



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE FARMÁCIA

JEFERSON DOS SANTOS DE MIRANDA

**Prospecção e avaliação *in silico* de peptídeos antimicrobianos oriundos de
Cereus jamacaru DC. e *Opuntia ficus-indica* L. Mill.**

Barreiras-BA

2023

JEFERSON DOS SANTOS DE MIRANDA

**Prospecção e avaliação *in silico* de peptídeos antimicrobianos oriundos de
Cereus jamacaru DC. e *Opuntia ficus-indica* L. Mill.**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Universidade Federal
do Oeste da Bahia, como requisito
parcial para obtenção do Diploma de
Graduação no Curso de Farmácia.

Orientador: Dr. Eduardo Fernandes Barbosa

Coorientador(a): Dra. Larissa Paola Rodrigues Venâncio

Barreiras-BA

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

M672 Miranda, Jeferson dos Santos de.

Prospecção e avaliação in silico de peptídeo antimicrobianos oriundos de *Cereus jamacaru* DC. e *Opuntia ficus-indica* L. Mill. / Jeferson dos Santos de Miranda – 2023.

50f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Fernandes Barbosa.

Monografia (Graduação) – Bacharelado em Farmácia. Universidade Federal do Oeste da Bahia. Centro das Ciências Biológicas e da Saúde. Barreiras, BA, 2023.

1. Peptídeos. 2. Antimicrobianos. 3. Antibióticos. I. Barbosa, Eduardo Fernandes. II. Universidade Federal do Oeste da Bahia – Centro das Ciências Biológicas e da Saúde. III. Título.

CDD 615.329

Biblioteca Central de Barreiras - UFOB

JEFERSON DOS SANTOS DE MIRANDA

**Prospecção e avaliação *in silico* de peptídeos antimicrobianos
oriundos de *Cereus jamacaru* DC. e *Opuntia ficus-indica* L. Mill.**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal do
Oeste da Bahia, como requisito parcial para
obtenção do Diploma de Graduação no
Curso de Farmácia.

Aprovado em 25 de julho de 2023.

BANCA EXAMINADORA:

Documento assinado digitalmente
 Eduardo Fernandes Barbosa
Data: 25/07/2023 14:57:41-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Eduardo Fernandes Barbosa
(Orientador)

Documento assinado digitalmente
 Stefania Neiva Lavorato
Data: 25/07/2023 15:18:16-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Stefania Neiva Lavorato
(Membro)

Documento assinado digitalmente
 THAMARA MACHADO E SILVA
Data: 25/07/2023 17:04:37-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Thâmara da Silva Machado
(Membro)

Dedico este trabalho ao grande maestro dessa orquestra chamada vida e a todos que me ajudaram a tocar essa música.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me ajudado até aqui, dando coragem, paciência e muita resiliência durante essa jornada e por colocar pessoas ao meu lado que fizeram essa caminhada muito mais leve e colorida.

Agradeço também a minha família, por completo, pois, sem exceção, todos me apoiaram nessa caminhada e acreditam mais na capacidade do que eu mesmo. A minha mãe e irmã, por todo o apoio, a meu pai, por mesmo não entendendo o que eu faço na faculdade sempre me ajudou no que fosse necessário, a minha avó, minhas tias, tio e primas, sou grato pelos incentivos e apoios, mesmo quando eu não queria ou precisava, pois entendo o valor e raridade disso.

Aos meus amigos que foram uma segunda família ao longo dessa jornada, que estiveram presentes nos momentos mais malucos, divertidos, aleatórios, cansativos ou desafiadores. Sendo sempre o ponto de alívio, ânimo e apoio para concluir as centenas de disciplinas e os incontáveis trabalhos que eu sempre queria não fazer. Sou muito grato pela amizade de vocês.

Aos vários mestres e doutores com quem aprendi muito ao longo da graduação, sou muito grato pelo visível esforço em não cumprir apenas uma carga horária e uma ementa, mas sim de formar profissionais competentes e contribuir de verdade para uma sociedade melhor. Sou muito feliz pelo maravilhoso elenco de professores da farmácia da UFOB, pois são realmente incríveis. E só lamento por aqueles estudantes que não tiveram o privilégio de aprender com eles.

Por fim, mas não menos importante, agradeço ao meu orientador professor Eduardo por ter me acolhido mesmo não sendo seu aluno e me apoiado em todo esse processo de elaboração do trabalho, mesmo quando eu sumia do nada, e a professora Larissa por se disponibilizar e contribuir nessa etapa tão importante da minha formação.

A todos vocês, sou eternamente grato.

“Os passos do homem são dirigidos pelo Senhor; como, pois, poderá o homem entender o seu caminho?”

(Provérbios 20.24)

RESUMO

Peptídeos antimicrobianos vem sendo considerados como alternativa potencialmente atrativa para substituição dos antibióticos convencionais frente ao advento da multirresistência. Muitas espécies têm sido exploradas como potenciais fontes de peptídeos antimicrobianos, considerando a presença universal dessas moléculas nos seres vivos. Nesse contexto, prospecção de peptídeos intragênicos é um dos métodos utilizados na busca por novos peptídeos para aplicação clínica. Esse método trabalha por meio da digestão de proteínas oriundas de qualquer espécie, que gera novos peptídeos para serem avaliados de acordo com as características esperadas para um peptídeo antimicrobiano efetivo, e assim serem classificados como antimicrobianos. Buscamos prospectar e analisar, *in silico*, novos peptídeos antimicrobianos a partir de proteínas de *Cereus jamacaru* DC. e *Opuntia ficus-indica* L. Mill. Utilizou-se o software Kamal para gerar os peptídeos, filtrar os resultados e analisar as características estruturais dos peptídeos. Foi realizada a digestão teórica de 60 proteínas, oriundas das duas espécies vegetais selecionadas, que gerou 84.543 peptídeos. Após uma etapa de seleção, separamos os 10 melhores candidatos, com base na classificação fornecida pelo software e analisamos diferentes propriedades de cada um deles, por meio dos servidores de bioinformática Expasy, APD3 e CAMP. Os resultados das análises indicaram todos os peptídeos como potenciais agentes antimicrobianos.

Palavras-chave: peptídeos antimicrobianos intragênicos; avaliação antimicrobiana *in silico*; peptídeos de origem vegetal; atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Antimicrobial peptides have been considered as a potentially attractive alternative to replace conventional antibiotics in the face of the advent of multidrug resistance. Many species have been explored as potential sources of antimicrobial peptides, considering the universal presence of these molecules in living beings. In this context, prospecting for intragenic peptides is one of the methods used in the search for new peptides for clinical application. This method works through the digestion of proteins from any species, which generates new peptides to be evaluated according to the expected characteristics for an effective antimicrobial peptide, and thus be classified as antimicrobial. We sought to prospect and analyze, *in silico*, new antimicrobial peptides from *Cereus jamacaru* DC proteins. and *Opuntia ficus-indica* L. Mill. Kamal software was used to generate the peptides, filter the results and analyze the structural characteristics of the peptides. Theoretical digestion of 60 proteins from the two selected plant species was carried out, which generated 84,543 peptides. After a selection stage, we separate the 10 best candidates, based on the classification provided by the software and we analyze different properties of each one of them, through the Expasy, APD3 and CAMP bioinformatics servers. The analysis results indicated all peptides as potential antimicrobial agents.

Key words: intragenic antimicrobial peptides; *in silico* antimicrobial evaluation; peptides of plant origin; antimicrobial activity.

LISTA DE ABREVIATURAS

aa – Aminoácido

ANN - Artificial Neural Network

APD3 - Antimicrobial Peptide Database 3

C - Cisteína

CAMP - Collection of Anti-Microbial Peptides

C.L. – Carga Líquida

IAP – Intragenics Antimicrobial Peptide

II – Índice de Instabilidade

LEM - Laboratório de Espectrometria de Massa

LPS – Lipopolissacarídeos

NCBI - National Center for Biotechnology Information

P - Prolina

PAM - Peptídeos Antimicrobianos

PDB - Protein Data Bank

P.I. – Ponto isoelétrico

RF - Random Forest

SVM - Support Vector Machine

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros utilizados para filtrar os peptídeos antimicrobianos (página 24)

Tabela 2 – Proteínas encontradas na busca através dos bancos de dados Protein e PDB (página 26)

Tabela 3 – Número de peptídeos excluídos em cada etapa de seleção (página 33)

Tabela 4 – Lista dos melhores peptídeos gerados a partir da digestão in silico pelo Kamal com base no seu score (página 33)

Tabela 5 – Relação do aminoácido N-terminal com o tempo de meia-vida da proteína em diferentes organismos (página 35)

Tabela 6 – Tempo de meia-vida estimado para cada um dos peptídeos em mamíferos, leveduras e E. coli e Índice de Instabilidade de cada peptídeo. Dados calculados pela ferramenta ProtParam do servidor Expasy (página 36)

Tabela 7 – Índice de Boman estimado para cada peptídeo através do servidor APD3 (página 38)

Tabela 8 – Resultados das análises de potencial de ligação à membrana e formação de α -hélice pelo servidor APD3 (página 39)

Tabela 9 – Probabilidade de atividade antimicrobiana calculada por CAMP (página 43).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – esquema de prospecção in sílico dos peptídeos antimicrobianos (página 252)

Figura 2 – planilha gerada pelo Kamal após digestão teórica (página 29)

Figura 3 – representações Helical Wheel dos peptídeos selecionados (página 40)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	14
2.1. A família Cactacea.....	14
2.2. Peptídeos antimicrobianos.....	16
2.3. Prospecção de novos PAMs.....	19
3. OBJETIVOS.....	23
3.1. Geral.....	23
3.2. Específicos.....	23
4. METODOLOGIA.....	24
4.1. Seleção das proteínas.....	24
4.2. Digestão <i>in silico</i>	24
4.3. Seleção dos peptídeos.....	24
4.4. Análise da atividade antimicrobiana.....	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5.1. Seleção das proteínas.....	26
5.2. Digestão <i>in silico</i>	28
5.3. Seleção dos peptídeos.....	30
5.3.1.1. Tamanho do peptídeo.....	30
5.3.1.2. Carga líquida.....	31
5.3.1.3. Hidrofobicidade e momento hidrofóbico.....	32
5.3.1.4. Resíduos.....	32
5.3.2. Peptídeos selecionados.....	33
5.4. Avaliação da atividade antimicrobiana.....	34
5.4.1. Meia-vida e Índice de Instabilidade (II).....	34
5.4.2. Índice de Boman.....	37
5.4.3. Potencial de ligação à membrana e formação de α -hélice... 38	
5.4.4. Predição de atividade antimicrobiana.....	43
6. CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS.....	46

1. INTRODUÇÃO

Peptídeos antimicrobianos são moléculas naturais presentes em todos os organismos vivos que fazem parte do arsenal de defesa deles contra microrganismos invasores. Essas pequenas sequências de 12 a 50 resíduos de aminoácidos, geralmente catiônicas e anfifílicas são encontradas em mamíferos, anfíbios, peixes, plantas, bactérias e muitos outros organismos, atuando no combate a bactérias, fungos, protozoários e vírus, constituindo a principal linha de defesa contra esses microrganismos, para algumas dessas espécies (JENSSEN, *et al.* 2006; HANEY, *et al.* 2017).

Esses peptídeos fazem interação com a membrana dos microrganismos por atração eletrostática entre a sua carga, geralmente positiva, e a carga negativa presente nas membranas dos microrganismos. Após a interação com a membrana, diversos mecanismos podem ser acionados para levar à morte celular. Geralmente, o principal mecanismo correlacionado com a atividade antimicrobiana é a de ruptura da membrana por desestabilização dessa estrutura, porém, existem outros peptídeos que levam à morte celular por ligação com alvos intracelulares, inibindo diversos processos metabólicos vitais para o microrganismo e, conseqüentemente, matando a célula. Além desses mecanismos, ainda há relatado que muitos peptídeos antimicrobianos regulam respostas imunológicas mais complexas para o combate aos microrganismos invasores, como o caso das catelicidinas e defensinas (JASSEN, *et al.* 2006; GALLO, *et al.* 2012; HANCOCK, *et al.* 2000; SALLES, 2012).

O interesse pelos peptídeos antimicrobianos tem aumentado devido à dificuldade de superar o desafio da resistência bacteriana. Nesse contexto, os peptídeos têm se mostrado uma potente alternativa antimicrobiana, devido a pouca relação do seu uso com o desenvolvimento de resistência. Por isso, muitos peptídeos das mais variadas espécies têm sido testados para o desenvolvimento de novos biofármacos. Atualmente, o banco de dados Collection of Anti-Microbial Peptides (CAMP), conta com 24.243 peptídeos antimicrobianos descritos, tanto de origem sintética quanto de origem natural (MOORTHY, *et al.* 2023; GAWDE, *et al.* 2023).

As mais diversas fontes têm sido exploradas para isolar novas moléculas. Desde bactérias e insetos até plantas e mamíferos. Porém, o alto custo e o baixo rendimento para o isolamento desses peptídeos têm direcionado as buscas à utilização de outras abordagens, como o desenho de peptídeo sinteticamente ou a

busca de peptídeos intragênicos. No primeiro caso, é possível desenhar novas moléculas partindo de um peptídeo conhecido ou sem nenhuma sequência base e são adicionados novos resíduos de aminoácidos com base nas características desejadas para o peptídeo, visando modular as suas propriedades para a melhor atividade antimicrobiana. A segunda abordagem parte do pressuposto de que é há encriptado em proteínas de todas as espécies sequências menores com propriedades bioativas que podem não estar relacionadas com a atividade original da proteína. Desse modo, realizar a hidrólise da proteína buscando novos peptídeos tem sido uma abordagem interessante para prospecção de novos antimicrobianos (LI, *et al.* 2022; LIMA, 2021; SANTOS, 2022; RAMADA, 2016; SÁ, 2018).

Essas duas abordagens são mais baratas por permitirem o trabalho *in silico* durante o estudo. Diversas ferramentas estão disponíveis atualmente para o desenho de novos peptídeos, a digestão de proteínas e a análise das características estruturais e propriedades físico-químicas de novos peptídeos. Isso tem permitido a prospecção de novos peptídeos antimicrobianos em uma escala muito maior (BIN HAFEEZ, *et al.* 2021; NYEMBE, *et al.* 2023).

As espécies da família Cactacea são vegetais pouco explorados quanto à presença de peptídeos antimicrobianos em sua composição, apesar de já haver relatado em alguns trabalhos que cactos como *Cereus jamacaru* DC. e *Opuntia ficus-indica* são potenciais fontes de peptídeos bioativos. O extrato proteico de *Cereus jamacaru* DC. já foi analisado quanto a inibição de *Colletotrichum gloeosporioides* e o extrato de *Opuntia ficus-indica* foi analisado quanto a inibição de *Staphylococcus aureus* e nos dois casos as espécies demonstraram ter em suas composições componentes com potencial atividade antimicrobiana (MOTA, *et al.* 2019; AKKOL, *et al.* 2020; GÓMEZ-MAQUEO, *et al.* 2021; HEIKAL, *et al.* 2021).

Considerando essas informações, o presente estudo buscou prospectar novos peptídeos antimicrobianos intragênicos oriundos do conteúdo proteico de *Cereus jamacaru* DC. e *Opuntia ficus-indica* disponível nos bancos de dados e analisar suas propriedades relacionadas a atividade antimicrobiana.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. A família Cactacea

Cactacea é uma família vegetal, da ordem Caryophyllales, constituída por espécies popularmente conhecidas como cactos. Sendo conhecidas atualmente mais de 1450 espécies e 129 gêneros, essa família é subdividida em 4 subfamílias (Cactoídae, Maihuenioidae, Opuntioidae e Pereskioidae) que se distribuem ao longo do continente americano e uma parte do continente africano. A morfologia das espécies da família Cactacea é descrita por Zappi e colaboradores (2020) como plantas com caules suculentos e fotossintetizantes (morfologicamente variáveis). Os seus ramos podem ser compressos, cilíndricos, costados ou tuberosos. Meristemas auxiliares na forma de aréolas. Geralmente apresentando tricomas, espinhos, flores ou folhas. Apresentam flores vistosas, geralmente solitárias, e frutos bacáceos, deiscentes ou indeiscentes.

Mesmo não sendo uma família de plantas endêmicas do Brasil, no país encontramos essas espécies em todas as cinco regiões do país, sendo que no Sudeste foram descritas até o ano de 2020 138 espécies, já no Nordeste são relatadas 115 espécies, no Sul 89 espécies, no Centro-oeste 53 e no Norte 26. Enquanto, em relação a distribuição da diversidade de espécies por domínio fitogeográfico brasileiro, é relatado um somatório maior na Mata Atlântica (103), seguida pela Caatinga (99) e o Cerrado (85), já as regiões de Pampa, Pantanal e Floresta Amazônica apresentam quantidades menores de espécies relatadas, 50, 26 e 15 respectivamente (ZAPPI, *et al.* 2020; LUCENA, *et al.* 2013).

Muitas dessas espécies são bastante conhecidas no país por causa de sua aparência que lhes permitem ser utilizadas para fins decorativos em casas, praças e jardins, porém sua presença é mais marcante nas regiões do Nordeste brasileiro, onde os longos períodos de seca fazem com que algumas espécies dessa família (que são mais resistentes a esses eventos) se tornem mais presentes no dia a dia da população (BRAVO, *et al.* 2018; LUCENA, *et al.* 2013). Espécies como *Cereus jamacaru* (mandacaru), *Melocactus sergipensis* (cabeça-de-frade), *Melocactus zehntneri* (coroa-de-frade), *Melocactus violaceus*, *Nopalea cochenillifera* (palma forrageira), *Pilosocereus cattingicola* (facheiro) e *Pilosocereus gounellei* (xique-xique) são bastante utilizadas pela população nordestina como forragem para a alimentação de ruminantes. O que em algumas ocasiões pode ser a única alternativa para sobrevivência desses animais naquela região (BRAVO, *et al.* 2018; LUCENA, *et al.* 2013).

Além dessas aplicações, as cactáceas também são utilizadas pela população para a alimentação, construção e como remédio para algumas enfermidades. O fruto de *Cereus jamacaru* serve como alimento, enquanto outras partes são utilizadas como cerca viva. Da mesma forma, *Melocactus sergipensis* e *Nopalea cochenillifera* são utilizados para a produção de doces e bolos e como material para construção de cercas vivas. Essas espécies ainda estão popularmente relacionadas com o alívio de cálculo renal, e o tratamento de diabetes, colesterol, epilepsia e outras doenças (BRAVO, *et al.* 2018; LUCENA, *et al.* 2013).

As diversas utilidades proporcionadas por espécies dessa família direcionaram alguns estudos para a melhor compreensão de suas composições nutricionais e físico-químicas, na busca por compostos bioativos que possam ser aproveitados pela indústria alimentícia, bem como pela farmacêutica e biotecnológica (DE ARAUJO, *et al.* 2021).

Soares e colaboradores (2021) realizaram um estudo para avaliar a composição físico-química da casca e polpa de *Cereus jamacaru* e avaliaram que o seu fruto possui um teor de potássio bastante considerável, o que pode indicar uma potencial fonte de nutrientes para produção de alimentos. Além disso, ao avaliar a composição centesimal do fruto observou-se que a polpa do fruto possui um teor de umidade de 82,59g/ 100g ao passo que a casca tem um valor de 91,41g / 100g. Em relação aos sólidos solúveis, a polpa possui um teor de 10,60g/ 100g enquanto o teor da casca varia entre 9,7 e 16,4g /100g. Os valores médios de cinza, em base úmida, para polpa foram de 0,499g /100g para a polpa e 0,518g /100g para a casca. Vale destacar ainda o teor de proteínas presentes na polpa e na casca, onde concentrações de 1,12g /100g e 6,42g /100g foram determinadas, respectivamente, para cada uma. Esses resultados colaboram para a ideia do uso do fruto do mandacaru como fonte de nutrientes para população (CARDOSO, *et al.* 2021; SOARES, *et al.* 2021).

A espécie *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. Também foi analisada quanto a sua composição nutricional, onde foi possível observar uma concentração mineral bastante significativa de potássio, magnésio e cálcio. Esses achados podem indicar uma possível aplicação dessa espécie na prevenção da osteoporose. Além disso, também foi observado que a presença de diversos compostos bioativos como ácidos graxos (ácido linolênico, ácido palmítico, ácido linoleico, ácido oleico e ácido esteárico), aminoácidos (serina, prolina, ácido gama-aminobutírico, arginina e ácido glutâmico), esteróis (β -sitosterol e campesterol), carotenóides (luteína, β -caroteno e β -10

criptoxantina), compostos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonoides, ligninas e estilbenos) e betalaínas (betaxantinas e betacianinas) (BRAVO, *et al.* 2018; KOLNIAK-OSTEK, *et al.* 2020; SILVA, *et al.* 2021).

No âmbito da busca por propriedades de interesse farmacológico, diversos achados indicaram essas espécies como promissoras fontes de compostos bioativos para aplicação na indústria farmacêutica (LUCENA, *et al.* 2013).

Mota e colaboradores (2019) observaram que o extrato proteico de *Cereus jamacaru* foi capaz de inibir o crescimento de *Colletotrichum gloeosporioides* estimulando a produção de espécies reativas de oxigênio e gerando danos a membrana celular do fungo (MOTA, *et al.* 2019). Outro estudo realizado com o extrato hidroalcóolico buscou investigar a atividade citotóxica e anti-citotóxica em linfócitos humanos e efeitos antitumorais, mutagênicos e citotóxicos em células de sarcoma de camundongos. Em seus resultados foi observado que o extrato hidroalcóolico de *Cereus jamacaru* não induziu citotoxicidade em linfócitos humanos, além de ser capaz de promover uma redução de 86,07% do sarcoma de camundongo e atividade anti-citotóxica contra cisplatina (VENCIONECK, *et al.* 2018). *Cereus jamacaru* ainda foi relacionado com atividade antioxidante e efeitos anti-helmínticos em ovelhas (VATTA, *et al.* 2011; DE MEDEIROS, *et al.* 2019).

Outra espécie estudada quanto aos seus potenciais efeitos farmacológicos foi a *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. Blando e colaboradores (2019) avaliaram a atividade antimicrobiana dos extratos polifenólicos dos cladódios de *Opuntia ficus-indica* contra *Staphylococcus aureus* e observaram que o extrato era capaz de inibir seletivamente o crescimento de bactérias Gram-positivas e a produção de biofilme por essas bactérias. Esses resultados são corroborados por outros experimentos realizados com o extrato hidroalcóolico de *Opuntia ficus-indica* na investigação de seus efeitos contra nematoides gastrointestinais de ovelhas que observou um potencial inibição contra esses parasitas, reforçando a atividade antimicrobiana de *Opuntia ficus-indica*. Essa espécie ainda foi relacionada com atividade anti-inflamatória, anticâncer, ansiolítica e sedativa (AKKOL, *et al.* 2020; GÓMEZ-MAQUEO, *et al.* 2021; HEIKAL, *et al.* 2021).

2.2. Peptídeos Antimicrobianos

Dentre os diversos compostos bioativos naturais oriundos de espécies vegetais se destacam os Peptídeos Antimicrobianos (PAMs) que são sequências curtas de 12 a 50 resíduos de aminoácidos que participam da primeira linha de defesa do hospedeiro na presença de microrganismos invasores. Essas moléculas fazem parte da resposta imune da maioria dos organismos vivos e exercem um papel essencial na sobrevivência das espécies diante da exposição a bactérias, fungos, vírus e protozoários (JENSSEN, *et al.* 2006; HANEY, *et al.* 2017).

Peptídeos antimicrobianos já foram isolados em diversas bactérias, que fazem uso dessas moléculas para superar outras bactérias na competição por recursos. A nisina, produzida por *Lactococcus lactis*, e a mersacidina, produzida por *Bacillus* spp. são alguns dos principais representantes desse grupo. Nas plantas, há uma relação forte entre a presença de peptídeos antimicrobianos e a proteção do organismo contra bactérias e fungos. Já no caso dos invertebrados, a ausência de um sistema imune adaptativo exige uma resposta inata efetiva para sua sobrevivência diante de exposições patogênicas. Dessa forma, muitos peptídeos antimicrobianos potentes já foram isolados nesses organismos e demonstraram sua capacidade de proteção para essas espécies. Nesse caso, PAMs podem ser expressos constitutivamente na hemolinfa, células fagocíticas e células epiteliais dos invertebrados, ou por meio do reconhecimento de algum patógeno no organismo, configurando um mecanismo de defesa evolutivamente efetivo. Já no caso dos vertebrados, em especial a espécie humana, os PAMs constituem um recurso ativo tanto no combate direto aos patógenos invasores como na imunomodulação de uma resposta ao microrganismo, seja controlando a inflamação ou recrutando outros recursos antimicrobianos para compor uma resposta maior. As catelicidinas e as defensinas são exemplos de grupos de PAMs que constituem o arsenal antimicrobiano dos vertebrados (JASSEN, *et al.* 2006; GALLO, *et al.* 2012; HANCOCK, *et al.* 2000).

Essas moléculas são capazes de inibir o crescimento dos microrganismos e levá-los a morte. Porém, os PAMs não interagem diretamente com um alvo molecular específico ao se ligar a membrana celular e desenvolver sua atividade antimicrobiana. Essa interação ocorre pela atração eletrostática entre os peptídeos e a membrana do microrganismo (BROGDEN, 2005).

Diversos fatores influenciam no processo de interação com a célula microbiana. A composição do peptídeo e da membrana-alvo são os principais fatores determinantes nesse processo. Membranas de bactérias gram-negativas contém

lipopolissacarídeos (LPS) em abundância, enquanto bactérias gram-positivas apresentam ácido teicóico e lipoteicoico em grandes concentrações. Esses componentes conferem uma carga líquida negativa para a superfície celular, favorecendo a atração de PAMs catiônicos (CIUMAC, 2019; YEAMAN, 2003). Entretanto, alguns PAMs possuem caráter aniônico, como pequenos peptídeos presentes em extratos de surfactantes, fluido de lavagem broncoalveolar e células das vias aéreas, mas a maioria possui um caráter catiônico, como a catelicidina LL-37 presente nos seres humanos (BROGDEN, 2005). Essas características configuram o padrão de seletividade e potência de cada peptídeo (SANTOS, 2022).

PAMs catiônicos são aqueles mais bem compreendidos em relação às suas propriedades. A atração eletrostática entre a carga negativa das membranas celulares e a carga positiva do peptídeo é compreendida como um fator definitivo para desencadear os efeitos antimicrobianos, pois apenas após essa interação é possível o peptídeo desencadear sua atividade antimicrobiana.

Os eventos posteriores a essa etapa, que constituem o mecanismo de ação dos peptídeos, não são completamente compreendidos. Porém, foi demonstrado que o principal mecanismo de ação dos PAMs é a desestabilização da membrana microbiana que resulta em lise e morte da célula. Também foi demonstrado que alguns peptídeos podem ainda ser citotóxicos sem causar danos à membrana, através da sua inserção na célula e ação em alvos intracelulares, como os ácidos nucleicos (SALLES, 2012).

Os modelos de interação propostos para descrever o processo de desestabilização da membrana, que são mais bem aceitos, são o modelo barril-stave, o modelo tapete e o modelo toroidal. Essas propostas de mecanismo de ação sugerem a desestabilização da membrana por meio da formação de poros ou de micelas ao longo da célula levando à lise celular e morte microbiana.

No modelo barril-stave os peptídeos se ligam paralelamente à membrana e se acumulam na superfície da célula. Conforme a concentração do peptídeo aumenta, eles passam a se inserir na membrana de maneira perpendicular e interagir uns com os outros para formar um poro transmembranar. Nesse caso, as faces hidrofílicas dos peptídeos formam o lúmen do canal enquanto a face hidrofóbica faz a interação com a membrana. Já no modelo toroidal, um poro também é formado, porém como resultado da exposição do núcleo hidrofóbico da bicamada lipídica. A interação do peptídeo com a membrana faz com que a continuidade da camada lipídica seja

interrompida e seu núcleo hidrofóbico fique exposto. Para estabilizar novamente a membrana, a monocamada lipídica se dobra internamente formando um poro e permitindo a passagem de íons.

No modelo carpete, não há a formação de poros, mas a formação de micelas que resultam de uma ação semelhante a um detergente causada pelos peptídeos. Nesse caso, os peptídeos se acumulam sobre a membrana formando uma camada semelhante a um tapete e esse acúmulo resulta na desestabilização da membrana e leva à formação de micelas e o rompimento da membrana (BROGDEN, 2005; HANEY, *et al.* 2017 SIERRA, *et al.* 2017).

Os peptídeos que possuem essas propriedades compartilham algumas características que favorecem sua atividade. Fatores como a estrutura secundária, carga líquida e hidrofobicidade afetam diretamente na interação das moléculas com a membrana e na sua citotoxicidade.

Geralmente, esses peptídeos são ricos em resíduos de aminoácidos catiônicos como arginina e lisina. Isso resulta em uma carga líquida positiva em pH neutro e favorece a atração eletrostática com as membranas microbianas carregadas negativamente. A hidrofobicidade dessas moléculas também é um fator que interfere na interação delas com as membranas. Os PAMs apresentam em sua sequência cerca de 50% de resíduos hidrofóbicos. Isso configura um caráter anfifílico para a molécula e lhe permite interagir com a membrana aniônica e se inserir através do meio hidrofílico.

Outro fator comum em muitos desses PAMs é a sua estrutura secundária em α -hélice. Ao adotar esse tipo de estrutura, geralmente, os resíduos hidrofílicos se dispõem em uma face do peptídeo e os resíduos hidrofóbicos na outra face, facilitando a interação com os dois meios simultaneamente (YEAMEN, 2003; SÁ, 2018).

2.3. Prospecção de novos PAMs

Os PAMs entraram em foco como alternativa aos antimicrobianos convencionais por induzirem menos resistência antimicrobiana em relação aos antibióticos convencionais. Em um contexto em que a resistência tem se tornado uma preocupação para os pesquisadores, essas moléculas se mostram vantajosas pelo amplo espectro de ação e a baixa incidência de resistência (MOORTHY, *et al.* 2023). Por causa disso, diversos trabalhos foram desenvolvidos visando explorar o potencial dessas moléculas, seja pela compreensão de PAMs já conhecidos ou pela busca de

novos candidatos. (DEO, *et al.* 2022; LI, *et al.* 2022; MAZURKIEWICZ-PISAREK, *et al.* 2023; MCMILLAN, *et al.* 2020; NAGAOKA, *et al.* 2020).

Atualmente, o banco de dados APD3 contam com 3569 peptídeos antimicrobianos descritos oriundos de mamíferos, répteis, aves, anfíbios, artrópodes, fungos, protozoários e muito mais (WANG, *et al.* 2016).

Na busca por novos PAMs, existem, pelo menos, três métodos principais de prospecção. O isolamento de peptídeos que exercem essa função ativamente em algum organismo (TEIXEIRA, *et al.* 2023), a prospecção sintética de novos peptídeos (LIMA, 2021) e a prospecção de peptídeos intragênicos (SANTOS, 2022; RAMADA, 2016; SÁ, 2018).

No caso do isolamento de peptídeos antimicrobianos de algum organismo, há uma grande limitação quanto ao rendimento desse tipo de processo. Pois se trata de uma atividade bastante complexa, demorada e com custos elevados. A síntese química e a engenharia genética têm auxiliado bastante na superação desses desafios. Entretanto, muitos dos PAMs isolados são facilmente degradados por proteases no corpo humano, possuem um meia-vida muito curta no organismo e acabam sendo eliminados sem exercer nenhum efeito antimicrobiano. Além disso, a ligação a proteínas séricas, inibição por sais fisiológicos e citotoxicidade dificultam a aplicação dessas moléculas clinicamente (LI, *et al.* 2022).

Como alternativa a esse problema, a prospecção de peptídeos sintéticos demonstra-se vantajosa. Nesse caso, há o desenho de um novo peptídeo, com base nas características conhecidas de outras sequências, visando modular as propriedades da molécula para padrões mais satisfatórios, seja aumentando o tempo de meia, evitando a degradação por proteases ou diminuindo a toxicidade nas células do hospedeiro. Geralmente é utilizado um peptídeo já conhecido e modificações pontuais em sua sequência são feitas. Após isso, com o auxílio de ferramentas bioinformáticas é possível analisar e prever as propriedades do novo peptídeo. Lima, em seu trabalho, desenhou novos peptídeos sintéticos partindo de *Mo*-CBP₃, extraído da semente da *Moringa oleífera*, e Rc2S-Alb, oriundo da semente de *Ricinus communis*. As modificações realizadas na estrutura geraram peptídeos com alto potencial para a elaboração de fármacos antifúngicos, demonstrando a eficácia dessa abordagem (LIMA, 2021).

Outra opção na busca de novos PAMs é a prospecção de peptídeos antimicrobianos intragênicos. Essa estratégia está fundamentada no conhecimento de

que alguns peptídeos bioativos podem estar presentes dentro de uma proteína que não necessariamente possui aquela atividade. Desse modo, proteínas de diversas funções e organismos podem ser potenciais fontes de novos PAMs. Esses peptídeos obtidos por meio da clivagem de uma proteína são chamados de Peptídeos Antimicrobianos Intragênicos (IAPs). Nesse caso, ferramentas de bioinformáticas são utilizadas na hidrólise e milhares de potenciais sequências são geradas. Essas sequências podem então ser avaliadas segundo os parâmetros estabelecidos pelo pesquisador e selecionadas para o prosseguimento do estudo (SANTOS, 2022; RAMADA, 2016; SÁ, 2018).

Tanto no processo de proteólise quanto na análise das propriedades de PAMs, as ferramentas bioinformáticas têm se apresentado como excelentes recursos para os pesquisadores (BIN HAFEEZ, *et al.* 2021).

A abordagem de digestão *in silico*, por exemplo, surge como uma alternativa bastante útil na proteólise das sequências, por seu baixo custo e aplicabilidade. Nesse caso, para que o processo possa ser realizado é necessário, primeiramente, que a elucidação da sequência de aminoácidos da proteína já tenha sido feita e conste em algum banco de dados. Os bancos de dados mais consultados para obtenção dessas sequências são os do National Center for Biotechnology Information (NCBI) ou do UniProtKB. Após a obtenção da sequência primária em um desses bancos de dados, softwares como Peptide-cutter e Kamal podem ser utilizados. Eles realizarão uma digestão enzimática teórica que gera peptídeos considerando os possíveis locais de clivagem de proteases ou compostos químicos e apresenta as sequências geradas com diversas informações sobre suas características estruturais e físico-químicas (WILKINS, *et al* 1999; SÁ, 2018).

Geralmente são gerados milhares de peptídeos como possíveis candidatos, então cabe ao pesquisador definir parâmetros de ranqueamento para filtrar as melhores sequências e prosseguir o estudo de análise dos novos peptídeos. Nesse caso, a carga líquida, hidrofobicidade e o tamanho da sequência podem ser alguns dos parâmetros avaliados no processo (SANTOS, 2022; RAMADA, 2016; SÁ, 2018).

A expressão desses peptídeos para análise de suas propriedades *in vitro* e *in vivo* é bastante custosa e complexa. Como alternativa, as análises *in silico* também vem demonstrando capacidade de prever o potencial antimicrobiano dos peptídeos, além de prever muitas outras características (CHAKRABORTY, *et al.* 2013). Servidores online como APD3, ProtParam e CAMP conseguem descrever

características funcionais, estruturais, físico-químicas e metabólicas dos peptídeos. Sendo possível avaliar a estabilidade dos PAMs em diferentes organismos, o tempo de meia-vida dessas moléculas, características de interação com a membrana celular e outras proteínas plasmáticas, mapear a topologia das estruturas secundárias, calcular a probabilidade do peptídeo possuir alguma atividade antimicrobiana e muitos outros parâmetros úteis que possibilitam o estudo dos PAMs de maneira mais fácil e barata (THOMAS, et al. 2009; WILKINS, et al. 1999; WANG, et al. 2016).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Prospectar e analisar peptídeos antimicrobianos oriundos de *Cereus jamacaru* DC. e *Opuntia ficus-indica* *in silico*.

3.2. Específicos

- Buscar em bancos de dados proteínas de *Cereus jamacaru* DC. e *Opuntia ficus-indica* com a sequência primária elucidada;
- Realizar a digestão *in silico* das proteínas encontradas;
- Filtrar os resultados da digestão de acordo com os critérios de inclusão e exclusão do estudo;
- Selecionar os melhores peptídeos oriundos da digestão *in silico*;
- Avaliar características estruturais e propriedades físico-químicas dos peptídeos, *in silico*, quanto à sua atividade antimicrobiana.

4. METODOLOGIA

4.1. Seleção das proteínas

Na seleção das proteínas para a digestão enzimática foram utilizados os bancos de dados de proteínas Protein, associado ao National Center of Biotechnology Information (NCBI) (disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/proteins/>), e Protein Data Bank (PDB) (disponível em: <https://www.rcsb.org/>). Os termos *Cereus Jamacaru* DC. e *Opuntia Ficus-Indica* L. Mill foram utilizados na busca e todos os resultados foram selecionados.

Em seguida, todas as proteínas foram adicionadas em uma planilha informando a espécie de origem, nome, sequência, organela (quando a informação estava disponível), gene e quantidade de aminoácidos. E, as sequências que estavam duplicadas foram eliminadas e um arquivo com a sequência fasta para cada proteína foi criado.

4.2. Digestão *in silico*

Para gerar os peptídeos foi utilizado o software Kamal, desenvolvido pelo Laboratório de Espectrometria de Massa (LEM) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, para a identificação de peptídeos intragênicos funcionais em proteínas.

O arquivo com a sequência da proteína era aberto no programa e era gerado uma planilha contendo todos os peptídeos identificados, além de informações como a sequência, massa, agregação, carga líquida, momento hidrofóbico, hidrofobicidade, ponto isoelétrico e um score para ranquear todas as sequências.

4.3. Seleção dos peptídeos

Os peptídeos gerados foram selecionados por meio de uma filtragem considerando os seguintes parâmetros:

Tabela 1: Parâmetros utilizados para filtrar os peptídeos antimicrobianos.

Parâmetros de prospecção	
Tamanho	16 a 23 resíduos
Carga líquida	+2 a +6
Hidrofobicidade	0,0 a 0,5 (escala TM)
Momento hidrofóbico	0,516 a 1,267 (escala TM)
Agregação	Sem definição de máximo/mínimo
Resíduo	Exclusão de Cisteínas e Prolinas

Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

Os parâmetros foram definidos com base nos valores utilizados nas dissertações de Ramada e Sá, que utilizaram faixas semelhantes e demonstraram boa eficácia na prospecção de PAMs por meio dessa abordagem (RAMADA, 2016; SÁ, 2018). Sendo que as sequências fora de algum desses limites foram excluídas e as restantes foram ranqueadas com base no score fornecido pelo Kamal.

4.4. Análise da atividade antimicrobiana

A análise da atividade antimicrobiana foi realizada por meio da predição de (I) meia-vida *in vivo*, (II) índice de instabilidade, (III) índice de Boman, (IV) potencial de ligação à membrana e formação de α -hélice, (V) predição de atividade antimicrobiana.

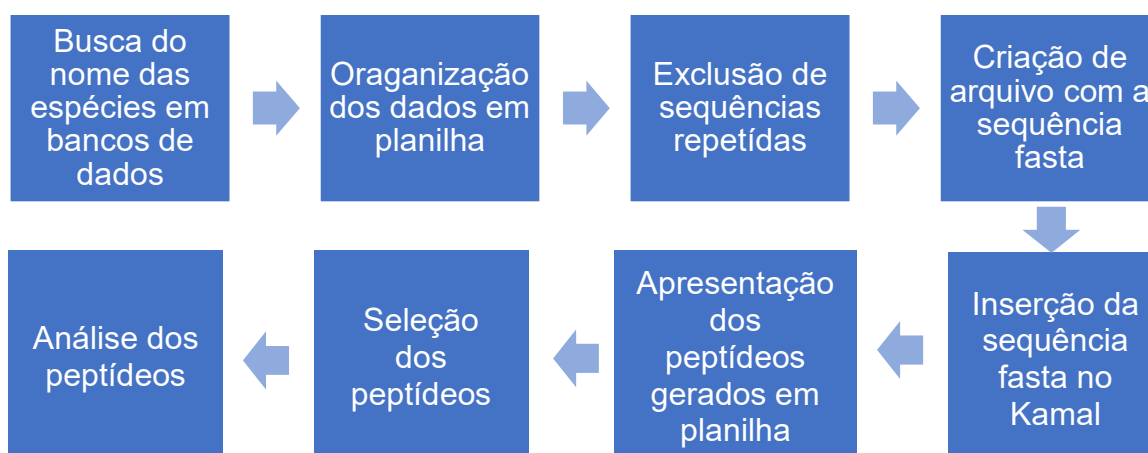
O índice de instabilidade foi calculado com base na composição de dipeptídeos, conforme o método de Guruprasad et al. (GURUPRASAD, *et al.* 1990). Esse valor, junto aos valores de meia-vida *in vivo*, foram estimados pela ferramenta ProtParam do servidor Expasy (disponível em: <https://web.expasy.org/protparam/>). (WILKINS, *et al.* 1999).

O índice de Boman, o potencial de ligação à membrana e de formação de α -hélice foram obtidos por meio do Antimicrobial Peptide Calculator and Predictor (<https://aps.unmc.edu/prediction>), disponível no banco de dados APD3 (WANG, *et al.* 2016).

Por fim, a predição de atividade antimicrobiana foi estimada através do servidor CAMP utilizando os algoritmos Random Forest (RF), Support Vector Machine (SVM) e Artificial Neural Network (ANN). (THOMAS, *et al.* 2009).

Todo esse processo está resumido no esquema 1, abaixo.

Figura 1: esquema de prospecção *in silico* dos peptídeos antimicrobianos



Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Seleção de proteínas

Na etapa de seleção das proteínas que seriam hidrolisadas para geração dos peptídeos, foram utilizados dois bancos de dados, o Protein (associado ao NCBI) e o PDB.

A busca foi realizada utilizando como termos os nomes das espécies vegetais e apresentou 107 resultados, sendo 9 associados à espécie *Cereus Jamacaru* DC. e 98 associados à *Opuntia ficus-indica* L. Mill. Essa diferença na quantidade de resultados provavelmente é consequência da distribuição dessas espécies ao redor do mundo, pois *Opuntia ficus-indica* L. Mill é uma espécie globalmente melhor distribuída do que *Cereus Jamacaru* DC. (uma espécie nativa do Brasil). Isso culmina em uma produção científica mais intensa para a espécie mais bem distribuída enquanto as produções a respeito de *Cereus jamacaru* DC. se concentram no Brasil (CAVALCANTE, et al. 2020; LUCENA, et al. 2020).

Dentre os resultados obtidos foram identificadas 3 diferentes proteínas para *Cereus jamacaru* DC. e 16 para *Opuntia ficus-indica* L. Mill, pois muitas das sequências encontradas pertenciam a mesma proteína.

É importante ressaltar que 17 das 19 proteínas encontradas apresentavam apenas parte de suas sequências. Isso reafirma a escassez de produção científica no conhecimento dessas espécies, dificultando a aplicação de suas propriedades já demonstradas no desenvolvimento farmacêutico e biotecnológico de novos compostos ativos e limitando os resultados de novas pesquisas, como o caso do presente estudo.

As proteínas encontradas são apresentadas na tabela 2, a seguir.

Tabela 2: Proteínas encontradas na busca através dos bancos de dados Protein e PDB.

Nome	Espécie de origem	Arquivos de entrada	Organela	Gene	Tamanho
Maturase K (parcial)	<i>Cereus jamacaru</i> DC.	2	Cloroplasto	MatK	282 e 287 aa
Ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (subunidade grande)	<i>Cereus jamacaru</i> DC.	2	Cloroplasto	RbcL	239 e 458 aa

Fitocromo C (parcial)	<i>Cereus jamacaru</i> DC.	5	-	PHY C	289 a 300 aa
4,5-Extradiol dioxigenase putativa (parcial)	<i>Opuntia ficus-indica</i> L. Mill	3	-	-	155 aa
Betanidina 5-O-glicosiltransferase putativa (parcial)	<i>Opuntia ficus-indica</i> L. Mill	2	-	-	252 aa
AtpB (parcial)	<i>Opuntia ficus-indica</i> L. Mill	53	Cloroplasto	AtpB	7 a 33 aa
Ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (parcial) (subunidade grande)	<i>Opuntia ficus-indica</i> L. Mill	8	Cloroplasto	RbcL	7 a 184 aa
Maturase K (parcial)	<i>Opuntia ficus-indica</i> L. Mill	11	Cloroplasto	MatK	141 a 339 aa
Proteína D1 do fotossistema (parcial)	<i>Opuntia ficus-indica</i> L. Mill	4	Cloroplasto	PsbA	7 a 11 aa
Subunidade 3 do citocromo C oxidase (parcial)	<i>Opuntia ficus-indica</i> L. Mill	4	Mitocôndria	Cox3	228 a 233 aa
Citocromo P450 CYP76AD9	<i>Opuntia ficus-indica</i> L. Mill	1	-	-	495 aa
Citocromo P450 CYP76AD8	<i>Opuntia ficus-indica</i> L. Mill	1	-	-	508 aa
Proteína semelhante a desidrina (parcial)	<i>Opuntia ficus-indica</i> L. Mill	1	-	-	148 aa
Lacase putativa (parcial)	<i>Opuntia ficus-indica</i> L. Mill	2	-	-	289 e 293 aa

Peptídeo natriurético PNPA (parcial)	<i>Opuntia ficus-indica</i> L. Mill	1	-	PNP	51 aa
PsbJ (parcial)	<i>Opuntia ficus-indica</i> L. Mill	2	Cloroplasto	-	9 e 15 aa
Subunidade F da NADH desidrogenase (parcial)	<i>Opuntia ficus-indica</i> L. Mill	2	Cloroplasto	NdhF	15 aa
PsBA (parcial)	<i>Opuntia ficus-indica</i> L. Mill	2	Cloroplasto	PsbA	24 aa
Poligalacturonase (parcial)	<i>Opuntia ficus-indica</i> L. Mill	1	-	PG	94 aa

Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

Algumas das proteínas obtidas possuem mais de um arquivo de entrada nos bancos de dados. Em alguns casos, elas divergiam na sequência de aminoácidos, porém em outros casos a sequência era repetida. Por isso, as sequências que estavam repetidas foram excluídas do trabalho para evitar resultados redundantes e restaram 60 proteínas para compor o restante do trabalho.

Após os resultados da busca estarem organizados, as proteínas foram numeradas de P1 até P60 e um arquivo fasta com a sequência de aminoácidos de cada uma delas foi gerado, para utilizarmos como documento de entrada na etapa de digestão *in silico*.

5.2. Digestão *in silico*

Para a realização da hidrólise *in silico* de cada uma das proteínas foi utilizado o software Kamal, desenvolvido pelo Laboratório de Espectrometria de Massa da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Ele se fundamenta na hipótese de que há criptografado dentro de todas as proteínas módulos funcionais ativos que podem ser utilizados em aplicações diferentes da função exercida pela proteína de origem e realiza a prospecção de novos peptídeos com base na similaridade físico-química de outros PAMs já conhecidos que atuam rompendo a membrana fosfolipídica. (BRAND, et al. 2019).

Primeiramente, os parâmetros limitadores dos resultados foram definidos no software com base nas definições da pesquisa, previamente descritas na seção da

metodologia. Após a definição dos parâmetros utilizados, o arquivo fasta foi aberto e todos os peptídeos gerados foram apresentados na interface da ferramenta. Esses resultados foram salvos em um arquivo .csv, (figura 1) que pode ser aberto em qualquer editor de planilhas.

Figura 2: Planilha gerada pelo Kamal após digestão teórica.

A1	PEP_ID																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
----	--------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Obs: Os resultados da digestão estão organizados em linhas, onde a primeira coluna apresenta a identificação do peptídeo e na frente são descritas as sequências dos peptídeos e as suas características.

Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

Foram gerados um total de 84.543 peptídeos oriundos de 43 proteínas utilizadas no estudo, pois 17 das 60 sequências inseridas no software eram muito curtas e por isso não foi possível gerar nenhum peptídeo a partir delas.

Todos os peptídeos apresentados pelo Kamal são resultados de uma análise que avalia as propriedades físico-químicas de cada sequência e as compara com as características de outras sequências de atividade comprovada, conforme dito anteriormente. No geral, são avaliadas as características que favorecem a interação do peptídeo com a membrana do microrganismo e com a desestabilização dessa estrutura. As sequências que apresentam características semelhantes são apresentadas como resultados da digestão. Isso implica milhares de resultados com potencial atividade antimicrobiana (BRAND, *et al.* 2012). Entretanto, por mais que as características consideradas pelo software favoreçam a atividade antimicrobiana dos peptídeos, elas não são os únicos fatores influentes nesse processo, considerando que há demonstrado PAMs com as mais variadas propriedades físico-químicas e a possibilidade de que mesmo com essas características o peptídeo não exerça nenhuma atividade antimicrobiana. Desse modo, os resultados dessa etapa são

apenas um indicativo dessa possível atividade. Para que qualquer uma das sequências possa de fato ser associada a tal atividade é necessária uma maior filtragem dos resultados e outras análises das sequências.

5.3. Seleção dos peptídeos

Após a digestão de cada uma das proteínas foi necessário filtrar os resultados. Essa etapa do trabalho não tinha como finalidade selecionar os peptídeos que poderiam ser antimicrobianos e excluir aqueles que não seriam, visto que para isso seria necessária uma análise mais aprofundada de cada uma das milhares de sequências. O objetivo dessa etapa consistia em separar os peptídeos que possuíam maior probabilidade de exercer atividade antimicrobiana, pelo mecanismo de desestabilização da membrana através da formação de α -hélice, daqueles que com menor chance. Isso significa que alguns peptídeos que poderiam possuir tal atividade podem não passar na etapa de seleção devido as suas propriedades desfavoráveis, pois a análise de todas as sequências seria inviável.

Para selecionarmos os peptídeos com maior probabilidade de apresentarem atividade antimicrobiana os resultados foram filtrados com base nos parâmetros já apresentados.

Essa seleção foi realizada quase em sua totalidade de maneira manual, devido a problemas no manuseio do software para realização dessa etapa do trabalho que levaram a preferência por essa abordagem. Com exceção da etapa de exclusão dos peptídeos com base no tamanho de sua sequência, todas as etapas de filtragem foram realizadas através da planilha gerada pelo Kamal para cada proteína.

5.3.1.1. Tamanho do peptídeo

A etapa de seleção dos peptídeos com base em seu tamanho foi a única realizada completamente através do software Kamal. Os limites da sequência foram definidos antes da hidrólise e a ferramenta apresentou apenas os resultados dentro dos tamanhos estabelecidos.

Selecionamos para nosso trabalho apenas os peptídeos com sequências entre 16 e 23 aminoácidos. Apesar de haver conhecimento de muitos PAMs com sequências maiores ou menores que essas, há estabelecido que esses são tamanhos ideais para prospecção de novos peptídeos.

Esse tamanho é favorecido, pois segundo alguns trabalhos existe uma relação entre o tamanho da sequência e a atividade antimicrobiana, de modo que com o aumento da sequência ocorra um aumento da atividade antimicrobiana (NYEMBE, *et al.* 2023). Apesar de ser possível que o peptídeo exerça atividade antimicrobiana com sequências menores que o tamanho estabelecido, a probabilidade de que ele faça isso por meio de uma interação na membrana na forma de α -hélice é menor. Considerando que os parâmetros estabelecidos nesse estudo têm como base as características de PAMs catiônicos que atuam interagindo com a membrana do microrganismo, formando α -hélice, e desestabilizando essa estrutura, eliminamos as sequências que tenham menor probabilidade de atuar por esse mecanismo.

Sequências maiores que 23 aminoácidos também foram excluídas pelo alto custo de síntese dessas moléculas, pois quanto maior o peptídeo, mais recursos são necessários para sua expressão e mais complexa se torna a sua obtenção. Por isso, sequências com até 23 aminoácidos tem grande probabilidade de exercer atividade antimicrobiana e custos de síntese relativamente menores que outras sequências mais longas (NYEMBE, *et al.* 2023).

5.3.1.2. Carga líquida

Essa etapa de seleção foi realizada manualmente, dentro da planilha gerada pelo software. Optou-se por isso devido à impossibilidade de prospectar os peptídeos quando os parâmetros de carga líquida, hidrofobicidade e momento hidrofóbico eram inseridos no software. Por algum motivo desconhecido, houve incompatibilidade entre esses parâmetros e a ferramenta não conseguia realizar a digestão das proteínas se eles estivessem presentes.

Como os PAMs precisam interagir com a membrana dos microrganismos para desencadear sua atividade sobre a célula é necessário considerar os parâmetros que favorecem esse tipo de interação. Nesse caso, a carga líquida é o fator determinante para essa interação.

As membranas celulares das bactérias possuem uma carga líquida negativa. Desse modo, peptídeos catiônicos possuem favorecimento na interação com essas células. Entretanto, cargas líquidas muito altas podem ter um efeito negativo sobre a atividade antimicrobiana pela formação de poros menores, menos estáveis e de vida curta ou pela translocação mais rápida do peptídeo através da membrana. Portanto, para uma atividade antimicrobiana ideal existe uma faixa de carga líquida favorável.

A carga líquida dos PAMs é determinada pela sua composição de aminoácidos básicos (lisina, arginina e histidina) e varia entre 0 e +16, porém a grande maioria se concentra na faixa de +4 a +6. É determinado ainda que para uma atividade lítica máxima a carga ideal de um peptídeo é de +4,185. Considerando esse valor médio, selecionamos os peptídeos com carga líquida dentro da faixa de +2 a +6 (SATURINO, 2013; TOSSI, *et al.* 2000).

5.3.1.3. Hidrofobicidade e momento hidrofóbico

Outros fatores estreitamente relacionados com a atividade antimicrobiana dos peptídeos são a sua hidrofobicidade e seu momento hidrofóbico. Como já definido, essas características estão relacionadas com a capacidade de uma molécula ser transferida de um meio aquoso para um hidrofóbico e, portanto, influenciam na interação dela com a região hidrofóbica da membrana (TOSSI, *et al.* 2000; DATHE, *et al.* 1997).

Moléculas com baixa hidrofobicidade não conseguem interagir adequadamente com a membrana da célula-alvo e se inserir nela. Por outro lado, moléculas altamente hidrofóbicas tendem a não conseguir interagir adequadamente com a membrana por não atravessarem adequadamente o meio aquoso para que a interação ocorra. Nesses casos é possível que as moléculas se agreguem e precipitem no meio. Além disso, ainda há relacionado com o aumento da hidrofobicidade o favorecimento da mudança da conformação do peptídeo de uma α -hélice para folha- β e o aumento da toxicidade contra células de mamíferos (TOSSI, *et al.* 2000; DATHE, *et al.* 1997).

Desse modo, é necessário selecionar moléculas com valores de hidrofobicidade de momento hidrofóbico que sejam suficientes para que possam interagir com a membrana e que não favoreçam a formação de estruturas indesejadas ou efeitos tóxicos para o ser humano. Para isso, selecionamos as moléculas que possuíam valores de hidrofobicidade entre 0 e 0,5 (escala TM) e momento hidrofóbico entre 0,516 e 1,267 (escala TM).

5.3.1.4. Resíduos

O último fator que utilizamos na filtragem dos peptídeos foi a composição de aminoácidos na sequência. Nesse caso, foram excluídas as sequências que continham prolina (P) e cisteína (C), por sua baixa representatividade na formação de

α -hélice, como proposto em outras prospecções de PAMs. (SÁ, 2018; RAMADA, 2016; BRAND, *et al.* 2012).

5.3.2. Peptídeos selecionados

A tabela 3 apresenta quantos peptídeos foram excluídos e quantos restaram após cada etapa de seleção.

Tabela 3: Número de peptídeos excluídos em cada etapa de seleção.

Filtro	Aminoácidos excluídos	Aminoácidos restantes
Tamanho	-	84543
Carga líquida	61275	24268
Hidrofobicidade média	20199	4069
Resíduos de C e P	2637	1432
Momento hidrofóbico	1252	180

Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

Após toda essa etapa de seleção restaram 180 peptídeos dos 84543 gerados. Desses 180, selecionamos 10 sequências para analisarmos mais a fundo. Essa seleção foi feita com base em um score fornecido pelo Kamal. Desse modo, como resultado principal da prospecção tivemos os seguintes peptídeos:

Tabela 4: Lista dos melhores peptídeos gerados a partir da digestão *in silico* pelo Kamal com base no seu score.

Nome	Score	Massa	C.L.	Momento hidrofóbico	Hidrofobicidade	P. I.	Resíduos
P34PEP-184	0,07	1709,97	2	0,68	0,1	10	16
P58PEP-51	0,07	2024,16	3	0,59	0,01	10,2	16
P42PEP-72	0,07	1968,17	4	0,57	0	12	16
P34PEP-677	0,07	1857,04	2	0,54	0,21	10	17
P34PEP-1003	0,07	2036,19	3	0,62	0,08	10,3	18
P54PEP-6	0,07	2031,2	2	0,64	0,08	9,7	16
P42PEP-75	0,07	2105,19	4	0,64	0	11,1	16
P42PEP-374	0,07	2131,23	4	0,54	0,03	11,1	17
P18PEP-343	0,06	2167,15	3	0,52	0,05	9,7	17
P34PEP-1169	0,06	1944,07	2	0,52	0,17	10	18

Obs: O nome de cada peptídeo é dado pelo número atribuído a sua proteína de origem (P1 a P60) e o número do peptídeo dentro de todos os oriundos daquela mesma proteína. Pode-se ler, por exemplo, Peptídeo 6 da proteína 54 (P54PEP-6).

C. L.: Carga líquida. P. I.: Ponto isoelétrico.

Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

É importante ressaltar que nenhum dos 10 peptídeos selecionados é oriundo de *Cereus jamacaru* DC. Isso certamente resulta do pouco registro de proteínas dessa

espécie nos bancos de dados em relação à *Opuntia ficus-indica*, gerando muito mais peptídeos potencialmente antimicrobianos para a segunda espécie. Isso não significa que não há PAMs intragênicos em *Cereus jamacaru* DC., porém ressalta a necessidade de uma melhor elucidação do conteúdo proteico dessa espécie e reafirma essa indisponibilidade como um fator limitante do trabalho.

Vale destacar ainda que 6 dos 180 peptídeos selecionados são oriundos da Maturase K de *Cereus jamacaru* DC., entretanto o score desses peptídeos não classificou nenhum deles entre os 10 melhores resultados.

Os 10 peptídeos selecionados são oriundos de 5 proteínas diferentes: P34PEP-184, P34PEP-677, P34PEP-1003 e P34PEP-1169 foram obtidos do citocromo P450 CYP76AD8; P42PEP-72, P42PEP-75 e P42PEP-374, P58PEP-51 P54PEP-6 e P18PEP-343 são oriundos de 4 maturase K diferentes, sendo que cada uma das 4 possuem comprimentos e sequências diferentes.

5.4. Avaliação da atividade antimicrobiana

5.4.1. Meia-vida *in vivo* e índice de instabilidade (II)

Um dos desafios na aplicação clínica de novos peptídeos antimicrobianos é a curta meia-vida e a instabilidade que essas moléculas possuem dentro dos sistemas vivos. Como já apresentado, a rápida degradação desses peptídeos por proteases e a sua depuração renal resulta em uma meia-vida relativamente curta que dificulta o desenvolvimento da atividade antimicrobiana adequadamente (LI, et al. 2022).

Considerando isso, utilizamos a ferramenta ProtParam, do servidor ExPASy, para estimar essas características em nossos peptídeos.

A meia-vida dos peptídeos foi estimada com base na regra do N-terminal, desenvolvida por Bachmair e colaboradores (1986) que observou que o aminoácido N-terminal de uma proteína é determinante no seu tempo de meia-vida. Eles analisaram que modificação nessa posição em uma β -galactosidase alteravam a meia-vida da proteína, com variações de 2 minutos até 100 horas, e estabeleceram que esse efeito é universal, tanto para outras proteínas, como para outras espécies. Foi observado ainda, em estudos posteriores, que determinados aminoácidos causavam efeitos diferentes na meia-vida da proteína a depender do organismo de estudo, sendo analisados esses efeitos em reticulócitos *in vitro*, em levedura

Saccharomyces cerevisiae in vivo, e em *Escherichia coli in vivo* (BACHMAIR, et al. 1986; GONDA, et al. 1989; TOBIAS, et al. 1991; VARSHAVSKY, et al. 1997).

Desse modo, foram postulados os seguintes tempos de meia-vida com base no aminoácido N-terminal:

Tabela 5: Relação do aminoácido N-terminal com o tempo de meia-vida da proteína em diferentes organismos.

Aminoácido	Mamíferos	Leveduras	E. Coli
Ala	4.4 horas	>20 horas	>10 horas
Arg	1 hora	2 minutos	2 minutos
Asn	1.4 horas	3 minutos	>10 horas
Asp	1.1 hora	3 minutos	>10 horas
Cys	1.2 horas	>20 horas	>10 horas
Gln	0.8 horas	10 minutos	>10 horas
Glu	1 hora	30 minutos	>10 horas
Gly	30 horas	>20 horas	>10 horas
His	3.5 horas	10 minutos	>10 horas
Ile	20 horas	30 minutos	>10 horas
Leu	5.5 horas	3 minutos	2 minutos
Lys	1.3 horas	3 minutos	2 minutos
Met	30 horas	>20 horas	>10 horas
Phe	1.1 hora	3 minutos	2 minutos
Pro	>20 horas	>20 horas	?
Ser	1.9 horas	>20 horas	>10 horas
Thr	7.2 horas	>20 horas	>10 horas
Trp	2.8 horas	3 minutos	2 minutos
Tyr	2.8 horas	10 minutos	2 minutos
Val	100 horas	>20 horas	>10 horas

Fonte: Adaptado de WILKINS, et al. 1999.

Já o Índice de Instabilidade (II), é um método de previsão da instabilidade (ou estabilidade) de um peptídeo ou proteína com base na sua sequência primária e presença de dipeptídeos que desestabilizem a estrutura. De acordo com o observado por Guruprasad *et al*, há uma frequência maior de certos dipeptídeos em proteínas instáveis em comparação com proteínas estáveis. Eles relacionaram como cada um dos possíveis 400 dipeptídeos impacta na estabilidade da proteína e atribuíram valores para cada um deles, com base em proteínas já definidas como estáveis ou instáveis. Foi então possível calcular o II considerando a frequência de cada dipeptídeo em razão do tamanho da sequência da proteína, onde, proteínas com $II > 40$ são consideradas instáveis (GURUPRASAD, et al. 1990).

A tabela 6 apresenta os resultados fornecidos pelo ProtParam de meia-vida e Índice de Instabilidade.

Tabela 6: Tempo de meia-vida estimado para cada um dos peptídeos em mamíferos, leveduras e *E. coli* e Índice de Instabilidade de cada peptídeo. Dados calculados pela ferramenta ProtParam do servidor ExPASy.

Peptídeo	Meia-vida			Índice de Instabilidade
	Reticulócitos de mamíferos, <i>in vitro</i>	Levedura, <i>in vivo</i>	<i>E. coli</i> , <i>in vivo</i>	
P34PEP-184	30 horas	>20 horas	>10 horas	-1,24 (estável)
P58PEP-51	2,8 horas	10 min	2 min	49,48 (instável)
P42PEP-72	1,9 horas	>20 horas	>10 horas	45,17 (instável)
P34PEP-677	30 horas	>20 horas	>10 horas	-0,58 (estável)
P34PEP-1003	20 horas	30 min	>10 horas	-3,19 (estável)
P54PEP-6	1,1 horas	3 min	2 min	5,49 (estável)
P42PEP-75	20 horas	30 min	>10 horas	35,78 (estável)
P42PEP-374	1,9 horas	>20 horas	>10 horas	43,11 (instável)
P18PEP-343	1,3 horas	3 min	3 min	11,77 (estável)
P34PEP-1169	30 horas	>20 horas	>10 horas	0,01 (estável)

Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

Conforme o apresentado na tabela 6, 5 dos 10 peptídeos selecionados têm uma meia-vida estimada em mamíferos entre 20 e 30 horas, um tempo consideravelmente satisfatório. Porém, as outras 5 sequências possuem um tempo bem mais curto, entre 1,1 e 2,8 horas. Já em relação ao II, 7 das 10 sequências são estimadas como sendo estáveis e 3 como instáveis. Valendo ressaltar que o peptídeo P42PEP-75 possui um valor de II próximo de 40, o que pode ser considerado uma condição limítrofe.

Através dessas estimativas, os peptídeos oriundos da proteína 34 (P34), o citocromo P450 CYP76AD8, ganham destaque. Pois 4 dos 5 peptídeos com o maior tempo de meia-vida pertencem a esse grupo. Além disso, todos os peptídeos oriundos dessa proteína possuem um índice de instabilidade bastante favorável para sua aplicação clínica.

Os resultados dessas análises, no geral, são bastante positivos e indicam que esses peptídeos têm um potencial para aplicação clínica. Apesar de alguns peptídeos apresentarem uma estimativa de estabilidade e de meia-vida desfavoráveis, é precipitado afirmar a instabilidade desses peptídeos em organismos vivos, apenas com base nessas informações. Pois a determinação do tempo de meia-vida de um peptídeo, bem como sua estabilidade não são determinados apenas pelos fatores avaliados neste estudo. Outros fatores ainda são correlacionados com essas características, como a sua estabilidade térmica, a presença de regiões PEST (regiões ricas em prolina, ácido glutâmico, serina e treonina) e a presença de ligações

dissulfeto na sequência (PARSELL, et al. 1989; ROGERS, et al. 1986 GURUPRASAD, et al. 1990). De modo que apenas avaliando todos esses parâmetros seria adequado afirmar que um dos nossos peptídeos é estável ou instável em meios biológicos.

Entretanto, a influência dos parâmetros aqui avaliados também já foi demonstrada experimentalmente e exercem forte impacto na estabilidade dos peptídeos *in vivo*, de modo que os resultados apresentados, mesmo que não permitam afirmar as propriedades reais dos peptídeos, são bons indicativos da realidade ou algo próximo a ela.

5.4.2. Índice de Boman

Outro fator limitante na aplicação clínica de PAMs é o seu potencial em causar efeitos tóxicos para o indivíduo. Por causa disso, muitos agentes têm sua ação limitada ao uso tópico (RIMA, et al. 2021).

Considerando que PAMs são moléculas naturais produzidas por todos os organismos que participam não apenas da inibição direta de um microrganismo, mas também atuam em processos de sinalização e recrutamento de outros agentes para combater os organismos invasores, Boman correlacionou as características estruturais que favorecem um peptídeo a exercer atividade antimicrobiana com os feitos hormonais que essas moléculas podem apresentar (BOMAN, 2003).

Boman observou que as principais características estruturais que estão correlacionadas com a atividade antimicrobiana de um peptídeo (carga líquida positiva e anfipaticidade) são características de outros polipeptídeos, como as histonas, que se ligam a outras estruturas e desenvolvem outros efeitos, além de antimicrobianos. Desse modo, ele definiu um índice que correlaciona a sequência da proteína com uma potencial atividade hormonal que pode resultar em efeitos indesejados. Esse cálculo é feito definindo o potencial de ligação à proteína do peptídeo, com base na soma das propriedades de solubilidade das cadeias laterais dos seus resíduos de aminoácidos. Foi observado peptídeos que exercem ação hormonal ou outros efeitos, além do antimicrobiano, possuem índices mais altos (acima de 1,5 kcal/mol), ao passo que peptídeos com ação apenas antimicrobiana possuem índices menores (abaixo de 1,5 kcal/mol) (BOMAN, 2003).

Com base nesse postulado, calculamos o índice de Boman para nossos peptídeos através da ferramenta Antimicrobial Peptide Calculator and Predictor do

servidor APD3, para estimar a possibilidade de eles exercerem exclusivamente atividade antimicrobiana ou outras atividades em conjunto a essa.

Tabela 7: Índice de Boman estimado para cada peptídeo através do servidor APD3.

Peptídeo	Índice de Boman
P34PEP-184	-0,03 kcal/mol
P58PEP-51	1,35 kcal/mol
P42PEP-72	1,51 kcal/mol
P34PEP-677	-0,02 kcal/mol
P34PEP-1003	-0,22 kcal/mol
P54PEP-6	0,41 kcal/mol
P42PEP-75	1,63 kcal/mol
P42PEP-374	1,43 kcal/mol
P18PEP-343	0,08 kcal/mol
P34PEP-1169	0 kcal/mol

Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

Os índices estimados para os peptídeos, no geral, também demonstraram ser favoráveis para a sua aplicação clínica, pois são consideravelmente baixos, indicando um baixo potencial de ligação à proteína.

É importante ressaltar dois resultados obtidos nessa estimativa: os peptídeos oriundos da proteína 34 (citocromo P450 CYP76AD8) e os peptídeos oriundos da proteína 42 (maturase K). Os peptídeos da P34 apresentaram valores bastante favoráveis para sua aplicação, ao passo que os valores da P42 foram consideravelmente desfavoráveis. Esses resultados reforçam o que foi observado através das estimativas de meia-vida e Índice de Instabilidade, que indicam os peptídeos de P34 como os mais promissores, enquanto os da P42 tendem a ser os mais instáveis e promíscuos dentre os peptídeos.

Entretanto, como dito anteriormente, não é adequado considerar esses parâmetros como definitivos a respeito desses peptídeos. Visto que os resultados de P42 não ultrapassam muito o valor limite estabelecido por Boman e que mesmo com um potencial de ligação à proteína considerável para esses peptídeos, isso não significa que na prática eles irão se ligar a alguma delas ou que essa ligação necessariamente será prejudicial.

5.4.3. Potencial de ligação à membrana e formação de α -hélice

A ligação do peptídeo com a membrana do microrganismo-alvo é essencial para que o mecanismo de lise celular possa ser desencadeado. Diversos fatores já apresentados aqui estão diretamente relacionados com a interação entre o peptídeo

e a membrana-alvo. Para que a ligação do peptídeo com essa membrana seja favorecida geralmente há a presença de uma carga líquida positiva que auxilia a molécula na interação com a superfície negativa da célula e a presença de resíduos hidrofóbicos que constituem a interface de interação com a parte apolar da membrana. O sinergismo dessas duas características favorece o peptídeo a interagir com o microrganismo (SATURINO, 2013).

Grande parte dos peptídeos que fazem esse tipo de interação assumem a estrutura secundária de α -hélice anfipática, que permite o peptídeo constituir poros através da interação dos resíduos hidrofóbicos com a membrana e a formação de um lúmen com os resíduos polares (SATURINO, 2013).

Como as características que tendenciam o peptídeo a interagir com a membrana e a formar α -hélice são semelhantes, esses dois eventos acabam se correlacionando, de modo que, geralmente o peptídeo assume sua estrutura de α -hélice após a interação com a membrana (SATURINO, 2013).

Considerando isso, o servidor APD3 fornece uma estimativa sobre o potencial de ligação de membrana e formação de α -hélice através da análise da sequência do peptídeo e a disposição desses peptídeos ao longo da sequência. É calculado uma razão hidrofóbica e, com base nos tipos de aminoácidos que compõem a sequência, o servidor afirma se é possível o peptídeo interagir com a membrana alvo, formar α -hélice e estima quantos peptídeos constituirão a face hidrofóbica da estrutura secundária.

A tabela 8 apresenta as informações a respeito da razão hidrofóbica de cada peptídeo, se o peptídeo pode formar α -hélice e interagir com a membrana e a estimativa de quantos resíduos irão compor a superfície hidrofóbica para essa interação. Também apresentamos abaixo uma representação gráfica das α -hélices que estima como acontecerá a distribuição dos aminoácidos ao longo da estrutura.

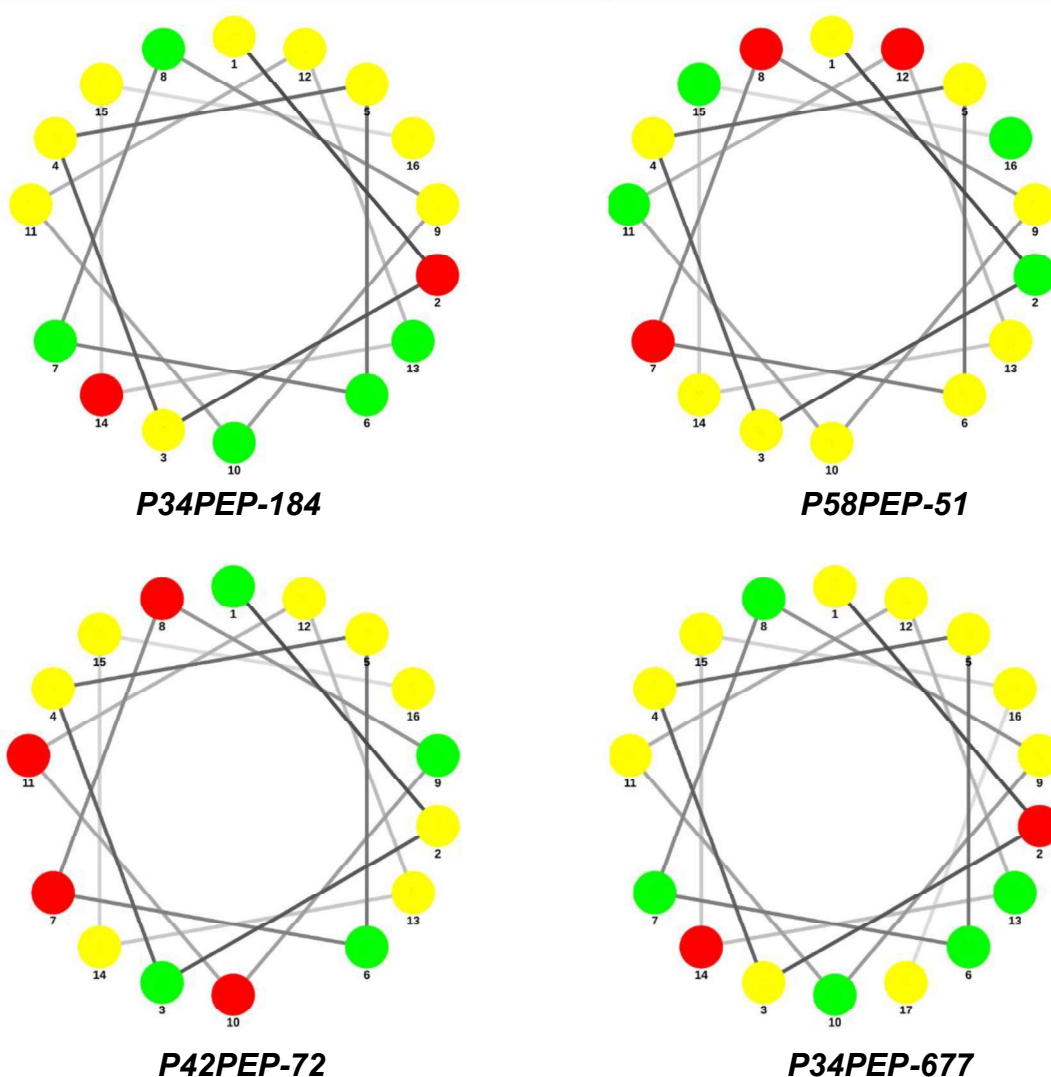
Tabela 8: Resultados das análises de potencial de ligação à membrana e formação de α -hélice pelo servidor APD3.

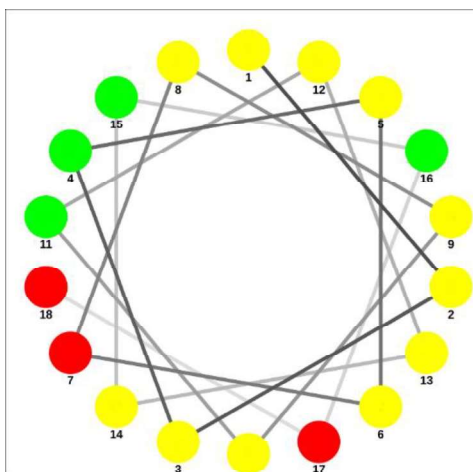
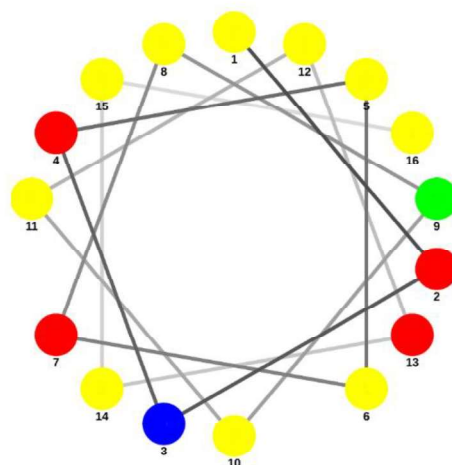
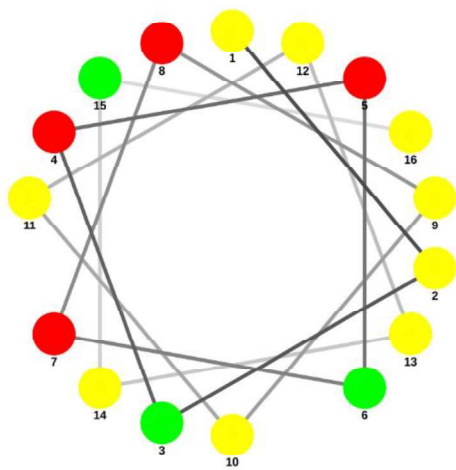
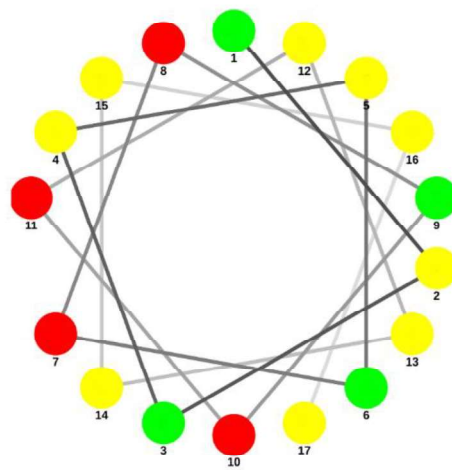
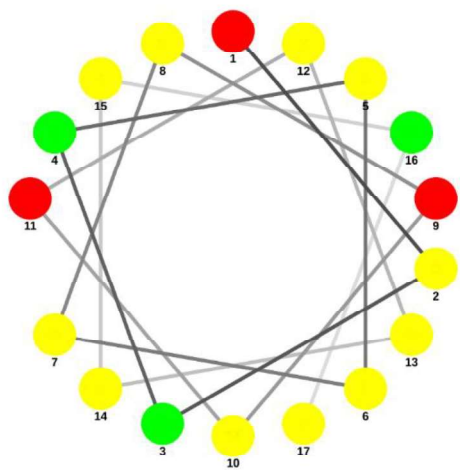
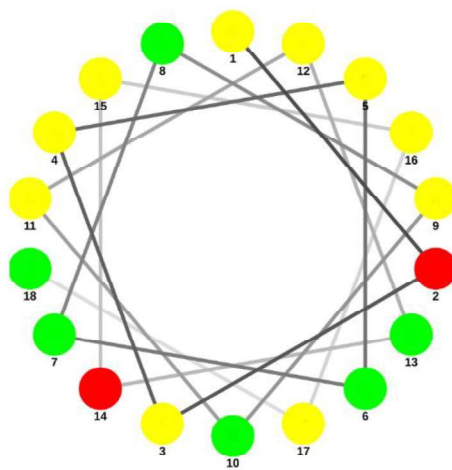
Peptídeos	Razão hidrofóbica	Capacidade de formar α -hélice	Resíduos hidrofóbicos na mesma face
P34PEP-184	50%	Sim	5
P58PEP-51	44%	Sim	5
P42PEP-72	50%	Sim	5
P34PEP-677	53%	Sim	5

P34PEP-1003	56%	Sim	8
P54PEP-6	56%	Sim	8
P42PEP-75	50%	Sim	4
P42PEP-374	47%	Sim	5
P18PEP-343	41%	Sim	6
P34PEP-1169	50%	Sim	5

Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

Figura 3: representações Helical Wheel dos peptídeos selecionados, geradas em <http://lbqp.unb.br/NetWheels/>.



**P34PEP-1003****P54PEP-6****P42PEP-75****P42PEP-374****P18PEP-343****P34PEP-1169**

Obs: resíduos polares básicos representados em vermelho, polares ácidos em azul, polares sem carga em verde e apolares em amarelo.

Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

Os resultados gerados nessa etapa da análise são bastante semelhantes. Tanta a razão hidrofóbica, quanto a capacidade de interagir com a membrana e a quantidade de resíduos que fazem parte dessa interação são bastante próximos. Isso já era esperado, considerando que toda a etapa de prospecção se baseou em selecionar peptídeos com as características que favorecem esse tipo de interação. Por isso todos os peptídeos são classificados como tendo a capacidade de formar α -hélice, afirmando uma eficácia na seleção dos peptídeos.

A disposição dos resíduos ao longo da sequência é um dos fatores de influência para esse tipo de interação em análise. O servidor estimou que a face apolar dos peptídeos, que interagirá com as cadeias carbônicas dos fosfolipídeos da membrana do organismo, será composta por 4 a 8 resíduos hidrofóbicos, porém a constituição dos peptídeos conta com quantidades maiores de peptídeos apolares. Isso demonstra que a face hidrofóbica de um peptídeo não é definida apenas pela quantidade de resíduos com essa característica, mas também pela disposição espacial deles.

Esse evento é melhor compreendido ao observar as representações do P34PEP-184 e P42PEP-75 (figura 2), onde os dois peptídeos possuem 9 resíduos apolares, porém o primeiro é descrito como tendo 5 resíduos em sua face apolar e o segundo contará com 4. Isso porque no primeiro é visível uma distribuição simétrica entre os resíduos polares e apolares, constituindo uma face hidrofóbica e outra hidrofílica bem definidas. Por outro lado, o segundo peptídeo tem uma distribuição desses resíduos de maneira mais assimétrica, o que possivelmente resultará em capacidades de interação com a membrana diferentes para esses dois peptídeos. Desse modo, quanto mais resíduos apolares dispostos em uma mesma face, maior será a quantidade de pontos de interação entre a membrana e o peptídeo. Entretanto, não afirmamos aqui nenhum favorecimento na interação com a membrana e atividade antimicrobiana de nenhum dos peptídeos, visto que o servidor afirma potencial de interação para todos e não conhecemos nenhuma correlação estabelecida entre a quantidade de resíduos da face apolar do peptídeo com sua atividade antimicrobiana. De modo que, mais resíduos na mesma face podem ser um fator positivo, negativo ou nulo. Podemos apenas esperar capacidades de interação diferentes para cada peptídeo, com base nessas informações.

5.4.4. Predição de atividade antimicrobiana

A última avaliação realizada com os peptídeos foi a predição da atividade antimicrobiana através do servidor CAMP. Esse é um banco de dados com mais de 24 mil sequências de peptídeos antimicrobianos, tanto de origem natural quanto sintética que fornece informações detalhadas sobre essas estruturas. CAMP está em constante atualização e fornece algumas ferramentas úteis no desenvolvimento de novos PAMs. Entre essas ferramentas está o “AMP Prediction” que permite a calcular a probabilidade de o peptídeo possuir atividade antimicrobiana. Esse cálculo utiliza as informações disponíveis no banco de dados e através da análise de 64 características é capaz de classificar um peptídeo como antimicrobiano ou não antimicrobiano (GAWDE, et al. 2023).

Três algoritmos diferentes podem ser utilizados para essa estimativa, Random Forest (RF), Support Vector Machine (SVM) e Artificial Neural Network (ANN). Sendo que todos os três possuem uma precisão acima de 80% para esse tipo de previsão (GAWDE, et al. 2023).

Tabela 9: Probabilidade de atividade antimicrobiana calculada por CAMP.

Peptídeos	RF	SVM	ANN
P34PEP-184	0,83	0,94	0,94
P58PEP-51	0,53	0,5	0,6
P42PEP-72	0,87	0,94	0,97
P34PEP-677	0,86	0,94	0,95
P34PEP-1003	0,94	0,92	0,94
P54PEP-6	0,86	0,91	0,96
P42PEP-75	0,85	0,96	0,97
P42PEP-374	0,84	0,9	0,96
P18PEP-343	0,65	0,77	0,77
P34PEP-1169	0,82	0,92	0,92

Valores acima de 0,5 são classificados como antimicrobianos e abaixo desse valor como não antimicrobianos.

Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

De acordo com as estimativas do CAMP há grande probabilidade de que os peptídeos oriundos dessa prospecção possuam atividade antimicrobiana. Com exceção do P58PEP-51, todos os peptídeos possuem uma probabilidade acima de 65% para essa atividade.

Com base nesses resultados e nos resultados gerados por todas as análises realizadas no presente estudo é possível classificar os nossos peptídeos como potenciais candidatos antimicrobianos.

Saturino (2013), em sua dissertação, analisou peptídeos derivados de C-GSF humano para verificar o potencial antimicrobiano dessas moléculas. Foram analisadas quatro sequências por meio de uma abordagem semelhante à do presente estudo, utilizando as mesmas ferramentas, e, após essa análise *in silico*, foi feita uma análise *in vivo*. Essa segunda análise demonstrou que os resultados *in silico* foram capazes de prever a real atividade dos peptídeos *in vivo*. Isso aumenta a confiabilidade de nossos resultados.

Numa visão geral, todos os 10 peptídeos se apresentam como potenciais PAMs, porém, é adequado esperar uma maior instabilidade dos peptídeos oriundos de P42, ao passo que os oriundos de P34 tendem a ser mais estáveis. Da mesma forma, o peptídeo de P18 e o de P54 não apresentaram resultados tão favoráveis para a estimativa de meia-vida e o peptídeo de P58 não apresentou resultados tão bons para índice de Boman e Índice de Instabilidade. De modo, que, dentre os peptídeos analisados, os de P34 apresentam os melhores resultados em todas as análises e podem ser tidos como os melhores candidatos dentre os 10. Ainda assim, todos figuram como bons peptídeos.

Entretanto, apesar dos resultados favoráveis, são necessárias muitas outras análises para de fato ser possível classificar os peptídeos como PAMs, devido as limitações das análises realizadas e das diversas características e propriedades dos peptídeos que não podem ser avaliadas nesse tipo de análise *in silico* e podem ser determinantes na avaliação final do caráter dessas moléculas.

Sugere-se, desse modo, a continuidade do trabalho visando compreender melhor tanto as características pertencentes aos peptídeos prospectados como a atividade antimicrobiana de cada um deles, considerando a potencialidade do desenvolvimento de um novo composto biofarmacológico partindo dos presentes resultados.

6. CONCLUSÃO

Com isso é possível concluir que após a busca das sequências de proteínas nos bancos de dados e a digestão teórica delas por meio do Kamal as espécies *Cereus jamacaru* e *Opuntia ficus-índica* são potenciais fontes de PAMs.

As análises feitas para a filtragem dos peptídeos permitiram selecionar os melhores candidatos de um grupo de mais de 84 mil peptídeos. Essas filtrações dos resultados da digestão teórica foram essenciais e definitivas na qualidade de nossos resultados, pois todos os 10 peptídeos selecionados nessa etapa demonstraram, após as análises *in silico*, ser potenciais PAMs.

Vale destacar ainda a possibilidade de haver diversos outros peptídeos antimicrobianos intragênicos oriundos tanto de *Cereus jamacaru* como de *Opuntia ficus-índica*, considerando que não foi possível analisar uma parte significativa do conteúdo proteico das duas espécies nesse trabalho devido ao volume reduzido de sequências primárias nos bancos de dados utilizados.

REFERÊNCIAS

AKKOL E.K.; ILHAN, M.; KARPUZ, B.; GENC, Y.; SOBARZO-SÁNCHEZ, E. Sedative and Anxiolytic Activities of *Opuntia ficus indica* (L.) Mill.: An Experimental Assessment in Mice. **Molecules**. Basileia, Suíça. 2020; vol. 25, 8 1844. DOI: 10.3390/molecules25081844.

BACHMAIR, A.; FINLEY, D.; VARSHAVSKY, A. In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. **Science**. Nova Iorque. 1986; vol. 234, 4773 179-86. DOI:10.1126/science.3018930

BECHINGER, B.; GORR, S.U. Antimicrobial Peptides: Mechanisms of Action and Resistance. **Journal of dental research**. 2017; vol. 9, 63:254-260. DOI:10.1177/0022034516679973

BIN HAFEEZ, A.; JIANG, X.; BERGEN, P.J.; ZHU, Y. Antimicrobial Peptides: An Update on Classifications and Databases. **International journal of molecular sciences**. 2021; vol. 22, 21:11691. DOI:10.3390/ijms222111691

BLANDO, F. *et al.* Antimicrobial and Antibiofilm Activity against *Staphylococcus aureus* of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. Cladode Polyphenolic Extracts. **Antioxidants** Basel, Switzerland, 2019. Vol 8(5), 117. DOI:10.3390/antiox8050117

BOMAN, H G. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. **Journal of internal medicine**. Estocolmo, Suécia. 2003. vol. 254,3: 197-215. DOI:10.1046/j.1365-2796.2003.01228.x

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. **Nature reviews Microbiology**. Iowa. 2005. vol. 3, 3: 238-50. DOI:10.1038/nrmicro1098

BRAND, G.D. *et al.* Intragenic antimicrobial peptides (IAPs) from human proteins with potent antimicrobial and anti-inflammatory activity. **PLoS ONE**. Brasília. 2019. Vol. 14, 8: e0220656. DOI:10.1371/journal.pone.0220656.

BRAND, G. D. *et al.* Probing protein sequences as sources for encrypted antimicrobial peptides. **PLoS ONE**. Brasília. 2012. vol. 7,9: e45848. DOI:10.1371/journal.pone.0045848

BRAVO FILHO, E. S. *et al.* Levantamento etnobotânico da família Cactaceae no estado de Sergipe. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro. 2018 vol. 12, n. 1, p. 41- 53. DOI:10.5935/2446-4775.20180005

Cactaceae in Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2020. Disponível em: <<https://floradobrasil2020.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB70>>. Acesso em: 04 jun. 2023.

CARDOSO P.D.S. *et al.* Nutritional and technological potential of cactus fruits for insertion in human food. **Crit Rev Food Sci Nutr**. 2021. Vol. 1:1-17. DOI: 10.1080/10408398.2021.1997906.

CAVALCANTE, A. de M. B. *et al.* *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. e as Mudanças Climáticas: Uma Análise a Luz da Modelagem de Distribuição de Espécies no Bioma Caatinga. **Revista Brasileira De Meteorologia**. Rio de Janeiro. 2020. Vol. 35(3), 375–385. DOI:10.1590/0102-7786353001.

CHAKRABORTY, C.; AGRAWAL, A. Computational analysis of C-reactive protein for assessment of molecular dynamics and interaction properties. **Cell Biochem Biophys**. Grande Noida, Índia. 2013. Vol. 67(2):645-656. DOI:10.1007/s12013-013-9553-4.

CIUMAC, D. *et al.* Membrane targeting cationic antimicrobial peptides. **Journal of colloid and interface Science**. Manchester, Reino Unido. 2019. vol. 537: 163-185. DOI:10.1016/j.jcis.2018.10.103.

DATHE, M. *et al.* Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipathic helical peptides. **FEBS letters**. 1997. vol. 403,2: 208-12. DOI:10.1016/s0014-5793(97)00055-0.

DE ARAÚJO, F.F.; *et al.* Underutilized plants of the Cactaceae family: Nutritional aspects and technological applications. **Food Chem**. Campinas, São Paulo. Vol 362:130196. DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.130196.

DE MEDEIROS, I.U. *et al.* Genotoxicity and pharmacokinetic characterization of *Cereus jamaru* ethanolic extract in rats. **Biosci Rep**. Natal, Rio Grande do Norte. 2019. Vol 39(1):BSR20180672. DOI: 10.1042/BSR20180672.

DEO, S. *et al.* Strategies for improving antimicrobial peptide production. **Biotechnology advances**. Canadá. 2022. vol. 59: 107968. DOI:10.1016/j.biotechadv.2022.107968

GALLO, R.L., HOOPER, L.V. Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. **Nat Rev Immunol**. San Diego, Califórnia. 2012. Vol 12(7):503-516. DOI:10.1038/nri3228

GAWDE, U. *et al.* CAMPR4: a database of natural and synthetic antimicrobial peptides. **Nucleic Acids Research**. Maharashtra, Índia. 2023, Vol. 51, D1: D377–D383. DOI:10.1093/nar/gkac933.

GÓMEZ-MAQUEO, A.; SOCCIO, M.; CANO, M.P. In Vitro Antioxidant Capacity of *Opuntia* spp. Fruits Measured by the LOX-FL Method and its High Sensitivity Towards Betalains. **Plant Foods Hum Nutr**. Madrid, Espanha. 2021. Vol 76(3):354-362. DOI: 10.1007/s11130-021-00914-7.

GONDA, D. K. *et al.* Universality and structure of the N-end rule. **The Journal of biological chemistry**. Cambridge. 1989. vol. 264,28: 16700-12.

GURUPRASAD, K. *et al.* Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its

primary sequence. **Protein engineering**. Hyderabad, Índia. 1990. vol. 4,2: 155-61. DOI:10.1093/protein/4.2.155

HANCOCK, R.E.; SCOTT, M.G. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. **Proc Natl Acad Sci**. U.S.A. 2000. Vol 97(16):8856-8861. DOI:10.1073/pnas.97.16.8856

HANEY, E.F.; MANSOUR, S.C.; HANCOCK, R.E. Antimicrobial Peptides: An Introduction. **Methods Mol Biol**. Canadá. 2017. Vol 1548:3-22. DOI: 10.1007/978-1-4939-6737-7_1.

HEIKAL, A.; ABD EL-SADEK, M.E.; SALAMA, A.; TAHA, H.S. Comparative study between in vivo- and in vitro-derived extracts of cactus (*Opuntia ficus-indica* L. Mill) against prostate and mammary cancer cell lines. **Heliyon**. Cairo, Egito. 2021. Vol 7(9):e08016. DOI:10.1016/j.heliyon.2021.e08016.

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R.E. Peptide antimicrobial agents. **Clin Microbiol Rev**. Canadá. 2006. Vol 19(3):491-511. DOI:10.1128/CMR.00056-05.

KOLNIAK-OSTEK J. *et al*. Characterization of Bioactive Compounds of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. Seeds from Spanish Cultivars. **Molecules**. Polônia, 2020. Vol 25(23):5734. DOI:10.3390/molecules25235734

LIMA, P. G. **Peptídeos antimicrobianos sintéticos: atividade antifúngica e mecanismos de ação**. 2021. 116 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2021.

LI, X. *et al*. Antimicrobial Mechanisms and Clinical Application Prospects of Antimicrobial Peptides. **Molecules**. China, 2022. Vol 27(9):2675. DOI:10.3390/molecules27092675

LUCENA, C. M. *et al*. Distribuição Local de *Cereus jamacaru* DC. subsp. *jamacaru* e *Pilosocereus pachycladus* F. Ritter subsp. *pernambucoensis* (F. Ritter) Zappi (Cactaceae) e sua Relação com uma Comunidade Rural no Município do Congo, Paraíba. **Gaia Scientia**, [S. l.], v. 9, n. 2, 2015. Disponível em: <https://periodicos.ufpb.br/index.php/gaia/article/view/24499>.

LUCENA, C.M. *et al*. Use and knowledge of Cactaceae in Northeastern Brazil. **J Ethnobiol Ethnomed**. Paraíba, 2013. Vol 9(1):62. DOI:10.1186/1746-4269-9-62

MAZURKIEWICZ-PISAREK, A.; BARAN, J.; CIACH, T. Antimicrobial Peptides: Challenging Journey to the Pharmaceutical, Biomedical, and Cosmeceutical Use. **Int J Mol Sci**. Vorsóvia, Polônia. 2023. Vol 24(10):9031. DOI:10.3390/ijms24109031.

MCMILLAN, K. AM.; COOMBS, M.R.P. Review: Examining the Natural Role of Amphibian Antimicrobial Peptide Magainin. **Molecules**. Canadá, 2020. Vol 25(22):5436. DOI:10.3390/molecules25225436.

MOORTHY, K. *et al.* Recent developments in detection and therapeutic approaches for antibiotic-resistant bacterial infections. **J Food Drug Anal.** Taiwan, 2023. Vol 31(1):1-19. DOI:10.38212/2224-6614.3433.

MOTA, T.R. *et al.* Protein extract from *Cereus jamacaru* (DC.) inhibits *Colletotrichum gloeosporioides* growth by stimulating ROS generation and promoting severe cell membrane damage. **Microb Pathog.** Rio Grande do Norte, 2019. Vol 130:71-80. DOI: 10.1016/j.micpath.2019.02.033.

NAGAOKA, I.; TAMURA, H.; REICH, J. Therapeutic Potential of Cathelicidin Peptide LL-37, an Antimicrobial Agent, in a Murine Sepsis Model. **Int J Mol Sci.** Tóquio, Japão, 2020. Vol 21(17):5973. DOI:10.3390/ijms21175973.

NYEMBE, P.L.; NTOMBELA, T.; MAKATINI, M.M. Review: Structure-Activity Relationship of Antimicrobial Peptoids. **Pharmaceutics.** África do Sul, 2023. Vol 15(5):1506. DOI:10.3390/pharmaceutics15051506.

PARSELL, D. A.; SAUER, R. T. The structural stability of a protein is an important determinant of its proteolytic susceptibility in *Escherichia coli*. **The Journal of biological chemistry.** Cambrigde, 1989. vol. 264,13: 7590-5.

RAMADA, M. H. S. **Explorando genomas: a busca por peptídeos antimicrobianos intragênicos.** 2016. xvii, 123 f., il. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) — Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

RIMA, M. *et al.* Antimicrobial Peptides: A Potent Alternative to Antibiotics. **Antibiotics (Basel).** França, 2021. Vol 10(9):1095. DOI:10.3390/antibiotics10091095.

ROGERS, S.; WELLS, R.; RECHSTEINER, M. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. **Science.** Nova Iorque, 1986. vol. 234,4774: 364-8. DOI:10.1126/science.2876518.

SÁ, L. G. G de. **Prospecção, síntese e aplicação de peptídeos intragênicos antimicrobianos na conservação de alimentos.** 2018. xii, 93 f., il. Dissertação (Mestrado em Química) — Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

SALLES, S. S. **Prospecção in silico de novos peptídeos antimicrobianos a partir de fragmentos proteolíticos de leite bovino.** 2012. Dissertação (Mestrado em ciências biológicas – imunologia e do doenças infecto-parasitárias/genética e biotecnologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Brasil, 2012.

SANTOS, M. A dos. **Síntese e determinação da estrutura de peptídeos antimicrobianos intragênicos de proteínas humanas.** 2022. xiv, 104 f., il. Tese (Doutorado em Química) — Universidade de Brasília, Brasília, 2022.

SATURNINO, C. F. **Estudo in silico de derivados do G-CSF humano como antibacterianos.** 2013. Dissertação (Mestrado em biotecnologia) – Universidade Federal do Espírito Santo, 1013.

SIERRA, J. M. *et al.* An overview of antimicrobial peptides and the latest advances in their development. **Expert opinion on biological therapy**. Barcelona, Espanha, 2017 vol. 17,6: 663-676. DOI:10.1080/14712598.2017.1315402

SILVA, M.A. *et al.* Opuntia ficus-indica (L.) Mill.: A Multi-Benefit Potential to Be Exploited. **Molecules**. Lisboa, Portugal, 2021. Vol 26(4):951. DOI:10.3390/molecules26040951

SOARES, L. M. N, *et al.* Cereus jamacaru D.C. (Mandacaru): a Promising Native Brazilian Fruit as a Source of Nutrients and Bioactives Derived from its Pulp and Skin. **Plant Foods Hum Nutr**. Campina Grande, Paraíba, 2021. Vol 76(2):170-178. DOI: 10.1007/s11130-021-00885-9.

TEIXEIRA, C. SS. *et al.* Edible Insects as a Novel Source of Bioactive Peptides: A Systematic Review. **Foods**. Porto, Portugal, 2023. Vol 12(10):2026. DOI:10.3390/foods12102026

THOMAS, S. *et al.* CAMP: a useful resource for research on antimicrobial peptides. **Nucleic Acids Res**. Mumbai, Índia, 2010. Vol 38(problema no banco de dados):D774-D780. DOI:10.1093/nar/gkp1021

TOBIAS, J. W. *et al.* The N-end rule in bacteria. **Science**. Nova Iorque, 1991. vol. 254,5036: 1374-7. DOI:10.1126/science.1962196

TOSSI, A.; SANDRI, L.; GIANGASPERO, A. Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. **Biopolymers**. Trieste, Itália, 2000. vol. 55,1: 4-30. DOI:10.1002/1097-0282(2000)55:1<4::AID-BIP30>3.0.CO;2-M

VARSHAVSKY, A. The N-end rule pathway of protein degradation. **Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms**. E.U.A, 1997. vol. 2,1: 13-28. DOI:10.1046/j.1365-2443.1997.1020301.x

VATTA, A.F. *et al.* Direct anthelmintic effects of Cereus jamacaru (Cactaceae) on trichostrongylid nematodes of sheep: in vivo studies. **Vet Parasitol**. África do Sul, 2011. Vol 180(3-4):279-86. DOI: 10.1016/j.vetpar.2011.03.025.

VENCIONECK DUTRA, J.C. *et al.* Cereus jamacaru D.C. Hydroalcoholic Extract Promotes Anti-Cytotoxic and Antitumor Activity. **Pharmaceuticals (Basel)**. Vitória, Espírito Santo, 2018. Vol 11(4):130. DOI: 10.3390/ph11040130.

WANG, G.; LI, X.; WANG, Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. **Nucleic Acids Res**. E.U.A. 2016. Vol 44(D1):D1087-D1093. DOI:10.1093/nar/gkv1278

WILKINS, M. R. *et al.* Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. **Methods in molecular biology**. Sydney, Austrália, 1999. Vol 112, 531–552. DOI:10.1385/1-59259-584-7:531

YEAMAN, M. R.; NANNETTE, Y. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. **Pharmacological reviews**. E.U.A. 2003. vol. 55,1: 27-55.
DOI:10.1124/pr.55.1.2

ZAPPI, D.; TAYLOR, N.P. 2020. *Cactaceae in Flora do Brasil 2020*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:
<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB70>>. Acesso em: 01 dez. 2021