



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

AMANDA OLÍMPIA DA SILVA

**USO DE ABORDAGENS COMPUTACIONAIS INTEGRADAS PARA
OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS A
PARTIR DE INIBIDORES DE PROTEASES DE PLANTAS**

FORTALEZA
2025

AMANDA OLÍMPIA DA SILVA

USO DE ABORDAGENS COMPUTACIONAIS INTEGRADAS PARA
OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS A
PARTIR DE INIBIDORES DE PROTEASES DE PLANTAS

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica do Centro de Ciências,
da Universidade Federal do Ceará,
como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em
Bioquímica. Área de
concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Hermógenes
David de Oliveira.

FORTALEZA

2025

AMANDA OLÍMPIA DA SILVA

USO DE ABORDAGENS COMPUTACIONAIS INTEGRADAS PARA
OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS A
PARTIR DE INIBIDORES DE PROTEASES DE PLANTAS

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica do Centro de Ciências,
da Universidade Federal do Ceará,
como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em
Bioquímica. Área de
concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Hermógenes
David de Oliveira.

Aprovada em 30/05/2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Claudener Souza Teixeira
Universidade Federal do Cariri (UFCA)

Profa. Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Souza
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, Marta e Francisco.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e a oportunidade de viver essa experiência acadêmica durante esses dois anos.

A minha família por todo apoio, renúncia e sacrifícios que fizeram em nome dos meus estudos.

Aos meus amigos de faculdade por todo suporte, emocional e científico, que foi essencial durante esta trajetória.

Aos meus amigos externos à universidade que apesar da distância me apoiaram cada um à sua maneira.

A Universidade Federal do Ceará por todo suporte estrutural e educativo para o andamento e conclusão do mestrado. E a Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro durante os 24 meses.

Ao Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira, pela excepcional orientação.

Aos professores participantes da Banca examinadora, Profa. Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Souza e Prof. Dr. Claudener Souza Teixeira, pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes. (Marthin Luther King)

RESUMO

Infecções bacterianas graves compõem uma questão de saúde mundial e inibidores de proteases de plantas apresentam a capacidade de inibir ou regular proteases envolvidas na progressão de diversas doenças. O objetivo deste trabalho foi utilizar métodos computacionais de maneira integrada para a descoberta de peptídeos antimicrobianos com potencial para uso clínico futuro, a partir de inibidores de proteases de plantas. Para isto, duas abordagens foram utilizadas: na primeira metodologia os peptídeos foram gerados a partir da hidrólise da sequência aminoacídica dos inibidores e na segunda através da prospecção de fragmentos com potencial antimicrobiano com base em regiões conservadas. Para avaliação do potencial antimicrobiano foi utilizado a média de escores das plataformas CAMPR4, AI4AMP e HydrAMP e com os analisados promissores foram construídas bibliotecas de variantes utilizando a plataforma Scramble para avaliar de maneira ampla o potencial desses peptídeos. Além disso, foram feitas caracterizações quanto aos parâmetros físico-químicos com o auxílio de ferramentas como APD3, Heliquest, Expasy; foram analisados parâmetros biológicos como potencial antigênico, hemolítico, tóxico, capacidade de inibição de biofilme, antioxidante e susceptibilidade enzimática dos peptídeos por meio de plataformas como AnOxPP, HemoPI2.0, ToxinPred3; já nos parâmetros farmacocinéticos foi avaliado a absorção pelo intestino humano e o metabolismo pelas isoformas da enzima CYP450 através da plataforma ADMETSar; características estruturais também foram avaliados por meio do Pepfold3.5. Como resultado, foi obtido um total de 17 (7,32%) peptídeos e 24 (40%) variantes com potencial antimicrobiano na primeira abordagem; já na segunda os resultados encontrados foram de 6 (100%) e 17 (85%) analisados com potencial antimicrobiano, respectivo aos peptídeos e suas variantes; todos esses 64 peptídeos foram caracterizados segundo os parâmetros já citados. Espera-se oferecer informações importantes para o uso de peptídeos advindos de inibidores de proteases vegetais como possíveis candidatos em testes *in vitro* e *in vivo* para uso clínico.

Palavras-chave: inibidores de proteases; peptídeos antimicrobianos; resistência microbiana; peptídeos terapêuticos.

ABSTRACT

Serious bacterial infections are a global health issue, and plant protease inhibitors have the ability to inhibit or regulate proteases involved in the progression of several diseases. The aim of this work was to use computational methods in an integrated manner to discover antimicrobial peptides with potential for future clinical use, from plant protease inhibitors. For this, two approaches were used: in the first methodology, the peptides were generated from the hydrolysis of the amino acid sequence of the inhibitors and in the second through the prospecting of fragments with antimicrobial potential based on conserved regions. To evaluate the antimicrobial potential, the average scores of the CAMPR4, AI4AMP and HydrAMP platforms were used, and with the promising analyzes, libraries of variants were constructed using the Scramble platform to broadly evaluate the potential of these peptides. In addition, characterizations were performed regarding the physicochemical parameters with the aid of tools such as APD3, Heliquest, Expasy; Biological parameters such as antigenic, hemolytic, toxic potential, biofilm inhibition capacity, antioxidant and enzymatic susceptibility of the peptides were analyzed through platforms such as AnOxPP, HemoPI2.0, ToxinPred3; in the pharmacokinetic parameters, absorption by the human intestine and metabolism by CYP450 enzyme isoforms were evaluated through the ADMETSar platform; structural characteristics were also evaluated through Pepfold3.5. As a result, a total of 17 (7.32%) peptides and 24 (40%) variants with antimicrobial potential were obtained in the first approach; in the second, the results found were 6 (100%) and 17 (85%) analyzed with antimicrobial potential, respective to the peptides and their variants; All of these 64 peptides were characterized according to the parameters already mentioned. It is expected to offer important information for the use of peptides derived from plant protease inhibitors as possible candidates in in vitro and in vivo tests for clinical use.

Keywords: protease Inhibitors, antimicrobial peptides, antimicrobial resistance, therapeutic peptides.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Visão geral dos mecanismos de captação e integração de DNA por bactérias nos processos de aquisição de resistência.	18
Figura 2 - Classificação dos peptídeos antimicrobianos quanto a fonte, atividade, estrutura e espécie aminoacídica mais abundante.	22
Figura 3 - Estruturas tridimensionais dos peptídeos gerados a partir da hidrólise de inibidores de proteases vegetais.	60
Figura 4 - Estruturas tridimensionais dos peptídeos gerados a partir da prospecção de fragmentos conservados de inibidores de proteases vegetais.	63
Figura 5 - Estruturas tridimensionais das variantes dos peptídeos gerados a partir da hidrólise de inibidores de proteases vegetais.	79
Figura 6 - Estruturas tridimensionais das variantes dos peptídeos gerados a partir da prospecção de fragmentos conservados de inibidores de proteases vegetais.	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação das características de peptídeos antimicrobianos e antibióticos.	25
Tabela 2 - Plataformas de predição de peptídeos antimicrobianos.	33
Tabela 3 - Inibidores de proteases de origem vegetal com estrutura tridimensional resolvida.	38
Tabela 4 - Peptídeos gerados a partir da hidrólise de inibidores de proteases vegetais.	43
Tabela 5 - Peptídeos gerados a partir da predição de sequências antimicrobianas conservadas dos inibidores de proteases de acordo com a plataforma PyAMPA.	45
Tabela 6 - Avaliação do potencial antimicrobiano dos peptídeos obtidos a partir da hidrólise de inibidores de proteases vegetais.	45
Tabela 7 - Avaliação do potencial antimicrobiano dos peptídeos obtidos a partir da prospecção de fragmentos conservados de inibidores de proteases vegetais.	48
Tabela 8 - Propriedades físico-químicas dos peptídeos obtidos a partir da hidrólise de inibidores de proteases vegetais.	49
Tabela 9 - Propriedades físico-químicas dos peptídeos obtidos a partir da prospecção de fragmentos conservados de inibidores de proteases vegetais.	49
Tabela 10 - Potencial hemolítico, antigênico e tóxico dos peptídeos obtidos a partir da hidrólise de inibidores de proteases vegetais.	50
Tabela 11 - Potencial antioxidante dos peptídeos obtidos a partir da hidrólise de inibidores de proteases vegetais.	52
Tabela 12 - Potencial de inibição de biofilme dos peptídeos obtidos a partir da hidrólise de inibidores de proteases vegetais.	54
Tabela 13 - Susceptibilidade enzimática dos peptídeos obtidos a partir da hidrólise de inibidores de proteases vegetais.	55

Tabela 14 - Potencial hemolítico, antigênico e tóxico dos peptídeos obtidos a partir da prospecção de fragmentos conservados de inibidores de proteases vegetais.	57
Tabela 15 - Potencial antioxidante dos peptídeos obtidos a partir da prospecção de fragmentos conservados de inibidores de proteases vegetais.	57
Tabela 16 - Potencial de inibição de biofilme dos peptídeos obtidos a partir da prospecção de fragmentos conservados de inibidores de proteases vegetais.	57
Tabela 17 - Susceptibilidade enzimática dos peptídeos obtidos a partir da prospecção de fragmentos conservados de inibidores de proteases vegetais.	58
Tabela 18 - Propriedades farmacocinéticas dos peptídeos obtidos a partir da hidrólise de inibidores de proteases vegetais.	59
Tabela 19 - Propriedades farmacocinéticas dos peptídeos obtidos a partir da prospecção de fragmentos conservados de inibidores de proteases vegetais.	59
Tabela 20 - Variantes geradas a partir do embaralhamento das sequências de peptídeos com potencial antimicrobiano <i>in silico</i> gerados pela hidrólise de inibidores de proteases vegetais.	61
Tabela 21 - Biblioteca de variantes geradas a partir dos peptídeos antimicrobianos mais promissores obtidos pela prospecção de fragmentos conservados de inibidores de proteases vegetais.	62
Tabela 22 - Avaliação do potencial antimicrobiano das variantes dos peptídeos gerados a partir da hidrólise de inibidores de proteases vegetais.	63
Tabela 23 - Avaliação do potencial antimicrobiano das variantes dos peptídeos gerados a partir da prospecção de fragmentos conservados de inibidores de proteases vegetais.	65
Tabela 24 - Propriedades físico-químicas das variantes dos peptídeos gerados a partir da hidrólise de inibidores de proteases vegetais.	65
Tabela 25 - Propriedades físico-químicas das variantes dos peptídeos gerados a partir da prospecção de fragmentos conservados de inibidores de proteases vegetais.	67

Tabela 26 - Potencial hemolítico, antigênico e tóxico das variantes dos peptídeos obtidos a partir da hidrólise de inibidores de proteases vegetais.	68
Tabela 27 - Potencial antioxidante das variantes dos peptídeos obtidos a partir da hidrólise de inibidores de proteases vegetais.	70
Tabela 28 - Potencial de inibição de biofilme das variantes dos peptídeos obtidos a partir da hidrólise de inibidores de proteases vegetais.	71
Tabela 29 - Susceptibilidade enzimática das variantes dos peptídeos obtidos a partir da hidrólise de inibidores de proteases vegetais.	72
Tabela 30 - Potencial hemolítico, antigênico e tóxico das variantes dos peptídeos gerados a partir da prospecção de fragmentos conservados de inibidores de proteases vegetais.	73
Tabela 31 - Potencial antioxidante das variantes dos peptídeos gerados a partir da prospecção de fragmentos conservados de inibidores de proteases vegetais.	73
Tabela 32 - Potencial de inibição de biofilme das variantes dos peptídeos gerados a partir da prospecção de fragmentos conservados de inibidores de proteases vegetais.	74
Tabela 33 - Susceptibilidade enzimática das variantes dos peptídeos gerados a partir da prospecção de fragmentos conservados de inibidores de proteases vegetais.	75
Tabela 34 - Características farmacocinéticas das variantes dos peptídeos obtidos a partir da hidrólise de inibidores de proteases vegetais.	76
Tabela 35 - Características farmacocinéticas das variantes dos peptídeos gerados a partir da prospecção de fragmentos conservados de inibidores de proteases vegetais.	78

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ABP	Peptídeo Antibacteriano
ACP	Peptídeo Anticarcinogênico
ADMET	Absorção, Digestão, Metabolismo, Excreção e Toxicidade
AFP	Peptídeo Antifúngico
AMP	Peptídeo Antimicrobiano
ANN	Artificial Neural Network
AVP	Peptídeo Antiviral
CNN	Convolutional Neural Network
CYP	Citocromo P
DL	Deep Learning
DNA	Deoxyribonucleic Acid
ESKAPE	Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa e Enterobacter spp
GNN	Graph Neural Network
GTA	Gene Transfer Agents
IP	Inibidor de Protease
ICE	Integrative Conjugative Elements
MEC	Matriz Extracelular
ML	Machine Learning
MRSA	Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus
NN	single-layer Neural Network
PDB	Protein Data Bank
pI	Potencial Isoelétrico
pH	Potencial Hidrogeniônico
RecA	Recombinase A
RF	Random Forest
ROS	Reactive Oxygen Species
RNA	Ribonucleic Acid
sOPEP	Optimized Potential for Efficient structure Prediction Score
SVM	Support Vector Machine
OMS	Organização Mundial da Saúde

Tm	Template Modeling
VRE	Vancomycin-Resistant Enterococcus

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Resistência antimicrobiana como um desafio global	16
1.2	Peptídeos antimicrobianos	20
1.2.1	<i>Atividade Antimicrobiana</i>	20
1.2.2	<i>Vantagens e Limitações do uso de AMPs</i>	23
1.2.3	<i>Fatores potencializadores da atividade antimicrobiana e considerações para a aplicação clínica de AMPs</i>	26
1.3	Obtenção de peptídeos a partir de proteínas vegetais	28
1.3.1	<i>Inibidores de proteases vegetais</i>	28
1.3.2	<i>IPs vegetais como fontes de peptídeos</i>	30
1.4	Abordagens <i>in silico</i> na análise de peptídeos	31
1.4.1	<i>Bioinformática e a descoberta de novos fármacos</i>	31
1.4.2	<i>Ferramentas para a caracterização de peptídeos</i>	33
1.4.2.1	<i>Predição de propriedades bioquímicas e estruturais</i>	35
1.4.2.4	<i>Predição de propriedades biológicas e farmacocinéticas</i>	35
2	OBJETIVOS	37
2.1	Objetivo geral	37
2.2	Objetivos específicos	37
3	METODOLOGIA	38
3.1	Inibidores de protease utilizados no estudo	38
3.2	Abordagens de obtenção dos peptídeos antimicrobianos	39
3.3	Análise do potencial antimicrobiano <i>in silico</i> dos AMPs obtidos	39
3.4	Caracterização computacional integrada dos AMPs	39
3.4.1	<i>Caracterização físico-química</i>	39
3.4.2	<i>Caracterização biológica</i>	40
3.4.3	<i>Caracterização farmacocinética</i>	40
3.4.4	<i>Caracterização estrutural</i>	41
3.5	Biblioteca de variantes dos peptídeos antimicrobianos mais promissores	41
3.5.1	<i>Caracterização computacional integrada das variantes geradas</i>	41
4	RESULTADOS	42
4.1	Abordagens de criação dos peptídeos antimicrobianos	42

4.2	Análise do potencial antimicrobiano <i>in silico</i> dos peptídeos gerados	45
4.3	Caracterização computacional integrada dos AMPs	48
4.3.1	<i>Caracterização físico-química</i>	48
4.3.2	<i>Caracterização biológica</i>	50
4.3.3	<i>Caracterização farmacocinética</i>	58
4.3.4	<i>Caracterização estrutural</i>	60
4.4	Biblioteca de variantes dos peptídeos antimicrobianos mais promissores ...	61
4.4.1	<i>Potencial antimicrobiano das variantes obtidas</i>	62
4.4.2	<i>Caracterização computacional integrada das variantes geradas</i>	65
4.4.2.1	<i>Caracterização físico-química</i>	65
4.4.2.2	<i>Caracterização biológica</i>	68
4.4.2.3	<i>Caracterização farmacocinética</i>	76
4.4.2.4	<i>Caracterização estrutural</i>	78
5	DISCUSSÃO	82
6	CONCLUSÃO	87
	REFERÊNCIAS	88

1 INTRODUÇÃO

1.1. Resistência antimicrobiana como um desafio global

O termo antibiótico se refere a uma classe de substâncias que influenciam processos bioquímicos cruciais de organismos microbianos, como o crescimento e a divisão celular, podendo até levar à morte da célula em alguns casos (Brown e Wright, 2016). A introdução em larga escala da penicilina, um metabólito de origem fúngica, na primeira metade do século XX, marcou um ponto de virada na história médica, estabelecendo o medicamento como a primeira solução eficaz para o combate de infecções bacterianas. Esse avanço catalisou o desenvolvimento de novas pesquisas para a criação de antibióticos, especialmente à medida que novas bactérias eram identificadas, visando reduzir as altas taxas de mortalidade associadas a essas infecções (Vincent e Ramírez, 2024).

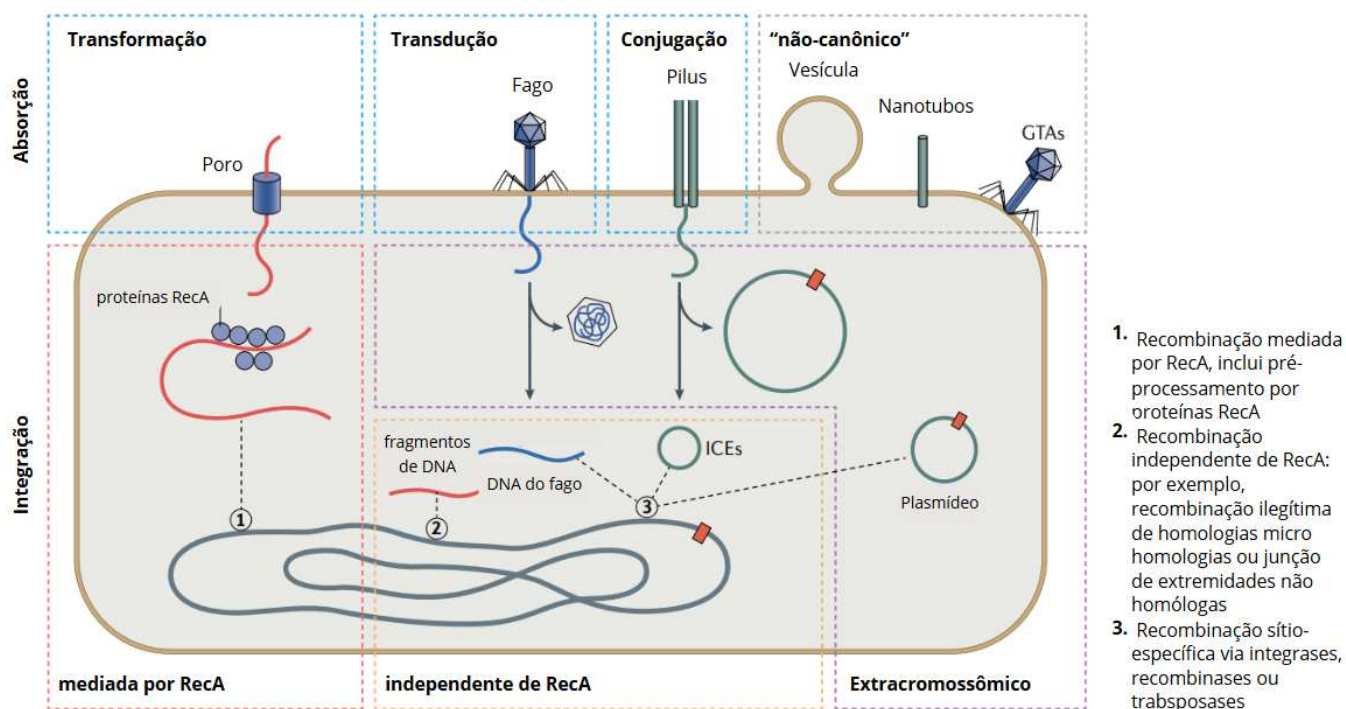
A fase moderna da medicina trouxe à tona a resistência crescente a antibióticos, com o surgimento de cepas multirresistentes que são resistentes a pelo menos três classes de antibióticos e são responsáveis pelas infecções mais difíceis de tratar (Nwobodo et al, 2022). A Organização Mundial da Saúde (OMS) identificou um grupo crítico de patógenos que necessitam urgentemente de novas estratégias de combate, conhecidos pelo acrônimo ESKAPE: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp.* (Mulani et al, 2019).

Nos últimos anos, a pandemia de COVID-19 teve um impacto significativo nesse setor, levando ao aumento do uso e, consequentemente, à busca por antibióticos. A introdução de medicamentos específicos contra *Staphylococcus aureus* resistente à metilina e *Enterococcus* resistente à vancomicina (do inglês, MRSA e VRE), a crescente carga de doenças infecciosas, o envelhecimento da população e a demanda por antibióticos novos e eficazes têm impulsionado o mercado, que deve alcançar US\$ 65,22 bilhões até 2029, partindo de US\$ 53,43 bilhões em 2024. Contudo, a resistência aos antibióticos e a diminuição no número de empresas dedicadas à pesquisa podem restringir o crescimento desse mercado, apesar das necessidades emergentes (Mordor intelligence, 2024).

Objetivando tornar mais claro o conceito de resistência microbiana e sua complexidade, é possível dizer que do ponto de vista mecanístico, os antibióticos podem ser classificados como: inibidores da síntese da parede celular; inibidores da função ribossomal (síntese proteica); inibidores da síntese de ácidos nucleicos (DNA e RNA); inibidores do metabolismo do ácido fólico; inibidores da integridade da membrana celular (Upmanyu e Malviya, 2020). A resistência a esses compostos é uma das principais causas de falhas no tratamento de doenças infecciosas e ocorre por meio da expressão de genes que desencadeiam mecanismos de defesa contra os medicamentos. A resistência pode ser intrínseca, onde uma bactéria já possui mecanismos naturais de proteção, ou adquirida, resultante de mutações genéticas ou da aquisição de genes de resistência de outras bactérias por bacteriófagos ou transformação (Reygaert, 2018).

Ainda no que tange a resistência, a maneira mais comum de ser estabelecida é por meio da transferência horizontal de genes (Thomas e Neilsen, 2005). A fase inicial desse processo diz respeito a absorção de DNA exógeno pela membrana bacteriana, podendo ocorrer de várias maneiras, dentre elas, as mais comuns são a transformação, conjugação e transdução. A transformação é definida pela absorção de DNA do ambiente; a conjugação frequentemente transfere plasmídeos e outros elementos conjugativos por contato direto através de um *pilus* conjugativo; a transdução depende da transferência de DNA permeada por um fago, que pode se replicar e se reembalar em novas partículas ou se integrar ao cromossomo do hospedeiro (**Figura 1**) (Arnold, Huang e Hanage, 2021).

Figura 1. Visão geral dos mecanismos de captação e integração de DNA por bactérias nos processos de aquisição de resistência. GTAs - agentes de transferência de genes semelhantes a fagos; RecA - recombinase que atua no reparo recombinacional do DNA em bactérias; ICEs - elementos conjugativos integrativos.



Fonte: Traduzido de Arnold, Huang e Hanage, 2021.

As pressões ambientais seletivas também forçam as bactérias a se adaptarem, alterando seu estado de crescimento e isso pode refletir na formação de biofilmes, que são encontrados em quase 90% das bactérias patogênicas para humanos (Shinde et al, 2021). O biofilme é uma agregação tridimensional e multicelular de bactérias, aderida a superfícies e incorporada em uma matriz extracelular (MEC). Essa formação é uma estratégia fisiológica e regulatória das bactérias, pois oferece resistência a tratamentos antimicrobianos e ao sistema imunológico do hospedeiro. Estima-se que 65% a 80% das infecções microbianas e crônicas, respectivamente, estejam associadas a biofilmes bacterianos (Romling et al, 2014). Além disso, infecções bacterianas recorrentes são frequentemente causadas pela persistência dos biofilmes, sendo que atualmente os organismos do grupo ESKAPE são os principais responsáveis por infecções crônicas associadas a biofilmes

multirresistentes e o tratamento dessas infecções está se tornando cada vez mais desafiador, representando, assim, um risco significativo para a saúde humana (Patil et al, 2021).

A tolerância, por outro lado, é a habilidade dos microrganismos de suportar ou sobreviver a antibióticos em concentrações acima da inibitória por um determinado período. Esse mecanismo adaptativo envolve uma mudança temporária no comportamento celular, onde as células passam de um estado ativo para um estado dormente ou inativo. Durante o estado de tolerância, ocorrem alterações significativas na produção de energia e em diversas funções celulares, sendo visíveis em condições inadequadas de crescimento, baixa concentração de antibióticos ou em uma situação de estresse (Wilmaerts et al, 2019). O sequestro de antibióticos na matriz extracelular, sem atingir o alvo, pode também desencadear a tolerância resultando na dormência ou ausência de crescimento das células bacterianas. A persistência é uma forma de tolerância: as células persistentes são capazes de sobreviver à ação dos antibióticos, mas podem ser eliminadas com exposição prolongada (Hall e Mah, 2017). Essas células podem surgir de forma induzida, em resposta ao estresse ou condições ambientais ou de maneira espontânea devido a processos estocásticos, sendo também conhecida como hetero tolerância. A resistência mediada por biofilme representa uma forma complexa de resistência, que envolve os mecanismos de resistência a antibióticos e os de tolerância. Além disso, fatores como as cepas e espécies bacterianas, os agentes antimicrobianos, o estado de desenvolvimento e condições de crescimento do biofilme influenciam grandemente o processo (Arzanlou et al, 2017).

Os mecanismos de resistência podem ser classificados de acordo com a forma como inativam os antibióticos: primeiro, pela produção de enzimas que degradam ou modificam o medicamento, como as beta lactamases que inativam penicilinas em *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*; segundo, pela redução da permeabilidade da membrana externa, exemplificado pela perda da porina D2 em *Pseudomonas aeruginosa* resistente ao antibiótico imipeném; terceiro, pelo aumento da atividade de sistemas de efluxo que removem o antibiótico da célula, como observado em *S. aureus* resistente a tetraciclina; quarto, pela alteração do sítio de ligação do antibiótico, como na menor afinidade da penicilina em MRSA e *Streptococcus pneumoniae*; e

quinto, pelo desvio da inibição antibiótica e superprodução do alvo do fármaco, como em bactérias expostas ao sulfametoxazol/trimetoprima (Kapoor, Saigal e Elongavan, 2017; Saikia e Chetia, 2024). A mortalidade associada a infecções causadas por cepas resistentes pode ser pelo menos duas vezes maior do que aquela causada por cepas sensíveis, evidenciando a importância de uma escolha acertada do tratamento (Daneman et al, 2023). O desenvolvimento de alternativas com menos efeitos adversos e a implementação de medidas para conter a dispersão dessas bactérias resistentes são cruciais, envolvendo desde a pesquisa e desenvolvimento de drogas até políticas de saúde pública.

Para combater a resistência antimicrobiana, os cientistas estão explorando diversas abordagens, como a combinação e administração direcionada de antibióticos (Wang et al., 2022), o uso de nanopartículas (Makabenta et al., 2021), fagos (Hatfull et al., 2022) , sensibilizadores antimicrobianos (LI et al., 2023) e peptídeos antimicrobianos (Liu et al., 2021). Cada uma destas estratégias tem vantagens e desafios, mas em conjunto representam esforços contínuos para desenvolver soluções eficazes para acompanhar as mudanças evolutivas nestes organismos resistentes.

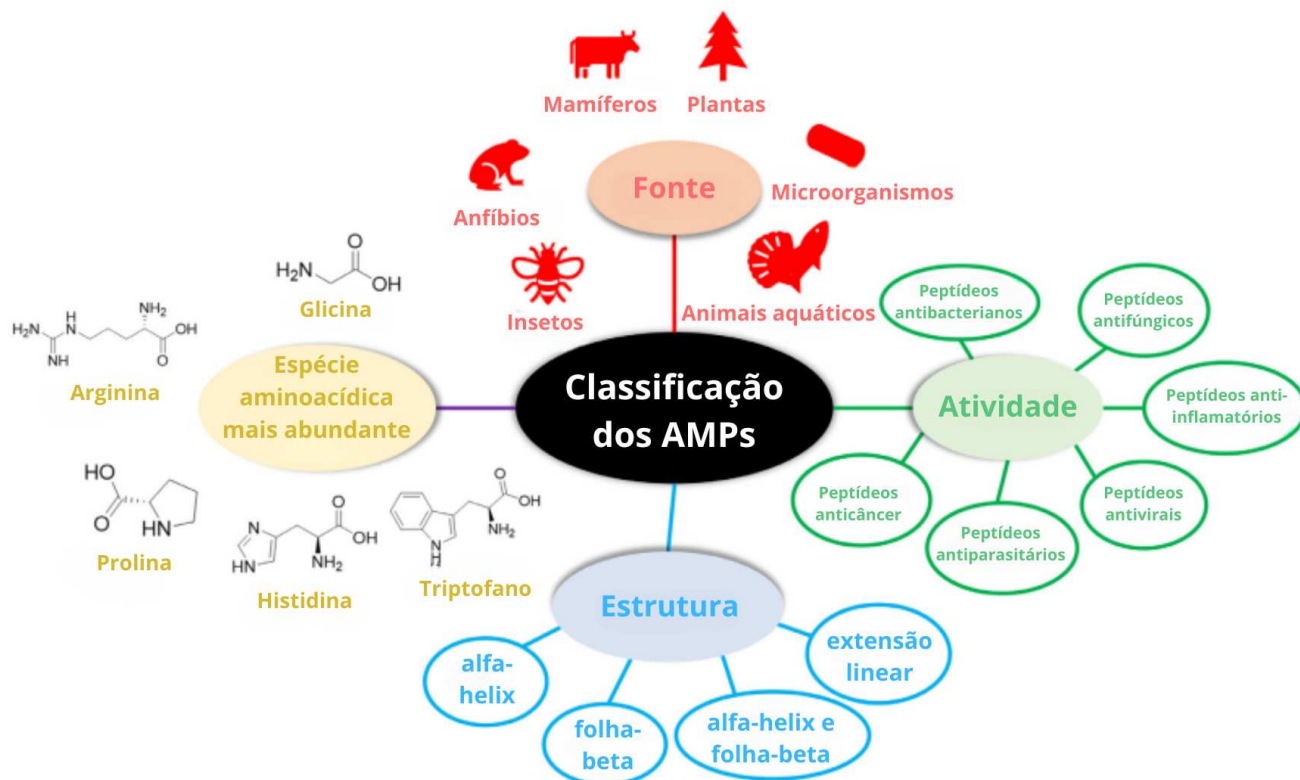
1.2 Peptídeos antimicrobianos

1.2.1. Atividade antimicrobiana

Dentro do universo das moléculas bioativas, os peptídeos antimicrobianos atuam na linha de defesa dos organismos com atividades antimicrobianas e imunomoduladoras, tanto contra bactérias infecciosas Gram positivas e Gram negativas, como fungos, vírus, entre outros. Frente a problemática do uso indiscriminado e diminuição da eficácia dos medicamentos antibióticos, os AMPs (do inglês, *Antimicrobial Peptides*) surgem como uma alternativa terapêutica e já conta com mais de 60 drogas peptídicas que chegaram ao mercado e várias centenas de novos peptídeos terapêuticos estão em desenvolvimento pré-clínico e clínico (Ventura e Neto, 2023). Diferentemente dos seres humanos, eucariotos como plantas e invertebrados não possuem imunidade adaptativa/adquirida (resposta imune gerada pela exposição aos patógenos). Por isso, os peptídeos antimicrobianos têm um papel fundamental na defesa dessas espécies, compondo o sistema imunológico inato desses organismos (Borzi, 2016; Nozaki e Izumi, 2023).

Podem ser classificados de várias maneiras quanto a sua fonte, atividade ou espécie aminoacídica mais abundante como mostrado (**Figura 2**). Dentre estas a mais comum é a classificação quanto à atividade, sendo ela dividida em: peptídeos antibacterianos (ABPs, do inglês *antibacterial peptides*) que representam uma grande parcela dos AMPs e tem como alvo, por exemplo, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella* e *Vibrio parahaemolyticus* (Pimchan et al, 2023); peptídeos antifúngicos (AFPs, do inglês *antifungal peptides*) que possuem efeito inibitório contra fungos mais resistentes a drogas terapêuticas e atuam em patógenos como *Aspergillus*, *Candida albicans* e *Aspergillus flavus* (Decker et al, 2022); peptídeos antivirais (AVPs, do inglês *antiviral peptides*) que inibem a ligação do vírus e sua fusão com a membrana da célula, ou mesmo o envelope nuclear viral e inibindo o processo de replicação (Urmi et al, 2023); peptídeos antiparasitários que podem matar ou inibir organismos parasitas responsáveis por doenças como malária e leishmaniose (Talapko et al, 2022); peptídeos anticancerígenos (ACPs, do inglês *anticarcinogenic peptides*) que são importantes para o desenvolvimento de novas drogas anticâncer, com efeito oncolítico que ocorre por meio de mecanismo membranolíticos ou não-membranolíticos (Zhang e Yang, 2022).

Figura 2 - Classificação dos peptídeos antimicrobianos quanto a fonte, atividade, estrutura e espécie aminoacídica mais abundante.



Fonte: Traduzido de - HUAN et al (2000, p. 3)

Já no que diz respeito à questão estrutural, podemos dividi-los em quatro famílias: AMPs alfa-helicoidais nos quais mudanças conformacionais ocorrem depois de interagir com a membrana alvo e separa os resíduos hidrofílicos dos hidrofóbicos, portanto o peptídeo assume uma conformação anfipática necessária para seu direcionamento na membrana celular (Marimuthu et al, 2020); AMPs folha-beta compostos por duas fitas beta com estruturas lineares adotando uma conformação similar a um grampo beta, sua atividade costuma estar ligada aos resíduos catiônicos e cadeias laterais hidrofóbicas expostas das folhas betas antiparalelas, além disso muitos desses peptídeos contêm resíduos de cisteína conservados responsáveis por estabelecer pontes dissulfeto que influenciam na sua função; há também os AMPs alfa-beta, compostos por ambas as estruturas, e interagem com membranas especializadas como membranas mitocondriais ou fúngicas; também existem os peptídeos estendidos ou de alça, que não apresentam estruturas alfa-hélice e nem folha-beta, ganhando destaque por serem ricos em aminoácidos como triptofano, glicina e prolina (Akhila et al, 2022).

A relação entre estrutura e função dos peptídeos já é relatada e discutida em vários estudos, inferindo que a modificação de parâmetros como carga, hidrofobicidade, conformação, ângulo polar e outros são determinantes para a potência e a amplitude da atividade microbiana. Nesse sentido, para o trabalho com design de peptídeos esses parâmetros estruturais são fundamentais para o êxito do trabalho, por mais que todos os aspectos dessa relação ainda não sejam completamente compreendidos (Ahmed e Hammami, 2019).

De acordo com o mecanismo de ação dos AMPs, tem como base a interação desses peptídeos com a membrana celular e sua capacidade de formar poros, podendo ser divididos nas seguintes classes mais comuns: modelo barril, onde peptídeos anfipáticos se agregam e orientam de forma que o lado catiônico fique virado para os grupos fosfatos que existem na superfície da bicamada lipídica, ao atingir a concentração ideal essas moléculas se inserem na membrana com as regiões hidrofóbicas em contato com a região apolar da membrana e as hidrofílicas expostas formando os poros; há também o modelo de poro toroidal, o peptídeo anfipático interage eletrostaticamente com a membrana fosfolipídica e se liga paralelamente a ela, separando as cabeças polares dos fosfolipídios e induzindo a dobradura para a formação dos poros toroidais, nesse poro os peptídeos e as cabeças polares dos lipídeos se alinham ao núcleo aquoso; modelo tapete, onde os peptídeos são alinhados paralelamente a bicamada lipídica mantendo contato com a parte da 'cabeça' dos lipídeos formando um tapete sobre a membrana, dependendo da concentração dessas moléculas, elas podem interromper a bicamada de uma forma similar a detergentes formando micelas ou formar furos transientes onde outros peptídeos podem também atravessar. (Kumar et al. 2018; Irazazabal, 2016). Os AMPs podem contar com diferentes mecanismos de ação, até mesmo uma combinação de mais de uma estratégia para o combate de um patógeno, sendo um somatório das características próprias do peptídeo e a composição membranar do patógeno alvo.

1.2.2 Vantagens e limitações do uso de AMPs

Peptídeos antimicrobianos naturais são relativamente seguros, sua natureza química como moléculas biologicamente ativas endógenas permite

que sejam degradados por proteases do sistema digestivo humano. Em comparação com os antibióticos tradicionais (**Tabela 1**), que têm baixa degradabilidade, os peptídeos antimicrobianos se degradam mais facilmente no ambiente e não causam problemas secundários como poluição, resistência bacteriana ou distúrbios ecológicos (Greber et al, 2020). Além disso, a síntese e secreção desses peptídeos ocorrem em resposta a sinais ambientais, possibilitando seu uso como marcadores para a mediação imunológica e aumento da imunidade do corpo. Por exemplo, as células epiteliais intestinais humanas, que atuam como uma barreira contra microrganismos, secretam diversos peptídeos antimicrobianos direcionados às bactérias patogênicas intestinais, prevenindo a superestimulação das células imunológicas no intestino e reduzindo o risco de inflamação.

Peptídeos antimicrobianos naturais são menos propensos à resistência microbiana, enquanto os antibióticos atuam em locais específicos dentro e fora da membrana celular bacteriana para exercer seu efeito, a resistência bacteriana pode se desenvolver quando há alterações nesses locais-alvo. Em comparação com os antibióticos, os peptídeos antimicrobianos apresentam vantagens, eles atuam em componentes estruturalmente conservados das membranas celulares e induzem alterações nessas membranas. Essas mudanças exigem mutações prolongadas para uma recuperação completa da estrutura da membrana, o que reduz significativamente a probabilidade de desenvolvimento de resistência bacteriana (Li et al, 2023; Ji et al, 2024).

Tabela 1 - Comparação de características de peptídeos antimicrobianos e antibióticos de modo geral.

Características	Peptídeos antimicrobianos	Antibióticos
Essência química	Peptídeos e complexos de peptídeos	Constituído principalmente por hidrocarbonetos aromáticos e seus derivados
Método de geração	Genes codificam produtos relacionados à imunidade inata sintetizados nos ribossomos são pequenas proteínas peptídicas com algum valor nutricional	Síntese mediada por enzimas de metabólitos secundários
Mecanismo de ação	Combinando a ação física de ânions e cátions para atuar nas membranas celulares ou nos alvos, os modos de ação múltiplos têm, portanto, menos probabilidade de produzir resistência a antibióticos	Bactérias podem facilmente se tornar resistentes a antibióticos por meio de mutação, ligando-se a receptores específicos na membrana celular bacteriana ou intracelular, com receptores de um tipo limitado
Imunomodulação	Envolvimento na regulação imunológica do corpo e aumento da imunidade do corpo	Uso prolongado prejudica os órgãos vitais, como o fígado e o coração, e destrói o sistema imunológico do corpo
Velocidade de ação	Ação rápida	Ação lenta
Espectro antibacteriano	O amplo espectro de inibição bacteriana é eficaz contra bactérias, fungos, patógenos e parasitas	Inibição apenas de bactérias
Biodegradação	Completamente decomponível	Incapaz de se decompor completamente
Poluição do meio ambiente	Sem poluição	Danos ao ambiente ecológico
Toxicidade	Desconhecida	Conhecida

Fonte: Traduzido de - JI et al (2024, p. 9).

Peptídeos antimicrobianos podem agir bioativamente não apenas por meio de interações com membranas celulares, mas também por meio de efeitos no metabolismo celular e interação com substâncias intracelulares. Agir por meio de múltiplos mecanismos não apenas os torna mais eficientes em termos de atividade antimicrobiana, mas também reduz a probabilidade de o microrganismo desenvolver um mecanismo de defesa. Ao contrário dos antibióticos, que podem prejudicar o sistema imunológico, os peptídeos antimicrobianos podem fortalecer os mecanismos naturais de imunomodulação no corpo (Trinidad-Calderón et al, 2021).

Em relação às desvantagens, os estudos na literatura relatam o fenômeno da resistência microbiana aos AMPs. Embora esses peptídeos não

apresentem resistência notável devido à sua interação com regiões conservadoras das membranas celulares, mutações genéticas por alguns peptídeos antimicrobianos em alvos em superfícies de células específicas podem facilitar que bactérias se tornem resistentes. Mecanismos de resistência contra peptídeos antimicrobianos podem ser agrupados em tolerância intrínseca ou tolerância induzível. Mecanismos induzíveis implicam o desenvolvimento de resistência por aquelas bactérias que eram previamente sensíveis ao agente antimicrobiano. Tal processo evolutivo pode resultar de mutações genéticas, aquisição de genes resistentes ou mutações espontâneas que dão origem à resistência. A resistência também pode ser desenvolvida por meio de diversos mecanismos, incluindo hidrólise de peptídeos por proteases, modificação em alvos de ação de peptídeos e ação com bombas de efluxo. Outros entraves se dão por meio do alto custo de produção, atividade instável, sensibilidade a proteases e pH extremo e dados de segurança toxicológica incompletos (Bucaturu e Ciobanasu, 2024).

1.2.3 Fatores potencializadores da atividade antimicrobiana e considerações para aplicação clínica de AMPs

Como já foi dito anteriormente, a relação entre estrutura e função dos peptídeos é estreita e continua sendo um foco relevante do estudo científico. Aminoácidos como triptofano, tirosina, metionina, histidina e cisteína têm sido associados tanto à atividade antimicrobiana quanto à capacidade antioxidante dessas moléculas. A atividade antioxidante, por sua vez, está relacionada à habilidade dos peptídeos em neutralizar radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ROS). Com isso, peptídeos com ação antioxidante podem proteger células do hospedeiro contra danos oxidativos, além de interferir no metabolismo de bactérias que utilizam ROS como parte de seus mecanismos de sinalização ou defesa, potencializando assim seu efeito antimicrobiano. Há casos, no entanto, que a capacidade antioxidante pode atenuar os efeitos do estresse oxidativo empregado pelo sistema imune para eliminar microrganismos, o que pode reduzir a eficácia antimicrobiana, dependendo do modo de ação do organismo-alvo (López-García et al., 2022; Mardani et al., 2023).

Já a susceptibilidade a proteases é uma diretriz importante de se analisar quando o objeto de estudo são peptídeos antimicrobianos já que muitos deles são alvos dessas enzimas, seja no organismo-hospedeiro ou alvo (Shao et al, 2019). Quanto maior a susceptibilidade do peptídeo às enzimas, menor será a estabilidade, o que leva ao comprometimento da atividade antimicrobiana. Por isso, se faz necessário a análise *in silico* da previsão dos sítios de clivagem por peptidases (como tripsina e quimiotripsina) para que as devidas modificações possam ser feitas se desejado, seja pela substituição de aminoácidos chave, ciclagem para proteção de regiões vulneráveis ou mesmo uso de D-aminoácidos para bloquear o reconhecimento por proteases (Starr e Wimley, 2017).

Peptídeos antimicrobianos podem ser clivados especificamente por várias enzimas. Entre as proteases endógenas mais frequentemente encontradas no trato gastrointestinal podemos citar algumas como a pepsina que atua no estômago e é ativada em meio ácido (pH próximo a 2) e cliva ligações peptídicas próximas a aminoácidos aromáticos como fenilalanina, triptofano e tirosina; a tripsina que cliva as proteínas nas ligações após lisina e arginina (aminoácidos básicos); a quimiotripsina que é responsável por clivar ligações após aminoácidos aromáticos, semelhante à pepsina, mas atua no intestino (Glibowicka, He e Deber, 2022). Por exemplo, a tripsina pode clivar peptídeos nos resíduos de cátions (arginina e lisina) na posição P1 com maior frequência para arginina. No entanto, a clivagem específica da tripsina é geralmente bloqueada quando a prolina é encontrada na posição P1'. A quimiotripsina pode clivar em triptofano, tirosina e fenilalanina na posição P1 (alta especificidade) e, em menor extensão, em leucina, metionina e histidina na posição P1 (Keil et al, 1992). Entre as proteases endógenas mais frequentemente encontradas no trato gastrointestinal podemos citar algumas como a pepsina que é ativada em meio ácido (pH próximo a 2) e cliva ligações peptídicas próximas a aminoácidos aromáticos como fenilalanina, triptofano e tirosina (Moncla et al, 2011; Lai et al, 2022).

Ainda sobre os cuidados com a administração do peptídeo no organismo humano e os fatores que impactam essa questão, podemos falar sobre os parâmetros de Absorção, Digestão, Metabolismo, Excreção e Toxicidade (ADMET). O sistema enzimático da superfamília do citocromo P450

(CYP450) é responsável pelo metabolismo de mais de dois terços dos fármacos atuando principalmente na primeira fase do metabolismo onde ocorrem reações de oxidação, redução e hidrólise (Gleeson M. P., 2008). É importante analisar a relação dos peptídeos com essas enzimas atuando tanto como substratos quanto como inibidores: no primeiro caso, ao serem metabolizados por CYPs os peptídeos podem apresentar redução de meia-vida plasmática, geração de metabólitos tóxicos e diminuição da biodisponibilidade; já no segundo caso, os AMPs podem ser inibidos por competição direta e levar a alterações da conformação enzimática, levando a interações medicamentosas e efeitos não desejados (Zhai et al, 2023; Nirogi et al, 2020).

Outro ponto crucial a ser analisado no que diz respeito a administração de fármacos e peptídeos é a capacidade ou não dessas moléculas serem absorvidas pelo intestino humano. Características como alto peso molecular e carga positiva e baixa lipofilicidade comprometem a difusão passiva pelo epitélio intestinal e em casos que o AMP precisa chegar na circulação sistêmica a baixa absorção induz a busca por outras vias de administração; já quando o alvo da droga se localiza no sistema gastrointestinal a baixa absorção pode ser vantajosa pois mantém o peptídeo ativo no lúmen (Zadorozhnii, Kiselev e Kharchenko, 2022).

1.3 Peptídeos de proteínas vegetais

1.3.1. Inibidores de proteases vegetais

Os inibidores de protease (IPs) são proteínas ou peptídeos que se ligam a enzimas proteolíticas, modificando seu sítio ativo para bloqueá-lo ou alterá-lo drasticamente, bloqueando assim atividades catalíticas excessivas e descontroladas (Cotabarren et al, 2020). E de acordo com a classificação das enzimas, os inibidores podem ser classificados com base na especificidade e mecanismo de inibição como: inibidores de serina, cisteína, aspártico, metalo e treonina-protease (Zhao e Ee, 2018). As interações proteína-proteína representam uma das funções típicas encontradas em todos os processos celulares, ao habilitar e regular funções proteicas individuais. O uso de peptídeos baseados em inibidores de proteína pode trazer benefícios substanciais devido à sua maior afinidade, estabilidade e penetração celular (Lucero et al, 2023). Os peptídeos têm maior funcionalidade do que moléculas

pequenas em termos de bloqueio direto e seletivo da interação proteína-proteína porque têm pesos moleculares maiores (Maemoto et al, 2023).

As serino proteases são os inibidores mais abundantes na natureza e imitam a distribuição mais natural de qualquer família de inibidores. A maioria delas tem baixo peso molecular; estão principalmente na faixa de 3 a 25 kDa e inibem a atividade enzimática da tripsina e da quimiotripsina. Elas são classificadas com base na especificidade do substrato, como o tipo de resíduo no inibidor de protease, da seguinte forma; semelhante à tripsina (resíduo de aminoácido carregado positivamente), elastase (pequeno resíduo de aminoácido hidrofóbico) e quimiotripsina (grande resíduo hidrofóbico) (Mishra, Reddy e Prasad, 2020). As funções dos IPs de serina, em geral, são regular as atividades proteolíticas excessivas por suas respectivas serino proteases. Os IPs inibem as proteases exógenas liberadas pelos microrganismos patogênicos para abrir caminho através da parede celular do hospedeiro para invasão em novos tecidos (Oliveira et al, 2020).

As plantas são uma fonte importante de inibidores de protease e já são conhecidas mais de 12 famílias. As mais estudadas são as duas principais famílias de inibidores, a família de inibidores de tripsina do tipo Kunitz e a família de inibidores do tipo Bowman-Birk (Cid-Gallegos et al, 2020). A primeira dessas famílias foi inicialmente encontrada em plantas de soja e inibe a atividade da enzima tripsina e também uma quantidade menor de quimiotripsina. Todas, exceto algumas dessas enzimas, têm 181 aminoácidos de comprimento, compostas de cadeias peptídicas com pesos moleculares na faixa de 18 a 22 kDa e são encontradas em sementes de leguminosas das famílias taxonômicas Mimosoideae, Caesalpinioideae e Papilionoideae, que suprimem as proteases de serina, cisteína e ácido aspártico (Oliva et al., 2010). Já a segunda família contou com os esforços de dois pesquisadores que nomeiam esse grupo graças a descoberta e caracterização dessas moléculas, que contam com um peso molecular de 6 a 9 kDa e são formados por 60-80 resíduos de aminoácidos e possui dois domínios inibitórios sendo capaz de interagir com duas proteases ao mesmo tempo. Além disso, podem criar complexos estequiométricos com enzimas digestivas, por exemplo, tripsina, quimiotripsina, elastase, catepsina G e duodenase, e são encontrados

majoritariamente em sementes e tubérculos de leguminosas de famílias como Fabaceae, Solanaceae, Cucurbitaceae, Asteraceae e Poaceae. (Clemente e Arques, 2014; Silva, 2023).

1.3.2 IPs vegetais como fontes de peptídeos

Proteases são alvos importantes para medicamentos com uma ampla gama de aplicações clínicas. As serino-proteases, por exemplo, estão entre os dez principais alvos de todas as proteínas quando se diz respeito à ação de drogas. Nesse contexto, existem vários desafios relacionados à capacidade intrínseca de uso dessa classe de enzimas em medicamentos. Um deles é a especificidade limitada do ligante dos medicamentos às proteases existentes, assim como, a limitação de moléculas pequenas como pequena área de superfície e número baixo de locais de contato. Dessa forma, os peptídeos ganharam grande interesse porque combinam algumas das vantagens das moléculas pequenas dos medicamentos tradicionais, por exemplo, restrição conformacional, com as de produtos biológicos maiores, como a especificidade do alvo (Cid-Gallegos et al, 2022).

A seletividade naturalmente alta de alvo dos medicamentos derivados de peptídeos foi bem relatada na literatura por meio de alguns peptídeos aprovados e/ou medicamentos derivados de inibidores de proteínas que são peptidomiméticos. Como, por exemplo, captopril e enalapril (inibidores da enzima conversora de angiotensina), bivalirudina (inibidor de trombina) e carfilzomibe (inibidor de proteases da superfamília da quimiotripsina no proteassoma 20S) (Lau; Dunn, 2017). Os inibidores de proteases vegetais podem fornecer estruturas funcionalizadas, que englobam as principais características para o desenvolvimento de peptídeos terapêuticos (estabilidade, entrega e especificidade) e também apresentam alta estabilidade em relação à proteólise, calor e acidez, apresentando vantagens no que diz respeito aos peptídeos lineares. Além disso, as terapias de peptídeos são consideradas “seguras”, por serem metabolizadas e degradadas em aminoácidos não-tóxicos e fragmentos menores. Os candidatos a medicamentos derivados de inibidores de proteases de plantas, também, oferecem alta seletividade de alvo reduzindo assim o risco de efeitos adversos fora do alvo (Rawlings et al, 2018; Hellinger e Gruber, 2019; Singh et al, 2023).

Aprofundando mais, no que tange a característica de estabilidade físico-química dos inibidores de proteases vegetais isso se expressa na forma de um nó de cistina ou vinco de Knottin (um motivo estrutural de proteína contendo três pontes dissulfeto compartilhado por vários peptídeos extraídos de plantas, animais e fungos) que exhibe estruturas compactas e estáveis unidas por numerosas pontes dissulfeto em relação ao número total de aminoácidos constituintes, presente na maioria dessa classe de enzimas. Essa característica aliada a ampla gama de atividades biológicas relacionadas a inibidores de proteases de plantas aumenta o interesse da comunidade científica em aprimorar os conhecimentos nessa área. O número de publicações científicas que relatam IPs vegetais com atividade antimicrobiana aumenta constantemente e a descoberta de moléculas naturais estáveis com atividade antimicrobiana é vantajosa para a ciência em geral, mas também porque a combinação dessas características é de particular interesse para a indústria farmacêutica (Cotabarren et al, 2020; Paul e Bhattacharjee, 2024). Vários tipos de inibidores de proteases vegetais seletivos e específicos foram purificados, caracterizados e avaliados quanto a sua atividade biológica e estabilidade. Demonstrando assim que essas moléculas podem ser inibidores potentes do crescimento de bactérias, fungos e até mesmo certos vírus, assim sendo, excelentes candidatas no desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos para aplicações clínicas (Bonturi et al, 2022; Leonardo-Sousa et al, 2022).

1.4. Abordagens *in silico* na análise de peptídeos

1.4.1 Bioinformática e a descoberta de novos fármacos

O campo da bioinformática tem sido de fundamental importância para a identificação e construção de AMPs, levando ao desenvolvimento de fármacos a partir desses peptídeos identificados e caracterizados. A triagem computacional permite que esses potenciais medicamentos sejam encontrados tanto a partir de coleções de compostos reais, como de coleções virtuais, de uma forma mais rápida um número grande de sequências, transformando o processo de seleção mais simples (Irazazabal, 2016).

No processo padrão para a obtenção de novos medicamentos, são feitos testes diretos utilizando compostos naturais ou de origem sintética em

ensaios biológicos de bancada, seja testes em células ou modelos animais. Os primeiros passos de obtenção, purificação e síntese dessas moléculas demandam uma grande quantidade de material biológico, sendo também demorado e dispendioso. Frente a essa problemática, o desenho *in silico* desses compostos entra como uma alternativa promissora que promete facilitar essa etapa de determinação da molécula alvo ideal e diminuir o ônus para o desenvolvimento de novos fármacos.

Métodos de predição são empregados para identificar novas sequências com características de peptídeos antimicrobianos (AMP), prever o modo de ação ou o alvo de um AMP conhecido, ou sugerir uma provável estrutura tridimensional (3D) na ausência de dados conformacionais experimentais. Esses procedimentos realizam essa tarefa ao analisarem bases de dados de AMPs já existentes e confrontar esses dados com sequências em potencial, já as informações estruturais podem ser adquiridas por meio da comparação com motivos conhecidos por sua atividade como AMPs. A disponibilidade de extensas quantidades de dados possibilita aos cientistas desenvolverem modelos complexos que revelam padrões e princípios fundamentais que podem não ser perceptíveis a olho nu. Esses sistemas passam por treinamento em milhares de AMPs reconhecidos para deduzir relações e conexões entre sequências e características, possibilitando aos usuários inserir uma sequência hipotética e obter a estimativa da probabilidade de essa sequência apresentar atividade antimicrobiana. Diferentes preditores, como CAMPR4, AI4AMP e HydrAMP, apresentam desempenhos variados em diferentes conjuntos de dados, o que exige discernimento na sua aplicação e alguns são descritos na Tabela 3.

Tabela 2 - Plataformas de predição de peptídeos antimicrobianos.

Preditor	Conjuntos de dados de treinamento	Número de AMPs/não AMPs	Algoritmo*	Recursos	Modo de gerar conjunto de dados negativos
CAMPR4	InverPep, YADAMP, LAMP, C-PamP	24.243/ 24.243	RF (melhor precisão), SVM, ANN	Composição baseada em sequência e propriedades físico-químicas de AMPs	25 proteínas random coil não AMPs validadas experimentalmente, não secretadas e aleatórias do banco de dados UniProt e geração de peptídeos aleatórios
AI4AMP	APD3, CAMPR3, DRAMP, LAMP	6.623/6.623	PC6 Deep learning	Propriedades físico-químicas de AMPs	Dados UniProt pré-processados e geração de peptídeos aleatórios
HydrAMP	dbAMP, AMP Scanner, DRAMP	11.131/ 11.131	GNN	Composição baseada em sequência, informações estruturais previstas e propriedades físico-químicas de AMPs	Dados UniProt pré-processados
AmpGram	APD3, CAMPR3, ADAM, PhytAMP, AMPer, AntiBP2, BACTIBASE, LAMP	2.463/2.463	RF	Composição baseada em sequência	Dados UniProt pré-processados
sAMPpred-GAT	SATPdb, ADAM, AMPfun, APD3, CAMPR3, LAMP, DRAMP, dbAMP	5.536/5.536	GNN	Composição baseada em sequência, informações estruturais previstas e propriedades físico-químicas de AMPs	Dados UniProt pré-processados

*RF: Random Forest, SVM: Support Vector Machine, ANN: Artificial Neural Networks and, GNN: Graph Neural Networks

Fonte: Traduzido de - BELLO-MADRUGA; TORRENT BURGAS (2024, p. 979)

Os métodos computacionais estão desempenhando um papel cada vez mais importante na pesquisa de AMP. Em particular, os métodos tradicionais de *machine learning* (ML) e *deep learning* (DL) são considerados métodos eficientes para reconhecer padrões previamente desconhecidos de sequências, o que ajuda a prever o potencial antimicrobiano de novas sequências. Os métodos de ML podem ser divididos ainda em diferentes metodologias de análise: *support vector machine* (SVM), *k-nearest neighbor* (kNN), *random forest* (RF) e *single-layer neural network* (NN), já os métodos de DL geralmente contêm várias camadas de NN, como o *convolutional neural network* (CNN) (Yan et al, 2022).

Além dessa categoria de abordagens computacionais, também é possível dividir as metodologias de desenho racional em quatro classes distintas: com base nos métodos físico-químicos, nos métodos que se baseiam em uma sequência modelo, com base nos métodos evolutivos e a partir dos métodos *de novo*. Além disso, também se usa metodologias híbridas que podem mesclar métodos de mais de uma classe dessas citadas (Porto et al, 2012).

1.4.2 Ferramentas para a caracterização de peptídeos

A tecnologia hoje permite que se possa encontrar sequências com as características desejadas em bancos de dados atualizados ou mesmo desenhar peptídeos a partir de proteínas potenciais, prever a atividade biológica que essa molécula pode desempenhar de acordo com algoritmos

robustos e plataformas que utilizam diferentes abordagens computacionais, assim como estudar as características físico-químicas e estruturais que são de interesse para o trabalho ao qual se pretende utilizar esse composto (anfipaticidade, hidrofobicidade, estrutura secundária, entre outros parâmetros). A otimização de peptídeos depende da compreensão dos parâmetros físico-químicos, especialmente aqueles que influenciam as propriedades de interrupção da membrana, comuns a muitos AMPs (Palmer et al, 2021).

A abordagem *in silico* do estudo de peptídeos também permite modificações específicas na estrutura dessas moléculas visando uma otimização do desempenho, levando em conta a relação estrutura-função. Dentre elas podemos citar: a substituição de aminoácidos (mutagênese sítio dirigida), onde certos resíduos de aminoácidos são trocados visando melhorar a afinidade de ligação com certo alvo de interesse, aumento da estabilidade térmica ou redução da toxicidade (Shin et al, 2022); ciclagem de peptídeos, que acontece por meio da adição de uma estrutura de cabeça ou cauda peptídica ou via ponte dissulfeto, visando tornar o peptídeos mais resistente à proteólise ou aumentar a estabilidade conformacional (Shirsat et al, 2025); inclusão de aminoácidos não naturais ou modificados, como D-aminoácidos a fim de resistir à degradação por proteases ou aminoácidos fluorados para alteração das propriedades eletrônicas e hidrofóbicas (Cardoso et al, 2018). Cada abordagem será escolhida de acordo com o objetivo do trabalho e a disponibilidade de recursos do projeto e deve ser usada com parcimônia.

Por exemplo, peptídeos que adotam conformações α -helicoidais são particularmente eficazes nesse contexto, pois a distribuição de carga, a hidrofobicidade e a anfipaticidade das hélices estão correlacionadas com a atividade da membrana. Compreendendo como mutações individuais de aminoácidos afetam essas propriedades, os pesquisadores podem ajustar o caráter AMP dos peptídeos e gerar novas sequências (Aronica et al, 2010). Avançando mais nessa linha metodológica de produção de fármacos também se pode contar com análises mais complexas como docking e dinâmica molecular que estudam e simulam a interação da sua molécula alvo com outros compostos ou mesmo num ambiente pré determinado, aprofundando a robustez dos dados fornecidos para o andamento da pesquisa (Mustafa et al, 2022).

1.4.2.1 *Predição de propriedades bioquímicas e estruturais*

Geralmente, o primeiro passo para a obtenção de AMPs envolve o estudo de cada aminoácido que compõe o peptídeo estabelecendo sua estrutura secundária/terciária e sua função biológica (isto é, atividade antimicrobiana). Partindo desse princípio, há uma vasta gama de ferramentas computacionais desenvolvidas para explorar essas características e de maneira geral tais abordagens envolvem o uso de descritores, que são vetores usados para descrever propriedades físico-químicas e estruturais intrinsecamente correlacionadas com a atividade biológica de uma determinada molécula (Beltran, Aguilera-Mendoza e Brizuela, 2018). Descritores comuns são a carga líquida, hidrofobicidade, peso molecular, propriedades topológicas e energéticas. Nesse sentido, temos ferramentas que exploram esses parâmetros como o Heliquest, APD3, Molprobit, ExPASy (PepitideCutter, ProtParam, ProtScale) etc (Cesaro, Torres e De La Fuente-Nunez, 2022).

Vários métodos de *machine learning*, alfabeto estrutural e modelagem de homologia são usados para a construção de ferramentas de predição estrutural; outros utilizam bancos de dados de AMPs já conhecidos para identificação de estruturas comuns em sequências não caracterizadas. Exemplos de ferramentas amplamente utilizadas são: PEP-FOLD, I-TASSER, Robetta, MODELER, DeepCNF e SWISS-MODEL; cabe ao pesquisador determinar a que mais se encaixe de acordo com o escopo do trabalho (Lenin e Antony, 2023).

1.4.2.2 *Predição de propriedades biológicos e farmacocinéticos*

Além das atividades biológicas mais comuns como antibacteriana, antiviral e antifúngica que compõem a cartela dos antimicrobianos, também há outras características associadas que influenciam a função desses peptídeos. Como exemplo temos, a capacidade de inibir a formação de biofilmes, capacidade de agregação e o potencial antioxidante dessas moléculas, fatores esses que aumentam o valor agregado dos AMPs e podem inclusive afetar sua ação biológica, nesse cenário podemos citar plataformas como dPABBs, AGGREGSCAN e AnOXPP respectivamente.

Também há parâmetros importantes a se analisar que precedem a fase clínica dessas moléculas e revelam o potencial terapêutico dos peptídeos, como o estudo do potencial hemolítico, antigênico e tóxico. Independente do alvo final do AMP, esses fatores de toxicidade para o organismo não-alvo, capacidade de ativar o sistema imunológico e causar hemólise nos glóbulos vermelhos são cruciais parâmetros clínicos e para isso utiliza-se a ajuda de ferramentas *in silico* como HemoPI, ToxinPred, HLPpred-Fuse. Já no que diz respeito mais precisamente a via de administração da possível droga podemos ter insights sobre seu comportamento através das análises ADMET, estudando a capacidade da molécula de ser absorvida pelo intestino humano (visando uma administração oral do medicamento), a capacidade de enzimas importantes do sistema gastrointestinal interagirem com os peptídeos (como por exemplo as isoformas do citocromo P450) e a forma que essas moléculas serão posteriormente digeridas e eliminadas no corpo (degradação por proteases e modo de excreção), para auxiliar isso contamos com ferramentas como BIOPEP-UWM e ADMETSar para predizer os resultados.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Encontrar moléculas promissoras para uso terapêutico pelas abordagens computacionais integradas por meio da identificação, caracterização e avaliação de peptídeos antimicrobianos obtidos a partir de inibidores de proteases de plantas.

2.2 Objetivos específicos

- Selecionar sequências de inibidores de proteases vegetais de bases de dados públicas com base na literatura existente.
- Gerar peptídeos com base em duas abordagens distintas: uma de fragmentação em decapeptídeos e outra de predição de potencial antimicrobiano.
- Realizar a predição do potencial antimicrobiano dos peptídeos de acordo com as plataformas de escolha.
- Construir bibliotecas de variantes para os peptídeos mais promissores em potencial antimicrobiano e submetê-los à análise de atividade antimicrobiana.
- Realizar predições *in silico* de propriedades físico-químicas e dos peptídeos e das variantes.
- Investigar o perfil de toxicidade, hemólise e imunogenicidade, assim como capacidade de inibição de biofilme e os sítios de proteases dos peptídeos e das variantes geradas.

3 METODOLOGIA

3.1 Inibidores de proteases utilizados no estudo

A partir do banco de dados de inibidores de proteases vegetais feito por Lima et al, (2023), foram selecionados seis inibidores, cada um proveniente de uma classe distinta, como Kunitz e Bowman-Birk; que possuam suas estruturas tridimensionais resolvidas pelo método de difração de raio-X, com sequências disponíveis no banco de dados *Protein Data Bank (PDB)*, e o representante de cada classe foi escolhido com base nas informações já contidas sobre ele na literatura acerca da atividade antimicrobiana e outras atividades biológicas, assim como por ser proveniente de organismos amplamente estudados (**Tabela 3**).

Tabela 3 - Inibidores de proteases de origem vegetal com estrutura tridimensional resolvida.

Descrição da Entidade Polimérica: Kunitz + Nome Taxonômico do Organismo de Origem: Plantas											
Número de resultados: 13											
Nome do Inibidor	Gene	Classificação	Nome da Planta	Origem	Protease inibida	Ki	Mecanismo de inibição	MW (kDa)	Cadeias Protéicas	Código do PDB	References
Inibidor de protease serínica de batata	KTI-B	Kunitz	<i>Solanum tuberosum</i>	Tubérculos	Tripsina	1,62-2,06 nM	Competitivo	24,111	1	3TC2	Valucya et al
					Quimiotripsina	1,68-2,35 nM	Competitivo				Meulenbroek et al
					Elastase de leucócitos humanos	0,85-0,97 nM	-				
Nome Macromolecular: Bowman-Birk + Nome Taxonômico do Organismo de Origem: Plantas											
Número de resultados: 20											
Nome do Inibidor	Gene	Classificação	Nome da Planta	Origem	Protease inibida	Ki	Mecanismo de inibição	MW (kDa)	Cadeias Protéicas	Código do PDB	References
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	N/A	Bowman-Birk	<i>Vigna radiata</i>	Sementes	Tripsina	0.12 µM	-	7.959	1	3MYW 1G9J 1SBW 1SMF	Li et al.
Descrição da Entidade Polimérica: Inibidor de Tripsina + Nome Taxonômico do Organismo de Origem: Plantas											
Número de resultados: 86											
Nome do Inibidor	Gene	Classificação	Nome da Planta	Origem	Protease inibida	Ki	Mecanismo de inibição	MW (kDa)	Cadeias Protéicas	Código do PDB	References
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTI)	N/A	Inibidor de tripsina	<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	Sementes	Trpsina bovina	0.88 nM	-	19,457	2	4J2K 4J2Y	Nakahata et al 2011
					Quimiotripsina bovina	1.11 nM					
					Elastase de neutrófilos humanos	55 nM					de Paula et al 2011
					Caliceína	6.1 nM					
					Plasmática humana	9.36 nM					
Nome Macromolecular: Cistatina + Nome Taxonômico do Organismo de Origem: Plantas											
Número de resultados: 4											
Nome do Inibidor	Gene	Classificação	Nome da Planta	Origem	Protease inibida	Ki	Mecanismo de inibição	MW (kDa)	Cadeias Protéicas	Código do PDB	References
OryzaCistatina-I	Os01g0803200	Cistatina	<i>Oryza sativa</i>	Sementes	Papaína Ficina	24 nM -	Não competitivo -	15,355	1	1EQK	Abe et al Aoki et al Chen et al.
Nome Macromolecular: Inibidor de Protease Aspártica + Nome Taxonômico do Organismo de Origem: Plantas											
Número de resultados: 2											
Nome do Inibidor	Gene	Classificação	Nome da Planta	Origem	Protease inibida	Ki	Mecanismo de inibição	MW (kDa)	Cadeias Protéicas	Código do PDB	References
Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAPI)	N/A	Inibidor de protease aspártica	<i>Cucurbita maxima</i>	Folhas	Pepsina	0.8 nM	Competitivo	11,267	1	2KXG	Headey et al
				Exsudato do floema do fruto							Christeller et al
Descrição da Entidade Polimérica: Serpina + Nome Taxonômico do Organismo de Origem: Plantas											
Número de resultados: 1											
Nome do Inibidor	Gene	Classificação	Nome da Planta	Origem	Protease inibida	Ki	Mecanismo de inibição	MW (kDa)	Cadeias Protéicas	Código do PDB	References
AtSerpinaI	At1g47710	Serpina	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Folhas	Proteases vasculares de cisteínas RD21 Metacaspases AtMC9	-	Inibidor suicida	42,639	1	3LE2	Lampel et al Vercautmen et al

Fonte: Adaptado de - LIMA et al. 2024.

3.2 Abordagens de obtenção dos peptídeos antimicrobianos

A fim de comparação escolhemos duas abordagens distintas para a geração dos peptídeos a partir da sequência aminoacídica dos inibidores vegetais: a primeira consiste em usar a plataforma Peptide 2.0 (Peptide 2.0, 2025) para fragmentar os inibidores em decapeptídeos; já a segunda parte do princípio de vasculhar regiões da sequência com potencial antimicrobiano nas proteínas modelo através da plataforma PyAMPA (Torrent et al, 2011).

3.3 Análise do potencial antimicrobiano *in silico* dos AMPs obtidos

Em seguida os peptídeos gerados foram analisados nos bancos de dados CAMPR4 (Gawde et al, 2023), AI4AMP (Lin et al, 2021), HydrAMP (Szymczak et al, 2023), segundo Bello-Madruga e Burgas (2024). As sequências com a maior média de escores na previsão do potencial antimicrobiano dos três servidores serão selecionadas para a construção da biblioteca de variantes e caracterizadas quanto às propriedades físico-químicas, biológicas e estruturais.

3.4 Caracterização computacional integrada dos AMPs

3.4.1 Caracterização físico-química

Parâmetros físico-químicos dos peptídeos gerados serão analisados através de ferramentas disponíveis on-line e utilizados como forma de seleção dessas moléculas para a condução das próximas etapas do trabalho. O Antimicrobial Peptide Database (APD3) (Wang et al, 2016) será utilizado para avaliar carga líquida (pelo menos +1), razão hidrofóbica (entre 40-60%) e índice de Boman (≤ 2.5). O ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular usando a ferramenta ProtParam do ExPASy (Gasteiger et al, 2005); o momento hidrofóbico utilizando a plataforma do HeliQuest (Gautier et al, 2008) e os valores de construção de modelos (da sigla em inglês, Tm) e valores do potencial otimizado de granulação grosseira de proteínas (da sigla em inglês, sOPEP) usando o PepFOLD 3.5 (Lamiable et al, 2016) também serão avaliados.

3.4.2 Caracterização biológica

Também serão analisadas algumas propriedades biológicas, tais como: potencial alérgico que será calculado usando a ferramenta de predição antigênica (Immunomedicine Group, 2025), o potencial hemolítico avaliado com o auxílio do programa HemoPI2.0 (Chaudhary et al, 2016) e o potencial citotóxico em fibroblastos usando o ToxinPred3 (Sharma et al, 2022) também será analisado. Para a predição do potencial antioxidante dos peptídeos foi utilizada a plataforma AnOXPP (Quin et al, 2023). Também foi explorada a capacidade potencial dos peptídeos de inibirem a formação de biofilme, avaliada de acordo com a plataforma dPABBs (Sharma et al, 2016). Assim como, a susceptibilidade dos peptídeos frente às enzimas digestivas mais comuns como pepsina e quimotripsina por meio da ferramenta PeptideCutter do Expasy (Gasteiger et al, 2005).

3.4.3 Caracterização farmacocinética

Os peptídeos no formato PDB obtidos a partir do Pepfold3.5, foram convertidos no formato SMILES pelo software da plataforma RCSB PDB na ferramenta Chemical Sketch (Berman et al, 2000), para então serem submetidos a análises de adsorção, permeabilidade de membrana e toxicidade em diferentes organismos usando a base de dados do ADMETSar (Cheng et al, 2012). Os parâmetros de interesse escolhidos o trabalho foram o potencial dos peptídeos serem absorvidos pelo intestino humano, já que geralmente as moléculas são projetadas para atingirem tecidos além do trato gastrointestinal então é de interesse que ele seja absorvido pelo intestino; além disso será analisada a capacidade dos peptídeos serem inibidores e/ou substrato para enzimas como citocromo P450 (CYP450), como CYP3A4, CYP2C9, e CYP2D6 o que se relaciona com a segurança, eficácia e perigo de interações medicamentosas. As enzimas CYP450 e suas isoformas (CYP3A4, 2C9, 2D6) são responsáveis pela metabolização dos medicamentos com cada uma tendo sua própria especificidade: a CYP3A4 metaboliza cerca de 50% dos fármacos, sendo altamente expressa no fígado e no intestino; a CYP2C9 metaboliza fármacos como varfarina, antidiabéticos, etc; e CYP2D6 é responsável por metabolizar antidepressivos, antipsicóticos, betabloqueadores (Xing et al, 2023).

3.4.4 Caracterização estrutural

O servidor PepFold (Genescript), uma ferramenta computacional amplamente usada para prever estruturas tridimensionais (3D) de peptídeos lineares entre 5 e 50 aminoácidos (Thevenet et al, 2012; Rey et al, 2023), será empregado para construir a estrutura 3D dos peptídeos selecionados. Os melhores modelos serão escolhidos com base na menor energia sOPEP e maiores valores de T_m, conforme definido pelo próprio servidor PEP-FOLD (Lamiable et al, 2016). As análises das estruturas 3D serão realizadas usando o PyMol Molecular Graphics System (versão 1.7.4, Schrodinger, LLC) com a licença educacional (Delano; Lam, 2005). Além disso, a qualidade das estruturas 3D geradas através da construção do gráfico de Ramachandran será avaliada usando o programa MolProbity (Williams et al, 2018).

3.5 Biblioteca de variantes dos peptídeos antimicrobianos mais promissores

As bibliotecas de peptídeos “embaralhados” foram construídas por meio da permutação das sequências peptídicas originais que apresentaram resultados mais promissores nas análises anteriores, para avaliar o potencial antimicrobiano de seus análogos. Essas bibliotecas foram criadas com a ferramenta Scrambled (Mimotopes, 2025). O número máximo de permutações aplicadas foi 10. Os peptídeos que deram origem a essas bibliotecas de ambas as metodologias de abordagem foram filtrados de acordo com parâmetros das análises anteriores e as variantes passaram pelas mesmas análises já descritas.

3.5.1 Caracterização computacional integrada das variantes geradas

As variantes passaram pelos processos de caracterização descritos nos tópicos 2.3, 2.4, 2.5, 2.6 e 2.7.

4 RESULTADOS

4.1 Abordagens de obtenção dos peptídeos antimicrobianos

Para a primeira abordagem os inibidores de protease escolhidos foram fracionados utilizando a plataforma Peptide 2.0 utilizando como critério de escolha o comprimento de 10 aminoácidos, janela de análise muito comum em plataformas de predição de AMPs (Burdukiewicz et al, 2020). O inibidor de protease serínica de batata (INB1) deu origem a 37 peptídeos e já o inibidor do tipo Bowman-Birk de feijão musgo (INB2) foi capaz de gerar 44 peptídeos, o inibidor de tripsina de *Enterolobium contortisiliquum* (INB3) resultou em 34 decapeptídeos, o inibidor OryzaCistatina-I (INB4) foi capaz de gerar 20 peptídeos, o inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (INB5) deu origem a 78 peptídeos e o inibidor AtSerpina1 (INB6) resultou em 19 decapeptídeos, essas diferenças se expressam pelo fato de cada inibidor possuir um comprimento diferente o que resulta em quantidades variáveis de peptídeos gerados (**Tabela 4**).

Tabela 4 - Peptídeos gerados a partir de decapeptídeos de inibidores de proteases vegetais. INB1 - inibidor de protease serínica de batata; INB2 - inibidor do tipo Bowman-Birk de feijão musgo; INB3 - inibidor de tripsina de *Enterolobium contortisiliquum*; INB4 - inibidor OryzaCistatina-I; INB5 - inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora; INB6 - inibidor AtSerpina1; N/A - não aplicável.

INB1	INB2	INB3	INB4	INB5	INB6
LPSDATPVLD	IVGGYTCAAN	KELSDSDGDI	MSSDGGPVLG	AGMDVRESIS	GPGPAIGEVI
TPVLDVTGKE	TCAANSVPYQ	SDGDILRNNG	GPVLGGVEPV	RESISLQNQV	IGEVIGISVN
VTGKELDPRL	SVPYQVSLNS	LRNGGTYIIL	GVEPVGNEND	LQNQVSMNLA	GISVNDPRVK
LDPRLSYRII	VSLNSGSHFC	TYIILPALRG	GNENDLHLVD	SMNLAKHVIT	DPRVKEIAEF
SYRIISTFWG	GSHFCGGSIL	PALRGKGGGL	LHLVDLARFA	KHVITTVSQN	EIAEFALKQH
STFWGALGGD	GGSLINSQWV	KGGGLELAKT	LARFAVTEHN	TVSQNSNVIF	ALKQHAEQNL
ALGGDVYLK	NSQWVVSAAH	ELAKTGDETC	VTEHNKKANS	SNVIFSPASI	AEQNLILAGV
VYLGKSPNSD	VSAAHCYKSR	GDETCPLNVV	KKANSLLFE	SPASINVVLS	ILAGVDAGQI
SPNSDAPCAN	CYKSRIQVRL	PLNVVQARSE	LLEFEKLVSV	NVVLSIIAAG	DAGQIIKGIP
APCANGVFRY	IQVRLGEHNI	QARSETKRGR	KLVSVKQQVV	IIAAGSAGAT	IKGIPHWDNY
GVFRYNSDVG	GEHNIDVLEG	TKRGRPAIIV	KQQVVAGTLY	SAGATKDQIL	HWDNYNNLIL
NSDVGPSGTP	DVLEGNEQFI	PAIIVTPPRI	AGTLYYFTIE	KDQILSFLKF	YNLILSAKHS
PSGTPVRFIG	NEQFINAAKI	TPPRIAILTP	YFTIEVKEGD	SFLKFSSTDQ	SAKHSPHEFS
VRFIGSSSHF	NAAKIITHPN	AILTPAFYLN	VKEGDAKKLY	SSTDQLNSFS	PHEFSKFYNV
SSSHFGQGIF	ITHPNFNGNT	AFYLNIEFQT	AKKLYEAKVW	LNSFSSEIVS	KFYNVVVLEK
GQGIFEDELL	FNGNTLDNDI	IEFQTRDLP	EAKVWEKPWM	SEIVSAVLAD	VVLEKASDNS
EDELLNIQFA	LDNDIMLIK	RDLPALEEY	EKPWMDFKEL	AVLADGSANG	ASDNSLKLVA
NIQFAISTSK	MLIKLSSPAT	CLEEYSRLPW	DFKELQEK	GSANGGPKLS	LKLVAFVPLF
ISTSKMCVSY	SSPATLNSRV	SRLPWKVEGE	QEFKPVDA	SA	SV
MCVSYTIWKV	LNSRVATVSL	KVEGESQEVK	VDASANA	VANGAWIDKS	N/A
TIWKVGDYDA	ATVSLPRSCA	SQEVKIAPKE	N/A	WIDKSLSFKP	N/A
GDYDASLGTM	PRSCAAAGTE	IAPKEEQHL	N/A	LSFKPSFKQL	N/A
SLGTMMLLETG	AAGTECLISG	EEQHFGSFK	N/A	SFKQLLEDSY	N/A
LLETGGTIGQ	CLISGWGNTK	FGSFKIKPYR	N/A	LEDSYKAASN	N/A
GTIGQADSSW	WGNTKSSGSS	IKPYRDDYKL	N/A	KAASNQADFQ	N/A
ADSSWFKIVK	SSGSSYPSLL	DDYKLVCYEG	N/A	QADFQSKAVE	N/A
FKIVKSSQFG	YPSLLQCLKA	VYCEGNSDDD	N/A	SKAVEVIAEV	N/A
SSQFGYNLLY	QCLKAPVLS	NSDDDSCKDL	N/A	VIAEVNSWAE	N/A
YNLLYCPVTT	PVLSDSCKS	SCKDLGISID	N/A	NSWAEKETNG	N/A
CPVTTSSDDQ	SSCKSAYPGQ	GISIDDENNR	N/A	KETNGLITEV	N/A
SSDDQFCLKV	AYPGQITGNM	DENNRLLVVK	N/A	LITEVLPEGS	N/A
FCLKVGVVHQ	ITGNMICVGF	LLVVKDGDP	N/A	LPEGSADSMT	N/A
GVVHQNGKRR	ICVGFLEGGK	DGDPLAVRFV	N/A	ADSMTKLIFA	N/A
NGKRRALALVK	LEGGKDSCQG	AVRFVKAHRR	N/A	KLIFANALYF	N/A
LALVKDNPLD	DSCQGDSSGGP	KAHRRG	N/A	NALYFKGTWN	N/A
DNPLDVSKFQ	DSGGPVVCNG	N/A	N/A	KGTWNEKFDE	N/A
VSFKQVQ	VVCNGQLQGI	N/A	N/A	EKFDESILTQE	N/A
N/A	QLQGIVSWG	N/A	N/A	SLTQEGEFHL	N/A
N/A	VSWGYGCAQK	N/A	N/A	GEFHLLDGNK	N/A
N/A	GCAQKNKPGV	N/A	N/A	LDGNKVTPF	N/A
N/A	NKPGVYTKVC	N/A	N/A	VTAPFMTSKK	N/A
N/A	YTKVCNYVNW	N/A	N/A	MTSKKKQYVS	N/A
N/A	NYVNWIIQTI	N/A	N/A	KQYVSAYDGF	N/A

INB1	INB2	INB3	INB4	INB5	INB6
N/A	IQQTIAAN	N/A	N/A	AYDGFKVLGL	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	KVLGLPYLQG	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	PYLQGQDKRQ	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	QDKRQFSMYF	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	FSMYFYLPDA	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	YLPDANNGLS	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	NNGLSDLLDK	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	DLLDKIVSTP	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	IVSTPGFLDN	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	GFLDNHIPRR	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	HIPRRQVKVR	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	QVKVREFKIP	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	EFKIPKFKFS	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	KFKFSFGFDA	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	FGFDASNVLK	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	SNVLKGLGLT	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	GLGLTSPFSG	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	SPFSGEGLT	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	EEGLTEMVES	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	EMVESPEMGK	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	PEMGKNLCVS	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	NLCVSNIFHK	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	NIFHKACIEV	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	ACIEVNEEGT	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	NEEGTEAAAA	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	EAAAASAGVI	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	SAGVIKLRGL	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	KLRGLLMEED	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	LMEEDEIDFV	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	EIDFVADHPF	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	ADHPFLLVVT	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	LLVVTENITG	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	ENITGVVLF	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	VVLFIGQVVD	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	GQVVDPLH	N/A

Fonte: Elaborado pela autora.

Já pela segunda abordagem foi usado a metodologia de previsão de peptídeos antimicrobiano através da busca por estruturas padrão com base em bancos de dados de peptídeos antimicrobianos já cadastrados e resultou em respectivamente 2, 2, 1, 0, 0 e 1 peptídeo para cada um dos inibidores já citados. O que mostra já a grande discrepância de resultados entre as duas abordagens, mas que é explicado pelo fato de a primeira englobar a análise de todas as partes da sequência da proteína e a segunda já fazer uma filtragem baseada no potencial intrínseco em fragmentos aminoácidos a fim de refinar a

análise do potencial das moléculas de acordo com padrões estruturais conhecidos na literatura (**Tabela 5**).

Tabela 5 - Peptídeos gerados a partir de regiões com potencial antimicrobiano dos inibidores de proteases de acordo com a plataforma PyAMPA. INB1 - inibidor de protease serínica de batata; INB2 - inibidor do tipo Bowman-Birk de feijão musgo; INB3 - inibidor de tripsina de *Enterolobium contortisiliquum*; INB4 - inibidor *OryzaCistatina-I*; INB5 - inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora; INB6 - inibidor *AtSerpina1*; N/A - não aplicável

INB1	INB2	INB3	INB4	INB5	INB6
KMCVSYTIWKVG	PGVYTKVCNYVNWIIQQT	KNKPGVYTKVCNYVSWIKQT	N/A	N/A	RRQVKVREFKIPKFKFS
KVGVVHQNGKRRLALV	NSCHSACKSCICTR	N/A	N/A	N/A	N/A

Fonte: Elaborado pela autora.

4.2 Análise do potencial antimicrobiano *in silico* dos peptídeos gerados

Na análise do potencial antimicrobiano dos peptídeos nas três plataformas escolhidas: CAMP44, AI4AMP e HydrAMP, a escolha dos mais promissores se baseou na média dos scores obtidos em cada plataforma para seguir com as análises (os escolhidos estão destacados em verde). Do total de 232 peptídeos analisados, somente 17 (7,32%) apresentaram resultado positivo no teste (**Tabela 6**).

Tabela 6 - Avaliação do potencial antimicrobiano dos decapeptídeos gerados a partir dos inibidores de proteases vegetais. O “-” indica valores abaixo de 0.500, “+” indica valores de score entre 0.500 e 0.699, “++” indica score entre 0.700 e 0.899 e “+++” indica score entre 0.900 e 1.000.

OryzaCistatina-I				Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAPI)				AtSerpina1			
Peptídeo	Plataforma de análise do potencial antimicrobiano			Peptídeo	Plataforma de análise do potencial antimicrobiano			Peptídeo	Plataforma de análise do potencial antimicrobiano		
	CAMPR4	AI4AMP	HydrAMP		CAMPR4	AI4AMP	HydrAMP		CAMPR4	AI4AMP	HydrAMP
MSSDGGPVLG	-	-	-	AGMDVRESIS	-	-	-	GPGEIAGEVI	-	-	-
GPVLGGVEPV	-	-	-	RESISLQNV	-	-	-	IGEVIGISVN	++	-	-
GVEPVGNEND	-	-	-	LQNOVSMNLA	-	-	-	GISVNDPRVK	-	-	-
GNENDLHLVD	-	-	-	SMNLAKHVIT	-	++	++	DPRVKEIAEF	-	-	-
LHLVDLARFA	-	-	-	KHVITTVSQN	-	-	-	EIAEFALKQH	-	-	-
LARFAVTEHN	-	-	-	TVSQNSNVIF	-	-	-	ALKQHAEQNL	-	-	-
VTEHNKKANS	-	-	-	SNVIFSPASI	-	-	-	AEQNLILAGV	-	-	-
KKANSLLFE	-	-	-	SPASINVVLS	-	-	-	ILAGVDAGQI	+	-	-
LLEFEKLVSV	-	-	-	NVVLISIAAG	-	-	-	DAGQIIKGIP	-	++	-
KLVSVKQQVV	-	+	-	IIAAGSAGAT	-	-	-	IKGIPHWDNY	-	-	+
KQQVVAGTLY	-	-	-	SAGATKDQIL	-	-	-	HWDNYYNLIL	-	-	-
AGTLYYFTIE	-	-	-	KDQILSFLKF	-	+	+	YNLILSAKHS	-	-	-
YFTIEVKEGD	-	-	-	SFLKFSSTDQ	-	-	-	SAKHSPEHFS	-	-	-
VKEGDAKKLY	-	-	-	SSTDQLNSFS	-	-	-	PHEFSKFYNV	-	-	-
AKKLYEAKVW	-	-	+++	LNSFSSEIVS	-	-	-	KFYNVVVLEK	-	-	-
EAKVWEKPWM	-	-	-	SEIVSAVLAD	-	-	-	VVLEKASDNS	+	-	-
EKPWMDFKEL	-	-	-	AVLADGSANG	-	-	-	ASDNSLKLVA	-	-	-
DFKELQKEP	-	-	-	GSANGGPKLS	-	-	-	LKLVAFVPLF	++	-	-
QEFKPVDAASA	-	-	-	GPKLSVANGA	-	-	-	FVPLF	-	+	-
VDASANA	-	-	-	VANGAWIDKS	-	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	WIDKLSFKP	+	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	LSFKPSFKQL	++	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	SFKQLLEDYS	-	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	LEDYSKAASN	-	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	KASNOADFQ	-	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	QADFQSKAVE	-	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	SKAVEIAEV	-	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	VIAEVNSWAE	-	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	NSWAEKETNG	-	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	KETNGLITEV	-	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	LITEVLPEGS	-	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	LPEGSADSMT	-	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	ADSMTKLIFA	+	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	KLIFANALYF	-	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	NALYFKGTWN	-	-	++	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	KGTWNEKFDE	-	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	EKFDESLTQE	-	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	SLTQEGEFHL	-	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	GEFHLLDGNK	-	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	LDGNKVTAPF	-	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	VTAPFMTSKK	++	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	MTSKKKQYVS	-	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	KQYVSAYDGF	+	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	AYDGFVKVLGL	-	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	KVLGLPYLQG	-	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	PYLQGDQRQ	-	-	+++	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	QDKRQFSMYF	-	-	+	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	FSMYFYLPDA	-	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	YLPDANNGLS	-	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	NNGLSDLLDK	-	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	DLLDKIVSTP	-	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	IVSTPGFLDN	-	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	GFLDNHIPP	-	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	HIPRRQVKVR	-	++	+++	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	QVKVREFKIP	+	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	EFKIPKFKFS	-	+	+	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	KFKFSFGFDA	-	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	FGFDASNVLK	-	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	SNVLKGLGLT	-	+	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	GLGLTSPFSG	-	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	SPFSGEGLT	-	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	EEGLTEMVES	-	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	EMVESPEMGK	-	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	PEMGKNLCVS	-	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	NLCVSNIFHK	-	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	NIFHKACIEV	-	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	ACIEVNEEGT	-	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	NEEGTEAAAA	-	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	EAAAAAGVI	-	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	SAGVIKLRGL	-	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	KLRGLLMEED	-	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	LMEEDEIDFV	-	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	EIDFVADHPF	-	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	ADHPFLLVVT	-	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	LLVVTENITG	-	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	ENITGVVLF	-	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	VVLFIGQVVD	-	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A
N/A	N/A	N/A	N/A	GQVVDPLH	-	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A

Fonte: Elaborada pela autora.

Na segunda abordagem, já que a base de escolha é o potencial antimicrobiano das regiões da sequência, o número de resultados positivos é superior a primeira abordagem. Nesse caso, não há peptídeos destacados em verde pois todos (100%) apresentaram potencial e foram escolhidos, o que difere grandemente do resultado da primeira abordagem tanto em quantidade de amostra quanto em porcentagem de aprovados (**Tabela 7**).

Tabela 7 - Avaliação do potencial antimicrobiano dos peptídeos gerados a partir de regiões com potencial antimicrobiano de inibidores de proteases vegetais pela plataforma PyAMPA. O “-” indica valores abaixo de 0.500, “+” indica valores de score entre 0.500 e 0.699, “++” indica score entre 0.700 e 0.899 e “+++” indica score entre 0.900 e 1.000.

Peptídeo	Plataforma de análise do potencial antimicrobiano		
	CAMPR4	AI4AMP	HydrAMP
KMCVSYTIWKVG	+	-	++
KVGVVHQNGKRRLALV	++	++	-
PGVYTKVCNYVNWIIQQT	+	-	+
NSCHSACKSCICTR	+	+++	+++
KNKPGVYTKVCNYVSWIKQT	++	-	++
RRQVKVREFKIPKFKFS	++	++	-

Fonte: Elaborada pela autora.

4.3 Caracterização computacional integrada dos AMPs

4.3.1 Caracterização físico-química

Para a caracterização físico-química foram analisados os parâmetros de carga líquida, ponto isoelétrico (pI) teórico, índice Bowman, peso molecular, taxa e momento hidrofóbico, parâmetros de escolha dos modelos da plataforma PEP-FOLD 2.0 (Tm e sOPEP) e o plot do gráfico de Ramachandran. A maioria dos analisados se enquadra dentro de parâmetros ideais como carga líquida positiva, índice de bowman menor que 2.5 e taxa hidrofóbica entre 40-60%. Parâmetros esses que foram classificatórios para a seleção dos peptídeos fonte da biblioteca de variantes (**Tabela 8**).

Tabela 8 - Propriedades físico-químicas dos decapeptídeos gerados a partir da fragmentação dos inibidores de proteases vegetais.

Inibidor de origem	Peptídeo	Carga líquida	PI teórico	Peso Molecular (Da)	Índice Bowman (kcal/mol)	Taxa hidrofóbica (%)	Momento hidrofóbico (uM)	Tm	sOPEP	Gráfico Ramachandran (%)
Inibidor de protease serínica de batata	SYRIISTFWG	+1	8.46	1229.40	0.83	40	0.302	0.603	-10.82	75
Inibidor de protease serínica de batata	VRFIGSSSHF	+1	9.73	1136.28	1.39	40	0.504	0.273	-5.08	75
Inibidor de protease serínica de batata	GVVHQNGKRR	+3	12.01	1150.31	4.22	20	0.077	0.428	-4.11	87.5
Inibidor de protease serínica de batata	NGKRRLLVK	+4	12.02	1154.42	3.09	40	0.376	0.890	-13.00	87.5
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCKYSR	+2	9.31	1121.28	2.31	40	0.256	0.940	-10.59	87.5
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	CLISGWGNTK	+1	8.22	1078.25	0.28	40	0.354	0.465	-6.15	75
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	YPSLLQLKA	+1	8.20	1135.39	-0.32	50	0.558	0.982	-16.15	100
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	GCAQKNKPGV	+2	9.31	1001.17	1.42	30	0.143	0.626	-5.82	75
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	NKPGVYTKVC	+2	9.20	1108.32	1.01	30	0.317	0.470	-6.32	75
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTi)	TKRGRPAIIW	+3	12.01	1197.44	2.30	40	0.035	0.447	-5.64	75
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTi)	FGSFKIKPYR	+3	10.29	1242.48	1.77	30	0.298	0.366	-5.13	75
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTi)	AVRFVKAHRR	+4	12.30	1239.49	4.02	50	0.459	0.834	-12.62	100
Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAPI)	SMNLAKHVIT	+1	8.49	1113.34	0.47	50	0.337	0.943	-13.00	100
Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAPI)	KDQILSFLKF	+1	8.59	1238.49	0.80	50	0.429	0.981	-16.29	100
Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAPI)	HIPRRQVKVR	+4	12.30	1288.56	4.75	30	0.310	0.404	-6.68	100
Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAPI)	EFKIPKFKFS	+2	9.71	1270.52	1.29	40	0.117	0.417	-8.96	75

Fonte: Elaborada pela autora.

Já na segunda abordagem, com uma amostragem bem menor, metade (50%) dos peptídeos obtiveram resultados não ideais nos parâmetros já descritos e acendem uma luz para a necessidade de possíveis mudanças na estrutura a fim de melhorar essas características (**Tabela 9**).

Tabela 9. Propriedades físico-químicas dos peptídeos gerados a partir de regiões com potencial antimicrobiano de inibidores de proteases vegetais.

Inibidor de origem	Peptídeo	Carga líquida	PI teórico	Peso Molecular (Da)	Índice Bowman (kcal/mol)	Taxa hidrofóbica (%)	Momento hidrofóbico (uM)	Tm	sOPEP	Gráfico Ramachandran (%)
Inibidor de protease serínica de batata	KMCVSYTIWKVG	+2	9.20	1414.74	-0.22	50	0.044	0.316	-10.24	80
Inibidor de protease serínica de batata	KGVVHQNGKRRLLV	+4	12.02	1774.15	-1.75	44	0.208	0.229	-18.24	85
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	PGVYTKVCNYVNWIQTI	+1	8.57	2126.46	0.48	39	0.382	0.677	-25.79	100
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	NSCHSACKSCICTR	+2	8.55	1512.75	2.33	43	0.259	0.637	-17.40	75
Inibidor de tripsina de <i>Enterobium contortisiliquum</i>	KNKPGVYTKVCNYVSWIKTI	+4	9.75	2469.93	1.11	33	0.298	0.563	-28.42	94
AtSerpina1	RRQVKVREFKIPKFKFS	+6	11.74	2193.67	3.57	35	0.023	0.236	-13.20	73

Fonte: Elaborada pela autora.

4.3.2 Caracterização biológica

Para as análises biológicas foram avaliados os potenciais tóxico, hemolítico, antigênico, antioxidante e susceptibilidade enzimática. Como observado, 5 peptídeos apresentaram potencial tóxico e/ou hemolítico e nenhum apresentou potencial antigênico. Já nas demais características apresentou-se uma heterogeneidade maior de resultados, com apenas 4 não se caracterizando como antioxidante, 5 que não apresentaram potencial de inibição de biofilme e todos apresentando pelo menos um sítio de clivagem para as enzimas analisadas (**Tabela 10**, **Tabela 11**, **Tabela 12** e **Tabela 13**).

Tabela 10 - Potencial hemolítico, antigênico e tóxico dos decapeptídeos gerados a partir da fragmentação de inibidores de proteases vegetais. ‘+’ indica resultado positivo, ‘-’ indica resultado negativo.

Inibidor de origem	Peptídeo	Potencial hemolítico	Potencial antigênico	Potencial tóxico
Inibidor de protease serínica de batata	SYRIISTFWG	+	-	-
Inibidor de protease serínica de batata	VRFIGSSSHF	-	-	-
Inibidor de protease serínica de batata	GVVHQNGKRR	-	-	-
Inibidor de protease serínica de batata	NGKRRLALVK	-	-	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	CLISGWGNTK	-	-	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	YPSLLQCLKA	-	-	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	-	-	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	GCAQKNKPGV	-	-	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	NKPGVYTKVC	-	-	-
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTI)	TKRGRPAIIV	-	-	+
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTI)	FGSFKIKPYR	-	-	-
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTI)	AVRFVKAHRR	-	-	-
Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAPI)	SMNLAKHVIT	-	-	-
Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAPI)	KDQILSFLKF	+	-	-
Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAPI)	HIPRRQVKVR	-	-	-
Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAPI)	EFKIPKFKFS	+	-	+

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 11 - Potencial antioxidante dos decapeptídeos gerados a partir da fragmentação de inibidores de proteases vegetais. '+' indica resultado positivo, '-' indica resultado negativo.

Inibidor de origem	Peptídeo	Antioxidante
Inibidor de protease serínica de batata	SYRIISTFWG	-
Inibidor de protease serínica de batata	VRFIGSSSHF	+
Inibidor de protease serínica de batata	GVVHQNGKRR	+
Inibidor de protease serínica de batata	NGKRRLALVK	+
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	CLISGWGNTK	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	YPSLLQCLKA	+
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	+
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	GCAQKNKPGV	+
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	NKPGVYTKVC	+
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTI)	TKRGRPAIIW	+
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTI)	FGSFKIKPYR	+
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTI)	AVRFVKAHRR	+
Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAPI)	SMNLAKHVIT	-
Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAPI)	KDQILSFLKF	-
Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAPI)	HIPRRQVKVR	+
Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAPI)	EFKIPKFKFS	+

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 12 - Potencial de inibição enzimática dos decapeptídeos gerados a partir da fragmentação de inibidores de proteases vegetais. '+' indica resultado positivo, '-' indica resultado negativo.

Inibidor de origem	Peptídeo	Inibição de biofilme
Inibidor de protease serínica de batata	SYRIISTFWG	+
Inibidor de protease serínica de batata	VRFIGSSSHF	+
Inibidor de protease serínica de batata	GVVHQNGKRR	-
Inibidor de protease serínica de batata	NGKRRLALVK	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	CLISGWGNTK	+
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	YPSLLQCLKA	+
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	GCAQKNKPGV	+
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	NKPGVYTKVC	+
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTI)	TKRGRPAIIW	-
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTI)	FGSFKIKPYR	+
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTI)	AVRFVKAHRR	-
Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAPI)	SMNLAKHVIT	-
Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAPI)	KDQILSFLKF	+
Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAPI)	HIPRRQVKVR	-
Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAPI)	EFKIPKFKFS	+

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 13 - Sítios de hidrólise dos decapeptídeos gerados a partir da fragmentação de inibidores de proteases vegetais. Q1 = Quimiotripsina de alta

especificidade (C-term para [FYW], não antes de P); Q2 = Quimiotripsina de baixa especificidade (termo C para [FYWML], não antes de P); P1 = Pepsina pH 1.3; P2 = Pepsina pH > 2 e T = Tripsina.

Inibidor de origem	Peptídeo	Sítios de hidrólise
Inibidor de protease serínica de batata	SYRIISTFWG	Q1, Q2, P1, P2 e T
Inibidor de protease serínica de batata	VRFIGSSSHF	Q1, Q2, P1, P2 e T
Inibidor de protease serínica de batata	GVVHQNGKRR	Q2 e T
Inibidor de protease serínica de batata	NGKRRLALVK	Q2, P1, P2 e T
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	CLISGWGNTK	Q1, Q2, P1, P2 e T
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	YPSLLQCLKA	Q2, P1, P2 e T
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	Q1, Q2, P2 e T
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	GCAQKNKPGV	T
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	NKPGVYTKVC	Q1, Q2, P2 e T
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTI)	TKRGRPAIIW	Q1, Q2, P2 e T
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTI)	FGSFKIKPYR	Q1, Q2, P1, P2 e T
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTI)	AVRFVKAHRR	Q1, Q2, P1, P2 e T
Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAPI)	SMNLAKHVIT	Q2, P1, P2 e T
Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAPI)	KDQILSFLKF	Q1, Q2, P1, P2 e T
Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAPI)	HIPRRQVKVR	Q2 e T
Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAPI)	EFKIPKFKFS	Q1, Q2, P1, P2 e T

Fonte: Elaborada pela autora.

Nos peptídeos da segunda abordagem apenas 1 deles não apresentou potencial antigênico, tóxico e/ou hemolítico; e diferentemente da primeira apenas 1 apresentou potencial antioxidante, além disso nesse quesito um dos

peptídeos não apresentou resultado conclusivo pois seu tamanho de 19 aminoácidos excedia o limite aceito pela plataforma de análise; mais uma vez apenas 1 apresentou potencial de inibir biofilme e todos apresentaram susceptibilidade por pelo menos duas das enzimas de interesse (**Tabela 14**, **Tabela 15**, **Tabela 16** e **Tabela 17**).

Tabela 14 - Potencial hemolítico, antigênico e tóxico dos peptídeos gerados a partir da prospecção de regiões com potencial antimicrobiano de inibidores de proteases vegetais. '+' indica resultado positivo, '-' indica resultado negativo.

Inibidor de origem	Peptídeo	Potencial hemolítico	Potencial antigênico	Potencial tóxico
Inibidor de protease serínica de batata	KMCVSYTIWKVG	-	-	+
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHQNGKRRLALV	-	-	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	NSCHSACKSCICTR	-	+	+
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	PGVYTKVCNYVNWIIQQT	-	+	-
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTI)	KNKPGVYTKVCNYVSWIKQTI	-	+	-
AtSerpina1	RRQVKVREFKIPKFKFS	-	-	+

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 15 - Potencial antioxidante dos peptídeos gerados a partir da prospecção de regiões com potencial antimicrobiano de inibidores de proteases vegetais. '+' indica resultado positivo, '-' indica resultado negativo. N/A indica não aplicável.

Inibidor de origem	Peptídeo	Antioxidante
Inibidor de protease serínica de batata	KMCVSYTIWKVG	-
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHQNGKRRLALV	+
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	NSCHSACKSCICTR	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	PGVYTKVCNYVNWIIQQT	-
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTI)	KNKPGVYTKVCNYVSWIKQTI	N/A
AtSerpina1	RRQVKVREFKIPKFKFS	-

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 16 - Potencial de inibição enzimática dos peptídeos gerados a partir da prospecção de regiões com potencial antimicrobiano de inibidores de proteases vegetais. '+' indica resultado positivo, '-' indica resultado negativo.

Inibidor de origem	Peptídeo	Inibição de biofilme
Inibidor de protease serínica de batata	KMCVSYTIWKVG	-
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHQNGKRRLALV	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	NSCHSACKSCICTR	+
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	PGVYTKVCNYVNWIIQQT	-
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTI)	KNKPGVYTKVCNYVSWIKQTI	-
AtSerpina1	RRQVKVREFKIPKFKFS	-

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 17 - Sítios de hidrólise dos peptídeos gerados a partir da prospecção de fragmentos conservados de inibidores de proteases vegetais. Q1 = Quimiotripsina de alta especificidade (C-term para [FYW], não antes de P); Q2 = Quimiotripsina de baixa especificidade (termo C para [FYWML], não antes de P); P1 = Pepsina pH 1.3; P2 = Pepsina pH > 2 e T = Tripsina.

Inibidor de origem	Peptídeo	Sítios de hidrólise
Inibidor de protease serínica de batata	KMCVSYTIWKVG	Q1, Q2, P2 e T
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHQNGKRRLALV	Q2, P1, P2 e T
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão	NSCHSACKSCICTR	Q2 e T
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão	PGVYTKVCNYVNWIIQQT	Q1, Q2, P2 e T
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTI)	KNKPGVYTKVCNYVSWIKQTI	Q1, Q2, P2 e T
AtSerpina1	RRQVKVREFKIPKFKFS	Q1, Q2, P1, P2 e T

Fonte: Elaborada pela autora.

4.3.3 Caracterização farmacocinética

Já na caracterização das propriedades relacionadas a farmacocinética de possíveis fármacos desenvolvidos com os peptídeos estudados, o ideal é que peptídeo seja absorvido pelo intestino humano e possa acessar as demais vias do corpo, dependendo do seu tecido alvo, e que não seja substrato/inibidor de nenhuma das isoformas das enzimas do citocromo P450 para diminuir as chances de interferência na eficácia da droga. E podemos observar que

apenas 1 peptídeo não apresentaram absorção pelo intestino humano na abordagem 1, assim como, apenas 3 tiveram interferência com as enzimas, seja por ser inibidor e/ou substrato delas (**Tabela 18**).

Tabela 18 - Propriedades farmacocinéticas dos decapeptídeos gerados a partir da fragmentação de inibidores de proteases vegetais. ‘+’ indica resultado positivo, ‘-’ indica resultado negativo

Inibidor de origem	Peptídeo	Absorção	Metabolismo							
		Absorção no intestino humano	Substrato de CYP450 2C9	Substrato de CYP450 2D6	Substrato de CYP450 3A4	Inibidor de CYP450 1A2	Inibidor de CYP450 2C9	Inibidor de CYP450 2D6	Inibidor de CYP450 2C19	Inibidor de CYP450 3A4
Inibidor de protease serínica de batata	SYRIISTFWG	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibidor de protease serínica de batata	VRFIGSSSHF	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	CLISGWGNTK	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	YPSLLQCLKA	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTi)	TKRGRPAIIW	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTi)	AVRFVKAHRR	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAPI)	SMNLAKHVIT	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAPI)	KDQILSFLKF	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAPI)	EFKIPKFKFS	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: Elaborada pela autora.

Já na segunda abordagem, todos os peptídeos apresentaram absorção no intestino e no que diz respeito ao metabolismo 3 deles apresentaram potencial para ser substrato da enzima CYP450 na sua isoforma 3A4 (**Tabela 19**).

Tabela 19 - Propriedades farmacocinéticas dos peptídeos gerados a partir da prospecção de regiões com potencial antimicrobiano de inibidores de proteases vegetais. ‘+’ indica resultado positivo, ‘-’ indica resultado negativo.

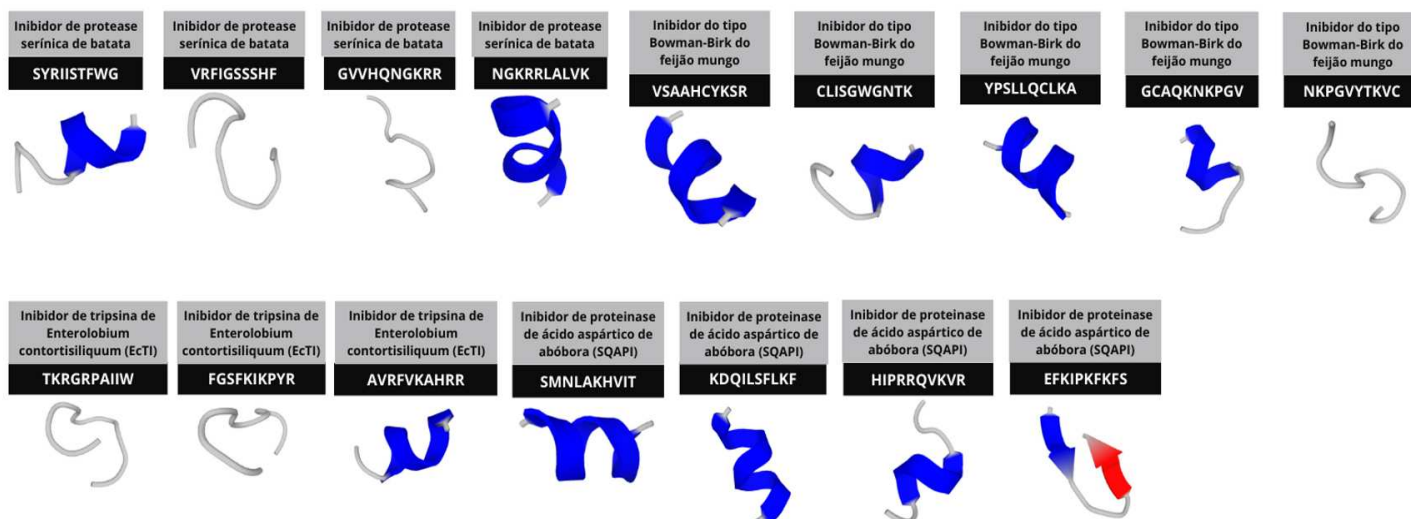
Inibidor de origem	Peptídeo	Absorção	Metabolismo							
		Absorção no intestino	Substrato de CYP450 2C9	Substrato de CYP450 2D6	Substrato de CYP450 3A4	Inibidor de CYP450 1A2	Inibidor de CYP450 2C9	Inibidor de CYP450	Inibidor de CYP450 2C19	Inibidor de CYP450 3A4
Inibidor de protease serínica de batata	KMCVSYTIWKVG	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Inibidor de protease serínica de batata	KGVVHQNGKRRRLALV	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	NSCHSACKSCICTR	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	PGVYTKVCNYVNWIIQQT	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Inibidor de tripsina de Enterolobium contortisiliquum (EcTI)	KNKPGVYTKVCNYVSWIKQTI	+	-	-	+	-	-	-	-	-
AtSerpina1	RRQVKVREFKIPKFKFS	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: Elaborada pela autora.

4.3.4 Caracterização estrutural

Para a caracterização das estruturas, os peptídeos foram submetidos à análise na plataforma do PEP-FOLD 3.5 onde foram geradas as estruturas 3D para avaliação das estruturas secundárias e sua relação com a função dos peptídeos. Como mostrado na figura abaixo, a maioria dos peptídeos apresentou uma predominância de conformação estrutural em forma de alfa-hélice (10), seguido de estruturas estendidas (5) e folha-beta (1) (**Figura 3**).

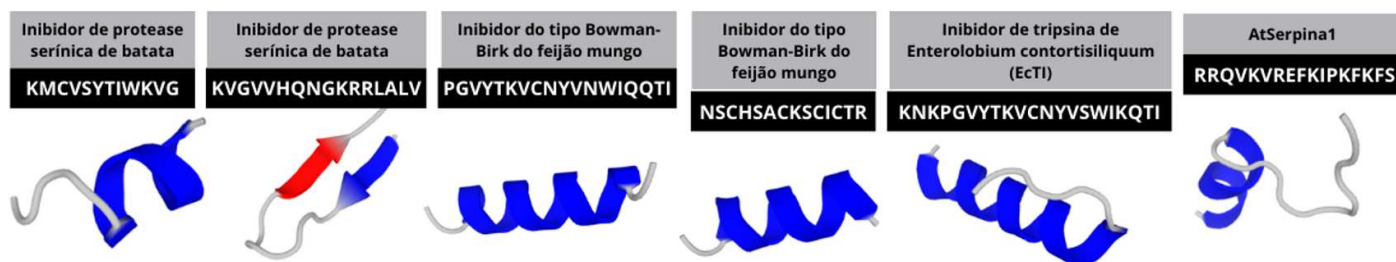
Figura 3 - Estruturas tridimensionais dos decapeptídeos gerados a partir da fragmentação de inibidores de proteases vegetais. Nos retângulos cinzas está informado o inibidor de origem de cada peptídeo correspondente nos retângulos pretos.



Fonte: Elaborada pela autora.

Na metodologia de abordagem 2, novamente apenas 1 peptídeo apresentou estrutura de folha-beta e todos os outros 5 contaram com uma mistura de alfa-hélices com estruturas estendidas (**Figura 4**).

Figura 4 - Estruturas tridimensionais dos peptídeos gerados a partir da prospecção de fragmentos conservados de inibidores de proteases vegetais. Nos retângulos cinzas está informado o inibidor de origem de cada peptídeo correspondente nos retângulos pretos.



Fonte: Elaborada pela autora.

4.4 Biblioteca de variantes dos peptídeos antimicrobianos mais promissores

Os peptídeos mais promissores passaram por uma filtragem por meio das características físico-químicas e farmacocinéticas para tornar viável a geração das bibliotecas de variantes (**Tabela 20**).

Tabela 20 - Variantes geradas a partir do embaralhamento das sequências dos decapeptídeos com potencial antimicrobiano *in silico* gerados pela fragmentação dos inibidores de proteases vegetais.

Inibidor de origem	Inibidor de protease serínica de batata	Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	Inibidor de tripsina de Enterolobium contortisiliquum (EcTi)	Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAPI)	Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAPI)
Peptídeo	SYRIISTFWG	CLISGWGNTK	VSAAHCYKSR	AVRFVKAHRR	SMNLAKHVIT	EFKIPKFKFS
Variante 1	FTSISGIRYW	CNGLSIWTKG	AHCASSYVRK	ARAKVFVHRR	AVTKHISLNM	FEFFKIPKKS
Variante 2	ISIFSWTGRY	GLICKNGTSW	HASVCRAYKS	AVVAKRFHRR	IHLKTAMSVN	FIKKPKSFFE
Variante 3	SGRYITWSFI	GSTLGWKNCI	RASHVKCYAS	FRARKVHAVR	INAHLSVTMK	FPIKFKESEK
Variante 4	SGSFIYRWTI	GWTGCKLISN	RVYSAKSCAH	FRVHARAVRK	KSTMILNVAH	IESFKPKKFF
Variante 5	SIGIRFSWTY	ISKGNGLWTC	SARHSYCVKA	HKARRRFVVA	LAVHINMSKT	ISFKKKFEFP
Variante 6	SIITFRGSWY	KIGSWCGNLT	SKCVYARHSA	HVKFVAARRR	LHNSKAMTVI	KFIEPFSSKK
Variante 7	SWISFRTGIY	KWITLNSGGC	VYHRASSCAK	RARFRAHVKV	NILKTHVMSA	PFKFIEFKKS
Variante 8	SYIGTSRWIF	NGWILTCKSG	VYSSHCAKKA	VHFKRVARAR	NSKHLMTAIV	PKIFEKFFKS
Variante 9	TRIWSFIGYS	NSCLGWKGTI	YKHVASRSCA	VRHKRRVFA	TNSKIHLAMV	SFIEFKFKPK
Variante 10	YSTSWRIIFG	WKGNGICSLT	VSYCKRHSA	VVHKAFRRA	VMINLATKSH	SPFEKKFFIK

Fonte: Elaborado pela autora.

Como já foi descrito na metodologia a primeira abordagem gera peptídeos de tamanhos iguais e encobre toda a extensão da sequência de aminoácidos dos peptídeos escolhidos, já a segunda seleciona apenas partes dos inibidores que apresentem potencial antimicrobiano de acordo com o banco de dados da plataforma PyAMPA (**Tabela 21**).

Tabela 21 - Biblioteca de peptídeos gerados pelo embaralhamento das sequências de peptídeos provenientes de inibidores de proteases gerados com base nas regiões com potencial antimicrobiano e que apresentaram melhores scores na análise de potencial antimicrobiano *in silico*.

Inibidor de origem	Inibidor de protease serínica de batata	Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo
Peptídeo	KVGVVHQNGKRRLALV	NSCHSACKSCICTR
Variante 1	GGKVKRLVHARVQVLN	CCSASRHSTNICKC
Variante 2	GVLHAQLNRVRKKVGV	CKCRCCSATSINSH
Variante 3	LGKVRRVQHKVGVANL	CSCASCSRKCHITN
Variante 4	LGVVVKVGRAQRNKHL	CSINTSCSCHKARC
Variante 5	RKVHVARLKGLVVQGN	CSIRHCACNTSCKS
Variante 6	RLKAKVGHVLRGNQVV	KASCCTHSCRISCN
Variante 7	VKQVKARRLVLGVHNG	NCATSSRKSICCHC
Variante 8	VLQVKRLRNVAGVGKH	RISKCCCSATSNNHC
Variante 9	VVAKVGHKGVNLRQRL	SCNSSRCTCHKIAC
Variante 10	VVRVKGGNAHKVQLRL	TCCCRHNCISKASIS

Fonte: Elaborado pela autora.

4.4.1 Potencial antimicrobiano das variantes obtidas

Na análise do potencial antimicrobiano das variantes em ambas as abordagens o perfil seguiu os parâmetros dos peptídeos originais no que diz respeito à proporção de resultados positivos, com 24 (40%) os peptídeos seguindo para as próximas análises (**Tabela 22**).

Tabela 22 - Avaliação do potencial antimicrobiano das variantes dos decapeptídeos gerados a partir da fragmentação dos inibidores de proteases vegetais. O “-” indica valores abaixo de 0.500, “+” indica valores de score entre

0.500 e 0.699, “++” indica score entre 0.700 e 0.899 e “+++” indica score entre 0.900 e 1.000.

Inibidor de origem	Peptídeo	Variante	CAMPR4	AI4AMP	HydrAMP
Inibidor de protease serínica de batata	SYRIISTFWG	FTSISGIRYW	+	-	++
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	CLISGWGNTK	CNGLSIWTKG	+	-	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	AHCASSYVRK	+	-	+++
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTi)	AVRFVKAHRR	ARAKVFEHRR	+	+++	+++
Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAPI)	SMNLAKHVIT	AVTKHISLNM	-	-	-
Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAPI)	EFKIPKFKFS	FEFFKIPKKS	-	+	+
Inibidor de protease serínica de batata	SYRIISTFWG	ISIFSWTGRY	+	-	+
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	CLISGWGNTK	GLICKNGTSW	+	-	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	HASVCRAYS	+	++	-
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTi)	AVRFVKAHRR	AVVAKRFHRR	+	+++	+++
Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAPI)	SMNLAKHVIT	IHLKTAMSVN	-	-	-
Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAPI)	EFKIPKFKFS	FIKKPKSFFE	-	-	-
Inibidor de protease serínica de batata	SYRIISTFWG	SGRYITWSFI	-	-	+
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	CLISGWGNTK	GSTLGWKNCI	+	-	+
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	RASHVKCYAS	+	++	-
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTi)	AVRFVKAHRR	FRARKVHAVR	+	-	+++
Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAPI)	SMNLAKHVIT	INAHLSVTMK	-	-	-
Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAPI)	EFKIPKFKFS	FPIKFESKF	-	-	-
Inibidor de protease serínica de batata	SYRIISTFWG	SGSFIYRWTI	-	-	+++
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	CLISGWGNTK	GWTGCKLISN	+	-	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	RVYSAKSCAH	+	+	-
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTi)	AVRFVKAHRR	FRVHARAVRK	+	+++	+++
Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAPI)	SMNLAKHVIT	KSTMILNVAH	-	+	-
Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAPI)	EFKIPKFKFS	IESFKPKKFF	-	-	-
Inibidor de protease serínica de batata	SYRIISTFWG	SIGIRFSWTY	+	-	++
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	CLISGWGNTK	ISKGNGLWTC	+	-	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	SARHSYCVKA	+	++	++
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTi)	AVRFVKAHRR	HKARRRFVVA	+	+++	+
Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAPI)	SMNLAKHVIT	LAVHINMSKT	-	-	-
Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAPI)	EFKIPKFKFS	ISFKKKFEFP	-	-	-

Inibidor de origem	Peptídeo	Variante	CAMPR4	AI4AMP	HydrAMP
Inibidor de protease serínica de batata	SYRIISTFWG	SIITFRGSWY	+	-	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	CLISGWGNTK	KIGSWCGNLT	-	-	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	SKCVYARHSA	+	+	+
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTi)	AVRFVKAHRR	HVKFVAARRR	+	+	+++
Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAPI)	SMNLAKHVIT	LHNSKAMTVI	-	-	-
Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAPI)	EFKIPKFKFS	KFIEPFFSKK	-	++	+
Inibidor de protease serínica de batata	SYRIISTFWG	SWISFRTGIY	+	-	+++
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	CLISGWGNTK	KWITLNSGGC	-	-	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	VYHRASSCAK	+	-	-
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTi)	AVRFVKAHRR	RARFRAHVKV	+	++	+++
Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAPI)	SMNLAKHVIT	NILKTHVMSA	-	-	-
Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAPI)	EFKIPKFKFS	PFKIEFKKS	-	++	-
Inibidor de protease serínica de batata	SYRIISTFWG	SYIGTSRWIF	+	-	++
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	CLISGWGNTK	NGWILTCKSG	+	-	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	VYSSHCAKKA	+	++	++
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTi)	AVRFVKAHRR	VHFKRVARAR	+	+++	+++
Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAPI)	SMNLAKHVIT	NSKHLMTAIV	-	+	-
Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAPI)	EFKIPKFKFS	PKIFEKFFKS	-	+++	-
Inibidor de protease serínica de batata	SYRIISTFWG	TRIWSFIGYS	-	-	++
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	CLISGWGNTK	NSCLGWKGTI	-	-	++
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	YKHVASRSCA	+	-	-
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTi)	AVRFVKAHRR	VRHKRRVFA	+	+++	+++
Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAPI)	SMNLAKHVIT	TNSKIHLAMV	-	-	-
Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAPI)	EFKIPKFKFS	SFIEFKFKPK	-	-	-
Inibidor de protease serínica de batata	SYRIISTFWG	YSTSWRIIFG	+	-	+
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	CLISGWGNTK	WKGGNICSLT	+	-	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	VSYCKRHSA	+	+++	-
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTi)	AVRFVKAHRR	VVHKAFRRA	+	+++	+++
Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAPI)	SMNLAKHVIT	VMINLATKSH	-	-	-
Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAPI)	EFKIPKFKFS	SPFEKKFFIK	-	-	+

Fonte: Elaborada pela autora.

Nos resultados da segunda abordagem os peptídeos destacados em verde são os que apresentaram resultado positivo na análise e foram a minoria como mostrado na tabela abaixo, com 17 peptídeos com potencial e uma taxa de 85% de resultados positivos (**Tabela 23**).

Tabela 23 - Avaliação do potencial antimicrobiano das variantes de peptídeos gerados a partir da prospecção de regiões com potencial antimicrobiano de inibidores de proteases vegetais pela plataforma PyAMPA. O “-” indica valores abaixo de 0.500, “+” indica valores de score entre 0.500 e 0.699, “++” indica score entre 0.700 e 0.899 e “+++” indica score entre 0.900 e 1.000.

Peptídeo	Plataforma de análise do potencial antimicrobiano		
	CAMPR4	AI4AMP	HydrAMP
KMCVSYTIWKVG	+	-	++
KVGVVHQNGKRRLALV	++	++	-
PGVYTKVCNYVNWIIQQT	+	-	+
NSCHSACKSCICTR	+	+++	+++
KNKPGVYTKVCNYVSWIKQTI	++	-	++
RRQVKVREFKIPKFKFS	++	++	-

Fonte: Elaborada pela autora.

4.4.2 Caracterização computacional integrada das variantes geradas

4.4.2.1 Caracterização físico-química

Na análise das propriedades físico-químicas das variantes da abordagem um foi percebido um padrão similar de resultados entre as variantes fruto do mesmo peptídeo, o que indica que apesar da mudança da sequência como a composição de aminoácidos se mantém a mesma, algumas características se mantêm conservadas (**Tabela 24**).

Tabela 24 - Propriedades físico-químicas das variantes dos decapeptídeos gerados a partir da fragmentação dos inibidores de proteases vegetais.

Inibidor de origem	Peptídeo	Variante	Carga líquida	PI teórico	Peso Molecular (Da)	Índice Bowman (kcal/mol)	Taxa hidrofóbica (%)	Momento hidrofóbico (uM)	Tm	sOPEP	Gráfico Ramachandran (%)
Inibidor de protease serínica de batata	SYRIISTFWG	FTSISGIRYW	+1	8.75	1229.40	0.83	40	0.204	0.295	-8.04	87.5
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	AHCASSYVRK	+2	9.32	1121.28	2.31	40	0.300	0.977	-10.30	87.5
Inibidor de tripsina de Enterolobium contortisiliquum (EcTi)	AVRFVKAHRR	ARAKV FVHRR	+4	12.30	1239.49	4.02	50	0.056	0.478	-8.31	100
Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAPi)	EFKIPKFKFS	FEFFKIPKKS	+2	9.70	1270.52	1.29	40	0.430	0.484	-8.82	37.5
Inibidor de protease serínica de batata	SYRIISTFWG	ISIFSWTGRY	+1	8.75	1229.40	0.83	40	0.284	0.347	-6.95	75
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	HASVCRAKYS	+2	9.31	1121.28	2.31	40	0.384	0.954	-11.30	100
Inibidor de tripsina de Enterolobium contortisiliquum (EcTi)	AVRFVKAHRR	AVVAKRFHRR	+4	12.30	1239.49	4.02	50	0.346	0.957	-12.08	87.5
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	CLISGWGNTK	GSTLGWKNCI	+1	8.22	1078.25	0.28	40	0.364	0.563	-7.51	62.5
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	RASHVKCYAS	+2	9.31	1121.28	2.31	40	0.139	0.482	-10.45	100
Inibidor de tripsina de Enterolobium contortisiliquum (EcTi)	AVRFVKAHRR	FRARKVHAVR	+4	12.30	1239.49	4.02	50	0.129	0.910	-12.44	87.5
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	RVYSAKSCAH	+2	9.31	1121.28	2.31	40	0.037	0.661	-9.70	100
Inibidor de tripsina de Enterolobium contortisiliquum (EcTi)	AVRFVKAHRR	FRVHARAVRK	+4	12.30	1239.49	4.02	50	0.520	0.966	-12.74	100
Inibidor de protease serínica de batata	SYRIISTFWG	SIGIRFSWTY	+1	8.46	1229.40	0.83	40	0.045	0.373	-6.84	75

Inibidor de origem	Peptídeo	Variante	Carga líquida	PI teórico	Peso Molecular (Da)	Índice Bowman (kcal/mol)	Taxa hidrofóbica (%)	Momento hidrofóbico (uM)	Tm	sOPEP	Gráfico Ramachandran (%)
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	SARHSYCVKA	+2	9.30	1121.28	2.31	40	0.160	0.715	-8.26	75
Inibidor de tripsina de Enterolobium contortisiliquum (EcTi)	AVRFVKAHRR	HKARRRFVVA	+4	12.30	1239.49	4.02	50	0.230	0.546	-11.21	87.5
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	SKCVYARHSA	+2	9.30	1121.28	2.31	40	0.096	0.786	-10.41	87.5
Inibidor de tripsina de Enterolobium contortisiliquum (EcTi)	AVRFVKAHRR	HVKFVAARRR	+4	12.30	1239.49	4.02	50	0.217	0.926	-13.15	87.5
Inibidor de tripsina de Enterolobium contortisiliquum (EcTi)	AVRFVKAHRR	HVKFVAARRR	+2	9.70	1270.54	1.30	40	0.432	0.607	-10.25	100
Inibidor de protease serínica de batata	SYRIISTFWG	SWISFRTGIY	+1	8.46	1229.40	0.83	40	0.376	0.399	-9.56	100
Inibidor de tripsina de Enterolobium contortisiliquum (EcTi)	AVRFVKAHRR	RARFRAHVKV	+4	12.30	1239.49	4.02	50	0.291	0.790	-12.01	75
Inibidor de protease serínica de batata	SYRIISTFWG	SYIGTSRWIF	+1	8.46	1229.40	0.83	40	0.241	0.387	-7.91	87.5
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	VYSSHCARKA	+2	9.31	1121.28	2.31	40	0.198	0.947	-9.35	100
Inibidor de tripsina de Enterolobium contortisiliquum (EcTi)	AVRFVKAHRR	VHFKRVARAR	+4	12.30	1239.49	4.02	50	0.287	0.974	-12.91	87.5
Inibidor de tripsina de Enterolobium contortisiliquum (EcTi)	AVRFVKAHRR	VRHKRRVFA	+4	12.30	1239.49	4.02	50	0.182	0.962	-11.66	100
Inibidor de protease serínica de batata	SYRIISTFWG	YSTSWRIIFG	+1	8.75	1229.40	0.83	40	0.431	0.204	-7.60	100
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	VSYCKRHSAA	+2	9.31	1121.28	2.31	40	0.288	0.975	-11.26	100
Inibidor de tripsina de Enterolobium contortisiliquum (EcTi)	AVRFVKAHRR	VVHKAFRRRA	+4	12.30	1239.49	4.02	50	0.396	0.853	-12.85	62.5

Fonte: Elaborada pela autora.

Esse padrão se observa de maneira mais clara nas variantes da segunda abordagem já que foram geradas a partir de apenas dois peptídeos como pode ser observado na tabela a seguir. Os parâmetros que não entram nessa padronagem são: o momento hidrofóbico, os scores de Tm e sOPEP e a porcentagem do gráfico de Ramachandran (**Tabela 25**).

Tabela 25. Propriedades físico-químicas das variantes de peptídeos gerados a partir da prospecção de regiões com potencial antimicrobiano de inibidores de proteases vegetais pela plataforma PyAMPA.

Inibidor de origem	Peptídeo de origem	Variante	Carga líquida	PI teórico	Peso Molecular (Da)	Índice Bowman (kcal/mol)	Taxa hidrofóbica (%)	Momento hidrofóbico (uM)	Tm	sOPEP	Gráfico Ramachandran (%)
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHONGKRRRLAL V	GGKVKRLVHARVQVLN	+4	12.02	1774.15	1.75	44	0.352	0.702	-23.01	92
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	NSCHSACKSCICTR	CCSASRHSTNICKC	+2	8.55	1512.75	2.33	43	0.321	0.431	-12.61	100
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHONGKRRRLAL V	LGKVVRRVQHKVGANL	+4	12.02	1774.15	1.75	44	0.217	0.613	-18.02	92
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	NSCHSACKSCICTR	CSCASC SRKCHITN	+2	8.55	1512.75	2.33	43	0.120	0.536	-14.99	100
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHONGKRRRLAL V	LGVVVKVGRAQRNKLH	+4	12.02	1774.15	1.75	44	0.214	0.460	-12.02	78
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	NSCHSACKSCICTR	CSINTSCSCHKARC	+2	8.55	1512.75	2.33	43	0.111	0.391	-12.71	76
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHONGKRRRLAL V	RKVHVARLKLGLVVGQN	+4	12.02	1774.15	1.75	44	0.142	0.455	-16.16	92
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	NSCHSACKSCICTR	CSIRHCACNTSCKS	+2	8.55	1512.75	2.33	43	0.087	0.388	-12.64	91
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHONGKRRRLAL V	RLKAKVGHVLRGNQVV	+4	12.02	1774.15	1.75	44	0.262	0.596	-16.93	85
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	NSCHSACKSCICTR	KASCCTHSCRISCN	+2	8.55	1512.75	2.33	43	0.172	0.267	-13.03	83
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHONGKRRRLAL V	VKQVKARRLVGVHNG	+4	12.02	1774.15	1.75	44	0.065	0.670	-20.31	64
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	NSCHSACKSCICTR	NCATSSRSKICCHC	+2	8.55	1512.75	2.33	43	0.202	0.293	-11.62	100
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHONGKRRRLAL V	VLQVKRLRNAGVGKH	+4	12.02	1774.15	1.75	44	0.171	0.619	-20.68	100
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	NSCHSACKSCICTR	RISKCCCSATSNHC	+2	8.55	1512.75	2.33	43	0.377	0.421	-13.53	75
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHONGKRRRLAL V	VVAKVGHKGVNLRQRL	+4	12.02	1774.15	1.75	44	0.353	0.345	-14.85	78
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	NSCHSACKSCICTR	SCNSSRCTCHKIAC	+2	8.55	1512.75	2.33	43	0.156	0.368	-12.51	83
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	NSCHSACKSCICTR	TCCCRHNCSKASIS	+4	12.02	1774.15	1.75	44	0.032	0.511	-13.73	91

Fonte: Elaborada pela autora.

4.4.2.2 Caracterização biológica

Nas variantes da primeira abordagem se manteve a porcentagem de nenhum peptídeo com potencial hemolítico e atingiu a mesma porcentagem no quesito potencial antigênico, nas demais características seguiu-se uma distribuição mais igualitária com porcentagem positivas de 37,5%, 75% e 28,12% para potencial tóxico, antioxidante e inibidor de biofilme; e com cerca de 65% dos peptídeos tendo susceptibilidade a todas as enzimas proteolíticas (Tabela 26, Tabela 27, Tabela 28 e Tabela 29).

Tabela 26 - Potencial hemolítico, antigênico e tóxico das variantes dos decapeptídeos gerados a partir da fragmentação de inibidores de proteases vegetais. ‘+’ indica resultado positivo, ‘-’ indica resultado negativo.

Inibidor de origem	Peptídeo	Variante	Potencial hemolítico	Potencial antigénico	Potencial tóxico
Inibidor de protease serínica de batata	SYRIISTFWG	FTSISGIRYW	-	-	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	AHCASSYVRK	-	-	+
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTI)	AVRFVKAHRR	ARAKVFVHRR	-	-	-
Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAPI)	EFKIPKFKFS	FEFFKIPKKS	-	-	+
Inibidor de protease serínica de batata	SYRIISTFWG	ISIFSWTGRY	-	-	+
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	HASVCRAYKS	-	-	+
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	CLISGWGNTK	GSTLGWKNCI	-	-	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	RASHVKCYAS	-	-	+
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	RVYSAKSCAH	-	-	+
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	SIGIRFSWTY	-	-	-
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTI)	AVRFVKAHRR	SARHSYCVKA	-	-	+
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTI)	AVRFVKAHRR	SKCVYARHSA	-	-	+
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTI)	AVRFVKAHRR	KFIEPFFSKK	-	-	-
Inibidor de protease serínica de batata	SYRIISTFWG	SWISFRTGIY	-	-	-
Inibidor de protease serínica de batata	SYRIISTFWG	SYIGTSRWIF	-	-	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	VYSSHCARKA	-	-	+
Inibidor de protease serínica de batata	SYRIISTFWG	YSTSWRIIFG	-	-	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	VSYCKRHSAA	-	-	+
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTI)	AVRFVKAHRR	AVVAKRFHRR	-	-	-
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTI)	AVRFVKAHRR	FRARKVHAVR	-	-	+
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTI)	AVRFVKAHRR	FRVHARAVRK	-	-	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	HKARRRFVVA	-	-	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	HVKFVAARRR	-	-	-
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTI)	AVRFVKAHRR	RARFRAHVKV	-	-	-
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTI)	AVRFVKAHRR	VHFKRVARAR	-	-	-
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTI)	AVRFVKAHRR	VRHKRRVFA	-	-	-
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTI)	AVRFVKAHRR	VVHKAFRRRA	-	-	-

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 27 - Potencial antioxidante das variantes dos decapeptídeos gerados a partir da fragmentação de inibidores de proteases vegetais. ‘+’ indica resultado positivo, ‘-’ indica resultado negativo.

Inibidor de origem	Peptídeo	Variante	Antioxidante
Inibidor de protease serínica de batata	SYRIISTFWG	FTSISGIRYW	+
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	AHCASSYVRK	+
Inibidor de tripsina de Enterolobium contortisiliquum (EcTi)	AVRFVKAHRR	ARAKVFVHRR	+
Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAPI)	EFKIPKFKFS	FEFFKIPKKS	+
Inibidor de protease serínica de batata	SYRIISTFWG	ISIFSWTGRY	+
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	HASVCRAYKS	+
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	CLISGWGNTK	GSTLGWKNCI	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	RASHVKCYAS	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	RVYSAKSCAH	+
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	SIGIRFSWTY	+
Inibidor de tripsina de Enterolobium contortisiliquum (EcTi)	AVRFVKAHRR	SARHSYCVKA	-
Inibidor de tripsina de Enterolobium contortisiliquum (EcTi)	AVRFVKAHRR	SKCVYARHSA	-
Inibidor de tripsina de Enterolobium contortisiliquum (EcTi)	AVRFVKAHRR	KFIEPFFSKK	+
Inibidor de protease serínica de batata	SYRIISTFWG	SWISFRTGIY	-
Inibidor de protease serínica de batata	SYRIISTFWG	SYIGTSRWIF	+
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	VYSSHCARKA	-
Inibidor de protease serínica de batata	SYRIISTFWG	YSTSWRIIFG	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	VSYCKRHSAA	-
Inibidor de tripsina de Enterolobium contortisiliquum (EcTi)	AVRFVKAHRR	AVVAKRFHRR	+
Inibidor de tripsina de Enterolobium contortisiliquum (EcTi)	AVRFVKAHRR	FRARKVHAVR	+
Inibidor de tripsina de Enterolobium contortisiliquum (EcTi)	AVRFVKAHRR	FRVHARAVRK	+
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	HKARRRFVVA	+
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	HVKFVAARRR	+
Inibidor de tripsina de Enterolobium contortisiliquum (EcTi)	AVRFVKAHRR	RARFRAHVKV	+
Inibidor de tripsina de Enterolobium contortisiliquum (EcTi)	AVRFVKAHRR	VHFKRVARAR	+
Inibidor de tripsina de Enterolobium contortisiliquum (EcTi)	AVRFVKAHRR	VRHKRRAVFA	+
Inibidor de tripsina de Enterolobium contortisiliquum (EcTi)	AVRFVKAHRR	VVHKAFRRA	+

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 28 - Potencial de inibição de biofilme das variantes dos decapeptídeos gerados a partir da fragmentação de inibidores de proteases vegetais. ‘+’ indica resultado positivo, ‘-’ indica resultado negativo.

Inibidor de origem	Peptídeo	Variante	Inibição de biofilme
Inibidor de protease serínica de batata	SYRIISTFWG	FTSISGIRYW	+
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	AHCASSYVRK	-
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTi)	AVRFVKAHRR	ARAKVFVHRR	-
Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAP)	EFKIPKFKFS	FEFFKIPKKS	+
Inibidor de protease serínica de batata	SYRIISTFWG	ISFSWTGRY	+
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	HASVCRAYKS	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	CLISGWGNTK	GSTLGWKNCI	+
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	RASHVKCYAS	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	RVYSAKSCAH	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	SIGIRFSWTY	+
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTi)	AVRFVKAHRR	SARHSYCVKA	-
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTi)	AVRFVKAHRR	SKCVYARHSA	-
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTi)	AVRFVKAHRR	KFIEPFFSKK	+
Inibidor de protease serínica de batata	SYRIISTFWG	SWISFRTGIY	+
Inibidor de protease serínica de batata	SYRIISTFWG	SYIGTSRWIF	+
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	VYSSHCARKA	-
Inibidor de protease serínica de batata	SYRIISTFWG	YSTSWRIIFG	+
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	VSYCKRHSA	-
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTi)	AVRFVKAHRR	AVVAKRFHRR	-
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTi)	AVRFVKAHRR	FRARKVHAVR	-
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTi)	AVRFVKAHRR	FRVHARAVRK	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	HKARRRFVVA	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	HVKFVAARRR	-
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTi)	AVRFVKAHRR	RARFRAHVKV	-
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTi)	AVRFVKAHRR	VHFKRVARAR	-
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTi)	AVRFVKAHRR	VRHKRRVFA	-
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTi)	AVRFVKAHRR	VVHKAFRRA	-

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 29 - Sítios de hidrólise das variantes dos decapeptídeos gerados a partir da fragmentação de inibidores de proteases vegetais. Q1 = Quimiotripsina de alta especificidade (C-term para [FYW], não antes de P); Q2 = Quimiotripsina de baixa especificidade (termo C para [FYWML], não antes de P); P1 = Pepsina pH 1.3; P2 = Pepsina pH > 2 e T = Tripsina.

Inibidor de origem	Peptídeo	Variante	Sítios de hidrólise
Inibidor de protease serínica de batata	SYRIISTFWG	FTSISGIRYW	Q1, Q2, P1, P2 e T
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	AHCASSYVRK	Q1, Q2, P2 e T
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTi)	AVRFVKAHRR	ARAKVFVHRR	Q1, Q2, P1, P2 e T
Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAPI)	EFKIPKFKFS	FEFFKIPKKS	Q1, Q2, P1, P2 e T
Inibidor de protease serínica de batata	SYRIISTFWG	ISIFSWTGRY	Q1, Q2, P1, P2 e T
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	HASVCRAYKS	Q1, Q2, P2 e T
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	CLISGWGNTK	GSTLGWKNCI	Q1, Q2, P1, P2 e T
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	RASHVKCYAS	Q1, Q2, P2 e T
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	RVYSAKSCAH	Q1, Q2, P2 e T
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	SIGIRFSWTY	Q1, Q2, P1, P2 e T
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTi)	AVRFVKAHRR	SARHSYCVKA	Q1, Q2 e T
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTi)	AVRFVKAHRR	SKCVYARHSA	Q1, Q2, P2 e T
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTi)	AVRFVKAHRR	KFIEPFFSKK	Q1, Q2, P1, P2 e T
Inibidor de protease serínica de batata	SYRIISTFWG	SWISFRTGIY	Q1, Q2, P1, P2 e T
Inibidor de protease serínica de batata	SYRIISTFWG	SYIGTSRWIF	Q1, Q2, P1, P2 e T
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	VYSSHCARKA	Q1, Q2, P2 e T
Inibidor de protease serínica de batata	SYRIISTFWG	YSTSWRIIFG	Q1, Q2, P1, P2 e T
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	VSYCKRHSAA	Q1, Q2, P2 e T
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTi)	AVRFVKAHRR	AVVAKRFHRR	Q1, Q2 e T
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTi)	AVRFVKAHRR	FRARKVHAVR	Q1, Q2, P1, P2 e T
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTi)	AVRFVKAHRR	FRVHARAVRK	Q1, Q2, P1, P2 e T
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	HKARRRFVVA	Q1, Q2 e T
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	HVKFVAARRR	Q1, Q2, P1, P2 e T
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTi)	AVRFVKAHRR	RARFRAHVKV	Q1, Q2, P1, P2 e T
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTi)	AVRFVKAHRR	VHFKRVARAR	Q1, Q2, P1, P2 e T
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTi)	AVRFVKAHRR	VRHKRAVFA	Q1, Q2, P1, P2 e T
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTi)	AVRFVKAHRR	VVHKAFFRRA	Q1, Q2 e T

Fonte: Elaborada pela autora.

Nas variantes da abordagem dois podemos mais uma vez observar um padrão de repetição dos resultados mais claro e mantendo de maneira geral as proporções de positivos e negativos (**Tabela 30, Tabela 31, Tabela 32 e Tabela 33**).

Tabela 30 - Potencial hemolítico, antigênico e tóxico das variantes dos peptídeos gerados a partir da prospecção de regiões com potencial antimicrobiano de inibidores de proteases vegetais. ‘+’ indica resultado positivo, ‘-’ indica resultado negativo.

Inibidor de origem	Peptídeo	Variante	Potencial hemolítico	Potencial antigênico	Potencial tóxico
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHQNGKRRLALV	GGKV/KRLVHARVQVLN	-	+	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	NSCHSACKSCICTR	CCSASRHSTNICKC	-	-	+
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHQNGKRRLALV	LGKVRVQHKVGVANL	-	+	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	NSCHSACKSCICTR	CSCASC SRKCHITN	-	+	+
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHQNGKRRLALV	LGVVVKVGRAQRNHL	-	-	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	NSCHSACKSCICTR	CSINTSCSCHKARC	-	+	+
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHQNGKRRLALV	RKVHVARLKGLVVQGN	-	+	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	NSCHSACKSCICTR	CSIRHCACNTSCKS	-	+	+
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHQNGKRRLALV	RLKAKVGHVLRGNQVV	-	+	+
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	NSCHSACKSCICTR	KASCCTHSCRISCN	-	+	+
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHQNGKRRLALV	VKQV/KARRLV/LGVHNG	-	+	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	NSCHSACKSCICTR	NCATSSRKSIKCHC	-	-	+
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHQNGKRRLALV	VLQVKRLRN/VAGVGKH	-	+	+
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	NSCHSACKSCICTR	RISKCCCSATSNHC	-	+	+
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHQNGKRRLALV	VVAKVGHKGVNLRQRL	-	+	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	NSCHSACKSCICTR	SCNSSRCTCHKIAC	-	+	+
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHQNGKRRLALV	TCCCRHNCSKASIS	-	+	+

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 31 - Potencial antioxidante das variantes dos peptídeos gerados a partir da prospecção de regiões com potencial antimicrobiano de inibidores de proteases vegetais. ‘+’ indica resultado positivo, ‘-’ indica resultado negativo.

Inibidor de origem	Peptídeo	Variante	Antioxidante
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHQNGKRRLALV	GGKVKRLVHARVQVLN	+
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão	NSCHSACKSCICTR	CCSASRHSTNICKC	-
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHQNGKRRLALV	LGKVRRVQHKVGVANL	+
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão	NSCHSACKSCICTR	CSCASCSRKCHITN	-
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHQNGKRRLALV	LGVVVKVGRAQRNKHL	+
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão	NSCHSACKSCICTR	CSINTSCSCHKARC	-
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHQNGKRRLALV	RKVHVARLKGLVVQGN	+
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão	NSCHSACKSCICTR	CSIRHCACNTSCKS	-
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHQNGKRRLALV	RLKAKVGHVLRGNQVV	+
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão	NSCHSACKSCICTR	KASCCTHSCRISCN	-
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHQNGKRRLALV	VKQVKARRLVLG VHNG	+
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão	NSCHSACKSCICTR	NCATSSRKSI CCHC	-
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHQNGKRRLALV	VLQVKRLRNVAGVGKH	+
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão	NSCHSACKSCICTR	RISKCCCSATS NHC	-
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHQNGKRRLALV	VVAKVGHKGVNLRQRL	+
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão	NSCHSACKSCICTR	SCNSSRCTCHKIAC	-
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHQNGKRRLALV	TCCCRHNCSKASIS	-

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 32 - Potencial de inibição de biofilme das variantes dos peptídeos gerados a partir da prospecção de regiões com potencial antimicrobiano de inibidores de proteases vegetais. ‘+’ indica resultado positivo, ‘-’ indica resultado negativo.

Inibidor de origem	Peptídeo	Variante	Inibição de biofilme
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHQNGKRRLALV	GGKVKRLVHARVQVLN	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão	NSCHSACKSCICTR	CCSASRHSTNICKC	+
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHQNGKRRLALV	LGKVRVQHKVGVANL	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão	NSCHSACKSCICTR	CSCASCSRKCHITN	+
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHQNGKRRLALV	LGVVVKVGRAQRNKHL	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão	NSCHSACKSCICTR	CSINTSCSCHKARC	+
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHQNGKRRLALV	RKVHVARLKGLVVQGN	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão	NSCHSACKSCICTR	CSIRHCACNTSCKS	+
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHQNGKRRLALV	RLKAKVGHVLRGNQVV	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão	NSCHSACKSCICTR	KASCCTHSCRISCN	+
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHQNGKRRLALV	VKQVKARRLVLGVHNG	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão	NSCHSACKSCICTR	NCATSSRKSICCHC	+
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHQNGKRRLALV	VLQVKRLRNVAGVGKH	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão	NSCHSACKSCICTR	RISKCCCSATSNHC	+
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHQNGKRRLALV	VVAKVGHKGVNLRQRL	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão	NSCHSACKSCICTR	SCNSSRCTCHKIAC	+
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHQNGKRRLALV	TCCCRHNCSKASIS	+

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 33 - Sítios de hidrólise das variantes dos peptídeos gerados a partir da prospecção de regiões com potencial antimicrobiano de inibidores de proteases vegetais. Q1 = Quimiotripsina de alta especificidade (C-term para [FYW], não antes de P); Q2 = Quimiotripsina de baixa especificidade (termo C para [FYWML], não antes de P); P1 = Pepsina pH 1.3; P2 = Pepsina pH > 2 e T = Tripsina.

Inibidor de origem	Peptídeo	Variante	Sítios de hidrólise
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHQNGKRRLALV	GGKVKRLVHARVQVLN	Q2, P1, P2 e T
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão	NSCHSACKSCICTR	CCSASRHSTNICKC	Q2 e T
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHQNGKRRLALV	LGKVRRVQHKVGVANL	Q2, P1, P2 e T
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão	NSCHSACKSCICTR	CSCASCSRKCHITN	Q2 e T
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHQNGKRRLALV	LGVVVKVGRAQRNKLH	Q2, P1, P2 e T
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão	NSCHSACKSCICTR	CSINTSCSCHKARC	Q2 e T
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHQNGKRRLALV	RKVHVARLKGLVVQGN	Q2, P1, P2 e T
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão	NSCHSACKSCICTR	CSIRHCACNTSCKS	Q2 e T
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHQNGKRRLALV	RLKAKVGHVLRGNQVV	Q2, P1, P2 e T
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão	NSCHSACKSCICTR	KASCCTHSCRISCN	Q2 e T
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHQNGKRRLALV	VKQVKARRLVLG VHNG	Q2, P1, P2 e T
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão	NSCHSACKSCICTR	NCATSSRKSI CCHC	Q2 e T
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHQNGKRRLALV	VLQVKRLRN VAGVGKH	Q2, P1, P2 e T
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão	NSCHSACKSCICTR	RISKCCCSATS NHC	Q2 e T
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHQNGKRRLALV	VVAKVGHKG VNLQRQL	Q2, P1, P2 e T
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão	NSCHSACKSCICTR	SCNSSRCTCHKIAC	Q2 e T
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHQNGKRRLALV	TCCCRHNCSKASIS	Q2 e T

Fonte: Elaborada pela autora.

4.4.2.3 Caracterização farmacocinética

Na análise ADMET das variantes, todas foram capazes de serem absorvidas pelo tecido do intestino humano e somente 10 possuíram interação apenas como substrato de CYP450 3A4 (**Tabela 34**).

Tabela 34 - Propriedades farmacocinéticas das variantes dos decapeptídeos gerados a partir da fragmentação de inibidores de proteases vegetais. ‘+’ indica resultado positivo, ‘-’ indica resultado negativo.

Inibidor de origem	Peptídeo	Variante	Absorção	Metabolismo							
			Absorção no intestino	Substrato de CYP450 2C9	Substrato de CYP450 2D6	Substrato de CYP450 3A4	Inibidor de CYP450 1A2	Inibidor de CYP450 2C9	Inibidor de CYP450 2D6	Inibidor de CYP450 2C19	Inibidor de CYP450 3A4
Inibidor de protease serínica de batata	SYRIISTFWG	FTSISGIRYW	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	AHCASSYVRK	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTi)	AVRFVKAHRR	ARAKVFVHRR	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAP)	EFKIPKFKFS	FEFFKIPKKS	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Inibidor de protease serínica de batata	SYRIISTFWG	ISIFSWTGRY	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	HASVCRAKYS	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	CLISGWGNTK	GSTLGWKNCI	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	RASHVKCYAS	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	RVYSAKSCAH	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	SIGIRFSWTY	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTi)	AVRFVKAHRR	SARHSYCVKA	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTi)	AVRFVKAHRR	SKCVYARHSA	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAP)	EFKIPKFKFS	KFIEPFFSKK	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibidor de protease serínica de batata	SYRIISTFWG	SWISFRTGIY	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibidor de protease serínica de batata	SYRIISTFWG	SYIGTSRWIF	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	VYSSHCARKA	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibidor de protease serínica de batata	SYRIISTFWG	YSTSWRIIFG	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	VSYCKRHSA	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTi)	AVRFVKAHRR	AVVAKRFHRR	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTi)	AVRFVKAHRR	FRARKVHAVR	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTi)	AVRFVKAHRR	FRVHARAVRK	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	HKARRRFVVA	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	VSAAHCYKSR	HVKFVAARRR	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTi)	AVRFVKAHRR	RARFRAHVKV	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTi)	AVRFVKAHRR	VHFKRVARAR	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTi)	AVRFVKAHRR	VRHKRRVFA	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (EcTi)	AVRFVKAHRR	VVHKAFFFFA	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: Elaborada pela autora.

Na segunda abordagem, todas as variantes também foram capazes de serem absorvidas no intestino e nenhuma delas apresentou qualquer interação com as isoformas da enzima analisadas (**Tabela 35**).

Tabela 35 - Propriedades farmacocinéticas das variantes dos peptídeos gerados a partir da prospecção de regiões com potencial antimicrobiano de inibidores de proteases vegetais. ‘+’ indica resultado positivo, ‘-’ indica resultado negativo.

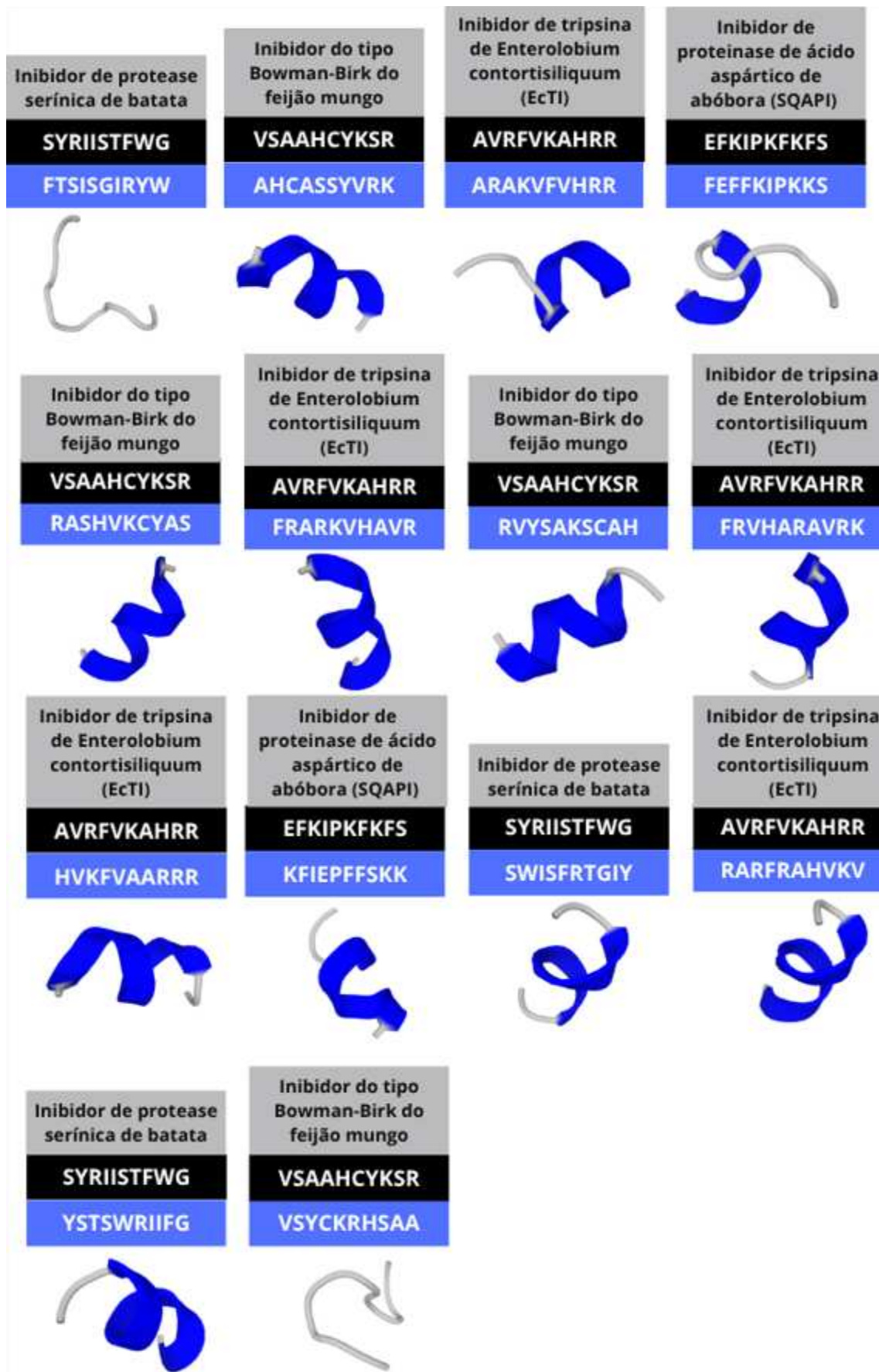
Inibidor de origem	Peptídeo	Variante	Absorção	Metabolismo							
			Absorção no intestino humano	Substrato de CYP450 2C9	Substrato de CYP450 2D6	Substrato de CYP450 3A4	Inibidor de CYP450 1A2	Inibidor de CYP450 2C9	Inibidor de CYP450 2D6	Inibidor de CYP450 2C19	Inibidor de CYP450 3A4
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHQNGKRRRLALV	GGKVKRLVHARVQVLN	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	NSCHSACKSCICTR	CCSASRHSTNICKC	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHQNGKRRRLALV	LGKVRVQHKVGVANL	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	NSCHSACKSCICTR	CSCASC SRKCHITN	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHQNGKRRRLALV	LGVVVKVGRAQRNKLH	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	NSCHSACKSCICTR	CSINTSCSCHKARC	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHQNGKRRRLALV	RKVHVARLKGVLVQGN	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	NSCHSACKSCICTR	CSIRHCACNTSCKS	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHQNGKRRRLALV	RLKAKVGHVLRGNQVV	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	NSCHSACKSCICTR	KASCTHSCRISCN	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHQNGKRRRLALV	VKQVKARRLVGVHNG	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	NSCHSACKSCICTR	NCATSSRKSIKCHC	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHQNGKRRRLALV	VLQVKRLRNAGVGKH	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	NSCHSACKSCICTR	RISKCCSATSNNHC	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHQNGKRRRLALV	VVAKVGHKGVNLRQRL	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo	NSCHSACKSCICTR	SCNSSRCTCHKIAC	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibidor de protease serínica de batata	KVGVVHQNGKRRRLALV	TCCCRHNCSKASIS	+	-	-	-	-	-	-	-	-

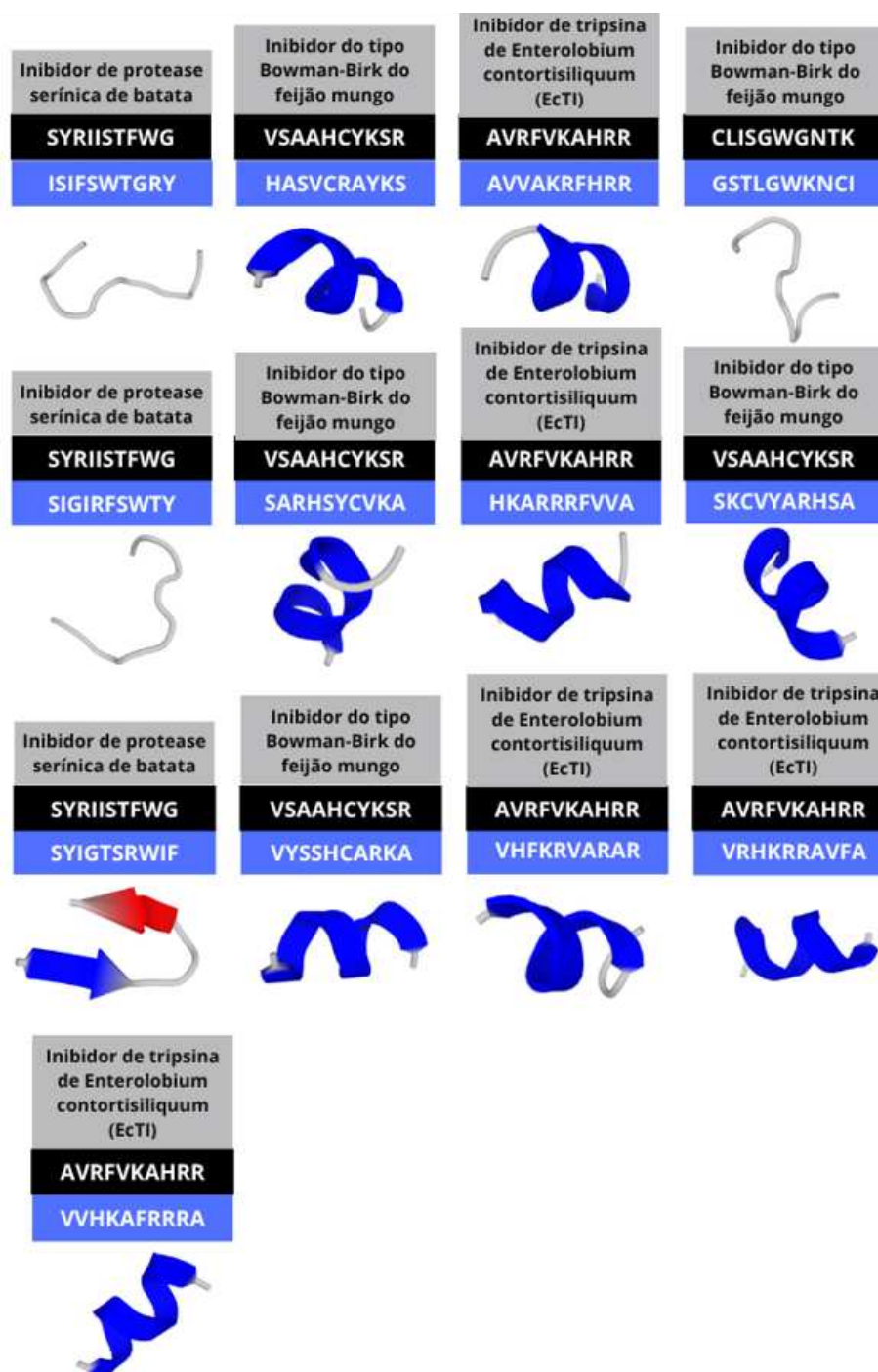
Fonte: Elaborada pela autora.

4.4.2.4 Caracterização estrutural

As variantes da primeira abordagem mantiveram uma proporção de estruturas semelhante, o que se considera desejado já que a maioria dos peptídeos antimicrobianos apresentam estruturas majoritariamente helicoidais e com apenas um peptídeo em folha-beta (**Figura 5**).

Figura 5 - Estruturas secundárias das variantes dos decapeptídeos gerados a partir da fragmentação de inibidores de proteases vegetais. Nos retângulos pretos estão informadas as variantes correspondentes a cada estrutura abaixo.



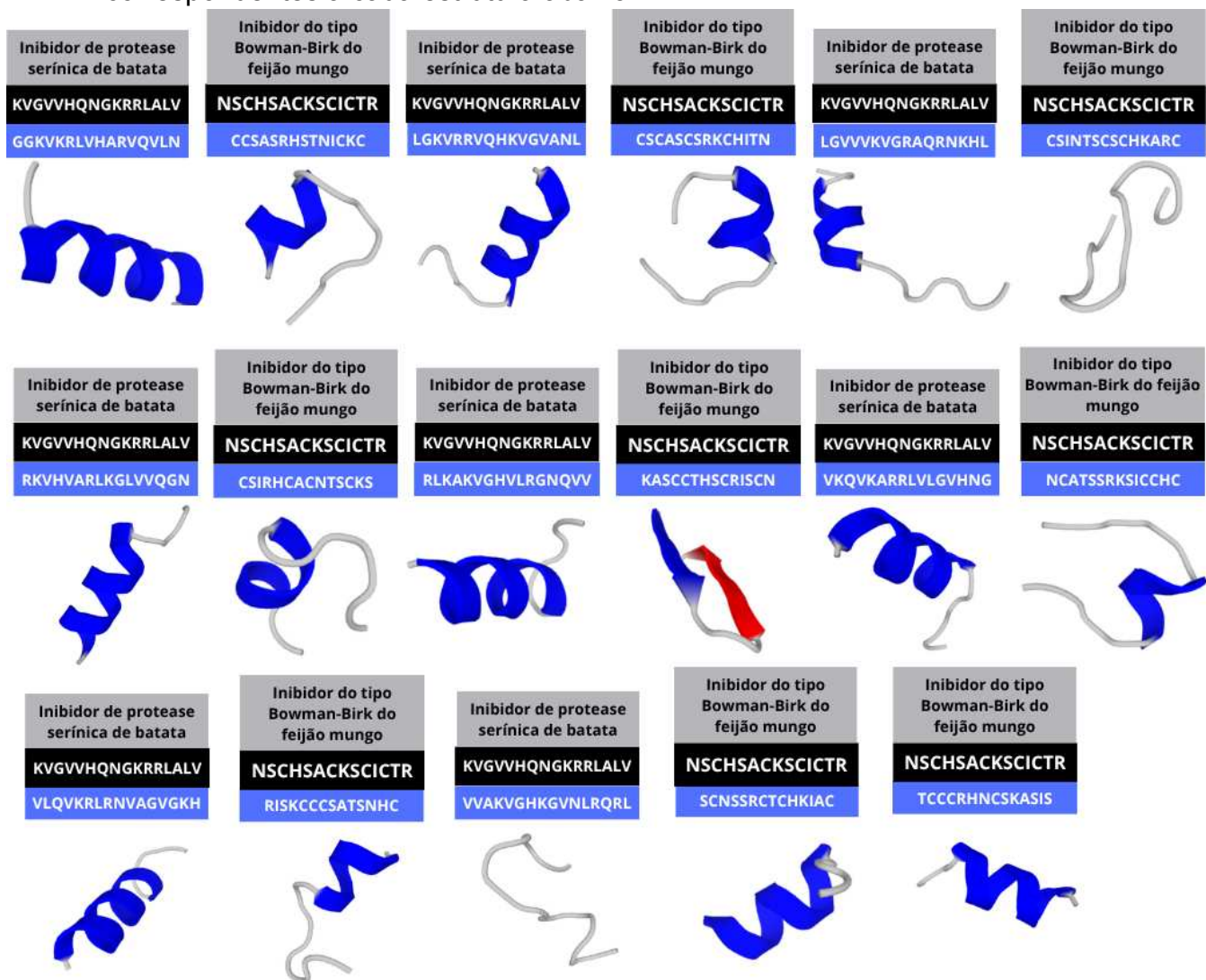


Fonte: Elaborada pela autora.

As variantes da segunda abordagem contam com 7 estruturas consideradas predominantemente helicoidais, 8 com predominância de estruturas estendidas e novamente apenas 1 contendo uma folha-beta (**Figura 6**).

Figura 6 - Estruturas secundárias das variantes dos peptídeos gerados a partir da prospecção de regiões com potencial antimicrobiano de inibidores de

proteases vegetais. Nos retângulos pretos estão informadas as variantes correspondentes a cada estrutura abaixo.



Fonte: Elaborada pela autora.

5 DISCUSSÃO

Sabe-se que o desenvolvimento de novos antimicrobianos seguros e eficazes não é capaz de acompanhar o aumento da resistência microbiana, sendo assim, a pesquisa de peptídeos antimicrobianos naturais e/ou sintéticos bioinspirados em proteínas vegetais é extremamente necessária. Esses peptídeos representam uma alternativa terapêutica promissora com potencial de substituir ou agregar em terapias antimicrobianas atuais. Nesse cenário, entram as análises *in silico* como uma ferramenta para otimizar essas pesquisas (Da Silva e Aquino, 2018; Puentes et al, 2020).

Dentre as diversas fontes de peptídeos provenientes de inibidores de protease de plantas, podemos citar famílias que são os maiores representantes como *Leguminosae*, *Solanaceae* e *Cucurbitaceae* e esse trabalho conta com inibidores dessas famílias sendo eles o inibidor do tipo Bowman-Birk do feijão mungo, o inibidor de protease serínica de batata e o Inibidor de proteinase de ácido aspártico de abóbora (SQAPI) respectivamente (Parisi et al, 2024). Os resultados presentes neste trabalho corroboram os dados encontrados na literatura que atesta a capacidade de um inibidor do tipo Kunitz proveniente de uma *Fabaceae* agir contra *Candida tropicalis* e *Candida buinensis* (Macedo et al, 2016); um inibidor de tripsina de uma leguminosa apresentar atividade antifúngica contra *Candida albicans* (Cotabarren et al, 2023) e um inibidor de protease de uma cucurbitácea ter ação antibacteriana contra *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris* e *Escherichia coli* (Satheesh e Murugan, 2011).

Um grande número de estudos, como o já citado de Satheesh e Murugan (2011), descrevem os mecanismos de ação na membrana e atividade antibacteriana de inibidores de tripsina (Almeida et al, 2020), o que pode complementar e validar os resultados provenientes do inibidor de tripsina de *Enterolobium contortisiliquum* (EcTI), que neste estudo deu origem a 4 peptídeos e 9 variantes com potencial antimicrobiano em ambas as abordagens utilizadas. Os inibidores de proteases do tipo Bowman-Birk também merecem destaque pela grande variedade de atividades antimicrobianas apresentadas na literatura, como antiviral (Liu et al, 2018),

antifúngica (Zhang et al, 2020), antibacteriana (Martins et al, 2018). Isso confirma o potencial multifacetado dos peptídeos deste trabalho provenientes do inibidor do feijão mungo, que foi responsável por gerar 7 peptídeos e 18 variantes que apresentaram potencial antimicrobiano. Já os inibidores do tipo Kunitz têm apresentado grande potencial contra microrganismos patogênicos, incluindo leveduras (Araújo et al, 2019; Dib et al, 2019). E os resultados encontrados no trabalho são condizentes com esse potencial antimicrobiano, já que foram obtidos 6 peptídeos e 14 variantes com que apresentam potencial de atividade antimicrobiana ao todo.

No que diz respeito a comparação dos peptídeos com suas variantes, geradas pelo Scrambled, há alguns pontos interessantes. Primeiramente, apesar das variantes terem sido geradas a partir dos peptídeos mais promissores nas análises de potencial antimicrobiano, em ambas as abordagens, ainda assim houveram variantes que não atestaram como potenciais antimicrobianos o que pode se dever a correlação entre a sequência aminoacídica e a atividade desses peptídeos ou mesmo a falsos positivos (Slezina e Odintsova, 2023). Outro ponto seria a repetição de parâmetros físico-químicos como carga, peso molecular e ponto isoelétrico o que faz sentido já que a ordem dos aminoácidos no peptídeo não interfere nesses parâmetros; diferentemente dos parâmetros biológicos como toxicidade e potencial hemolítico, nos quais as variantes apresentaram divergência de resultados quanto a seus peptídeos de origem ou até mesmo entre variantes de um mesmo peptídeo, o que pode indicar uma relação entre a ordem aminoacídica e as características biológicas importantes desses peptídeos (Hao et al, 2022; Yang et al, 2023).

É descrito na literatura que cerca de 16% das sequências antimicrobianas registradas em bancos de dados são provenientes de plantas, porém, vale ressaltar que muitos desses peptídeos não foram testados em ensaios clínicos, e/ou falharam na fase clínica devido à toxicidade alta ou à baixa eficácia por terem sido inativados em condições fisiológicas. Ademais, essas desvantagens podem ser resolvidas quando peptídeos naturais são modificados estruturalmente e diversos estudos demonstraram o sucesso de peptídeos sintéticos bioinspirados em peptídeos naturais ou proteínas

antimicrobianas para o controle de bactérias e leveduras resistentes (Mustafa et al, 2022).

O estudo de peptídeos provenientes de moléculas vegetais tem se tornado um campo de estudo cada vez mais promissor, não é à toa que 25 a 50% dos produtos farmacêuticos atuais são de origem vegetal (ECDC, 2022). Além das vantagens inerentes aos peptídeos como estabilidade, estrutura compacta, alta especificidade e baixo potencial tóxico, além de serem capazes de atuar na regulação da imunidade inata e adaptativa e na regulação dos processos inflamatórios do hospedeiro (Mahlapuu et al, 2016), aqui temos o alinhamento das vantagens de se trabalhar com inibidores de protease vegetais, que em essência são moléculas que compõem o sistema de defesa das plantas o que acarreta num potencial notável na área da saúde para a geração de potenciais ferramentas clínicas (Parisi et al, 2024).

Os inibidores de protease representam um grande grupo de moléculas vegetais com alto valor agregado agrônômico, biotecnológico e biomédico. Muitas atividades biológicas já foram relatadas para inibidores de proteases, como antitumorais, antioxidantes, anticoagulantes e inseticidas (Cotabarren et al, 2020). Portanto, os IPs oferecem uma notável oportunidade para a descoberta e o desenvolvimento de fármacos. Nesse sentido, considerando sua diversidade já identificada (> 6.700 IPs proteicos derivados de plantas) e aqueles ainda inexplorados, determinar os efeitos potenciais de cada novo peptídeo na saúde humana é de grande interesse (Hellinger e Gruber, 2019).

Os IPPs são notavelmente estáveis à temperatura, pH, agentes químicos (detergentes, redutores e oxidantes), força iônica e proteólise. Essas características estão relacionadas à sua estrutura tridimensional compacta, ligada por ligações dissulfeto. Interações não covalentes (como, ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas) também são responsáveis pelo enovelamento de proteínas e estabilidade geral das moléculas (Joshi et al, 2013).

Na análise das estruturas tridimensionais dos peptídeos de estudo, é interessante destacar a predominância de conformações helicoidais, já que a helicidade do peptídeo e sua face apolar da estrutura em alfa-hélice também são vitais para a inserção bem-sucedida na membrana e, em seguida, para a formação dos poros (Sun et al, 2017). Além dessa conformação, a segunda

mais presente no trabalho foi a espiral estendida que apesar de não ser a mais comum em peptídeos antimicrobianos, segundo os estudos de Su et al (2010), peptídeos rico em arginina com essa caracterização estrutural que penetram na célula são capazes de um rápido deslocamento pela membrana lipídica sem consideráveis efeitos adversos a membrana.

Outro fator que se relaciona com essas características é a necessidade de uma carga positiva para o peptídeo e isso se deve ao fato de que para atuarem na própria membrana plasmática os peptídeos precisam apresentar uma carga líquida positiva para uma boa interação com as cargas negativas presentes dos fosfolipídios (Travkova, Moehwald e Brezesinski, 2017),isso não é uma via de regra já que peptídeos com carga negativa ou neutra podem apresentar atividade antimicrobiana igualmente, mas são menos frequentes (Zhu et al, 2015). Apesar dessa preferência por uma carga total positiva do peptídeos, as interações eletrostáticas e hidrofóbicas são igualmente importantes, principalmente se o peptídeo precisa atravessar a camada da membrana plasmática e atuar no interior da célula; porém casos em que esses valores são muito altos geralmente acarretam em um potencial hemolítico maior (Pirtskhalava et al, 2021).

Os estudos ADMET foram realizados para avaliar os parâmetros farmacocinéticos dos peptídeos vegetais, com foco na absorção e metabolismo. A Absorção Intestinal Humana (AIH) foi avaliada como um fator importante que afeta a biodisponibilidade (Radchenko et al, 2016); e quase todos os peptídeos (com exceção de dois da primeira abordagem) apresentaram resultado positivo, indicando absorvibilidade no intestino humano, com resultados semelhantes sendo encontrados para plantas da espécie *Aegle marmelos* por Mishra e Muthukaliannan (2024) e em plantas da família Rosaceae nos estudos feitos por Flores-Houlgín, Frau e Glossman-Mitnik (2021). Ainda nesse cenário, a atividade das enzimas do citocromo P450 (CYPs) tem impacto significativo na farmacocinética do medicamento, alterando clinicamente a eficácia do medicamento administrado ou resultando em vários efeitos colaterais adversos devido a interações medicamentosas, como no caso da administração múltipla de medicamentos, por isso apesar de terem sido a minoria (17 peptídeos em ambas as abordagens) algumas moléculas apresentaram servir como substrato e/ou

inibidor da isoforma CYP450 3A4 é uma das monooxigenases envolvida no metabolismo de medicamentos e encontrada no fígado e trato gastrointestinal (Fatoki et al, 2024; Sivertsen et al, 2013).

Um ponto importante, no que se diz respeito ao comparativo entre as duas abordagens analisadas, é a diferente porcentagem de resultados positivos de 40% para a primeira abordagem e 85% para a segunda. Isso pode ser explicado devido ao método de escolha para a geração dos peptídeos propriamente ditos, que é o princípio que caracteriza cada abordagem e o ponto base do trabalho; como a metodologia mostrada em AB2 se baseia em uma análise criteriosa de padrões estruturais conservados com base em bancos de dados robustos e constantemente alimentados isso confere uma probabilidade maior de confiança do resultado e uma filtragem maior de segmentos com maior potencial antimicrobiano, diferentemente da primeira metodologia onde arbitrariamente se quebra o inibidor em partes iguais e é analisada a estrutura completa (Zhao et al, 2024; Musin e Asyanova, 2025).

Os peptídeos mais promissores foram selecionados para o desenho de peptídeos variantes, buscando estruturas com atividade antimicrobiana igual ou superior à dos peptídeos originais (Bozovicar e Bratikovic, 2019). Sabe-se que as características estruturais de um peptídeo são determinantes para sua atividade biológica, então foram analisadas diferentes combinações possíveis de sequências peptídicas das moléculas mais promissoras a fim de explorar o impacto que esse fator teria nas características desejadas para a atividade antimicrobiana. A carga positiva de todas as variantes em ambas as abordagens se deve provavelmente ao fato de serem mais ricas em aminoácidos positivos como arginina em sua estrutura primária, o que favorece a interação eletrostática dos peptídeos com os grupos fosfato de carga negativa presentes na superfície das membranas microbianas (Ebbensgaard et al, 2018). A alta afinidade dos peptídeos para realizar esse tipo de interação também foi atestada através do cálculo do índice de Bowman, os resultados positivos e até 2.5 indicam esse bom potencial de ligação a membranas (Yin et al, 2012) das variantes; assim como a taxa hidrofóbica média entre 40-50%, o que permite suas interações com o meio aquoso e com a membrana microbiana, facilitando assim a incorporação na estrutura das membranas das células (Gagat et al, 2024).

6 CONCLUSÃO

Conclui-se portanto, a partir dos resultados obtidos, que o uso de abordagens computacionais integradas é uma estratégia eficaz para a triagem, obtenção e caracterização de peptídeos antimicrobianos derivados de inibidores de proteases de plantas. A utilização de duas abordagens distintas permitiu explorar mais profundamente a sequência aminoacídica dos inibidores em busca de peptídeos com potencial antimicrobiano, assim como, a geração de bibliotecas de variantes dos peptídeos mais promissores quanto a atividade antimicrobiano atribuiu robustez e explorou o impacto das diferentes sequências de aminoácidos na função e características dos peptídeos.

REFERÊNCIAS

- AHMED, T. A. E.; HAMMAMI, R. Recent insights into structure-function relationships of antimicrobial peptides. **Journal of Food Biochemistry**, [s. l.], v. 43, n. 1, p. e12546, 2019.
- AKBARIAN, M. *et al.* Bioactive peptides: synthesis, sources, applications, and proposed mechanisms of action. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 1445, 27 jan. 2022.
- ALMEIDA, L. H. de O. *et al.* Adepamycin: design, synthesis and biological properties of a new peptide with antimicrobial properties. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 691, p. 108487, 2020.
- AMARAL, A. C. *et al.* Predicting antimicrobial peptides from eukaryotic genomes: in silico strategies to develop antibiotics. **Peptides**, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 301-308, 2012.
- AMARAL, J. L. *et al.* Quantum biochemistry, molecular docking, and dynamics simulation revealed synthetic peptides induced conformational changes affecting the topology of the catalytic site of SARS-CoV-2 main protease. **Journal of Biomolecular Structure & Dynamics**, [s. l.], v. 40, n. 19, p. 8925-8937, 2022.
- ARAÚJO, N. M. S. *et al.* CITI, a Kunitz trypsin inhibitor purified from *Cassia leiandra* Benth. seeds, exerts a candidicidal effect on *Candida albicans* by inducing oxidative stress and necrosis. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, [s. l.], v. 1861, n. 11, p. 183032, 2019.
- ARONICA, P. G. A. *et al.* Computational methods and tools in antimicrobial peptide research. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [s. l.], v. 61, n. 7, p. 3172-3196, 2021.
- ARZANLOU, M.; CHAI, W. C.; VENTER, H. Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. **Essays in Biochemistry**, [s. l.], v. 61, n. 1, p. 49-59, 2017.
- ASIF, F. *et al.* Antimicrobial peptides as therapeutics: confronting delivery challenges to optimize efficacy. **The Microbe**, [s. l.], v. 2, p. 100051, 2024.
- BELLO-MADRUGA, R.; TORRENT BURGAS, M. The limits of prediction: why intrinsically disordered regions challenge our understanding of antimicrobial peptides. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, [s. l.], v. 23, p. 972-981, 2024.
- BELTRAN, J. A.; AGUILERA-MENDOZA, L.; BRIZUELA, C. A. Optimal selection of molecular descriptors for antimicrobial peptides classification: an evolutionary feature weighting approach. **BMC Genomics**, [s. l.], v. 19, suppl. 7, p. 672, 2018.
- BERMAN, H. M. *et al.* The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 235-242, 01 jan. 2000.
- BONTURI, C. R. *et al.* Plant Kunitz inhibitors and their interaction with proteases: current and potential pharmacological targets. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 9, p. 4742, 2022.
- BORZI, M. M. *et al.* Characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from free-range helmeted guineafowl. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 49, suppl. 1, p. 107-112, 2018.
- BOZOVIČAR, K.; BRATKOVIČ, T. Evolving a peptide: library platforms and diversification strategies. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 215, 2019.

BROWN, E. D.; WRIGHT, G. D. Antibacterial drug discovery in the resistance era. **Nature**, [s. l.], v. 529, n. 7586, p. 336-343, 21 jan. 2016.

BRUICE, P. Y. **Química orgânica**. 4. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2006. v. 2, p. 392.

BUCATARU, C.; CIOBANASU, C. Antimicrobial peptides: opportunities and challenges in overcoming resistance. **Microbiological Research**, [s. l.], v. 286, p. 127822, 2024.

BURDUKIEWICZ, M. *et al.* Proteomic screening for prediction and design of antimicrobial peptides with AmpGram. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 21, n. 12, p. 4310, 2020.

CARDOSO, M. H. *et al.* The structure/function relationship in antimicrobial peptides: what can we obtain from structural data? **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, [s. l.], v. 112, p. 359-384, 2018.

CESARO, A.; TORRES, M. D. T.; DE LA FUENTE-NUNEZ, C. Methods for the design and characterization of peptide antibiotics. **Methods in Enzymology**, [s. l.], v. 663, p. 303-326, 2022.

CHAUDHARY, K. *et al.* A web server and mobile app for computing hemolytic potency of peptides. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 22843, 08 mar. 2016.

CHEN, V. B. *et al.* MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, [s. l.], v. 66, pt. 1, p. 12-21, jan. 2010.

CHENG, F. *et al.* admetSAR: a comprehensive source and free tool for evaluating chemical ADMET properties. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [s. l.], v. 52, n. 11, p. 3099-3105, 26 nov. 2012.

CID-GALLEGOS, M. S. *et al.* Protease inhibitors from plants as therapeutic agents – a review. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 77, n. 1, p. 20-29, 2022.

CISNEROS, J. S. *et al.* Purification and characterization of a novel trypsin inhibitor from *Solanum tuberosum* subsp. *andigenum* var. *overa*: study of the expression levels and preliminary evaluation of its antimicrobial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 158, p. 1279-1287, 2020.

CLEMENTE, A. Bowman-Birk inhibitors from legumes as colorectal chemopreventive agents. **World Journal of Gastroenterology**, [s. l.], v. 20, n. 30, p. 10305-10315, 2014.

COTABARREN, J. *et al.* Biotechnological, biomedical, and agronomical applications of plant protease inhibitors with high stability: a systematic review. **Plant Science**, [s. l.], v. 292, p. 110398, 2020.

COTABARREN, J. *et al.* A multifunctional trypsin protease inhibitor from yellow bell pepper seeds: uncovering its dual antifungal and hypoglycemic properties. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 781, 2023.

DA SILVA, M. O.; AQUINO, S. Resistência aos antimicrobianos: uma revisão dos desafios na busca por novas alternativas de tratamento. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, Santa Cruz do Sul, v. 8, n. 4, p. 472-482, 2018.

DAEMAN, N. *et al.* Effect of selective decontamination on antimicrobial resistance in intensive care units: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 328-341, 2013.

DB MOLECULAR. **Resistência aos antibióticos**. [s. l.], 2019. Disponível em: <https://www.dbmolecular.com.br/artigo/resistencia-aos-antibioticos>. Acesso em: 11/06/2024.

DECKER, A. P.; MECHESSO, A. F.; WANG, G. Expanding the landscape of amino acid-rich antimicrobial peptides: definition, deployment in nature, implications for peptide design and therapeutic potential. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 21, p. 12874, 2022.

DELANO, W. L.; LAM, J. W. PyMOL: a communications tool for computational models. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**. Washington, v. 230, p. U1371-U1372, 2005.

DIAS, L. P. *et al.* RcAlb-PepII, a synthetic small peptide bioinspired in the 2S albumin from the seed cake of *Ricinus communis*, is a potent antimicrobial agent against *Klebsiella pneumoniae* and *Candida parapsilosis*. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, [s. l.], v. 1862, n. 2, p. 183092, 2020.

DIB, H. X. *et al.* Biochemical characterization of a Kunitz inhibitor from *Inga edulis* seeds with antifungal activity against *Candida* spp. **Archives of Microbiology**, [s. l.], v. 201, n. 2, p. 223-233, 2019.

DUTT, Y. *et al.* The association between biofilm formation and antimicrobial resistance with possible ingenious bio-remedial approaches. **Antibiotics**, Basel, v. 11, n. 7, p. 930, 2022.

EBBENGAARD, A. *et al.* The role of outer membrane proteins and lipopolysaccharides for the sensitivity of *Escherichia coli* to antimicrobial peptides. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 9, p. 2153, 2018.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antimicrobial resistance surveillance in Europe**. [s. l.], 2022.

FARCAS, A. *et al.* Design of novel antimicrobial peptides in a multi-stage in silico approach. **Biophysical Journal**, [s. l.], v. 118, n. 3, p. 384a, 2020.

FARIAS, V. A. de *et al.* Enzymatic hydrolysis of wheat gluten employing cysteine proteases from noni fruits (*Morinda citrifolia* L.). **Journal of Cereal Science**, [s. l.], v. 117, p. 103929, 2024.

FATOKI, T. H. *et al.* In silico molecular targets, docking, dynamics simulation and physiologically based pharmacokinetics modeling of oritavancin. **BMC Pharmacology and Toxicology**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 79, 2024.

FLORES-HOLGUÍN, N.; FRAU, J.; GLOSSMAN-MITNIK, D. In silico pharmacokinetics, ADMET study and conceptual DFT analysis of two plant cyclopeptides isolated from Rosaceae as a computational peptidology approach. **Frontiers in Chemistry**, [s. l.], v. 9, p. 708364, 2021.

FORBES, J.; KRISHNAMURTHY, K. Biochemistry, peptide. In: **StatPearls**. Treasure Island, 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562260/>. Acesso em: 20/05/2026.

GAGAT, P. *et al.* Enhancing antimicrobial peptide activity through modifications of charge, hydrophobicity, and structure. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 25, n. 19, p. 10821, 2024.

GASTEIGER, E. *et al.* Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: WALKER, J. M. (ed.). **The proteomics protocols handbook**. Totowa, p. 571-607, 2005.

GAUTIER, R. *et al.* HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific alpha-helical properties. **Bioinformatics**, Oxford, v. 24, n. 18, p. 2101-2102, 2008.

GAWDE, U. *et al.* CAMPR4: a database of natural and synthetic antimicrobial peptides. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 51, n. D1, p. D377-D383, 2023.

GITLIN-DOMAGALSKA, A.; MACIEJEWSKA, A.; DĘBOWSKI, D. Bowman-Birk inhibitors: insights into family of multifunctional proteins and peptides with potential therapeutical applications. **Pharmaceuticals**, Basel, v. 13, n. 12, p. 421, 2020.

GLEESON, M. P. Generation of a set of simple, interpretable ADMET rules of thumb. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 51, n. 4, p. 817-834, 2008.

GLIBOWICZA, M.; HE, S.; DEBER, C. M. Enhanced proteolytic resistance of cationic antimicrobial peptides through lysine side chain analogs and cyclization. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 612, p. 105-109, 2022.

GREBER, K. E. *et al.* Efficacy of newly generated short antimicrobial cationic lipopeptides against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **International Journal of Antimicrobial Agents**, [s. l.], v. 55, n. 3, p. 105827, 2020.

GUPTA, S. *et al.* In silico approach for predicting toxicity of peptides and proteins. **PLoS One**, [s. l.], v. 8, n. 9, p. e73957, 2013.

HALL, C. W.; MAH, T.-F. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 41, n. 3, p. 276-301, 2017.

HAO, Y. *et al.* Editorial: antimicrobial peptides: molecular design, structure-function relationship, and biosynthesis optimization. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 13, p. 888540, 2022.

HATFULL, G. F.; DEDRICK, R. M.; SCHOOLEY, R. T. Phage therapy for antibiotic-resistant bacterial infections. **Annual Review of Medicine**, [s. l.], v. 73, n. 1, p. 197-211, 2022.

HEIBGES, A. *et al.* Structural diversity and organization of three gene families for Kunitz-type enzyme inhibitors from potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). **Molecular Genetics and Genomics**, [s. l.], v. 269, n. 4, p. 526-534, 2003.

HELLINGER, R.; GRUBER, C. W. Peptide-based protease inhibitors from plants. **Drug Discovery Today**, [s. l.], v. 24, n. 9, p. 1877-1889, 2019.

HUAN, Y. *et al.* Antimicrobial peptides: classification, design, application and research progress in multiple fields. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 11, p. 582779, 2020.

IMMUNOMEDICINE GROUP. **Tools: predicted antigenic peptides**. [s. l.], [20--?]. Disponível em: <http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl>. Acesso em: 23/03/2025.

IRAZAZABAL, L. N. **Avaliação estrutural e funcional de novos peptídeos antimicrobianos obtidos a partir de desenho racional**. 2016. Tese (Doutorado em Patologia Molecular) – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

Jl, S. *et al.* Antimicrobial peptides: an alternative to traditional antibiotics. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 265, p. 116072, 2024.

JOSHI, R. S. *et al.* Complementation of intramolecular interactions for structural-functional stability of plant serine proteinase inhibitors. **Biochimica et Biophysica Acta**, [s. l.], v. 1830, n. 11, p. 5087-5094, 2013.

KAPOOR, G.; SAIGAL, S.; ELONGAVAN, A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: a guide for clinicians. **Journal of Anaesthesiology, Clinical Pharmacology**, [s. l.], v. 33, n. 3, p. 300-305, 2017.

KEIL, B. **Specificity of proteolysis**. Berlin: Springer-Verlag, p. 335, 1992.

KOWALCZEWSKI, P. Ł. *et al.* Bioactive compounds of potato (*Solanum tuberosum* L.) juice: from industry waste to food and medical applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 52-89, 2022.

KUMAR, P.; KIZHAKKEDATHU, J. N.; STRAUS, S. K. Antimicrobial peptides: diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo. **Biomolecules**, v. 8, n. 1, p. 4, 2018.

KUMARI, S.; SHAHIDI, F. Bioactive peptides as antioxidants and antimicrobials: fundamentals and applications. **Journal of Food Bioactives**, [s. l.], v. 25, 2024.

LAI, Z. *et al.* Strategies employed in the design of antimicrobial peptides with enhanced proteolytic stability. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 59, p. 107962, 2022.

LAMIABLE, A. *et al.* PEP-FOLD3: faster de novo structure prediction for linear peptides in solution and in complex. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 44, n. W1, p. W449-W454, 2016.

LAU, J. L.; DUNN, M. K. Therapeutic peptides: historical perspectives and current development trends. In: **Peptide and peptidomimetic therapeutics**. [s. l.]: Elsevier, p. 3-33, 2022.

LENIN, K. L. D.; ANTONY, S. P. In silico molecular and functional characterization of a dual function antimicrobial peptide, hepcidin (GIFT-Hep), isolated from genetically improved farmed tilapia (GIFT, *Oreochromis niloticus*). **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 130, 2023.

LEONARDO-SOUSA, C. *et al.* Revisiting proteasome inhibitors: molecular underpinnings of their development, mechanisms of resistance and strategies to overcome anti-cancer drug resistance. **Molecules**, Basel, v. 27, n. 7, p. 2201, 2022.

LI, H. *et al.* The contribution of antimicrobial peptides to immune cell function: a review of recent advances. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 15, n. 9, p. 2278, 2023a.

LI, X. *et al.* Antibacterial sensitizers from natural plants: a powerful weapon against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 14, p. 1118793, 2023b.

LI, Y. *et al.* Studies on an artificial trypsin inhibitor peptide derived from the mung bean trypsin inhibitor: chemical synthesis, refolding, and crystallographic analysis of its complex with trypsin. **The Journal of Biochemistry**, [s. l.], v. 116, n. 1, p. 18-25, 1994.

LIANG, Q. *et al.* Development strategies and application of antimicrobial peptides as future alternatives to in-feed antibiotics. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 927, p. 172150, 2024.

LIMA, A. M. *et al.* Plant protease inhibitors against SARS-CoV-2 main protease: an in silico approach. **Future Virology**, [s. l.], v. 18, n. 7, p. 439-454, 2023.

LIN, T.-T. *et al.* AI4AMP: an antimicrobial peptide predictor using physicochemical property-based encoding method and deep learning. **mSystems**, [s. l.], v. 6, n. 6, p. e0029921, 2021.

LIU, B. *et al.* Design of novel antimicrobial peptide dimer analogues with enhanced antimicrobial activity in vitro and in vivo by intermolecular triazole bridge strategy. **Peptides**, [s. l.], v. 88, p. 115-125, 2017.

LIU, Y. *et al.* Bowman-Birk inhibitor suppresses herpes simplex virus type 2 infection of human cervical epithelial cells. **Viruses**, [s. l.], v. 10, n. 10, p. 557, 2018.

LIU, Y. *et al.* The revitalization of antimicrobial peptides in the resistance era. **Pharmacological Research**, [s. l.], v. 163, p. 105276, 2021.

LÓPEZ-GARCÍA, G. *et al.* Antioxidant and antimicrobial peptides derived from food proteins. **Molecules**, Basel, v. 27, n. 4, p. 1343, 2022.

LOYOLA-CRUZ, M. Á. *et al.* ESKAPE bacteria characterization reveals the presence of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* outbreaks in COVID-19/VAP patients. **American Journal of Infection Control**, [s. l.], v. 51, n. 7, p. 729-737, 2023.

LUCERO, B. *et al.* Protein-protein interactions: developing small-molecule inhibitors/stabilizers through covalent strategies. **Trends in Pharmacological Sciences**, [s. l.], v. 44, n. 7, p. 474-488, 2023.

MACEDO, M. L. R. *et al.* Antimicrobial activity of ILTI, a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Inga laurina* (Sw.) Willd. **Current Microbiology**, [s. l.], v. 72, n. 5, p. 538-544, 2016.

MAEMOTO, T. *et al.* A peptide derived from adaptor protein STAP-2 inhibits tumor progression by downregulating epidermal growth factor receptor signaling. **The Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 299, n. 1, p. 102724, 2023.

MAHLAPUU, M. *et al.* Antimicrobial peptides: an emerging category of therapeutic agents. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 6, p. 194, 2016.

MAKABENTA, J. M. V. *et al.* Polymeric nanoparticles active against dual-species bacterial biofilms. **Molecules**, Basel, v. 26, n. 16, p. 4958, 2021.

MANUAIS MSD. **Mecanismos comuns da resistência a antibióticos**. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: <https://www.msdmanuals.com/pt-br/profissional/multimedia/table/mecanismos-comuns-da-resistencia-a-antibioticos>. Acesso em: 20/06/2024.

MARDANI, M. *et al.* Antioxidant peptides: overview of production, properties, and applications in food systems. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 46-106, 2023.

MARIMUTHU, S. K. *et al.* In silico alpha-helical structural recognition of temporin antimicrobial peptides and its interactions with Middle East respiratory syndrome-coronavirus. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 1473-1483, 2020.

MARTINS, T. F. *et al.* A Bowman-Birk inhibitor from the seeds of *Luetzelburgia auriculata* inhibits *Staphylococcus aureus* growth by promoting severe cell membrane damage. **Journal of Natural Products**, [s. l.], v. 81, n. 7, p. 1497-1507, 2018.

MIMOTOPES. **Scrambled**. [s. l.], [s. d.]. Disponível em: <http://www.mimotopes.com/peptideLibraryScreening.asp?id=97>. Acesso em: 26/03/2025.

MISHRA, U. N.; REDDY, M. V.; PRASAD, D. T. Plant serine protease inhibitor (SPI): a potent player with bactericidal, fungicidal, nematocidal and antiviral properties. **International Journal of Chemical Studies**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 2985-2993, 2020.

MISHRA, R. K. A.; MUTHUKALIANNAN, G. K. In silico and in vitro study of novel antimicrobial peptide AM1 from *Aegle marmelos* against drug-resistant *Staphylococcus aureus*. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 25822, 2024.

MONCLA, B. J. *et al.* Degradation of naturally occurring and engineered antimicrobial peptides by proteases. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, [s. l.], v. 2, n. 6, p. 404-408, 2011.

MORDOR INTELLIGENCE. **Antibiotics market report: industry growth, size & analysis**. [s. l.], [s. d.]. Disponível em: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/antibiotics-market>. Acesso em: 19/12/2024.

MORDOR INTELLIGENCE. **Tamanho do mercado de antibióticos e análise de participação: relatório de pesquisa da indústria – tendências de crescimento**. [S.

I.], [s. d.]. Disponível em: <https://www.mordorintelligence.com/pt/industry-reports/antibiotics-market>. Acesso em: 8/06/2024.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, [s. l.], v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 16 dez. 1983.

MULANI, M. S. *et al.* Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: a review. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 10, p. 539, 2019.

MUSIN, K.; ASYANOVA, E. How machine learning helps in combating antimicrobial resistance: a review of AMP analysis and generation methods. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, [s. l.], v. 31, n. 4, 2025.

MUSTAFA, G. *et al.* Investigation of plant antimicrobial peptides against selected pathogenic bacterial species using a peptide-protein docking approach. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2022, p. 1980572, 2022.

NIROGI, R. *et al.* Absorption, distribution, metabolism, excretion (ADME), drug-drug interaction potential and prediction of human pharmacokinetics of SUVN-G3031, a novel histamine 3 receptor (H3R) inverse agonist in clinical development for the treatment of narcolepsy. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 152, p. 105425, 2020.

NOZAKI, Y.; IZUMI, S. Preincubation time-dependent, long-lasting inhibition of drug transporters and impact on the prediction of drug-drug interactions. **Drug Metabolism and Disposition**, [s. l.], v. 51, n. 9, p. 1077-1088, 2023.

NWOBODO, D. C. *et al.* Antibiotic resistance: the challenges and some emerging strategies for tackling a global menace. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, [s. l.], v. 36, n. 9, p. e24655, 2022.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], v. 52, n. 1, p. 1, 2003.

OLIVA, M. L. V. *et al.* A novel subclassification for Kunitz proteinase inhibitors from leguminous seeds. **Biochimie**, [s. l.], v. 92, n. 11, p. 1667-1673, 2010.

OLIVEIRA, M. T. A. *et al.* Serine protease inhibition and modulatory-antibiotic activity of the proteic extract and fractions from *Amburana cearensis*. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 135, p. 110946, 2020.

PALMER, N. *et al.* Molecular dynamics for antimicrobial peptide discovery. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 89, n. 4, p. e00703-20, 2021.

PARISI, M. G. *et al.* Plant protease inhibitors as emerging antimicrobial peptide agents: a comprehensive review. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 16, n. 5, p. 582, 2024.

PATIL, A. *et al.* Foodborne ESKAPE biofilms and antimicrobial resistance: lessons learned from clinical isolates. **Pathogens and Global Health**, [s. l.], v. 115, n. 6, p. 339-356, 2021.

PAUL, D. C.; BHATTACHARJEE, M. Revisiting the significance of natural protease inhibitors: a comprehensive review. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 280, pt. 3, p. 135899, 2024.

PEKSA, A.; MIEDZIANKA, J. Potato industry by-products as a source of protein with beneficial nutritional, functional, health-promoting and antimicrobial properties. **Applied Sciences**, Basel, v. 11, n. 8, p. 3497, 2021.

PEPTIDE GENERATOR. [S. I.], [s. d.]. Disponível em: https://www.peptide2.com/peptide_generator.php. Acesso em: 22/03/2025.

PIMCHAN, T. *et al.* Isolation, identification, and mode of action of antibacterial peptides derived from egg yolk hydrolysate. **Poultry Science**, [s. l.], v. 102, n. 7, p. 102695, 2023.

PIRTSKHALAVA, M. *et al.* Physicochemical features and peculiarities of interaction of AMP with the membrane. **Pharmaceuticals**, Basel, v. 14, n. 5, p. 471, 2021.

POPOWICZ, G. M. *et al.* Functional and structural characterization of Spl proteases from *Staphylococcus aureus*. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 358, n. 1, p. 270-279, 2006.

PORTO, W. F. *et al.* In silico identification of novel hevein-like peptide precursors. **Peptides**, [s. l.], v. 38, n. 1, p. 127-136, 2012.

PUNTES, P. R. *et al.* Design, screening, and testing of non-rational peptide libraries with antimicrobial activity: in silico and experimental approaches. **Antibiotics**, Basel, v. 9, n. 12, p. 854, 2020.

QIN, D. *et al.* Prediction of antioxidant peptides using a quantitative structure-activity relationship predictor (AnOxPP) based on bidirectional long short-term memory neural network and interpretable amino acid descriptors. **Computers in Biology and Medicine**, [s. l.], v. 154, p. 106591, 2023.

RAWLINGS, N. D. *et al.* The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 46, n. D1, p. D624-D632, 2018.

REY, J. *et al.* PEP-FOLD4: a pH-dependent force field for peptide structure prediction in aqueous solution. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 51, n. W1, p. W432-W437, 2023.

REYGAERT, W. C. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. **AIMS Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 482-501, 2018.

RÖMLING, U. *et al.* Microbial biofilm formation: a need to act. **Journal of Internal Medicine**, [s. l.], v. 276, n. 2, p. 98-110, 2014.

SADASIVAM, D. *et al.* Rational design of antimicrobial peptides: an optimization approach. **Molecular Systems Design & Engineering**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 311-322, 2024.

SAIKIA, S.; CHETIA, P. Antibiotics: from mechanism of action to resistance and beyond. **Indian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 64, n. 3, p. 821-845, 2024.

SANTOS, D. M. R. C. *et al.* Trypsin purified from *Coryphaena hippurus* (common dolphinfish): purification, characterization, and application in commercial detergents. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 25, p. 101584, 2020.

SATHEESH, L. S.; MURUGAN, K. Antimicrobial activity of protease inhibitor from leaves of *Coccinia grandis* (L.) Voigt. **Indian Journal of Experimental Biology**, [s. l.], v. 49, n. 5, p. 366-374, 2011.

SHAO, C. *et al.* Antimicrobial peptides with protease stability: progress and perspective. **Future Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 11, n. 16, p. 2047-2050, 2019.

SHARMA, A. *et al.* dPABs: a novel in silico approach for predicting and designing anti-biofilm peptides. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 21839, 2016.

SHARMA, N. *et al.* ToxinPred2: an improved method for predicting toxicity of proteins. **Briefings in Bioinformatics**, [s. l.], v. 23, n. 5, p. bbac174, 2022.

SHIN, M. K. *et al.* Designing a novel functional peptide with dual antimicrobial and anti-inflammatory activities via in silico methods. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 13, p. 821070, 2022.

SHINDE, S.; LEE, L. H.; CHU, T. Inhibition of biofilm formation by the synergistic action of EGCG-S and antibiotics. **Antibiotics**, Basel, v. 10, n. 2, p. 102, 2021.

SHIRSAT, H. *et al.* Plant defense peptides: exploring the structure-function correlation for potential applications in drug design and therapeutics. **ACS Omega**, [s. l.], v. 10, n. 8, p. 7583-7596, 2025.

SILVA, F. G. **Filogenia molecular e análise in silico do inibidor de protease Bowman-Birk de espécies da subfamília Papilionoideae**. 2023. 114 f. Tese (Doutorado em Melhoramento Genético de Plantas) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2023.

SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P. Aspectos nutricionais de fitatos e taninos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 13, n. 1, p. 3-9, 2000.

SINGH, V.; PHUKAN, U. J. Interaction of host and *Staphylococcus aureus* protease-system regulates virulence and pathogenicity. **Medical Microbiology and Immunology**, [s. l.], v. 208, n. 5, p. 585-607, 2019.

SIVERTSEN, A. **Development of novel renin inhibitors and interaction of antimicrobial and cytotoxic peptides with plasma proteins: a drug discovery study**. 2013. Tese (Doutorado) – Universitetet i Tromsø, Tromsø, 2013.

SLEZINA, M. P.; ODINTSOVA, T. I. Plant antimicrobial peptides: insights into structure-function relationships for practical applications. **Current Issues in Molecular Biology**, [s. l.], v. 45, n. 4, p. 3674-3704, 2023.

SOLANKI, P. *et al.* Microbial proteases: ubiquitous enzymes with innumerable uses. **3 Biotech**, [s. l.], v. 11, n. 10, p. 428, 2021.

SOUZA, P. F. N. *et al.* Synthetic antimicrobial peptides: from choice of the best sequences to action mechanisms. **Biochimie**, [s. l.], v. 175, p. 132-145, 2020.

STARR, C. G.; WIMLEY, W. C. Antimicrobial peptides are degraded by the cytosolic proteases of human erythrocytes. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, [s. l.], v. 1859, n. 12, p. 2319-2326, 2017.

STAWIKOWSKI, M.; FIELDS, G. B. Introduction to peptide synthesis. **Current Protocols in Protein Science**, [s. l.], v. 69, n. 1, p. 18.1.1-18.1.13, 2012.

SUN, S. *et al.* Enantiomeric effect of D-amino acid substitution on the mechanism of action of α -helical membrane-active peptides. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 67, 2017.

SZYMCZAK, P. *et al.* Discovering highly potent antimicrobial peptides with deep generative model HydrAMP. **Nature Communications**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 1453, 2023.

TAJ, Z. *et al.* In silico and in vitro approach to assessing the antimicrobial efficiency of novel AMP variants derived from *Lactobacillus* sp. against ESKAPE pathogens. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 58, p. 103235, 2024.

TALAPKO, J. *et al.* Antimicrobial peptides - mechanisms of action, antimicrobial effects and clinical applications. **Antibiotics**, Basel, v. 11, n. 10, p. 1417, 2022.

THÉVENET, P. *et al.* PEP-FOLD: an updated de novo structure prediction server for both linear and disulfide bonded cyclic peptides. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 40, p. W288-W293, 2012.

TIMMONS, P. B.; HEWAGE, C. M. HAPPENN is a novel tool for hemolytic activity prediction for therapeutic peptides which employs neural networks. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 10869, 2020.

TORRENT, M. *et al.* AMPA: an automated web server for prediction of protein antimicrobial regions. **Bioinformatics**, Oxford, v. 28, n. 1, p. 130-131, 2012.

TORRES, M. D. T. *et al.* Peptide design principles for antimicrobial applications. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 431, n. 18, p. 3547-3567, 2019.

TRAVKOVA, O. G.; MOEHWALD, H.; BREZESINSKI, G. The interaction of antimicrobial peptides with membranes. **Advances in Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 247, p. 521-532, 2017.

TRINIDAD-CALDERÓN, P. A. *et al.* Maize bioactive peptides: from structure to human health. **Journal of Cereal Science**, [s. l.], v. 100, p. 103232, 2021.

UPMANYU, N.; MALVIYA, V. N. Antibiotics: mechanisms of action and modern challenges. In: **Microorganisms for sustainable environment and health**. [s. l.], p. 367-382, 2020.

URMI, U. L. *et al.* A review of the antiviral activity of cationic antimicrobial peptides. **Peptides**, [s. l.], v. 166, p. 171024, 2023.

VENTURA, L. C.; BEZERRA NETO, J. P. Peptídeos antimicrobianos na descoberta de novos fármacos e aplicações no tratamento de doenças. In: **Pesquisas e avanços em genética e biologia molecular**. [s. l.], 2023.

VERMELHO, A. B. *et al.* Enzimas proteolíticas: aplicações biotecnológicas. In: **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. [s. l.: s. n.], v. 11, p. 273-287, 2008.

VICENT, C.; RAMÍREZ, P. El reto de los microorganismos multirresistentes. **Medicina Clínica**, [s. l.], v. 162, n. 8, p. 385-386, 2024.

WANG, G.; LI, X.; WANG, Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 44, n. D1, p. D1087-D1093, 2016.

WANG, H. *et al.* Antimicrobial sensitizers: gatekeepers to avoid the development of multidrug-resistant bacteria. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 369, p. 25-38, 2024.

WANG, H. *et al.* Peptide-based inhibitors of protein-protein interactions: biophysical, structural and cellular consequences of introducing a constraint. **Chemical Science**, [s. l.], v. 12, n. 17, p. 5977-5993, 2021.

WANG, N. *et al.* Antibiotic combination therapy: a strategy to overcome bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 13, p. 839808, 2022.

WEI, D.; ZHANG, X. Biosynthesis, bioactivity, biotoxicity and applications of antimicrobial peptides for human health. **Biosafety and Health**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 118-134, 2022.

WILLIAMS, C. J. *et al.* MolProbity: more and better reference data for improved all-atom structure validation. **Protein Science**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 293-315, 2018.

WILLIAMS, M. R. *et al.* *Staphylococcus aureus* induces increased serine protease activity in keratinocytes. **The Journal of Investigative Dermatology**, [s. l.], v. 137, n. 2, p. 377-384, 2017.

WILMAERTS, D. *et al.* General mechanisms leading to persister formation and awakening. **Trends in Genetics**, [s. l.], v. 35, n. 6, p. 401-411, 2019.

WU, X. *et al.* Deep learning for advancing peptide drug development: tools and methods in structure prediction and design. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 268, p. 116262, 2024.

XU, L. *et al.* Conversion of broad-spectrum antimicrobial peptides into species-specific antimicrobials capable of precisely targeting pathogenic bacteria. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 944, 2020.

YAN, J. *et al.* Recent progress in the discovery and design of antimicrobial peptides using traditional machine learning and deep learning. **Antibiotics**, Basel, v. 11, n. 10, p. 1451, 2022.

YANG, H. *et al.* admetSAR 2.0: web-service for prediction and optimization of chemical ADMET properties. **Bioinformatics**, Oxford, v. 35, n. 6, p. 1067-1069, 2019.

YANG, N. *et al.* Editorial: community series in antimicrobial peptides: molecular design, structure function relationship and biosynthesis optimization. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 14, p. 1125426, 2023.

ZADOROZHNI, P. V.; KISELEV, V. V.; KHARCHENKO, A. V. In silico ADME profiling of salubrin and its analogues. **Future Pharmacology**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 160-197, 2022.

ZHAI, J. *et al.* Comparison and summary of in silico prediction tools for CYP450-mediated drug metabolism. **Drug Discovery Today**, [s. l.], v. 28, n. 10, p. 103728, 2023.

ZHANG, C. *et al.* A fungal effector and a rice NLR protein have antagonistic effects on a Bowman-Birk trypsin inhibitor. **Plant Biotechnology Journal**, [s. l.], v. 18, n. 11, p. 2354-2363, 2020.

ZHANG, C.; YANG, M. Antimicrobial peptides: from design to clinical application. **Antibiotics**, Basel, v. 11, n. 3, p. 349, 2022.

ZHU, X. *et al.* Characterization of antimicrobial activity and mechanisms of low amphipathic peptides with different α -helical propensity. **Acta Biomaterialia**, [s. l.], v. 18, p. 155-167, 2015.