (0,96)	112 ± 11 (0,80)	29 ± 2 (1,07)	20 ± 2 (0,98)	99 ± 8 (1,09)	110 ± 11 (1,02)	242 ± 25 (0,82)	292 ± 31 (0,98)
200	98 ± 8 (0,72)	102 ± 18 (0,73)	28 ± 6 (1,04)	21 ± 5 (1,03)	76 ± 13 (0,83)	82 ± 6 (0,76)	192 ± 30 (0,65)	220 ± 23 (0,74)

*p < 0,05 (ANOVA), M ± DP = média e desvio padrão; IM = índice de mutagenicidade; Controle negativo: dimetilsulfóxido (DMSO - 100 μL/placa); C+ = Controle positivo: a4-nitro-o-fenilenodiamina (TA98 e TA97a, 10,0 μg/placa); b azida de sódio (TA100, 1,25 μg/placa); c mitomicina (TA102, 0,5 μg/placa), na ausência de S9 e d2-antramina (TA98, TA100, TA97a, 1,25 μg/placa), e2-aminofluoreno (TA102, 10,0 μg/placa), na presença de S9. Fonte: autor

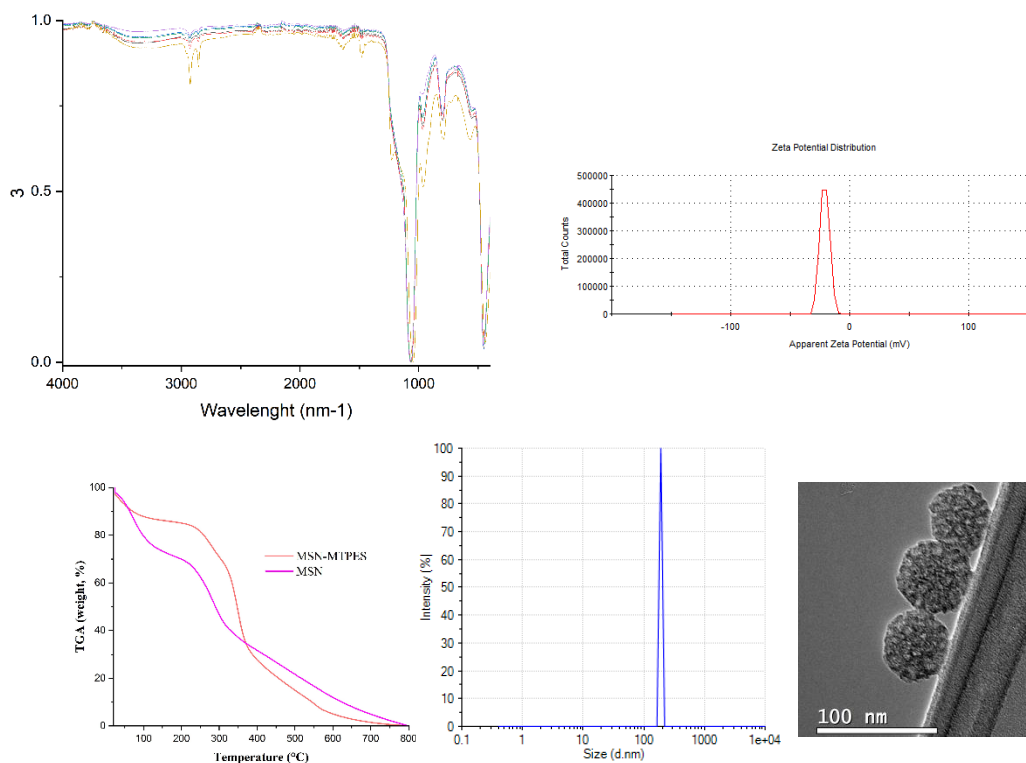
4.14 Síntese, funcionalização e caracterização de nanopartículas de sílica mesoporosas

As imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão revelam que as partículas possuem uma morfologia esférica com poros bem delimitados, apresentando um diâmetro médio próximo a 50 nm. Por outro lado, as análises de dispersão de luz dinâmica indicam que o tamanho hidrodinâmico das partículas é de aproximadamente 150 nm, complementado pela medição de um potencial Z negativo de -20 mV, o que sugere uma estabilidade coloidal adequada. As análises termogravimétricas das MSN puras e das MSN funcionalizadas com MTPES revelam que a estabilidade térmica das nanopartículas de sílica mesoporosa se mantém intacta após a funcionalização, uma vez que ambas começam sua decomposição em faixas de temperatura

comparáveis. Isso implica que a adição de grupos SH, fornecidos pelo MTPES, não altera significativamente a estrutura da sílica mesoporosa até determinadas temperaturas. Ademais, a variação observada na perda de peso entre as MSN puras e as MSN-MTPES pode ser explicada pela decomposição térmica dos grupos SH e outros componentes orgânicos associados ao MTPES.

As bandas características da estrutura de sílica observadas no FTIR em 465, 805 e 1095 cm^{-1} correspondem, respectivamente, às deformações $\delta(\text{Si—O—Si})$, às vibrações de estiramento simétricas $\nu_s(\text{Si—O—Si})$ e às vibrações de estiramento assimétricas $\nu_{\text{ass}}(\text{Si—O—Si})$. As bandas detectadas em 960 e 160 cm^{-1} foram atribuídas às vibrações de estiramento $\nu(\text{Si—OH})$ e às deformações $\delta(\text{OH})$, respectivamente. A presença de uma banda em torno de 3430 cm^{-1} foi associada às vibrações de estiramento $\nu(\text{OH})$ e à presença de moléculas de água (Maturi *et al.*, 2019) (**Figura 12**). Os resultados obtidos confirmam a incorporação de grupos silanol nas matrizes, assim como a eficácia dos processos de refluxo realizados para a remoção de surfactantes, evidenciando a ausência de material orgânico nos poros (Maturi *et al.*, 2019).

Figura 12. Caracterización de las MSN por FTIR, TGA, TEM, DLS y potencial Z



Fonte: autor

4.15 Quantificação de grupos tiol livres

Para confirmar a funcionalização de nanopartículas, utilizou-se o reagente de Ellman para quantificar os grupos tiol livres que podem ser usados na funcionalização do nosso CPP (**Tabela 8**).

Tabela 8. Quantificação dos grupos tiol do CPP e MSN-MTPES

Amostra	Tióis livres (ug/mL)
CPP	5,78
MSN-MTPES	0,93

Fonte: Autor

A quantidade elevada de grupos tiol livres no CPP, em comparação com o MSN-MTPES, indica uma maior disponibilidade de sítios de ancoragem para funcionalização, o que é essencial para o sucesso da conjugação de moléculas alvo. Para garantir uma funcionalização ótima, é preferível que o CPP esteja presente em excesso, assegurando assim que haja suficientes sítios reativos disponíveis para interagir com as MSN-MTPES (Simpson, 2008).

4.16 PPC é eficientemente funcionalizado na superfície do MSN-MTPES

Os resultados mostram que, após o processo de funcionalização, 217,82 µg/ml de tuftsina permaneceram no sobrenadante, sugerindo que 782,18 µg/ml do peptídeo se ligaram às nanopartículas, indicando uma eficiência de encapsulamento superior a 78% (**Tabela 9**). Pesquisas como as de Hu *et al.* (2016) demonstraram que a funcionalização de nanopartículas com peptídeos pode aprimorar a entrega direcionada de fármacos, permitindo um controle específico e sensível a estímulos na liberação do fármaco.

Tabela 9. Eficiência de funcionalização de tuftsina na superfície do MSN-MTPES.

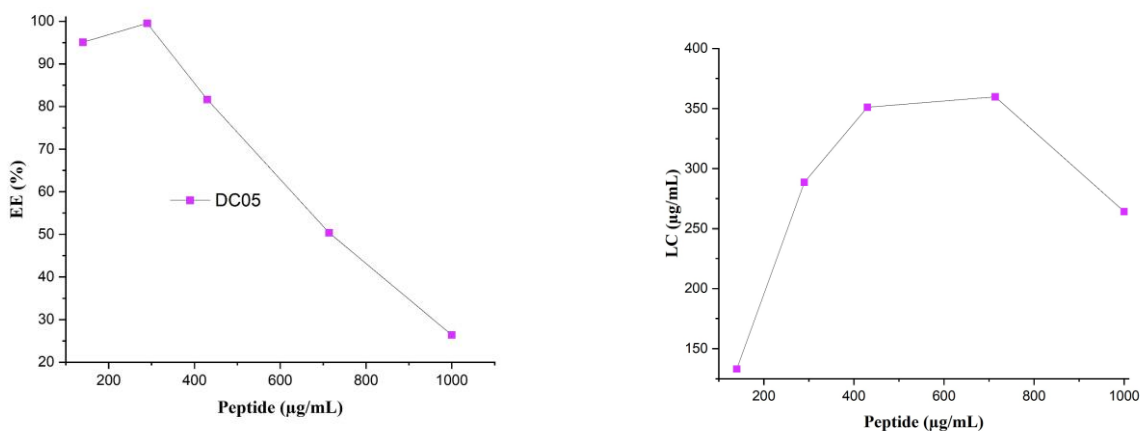
	CPP (µg/ml)	CPPr (µg/ml)	Efficiencie (%)
Antes	0	1000	-
Depois	782,18	217,82	78,22

Fonte: autor

4.17 Eficiência de encapsulamento e quantidade de carga

Observa-se uma tendência decrescente da eficiência de encapsulamento com o aumento da concentração do peptídeo. Isso sugere que a menores concentrações de peptídeo, as nanopartículas de sílica têm uma maior eficiência de encapsulamento, mas à medida que a concentração de peptídeo aumenta, o EE% diminui, o que poderia indicar uma saturação dos sítios de ligação disponíveis nas nanopartículas ou uma limitação na capacidade das nanopartículas para hospedar mais peptídeos. No segundo gráfico, a capacidade de carga mostra inicialmente um aumento com a concentração do peptídeo, alcançando um pico, após o qual a LC começa a diminuir (**Figura 13**). Isso poderia ser interpretado como que as nanopartículas podem carregar eficientemente mais peptídeos até certo ponto antes de que a eficiência comece a diminuir, possivelmente devido à aglomeração do peptídeo ou à desestabilização das nanopartículas com cargas excessivas.

Figura 13. Eficiência de encapsulamento e capacidade de carregamento de MSN-CPPs.



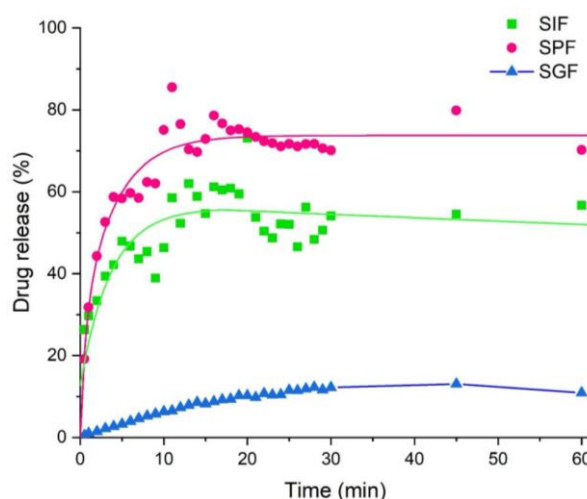
Fonte: autor

4.18 Liberação de DC05 em diferentes meios biológicos simulados

Os dados apresentados na **figura 14** mostram a liberação do peptídeo DC05 de nanopartículas de sílica mesoporosas em três meios simulados: intestinal (SIF), gástrico (SGF) e pulmonar (SPF). No SPF, há uma liberação rápida do peptídeo, superando o 70% aos 10 minutos. No SIF, a liberação é mais gradual, mas ainda atinge o 50% em 30 minutos. Em contraste, o SGF mostra uma liberação significativamente baixa, não ultrapassando 10% no mesmo período.

Os nanosistemas em estudo mostraram uma liberação *in vitro* simulada conforme ao pH e a concentração salina. Foi evidenciado que existe uma liberação acelerada e significativa em SPF, que se encontra baseado num pH 7.4 e com diversas concentrações salinas. Isto permite entender o comportamento da nanopartícula nas condições salinas e parcialmente no pH. O mesmo efeito é visualizado no SIF, onde o pH 7.4 permite a liberação do PAM mas apenas pela metade da concentração total encapsulada. Estes efeitos podem ser atribuídos à compatibilidade do meio de liberação *in vitro* com as propriedades do peptídeo e das nanopartículas (Tyagi, Pechenov e Anand Subramony, 2018). Por outra parte, a liberação em SGF foi significativamente menor, que pode ser atribuído à estabilidade do sistema nanoparticulado em condições ácidas, impedindo a liberação do peptídeo (Ding *et al.*, 2017).

Figura 14. Liberação de DC05 em meios biológicos simulado



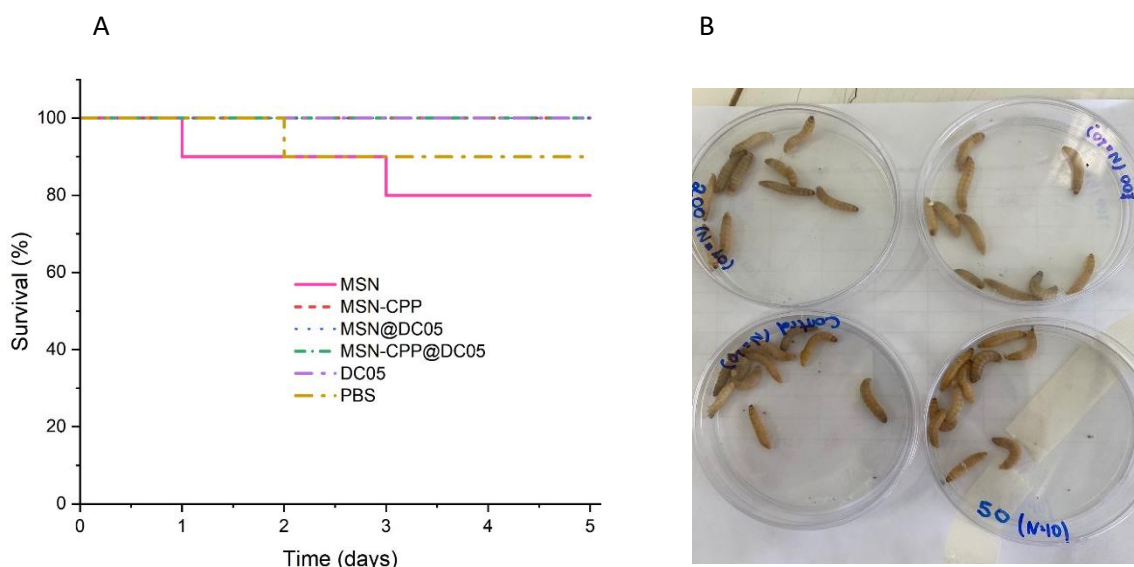
Fonte: autor

A liberação do princípio ativo em condições simuladas são estratégias consideradas prioritárias para o estudo da estabilidade e do controle de dosagem em novos fármacos (Dash *et al.*, 2010). Estudos anteriores demonstram que os PAMs são capazes de ser liberados controladamente (Roque-Borda *et al.*, 2023b), permitindo manter a atividade antimicrobiana (Primo *et al.*, 2024), serem mais estáveis, e não perder o efeito não hemolítico (Roque-Borda *et al.*, 2021). Os PAMs tendem a ser degradados em pH ácido pelo qual este sistema nanopartículas permite a proteção do DC05 e outras substâncias bioativas. Existem poucos reportes de PAMs encapsulados em nanopartículas de sílica contra Mtb e estes estudos podem contribuir a melhorar a administração de PAMs controladamente.

4.19 DC05 não causa toxicidade em *Galleria mellonella*

Galleria mellonella é um modelo animal de infecção alternativo que permite avaliar o potencial antibacteriano de diversos agentes anti-Mtb (Dinh *et al.*, 2021). De acordo com Asai *et al.* (2022), estes insetos possuem um sistema imune complexo composta de células fagocíticas conhecidas como hemocitos e que são funcionalmente similares aos macrófagos humanos. Nesta primeira parte, foi realizado o tratamento das larvas com os PAMs para avaliar sua toxicidade. Após cinco dias da adição do peptídeo, não se notaram diferenças significativas na sobrevivência das larvas submetidas às diversas doses de DC05 (**Figura 15**). A mobilidade das larvas se preservou estável até o último dia do estudo, assim como a produção de seda. Ademais, não se observou melanização nas larvas, sugerindo que o tratamento não provocou estresse nem ativou respostas imunológicas evidentes.

Figura 15. **A)** Sobrevivência das larvas após 5 dias de tratamento com DC05; **B)** Foto tirada após cinco dias desde a aplicação do PAM.



Fonte: autor

Os dados sugerem que o peptídeo DC05 é bem tolerado pelas larvas nas concentrações testadas. A ausência de mortalidade aumentada em concentrações mais altas poderiam ser interpretadas como um indicativo de baixa toxicidade do peptídeo, o que é uma característica desejável para potenciais aplicações terapêuticas. No entanto, é importante notar que estes resultados precisam ser

corroborados por estudos adicionais, incluindo análises de longo prazo e avaliações de toxicidade em organismos mais complexos.

5 CONCLUSÃO

Em pesquisa, exploramos o potencial do peptídeo DC05, focando em sua viabilidade terapêutica contra a TB e sua aplicabilidade em sistemas avançados de entrega de fármacos utilizando MSN. Através dos estudos, revelamos que o DC05 não apenas possui uma notável capacidade imunomoduladora, mas também apresenta um perfil de segurança excepcionalmente alto, caracterizado pela ausência de toxicidade hemolítica e atividade mutagênica. A eficácia na funcionalização e encapsulamento do DC05 em MSN sublinha seu potencial como um inovador sistema de entrega de fármacos. A alta eficiência de funcionalização, superior a 78%, sugere que as MSN são veículos promissores para a administração específica e controlada do DC05, embora tenha sido observada uma diminuição na eficiência de encapsulamento do DC05 com o aumento da concentração do peptídeo, indicando a necessidade de otimização. A liberação controlada do DC05 em meios biológicos simulados demonstrou uma liberação acelerada em um ambiente simulado pulmonar, o que é particularmente relevante para o tratamento da TB, indicando a capacidade do sistema de liberar eficazmente o peptídeo no ambiente pulmonar. A segurança do DC05 foi confirmada pelo uso de *Galleria mellonella* como modelo de infecção, demonstrando a ausência de toxicidade significativa e a ativação de respostas imunológicas adversas. Paralelamente, este estudo demonstrou a eficácia dos análogos de plectasin, especialmente do peptídeo DC05, como agentes antimicrobianos contra Mtb e outras bactérias patogênicas, incluindo P.A e S.T. A atividade antimicrobiana do DC05 contra Mtb, com uma CIM de 12 μM , e seu potencial significativo contra bactérias gram-negativas e micobactérias, destaca sua aplicabilidade como um agente antimicrobiano versátil. A biocompatibilidade favorável em diversas linhas celulares sugere uma alta viabilidade celular até concentrações de 1000 $\mu\text{M}/\text{ml}$, reforçando seu potencial para uso terapêutico sem causar danos celulares significativos. Uma descoberta crucial foi a capacidade dos peptídeos de inibir as bombas de efluxo em Mtb, um mecanismo chave de resistência antimicrobiana, indicando sua utilidade potencial como adjuvantes para aumentar a eficácia dos antibióticos tradicionais. A estabilidade variável dos peptídeos em diferentes modelos biológicos *in silico* destaca a necessidade de otimização de sequências para melhorar sua meia-vida, essencial para o desenvolvimento de terapias antimicrobianas eficazes. A combinação de

atividade antimicrobiana, biocompatibilidade, imunomodulação, segurança e eficácia em sistemas de entrega destaca o DC05 como um candidato excepcionalmente promissor para o desenvolvimento clínico no tratamento de doenças infecciosas, incluindo a TB. A sinergia entre a inovação em sistemas de entrega de fármacos e a descoberta de novos agentes terapêuticos, como demonstrado neste estudo, é fundamental para superar os desafios atuais no tratamento de doenças infecciosas e resistência aos antibióticos.

6 PERSPECTIVAS

A pesquisa e desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, como os PAMs derivados da Plectasina, destacam-se como abordagens promissoras no combate à resistência antimicrobiana, um dos principais desafios da saúde pública atual. Em particular, o peptídeo DC05 se sobressaiu neste estudo por sua notável eficácia contra Mtb e por apresentar um amplo espectro de atividade antimicrobiana, além de exibir um perfil de biocompatibilidade favorável. Estas descobertas abrem diversas perspectivas para futuras pesquisas e a aplicação clínica dos PAMs, indicando caminhos para a otimização de sequências, aprofundamento nos mecanismos de ação e exploração de suas potencialidades como adjuvantes em terapias combinadas.

A otimização das sequências dos peptídeos, dada a variabilidade observada em sua estabilidade em diferentes modelos biológicos, sugere a necessidade de refinamento para melhorar a atividade contra Mtb e outros patógenos. Tal ajuste não apenas potencializaria a eficácia terapêutica dos PAMs mas também contribuiria para a superação das barreiras de resistência antimicrobiana.

Aprofundar o entendimento sobre os mecanismos de ação dos PAMs, especialmente no que diz respeito à sua capacidade de inibir as bombas de efluxo em bactérias, poderia revelar estratégias inovadoras para potencializar o efeito de antibióticos já existentes. Isso se alinha à busca por alternativas que possam aumentar a concentração intracelular de antibióticos, especialmente em patógenos resistentes a múltiplas drogas.

Além disso, a potencial utilização dos PAMs, particularmente o DC05, como adjuvantes em terapias combinadas, abre perspectivas para a melhoria da eficácia dos regimes de tratamento antimicrobianos atuais. Essa abordagem poderia não apenas combater infecções resistentes, mas também reduzir o risco de desenvolvimento de novas resistências, ao interferir na capacidade das bactérias de expulsar os fármacos antimicrobianos das células.

Portanto, a contínua investigação e desenvolvimento de PAMs, com foco na otimização de sequências, compreensão dos mecanismos de ação e aplicação como adjuvantes, representam etapas cruciais para o avanço no tratamento de doenças infecciosas, particularmente aquelas causadas por patógenos resistentes. O peptídeo DC05 emerge como um candidato promissor nesse cenário, evidenciando a importância de seguir explorando o potencial dos PAMs na medicina contemporânea.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, H. *et al.* Biomedical applications of mesoporous silica nanoparticles as a drug delivery carrier. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 76, p. 103729, out. 2022.
- ALLEGRA, E. *et al.* *Galleria mellonella* larvae allow the discrimination of toxic and non-toxic chemicals. **Chemosphere**, v. 198, p. 469–472, maio 2018.
- ALMATAR, M. *et al.* Antimicrobial peptides as an alternative to anti-tuberculosis drugs. **Pharmacological Research**, v. 128, p. 288–305, 1 fev. 2018.
- ASAI, M. *et al.* *Galleria mellonella* as an infection model for the virulent *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. **Virulence**, v. 13, n. 1, p. 1543–1557, 31 dez. 2022.
- AVALOS, E. *et al.* Frequency and Geographic Distribution of gyrA and gyrB Mutations Associated with Fluoroquinolone Resistance in Clinical Mycobacterium Tuberculosis Isolates: A Systematic Review. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0120470, 27 mar. 2015.
- BAKSHIAN NIK, A. *et al.* Smart drug delivery: Capping strategies for mesoporous silica nanoparticles. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 299, p. 110115, jun. 2020.
- BERNSTEIN, L. *et al.* An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the Salmonella test. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 97, n. 4, p. 267–281, ago. 1982.
- BORBÁLA HORVÁTH, L. *et al.* Host cell targeting of novel antimycobacterial 4-aminosalicylic acid derivatives with tuftsin carrier peptides. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 174, p. 111–130, maio 2022.
- BRAUN, K. *et al.* Membrane interactions of mesoporous silica nanoparticles as carriers of antimicrobial peptides. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 475, p. 161–170, ago. 2016.
- BUCCINI, D. F.; CARDOSO, M. H.; FRANCO, O. L. Antimicrobial Peptides and Cell-Penetrating Peptides for Treating Intracellular Bacterial Infections. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, 5 fev. 2021.
- CAMINERO LUNA, J. A. Actualización en el diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis pulmonar. **Revista Clínica Española**, v. 216, n. 2, p. 76–84, mar. 2016.
- CANALES, C. S. C. *et al.* In silico drug design strategies for discovering novel tuberculosis therapeutics. **Expert Opinion on Drug Discovery**, p. 1–21, 19 fev. 2024.
- CASTRO, M. S. *et al.* Hylin a1, the first cytolytic peptide isolated from the arboreal South American frog *Hypsiboas albopunctatus* (“spotted treefrog”). **Peptides**, v. 30, n. 2, p. 291–296, fev. 2009.
- CHANCE, K. *et al.* Physical behavior of KR-12 peptide on solid surfaces and Langmuir-Blodgett lipid films: Complementary approaches to its antimicrobial mode against *S. aureus*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1864, n. 1, p. 183779, 1 fev. 2022.
- CUTRONA, K. J. *et al.* Role of arginine and lysine in the antimicrobial mechanism of histone-derived antimicrobial peptides. **FEBS Letters**, v. 589, n. 24PartB, p. 3915–3920, 21 dez. 2015.

DASH, S. *et al.* Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. **Acta Poloniae Pharmaceutica ñ Drug Research**, v. 67, n. 3, p. 217–223, 2010.

DING, Y. *et al.* In vivo study of doxorubicin-loaded cell-penetrating peptide-modified pH-sensitive liposomes: biocompatibility, bio-distribution, and pharmacodynamics in BALB/c nude mice bearing human breast tumors. **Drug Design, Development and Therapy**, v. Volume 11, p. 3105–3117, out. 2017.

DINH, H. *et al.* Microbiology's next top model: Galleria in the molecular age. **Pathogens and Disease**, 21 jan. 2021.

ERDEMLI, S. B. *et al.* Targeting the Cell Wall of Mycobacterium tuberculosis: Structure and Mechanism of L,D-Transpeptidase 2. **Structure**, v. 20, n. 12, p. 2103–2115, dez. 2012.

ERNST, J. D.; CORNELIUS, A.; BOLZ, M. Dynamics of Mycobacterium tuberculosis Ag85B Revealed by a Sensitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **mBio**, v. 10, n. 2, 30 abr. 2019.

FATIMA, S.; KUMARI, A.; DWIVEDI, V. P. Advances in adjunct therapy against tuberculosis: Deciphering the emerging role of phytochemicals. **MedComm**, v. 2, n. 4, p. 494–513, 5 dez. 2021.

GALDOPÓRPORA, J. M. *et al.* Inhalable Mannosylated Rifampicin–Curcumin Co-Loaded Nanomicelles with Enhanced In Vitro Antimicrobial Efficacy for an Optimized Pulmonary Tuberculosis Therapy. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 5, p. 959, 28 abr. 2022.

GARCÍA-FERNÁNDEZ, A.; SANCENÓN, F.; MARTÍNEZ-MÁÑEZ, R. Mesoporous silica nanoparticles for pulmonary drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 177, p. 113953, out. 2021.

GASTEIGER, E. *et al.* Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *Em: The Proteomics Protocols Handbook*. Totowa, NJ: Humana Press, 2005. p. 571–607.

GAUTAM, V. *et al.* Artificial intelligence and machine-learning approaches in structure and ligand-based discovery of drugs affecting central nervous system. **Molecular Diversity**, v. 27, n. 2, p. 959–985, 11 abr. 2023.

GERA, S.; KANKURI, E.; KOGERMANN, K. Antimicrobial peptides – Unleashing their therapeutic potential using nanotechnology. **Pharmacology & Therapeutics**, p. 107990, 28 set. 2021.

GERN, B. H. *et al.* TGFβ restricts expansion, survival, and function of T cells within the tuberculous granuloma. **Cell Host & Microbe**, v. 29, n. 4, p. 594– 606.e6, abr. 2021.

GISBERT-GARZARÁN, M.; LOZANO, D.; VALLET-REGÍ, M. Mesoporous Silica Nanoparticles for Targeting Subcellular Organelles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 24, p. 9696, 18 dez. 2020.

GOMES, A. S. *et al.* Folic acid-mesoporous silicon nanoparticles enhance the anticancer activity of the p73-activating small molecule LEM2. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 624, p. 121959, ago. 2022.

GOUNANI, Z. *et al.* Mesoporous silica nanoparticles carrying multiple antibiotics provide enhanced synergistic effect and improved biocompatibility. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 175, p. 498–508, mar. 2019.

GRIESS, P. Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt „Ueber einige Azoverbindungen“. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 12, n. 1, p. 426–428, 28 jan. 1879.

HALICKI, P. C. B. *et al.* Intramacrophage potential of a tetrahydropyridine: A promising compound in combating *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, v. 136, p. 102252, set. 2022.

HAN, R.; WANG, S. Mechanisms of antimicrobial peptides as characterized by solid-state NMR. **Magnetic Resonance Letters**, 12 out. 2021.

HAN, Y. *et al.* Chemical modifications to increase the therapeutic potential of antimicrobial peptides. **Peptides**, v. 146, p. 170666, 1 dez. 2021.

HANEY, E. F.; STRAUS, S. K.; HANCOCK, R. E. W. Reassessing the Host Defense Peptide Landscape. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, 4 fev. 2019.

HAROUNA HAMIDOU, Z.; MAMADOU, S.; SAAD, J. Molecular detection of *Mycobacterium tuberculosis sensu stricto* in the soil of Niger. **New Microbes and New Infections**, v. 44, p. 100939, 1 nov. 2021.

HEGETO, L. A. *et al.* In vitro combinatory activity of piperine and anti-tuberculosis drugs in *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, v. 111, p. 35–40, jul. 2018.

HONORATO, R. V. *et al.* Structural Biology in the Clouds: The WeNMR-EOSC Ecosystem. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 8, 28 jul. 2021.

HU, J.; XIAO, D.; ZHANG, X. Advances in Peptide Functionalization on Mesoporous Silica Nanoparticles for Controlled Drug Release. **Small**, v. 12, n. 25, p. 3344–3359, 6 jul. 2016.

HUANG, Y. T. *et al.* Efficacy of antimicrobial peptides (AMPs) against *Escherichia coli* and bacteria morphology change after AMP exposure. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 126, p. 307–312, 1 set. 2021.

IMAN, M.; DAVOOD, A. Homology modeling of lanosterol 14 α -demethylase of *Candida albicans* and insights into azole binding. **Medicinal Chemistry Research**, v. 23, n. 6, p. 2890–2899, 23 jun. 2014.

JEAN, K. D. SAINT *et al.* Effects of Hydrophobic Amino Acid Substitutions on Antimicrobial Peptide Behavior. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 10, n. 3, p. 408–419, 4 set. 2018.

JIA, L. *et al.* Successfully tailoring the pore size of mesoporous silica nanoparticles: Exploitation of delivery systems for poorly water-soluble drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 439, n. 1–2, p. 81–91, dez. 2012.

KHAN, M. M.; FILIPCZAK, N.; TORCHILIN, V. P. Cell penetrating peptides: A versatile vector for co-delivery of drug and genes in cancer. **Journal of Controlled Release**, v. 330, p. 1220–1228, 10 fev. 2021.

KWOK, P. C. L. *et al.* Inhalable spray-dried formulation of D-LAK antimicrobial peptides targeting tuberculosis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 491, n. 1–2, p. 367–374, ago. 2015.

LERNER, T. R.; BOREL, S.; GUTIERREZ, M. G. The innate immune response in human tuberculosis. **Cellular Microbiology**, v. 17, n. 9, p. 1277–1285, set. 2015.

- LI, JIALIANG *et al.* Porous Silicon Nanocarriers Boost the Immunomodulation of Mitochondria-Targeted Bovine Serum Albumins on Macrophage Polarization. **ACS Nano**, v. 17, n. 2, p. 1036–1053, 24 jan. 2023.
- LÓPEZ-GARCÍA, S. *et al.* Macrophage Activation by Ursolic and Oleanolic Acids during Mycobacterial Infection. **Molecules**, v. 20, n. 8, p. 14348–14364, 6 ago. 2015.
- MAMSA, S. S. A.; MELONI, B. P. Arginine and Arginine-Rich Peptides as Modulators of Protein Aggregation and Cytotoxicity Associated With Alzheimer's Disease. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 14, 28 out. 2021.
- MANAVALAN, B. *et al.* AtbPred: A Robust Sequence-Based Prediction of Anti-Tubercular Peptides Using Extremely Randomized Trees. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 17, p. 972–981, 2019.
- MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 113, n. 3–4, p. 173–215, mar. 1983.
- MATURI, F. *et al.* Luminescent Mesoporous Silica Nanohybrid Based on Drug Derivative Terbium Complex. **Materials**, v. 12, n. 6, p. 933, 21 mar. 2019.
- MAULINE, L. *et al.* Bifunctional silica nanoparticles for the exploration of biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. **Biofouling**, v. 29, n. 7, p. 775–788, ago. 2013.
- MIGUEL SÁBIO, R. *et al.* Advanced porous materials for antimicrobial treatment. **Nano Select**, 31 out. 2023.
- MOHAMED ISA, E. D. *et al.* Progress in Mesoporous Silica Nanoparticles as Drug Delivery Agents for Cancer Treatment. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 2, p. 152, 24 jan. 2021.
- MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1–2, p. 29–60, nov. 2000.
- NANDIYANTO, A. B. D. *et al.* Synthesis of spherical mesoporous silica nanoparticles with nanometer-size controllable pores and outer diameters. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 120, n. 3, p. 447–453, abr. 2009.
- NGUYEN, L. T.; HANEY, E. F.; VOGEL, H. J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 9, p. 464–472, set. 2011.
- NIÑO-CASTAÑO, V. E. *et al.* RIP2 Contributes to Expanded CD4⁺ T Cell IFN- γ Production during Efferocytosis of *Streptococcus pneumoniae* –Infected Apoptotic Cells. **ImmunoHorizons**, v. 6, n. 7, p. 559–568, 1 jul. 2022.
- NISHINO, K. *et al.* Function and Inhibitory Mechanisms of Multidrug Efflux Pumps. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 3 dez. 2021.
- OBA, M. *et al.* Secondary structures and cell-penetrating abilities of arginine-rich peptide foldamers. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1349, 4 fev. 2019.

PALOMINO, J.-C. *et al.* Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720–2722, ago. 2002.

PARK, H.-E. *et al.* Modulating macrophage function to reinforce host innate resistance against *Mycobacterium avium* complex infection. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 24 nov. 2022.

PAVAN, F. R. *et al.* Thiosemicarbazones, semicarbazones, dithiocarbazates and hydrazide/hydrazones: Anti – *Mycobacterium tuberculosis* activity and cytotoxicity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 5, p. 1898–1905, maio 2010.

PAWAR, S. S.; ROHANE, S. H. Review on Discovery Studio: An important Tool for Molecular Docking. **Asian Journal Of Research in Chemistry**, v. 14, n. 1, p. 1–3, 2021.

PETRELLA, S. *et al.* Overall Structures of *Mycobacterium tuberculosis* DNA Gyrase Reveal the Role of a *Corynebacteriales* GyrB-Specific Insert in ATPase Activity. **Structure**, v. 27, n. 4, p. 579- 589.e5, abr. 2019.

PIRES, D. E. V.; BLUNDELL, T. L.; ASCHER, D. B. pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 9, p. 4066–4072, 14 maio 2015.

PRIMO, L. M. D. G. *et al.* Antimicrobial peptides grafted onto the surface of N-acetylcysteine-chitosan nanoparticles can revitalize drugs against clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Carbohydrate Polymers**, p. 121449, out. 2023.

____. Antimicrobial peptides grafted onto the surface of N-acetylcysteine-chitosan nanoparticles can revitalize drugs against clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 323, p. 121449, jan. 2024.

PRIYADARSHINI, D. *et al.* Characterisation of cell membrane interaction mechanisms of antimicrobial peptides by electrical bilayer recording. **Biophysical Chemistry**, v. 281, p. 106721, 1 fev. 2022.

PURCELL, D.; PACKER, M. A.; HAYES, M. Identification of Bioactive Peptides from a *Laminaria digitata* Protein Hydrolysate Using In Silico and In Vitro Methods to Identify Angiotensin-1-Converting Enzyme (ACE-1) Inhibitory Peptides. **Marine Drugs**, v. 21, n. 2, p. 90, 27 jan. 2023.

QUAN, G. *et al.* Lactosaminated mesoporous silica nanoparticles for asialoglycoprotein receptor targeted anticancer drug delivery. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 13, n. 1, p. 7, 3 dez. 2015.

RAJPOOT, S. *et al.* In-Silico Design of a Novel Tridecapeptide Targeting Spike Protein of SARS-CoV-2 Variants of Concern. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 28, n. 1, p. 28, 13 jan. 2022.

RAO MUVVA, J. *et al.* Immunomodulatory Agents Combat Multidrug-Resistant Tuberculosis by Improving Antimicrobial Immunity. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 224, n. 2, p. 332–344, 15 jul. 2021.

ROQUE-BORDA, C. A. *et al.* Alginate-based microparticles coated with HPMCP/AS cellulose-derivatives enable the Ctx(Ile21)-Ha antimicrobial peptide application as a feed additive. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 183, p. 1236–1247, jul. 2021.

____. Conjugation of Ctx(Ile²¹)-Ha Antimicrobial Peptides to Chitosan Ultrathin Films by *N*-Acetylcysteine Improves Peptide Physicochemical Properties and Enhances Biological Activity. **ACS Omega**, v. 7, n. 32, p. 28238–28247, 16 ago. 2022.

____. Chitosan and HPMCAS double-coating as protective systems for alginate microparticles loaded with Ctx(Ile21)-Ha antimicrobial peptide to prevent intestinal infections. **Biomaterials**, v. 293, p. 121978, fev. 2023a.

____. Chitosan and HPMCAS double-coating as protective systems for alginate microparticles loaded with Ctx(Ile21)-Ha antimicrobial peptide to prevent intestinal infections. **Biomaterials**, v. 293, n. March 2022, p. 121978, fev. 2023b.

SANKINENI, S. *et al.* Global Health and Tuberculosis; Past, Present, and Future. *Em: Tubercular Drug Delivery Systems*. Cham: Springer International Publishing, 2023. p. 1–13.

SERRANO, D. R. *et al.* Hemolytic and pharmacokinetic studies of liposomal and particulate amphotericin B formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 447, n. 1–2, p. 38–46, abr. 2013.

SHAKER, B. *et al.* In silico methods and tools for drug discovery. **Computers in Biology and Medicine**, v. 137, p. 104851, out. 2021.

SHI, J. *et al.* Role of IL-10 and TNF- α during Mycobacterium tuberculosis infection in murine alveolar macrophages. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 3, 2016.

SILVA-CARVALHO, A. É. *et al.* Dissecting the relationship between antimicrobial peptides and mesenchymal stem cells. **Pharmacology & Therapeutics**, p. 108021, 9 out. 2021.

SILVEIRA, R. F.; ROQUE-BORDA, C. A.; VICENTE, E. F. Antimicrobial peptides as a feed additive alternative to animal production, food safety and public health implications: An overview. **Animal Nutrition**, v. 7, n. 3, p. 896–904, 1 set. 2021.

SIMPSON, R. J. Estimation of Free Thiols and Disulfide Bonds Using Ellman's Reagent. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2008, n. 9, p. pdb.prot4699, set. 2008.

STEPHEN, S. *et al.* Exploring the role of mesoporous silica nanoparticle in the development of novel drug delivery systems. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 12, n. 1, p. 105–123, 18 jan. 2022.

TAN, P.; FU, H.; MA, X. Design, optimization, and nanotechnology of antimicrobial peptides: From exploration to applications. **Nano Today**, v. 39, p. 101229, 1 ago. 2021.

TENLAND, E. *et al.* A novel derivative of the fungal antimicrobial peptide plectasin is active against Mycobacterium tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 113, p. 231–238, dez. 2018.

____. Effective delivery of the anti-mycobacterial peptide NZX in mesoporous silica nanoparticles. **PLOS ONE**, v. 14, n. 2, p. e0212858, 26 fev. 2019.

TURZO, S. B. A.; HANTZ, E. R.; LINDERT, S. Applications of machine learning in computer-aided drug discovery. **QRB Discovery**, v. 3, p. e14, 1 set. 2022.

TYAGI, P.; PECHENOV, S.; ANAND SUBRAMONY, J. Oral peptide delivery: Translational challenges due to physiological effects. **Journal of Controlled Release**, v. 287, p. 167–176, 10 out. 2018.

UM, J. *et al.* Enriching antimicrobial peptides from milk hydrolysates using pectin/alginate food-gels. **Food Chemistry**, v. 352, p. 129220, 1 ago. 2021.

WAGNER, J. T. *et al.* Peptide Controlled Assembly of Palladium Nanoparticles on High-Aspect-Ratio Gold Nanorods. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 124, n. 50, p. 27743–27753, 17 dez. 2020.

WANG, Y. *et al.* Cetuximab-modified mesoporous silica nano-medicine specifically targets EGFR-mutant lung cancer and overcomes drug resistance. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 25468, 6 maio 2016.

WANG, Y. *et al.* Advances in the development of antimicrobial peptides and proteins for inhaled therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 180, p. 114066, jan. 2022.

WEBB, B.; SALI, A. Protein Structure Modeling with MODELLER. *Em*: [s.l: s.n.]. p. 239–255.

WILLIAMS, H. D. *et al.* Strategies to Address Low Drug Solubility in Discovery and Development. **Pharmacological Reviews**, v. 65, n. 1, p. 315–499, 3 jan. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis report 2023**. Geneva: [s.n.]. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/9789240083851>>. Acesso em: 6 nov. 2023.

YE, X. *et al.* Characterization of the Hemolytic Activity of Mastoparan Family Peptides from Wasp Venoms. **Toxins**, v. 15, n. 10, p. 591, 28 set. 2023.

YONG, T. *et al.* Tumor exosome-based nanoparticles are efficient drug carriers for chemotherapy. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 3838, 23 ago. 2019.

YU, D.; WANG, L.; WANG, Y. Recent Advances in Application of Computer-Aided Drug Design in Anti-Influenza A Virus Drug Discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 9, p. 4738, 25 abr. 2022.

ZHANG, NA *et al.* Development of novel synthetic method of natural antimicrobial peptide TP4. **Tetrahedron Letters**, v. 79, p. 153299, 31 ago. 2021.

ZUNDERT, G. C. P. VAN *et al.* The HADDOCK2.2 Web Server: User-Friendly Integrative Modeling of Biomolecular Complexes. **Journal of Molecular Biology**, v. 428, n. 4, p. 720–725, fev. 2016.