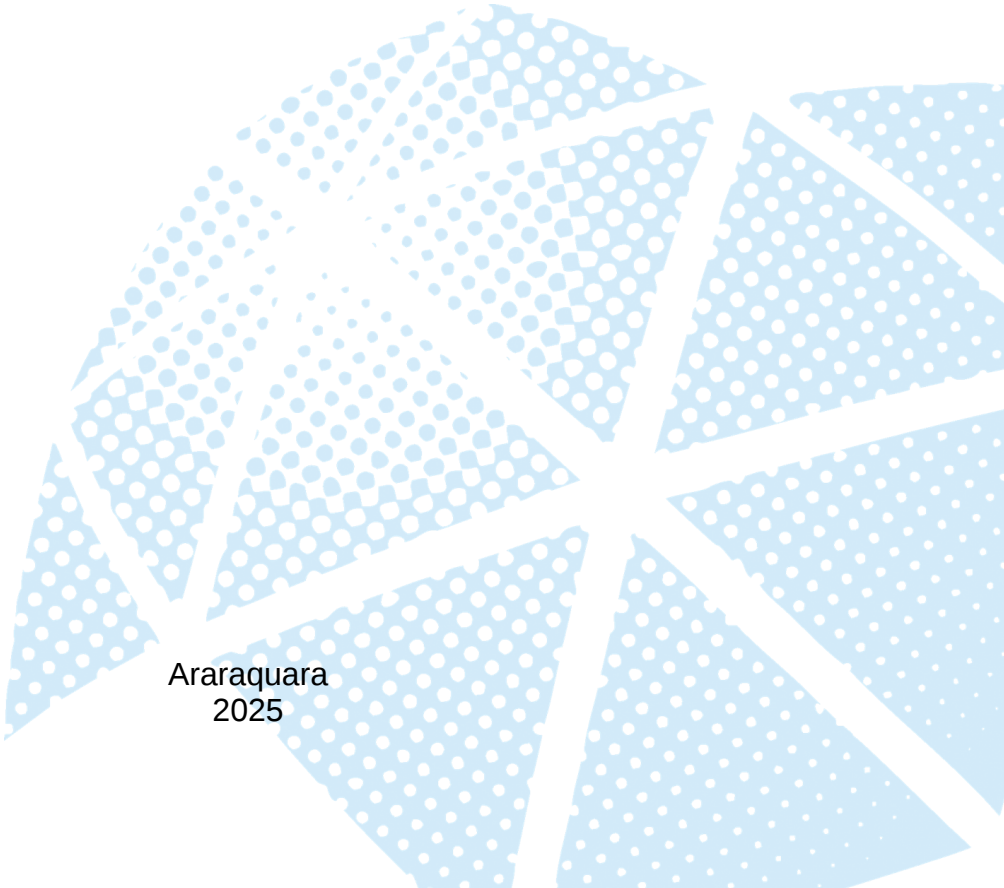


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

NATALIA DE GODOY

**ESTUDO DA TOXICIDADE DO BIOCONJUGADO AG-FALALKALKKALKKL-
COOH EM MODELO MURINO**



Araraquara
2025

NATALIA DE GODOY

**ESTUDO DA TOXICIDADE DO BIOCONJUGADO AG-FALALKALKKKL-
COOH EM MODELO MURINO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Estadual
Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências
Farmacêuticas, Araraquara, para
obtenção do título de Bacharela em
Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Ricardo da
Silva Sanches

Coorientadora: Dra. Marília Mazzi Moraes

Araraquara
2025

G589e

Godoy, Natalia de.

Estudo da toxicidade do bioconjugado AG-FALALKALKKALKKL-COOH em modelo murino / Natalia de Godoy. – Araraquara, 2025. 45 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação – Farmácia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Paulo Ricardo da Silva Sanches.

Coorientadora: Marília Mazzi Moraes.

1. Bioconjugado. 2. Toxicidade. 3. Modelo murino. 4. Peptídeo. 5. Arbovírus. I. Sanches, Paulo Ricardo da Silva, orient. II. Moraes, Marília Mazzi, coorient. III. Título.

NATALIA DE GODOY

ESTUDO DA TOXICIDADE DO BIOCONJUGADO AG-FALALKALKKALKKL-COOH EM MODELO MURINO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, para obtenção do título de Bacharela em Farmácia.

Data da defesa: 05/08/2025

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Paulo Ricardo da Silva Sanches
UNESP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli
UNESP - Instituto de Química – Campus de Araraquara

Profa. Dra. Taís Maria Bauab
UNESP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

Dedico este trabalho à pequena Natalia
que sonhava em ser cientista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela força e pela oportunidade de chegar até aqui.

Aos meus pais, Andréia Zulzke e Osmair Aparecido de Godoy, pelo amor, apoio incondicional, incentivo e compreensão durante toda esta jornada acadêmica, e à minha irmã, Rafaela de Godoy, pelo companheirismo e por ter sido inspiração para meu interesse pelas ciências biológicas.

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Ricardo da Silva Sanches, pelos ensinamentos, paciência e confiança ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

À minha coorientadora Dra. Marília Mazzi Moraes, pelo apoio, instruções e amizade.

À banca examinadora, pela atenção dedicada, pelas contribuições e disponibilidade para a avaliação deste trabalho.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Virologia Molecular (LVMol), pelas trocas de experiências e momentos vividos, em especial ao Caio Gonçalves do Amaral, Bruna de Oliveira Silva e Isaac Kirk Palomo de Oliveira.

Às amigas que construí durante o curso, pelo apoio emocional, pela torcida e participação nos inúmeros projetos e por dividirem comigo vivências, aprendizados e aventuras da vida longe de casa.

Aos professores e toda a comunidade da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, que de uma forma ou de outra contribuíram para minha graduação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de pesquisa (processo 118439/2025-1).

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade subcrônica do bioconjugado AG-FALALKALKKALKKL-COOH (AG-metabólito 5) em modelo murino, visando contribuir para o desenvolvimento de terapias antivirais. A pesquisa fundamentou-se em estudos prévios que demonstraram a eficácia *in vitro* do composto e ensaios de toxicidade *in vivo*, que evidenciaram a necessidade de aprofundamento das análises para caracterização de possíveis efeitos adversos. Para tanto, foram realizados ensaios em modelo murino, com camundongos *Swiss*. O experimento foi conduzido utilizando concentração de composto a 10 mg/kg via administração intraperitoneal de dose única determinada com base nos ensaios anteriores. Os animais foram monitorados por noventa dias para avaliação de sinais clínicos, acompanhamento de peso, análises bioquímicas de soro e histopatológicas de órgãos como baço, fígado e rins. Os resultados preliminares indicaram a presença de sinais transitórios de dor logo após a administração, com retorno rápido ao comportamento normal, além de aumento de gordura visceral em relação ao grupo controle. Os parâmetros bioquímicos analisados incluíram marcadores de função hepática (ALT, AST), renal (Creatinina), perfil lipídico (Colesterol) e proteínas séricas (Albumina e Proteínas Totais). A análise histopatológica dos órgãos coletados identificou alterações compatíveis com toxicidade leve a moderada, predominantes no fígado e rins, porém sem sinais inflamatórios ou degenerativos severos. Este estudo reforça a importância da investigação toxicológica em modelos animais como etapa essencial nos estudos pré-clínicos de novos candidatos a fármacos, especialmente para doenças negligenciadas como as causadas por arbovírus. Assim, os resultados obtidos poderão subsidiar futuras pesquisas para aprimorar a segurança e a viabilidade terapêutica do AG-metabólito 5.

Palavras-chave: bioconjugado; toxicidade; modelo murino; peptídeo; arbovírus.

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the subchronic toxicity of the bioconjugate AG-FALALKALKKALKKL-COOH (AG-metabolite 5) in a murine model, with the goal of contributing to the development of antiviral therapies. The research was based on previous studies that demonstrated the compound's *in vitro* efficacy and *in vivo* toxicity assays, which highlighted the need for further investigation to characterize potential adverse effects. To this end, experiments were conducted using Swiss mice as the animal model. The compound was administered via a single intraperitoneal injection at a dose of 10 mg/kg, determined based on prior studies. The animals were monitored for ninety days to assess clinical signs, weight variation, serum biochemical parameters, and histopathological alterations in organs such as the spleen, liver, and kidneys. Preliminary results indicated transient signs of discomfort shortly after administration, with rapid return to normal behavior, as well as increased visceral fat compared to the control group. The biochemical parameters analyzed included markers of liver function (ALT, AST), renal function (creatinine), lipid profile (cholesterol), and serum proteins (albumin and total proteins). Histopathological analysis of collected organs revealed changes compatible with mild to moderate toxicity, predominantly affecting the liver and kidneys, but without evidence of severe inflammatory or degenerative lesions. This study reinforces the importance of toxicological evaluation in animal models as a crucial step in the preclinical investigation of new drug candidates, particularly for neglected diseases such as those caused by arboviruses. The results obtained may support future studies aimed at improving the safety and therapeutic potential of AG-metabolite 5.

Keywords: bioconjugate; toxicity; murine model; peptide; arbovirus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Cromatograma do produto bruto AG-metabólito 5	16
Figura 2 – Cromatograma da produto puro AG-metabólito 5	17
Figura 3 – Espectro de massas do composto puro AG-metabólito 5	18
Figura 4 – Taxa de sobrevivência em ensaio de toxicidade dose única	19
Figura 5 – Determinação da DL50 em modelo murino	19
Figura 6 – Taxa de sobrevivência em ensaio de dose repetida	20
Figura 7 - Acompanhamento do peso em ensaio de toxicidade subcrônica com dose única	21
Figura 8 - Esquema de grupos animais do ensaio de toxicidade subcrônica	26
Figura 9 - Acompanhamento de peso dos animais do ensaio de toxicidade subcrônica	29
Figura 10 – Animais pós-eutanásia evidenciando diferença de acúmulo de gordura entre grupo controle (à esquerda) e grupo estudo (à direita)	30
Figura 11 – Animais em necrópsia evidenciando diferença de acúmulo de gordura entre grupo controle (à esquerda) e grupo estudo (à direita)	31
Figura 12 – Comparação entre imagens histológicas do baço dos grupos controle e tratado com AG-metabólito 5, evidenciando alterações morfológicas na polpa branca	35
Figura 13 - Comparação entre imagens histológicas do fígado dos grupos controle e tratado com AG-metabólito 5, evidenciando balonização hepatocelular	36

Figura 14 - Comparação entre imagens histológicas dos rins dos grupos controle e tratado com AG-metabólito 5, evidenciando balonização hepatocelular 37

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Comparação dos diagnósticos obtidos a partir da observação dos dados histológicos de lâminas coradas com HE dos rins, fígado e baço dos camundongos do grupo controle e do grupo de estudo tratado com 10 mg/kg do composto AG-metabólito 5	34
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados bioquímicos obtidos do grupo controle	31
Tabela 2 – Dados bioquímicos obtidos do grupo estudo	32
Tabela 3 – Dados bioquímicos dos grupos controle e estudo para avaliação da toxicidade subcrônica do composto AG-Metabólito 5, em dose única, após 90 dias	32

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	RESULTADOS PRÉVIOS	16
2.1	BIOCONJUGADO	16
2.2	DL ₅₀ , TOXICIDADE AGUDA E SUBCRÔNICA.....	18
3	JUSTIFICATIVA	22
4	OBJETIVO GERAL	24
4.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
5	DESENVOLVIMENTO	25
5.1	MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
5.1.1	Bioconjugado.....	25
5.1.2	Ensaio <i>in vivo</i>	25
5.1.2.1	<i>Escolha do modelo animal</i>	25
5.1.2.2	<i>Ensaio de toxicidade subcrônica</i>	26
5.1.2.3	<i>Grau de invasividade</i>	26
5.1.2.4	<i>Eutanásia</i>	27
5.1.3	Análise bioquímica	27
5.1.3.1	<i>Preparo da amostra</i>	27
5.1.3.2	<i>Determinação dos parâmetros bioquímicos</i>	27
5.1.4	Análise histopatológica.....	28
5.1.4.1	<i>Preparo da amostra</i>	28
6	RESULTADOS	29
6.1	ENSAIO DE TOXICIDADE SUBCRÔNICA	29
6.1.1	Acompanhamento de peso.....	29
6.1.2	Acompanhamento de sinais clínicos	29
6.1.3	Análise bioquímica	31
6.1.4	Análise histopatológica.....	34
7	CONCLUSÃO	38
	REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

Durante o longo e complexo estudo e desenvolvimento de novas moléculas candidatas à fármacos, quando os estudos mostram boas perspectivas se vê imprescindível a etapa de estudos pré-clínicos *in vivo*. Apesar do grande avanço tecnológico e racional que complementa estudos de toxicidade (Cavagnaro, 2002), o papel dos modelos animais para estes ensaios ainda é essencial para compreensão de possíveis efeitos tóxicos em humanos devido a possibilidade de extrapolação das informações (Robinson *et al.*, 2019).

Idealmente, a partir dos estudos pré-clínicos, os pesquisadores devem ser capazes de prever os potenciais efeitos adversos e, logo, planejar estudos clínicos que diminuam sua ocorrência (Cavagnaro, 2002) e/ou realizar alterações na substância estudada.

O *Guia para a Condução de Estudos Não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos*, publicado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), traz orientações acerca do tema, baseadas em documentos de agências reconhecidas pela vigilância sanitária, como *Food and Drug Administration (FDA)* e *European Medicines Agency (EMA)* e instituições de interesse na área. O documento objetiva conciliação com a regulamentação internacional e minimização de estudos em duplicatas e do uso desnecessários de animais, ainda mantendo-se a confiabilidade dos estudos.

Os animais utilizados para estudos não clínicos de segurança, além de serem capazes de extrapolar os dados para seres humanos, devem ser saudáveis e possuir peso e idade adequado ao experimento:

- a) estudo de Toxicidade de Dose Única (Aguda) – avaliar a toxicidade induzida por uma substância-teste administrada em dose única ou múltiplas doses dentro de um período de até 24 horas, com posterior monitoramento dos animais por um período de 14 dias;
- b) estudos de Toxicidade de Doses Repetidas - caracterizar o perfil toxicológico da substância por meio de administração de múltiplas doses, obter informações sobre efeitos tóxicos gerais,

identificar órgãos-alvo, alterações fisiológicas, hematológicas, bioquímicas, anatômicas e histopatológicas, além de definir dos valores de Nível de dose sem observação de efeito (NOEL) e Nível de dose sem observação de efeito adverso (NOAEL);

- c) estudos de Toxicidade Reprodutiva – revelar efeito de uma ou mais substâncias ativas na reprodução de mamíferos;
- d) estudos de Genotoxicidade – detectar o potencial das substâncias em causar mutações gênicas e alterações cromossômicas;
- e) estudos de Tolerância Local – investigar a tolerância de locais do corpo que podem sofrer contato na prática clínica com o produto estudado;
- f) estudos de Carcinogenicidade – identificar substâncias que possam causar o desenvolvimento de tumores;
- g) estudos de Interesse para a Avaliação da Segurança Farmacológica – pesquisar possíveis efeitos farmacodinâmicos indesejáveis do composto testado nas funções fisiológicas do organismo;
- h) estudos de Toxicocinética – descrever a exposição sistêmica em animais e a sua relação com o nível de dose e o tempo;
- i) estudos não clínicos de segurança para o desenvolvimento e registro de ADF (Associação em Dose Fixa) de medicamentos sintéticos e semissintéticos de uso oral – caracterizar os efeitos farmacológicos, farmacocinéticos e toxicológicos do uso combinado de ativos, identificando interações aditivas, sinérgicas ou antagônicas.

O pesquisador deve ser capaz de discernir entre os ensaios considerando a necessidade de cada substância estudada de forma a evitar, conforme objetivo do guia, estudos duplicados e de obter resultados confiáveis.

A emergência e reemergência de doenças transmitidas por vetores, parasitas, bactérias ou vírus, são reconhecidas como problema de saúde pública em países tropicais e subtropicais e representam mais de 17% de todas as doenças infecciosas, causando anualmente mais de 700.000 mortes (Araújo *et al.*, 2021; Chala; Hamde, 2021; WHO, 2024; Yu; Cheng, 2022) e evidenciam

falta, e necessidade, de desenvolvimento de tratamentos. Os vírus transmitidos principalmente por mosquitos causam grandes epidemias urbanas, que podem ser relacionadas às condições ambientais e sociais de urbanização, desmatamento, falta de saneamento básico e diversidade de artrópodes hematófagos, principalmente em regiões tropicais e equatoriais (Lima-Camara, 2016; Medeiros; Vasconcelos, 2019; Viglietta *et al.*, 2021; Yu; Cheng, 2022).

Os flavivírus são compostos por diversas espécies com importância na saúde pública, como o vírus Dengue (DENV), vírus Zika (ZIKV), vírus da Febre Amarela (YFV), entre outros, e estima-se que os dois primeiros infectam anualmente mais de 96 milhões de pessoas (Ali *et al.*, 2017; Araújo *et al.*, 2021). Apesar de normalmente as infecções por flavivírus gerarem quadros sintomáticos leves que se amenizam em torno de 7 a 10 dias, manifestações clínicas graves podem acontecer, como febre hemorrágica e complicações neurológicas (Leur *et al.*, 2021).

No âmbito de novas terapêuticas, os peptídeos apresentam diversas vantagens em relação a outras moléculas, incluindo alta seletividade, ação rápida e biodegradabilidade. Embora os peptídeos apresentem algumas limitações, como curta meia-vida, baixa absorção oral e elevada degradação por proteases, estas podem ser superadas por meio de técnicas químicas, como a bioconjugação. Este processo envolve a ligação de duas ou mais moléculas bioativas por meio de ligações covalentes, resultando na formação de um novo composto com propriedades terapêuticas aprimoradas (Drucker, 2020; Tesauro *et al.*, 2019).

O peptídeo Hecate (FALALKALKKKALKKLKKALKKKAL-CONH₂), utilizado como carreador de moléculas devido à sua capacidade de penetrar membranas celulares, mostrou potencial antiviral. Em estudos anteriores, demonstrou-se que o bioconjugado entre Ácido Gálico (AG) e Hecate é eficaz no transporte de substâncias antivirais e na inibição do ciclo de replicação do vírus da hepatite C (flavivírus). No estudo de Sanches *et al.*, 2023, o bioconjugado AG-Hecate foi testado contra as linhagens africana e asiática do vírus Zika. Além disso, os metabólitos gerados pela degradação do AG-Hecate no plasma sanguíneo foram analisados quanto à sua atividade antiviral. Dentre os cinco metabólitos identificados, três foram selecionados para avaliação. O metabólito 5 (AG-FALALKALKKKALKKL-COOH) se destacou por apresentar a

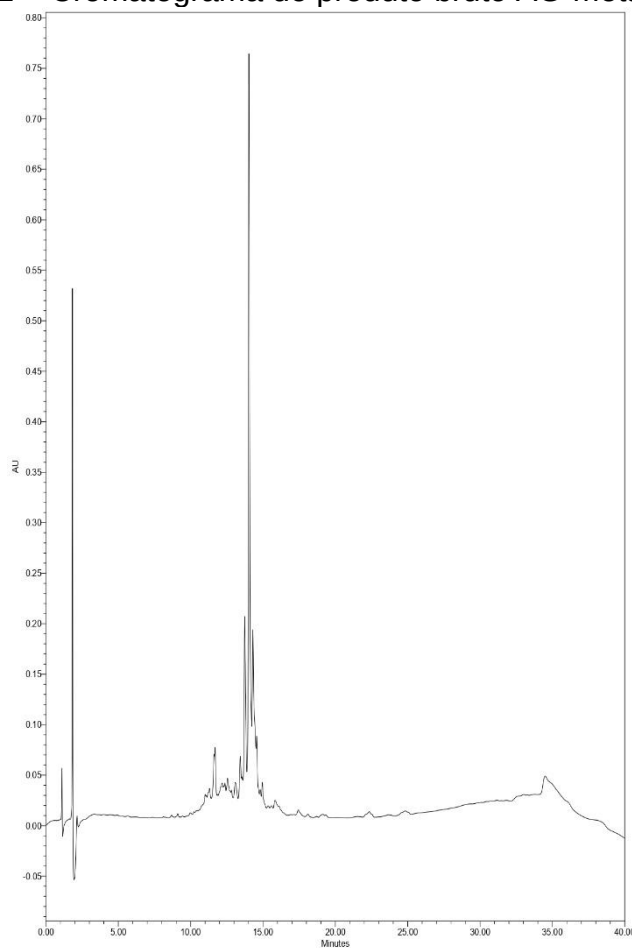
melhor inibição da multiplicação viral, além de propriedades virucidas e protetoras. Esse metabólito se mostrou mais eficaz que o próprio AG-Hecate (Batista *et al.*, 2018; Sanches *et al.*, 2023) e foi investigado neste trabalho devido seus resultados prévios promissores.

2 RESULTADOS PRÉVIOS

2.1 BIOCONJUGADO

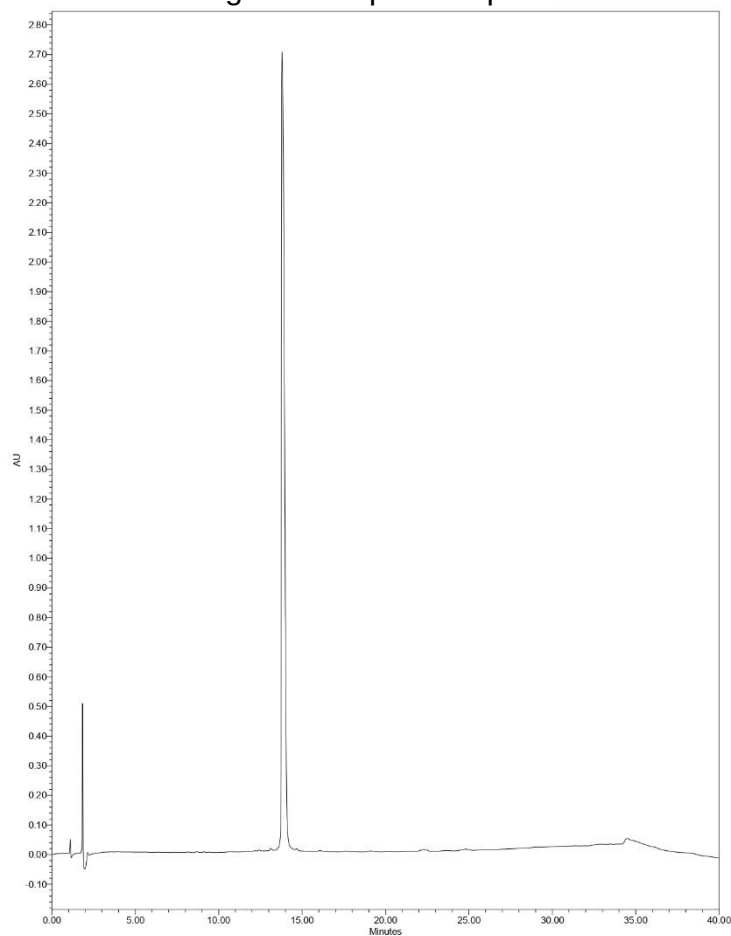
Em estudo realizado previamente pelo grupo de pesquisa, o composto AG-metabólito 5 (AG-FALALKALKKALKKL-COOH) foi obtido por meio da técnica de síntese de peptídeos em fase sólida e obteve alto grau de pureza (acima de 95,0 %). (Amaral, 2024), conforme as figuras 1 e 2.

Figura 1 – Cromatograma do produto bruto AG-metabólito 5



Fonte: Amaral (2024).

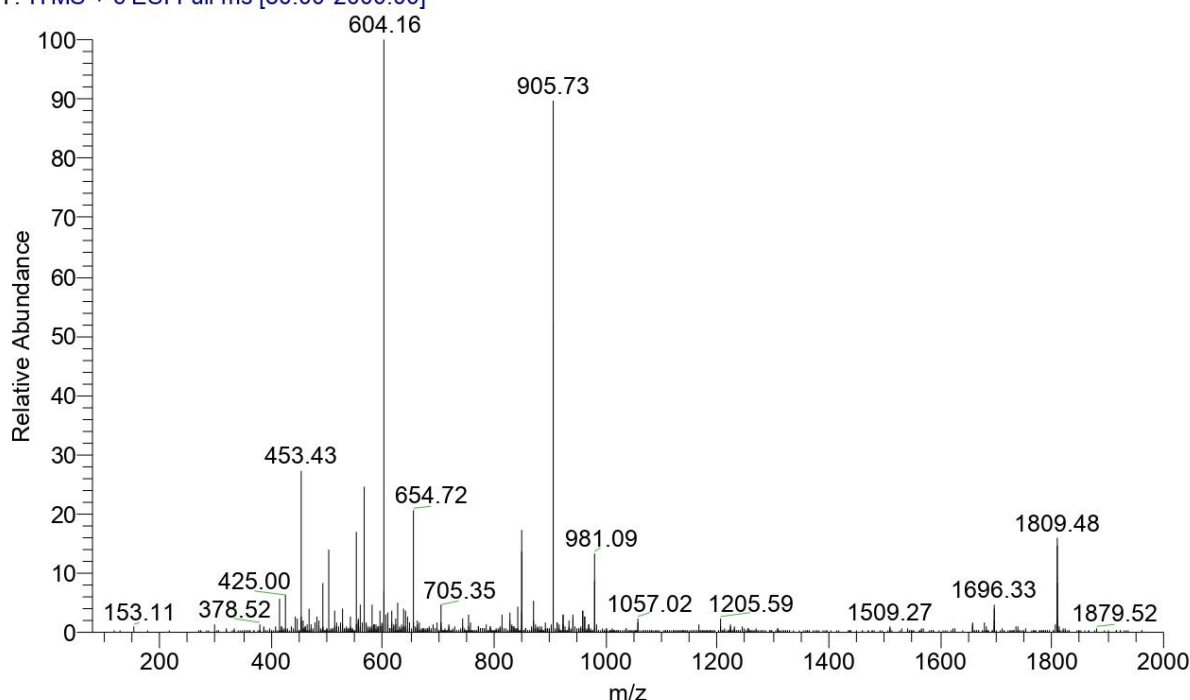
Figura 2 – Cromatograma do produto puro AG-metabólito 5



Fonte: Amaral (2024).

É possível identificar no espectro de massas obtido do composto puro (figura 3), peso molecular de 1808,1 g/mol, relação $(m+z)/z$ de +1 (1809,48 g/mol, +2 (905,73 g/mol), +3 (604,16 g/mol) e +4 (453,43 g/mol).

Figura 3 – Espectro de massas do composto puro AG-metabólito 5
 CG2303-BR_240131151720 #3-21 RT: 0.01-0.08 AV: 19 NL: 2.80E5
 T: ITMS + c ESI Full ms [80.00-2000.00]

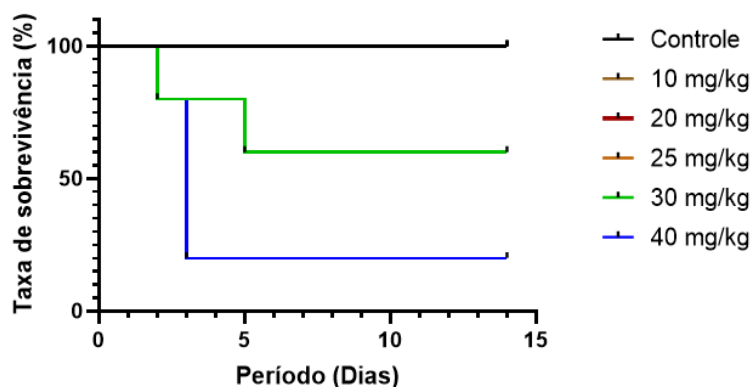


Fonte: Amaral (2024).

2.2 DL₅₀, TOXICIDADE AGUDA E SUBCRÔNICA

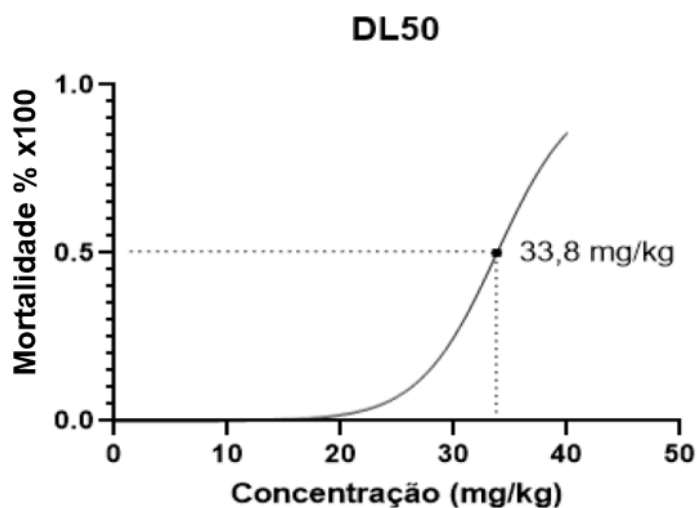
Amaral (2024) determinou a dose letal 50% (DL₅₀) do composto em camundongos *Swiss* machos em estudo com 5 grupos, cada grupo recebeu diferentes doses do bioconjugado: 10, 20, 25, 30 e 40 mg/kg do animal, além do grupo controle que recebeu apenas solução salina. A administração foi por via intraperitoneal e os animais foram acompanhados por 14 dias, com acompanhamento do peso e de sinais clínicos. Os resultados das concentrações de 10, 20 e 25 mg/kg foram positivos e não demonstraram toxicidade a curto prazo, porém os animais que receberam as doses de 30 e 40 mg/kg demonstraram sinais de dor no local da administração e sinais clínicos de toxicidade, como palidez, baixa atividade, inchaço abdominal, contração corporal, diminuição do peso, urina com coloração mais intensa, fezes inconsistentes, além de mortalidade de 40% e 80% do grupo, respectivamente. A partir dos resultados da taxa de sobrevivência (figura 4), a DL₅₀ encontrada foi de 33,8 mg/kg (figura 5).

Figura 4 - Taxa de sobrevivência em ensaio de toxicidade dose única



Fonte: Amaral (2024).

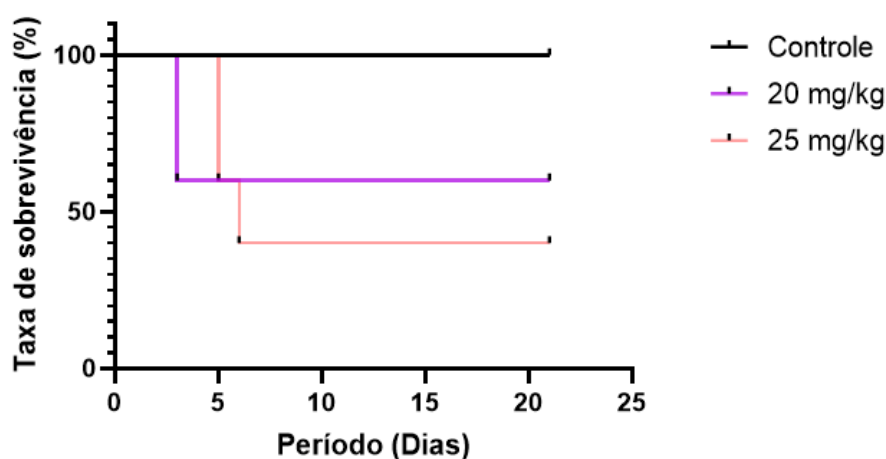
Figura 5 – Determinação da DL₅₀ em modelo murino



Fonte: Amaral (2024).

Apesar de a dose subsequente abaixo da DL₅₀ ser de 30 mg/kg, o grupo constatou efeitos adversos de toxicidade aguda e a dose de 25 mg/kg foi escolhida para etapas posteriores. Para avaliação da exposição contínua ao composto, foi realizado ensaio de dose repetida com camundongos Swiss, onde dois grupos receberam a cada 24 horas, por 7 dias, administração IP de 20 e 25 mg/kg (cada grupo) e foram acompanhados por mais 21 dias. Ao final do período, estas doses demonstraram-se tóxicas, tendo uma mortalidade de 40% e 60% (figura 6) respectivamente, além de sinais clínicos semelhantes aos apresentados anteriormente (Amaral, 2024).

Figura 6 - Taxa de sobrevivência em ensaio de dose repetida

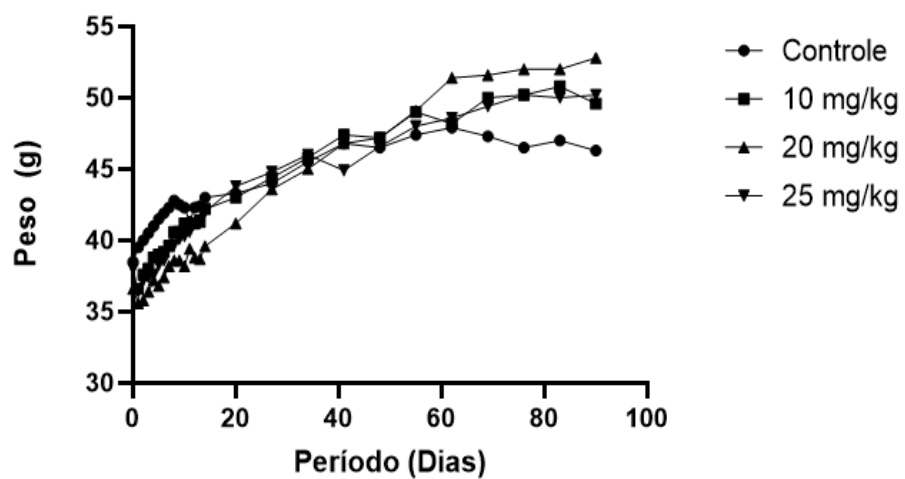


Fonte: Amaral (2024).

Além destes, foi realizado o ensaio de toxicidade subcrônica de dose única em doses de 10, 20 e 25 mg/kg, que constataram efeitos adversos nas doses de 20 e 25 mg/kg. Portanto, devido aos efeitos tóxicos agudos nas doses únicas de 30 e 40 mg/kg e nas doses repetidas de 20 e 25 mg/kg, determinou-se que o nível sem efeito adverso observado (NOAEL) é de 10 mg/kg, sendo a dose escolhida para os testes posteriores (Amaral, 2024).

Contudo, o ensaio de toxicidade subcrônica em dose única revelou acúmulo de gordura visceral e aumento do peso médio em relação ao grupo controle mesmo na dose de 10 mg/kg (figura 7), apontando a necessidade de maiores investigações para possíveis danos causados pelo composto.

Figura 7 – Acompanhamento do peso em ensaio de toxicidade subcrônica com dose única



Fonte: Amaral (2024).

3 JUSTIFICATIVA

As doenças causadas por flavivírus, como Zika, Dengue e Febre Amarela, representam um dos principais desafios de saúde pública global, especialmente em regiões tropicais e subtropicais. Apesar da alta taxa de infecção e do potencial para surtos epidêmicos, ainda há uma escassez significativa de opções terapêuticas eficazes e seguras para essas doenças, o que reforça a necessidade urgente de desenvolvimento de novos fármacos antivirais.

Neste cenário, moléculas peptídicas têm se destacado como promissoras devido à sua elevada especificidade, biodegradabilidade e versatilidade estrutural. Entre elas, o bioconjugado AG-FALALKALKKALKKL-COOH (também denominado AG-metabólito 5), derivado do peptídeo Hecate, tem demonstrado atividade antiviral relevante em estudos *in vitro*, incluindo inibição da replicação do vírus Zika, além de propriedades virucidas e protetoras superiores ao composto precursor.

No entanto, para que uma molécula candidata avance em direção ao uso clínico, é imprescindível a realização de estudos pré-clínicos que avaliem seu perfil toxicológico. Ensaio anteriores conduzidos com o AG-metabólito 5 apontaram que, apesar de sua eficácia antiviral, algumas doses do composto induziram efeitos adversos em camundongos *Swiss*, como sinais clínicos de toxicidade e aumento de mortalidade em doses repetidas. A dose de 10 mg/kg foi identificada como segura, mas ainda assim, os achados de aumento de gordura visceral e alterações discretas em parâmetros bioquímicos sugerem que efeitos adversos subclínicos ou cumulativos não podem ser descartados sem investigação aprofundada.

Diante disso, este trabalho justifica-se pela necessidade de caracterizar com maior precisão a toxicidade subcrônica do AG-metabólito 5 em modelo murino, com ênfase na análise de sinais clínicos, alterações bioquímicas e possíveis danos histopatológicos. A investigação desses parâmetros é crucial para estabelecer um perfil de segurança confiável do composto, além de oferecer subsídios para futuras modificações estruturais ou estratégias de formulação que aumentem sua segurança terapêutica.

Além disso, o estudo contribui com o avanço do conhecimento científico no campo dos peptídeos bioativos e sua aplicação como antivirais, especialmente em um contexto de urgência sanitária e negligência histórica em relação às doenças tropicais. A abordagem adotada, fundamentada nas diretrizes da ANVISA e nos princípios éticos do uso de animais em pesquisa, reforça a relevância acadêmica, social e científica da presente investigação.

4 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo o estudo da toxicidade subcrônica do AG-metabólito 5 (AG-FALALKALKKALKKL-COOH) em modelo animal utilizando camundongos *Swiss* machos por meio da análise dos sinais clínicos, dados bioquímicos e histopatológicos obtidos após administração do composto em dose de 10 mg/kg.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) avaliar a toxicidade subcrônica do composto em concentração segura com dose única (10 mg/kg) por meio da administração por via intraperitoneal em camundongos *Swiss* machos, com idade entre 8-10 semanas, com acompanhamento de peso, morte e sinais clínicos por 90 dias;
- b) realizar análises bioquímicas do soro sanguíneo dos animais ao final do período de 90 dias por meio de marcadores de função hepática (ALT, AST), renal (ureia, creatinina, proteínas totais, albumina sérica) e de perfil lipídico (colesterol total), para verificar alterações decorrentes da administração do composto em relação ao grupo controle;
- c) investigar alterações histopatológicas em órgãos (baço, fígado e rim), verificando a presença de lesões ou alterações morfológicas em relação ao grupo controle;
- d) relacionar os resultados prévios obtidos a fim de corroborar no estabelecimento de um perfil de segurança toxicológica do AG-metabólito 5 em modelo animal;
- e) discutir os resultados com dados da literatura disponíveis para compostos peptídicos para viabilidade de uso terapêutico futuro.

5 DESENVOLVIMENTO

Tendo como base as diretrizes da ANVISA, foi feita a aplicação do bioconjugado nos camundongos por via intraperitoneal e o acompanhamento de seus sinais clínicos por 90 dias, foi também realizada análise bioquímica e histopatológica de suas amostras biológicas.

Durante os primeiros 14 dias foram coletados, diariamente, peso dos animais e após este período a cada 7 dias, até completar o período do ensaio.

Abaixo encontra-se a metodologia aplicada.

5.1 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1.1 Bioconjugado

O bioconjugado AG-FALALKALKKKL-COOH foi obtido anteriormente, conforme a seção 2.1 Bioconjugado em colaboração com o Laboratório de Síntese e Estudos de Biomoléculas (LaSEBio), localizado no IQ-UNESP, coordenado pelo Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli.

5.1.2 Ensaio *in vivo*

Para a avaliação da toxicidade de um novo composto candidato a fármaco, é fundamental a realização de ensaios de segurança *in vivo*, os quais possibilitam a análise dos efeitos sistêmicos decorrentes da administração da substância. Com o objetivo de aprofundar os dados obtidos em estudos anteriores, o presente ensaio empregou a administração do bioconjugado em um modelo animal reconhecido por sua capacidade de mimetizar aspectos fisiológicos e metabólicos do organismo humano. A seguir, são descritos os procedimentos metodológicos adotados neste estudo.

5.1.2.1 Escolha do modelo animal

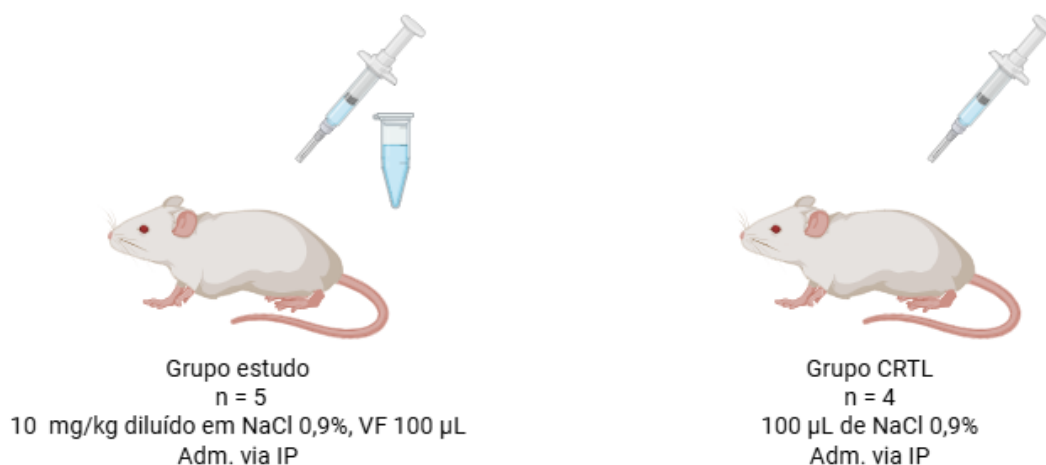
A escolha do modelo animal é essencial para gerar resultados de relevância, confiança e reprodutibilidade. Neste trabalho utilizamos camundongos da linhagem *Swiss*, machos, com idade entre 8 e 10 semanas. Os camundongos *Swiss* são heterogênicos e possuem atividade metabólica

normal, sendo essencial para realizar a análise da metabolização do composto, assim como a sua difusão pelo corpo do animal e efeitos de toxicidade, nesta idade apresentam maturidade imunológica. Os animais foram adquiridos do biotério Central da UNESP de Botucatu. Protocolo CEUA/FCF/CAR: 6533727772.

5.1.2.2 Ensaio de toxicidade subcrônica

Seguindo o princípio dos 3Rs (Redução, Refinamento e Substituição), o experimento contou com 9 animais divididos em dois grupos: grupo controle (n = 4) e grupo estudo (n = 5). O grupo controle recebeu apenas 100 µL de solução salina estéril (NaCl 0,9%) por via intraperitoneal (IP) e o grupo estudo recebeu o composto em dose de 10 mg/kg de animal, por via IP, diluído em 100 µL de solução salina. Após a administração, os animais ficaram em observação de seus sinais clínicos, o peso foi coletado por 14 dias seguidos e, após esse período, a cada 7 dias até completarem os 90 dias do ensaio. Ao final do ensaio, foram coletados os órgãos baço, fígado e rins por necrópsia e sangue por punção intracardíaca, após eutanásia

Figura 8 – Esquema de grupos animais do ensaio de toxicidade subcrônica



Fonte: Próprio autor

5.1.2.3 Grau de invasividade

O projeto está enquadrado em grau de invasividade 2 (GI 2), segundo classificação do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal).

5.1.2.4 Eutanásia

Para realização da eutanásia, os animais foram inseridos em câmara de CO₂, pré-ambientalizada com ~40% do gás durante 1 minuto, ao apresentarem sinais de sonolência e desequilíbrio, a liberação de gás para a câmara era aumentada por meio da válvula. Após visível imobilidade dos animais, o fluxo de gás era interrompido e contabilizado 1 minuto para abertura da câmara e checagem dos sinais vitais e sensibilidade à dor. Caso o animal apresentasse sensibilidade, a câmara era fechada e o fluxo de gás reaberto por mais 1 minuto.

5.1.3 Análise bioquímica

Para análise dos parâmetros bioquímicos, foi obtido soro a partir do sangue coletado por via intracardíaca, a amostra foi preparada e processada em Analisador Bioquímico Automático Mindray.

5.1.3.1 Preparo da amostra

Imediatamente após eutanásia, o sangue de cada camundongo foi coletado por via intracardíaca utilizando seringa estéril e agulha 0,50 x 15 mm, adicionado em micro tubo identificado e reservado por 15 minutos em temperatura ambiente e sem movimentação. Após este intervalo, os tubos foram centrifugados e o soro coletado, reservado, identificado e armazenado em refrigeração para análise.

5.1.3.2 Determinação dos parâmetros bioquímicos

As amostras foram analisadas em Analisador Bioquímico Automático Mindray utilizando kits veterinários da Labtest, para os parâmetros:

- a) albumina sérica – indicador de perdas renais;
- b) alanina Aminotransferase (ALT) – indicador de lesão ou inflamação hepatocelular;
- c) aspartato Aminotransferase (AST) – indicador de lesão no fígado ou muscular;
- d) creatinina - indicador de função renal;
- e) proteínas totais – indicador de função renal;

- f) ureia – indicador de função renal;
- g) colesterol – indicador de metabolismo lipídico.

5.1.4 Análise histopatológica

Para análise histopatológica, baço, fígado e rins foram coletados em necrópsia para envio ao HistoLab, empresa terceirizada, para confecção das lâminas histológicas.

5.1.4.1 Preparo da amostra

Os órgãos obtidos de um animal de cada grupo foram, individualmente, inseridos em cassete histológico, identificados e imergidos em solução de formol (10%) para envio ao HistoLab (Campinas – SP).

6 RESULTADOS

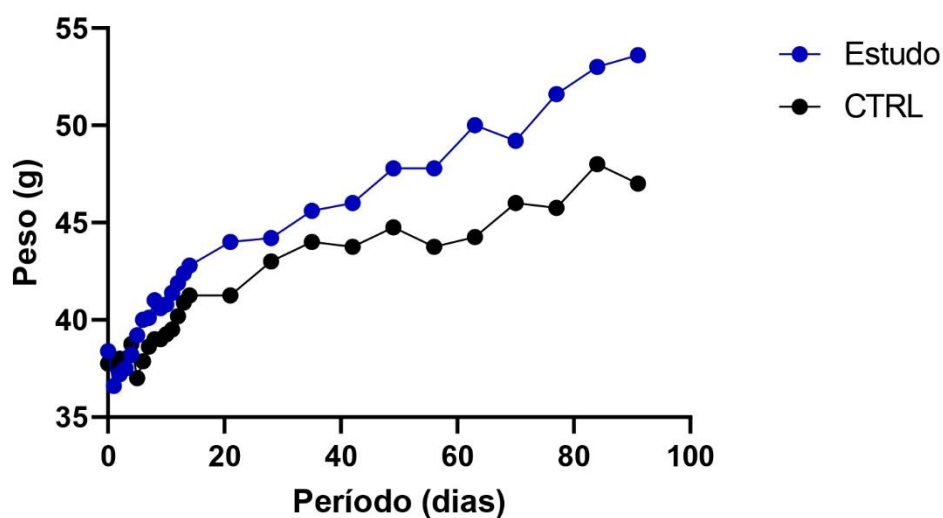
Abaixo apresentam-se o acompanhamento de peso, análise bioquímica e histopatológica resultantes do ensaio de toxicidade subcrônica *in vivo* do bioconjugado.

6.1 ENSAIO DE TOXICIDADE SUBCRÔNICA

6.1.1 Acompanhamento de peso

Durante os primeiros 14 dias do ensaio, o peso dos animais foi monitorado diariamente. A partir de então, até o 90º dia, as pesagens passaram a ser realizadas semanalmente. A média do peso de cada grupo pode ser acompanhada na figura 9.

Figura 9 – Acompanhamento de peso dos animais do ensaio de toxicidade subcrônica



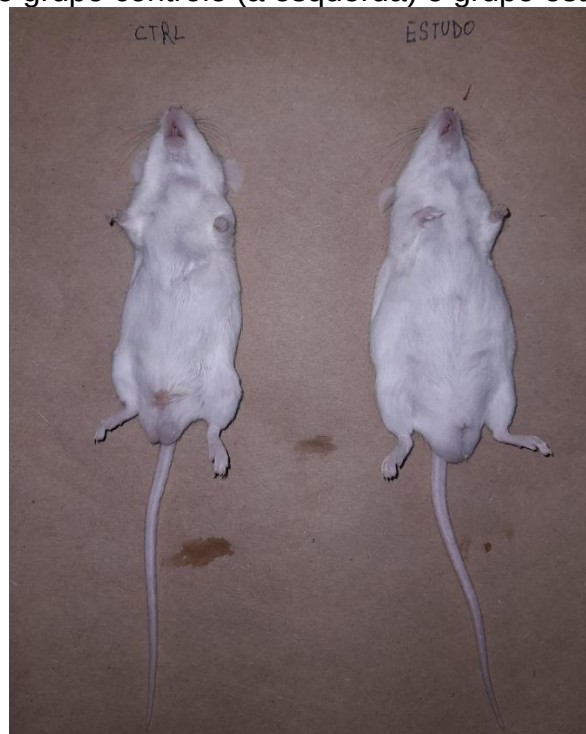
Fonte: Próprio autor

6.1.2 Acompanhamento de sinais clínicos

Os animais do grupo estudo apresentaram sinais de dor logo após administração do composto, como olhos semifechados, orelhas para trás e contração muscular na região da aplicação. Estes sinais foram momentâneos, após cerca de 30 minutos todos os animais apresentavam comportamento normal. Durante os 90 dias, o grupo estudo apresentou comportamento igual ao grupo controle, sendo ativos, responsivos ao manejo e com visível alimentação e ingestão de água em níveis normais. Ao final do experimento,

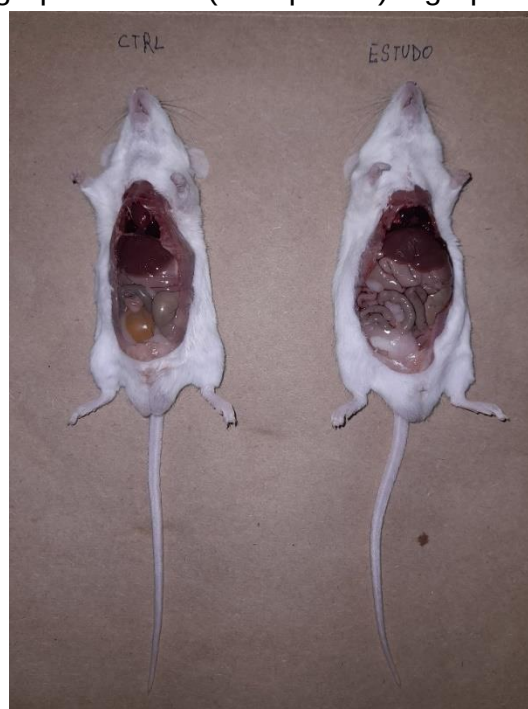
pode-se observar maior acúmulo de gordura nos animais do grupo estudo em relação ao grupo controle, o que pode ser comprovado pelo acompanhamento do peso de cada grupo (figura 9) e visto na comparação entre os corpos dos animais pós eutanásia (figura 10) e dissecação (figura 11).

Figura 10 – Animais pós-eutanásia evidenciando diferença de acúmulo de gordura entre grupo controle (à esquerda) e grupo estudo (à direita)



Fonte: Próprio autor

Figura 11 – Animais em necrópsia evidenciando diferença de acúmulo de gordura entre grupo controle (à esquerda) e grupo estudo (à direita)



Fonte: Próprio autor

6.1.3 Análise bioquímica

Os dados bioquímicos foram obtidos a partir da análise do soro sanguíneo por Analisador Bioquímico Automático Mindray, os parâmetros investigam função renal, função hepática e metabolismo lipídico (tabelas 1, 2 e 3).

Tabela 1 – Dados bioquímicos obtidos do grupo controle

Parâmetro bioquímico	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4
Albumina (g/dL)	3,96	4,26	4,47	4,11
ALT (U/L)	88	64	171	92
AST (U/L)	281	157	ND	191
Creatinina (mg/dL)	ND	ND	ND	ND
Proteínas Totais (g/dL)	8,46	8,87	9,55	8,96
Ureia (mg/dL)	20	37	28	44
Colesterol (mg/dL)	208	161	225	221

Fonte: Próprio autor

ALT (Alanina Aminotransferase); **AST** (Aspartato Aminotransferase); **g/dL** (gramas por decilitro); **U/L** (unidades por litro); **mg/dL** (miligramas por decilitro); **ND** (não detectável).

Tabela 2 – Dados bioquímicos obtidos do grupo de estudo

Parâmetro bioquímico	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5
Albumina (g/dL)	4,02	3,88	3,84	3,81	3,98
ALT (U/L)	123	88	93	88	102
AST (U/L)	89	297	130	214	103
Creatinina (mg/dL)	0,11	ND	ND	0,14	ND
Proteínas Totais (g/dL)	8,54	8,33	8,42	8,35	8,45
Ureia (mg/dL)	ND	30	36	69	27
Colesterol (mg/dL)	184	200	161	227	AI

Fonte: Próprio autor

AI (Amostra insuficiente); **ALT** (Alanina Aminotransferase); **AST** (Aspartato Aminotransferase); **g/dL** (gramas por decilitro); **U/L** (unidades por litro); **mg/dL** (miligramas por decilitro); **ND** (não detectável).

Tabela 3 – Dados bioquímicos dos grupos controle e estudo para avaliação da toxicidade subcrônica do composto AG-metabólito 5, em dose única, após 90 dias

Parâmetro bioquímico	Intervalo CTRL	Média CTRL	Intervalo estudo	Média estudo
Albumina (g/dL)	3,96 – 4,47	4,2	3,81 – 4,02	3,91
ALT (U/L)	64 – 171	103,7	88 – 123	98,8
AST (U/L)	ND – 281	157,25	89 – 297	166,6
Creatinina (mg/dL)	ND	ND	ND – 0,14	0,05
Proteínas Totais (g/dL)	8,46 – 9,55	8,96	8,33 – 8,54	8,42
Ureia (mg/dL)	20 – 44	32,25	ND – 69	32,4
Colesterol (mg/dL)	161 – 225	203,75	161 – 227	193

Fonte: Próprio autor

ALT (Alanina Aminotransferase); **AST** (Aspartato Aminotransferase); **g/dL** (gramas por decilitro); **U/L** (unidades por litro); **mg/dL** (miligramas por decilitro); **CTRL** (Controle); **ND** (não detectável).

A análise dos parâmetros bioquímicos obtidos a partir do soro sanguíneo dos animais permitiu avaliar potenciais efeitos sistêmicos do bioconjugado AG-FALALKALKKKL-COOH, com foco nas funções hepática,

renal, proteica e lipídica. Em relação aos marcadores de função hepática, observou-se uma discreta redução da enzima ALT no grupo tratado (98,8 U/L) em comparação ao grupo controle (103,75 U/L), enquanto os níveis médios de AST foram maiores no grupo tratado (166,6 U/L) frente ao controle (157,25 U/L). A ALT é um marcador mais específico de lesão hepatocelular, enquanto a AST também pode refletir alterações musculares ou sistêmicas. Dessa forma, a alteração de ambas as enzimas no grupo tratado não é capaz de indicar hepatotoxicidade evidente.

Quanto à função renal, a creatinina não foi detectável (ND) em todos os animais do grupo controle e detectada em níveis muito baixos no grupo tratado (média de 0,05 mg/dL), o que pode indicar ausência de acúmulo renal do metabólito, embora também revele limitação do método analítico para avaliar função renal com precisão nessa faixa de concentração. Já os níveis médios de ureia foram discretamente mais elevados no grupo tratado (32,4 mg/dL) em comparação ao grupo controle (32,25 mg/dL), podendo refletir um leve impacto sobre a excreção renal ou aumento no catabolismo proteico.

Os parâmetros relacionados ao metabolismo proteico também apresentaram tendência à redução no grupo tratado. A albumina média caiu de 4,2 g/dL no grupo controle para 3,91 g/dL, e as proteínas totais reduziram-se de 8,96 g/dL para 8,42 g/dL, o que pode ser interpretado como uma possível alteração na síntese proteica hepática ou resposta inflamatória leve de caráter subclínico.

Em relação ao metabolismo lipídico, foi observada uma redução no colesterol total no grupo tratado (193 mg/dL) em relação ao grupo controle (203,75 mg/dL). Embora modesta, essa queda contrasta com o acúmulo evidente de gordura visceral nos animais tratados, registrado por imagens macroscópicas (Figuras 10 e 11). Esses dados sugerem que o bioconjugado pode estar promovendo uma redistribuição lipídica, possivelmente favorecendo o acúmulo de lipídios nos tecidos adiposos viscerais, ao mesmo tempo em que reduz sua presença no compartimento plasmático. Tal padrão pode decorrer de alterações na captação celular de colesterol, na lipogênese ou na taxa de síntese hepática, merecendo investigação adicional.

Os resultados bioquímicos não apontam para toxicidade aguda ou subcrônica significativa, mas indicam modulações metabólicas discretas

induzidas pela exposição ao composto, especialmente sobre os eixos lipídico e proteico. Esses achados, somados ao aumento de gordura abdominal, reforçam a importância de estudos complementares com perfil lipídico completo, análise histológica de tecido adiposo e avaliação de vias metabólicas hepáticas envolvidas no armazenamento e transporte de lipídios.

6.1.4 Análise histopatológica

As lâminas histológicas foram confeccionadas pelo HistoLab (Campinas – SP), utilizando coloração de Hematoxilina e Eosina (HE), e posteriormente analisadas pelo Prof. Dr. Cleverton Roberto de Andrade. As comparações resultantes dessas análises estão apresentadas no Quadro 1.

Quadro 1 – Comparação dos diagnósticos obtidos a partir da observação dos dados histológicos de lâminas coradas com HE dos rins, fígado e baço dos camundongos do grupo controle e do grupo de estudo tratado com 10 mg/kg do composto AG-metabólito 5

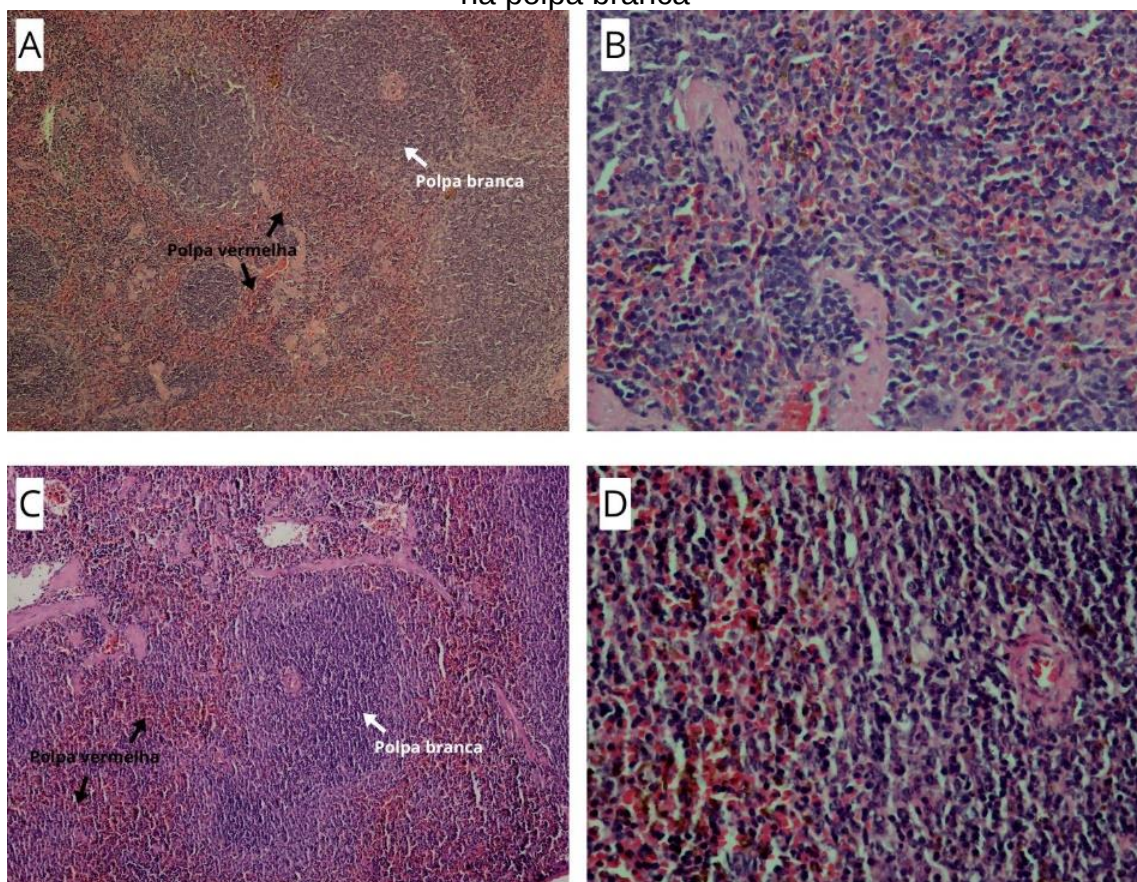
Órgão	Grupo Controle	Grupo Estudo (Tratado)	Intensidade do Dano	Achado Principal
Baço	Arquitetura preservada Polpa branca e vermelha normais	Leve desorganização Aumento da celularidade na polpa branca	Leve	Estimulação imune (sem toxicidade evidente)
Fígado	Cordões hepáticos preservados Sem inflamação	Balonização hepatocelular Congestão sinusoidal Inflamação mononuclear discreta	Moderada	Lesão hepatocelular inflamatória discreta
Rim	Glomérulos e túbulos normais Sem infiltrado	Hipercelularidade glomerular Infiltrado intersticial discreto Leve dilatação tubular	Leve a moderada	Sinais leves de lesão tubular e inflamação

Fonte: Próprio autor

A análise histopatológica dos órgãos dos camundongos submetidos ao tratamento com o composto AG-metabólito 5 permitiu a identificação de alterações morfológicas sugestivas de efeitos leves a moderados, com

variações entre os diferentes órgãos avaliados. No baço, os animais do grupo estudo apresentaram leve desorganização celular e aumento da celularidade na região da polpa branca, quando comparados aos animais do grupo controle, que exibiram estrutura esplênica preservada, com as regiões de polpa branca e vermelha normais (figura 12). Essas alterações, embora leves, podem estar relacionadas à estimulação do sistema imunológico em resposta à administração do bioconjugado, contudo, sem sinais de toxicidade evidentes.

Figura 12 – Comparação entre imagens histológicas do baço dos grupos controle e tratado com AG-metabólito 5, evidenciando alterações morfológicas na polpa branca



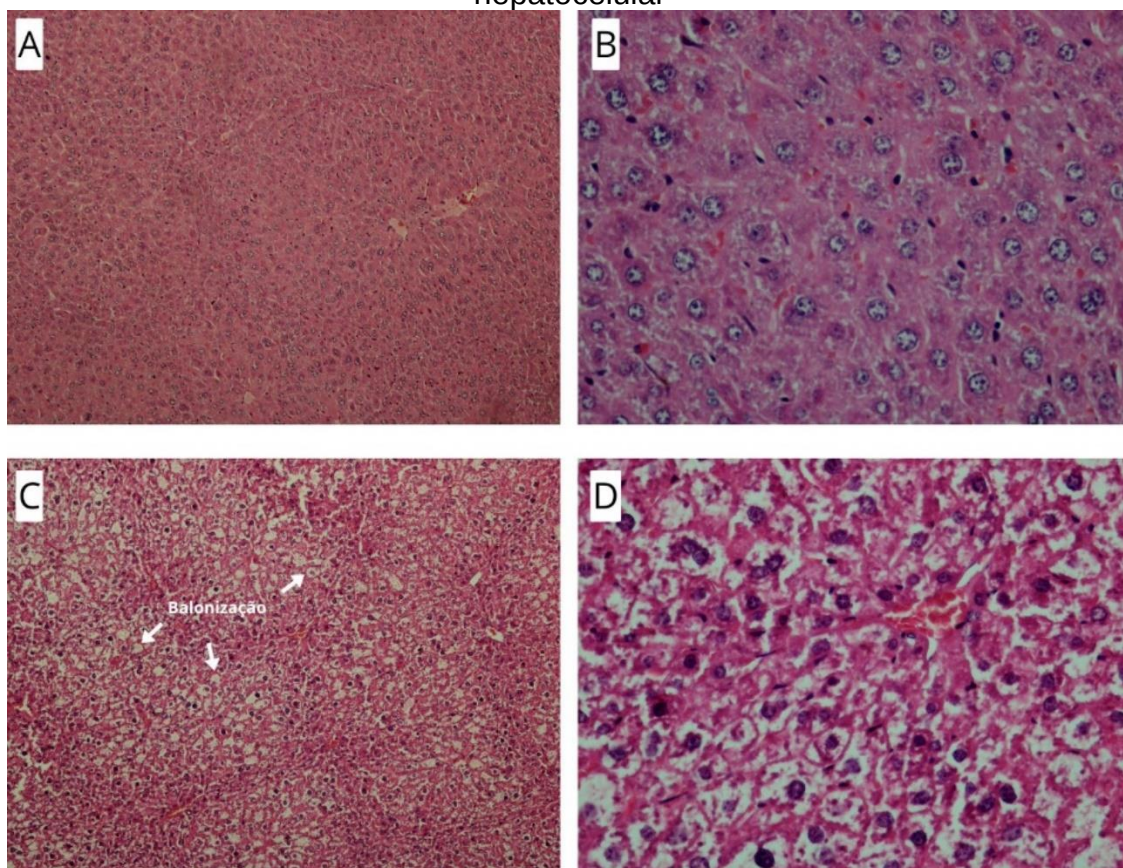
Fonte: Próprio autor

Baço, HE. **A:** Grupo controle evidenciando as regiões de polpa branca e polpa vermelha normais e arquitetura preservada, 10x. **B:** Grupo controle, 40x. **C:** Grupo estudo, aumento da celularidade da polpa branca e leve desorganização, 10x. **D:** Grupo estudo, 40x.

No fígado, o grupo controle apresentou glomérulos e túbulos normais e ausência de infiltrado, já no grupo estudo foram observadas alterações moderadas. Dentre os achados, destacam-se balonização hepatocelular, congestão sinusoidal e inflamação mononuclear discreta. Essas alterações configuram um padrão de lesão hepatocelular inflamatória discreta.

A balonização dos hepatócitos é uma alteração caracterizada pelo inchaço e aumento do volume destas células (figura 13). A congestão sinusoidal, por sua vez, pode refletir em complicações no fluxo sanguíneo do fígado, enquanto a inflamação mononuclear discreta sugere uma resposta inflamatória leve devido a presença de poucas células mononucleares. Apesar dessas alterações, não foram observadas lesões necróticas, o que sugere que o composto não induziu hepatotoxicidade severa na dose testada.

Figura 13 – Comparação entre imagens histológicas do fígado dos grupos controle e tratado com AG-metabólito 5, evidenciando balonização hepatocelular



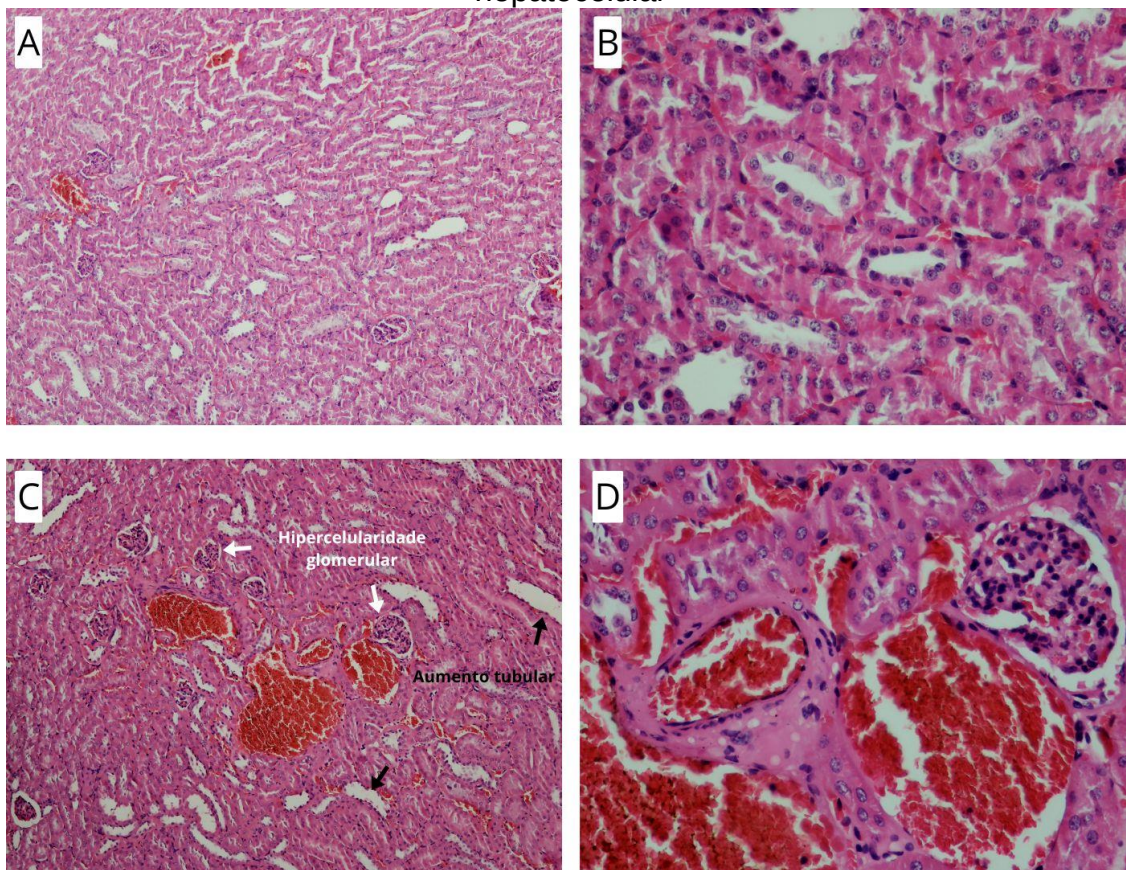
Fonte: Próprio autor

Fígado, HE. **A:** Grupo controle, ausência de inflamação e cordões hepáticos preservados, 10x. **B:** Grupo controle, 40x. **C:** Grupo estudo, evidenciando balonização hepatocelular, 10x. **D:** Grupo estudo, 40x.

Em relação aos rins, há presença de hiper celularidade glomerular, infiltrado intersticial discreto e leve dilatação tubular no grupo tratado (figura 14), que sugerem um processo inflamatório leve, enquanto os animais do grupo controle apresentaram glomérulos e túbulos com estruturas preservadas. A intensidade do dano foi classificada como leve a moderada. Ainda assim, não

foram observadas alterações estruturais graves, como necrose tubular, sugerindo um quadro limitado de comprometimento da função dos rins.

Figura 14 – Comparação entre imagens histológicas dos rins dos grupos controle e tratado com AG-metabólito 5, evidenciando balonização hepatocelular



Fonte: Próprio autor

Rim, HE. **A:** Grupo controle, 10x. **B:** Grupo controle apresentando glomérulos e túbulos normais, 40x. **C:** Grupo estudo, evidenciando hiper celularidade glomerular e aumento tubular, 10x. **D:** Grupo estudo, 40x.

De forma geral, os dados obtidos a partir da análise histológica indicam que o composto AG-metabólito 5, na dose testada (10 mg/kg), provocou alterações teciduais leves a moderadas, predominantemente no fígado e nos rins, sem presença de sinais inflamatórios severos ou degenerativos.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no ensaio de toxicidade subcrônica em camundongos *Swiss* machos proporcionam dados relevantes sobre o perfil de segurança do bioconjugado AG-FALALKALKKALKKL-COOH, composto promissor para tratamento antiviral contra flavivírus.

Os sinais clínicos transitórios de dor e desconforto observados imediatamente após aplicação do composto foram rapidamente revertidos, o que pode ser atribuído a resposta inflamatória aguda no local da administração, comum por se tratar de via intraperitoneal. Durante todo o período de 90 dias, o grupo controle e estudo apresentaram comportamento normal, sem indícios de sinais de toxicidade.

O monitoramento do peso dos animais, conforme recomendado pelo Guia para a Condução de Estudos Não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos (ANVISA, 2013), demonstra alterações ao longo do tempo, os animais do grupo estudo apresentaram discreta variação na curva de peso em comparação ao grupo controle (figura 9) e aumento visível no acúmulo de gordura visceral (figura 10 e 11), este achado pode sugerir possíveis alterações no metabolismo lipídico. No ensaio bioquímico foi detectada diminuição nos níveis de colesterol total no grupo estudo (tabela 3), sendo um parâmetro relevante para monitoramento em futuros estudos pois a literatura aponta que peptídeos bioativos podem interferir na regulação lipídica (Ma *et al.*, 2023).

O marcador de função hepática ALT apresentou discreta elevação no grupo estudo, enquanto o marcador AST apresentou diminuição, não sendo possível inferir dado nas células hepáticas a partir destes resultados.

Para a investigação de possíveis danos renais, o discreto aumento nos níveis de creatinina e ureia observados no grupo estudo pode sugerir um efeito adverso, ainda que leve. No entanto, os demais parâmetros relacionados à função renal, como albumina e proteínas totais, apresentaram diminuição. Esse achado indica que as variações detectadas podem representar um evento isolado ou pontual, o que reforça a necessidade de ampliação do tamanho amostral em estudos futuros, de modo a garantir maior robustez estatística e confiabilidade dos resultados.

A redução dos níveis de colesterol total observada no grupo tratado, quando analisada em conjunto com o aumento de gordura visceral, sugere um possível desequilíbrio no metabolismo lipídico induzido pela administração do bioconjugado. Embora o acúmulo de gordura visceral esteja classicamente associado ao aumento dos níveis circulantes de colesterol, estudos apontam que compostos bioativos, como peptídeos, podem modular vias metabólicas específicas, interferindo na síntese, captação ou redistribuição lipídica entre tecidos. Nesse contexto, a diminuição do colesterol sérico pode refletir uma maior captação pelas células adiposas ou uma inibição parcial da síntese hepática de colesterol, associada ao efeito do composto. Além disso, pequenas alterações em parâmetros hepáticos, como a elevação discreta da ALT e a redução da albumina sérica, podem indicar uma resposta adaptativa do fígado, órgão central no metabolismo lipídico, à exposição ao bioconjugado. Esses achados, embora não conclusivos quanto à toxicidade hepática ou dislipidemia, reforçam a necessidade de estudos adicionais que explorem em maior profundidade o impacto metabólico do AG-metabólito 5, especialmente em modelos de exposição prolongada ou em diferentes perfis fisiológicos.

A avaliação histopatológica permitiu a identificação de alterações compatíveis com toxicidade leve a moderada, predominantemente no fígado e nos rins, causadas pela administração do bioconjugado (grupo estudo). No baço destes animais, foi observada leve desorganização e aumento da celularidade na polpa branca, indicando leve dano no tecido e possível relação com estimulação imunológica, sem evidência de toxicidade. No fígado, a identificação de balonização das células hepáticas, congestão sinusoidal e inflamação mononuclear discreta caracterizam lesão hepatocelular inflamatória discreta, com intensidade moderada. Enquanto no rim, a presença de hiper celularidade glomerular, infiltrado intersticial discreto e leve dilatação tubular indicam lesão tubular e inflamação leve a moderada. A ausência de sinais inflamatórios ou degenerativos severos reforça a hipótese de que tais alterações representam uma resposta fisiológica adaptativa, e não necessariamente um indicativo de dano.

Em síntese, o bioconjugado, apesar de apresentar sinais transitórios de desconforto após administração, não possui evidências claras de toxicidade grave na dose de 10 mg/kg em camundongos *Swiss* machos, com idade entre

8 e 10 semanas. Para consolidar o perfil de segurança antes da transição para estudos clínicos, ainda são necessários novos ensaios com maior amostragem, extensão para outros modelos animais, acompanhamento crônico (até 1 ano) e análise hematológica.

Ainda, vê-se necessário para melhor investigação, que o laboratório determine um conjunto próprio de valores de referências dos animais devido diversos fatores que podem interferir na composição sanguínea dos animais que limitam a análise de modificações induzidas por processos patológicos, como sexo, idade, linhagem, alimentação, ambiente e manuseio (Lima, 2018; Wolford *et al.*, 1986).

Os resultados fortalecem o uso da dose de 10 mg/kg como dose segura do bioconjugado AG-metabólito 5 para ensaios *in vivo*, com administração via intraperitoneal, indicando danos leves nos tecidos principais (rim, fígado e baço), com alterações metabólicas superficiais.

REFERÊNCIAS

ALI, S. *et al.* Environmental and Social Change Drive the Explosive Emergence of Zika Virus in the Americas. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 2, p. e0005135, feb. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005135>. Acesso em: 08 jul. 2025.

AMARAL, C. G. **Avaliação do potencial antiviral e toxicidade do bioconjugado AG-FALALKALKKALKKL-COOH em modelo murino.** Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP, Araraquara, 2024.

ANVISA. **Guia para a Condução de Estudos Não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos.** V. 2. Brasília: 2013. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/medicamentos/pesquisa-clinica/manuais-e-guias>. Acesso em: 02 jul. 2025.

ARAÚJO, L. J. T., *et al.* Surveillance of hemorrhagic fever and/or neuroinvasive disease: challenges of diagnosis. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, Brasil, v. 55, p. 41, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/s1518-8787.2021055003068>. Acesso em: 07 jul. 2025.

BATISTA, M. N., *et al.* GA-Hecate antiviral properties on HCV whole cycle represent a new antiviral class and open the door for the development of broad spectrum antivirals. **Scientific Reports**, v. 8, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32176-w>. Acesso em: 07 jul. 2025.

BRASIL. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1o do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais [...]. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, p. 1-2, 09 out. 2008. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm. Acesso em: 07 jul. 2025.

CAVAGNARO, J. A. Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals. **Nature Reviews Drug Discovery** **1**, p. 469–475, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrd822>. Acesso em 08 jul. 2025.

CHALA, B.; HAMDE, F. Emerging and Re-emerging Vector-Borne Infectious Diseases and the Challenges for Control: A Review. **Frontiers in public health**, v. 9, p. 715759, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.715759>. Acesso em 08 jul. 2025.

DRUCKER, D. J. Advances in oral peptide therapeutics Nature Reviews Drug Discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, p. 277–289, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0053-0>. Acesso em: 08 jul. 2025.

LEUR, S. W. VAN, *et al.* Pathogenesis and virulence of flavivirus infections. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 2814 – 2838, dez. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1996059>. Acesso em: 08 jul. 2025.

LIMA, F. E. G. **Perfil bioquímico e hematológico de ratos e camundongos do biotério central da Universidade Federal do Ceará**. 2018. 75 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Farmacologia Clínica) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018. Disponível em: <http://repositorio.ufc.br/handle/riufc/32198>. Acesso em 09 jul. 2025.

LIMA-CAMARA, T. N. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. **Revista Saúde Pública**, 50, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1518-8787.2016050006791>. Acesso em: 07 jul. 2025.

MA, W., *et al.* Research progress in lipid metabolic regulation of bioactive peptides. **Food Production Processing and Nutrition**, 5, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s43014-022-00123-y>. Acesso em: 09 jul. 2025.

MEDEIROS, D. B. A.; VASCONCELOS, P. F. C. Is the brazilian diverse environment is a crib for the emergence and maintenance of exotic arboviruses? **Academia Brasileira de Ciências**. 91, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920190407>. Acesso em: 06 jul. 2025.

ROBINSON, N. B., *et al.* The current state of animal models in research: A review. **International Journal of Surgery**, v. 72, p. 9 – 13, 1 dez. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijsu.2019.10.015>. Acesso em: 04 jul. 2025.

SANCHES, P. R. S., *et al.* Antiviral Evaluation of New Synthetic Bioconjugates Based on GA-Hecate: A New Class of Antivirals Targeting Different Steps of Zika Virus Replication. **Molecules**, v. 28, n. 13, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules28134884>. Acesso em: 07 jul. 2025.

TESAURO, D., *et al.* Peptide-based drug-delivery systems in biotechnological applications: Recent advances and perspectives. **Molecules**, v. 24, n. 2, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules24020351>. Acesso em: 04 jul. 2025.

VIGLIETTA, M., *et al.* Vector Specificity of Arbovirus Transmission. **Frontiers in microbiology**, v. 12, p. 773211, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.773211>. Acesso em: 08 jul. 2025.

WHO. Vector-borne diseases. **World Health Organization**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>. Acesso em: 7 jul. 2025.

WOLFORD, S. T., *et al.* Reference range data base for serum chemistry and hematology values in laboratory animals. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 18, n. 2, p. 161 – 188, jan. 1986. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3712484/>. Acesso em: 08 jul. 2025.

YU, X.; CHENG, G. Adaptive Evolution as a Driving Force of the Emergence and Re-Emergence of Mosquito-Borne Viral Diseases. **Viruses**, v. 14, n. 2, 21 fev. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/v14020435>. Acesso em: 08 jul. 2025.