



UNIVERSIDADE FEDERAL DO DELTA DO PARNAÍBA
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO
CURSO DE BACHARELADO EM BIOMEDICINA

THALIS FERREIRA DE SOUZA

**SELEÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA *IN SÍLICO* DE
PEPTÍDEOS INSPIRADOS NA OSMOTINA DE *Calotropis procera***

PARNAÍBA

2022

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Delta do Parnaíba
Biblioteca Central Prof. Cândido Athayde

L729s Souza, Thalís Ferreira de
Seleção, caracterização e atividade antibacteriana in silico de peptídeos inspirados na osmotina de *Calotropis Procera* [recurso eletrônico] / Thalís Ferreira de Souza – 2022

1 Arquivo em PDF.

TCC (Bacharelado em Biomedicina) – Universidade Federal do Delta do Parnaíba, 2022.

Orientação: Prof. Dr. Jefferson Soares de Oliveira.

1. Látex. 2. Docking. 3. Proteína. 4. ADMET. 5. MurB. 6. Tirosil-tRNA sintetase. 7. RbmA. I. Título.

CDD: 615.7

THALIS FERREIRA DE SOUZA

**SELEÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA *IN SÍLICO* DE
PEPTÍDEOS INSPIRADOS NA OSMOTINA DE *Calotropis procera***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Biomedicina da Universidade
Federal do Delta do Parnaíba, *Campus* Ministro
Reis Velloso, como requisito obrigatório para
obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Jefferson Soares de Oliveira

PARNAÍBA

2022

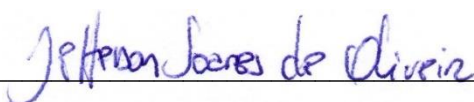
THALIS FERREIRA DE SOUZA

**SELEÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA *IN SÍLICO* DE
PEPTÍDEOS INSPIRADOS NA OSMOTINA DE *Calotropis procera***

Monografia apresentada à Universidade Federal do Delta do Parnaíba como requisito obrigatório para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em 14 de Outubro de 2022.

BANCA EXAMINADORA



Dr. Jefferson Soares de Oliveira (Orientador)

Professor responsável pelo Laboratório de Plantas Laticíferas da Universidade Federal do Delta do Parnaíba
(LABPL/UFDPar)



MSc. Ana Clara Silva Sales

Douoranda do Laboratório de Plantas Laticíferas da Universidade Federal do Delta do Parnaíba
(LABPL/UFDPar)



MSc. Bruna da Silva Souza

Douoranda do Laboratório de Plantas Laticíferas da Universidade Federal do Delta do Parnaíba
(LABPL/UFDPar)

Dedico aos meus pais, por me apoiarem desde os meus primeiros passos e nunca deixarem de acreditar em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais José Francisco de Souza Neto e Francisca Francileuza de Lima Ferreira por me conduzirem e me apoiarem em todos os meus projetos e escolhas, pelos seus conselhos e direcionamentos e por sempre acreditarem em mim, obrigado!

A minhas irmãs por serem as melhores do mundo e por estarem sempre ao meu lado mesmo estando distante.

Ao Matheus Pedrosa de Oliveira por me acompanhar durante todo o curso e sempre me dar forças em momentos em que nem eu acreditava em mim mesmo. Te amo!

Aos meus amigos por compartilharem comigo essa difícil fase de descobertas, erros e acertos.

A Liga Acadêmica de Microbiologia - LAMIC por ser o primeiro projeto na universidade que me acolheu e abriu meus olhos para novos horizontes.

Aos meus colegas do Laboratório de Bioquímica de Plantas Laticíferas (LABPL), principalmente para Ana Clara Silva Sales, Bruna da Silva Souza, Francisca Dayane Soares da Silva, Gabriella Linhares de Andrade e Lucas Arruda Moita por me acolherem e me ensinarem muito sobre ciência, vida e trabalho.

Ao maior orientador do mundo!! Professor Dr. Jefferson Soares de Oliveira por ter me acolhido em seu grupo de pesquisa, por ter confiado em meu trabalho, pela paciência e dedicação empregados aos projetos que desenvolvemos. Obrigado! Você é um grande exemplo como pessoa e profissional.

Ao CNPq pelo apoio e incentivo a pesquisa.

Ao corpo docente do curso de Biomedicina da UFDF por todo conhecimento repassado com maestria.

A coordenação do curso de Biomedicina da UFDF por estar sempre a disposição dos alunos e trabalhar para solucionar nossos problemas.

E por fim a Universidade Federal do Delta do Parnaíba – UFDF por toda a estrutura fornecida.

“Nos tempos de cristo, havia uma ave estúpida chamada fénix que, a cada cem anos, construía uma pira e se consumia em suas chamas. Deve ter sido prima-irmã do homem. Mas, toda vez que queimava, ressurgia das cinzas e novamente renascia. E parece que estivemos fazendo e refazendo inúmeras vezes a mesma coisa, só que com uma vantagem que a fénix nunca teve. Nós sabemos a estupidez que acabamos de cometer. Conhecemos todas as coisas estúpidas que estivemos fazendo nos últimos mil anos. Desde que não nos esqueçamos disso, que sempre tenhamos algo para lembrar disso, algum dia deixaremos de construir as malditas piras funerárias e de saltar dentro delas. A cada geração, escolheremos mais algumas pessoas que se lembrem disso.”

Ray Bradbury (1953)

RESUMO

A diminuição da eficiência antibiótica gera uma grande preocupação para a saúde individual e coletiva, pois esses fármacos são a principal forma de combate a infecções bacterianas. Com isso torna-se essencial a busca por novos compostos antibacterianos eficazes e sem toxicidade para os usuários. A partir disso os peptídeos antimicrobianos (PAMs) fazem parte de um considerável grupo de moléculas que podem desempenhar essa tarefa. Posto isso, uma maneira de iniciar os estudos com esse material é a partir de pesquisas *in silico*, que auxiliam desde a montagem do peptídeo até as previsões de propriedades biológicas, toxicidade, estrutura e características físico-químicas. Sabendo disso a osmotina de *Calotropis procera* é uma glicoproteína que já possui sua estrutura e sequência de aminoácidos estudada, a partir dela este trabalho predisse quatro peptídeos (CpOsmPep-1, CpOsmPep-1a, CpOsmPep-1b e CpOsmPep-1c) com tamanho de dez aminoácidos e observou que, além de suas características físico-químicas similares as de PAMs, todos eles apresentaram propriedades antibiofilme e penetrante em célula, ausência de toxicidade e alergenicidade, bem como estabilidade em ambiente gastrointestinal humano. Contudo dos quatro peptídeos apenas um deles (CpOsmPep-1c) demonstrou apresentar característica antimicrobiana. Esse foi analisado frente a ancoragem molecular com as proteínas UDP-N-acetilenoilpiruvilglucosamina redutase de *staphylococcus aureus*, tirosil-tRNA sintetase de *S. aureus* e RbmA de *Vibrio cholera*. Através disso, foi observado que CpOsmPep-1c demonstrou ligar-se a sítios alvos de todas as proteínas testadas, impedindo a mesma realize suas funções. O perfil ADMET *in silico* de CpOsmPep-1c também foi traçado e a partir dele foi notado que o peptídeo tende a ter uma melhor absorção cutânea, com tendência para permanecer nos vasos sanguíneos e ser metabolizado pelo citocromo p450 através da CYP3A4 e com tempo de meia vida de duas horas. Para mais, foi observado que o peptídeo não apresentou toxicidade contra rins, olhos, genes e pele, entretanto foi positivo para hepatotoxicidade e inibiu a proteína hERG II, podendo ser cardiotoxico. Tais resultados compõem os estudos iniciais de uma nova molécula peptídica que pode ser usada em tratamentos antibacterianos no futuro, contudo, apesar de suas notáveis características biológicas, tal molécula ainda pode ser melhorada para que sua melhor versão prossiga para estudos *in vitro* e *in vivo*.

Palavras-chave: Látex, Docking, Proteína, ADMET, MurB, tirosil-tRNA sintetase, RbmA.

ABSTRACT

The decrease in antibiotic efficiency generates a great concern for individual and collective health, because these drugs are the main way to fight bacterial infections. Thus, it becomes essential the search for new antibacterial compounds that are effective and without toxicity to users. Antimicrobial peptides (AMPs) are part of a considerable group of molecules that can perform this task. That said, one way to begin studies with this material is from *in silico* research, which helps from peptide assembly to predictions of biological properties, toxicity, structure, and physicochemical characteristics. Knowing that the osmotin from *Calotropis procera* is a glycoprotein that already has its structure and amino acid sequence studied, from it this work predicted four peptides (CpOsmPep-1, CpOsmPep-1a, CpOsmPep-1b and CpOsmPep-1c) with size of ten amino acids and observed that, in addition to their physicochemical characteristics similar to AMPs, they all showed antibiofilm and cell-penetrating properties, absence of toxicity and allergenicity, as well as stability in the human gastrointestinal environment. However, of the four peptides only one (CpOsmPep-1c) showed antimicrobial characteristics. It was analyzed against molecular docking with the proteins UDP-N-acetylenolpyruvylglucosamine reductase from *S. aureus*, Tyrosyl-tRNA synthetase from *S. aureus* and RbmA from *V. cholera*. Through this, it was observed that CpOsmPep-1c was shown to bind to target sites of all tested proteins, preventing it from performing its functions. The *in silico* ADMET profile of CpOsmPep-1c was also drawn and from this it was noted that the peptide tends to have a better cutaneous absorption, with a tendency to remain in blood vessels and be metabolized by cytochrome p450 via CYP3A4 and with a half-life of two hours. Furthermore, it was observed that the peptide showed no toxicity against kidneys, eyes, genes, and skin, however it was positive for hepatotoxicity and inhibited the hERG II protein, and may be cardiotoxic. Such results comprise the initial studies of a new peptide molecule that can be used in antibacterial treatments in the future, however, despite its remarkable biological characteristics, such molecule can still be improved for its best version to proceed to *in vitro* and *in vivo* studies.

Keywords: Latex, Docking, Protein, ADMET, MurB, Tyrosyl-tRNA synthetase, RbmA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura tridimensional e informações da Osmotina de <i>C. procera</i> resgatada do NCBI	17
Figura 2: Alinhamento da sequência do peptídeo CpOsmPep1 e seus mutantes	18
Figura 3: Previsão da estrutura tridimensional dos peptídeos e seu gráfico de Ramachandran	23
Figura 4: Docagem molecular com a proteína MurB de <i>S. aureus</i>	27
Figura 5: Interações moleculares com MurB de <i>S. aureus</i>	28
Figura 6: Ancoragem molecular com Tirosil-tRNA sintetase de <i>S. aureus</i>	29
Figura 7: Interações moleculares com Tirosil-tRNA sintetase de <i>S. aureus</i>	30
Figura 8: Ancoragem molecular com RbmA de <i>V. Cholerae</i>	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características biológicas, físico-químicas e estruturais dos peptídeos previstos.....	19
Tabela 2: Perfil ADMET de CpOsmPep-1c.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CellPPD	Designing of Cell Penetrating Peptides
CPC	Característica Penetrante em Célula
dPABB	design Peptides Against Bacterial Biofilms
FAD	Flavina-adenina dinucleotídeo
iB	Índice de Boman
IgE	Imunoglobulina E
LPS	Lipopolissacarídeo
MurB	UDP-N-acetilenolpiruvilglucosamina redutase
OCTs	Transportadores de cátions orgânicos
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMs	Peptídeos Antimicrobianos
PepSMI	Converter Peptídeo para string SMILES
pI	Ponto isoelétrico
SMILES	Simplified Molecular Input Line Entry System
SNC	Sistema Nervoso Central
VDss	Volume de distribuição em estado estacionário

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 METODOLOGIA	14
2.1 PREDIÇÃO DOS PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS	14
2.1.1 Predição dos peptídeos mutantes.....	14
2.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS PEPTÍDEOS.....	15
2.3 PROTEÓLISE E ESTABILIDADE EM AMBIENTE GASTROINTESTINAL.....	15
2.4 ANÁLISES ESTRUTURAIS DOS PEPTÍDEOS SELECIONADOS	15
2.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ALERGÊNICO, TÓXICO E HEMOLÍTICO	15
2.6 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	15
2.7 DOCKING MOLECULAR	16
2.8 PERFIL ADMET.....	16
3 RESULTADOS E DISCURSÃO.....	16
3.1 SELEÇÃO DOS PEPTÍDEOS	16
3.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS PEPTÍDEOS.....	20
3.3 PROTEÓLISE E ESTABILIDADE EM AMBIENTE GASTROINTESTINAL.....	21
3.4 ANÁLISES ESTRUTURAIS DOS PEPTÍDEOS SELECIONADOS	22
3.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ALERGÊNICO, TÓXICO E HEMOLÍTICO	24
3.6 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	25
3.7 DOCKING MOLECULAR	26
3.7.1 Docagem molecular com a proteína UDP-N-acetilenolpiruvilglucosamina redutase de <i>S. aureus</i> (MurB).....	26
3.7.2 Docagem molecular com a enzima Tirosil-trna sintetase de <i>S. aureus</i>	28
3.7.3 Docagem molecular com RbmA de <i>V. cholerae</i>	30
3.8 PERFIL ADMET DE CpOsmPep-1C	31
3.8.1 ABSORÇÃO.....	33
3.8.2 Distribuição	33
3.8.3 Metabolismo	34
3.8.4 Excreção	34
3.8.5 Toxicidade	35
4. CONCLUSÃO	36
5 REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

Desde sua descoberta, a antibioticoterapia tem sido a principal arma de combate contra patógenos bacterianos. Contudo, a maior conquista da medicina moderna não previa a elevada capacidade evolutiva destes patógenos que, em menos de um século, desenvolveram defesas e voltaram a ser uma preocupação (ZHUANG *et al.*, 2021). De acordo com relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2019, cerca de 700.000 pessoas morreram devido a infecções com cepas bacterianas resistentes, sendo *Escherichia coli*, *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Klebsiella pneumoniae* os principais patógenos associados. No mesmo ano, o Centro de Controle de Doenças dos EUA apontou que mais de 2,8 milhões de pessoas adquiriram infecções causadas por organismos resistentes e cerca de 35 mil delas morrem a cada ano. Além disso, conforme dados fornecidos pela Índia, cerca de uma criança morre a cada 9 minutos devido à infecção com patógenos resistentes a medicamentos (SS, 2020; UDDIN *et al.*, 2021).

Em razão das preocupantes estatísticas, o investimento em novas substâncias e tecnologias é necessário. Embora a remodelação de fármacos já superados tenha sido capaz de reestabelecer a atividade antibacteriana desses medicamentos, a rápida ascensão de mecanismos de resistência provocou uma baixa longevidade (KLEIN *et al.*, 2021). Em decorrência disso, a descoberta de novas moléculas com potencial antibacteriano torna-se de caráter prioritário, desta forma, os Peptídeos Antimicrobianos (PAMs) constituem uma classe de moléculas amplamente estudadas como alternativa aos antimicrobianos convencionais, principalmente diante da sua grande disponibilidade em organismos vivos e atividade promissora contra bactérias multirresistentes (LIMA *et al.*, 2021).

Estas moléculas podem adotar diferentes estruturas, existir em diferentes combinações e comprimentos de aminoácidos. Em geral, os PAMs são moléculas curtas de carga líquida positiva maior que dois, composição de aminoácidos igualmente dividida entre hidrofílicos e hidrofóbicos e tamanho máximo de 9 kDa (THAKUR *et al.*, 2022). Diversos são os meios como os PAMs desempenham sua atividade antibacteriana, dentre eles a inibição da parede celular bacteriana, de funções enzimáticas, de ácidos nucleicos e de processos de síntese de proteínas são alguns exemplos de ação intracelular. Os PAMs de conformação α -hélice são amplamente estudados na farmacologia devido sua capacidade de formar poros transmembranares através de mecanismos conhecidos como barril, tapete e buraco de minhoca (CORRÊA *et al.*, 2019).

Uma das formas bem difundida de estudos envolvendo PAMs é a abordagem *in silico* que vem ganhando cada vez mais espaço nas pesquisas farmacológicas, uma vez que sua aplicação diminuir consideravelmente o alto custo e o complexo trabalho experimental exigido durante o desenvolvimento de uma droga (FJELL; HANCOCK; JENSSEN, 2010). Utilizado especialmente em estágios iniciais, a abordagem fornece importantes informações sobre um protótipo de fármaco, a fim de selecionar candidatos que apresentem maior chance de sucesso de acordo com suas características, diminuindo recursos financeiros, tempo de bancada e até mesmo a utilização de animais (KNUDSEN *et al.*, 2020). Dentre os dados fornecidos por metodologias *in silico* destacam-se previsões relacionadas a

farmacocinética, farmacodinâmica, toxicidade, atividades biológicas, características físico-químicas, estrutura e dentre outros (SHAKER *et al.*, 2021).

A planta arbustiva *C. procera* pertence à família Apocynaceae e é encontrada em diversos lugares como Ásia, América e África. Ao sofrer trauma mecânico, a planta exsuda o seu látex, um espesso fluido leitoso de composição complexa que contém diversos fitoquímicos como triterpenos, alcaloides, enzimas, flavanóides e proteínas (ALI-SEYED; AYESHA, 2020). Tais fitoconstituintes são responsáveis por diversas atividades biológicas como anticancerígena, anti-inflamatória, antimicrobiana, dentre outras (AMINI *et al.*, 2021). A osmotina é uma glicoproteína de *C. procera* que foi purificada por Freitas *et al.*, (2011), em seus estudos foram observados duas isoformas com massas de 22.340 e 22.536 Da e ponto isoeletrico de 8,9 e 9,1 respectivamente. Essa proteína obtida exibiu atividade antifúngica diminuindo a germinação de esporos e dificultou o crescimento micelial (FREITAS *et al.*, 2011).

Motivado pela necessidade de descoberta de novos compostos antimicrobianos atrelada a necessidade de ampliar os estudos envolvendo a osmotina de *C. procera*, este estudo visou realizar projeção de peptídeos a partir desta proteína, caracterizá-los quanto suas estruturas, propriedades físico-químicas e farmacológicas, bem como desbravar suas capacidades de penetração celular, antibiofilme e antibacteriana.

2 METODOLOGIA

2.1 PREDIÇÃO DOS PEPTÍDEOS COM CARACTERÍSTICAS ANTIBIOFÍLME E PENETRANTE EM CÉLULA

Inicialmente a sequência em formato FASTA da Osmotina de *C. procera* foi obtida no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A predição dos peptídeos com tamanhos de 5; 10; 15 e 20 sequências de aminoácidos foi realizada no servidor design Peptides Against Bacterial Biofilms (dPABB) (<http://ab-openlab.csir.res.in/abp/antibiofilm/protein.php>), que além de prever os peptídeos, analisa sua possível atividade contra biofilme (Sharma *et al.*, 2016). Em seguida os que apresentaram potencialidades anti-biofilme foram submetidos ao programa Designing of Cell Penetrating Peptides (CellPPD) (<http://crdd.osdd.net/raghava/cellppd/>) para análise da capacidade de penetração celular destes peptídeos (GAUTAM *et al.*, 2015). As bioatividades testadas nesta etapa da metodologia foram realizadas utilizando o modo de seleção support vector machine (SVM) com nota de corte igual a zero (SOUZA *et al.*, 2020; YAP; GAN, 2020).

2.1.1 Predição dos peptídeos mutantes

Os mutantes do peptídeo selecionado foram previstos afim de encontrar versões melhoradas do mesmo, com isso o peptídeo selecionado contendo características penetrante em célula (CPC) e antibiofilme, teve seus possíveis mutantes previstos utilizando os programas dPABB e CellPPD. Com

o intuito de realizar uma seleção mais refinada das versões do peptídeo original, as notas de corte de SVM foram elevadas para 0,5 em previsões realizadas no dPABB e para 0,2 em simulações do CellPPD.

2.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS PEPTÍDEOS

A ferramenta Antimicrobial Peptide Database (APD3) (<http://aps.unmc.edu/AP/>) foi utilizada para análise de características físico-químicas dos peptídeos, tais como carga líquida, hidrofobicidade e índice de Boman. O ponto isoelétrico foi previsto utilizando a ferramenta ProtParam presente no Expasy (<https://web.expasy.org/protparam>).

2.3 PROTEÓLISE E ESTABILIDADE EM AMBIENTE GASTROINTESTINAL

A resistência a proteólise no ambiente gastrointestinal foi medida pela ferramenta HPL disponível em <http://crdd.osdd.net/raghava/hlp/help.html> (SHARMA *et al.*, 2016). A presença de locais de clivagem por enzimas proteolíticas do trato digestório foi avaliada pelo PeptideCutter (http://web.expasy.org/peptide_cutter) (Wang & Wang, 2016).

2.4 ANÁLISES ESTRUTURAIS DOS PEPTÍDEOS SELECIONADOS

A obtenção da estrutura tridimensional dos peptídeos foi possível através da ferramenta online PEP-FOLD 3 (<https://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD3/>), a partir disso as cinco melhores representações de cada peptídeo foram escolhidas com base na menor energia sOPEP (THEVENET *et al.*, 2012). Os modelos separados foram avaliados através da trama de Ramachandran fornecida pela ferramenta PROCHECK (<https://saves.mbi.ucla.edu/>) e os que tiveram maior probabilidade conformacional foram selecionados (AGNIHOTRY *et al.*, 2022). As análises visuais das estruturas selecionadas foram realizadas utilizando o PyMol Molecular Graphics System (versão 2.5.3, Schrodinger, LLC) (DELANO & LAM, 2005).

2.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ALERGÊNICO, TÓXICO E HEMOLÍTICO

A identificação de segmentos capazes de induzir uma resposta imune presentes na sequência dos peptídeos foi calculado através da ferramenta Predicted Antigenic Peptides (<http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl>) (MOLERO-ABRAHAM *et al.*, 2015). O potencial hemolítico teve sua avaliação na plataforma HemoPI (<https://webs.iiitd.edu.in/raghava/hemopi/design.php>) que utiliza a metodologia baseada em SVM e intervalo de probabilidade entre 0 e 1 (CHAUDHARY *et al.*, 2016). A análise da capacidade tóxica dos peptídeos foi feita através da ferramenta ToxinPred disponível em <http://crdd.osdd.net/raghava/toxinpred/design.php>, que utiliza o modo de análise apoiado em SVM com nota de corte igual a 0 (GAUTAM *et al.*, 2013).

2.6 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Com o intuito de investigar o possível potencial antibacteriano dos peptídeos estudados, a ferramenta iAMPpred disponível em <http://cabgrid.res.in:8080/amppred/> foi utilizada em seu modelo de SVM com escala de probabilidade de 0 a 1. Com o auxílio do APD3 foi possível realizar a análise

comparativa dos peptídeos deste estudo com PAMs de potenciais previamente testados e depositados no banco de dados da ferramenta.

2.7 DOCKING MOLECULAR

A partir das análises anteriores as moléculas que apresentarem características físico-químicas sugestivas para PAMs e probabilidade acima de 50% para atividade antibacteriana foi analisada frente a sua capacidade de se ligar a alvos bacterianos. Para os estudos de ancoragem molecular, as informações estruturais foram obtidas do PEP-FOLD 3. As estruturas tridimensionais das proteínas receptoras UDP-N-acetilglucosamina 6-fosforiltransferase de *S. aureus*, tirosil-tRNA sintetase de *S. aureus* e RbmA de *V. cholerae* foram resgatadas do banco de dados de proteínas PDB sob o código 1HSK, 1JIJ e 4KKP, respectivamente. O preparo dos alvos foi realizado com auxílio do programa UCSF Chimera (V 1.16), pelo qual foram retiradas moléculas de água, íons e outras estruturas indesejadas, posteriormente foram adicionados hidrogênios e cargas às proteínas.

O docking foi realizado através do servidor Cluspro (<https://cluspro.bu.edu/signup.php>), utilizando o módulo de atracamento peptídeo-proteína. O encaixe cego foi realizado ao redor da proteína, considerando o alvo rígido e o ligante flexível. Os resultados revertidos em "equilibrado" foram registrados e a distribuição das proteínas em clusters foi analisada, conforme região de ligação dos mesmos. Um representante de cada região almejada foi selecionado para estudos mais detalhados. A visualização do resultado de docking foi feito através do UCSF Chimera e a interação com os resíduos de aminoácidos foi verificado pelo Studio Discover (2021).

2.8 PERFIL ADMET

Seguindo os mesmos critérios impostos para o docking, o peptídeo teve seu perfil ADMET investigado. Para a análise do perfil ADMET foi necessário inicialmente converter a sequência de aminoácidos para o formato Simplified Molecular Input Line Entry System (SMILES) utilizando a ferramenta Converter Peptídeo para string SMILES (PepSMI) (<https://www.novoprolabs.com/tools/convert-peptide-to-smiles-string>). As avaliações ADMET foram realizadas através da ferramenta online pkCSM (<https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsml/>), que se baseia em assinaturas embasadas em gráficos (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015). A previsão do tempo de meia vida foi possível através do servidor ADMETlab (<https://admet.scbdd.com/calcpred/index/>). As características de irritação e corrosão ocular e a nefrotoxicidade foi prevista pelo programa ADMETsar (<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar2/>) (FLORES-HOLGUÍN; FRAU; GLOSSMAN-MITNIK, 2021).

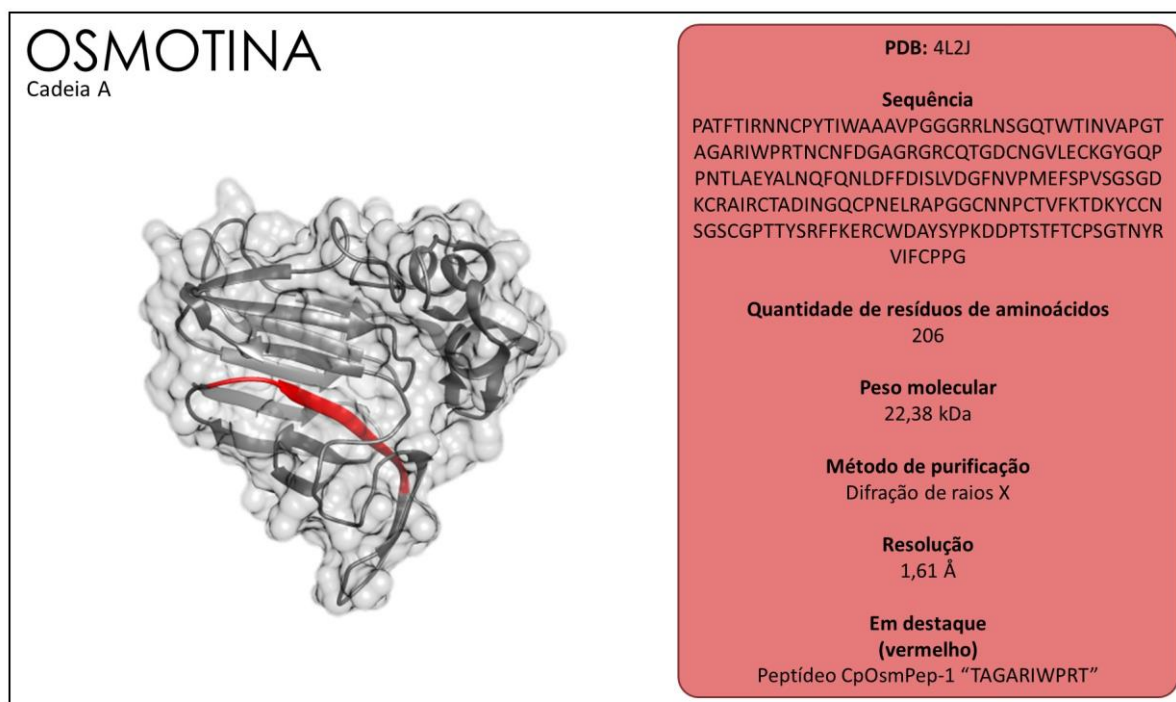
3 RESULTADOS E DISCURSÃO

3.1 SELEÇÃO DOS PEPTÍDEOS COM CARACTERÍSTICAS ANTIBIOFÍLME E PENETRANTE EM CÉLULA

A sequência de aminoácidos correspondentes a cadeia A da Osmotina de *C. procera* está disposta no NCBI sob código PDB 4L2J. A sequência caracterizada como proteína laticífera antifúngica,

teve seu lançamento no banco de dados em novembro de 2017 e possui um total de 206 aminoácidos (Figura 1). Esta proteína pertence à família PR-5 e foi purificada por Freitas *et al.* (2011), que observou a presença de duas isoformas com massa de 22.340 e 22.536 Da e ponto isoelétrico de 8,9 e 9,1 respectivamente. Além disso a proteína obtida demonstrou atividade antifúngica reduzindo a germinação de esporos e o crescimento micelial (FREITAS *et al.*, 2011).

Figura 1: Estrutura tridimensional e informações da Osmotina de *C. procera* resgatada do NCBI



Fonte: próprio autor (2022).

A sequência foi submetida ao dPABB que fez a predição de 738 peptídeos de tamanhos que variaram de 5 a 20 aminoácidos, dentre os quais 37 peptídeos apresentaram atividade antibiofilme. Em uma nova sequência de simulações, esses foram analisados no CellPPD para averiguação de sua capacidade CPC, onde verificou-se que apenas um peptídeo ("TAGARIWPRT") apresentou atividade. Esse foi denominado de peptídeo da Osmotina de *C. procera*. 1 (CpOsmPep-1) (Figura 1). Para a obtenção dos mutantes o CpOsmPep-1 foi ressubmetido ao dPABB e CellPPD para análise de suas possíveis versões, assim como suas respectivas atividades antibiofilme e penetrante em célula. Com isso 3 peptídeos mutantes foram previstos sendo eles denominados de CpOsmPep-1a, CpOsmPep-1b e CpOsmPep-1c (Figura 2, Tabela 1). A nota de corte SVM para a seleção inicial do peptídeo foi 0, dessa forma o peptídeo obtido a partir da sequência da proteína apresenta um valor menor para penetração celular (0,04) e antibiofilme (0,01). Os demais peptídeos previstos através de mutações em CpOsmPep1

apresentaram um valor de score mais elevado, em decorrência da nota de corte que foi aumentada para uma seleção mais precisa dos peptídeos com as possíveis bioatividades (Tabela 1).

Figura 2: Alinhamento da sequência do peptídeo CpOsmPep1 e seus mutantes



Figura 2: Alinhamento dos peptídeos previstos; em verde os aminoácidos alterados nos mutantes de CpOsmPep-1; Fonte: próprio autor (2022).

Tabela 1: Características biológicas, físico-químicas e estruturais dos peptídeos previstos

Nomes	CpOsmPep-1	CpOsmPep-1a	CpOsmPep-1b	CpOsmPep-1c
Sequência	TAGARIWPRT	KAGARIWPRT	TAGARIWPRK	TAWARIWPRT
Físico-químicas				
Ponto Isoelétrico	12	12	12	12
Massa molecular	1128,30 kDa	1155,37 kDa	1155,37 kDa	1257,46 kDa
Carga líquida	+2	+3	+3	+2
Hidrofobicidade	40%	40%	40%	50%
Boman	2,31 kcal/mol	2,61 kcal/mol	2,61 kcal/mol	2,17 kcal/mol
Biodisponibilidade TGI				
Tripsina	Susceptível	Susceptível	Susceptível	Susceptível
Pepsina pH 1,3	Não suscep.	Não suscep.	Não suscep.	Não suscep.
Pepsina pH >2	Não suscep.	Não suscep.	Não suscep.	Susceptível
Quimotripsina	Não suscep.	Não suscep.	Não suscep.	Susceptível
Meia-vida	1.045 seg.	0,779 seg.	1.122 seg.	1.156 seg.
Estabilidade	Alta	Normal	Alta	Alta
Estrutura				
sOPEP modelo 1	-5.88	-6.96	-6.64	-11.50
sOPEP modelo 2	-5.87	-6.71	-6.19	-11.39
sOPEP modelo 3	-5.72	-6.63	-5.79	-11.33
sOPEP modelo 4	-5.66	-6.62	-5.68	-11.31
sOPEP modelo 5	-4.90	-6.59	-5.55	-11.29
Toxicidade				
Alergênico	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Tóxico	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Hemolítico	33%	54%	54%	52%
Atividades				
CPC	Presente (0,04)	Presente (0,29)	Presente (0,27)	Presente (0,23)
Antibiofilme	Presente (0,01)	Presente (0,61)	Presente (0,61)	Presente (0,52)
Antibacteriana	31%	34%	34%	66%

Tabela 1: Características biológicas, físico-químicas e estruturais dos peptídeos previstos; nota de corte definida em 0 para considerar as características CPC e antibiofilme positivas; antibacteriano e hemolítico obtidos em uma escala de 0 a 1 e convertidos em porcentagem para a tabela. Fonte: Próprio autor (2022).

O biofilme é um importante mecanismo de virulência bacteriano que consistem em um agrupado de bactérias envoltos por uma matriz de substância polimérica extracelular que se liga em diversas superfícies orgânicas e inorgânicas (HILL; JAIN; IYENGAR, 2022). A presença deste fator afeta

diretamente o tratamento, uma vez que as concentrações de antibióticos para uma terapia eficaz são aumentadas devido à baixa penetração do fármaco no biofilme (DEMIRCI; YIGIN; DEMIR, 2022). Os PAMs com capacidade de eliminar tal barreira atuam rompendo o potencial de membrana das células circundadas pelo biofilme através de suas porções carregadas negativamente presentes nas paredes de células gram-negativas ou através do ácido lipoteicoico em gram-positivas (HILL; JAIN; IYENGAR, 2022). Atualmente, PAMs com potenciais antibiofilme são estudados em terapias combinadas para uma melhor penetração do antibiótico nas células bacterianas, diminuindo a necessidade aumentar a dose antibiótica, potencializando o efeito antimicrobiano do fármaco e reduzindo a resistência (DURAND; RAOULT; DUBOURG, 2019).

O desenvolvimento de medicamentos que apresentam um sistema eficaz de entrega é um grande desafio, considerado o principal obstáculo para a liberação de um fármaco (KARDANI; BOLHASSANI, 2021). Assim como a capacidade de degradar biofilme, a penetração em células também é amplamente estudada para o carreamento e potencialização do efeito de fármacos (SOUZA *et al.*, 2020; KARDANI; BOLHASSANI, 2021). Em geral os peptídeos com potencial CPC são curtos e podem ser classificados como carregados positivamente, negativamente e anfipáticos e sua penetração pode ser dependente ou independente de energia (KIM; CHEON; LEE, 2021; SHANKAR *et al.*, 2021).

3.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS PEPTÍDEOS

Os peptídeos foram caracterizados quanto a suas propriedades físico-químicas (Tabela 1). O ponto isoelétrico (pI) de todos os peptídeos previstos foi 12 e a carga líquida de +2 para CpOsmPep-1 e CpOsmPep-1c e +3 para CpOsmPep-1a e CpOsmPep-1b. Considerando que o pH homeostático do corpo humano varia de 7,38 a 7,42 os peptídeos apresentam carga líquida positiva em condições fisiológicas humanas (WANG *et al.*, 2021). Na natureza os PAMs podem estar carregados positivamente e negativamente, em geral a atividade antimicrobiana está presente principalmente em peptídeos de carga positiva, esta característica em conjunto com outros aspectos como anfipaticidade concede ao peptídeo afinidade pela parede celular bacteriana (THAKUR *et al.*, 2022). Normalmente PAMs catiônicos apresentam carga líquida variando de +2 a +13, peptídeos de cargas maiores demonstram uma melhor atividade contra bactérias, no entanto a afinidade com eritrócitos também se apresenta elevada, com maior risco de causar hemólise (WEI; ZHANG, 2022; KUMAR; KIZHAKKEDATHU; STRAUS, 2018).

A massa molecular dos peptídeos variou entre 1.128,30 a 1.257,46 kDa. Habitualmente os peptídeos apresentam baixa massa molecular variando entre 1 e 3 kDa, esse atributo eleva a capacidade dos peptídeos de se inserirem em membranas lipídicas e dificulta a hidrólise por proteases (AMIRI *et al.*, 2021). A proporção total de hidrofobicidade foi de 40% para CpOsmPep-1, CpOsmPep-1a e CpOsmPep-1b e de 50% para CpOsmPep-1c, essa é uma importante característica para os peptídeos e sua presença influencia na capacidade de ligação com membranas celulares. Comumente os PAMs são compostos por até metade de resíduos hidrofóbicos (50%), peptídeos com baixa hidrofobicidade

apresentam capacidade de ligação baixa com membranas, em contraponto a alta quantidade de aminoácidos hidrofóbicos podem levar o aumento da dimerização e consequentemente a diminuição da atividade antimicrobiana, em alguns casos (THAKUR *et al.*, 2022; WEI; ZHANG, 2022; AMIRI *et al.*, 2021).

O índice de Boman (iB) proposto em 2003 por Hans G. Boman surgiu com o intuito de trazer um denominador comum para os PAMs, antes de sua ideia as características mais aceitas para considerar um peptídeo como antimicrobiano eram a carga líquida positiva e a presença de uma região anfipática, contudo estes critérios são gerais e englobam outros grupos de peptídeos (BOMAN, 2003). O iB é uma estimativa baseada na soma da solubilidade dos resíduos de aminoácidos presentes em uma sequência, com isso é possível obter uma estimativa do potencial de ligação de um peptídeo a proteínas (Wang & Wang, 2016). Os peptídeos testados neste estudo apresentaram iB de 2,31 kcal/mol e 2,17 kcal/mol para os peptídeos CpOsmPep-1 e CpOsmPep-1c sendo considerados intermediários, enquanto CpOsmPep-1a e CpOsmPep-1b apresentaram um valor igual de 2,61 kcal/mol, classificado como alto. Este resultado fornece uma estimativa geral do potencial de um peptídeo para se ligar a outras proteínas, quanto maior o valor do índice maior é o número de interações dentro de uma célula (AZAD; HUTTUNEN-HENNELLY; FRIEDMAN, 2011; BOMAN, 2003).

3.3 PROTEÓLISE E ESTABILIDADE EM AMBIENTE GASTROINTESTINAL

Todos os peptídeos testados apresentaram sítios de hidrólise da Tripsina, CpOsmPep-1 e CpOsmPep-1c podem ser clivados nos aminoácidos 5 e 9, CpOsmPep-1a em 1, 5 e 9 e CpOsmPep-1b em 5, 9 e 10 (Tabela 1). As regiões que sofrem ação da tripsina são constituídas por Arginina e lisina, essa enzima tem afinidade para estes dois aminoácidos e os quebra na região c-terminal. (YAP; GAN, 2020; SOUZA *et al.*, 2020). A pepsina em pH ideal (1,3) não demonstrou afinidade por nenhum dos peptídeos testados, no entanto em pH > 2 apontou afinidade para os aminoácidos 2 (Alanina) e 3 (Triptofano) de CpOsmPep-1c. Enquanto a Quimotripsina pode atuar no aminoácido 3 do mesmo peptídeo. Apesar de terem demonstrado afinidade por alguns aminoácidos presentes nos peptídeos, vale ressaltar que o método de estudo engloba principalmente a afinidades teóricas entre enzimas e aminoácidos excluindo fatores como a morfologia das moléculas. A maioria das enzimas digestivas são mais eficientes em quebrar proteínas em comparação peptídeo, devido ao seu tamanho que interfere no encaixe ao sítio de clivagem (SOUZA, 2020).

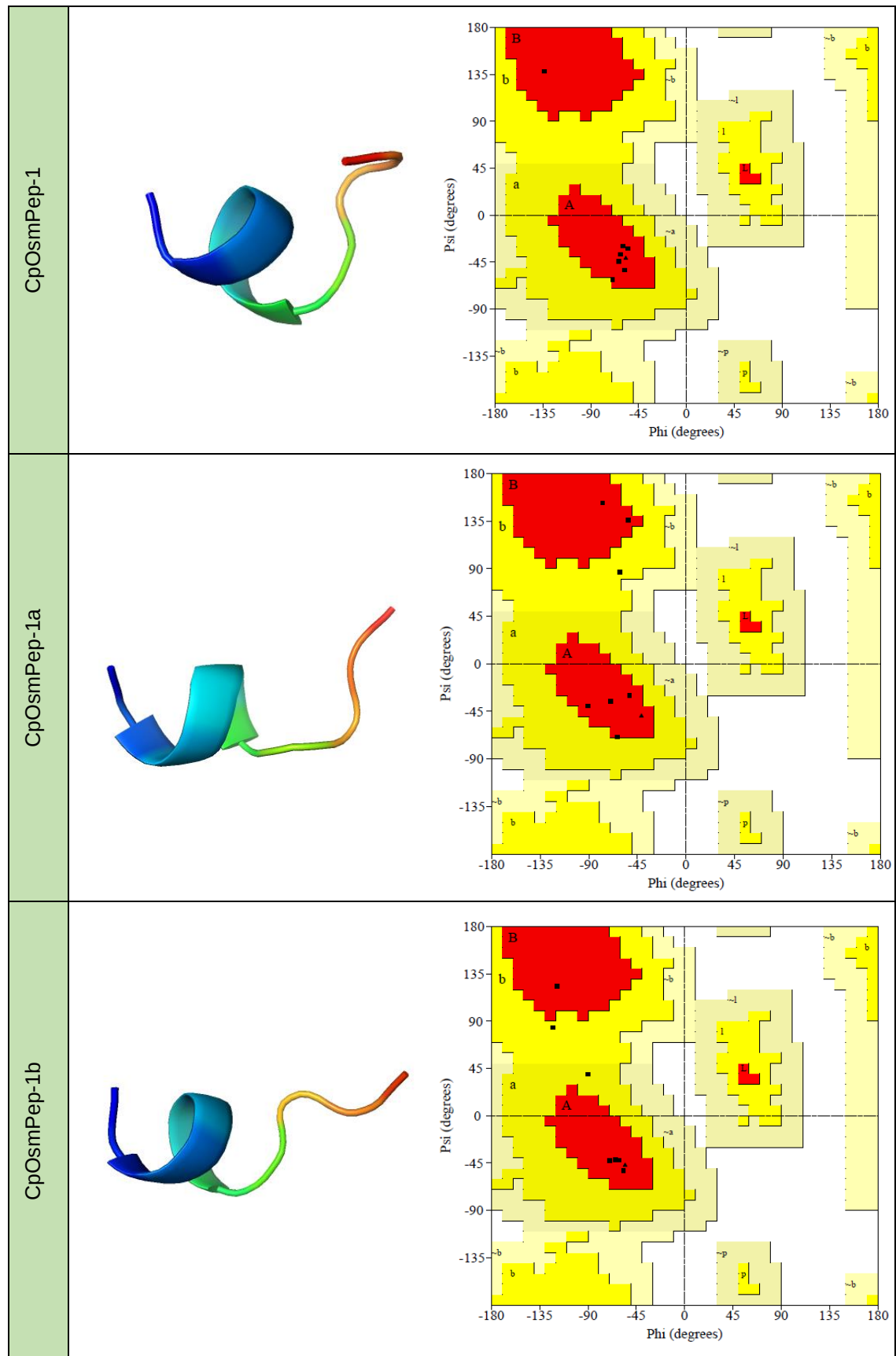
Em decorrência da baixa biodisponibilidade oral dos peptídeos, a maioria dos estudos são voltados para administração parenteral, contudo dependendo das circunstâncias tal forma de aplicação pode gerar desconforto para o paciente, o que leva a baixa adesão do uso da droga, principalmente quando usados em ambientes extra-hospitalar. Em vista disso a administração oral se torna uma via de maior aceitabilidade por proporcionar ao paciente uma melhor experiência (KLEPACH *et al.*, 2022). Com isso diversos meios para otimizar a entrega e absorção de peptídeos vem sendo desenvolvidos, como moduladores de permeação que atuam facilitando a passagem dos PAMs pelas células epiteliais,

através da via paracelular e/ou intracelular. Outro meio é a modulação do pH que tem como princípio a modificação do pH intestinal para que as enzimas proteolíticas percam sua estabilidade, outros métodos de incorporação do peptídeo a hidrogéis, mucoadesivos, cápsulas e outros também se demonstraram promissores (DRUCKER, 2019; DUBEY *et al.*, 2021). A característica penetrante em célula também é um fator importante para a absorção de peptídeos, a capacidade de translocação de membrana facilita a entrada dos PAMs nas células (NIU *et al.*, 2017; DRUCKER, 2019).

3.4 ANÁLISES ESTRUTURAIS DOS PEPTÍDEOS SELECIONADOS

A energia sOPEP dos cinco melhores modelos de cada peptídeo estão apresentadas na (Tabela 1). O gráfico de Ramachandran foi aplicado para análise da geometria dos modelos obtidos através do PEP-FOLD, essa representação utiliza os ângulos de ligação ϕ (phi) e ψ (psi) da cadeia principal para determinar o quão favorável é a estrutura. Tal metodologia é amplamente utilizada na validação de modelos tridimensionais, com isso, o melhor modelo de cada peptídeo foi selecionado pela maior presença de aminoácidos em regiões favoráveis à sua geometria (AGNIHOTRY *et al.*, 2022). O modelo 2 foi escolhido para CpOsmPep-1 pois apresentou 100% dos seus aminoácidos em regiões favoráveis, o mesmo foi observado para o modelo 3 de CpOsmPep-1a, já CpOsmPep-1b teve o seu modelo 1 como mais favorável e apresentou 83,3% de seus aminoácidos dentro da região favorável e 16,7% em regiões permitidas, por fim o peptídeo CpOsmPep-1c também teve o seu modelo 1 escolhido e apresentou 85.7% de seus resíduos em regiões favoráveis e 14.3% em regiões permitidas (Tabela 1, Figura 3).

Figura 3: Previsão da estrutura tridimensional dos peptídeos e seu gráfico de Ramachandran



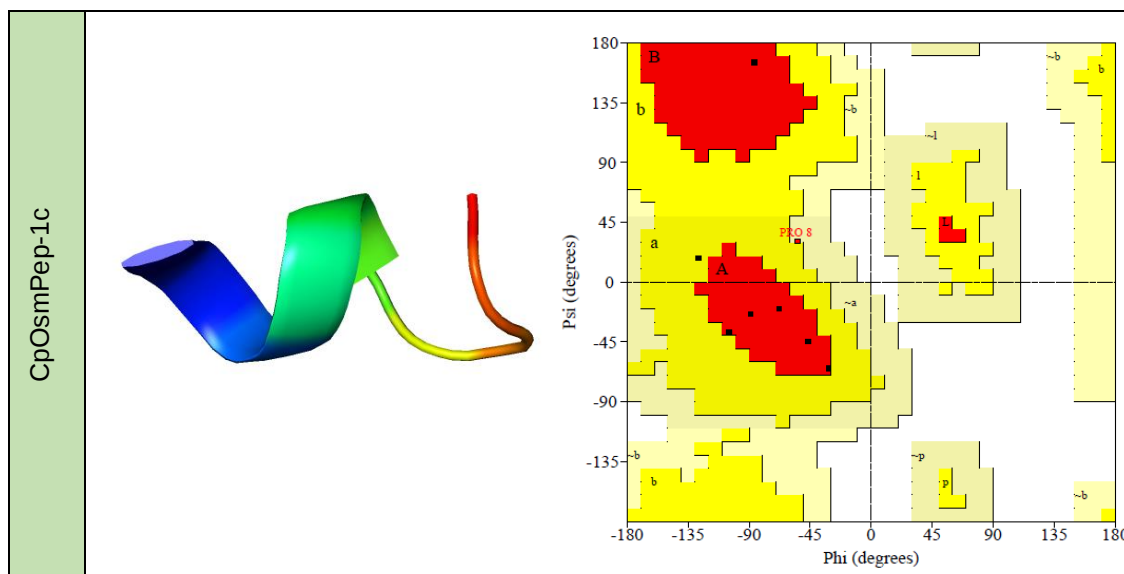


Figura 3: Previsão tridimensional dos peptídeos; gráfico de Ramachandran, as áreas em branco representam regiões desfavoráveis, as áreas amarelas e bege representam regiões permitidas e pouco prováveis, por fim as áreas vermelhas correspondem a regiões favoráveis.

3.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ALERGÊNICO, TÓXICO E HEMOLÍTICO

Explorar o potencial alergênico de substâncias terapêuticas é fundamental para o desenvolvimento de um fármaco, respostas de hipersensibilidade imunológica podem causar diversas reações indesejadas que se muito intensas podem levar a morte (YAP; GAN, 2020). Os peptídeos testados neste estudo não apresentaram determinantes antigênicos na sequência. PAMs alérgenos possuem epítomos que são reconhecidos por anticorpos imunoglobulina E (IgE) que levam a ativação de mastócitos por reticulação de IgE ligada ao receptor FcεRI, a ausência de característica alérgênicas nos peptídeos testados podem inferir na falta desses epítomos (KUBO, 2018; YAP; GAN, 2020). Os peptídeos também não demonstraram toxicidade através da análise por SVM na ferramenta ToxinPred. A presença de toxicidade em PAMs pode ocorrer em diferentes níveis como membranar, celular e sistêmico, sendo o primeiro mais comum devido a tenuousidade entre características da membrana celular de mamíferos e bactérias (LIMA *et al.*, 2022; YAP; GAN, 2020).

O potencial hemolítico foi medido em uma escala de probabilidade que vai de 0 a 1, os resultados obtidos para os peptídeos testados foram de 33% (CpOsmPep-1), 54% (CpOsmPep-1a e CpOsmPep-1b) e 52% (CpOsmPep-1c). Fatores físico-químicos como hidrofobicidade, carga líquida positiva e estrutura secundária estão intimamente associados a presença desta toxicidade, pois concedem aos PAMs uma maior afinidade a membranas lipídicas negativamente carregadas. Devido a isso, CpOsmPep-1 apresentou a menor probabilidade de ser hemolítico, pois possui uma combinação de características como carga (+2) e hidrofobicidade (40%), o que difere do arranjo presente em CpOsmPep-1b e CpOsmPep-1c que apesar de possuírem mesma hidrofobicidade que CpOsmPep-1 tiveram uma carga de +3, já CpOsmPep-1c manteve a mesma carga que CpOsmPep-1, no entanto sua hidrofobicidade foi de 50% (KUMAR; KIZHAKKEDATHU; STRAUS, 2018; LIMA *et al.*, 2022).

Utilizando a mesma ferramenta que este estudo, Souza *et al.* (2020) avaliou o potencial hemolítico *in silico* de dois PAMs, PepGAT e PepKAA e descobriu que a probabilidade de serem hemolíticos era de 50% e 40% respectivamente, além disso apresentaram carga líquida de +2 e +3 na mesma ordem e hidrofobicidade de 40% para os dois PAMs, seguindo seus estudos os mesmos peptídeos também foram avaliados *in vitro* utilizando hemácias de coelho durante 1 hora a 37 °C e não foi observado hemólise mesmo em concentrações 10 vezes maiores do que a concentração antibacteriana. Diante da semelhança das características físico-químicas dos PAMs estudados neste trabalho com os estudados por Souza *et al.* (2020) espera-se observar uma baixa ação hemolítica *in vitro* para os PAMs desse estudo..

3.6 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A análise feita pelo iAMPpred mostrou que a probabilidade de os peptídeos apresentarem atividade antimicrobiana era de 31% para CpOsmPep-1, 34% para CpOsmPep-1a e CpOsmPep-3 e 66% para CpOsmPep-1c (Tabela 1). As análises comparativas feitas pelo APD3 mostraram que CpOsmPep-1 e CpOsmPep-1b apresentaram 40% de similaridade com o peptídeo Carnocin UI49 isolado de *Carnobacterium piscicola* UI49 e depositado no APD sob ID AP00995, este demonstrou atividade antibacteriana contra bactérias Gram positivas e negativas. O CpOsmPep-1a apresentou similaridade de 40% com o AMP SyCPA 63 advindos de *Bacillus thuringiensis* e sob ID AP03317, este apresenta atividade contra Gram positivas, negativas e *S. aureus* Resistente à Meticilina (CHU *et al.*, 2020).

Além de ter obtido o maior valor preditivo para atividade antimicrobiana, CpOsmPep-1c também obteve maior quantidade de moléculas similares, sugerindo presença de características comuns a PAMs. O peptídeo P14a disposto sob o ID AP02938 foi obtido da microbiota ruminal de plantas e apresentou 42,86% de semelhança, este expressou ação contra bactérias Gram negativas (OYAMA *et al.*, 2017). Um outro peptídeo similar foi o P23 de ID AP02951, que também foi isolado a partir da microbiota ruminal de plantas e tem sua atividade voltada para Gram negativas. O peptídeo IDR-1010 apresentou 38,46% de similaridade, sua atividade bactericida foi positiva contra cepas Gram positivas e negativas, além disso verificou-se que o peptídeo possui capacidade de suprimir a indução de citocinas pró-inflamatórias mediada por lipopolissacarídeo (LPS) em 94%, também foi capaz de proteger camundongos contra infecção invasiva de *S. aureus* (GAO *et al.*, 2012).

Dias *et al.* (2020) conduziu estudos utilizando dois peptídeos sintetizados a partir da albumina 2S das sementes de *Ricinus communis*, os PAMs Rc Alb-PepI e Rc Alb-PepII presentes no estudo, tiveram sua característica antibacteriana prevista pelo iAMPpred, obtendo os resultados de 78% e 80% respectivamente, em seguida, este potencial foi validado *in vitro* frente a *E. coli*, *K. pneumoniae* e *S. aureus* e ambos os peptídeos foram eficazes na inibição destas cepas. Outro trabalho desenvolvido por Lugo *et al.* (2019) utilizando a mesma ferramenta, purificou um peptídeo de *Clarias gariepinus*, este obteve a probabilidade de 79% para atividade antibacteriana, em estudos de bancada o peptídeo foi capaz de inibir *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Salmonella sp.* e outras bactérias não

patogênicas. Tais estudos obtiveram moléculas com valores de previsão similares a CpOsmPep-1c e se provaram positivos frente a estudos *in vitro*, servindo como bons indicativos de uma previsão de atividade bacteriana assertiva.

3.7 DOCKING MOLECULAR

Por ter demonstrado características físico-químicas sugestivas para um AMP e maior probabilidade de atividade antibacteriana, o peptídeo CpOsmPep-1c foi escolhido para análise de suas interações moleculares com alvos antibacterianos.

3.7.1 Docagem molecular com a proteína UDP-N-acetilenolpiruvilglucosamina redutase de *S. aureus* (MurB)

A flavoproteína UDP-N-acetilenolpiruvilglucosamina redutase de *S. aureus* (MurB) (PDB: 1HSK) pertence à família de proteínas de ligação a flavina-adenina dinucleotídeo (FAD) e é composta por 369 resíduos de aminoácidos distribuídos em três domínios. Dentre eles, o domínio I (resíduos 14-98) e II (resíduos 101-229) estão associados a ligação com o cofator FAD e o domínio III (resíduos 230-316) liga-se ao substrato enzimático UDP-N-acetilenolpiruvilglucosamina e ao NADP⁺ (BENSON *et al.*, 2001). A proteína é uma das enzimas essenciais para a síntese de peptidoglicano durante a etapa citoplasmática, devido a reação sequencial de atuação das enzimas MurA, MurB, MurC, MurD, MurE, MurF e MurG. A participação de MurB consiste em uma reação enzimática catalisada que reduz a UDP-N-acetilenolpiruvilglucosamina em ácido UDP-N-acetilmurâmico, por meio de um processo de duas etapas, sendo a primeira a redução de FAD em FADH₂ através da molécula NADPH e a segunda consiste em uma transferência dos elétrons de FADH₂ para UDP-N-acetilenolpiruvilglucosamina (GRILO, 2021).

Diversos antibióticos de atuação na integridade da parede celular bacteriana são direcionados para alvos citoplasmáticos, agindo na montagem e/ou interrompendo a biossíntese. Com isso, a MurB se torna um alvo interessante para atuação de antibacterianos pois sua inibição interrompe a biossíntese citoplasmática de peptidoglicano (NISHIDA *et al.*, 2006). A análise da estrutura ancorada com CpOsmPep-1c previu que o peptídeo demonstrou afinidade para duas regiões da proteína MurB (Figura 4). A primeira posição de ligação está destacada em azul, tal interação ocorreu em uma área promissora, pois localiza-se próximo aos sítios de ligação do substrato e do cofator, entretanto a segunda posição destacada em vermelho encontra-se localizada em uma região um pouco mais desfavorável para intervenção sobre o alvo, contudo mantêm interações próximas a região ativa (BENSON *et al.*, 2001).

Figura 4: Docagem molecular com a proteína MurB de *S. aureus*

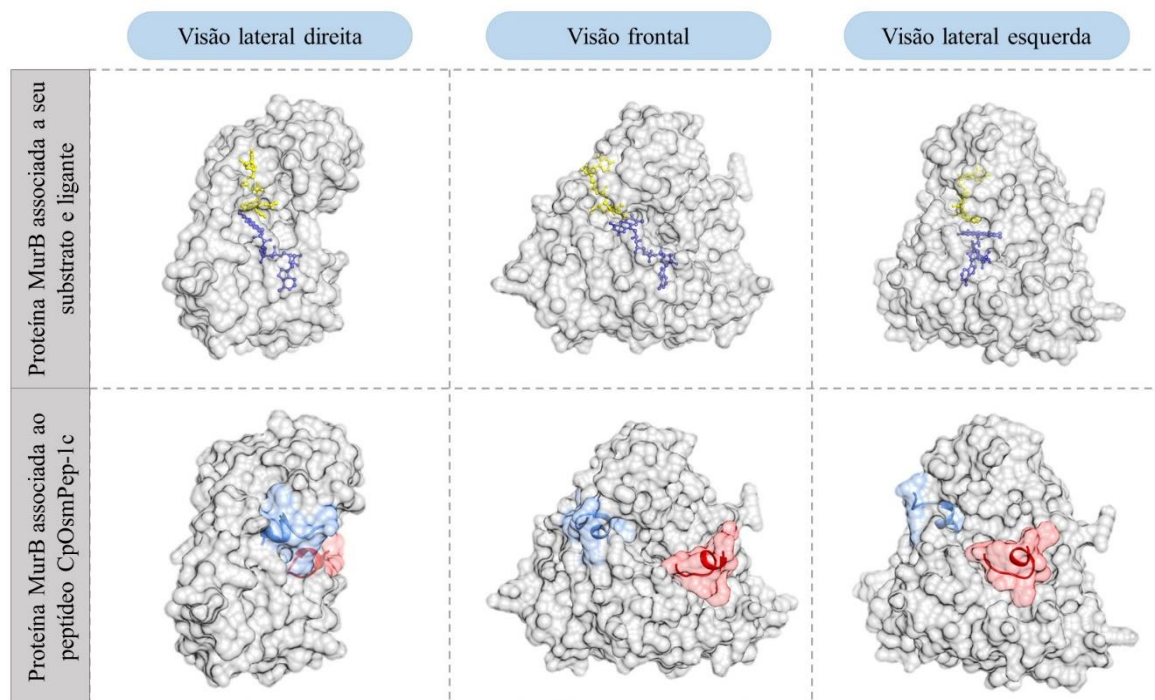


Figura 4: Face direita, frontal e esquerda da proteína MurB associada a seu substrato UDP-N-acetilolpiruvilglucosamina (amarelo) e ao seu cofator FAD (azul) nas seções superiores e associada ao peptídeo CpOsmPep-1c na posição 1 (azul) e posição 2 (vermelho) nas seções inferiores. Fonte: Próprio autor (2022).

Investigando as interações feitas por CpOsmPep-1c na posição 1 evidenciou-se que o peptídeo interagiu através de pontes de hidrogênio convencionais com os resíduos ASN83, GLU158, ARG188, SER238, ARG242, HIS271, também interagiu com ARG188 e ARG255 por meio de ligações desfavoráveis positiva-positiva, com HIS271 e PHE274 por intermédio de ligação pi-alkI e com GLY153 por meio de pontes salinas. Tais aminoácidos, estão presentes nos três domínios da proteína. As interações com ARG 188, HIS271, ARG242 e SER 238 constituem possíveis sítios de ligação ao substrato, próximo a esses resíduos encontram-se TYR187 que também é um importante componente do sítio ativo. Outro contato atrativo entre as moléculas nesta posição foi com os resíduos ARG225 e ASN83 que interagem com o cofator. Tais observações sugerem que o peptídeo CpOsmPep-1c pode impedir por competição a ligação do substrato e do cofator com o sítio alvo de MurB de forma estável, pois nos dois sítios foram observadas ligações de hidrogênio que garantem maior resistência a ligação do peptídeo (Figura 5) (BENSON *et al.*, 2001; NISHIDA *et al.*, 2006).

Quando ligado a posição 2, o peptídeo CpOsmPep-1c apresentou interações através de pontes de hidrogênio com TYR149, HIS196, ARG310 e GLY313 (Figura 5). Os resíduos estão bem próximos do sítio ativo e compõem o domínio II, responsável pela ligação do cofator, e domínio III que interage com substrato. A ligação com o aminoácido ARG310 indica que o peptídeo interage com um resíduo ligante do cofator, além disso outras associações observadas fazem vizinhança com o resíduo VAL199

que também é um ligante do cofator. As interações observadas na posição 2 sugerem maior probabilidade de atuar inibindo a ligação do cofator a MurB, contudo apesar de não demonstrar ligações diretas com resíduos atuantes na interação da proteína com seu substrato, ainda foi possível notar interações próximas a este sítio ativo, com isso essa posição carece de mais estudos pois pode interferir nessa interação por ocupar o espaço destinado ao substrato (BENSON *et al.*, 2001; NISHIDA *et al.*, 2006).

Figura 5: Interações moleculares com MurB de *S. aureus*

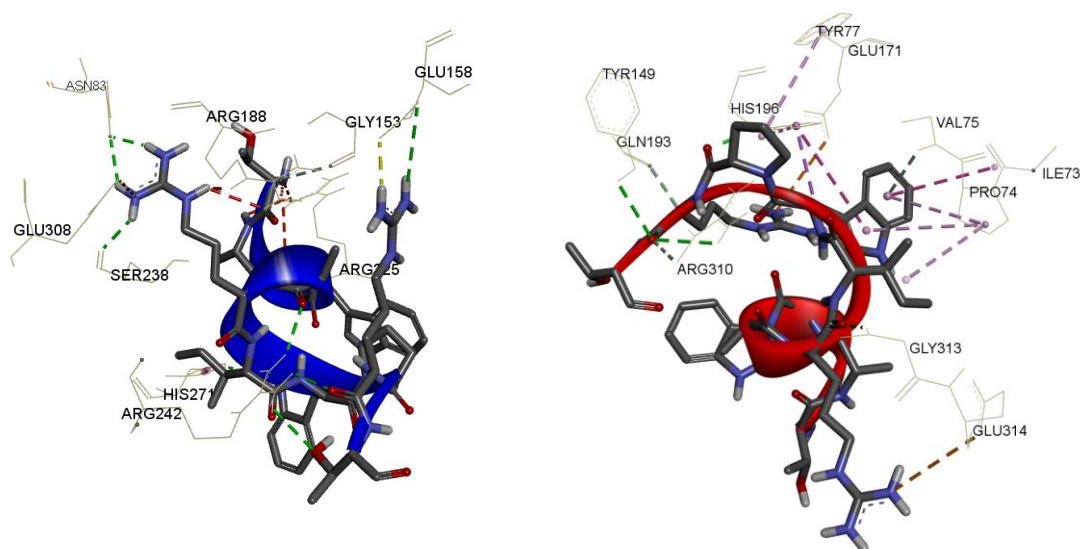


Figura 5: Mapa farmacofórico 3D da interação de CpOsmPep-1c na posição 1 (azul) e posição 2 (vermelho) com MurB. Os traços representam ligações: pontes de hidrogênio (verde); pontes carbono-hidrogênio (verde claro); carga atrativa (laranja); desfavoráveis positivo-positivo ou doador-doador (vermelho vivo); pi-doador (Azul); pi-anion (azul marinho); akil (rosa); pi-akil (roxo); pi-sigma (vermelho escuro). Fonte: Próprio autor (2022).

3.7.2 Docagem molecular com a enzima Tirosil-trna sintetase de *S. aureus*

A Tirosil-tRNA sintetase é uma enzima pertencente à família aminoacil-tRNA, essas são enzimas-chave para atuação de antibióticos pois são responsáveis por catalisar a transferência de aminoácidos para seus respectivos tRNAs durante o processo de síntese proteica (VAN *et al.*, 2017). A tirosil-tRNA sintetase exerce sua função em dois estágios, o primeiro deles acontece a partir do reconhecimento e ativação da tirosina por meio de reação com ATP para gerar um adenilato de tirosila, em seguida a transferência da tirosina é catalisada para formação do tRNA (WEI *et al.*, 2015; BROWN *et al.*, 2001). Os motivos que conferem a esta proteína um alvo para antibióticos envolvem sua alta conservação entre os procariotos e a diferença dessa proteína para proteínas de mesma função em eucariotos (VAN *et al.*, 2017; SUN; LV; ZHU, 2017).

Foi observado que o peptídeo CpOsmPep-1c interagiu com a tirosil-tRNA sintetase de *S. aureus* em três regiões diferentes (Figura 6). A posição 1 (peptídeo em lilás) está parcialmente inserida no sítio de ligação da tirosina. Essa interação envolveu-se por pontes de hidrogênio os aminoácidos LYS84,

VAL224, PHE232 e GLY233, além dessa foi observado interações pi-akil nos resíduos LYS84, LEU223, LYS234, ALA239 e TRP241, pi-anion em ASP195, pi-sigma em HIS47 e pi-doador para os aminoácidos LYS226 e PHE232 (Figura 7). Nas posições 2 e 3 representadas em amarelo queimado e vermelho, respectivamente, não podem ser consideradas como inibidores até o presente estudo, pois não há evidências claras da atuação dessas regiões no desempenho da atividade da proteína (Figura 6).

Figura 6: Ancoragem molecular com Tirosil-tRNA sintetase de *S. aureus*

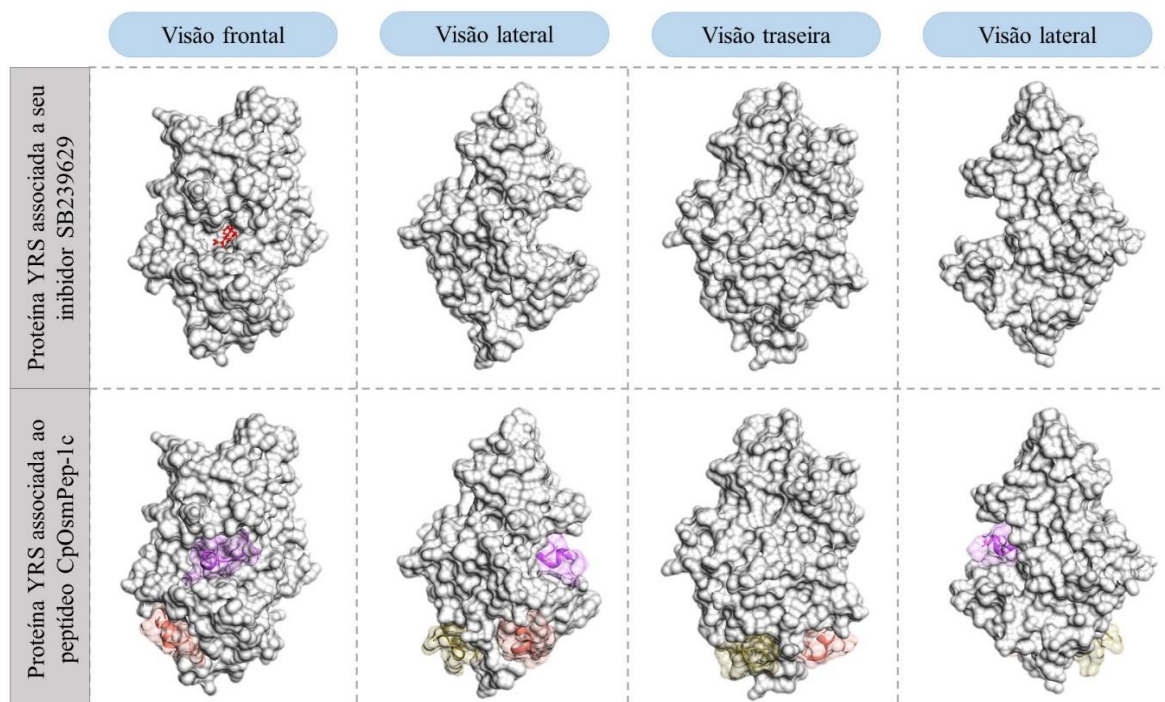


Figura 6: Faces frontal, dianteira e laterais da proteína Tirosil-tRNA sintetase; na parte superior é possível observar a proteína com seu inibidor SB239629; na parte inferior estão dispostos nas cores marrom claro, lilás e vermelho os locais de ligação do peptídeo CpOsmPep-1c com a proteína.

O local de ligação apresentado por CpOsmPep-1c foi similar aos inibidores análogos SB-219383, SB-239629, SB-243545 e SB-284485, esses atuam de forma seletiva para tirosil-tRNA de bactérias, no entanto as análises apontaram que o peptídeo está localizado em uma área mais externa se comparado aos inibidores, de maneira que a molécula parece ocupar a via de acesso ao sítio ligante. Comparado as interações dos inibidores com o peptídeo, foi notado que o peptídeo apresenta ligações próximas aos aminoácidos alvos ASP194 e HIS48 de SB-219383, e quando comparado a SB-239629 o peptídeo CpOsmPep-1c dividiu o sítio de ligação em ASP195 (Figura 7). Tanto as análises comparativas com outros inibidores, quanto a análise visual, inferem em uma possível atuação de CpOsmPep-1c pela interação ao sítio ou bloqueio de acesso a ele (QIU *et al.*, 2001; FOUDAH *et al.*, 2022; SUN; LV; ZHU, 2017).

Figura 7: Interações moleculares com Tirosil-tRNA sintetase de *S. aureus*

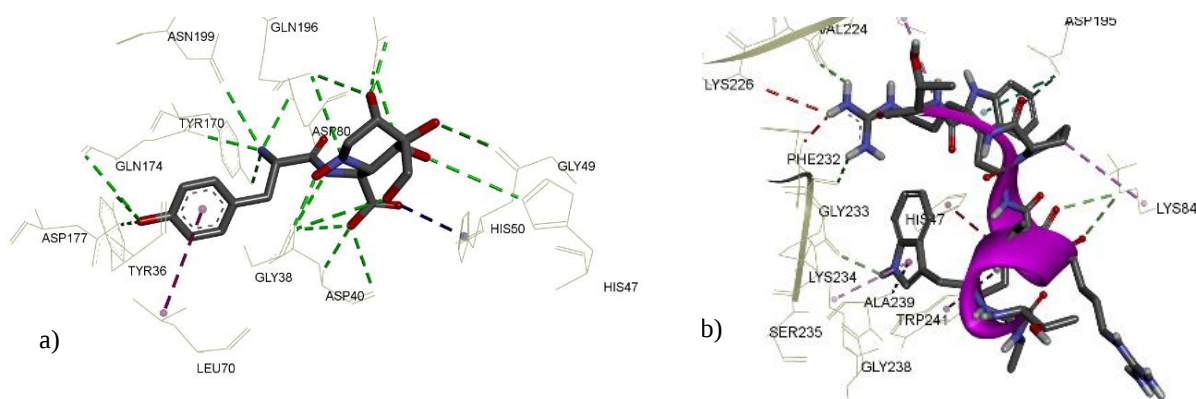


Figura 7: Mapa farmacofórico 3D da interação de SB-239629 (a) e CpOsmPep-1c (b) com YRS. Os traços representam ligações: de pontes de hidrogênio (verde); pontes carbono-hidrogênio (verde claro); carga atrativa (laranja); desfavoráveis positivo-positivo ou doador-doador (vermelho vivo); pi-doador (Azul); pi-anion (azul marinho); akil (rosa); pi-akil (roxo); pi-sigma (vermelho escuro). Fonte: Próprio autor (2022).

3.7.3 Docagem molecular com RbmA DE *V. cholerae*

A RbmA é uma proteína de dois domínios organizada em dímero que possui 26,4 kDa, sua função está associada a manutenção da estrutura da colônia e do biofilme, sua ausência ocasiona em uma maior fragilidade do biofilme deixando-o susceptível a ação de detergentes. Além disso a RbmA atua como intermediador no contato célula-célula e biofilme-célula, tal função está associada a retenção de células filhas após a divisão (GIGLIO *et al.*, 2013; MAESTRE-REYNA; WU; WANG, 2013). CpOsmPep-1c demonstrou afinidade para oito regiões de RbmA, sendo seis desses representados em amarelo, vermelho, laranja, rosa, lilás e azul claro ligados a interface do sulco estreito localizado entre os dímeros, enquanto duas delas roxo e azul, se ligaram ao suco largo da proteína (Figura 8).

Figura 8: Ancoragem molecular com RbmA de *V. Cholerae*

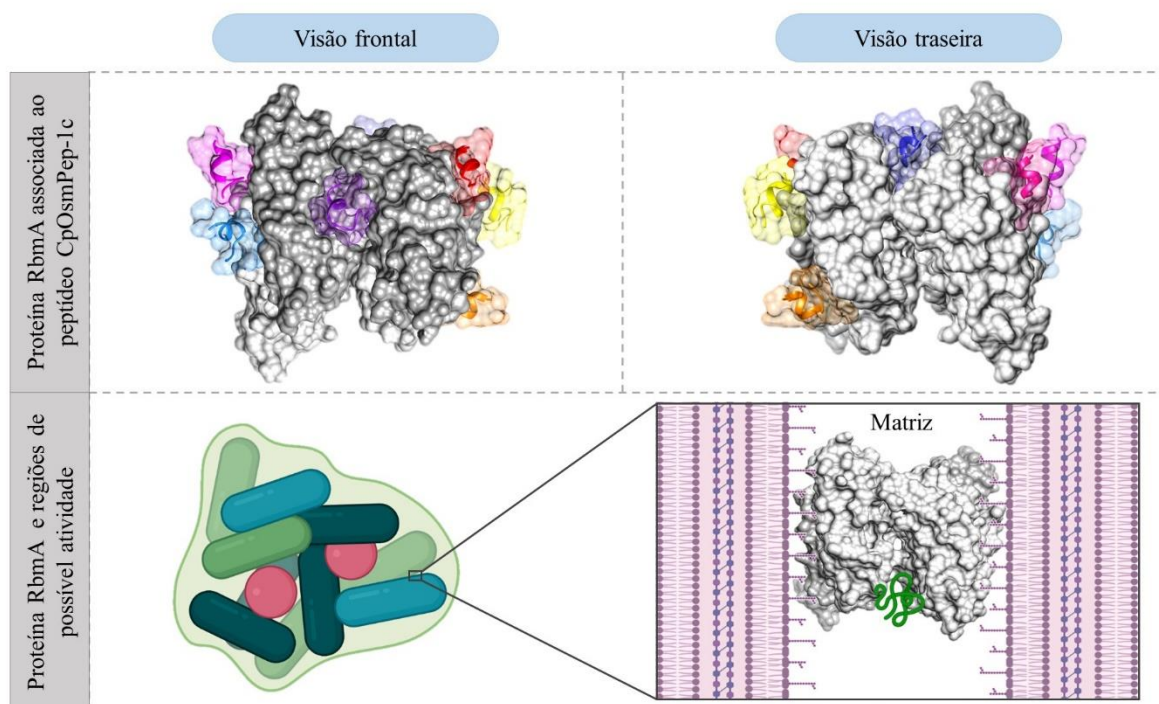


Figura 8: Locais de ligação do CpOsmPep-1c na proteína RbmA representados na parte superior; mecanismo proposto para atuação e interação de RbmA no biofilme na parte inferior. Fonte: próprio autor (2022).

Apesar de seu importante papel para a integridade do biofilme, essa proteína ainda não se encontra com suas ligações bem delimitadas, contudo os modelos de interações sugerem que a proteína RbmA realize o contato célula-célula através do seu sulco estreito que por possuir ranhuras de carga positiva, atrairia a parede celular bacteriana de carga negativa. A ligação do peptídeo a esta região pode inferir em um mau encaixe da proteína na superfície celular, levando a diminuição ou a perda da dessa capacidade de ligação. A outra região onde CpOsmPep-1c se associou exerce a função de se ligar a filamentos como polissacarídeos o que compete a sua função de ligação biofilme-célula (MAESTRE-REYNA; WU; WANG, 2013).

3.8 PERFIL ADMET DE CpOsmPep-1c

Seguindo os mesmos motivos que levaram a escolha de CpOsmPep-1c para analisar suas interações moleculares o peptídeo também foi testado frente a seu perfil ADMET. Os resultados referentes ao perfil ADMET de CpOsmPep-1c estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Perfil ADMET de CpOsmPep-1c

	Nome do modelo	Valor previsto
A	Absorção	
	Absorção intestinal (humana)	0%
	Permeabilidade CaCo-2	-0,957 log Papp em 10 cm/s
	Substrato de glicoproteína-P	Sim
	Inibidor de glicoproteína-P I	Não
	Inibidor de glicoproteína-P II	Não
	Permeabilidade da pele	- 2,735 log Kp
D	Distribuição	
	Penetração da barreira hematoencefálica	-3,07 log BB
	Permeabilidade do SNC	-6757 log PS
	VDss (humano)	-0,392 log L/kg
	Fração não vinculada (humana)	0,393 Fu
M	Metabolismo	
	Substrato de CYP2D6	Não
	Substrato de CYP3A4	Sim
	Inibidor de CYP1A2	Não
	Inibidor de CYP2C19	Não
	Inibidor de CYP2C9	Não
	Inibidor de CYP2D6	Não
	Inibidor de CYP3A4	Não
E	Excreção	
	Liquidação total	0,262 log (ml/min/kg)
	Tempo de meia vida	2:06 h
	Substrato renal OCT2	Não
T	Toxicidade	
	Inibidor de hERG I	Não
	Inibidor de hERG II	Sim
	Hepatotoxicidade	Sim
	Nefrotoxicidade	Não
	Sensibilização da pele	Não
	Corrosão ocular	Não
	Irritação ocular	Não
	Toxicidade AMES	Não
	Dose máxima tolerada (humano)	0,439 log mg/kg/dia

Fonte: Próprio autor (2022).

3.8.1 Absorção

As análises preditivas mostraram que CpOsmPep-1c não é absorvido pelo trato gastrointestinal, além disso também foi observado baixa permeabilidade para células CaCo-2. Como citado acima o ambiente oral é um desafio para a terapêutica peptídica que sofre da estabilidade à absorção. Estudos já mostraram que cadeias de peptídeos compostas por mais de quatro aminoácidos são drasticamente menos absorvidas (BOSE *et al.*, 2010). A linhagem de células CaCo-2 advém de células epiteliais de adenocarcinoma colorretal humano, devido a sua capacidade de formar junções apertadas, esse tipo celular é comumente utilizado para averiguação *in vitro* da permeabilidade de moléculas por via oral, contudo este modelo é mais específico para moléculas menores e que estejam dentro da “Regra de cinco” proposta por Lipinski, o que não é o caso dos peptídeos (DRUCKER, 2019; CUI *et al.*, 2021; KLEPACH *et al.*, 2022).

A glicoproteína-P é uma proteína de membrana de amplo espectro que é expressa em múltiplos locais do corpo como rins, fígado, intestino e outros, sua função está relacionada com o efluxo de substâncias nocivas, devido a esse caráter protetor no organismo essa proteína encontra-se bastante correlacionada com a biodisponibilidade de fármacos (ANAYA *et al.*, 2020). O peptídeo CpOsmPep-1c apresentou ser ativo como substrato e inativo como inibidor, sugerindo que o peptídeo sofre ação da proteína impactando negativamente sua biodisponibilidade oral (ANAYA *et al.*, 2020). As previsões também forneceram análise do potencial de permeabilidade da pele, o peptídeo CpOsmPep-1c demonstrou ser capaz de atravessar a barreira transdérmica ($<-2,5 \log kp$), tal capacidade está intimamente associada a eficácia de penetração celular (HORN; NEUNDORF, 2018). Esta via de entrega é indolor, não invasiva, prática e de boa adesão para o paciente (LEE; PARK; KIM, 2017). Peptídeos que apresentam essa característica penetram a matriz intracelular e aumentam a permeabilidade dos corneócitos da camada externa da epiderme, devido a isso são amplamente utilizados como intensificadores de penetração (HORN; NEUNDORF, 2018; PEREIRA *et al.*, 2021).

3.8.2 Distribuição

As previsões apontam que CpOsmPep-1c apresenta baixa capacidade de penetração na barreira hematoencefálica (>3 : atravessa a barreira hematoencefálica, <-1 : mal distribuído para o cérebro), além disso os resultados de permeabilidade do Sistema Nervoso Central (SNC) apontaram que CpOsmPep-1c não adentra no SNC (>-2 : penetrante no SNC, <-3 : não penetrante).

A barreira hematoencefálica corresponde a uma estrutura de proteção neural. Sua permeabilidade é seletiva para compostos pequenos e hidrofóbicos, além disso sua estrutura composta por células epiteliais especializadas e de junções firmes tendem a impedir a passagem passiva de moléculas (CAI *et al.*, 2018; LANGEN; AYLOO; GU, 2019). Essa baixa penetração no SNC é comumente observada em drogas peptídicas, pois são moléculas consideravelmente maiores se comparado a outros fármacos e que utilizam principalmente a difusão passiva para adentrar nas células, além de que a seletividade para compostos hidrofóbicos é um problema para PAMs que tem sua

atividade antibacteriana bastante influenciada pela sua característica anfifílica. Contudo tal fator é limitante principalmente para drogas de atuação no SNC, em caso de fármacos que não tem essa região como alvo, essa característica é interessante pois evita toxicidade (MENDONÇA *et al.*, 2021).

O volume de distribuição em estado estacionário (VDss) direciona a dose necessária de um fármaco para que haja uma disposição homogênea no plasma, valores mais elevados desse parâmetro predizem uma distribuição maior da droga nos tecidos, enquanto valores mais baixos indicam predisposição para se manter no plasma. A fração não vinculada informa o estado de ligação do fármaco a proteínas plasmáticas, o grau de ligação pode afetar a eficiência do fármaco pois quanto mais o fármaco estiver ligado menos propenso a atravessar membranas e se distribuir para os tecidos adjacentes. O peptídeo apresentou um baixo VDss ($< -0,15$: baixo e $> 0,45$: alto), além disso também foi observado que a fração não vinculada do peptídeo corresponde a 39%, ou seja mais de 60% da molécula estará associada a proteínas plasmáticas, essa ligação é reversível e sua dissociação não impede a sua atuação. Com isso, infere-se que haja uma tendência do peptídeo a se manter dentro dos vasos sanguíneos (FLORES-HOLGUÍN; FRAU; GLOSSMAN-MITNIK, 2021).

3.8.3 Metabolismo

O metabolismo é a primeira etapa de eliminação de um fármaco e consiste em duas fases que visam a diminuição da lipossolubilidade da droga, a primeira converte fármacos lipofílicos em moléculas apolares enquanto a segunda consiste em reações de conjugação com substratos endógenos (LAI *et al.*, 2022). O citocromo P450 é o principal sistema de biotransformação responsável pela fase um do metabolismo de drogas, este é composto por uma família de isoenzimas denominadas CYPs (COOK *et al.*, 2016).

Os resultados preditivos mostraram que CpOsmPep-1c não atuou como inibidor de nenhuma CYP testada. A inativação dessas enzimas pode ter efeitos negativos no metabolismo de outras drogas causando efeitos adversos pelo acúmulo da substância no organismo. O peptídeo CpOsmPep-1c demonstrou ser substrato positivo para CYP3A4 e negativo para CYP2D6, tal resultado infere que a molécula estudada é metabolizada pelo citocromo P450 (FLORES-HOLGUÍN; FRAU; GLOSSMAN-MITNIK, 2021; SHANKAR; MEHENDALE, 2014).

3.8.4 Excreção

A excreção é a segunda etapa de eliminação de um fármaco e pode ocorrer por diversas vias como biliar, dérmica, respiratória e renal, sendo esta última a via mais comum de eliminação. Os transportadores de cátions orgânicos (OCTs) constituem a membrana basolateral das células do epitélio tubular renal, diversos tipos de OCTs são conhecidas, contudo a OCT2 está intimamente associada com a depuração de fármacos (CHEUNG *et al.*, 2017).

O peptídeo CpOsmPep-1c não apresentou interação de substrato com OCT2, o que indica que a proteína não é sua via de secreção renal. Fármacos podem atuar em OCT2 em forma de substrato ou/e inibidor, medicamentos que tem este transportador como principal via de eliminação não podem ser

administrados juntamente com drogas que atuam como inibidores de OCT2, uma vez que a não eliminação do fármaco eleva seus níveis plasmáticos podendo causar efeitos tóxicos (GEORGE *et al.*, 2021; FLORES-HOLGUÍN; FRAU; GLOSSMAN-MITNIK, 2021).

A liquidação total consiste na previsão da medida combinada da depuração hepática e renal, o seu conhecimento está associado a biodisponibilidade e seu conhecimento é essencial para determinação da dosagem de um fármaco (FLORES-HOLGUÍN; FRAU; GLOSSMAN-MITNIK, 2021). A taxa líquida total do peptídeo CpOsmPep-1c foi de 0,262 log (ml/min/kg), ou seja, a cada minuto essa quantidade de plasma é liberada do fármaco (BHOSLE *et al.*, 2017). A meia vida é o tempo necessário para que um fármaco tenha sua concentração plasmática reduzida pela metade, o conhecimento desse parâmetro impacta diretamente na frequência da dose do medicamento para que ele se mantenha em níveis plasmáticos atuantes. Analisado frente a esse parâmetro CpOsmPep-1c apresentou meia-vida de 2:06h, sendo considerado baixo (>8h: alto; 3h < Cl < 8h: moderado; <3h: baixo). Este resultado é esperado pois medicamentos à base de proteínas e peptídeos geralmente apresentam uma menor duração no plasma (WU; HUANG, 2018).

3.8.5 Toxicidade

Analisado frente a sua capacidade inibitória de hERG I e II, o peptídeo CpOsmPep-1c apresentou inibição apenas para hERG II. Essa proteína está associada com o mecanismo mais comum de cardiotoxicidade induzida por fármacos, sua inibição leva a síndrome do QT longo adquirido que ocasiona em arritmia ventricular fatal (NOGAWA; KAWAI, 2014). Estima-se que em torno de 60% dos medicamentos em desenvolvimento sejam bloqueadores de hERG, desses estão inclusos analgésicos, antibióticos, antipsicóticos e outros (STERGIOPOULOS *et al.*, 2021; XUE *et al.*, 2022).

O peptídeo CpOsmPep-1c apresentou previsão de hepatotoxicidade positiva, contudo o grau e o mecanismo são imprecisos para a metodologia deste estudo. A hepatotoxicidade está associada a interrupção da função normal do fígado, diversas clases de drogas apresentam esta toxicidade e devido a isso a busca por fármacos não hepatotóxicos é um desafio para o desenvolvimento de medicamentos (PUGH *et al.*, 2009; THAKKAR *et al.*, 2020; FLORES-HOLGUÍN; FRAU; GLOSSMAN-MITNIK, 2021). A ausência nefrotoxicidade apresentada por CpOsmPep-1c é outro parâmetro almejavél para drogas em desenvolvimento, tendo em vista função excretora de xenobióticos e o elevado fluxo sanguíneo torna os rins mais sensíveis a toxicidade química (YEN *et al.*, 2022; GAO *et al.*, 2021).

Favorecendo suas características associadas a pele, o peptídeo CpOsmPep-1c não apresentou capacidade de sensibilização e resultados negativos foram obtidos para irritação e corrosão ocular. Essa observação traz boas perspectivas para a estudos futuros voltados para essa forma de aplicação. Peptídeos veem sendo melhor explorados nas áreas da cosmetologia devido a suas características antioxidantes e hidratantes, vários tratamentos voltados para a face já chegaram ao mercado, concomitante a isso estudos voltados para peptídeos carreadores de fármacos oculares e dérmicos

também veem ganhando força. (KUMAR *et al.*, 2015; MILEWSKI *et al.*, 2020; RAN *et al.*, 2022; ATTIA; MACKAY, 2022; WANG *et al.*, 2017).

O teste Ames é um método muito comum para avaliação do potencial mutagênico de um composto, testes positivos indicam característica mutagênica do composto, podendo ser carcinogênico, por essa razão a previsão de CpOsmPep-1c foi realizada frente ao teste Ames e demonstrou-se negativa (ZONARI *et al.*, 2022).

Por fim, a predição da dose máxima tolerada foi averiguada e apontou que a dose de 0,439 log mg/kg/dia, esta é uma dose razoavelmente baixa, contudo seu significado serve principalmente para indicar a dose inicial que pode apresentar algum efeito, sendo utilizada como base para estudos de toxicidade para drogas de fase 1 (FLORES-HOLGUÍN; FRAU; GLOSSMAN-MITNIK, 2021).

4. CONCLUSÃO

Frente a necessidade de encontrar novos compostos antibacterianos, a Osmotina de *C. procera* foi utilizada neste estudo como percussora de peptídeos que apresentassem tal característica. A partir disso, foi possível prever quatro peptídeos denominados de CpOsmPep-1, CpOsmPep-1a, CpOsmPep-1b e CpOsmPep-1c. Todos eles apresentaram características antibiofilme e penetrante em célula, bem como baixa toxicidade e estabilidade em ambiente gastrointestinal humano. No entanto, apenas CpOsmPep-1c demonstrou boa probabilidade de possuir atividade antibacteriana, diante disso ele foi escolhido para estudos de ancoragem com alguns alvos previamente conhecidos, onde foi possível observar que CpOsmPep-1c é capaz de se ligar com MurB e Tirosil-tRNA sintetase de *S. aureus*, além da proteína RbmA de *V. cholerae*. Em todos as ligações o peptídeo foi capaz de se ligar próximo ou no sítio alvo impedindo que o alvo exerça sua atividade. O perfil ADMET de CpOsmPep-1c apontou diversos desafios para absorção oral, entretanto a absorção cutânea trouxe outras perspectivas de aplicação, além disso o peptídeo é metabolizado pelas enzimas do citocromo P450 e meia vida de duas horas. Em relação a toxicidade CpOsmPep-1c foi nociva para coração e fígado, entretanto não houve resultado positivo para as previsões de genotoxicidade, nefrotoxicidade, irritação ocular e sensibilização da pele. Neste estudo, CpOsmPep-1c foi apontada como uma molécula de atividades biológicas notáveis, contudo ainda é possível modificações em sua estrutura e composição que elevem suas características biológicas, aplicação e toxicidade. Tais resultados marcam os primeiros passos para o desenvolvimento de uma molécula terapêutica a ser utilizada no tratamento de doenças bacterianas que afetam a saúde humana e ou animal.

5 REFERÊNCIAS

AGNIHOTRY, Shikha; PATHAK, Rajesh Kumar; SINGH, Dev Bukhsh; TIWARI, Apoorv; HUSSAIN, Imran. Protein structure prediction. **Bioinformatics**, [S.L.], p. 177-188, 2022. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-323-89775-4.00023-7>.

AGNIHOTRY, Shikha; PATHAK, Rajesh Kumar; SINGH, Dev Bukhsh; TIWARI, Apoorv; HUSSAIN, Imran. **Protein structure prediction. Bioinformatics**, [S.L.], p. 177-188, 2022. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-323-89775-4.00023-7>.

ALI-SEYED, Mohamed; AYESHA, Siddiqua. Calotropis - A multi-potential plant to humankind: special focus on its wound healing efficacy. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, [S.L.], v. 28, p. 101725, set. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101725>

AMINI, Mohammad Humayoon; ASHRAF, Kamran; SALIM, Fatimah; LIM, Siong Meng; RAMASAMY, Kalavathy; MANSHOOR, Nurhuda; SULTAN, Sadia; AHMAD, Wasim. Important insights from the antimicrobial activity of Calotropis procera. **Arabian Journal Of Chemistry**, [S.L.], v. 14, n. 7, p. 103181, jul. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103181>.

AMIRI, Elahe Omidbakhsh; FARMANI, Jamshid; AMIRI, Zeynab Raftani; DEHESTANI, Ali; MOHSENI, Mojtaba. Antimicrobial activity, environmental sensitivity, mechanism of action, and food application of α s165-181 peptide. **International Journal Of Food Microbiology**, [S.L.], v. 358, p. 109403, nov. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109403>.

AMIRI, Elahe Omidbakhsh; FARMANI, Jamshid; AMIRI, Zeynab Raftani; DEHESTANI, Ali; MOHSENI, Mojtaba. Antimicrobial activity, environmental sensitivity, mechanism of action, and food application of α s165-181 peptide. **International Journal Of Food Microbiology**, [S.L.], v. 358, p. 109403, nov. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109403>.

ANAYA, Katya; PODSZUN, Maren; FRANCO, Octavio Luiz; GADELHA, Carlos Alberto de Almeida; FRANK, Jan. The Coconut Water Antimicrobial Peptide CnAMP1 Is Taken up into Intestinal Cells but Does Not Alter P-Glycoprotein Expression and Activity. *Plant Foods For Human Nutrition*, [S.L.], v. 75, n. 3, p. 396-403, 27 maio 2020. **Springer Science and Business Media LLC**. <http://dx.doi.org/10.1007/s11130-020-00826-y>.

ATTIA, Sara Aly; MACKAY, J. Andrew. Protein and polypeptide mediated delivery to the eye. *Advanced Drug Delivery Reviews*, [S.L.], v. 188, p. 114441, set. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2022.114441>.

AZAD, Marisa Ann; HUTTUNEN-HENNELLY, Heidi Esther Katrina; FRIEDMAN, Cynthia Ross. Bioactivity and the First Transmission Electron Microscopy Immunogold Studies of Short De Novo - Designed Antimicrobial Peptides. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [S.L.], v. 55, n. 5, p. 2137-2145, maio 2011. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.01148-10>.

BENSON, Timothy E. et al. Uma variação estrutural para MurB: estrutura cristalina de raios-X de *Staphylococcus aureus* UDP-N-acetilenoilpiruvilglucosamina redutase (MurB). **Bioquímica**, v. 40, n. 8, pág. 2340-2350, 2001.

BHOSLE, Vikrant K.; ALTIT, Gabriel; AUTMIZGUINE, Julie; CHEMTOB, Sylvain. Basic Pharmacologic Principles. **Fetal And Neonatal Physiology**, [S.L.], p. 187-201, 2017. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-323-35214-7.00018-4>.

BOMAN, H. G. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. **Journal Of Internal Medicine**, [S.L.], v. 254, n. 3, p. 197-215, set. 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2796.2003.01228.x>.

BOSE, Partha Pratim; CHATTERJEE, Urmimala; HUBATSCH, Ina; ARTURSSON, Per; GOVENDER, Thavendran; KRUGER, Hendrik G.; BERGH, Margareta; JOHANSSON, Jan; ARVIDSSON, Per I.. In vitro ADMET and physicochemical investigations of poly-N-methylated peptides designed to inhibit A β aggregation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 18, n. 16, p. 5896-5902, ago. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2010.06.087>.

BROWN, Pamela; EGGLESTON, Drake S.; HALTIWANGER, R.Curtis; JARVEST, Richard L.; MENSAH, Lucy; O'HANLON, Peter J.; POPE, Andrew J.. Synthetic analogues of SB-219383. Novel C-glycosyl peptides as inhibitors of tyrosyl tRNA synthetase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S.L.], v. 11, n. 5, p. 711-714, mar. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0960-894x\(01\)00039-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0960-894x(01)00039-7).

CAI, Zhiyou; QIAO, Pei-Feng; WAN, Cheng-Qun; CAI, Min; ZHOU, Nan-Kai; LI, Qin. Role of Blood-Brain Barrier in Alzheimer's Disease. **Journal Of Alzheimer'S Disease**, [S.L.], v. 63, n. 4, p. 1223-1234, 30 maio 2018. IOS Press. <http://dx.doi.org/10.3233/jad-180098>.

CHAUDHARY, K. et al. A Web Server and Mobile App for Computing Hemolytic Potency of Peptides. **Scientific reports**, v. 6, p. 22843, 8 mar. 2016.

CHEUNG, Kit Wun Kathy; HSUEH, Chia-Hsiang; ZHAO, Ping; MEYER, Timothy W.; ZHANG, Lei; HUANG, Shiew-Mei; GIACOMINI, Kathleen M.. The Effect of Uremic Solutes on the Organic Cation Transporter 2. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [S.L.], v. 106, n. 9, p. 2551-2557, set. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.xphs.2017.04.076>.

CHU, John; KOIRALA, Bimal; FORELLI, Nicholas; VILA-FARRES, Xavier; TERNEI, Melinda A.; ALI, Thahmina; COLOSIMO, Dominic A.; BRADY, Sean F.. Synthetic-Bioinformatic Natural Product Antibiotics with Diverse Modes of Action. *Journal Of The American Chemical Society*, [S.L.], v. 142, n. 33, p. 14158-14168, 22 jul. 2020. **American Chemical Society (ACS)**. <http://dx.doi.org/10.1021/jacs.0c04376>.

COOK, D.J.; FINNIGAN, J.D.; COOK, K.; BLACK, G.W.; CHARNOCK, S.J.. Cytochromes P450. Insights Into Enzyme Mechanisms And Functions From Experimental And Computational Methods, [S.L.], p. 105-126, 2016. **Elsevier**. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.apcsb.2016.07.003>.

CORRÊA, Jessica Audrey Feijó; EVANGELISTA, Alberto Gonçalves; NAZARETH, Tiago de Melo; LUCIANO, Fernando Bittencourt. Fundamentals on the molecular mechanism of action of antimicrobial peptides. **Materialia**, [S.L.], v. 8, p. 100494, dez. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mtla.2019.100494>.

CUI, Yunhai; DESEVAUX, Cyril; TRUEBENBACH, Ines; SIEGER, Peter; KLINDER, Klaus; LONG, Alan; SAUER, Achim. A Bidirectional Permeability Assay for beyond Rule of 5 Compounds. **Pharmaceutics**, [S.L.], v. 13, n. 8, p. 1146, 27 jul. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics13081146>.

DELANO, Warren L.; LAM, Joni W. PyMOL: A communications tool for computational models. In: **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**. 1155 16TH ST, NW, WASHINGTON, DC 20036 USA: AMER CHEMICAL SOC, 2005. p. U1371-U1372.

DEMIRCI, Mehmet; YIGIN, Akin; DEMIR, Cemil. Efficacy of antimicrobial peptide LL-37 against biofilm forming Staphylococcus aureus strains obtained from chronic wound infections. **Microbial Pathogenesis**, [S.L.], v. 162, p. 105368, jan. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105368>.

DIAS, Lucas P.; SOUZA, Pedro F.N.; OLIVEIRA, Jose T.A.; VASCONCELOS, Ilka M.; ARAËJO, Nadine M.s.; TILBURG, Mauricio F.V.; GUEDES, Maria I.F.; CARNEIRO, Rômulo F.; LOPES, José L.s.; SOUSA, Daniele O.B.. RcAlb-PepII, a synthetic small peptide bioinspired in the 2S albumin from the seed cake of Ricinus communis, is a potent antimicrobial agent against Klebsiella pneumoniae and Candida parapsilosis. Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Biomembranes, [S.L.], v. 1862, n. 2, p. 183092, fev. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.183092>.

DRUCKER, Daniel J.. Advances in oral peptide therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S.L.], v. 19, n. 4, p. 277-289, 17 dez. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41573-019-0053-0>.

DRUCKER, Daniel J.. Advances in oral peptide therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S.L.], v. 19, n. 4, p. 277-289, 17 dez. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41573-019-0053-0>.

DUBEY, Sunil Kumar; PARAB, Shraddha; DABHOLKAR, Neha; AGRAWAL, Mukta; SINGHVI, Gautam; ALEXANDER, Amit; BAPAT, Ranjeet Ajit; KESHARWANI, Prashant. Oral peptide delivery: challenges and the way ahead. Drug Discovery Today, [S.L.], v. 26, n. 4, p. 931-950, abr. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2021.01.001>.

DURAND, Guillaume André; RAOULT, Didier; DUBOURG, Grégory. Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, [S.L.], v. 53, n. 4, p. 371-382, abr. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.11.010>.

FJELL, Christopher D.; HANCOCK, Robert E.W.; JENSSEN, Havard. Computer-Aided Design of Antimicrobial Peptides. **Current Pharmaceutical Analysis**, [S.L.], v. 6, n. 2, p. 66-75, 1 maio 2010. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/157341210791202645>.

FLORES-HOLGUÍN, Norma; FRAU, Juan; GLOSSMAN-MITNIK, Daniel. In Silico Pharmacokinetics, ADMET Study and Conceptual DFT Analysis of Two Plant Cyclopeptides Isolated From Rosaceae as a Computational Peptidology Approach. *Frontiers In Chemistry*, [S.L.], v. 9, 12 ago. 2021. **Frontiers Media SA**. <http://dx.doi.org/10.3389/fchem.2021.708364>.

FLORES-HOLGUÍN, Norma; FRAU, Juan; GLOSSMAN-MITNIK, Daniel. In Silico Pharmacokinetics, ADMET Study and Conceptual DFT Analysis of Two Plant Cyclopeptides Isolated From Rosaceae as a Computational Peptidology Approach. *Frontiers In Chemistry*, [S.L.], v. 9, 12 ago. 2021. **Frontiers Media SA**. <http://dx.doi.org/10.3389/fchem.2021.708364>.

FOUDAH, Ahmed I.; ALQARNI, Mohammad H.; ALAM, Aftab; SALKINI, Mohammad Ayman; ROSS, Samir A.; YUSUFOGLU, Hasan S.. Phytochemical Screening, In Vitro and In Silico Studies of Volatile Compounds from *Petroselinum crispum* (Mill) Leaves Grown in Saudi Arabia. **Molecules**, [S.L.], v. 27, n. 3, p. 934, 29 jan. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules27030934>.

FREITAS, Cleverson Diniz Teixeira de; LOPES, José Luiz de Souza; BELTRAMINI, Leila Maria; OLIVEIRA, Raquel Sombra Basílio de; OLIVEIRA, José Tadeu Abreu; RAMOS, Márcio Viana. Osmotin from *Calotropis procera* latex: new insights into structure and antifungal properties. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Biomembranes**, [S.L.], v. 1808, n. 10, p. 2501-2507, out. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.07.014>.

GAO, Chen; LIU, Chang; CHEN, Yuwei; WANG, Qingtao; HAO, Zhihui. Protective effects of natural products against drug-induced nephrotoxicity: a review in recent years. **Food And Chemical Toxicology**, [S.L.], v. 153, p. 112255, jul. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2021.112255>.

GAO, Guangzheng; CHENG, John T.J.; KINDRACHUK, Jason; HANCOCK, Robert E.W.; STRAUS, Suzana K.; KIZHAKKEDATHU, Jayachandran N.. Biomembrane Interactions Reveal the Mechanism of Action of Surface-Immobilized Host Defense IDR-1010 Peptide. *Chemistry & Biology*, [S.L.], v. 19, n. 2, p. 199-209, fev. 2012. **Elsevier BV**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2011.12.015>.

GAUTAM, A. et al. Computer-Aided Virtual Screening and Designing of Cell-Penetrating Peptides. **Methods in molecular biology** (Clifton, N.J.), v. 1324, p. 59–69, 2015.

GAUTAM, A., P. KAPOOR, S. GUPTA, K. CHAUDHARY, G.P.S. RAGHAVA, R. KUMAR, In silico approach for predicting toxicity of peptides and proteins, *PLoS One* 8 (2013), e73957,

GEORGE, Blessy; WEN, Xia; JAIMES, Edgar A.; JOY, Melanie S.; ALEKSUNES, Lauren M.. In Vitro Inhibition of Renal OCT2 and MATE1 Secretion by Antiemetic Drugs. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 22, n. 12, p. 6439, 16 jun. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22126439>.

GIGLIO, K. M.; FONG, J. C.; YILDIZ, F. H.; SONDERMANN, H.. Structural Basis for Biofilm Formation via the *Vibrio cholerae* Matrix Protein RbmA. **Journal Of Bacteriology**, [S.L.], v. 195, n. 14, p. 3277-3286, 17 maio 2013. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.00374-13>.

GRILO, Margarida Isabel Capitão. Novos inibidores da biossíntese do peptidoglicano no tratamento da tuberculose. 2021. 55 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado Integrado em **Ciências Farmacêuticas**, **Universidade de Lisboa**, Lisboa, 2021. Disponível em: https://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/52733/1/MICF_Margarida_Grilo.pdf. Acesso em: 21 set. 2022.

HILL, Tristan; JAIN, Vijay Kumar; IYENGAR, Karthikeyan P.. Antimicrobial peptides (AMP) in biofilm induced orthopaedic device-related infections. **Journal Of Clinical Orthopaedics And Trauma**, [S.L.], v. 25, p. 101780, fev. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcot.2022.101780>.

HORN, Mareike; NEUNDORF, Ines. Design of a novel cell-permeable chimeric peptide to promote wound healing. *Scientific Reports*, [S.L.], v. 8, 2 nov. 2018. **Springer Science and Business Media LLC**. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-34684-1>.

HORN, Mareike; NEUNDORF, Ines. Design of a novel cell-permeable chimeric peptide to promote wound healing. *Scientific Reports*, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 0-00, 2 nov. 2018. **Springer Science and Business Media LLC**. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-34684-1>.

Kadri SS. Key Takeaways From the U.S. CDC's 2019 Antibiotic Resistance Threats Report for Frontline Providers. **Crit Care Med**. 2020 Jul;48(7):939-945. doi: 10.1097/CCM.0000000000004371.

KARDANI, Kimia; BOLHASSANI, Azam. Cppsite 2.0: an available database of experimentally validated cell-penetrating peptides predicting their secondary and tertiary structures. **Journal Of Molecular Biology**, [S.L.], v. 433, n. 11, p. 166703, maio 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2020.11.002>.

KIM, Gyu Chan; CHEON, Dae Hee; LEE, Yan. Challenge to overcome current limitations of cell-penetrating peptides. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Proteins And Proteomics**, [S.L.], v. 1869, n. 4, p. 140604, abr. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2021.140604>.

KLEIN, Eili y; MILKOWSKA-SHIBATA, Maja; TSENG, Katie K; SHARLAND, Mike; GANDRA, Sumanth; PULCINI, Céline; LAXMINARAYAN, Ramanan. Assessment of WHO antibiotic consumption and access targets in 76 countries, 2000–15: an analysis of pharmaceutical sales data. **The Lancet Infectious Diseases**, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 107-115, jan. 2021. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099\(20\)30332-7](http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099(20)30332-7).

KLEPACH, Alisa; TRAN, Huyen; MOHAMMED, Faiz Ahmad; ELSAYED, Mohamed E.H.. Characterization and impact of peptide physicochemical properties on oral and subcutaneous delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.L.], v. 186, p. 114322, jul. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2022.114322>.

KLEPACH, Alisa; TRAN, Huyen; MOHAMMED, Faiz Ahmad; ELSAYED, Mohamed E.H.. Characterization and impact of peptide physicochemical properties on oral and subcutaneous delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.L.], v. 186, p. 114322, jul. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2022.114322>.

KNUDSEN, Thomas B.; SPENCER, Richard M.; PIERRO, Jocelyn D.; BAKER, Nancy C.. Computational biology and in silico toxicodynamics. **Current Opinion In Toxicology**, [S.L.], v. 23-24, p. 119-126, out. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cotox.2020.11.001>.

KUBO, Masato. Mast cells and basophils in allergic inflammation. **Current Opinion In Immunology**, [S.L.], v. 54, p. 74-79, out. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2018.06.006>.

KUMAR, Prashant; KIZHAKKEDATHU, Jayachandran; STRAUS, Suzana. Antimicrobial Peptides: diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo. **Biomolecules**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 4, 19 jan. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/biom8010004>.

KUMAR, Prashant; KIZHAKKEDATHU, Jayachandran; STRAUS, Suzana. Antimicrobial Peptides: diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo. **Biomolecules**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 4, 19 jan. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/biom8010004>.

KUMAR, Sunny; ZAKREWSKY, Michael; CHEN, Ming; MENEGATTI, Stefano; MURASKI, John A.; MITRAGOTRI, Samir. Peptides as skin penetration enhancers: mechanisms of action. **Journal Of Controlled Release**, [S.L.], v. 199, p. 168-178, fev. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.12.006>.

LAI, Yurong; CHU, Xiaoyan; DI, Li; GAO, Wei; GUO, Yingying; LIU, Xingrong; LU, Chuang; MAO, Jialin; SHEN, Hong; TANG, Huaping. Recent advances in the translation of drug metabolism and pharmacokinetics science for drug discovery and development. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, [S.L.], v. 12, n. 6, p. 2751-2777, jun. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2022.03.009>.

LANGEN, Urs H.; AYLOO, Swathi; GU, Chenghua. Development and Cell Biology of the Blood-Brain Barrier. **Annual Review Of Cell And Developmental Biology**, [S.L.], v. 35, n. 1, p. 591-613, 6 out. 2019. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100617-062608>.

LEE, Haerin; PARK, Juhyun; KIM, Yeu-Chun. Enhanced transdermal delivery with less irritation by magainin pore-forming peptide with a N-lauroylsarcosine and sorbitan monolaurate mixture. **Drug Delivery And Translational Research**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 54-63, 31 out. 2017. **Springer Science and Business Media LLC**. <http://dx.doi.org/10.1007/s13346-017-0433-0>.

LIMA, Adrienne M.; AZEVEDO, Mayara I.G.; SOUSA, Lyndefania M.; OLIVEIRA, Nayara S.; ANDRADE, Claudia R.; FREITAS, Cleverson D.T.; SOUZA, Pedro F.N.. Plant antimicrobial peptides: an overview about classification, toxicity and clinical applications. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 214, p. 10-21, ago. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.06.043>.

LIMA, Patrícia G.; OLIVEIRA, Jose T.A.; AMARAL, Jackson L.; FREITAS, Cleverson D.T.; SOUZA, Pedro F.N.. Synthetic antimicrobial peptides: characteristics, design, and potential as alternative molecules to overcome microbial resistance. **Life Sciences**, [S.L.], v. 278, p. 119647, ago. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119647>.

LUGO, Juana Maria; TAFALLA, Carolina; OLIVA, Ayme; PONS, Tirso; OLIVA, Brizaida; AQUILINO, Carolina; MORALES, Reynold; ESTRADA, Mario Pablo. Evidence for antimicrobial and anticancer activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) from North African catfish (*Clarias gariepinus*): its potential use as novel therapeutic agent in fish and humans. **Fish & Shellfish Immunology**, [S.L.], v. 86, p. 559-570, mar. 2019. **Elsevier BV**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2018.11.056>.

MAESTRE-REYNA, Manuel; WU, Wen-Jin; WANG, Andrew H.-J.. Structural Insights into RbmA, a Biofilm Scaffolding Protein of *V. Cholerae*. **Plos One**, [S.L.], v. 8, n. 12, 5 dez. 2013. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0082458>.

MENDONÇA, Diogo A.; BAKKER, Mariët; CRUZ-OLIVEIRA, Christine; NEVES, Vera; JIMÉNEZ, Maria Angeles; DEFAUS, Sira; CAVACO, Marco; VEIGA, Ana Salomé; CADIMA-COUTO, Iris; CASTANHO, Miguel A. R. B.. Penetrating the Blood-Brain Barrier with New Peptide–Porphyrin Conjugates Having anti-HIV Activity. **Bioconjugate Chemistry**, [S.L.], v. 32, n. 6, p. 1067-1077, 25 maio 2021. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.1c00123>.

MILEWSKI, Mikolaj; KAPOOR, Yash; DING, Zhongli; ZHANG, Jingtao; GHARTEY-TAGOE, Esi; MANSER, Kim; NISSLEY, Becky; PETRESCU, Ioan; XU, Ling; DUFFIELD, Bill. Stabilization and Transdermal Delivery of an Investigational Peptide Using MicroCor® Solid-State Dissolving

Microstructure Arrays. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [S.L.], v. 109, n. 3, p. 1288-1296, mar. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.xphs.2019.11.006>.

MOLERO-ABRAHAM, M. et al. EPIPOX: Immunoinformatic Characterization of the Shared T-Cell Epitome between Variola Virus and Related Pathogenic Orthopoxviruses. **Journal of immunology research**, v. 2015, p. 738020, 2015.

NISHIDA, Satoshi; KUROKAWA, Kenji; MATSUO, Miki; SAKAMOTO, Kimitoshi; UENO, Kohji; KITA, Kiyoshi; SEKIMIZU, Kazuhisa. Identification and Characterization of Amino Acid Residues Essential for the Active Site of UDP-N-acetylenolpyruvylglucosamine Reductase (MurB) from *Staphylococcus aureus*. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 281, n. 3, p. 1714-1724, jan. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m509277200>.

NIU, Zhigao; TEDESCO, Erik; BENETTI, Federico; MABONDZO, Aloïse; MONTAGNER, Isabella Monia; MARIGO, Ilaria; GONZALEZ-TOUCEDA, David; TOVAR, Sulay; DIÉGUEZ, Carlos; SANTANDER-ORTEGA, Manuel J.. Rational design of polyarginine nanocapsules intended to help peptides overcoming intestinal barriers. **Journal Of Controlled Release**, [S.L.], v. 263, p. 4-17, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.02.024>.

NOGAWA, Hisashi; KAWAI, Tomoyuki. HERG trafficking inhibition in drug-induced lethal cardiac arrhythmia. **European Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 741, p. 336-339, out. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.06.044>.

OYAMA, Linda B.; GIRDWOOD, Susan E.; COOKSON, Alan R.; FERNANDEZ-FUENTES, Narcis; PRIVÉ, Florence; VALLIN, Hannah E.; WILKINSON, Toby J.; GOLYSHIN, Peter N.; GOLYSHINA, Olga V.; MIKUT, Ralf. The rumen microbiome: an underexplored resource for novel antimicrobial discovery. *Npj Biofilms And Microbiomes*, [S.L.], v. 3, dez. 2017. **Springer Science and Business Media LLC**. <http://dx.doi.org/10.1038/s41522-017-0042-1>.

PEREIRA, Rui; SILVA, Sandra G.; PINHEIRO, Marina; REIS, Salette; VALE, M. Luísa do. Current Status of Amino Acid-Based Permeation Enhancers in Transdermal Drug Delivery. **Membranes**, [S.L.], v. 11, n. 5, p. 343, 7 maio 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/membranes11050343>.

PIRES, Douglas E. V.; BLUNDELL, Tom L.; ASCHER, David B.. PkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 58, n. 9, p. 4066-4072, 22 abr. 2015. American Chemical Society (ACS).

PUGH, Aaron J.; BARVE, Ashutosh J.; FALKNER, Keith; PATEL, Mihir; MCCLAIN, Craig J.. Drug-Induced Hepatotoxicity or Drug-Induced Liver Injury. *Clinics In Liver Disease*, [S.L.], v. 13, n. 2, p. 277-294, maio 2009. **Elsevier BV**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cld.2009.02.008>.

QIU, Xiayang; JANSON, Cheryl A.; SMITH, Ward W.; GREEN, Susan M.; MCDEVITT, Patrick; JOHANSON, Kyung; CARTER, Paul; HIBBS, Martin; LEWIS, Ceri; CHALKER, Alison. Crystal structure of Staphylococcus aureus tyrosyl-tRNA synthetase in complex with a class of potent and specific inhibitors. *Protein Science*, [S.L.], v. 10, n. 10, p. 2008-2016, out. 2001. **Wiley**. <http://dx.doi.org/10.1110/ps.18001>.

RAN, Meixin; DENG, Yaxin; YAN, Jiaqi; ZHANG, Anan; WEI, Ying; LI, Xiaowen; HE, Haibing; GOU, Jingxin; YIN, Tian; TANG, Xing. Neovascularization-directed bionic eye drops for noninvasive renovation of age-related macular degeneration. **Chemical Engineering Journal**, [S.L.], v. 450, p. 138291, dez. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2022.138291>.

SHAKER, Bilal; AHMAD, Sajjad; LEE, Jingyu; JUNG, Chanjin; NA, Dokyun. In silico methods and tools for drug discovery. **Computers In Biology And Medicine**, [S.L.], v. 137, p. 104851, out. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.combiomed.2021.104851>.

SHANKAR, K.; MEHENDALE, H.M.. Cytochrome P450. **Encyclopedia Of Toxicology**, [S.L.], p. 1125-1127, 2014. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-386454-3.00299-2>.

SHANKAR, Sujithra; SHAH, Sushmita G.; YADAV, Shikha; CHUGH, Archana. Novel corneal targeting cell penetrating peptide as an efficient nanocarrier with an effective antimicrobial activity. **European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics**, [S.L.], v. 166, p. 216-226, set. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2021.06.014>.

SHARMA, A. et al. dPABBs: A Novel in silico Approach for Predicting and Designing Anti-biofilm Peptides. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 21839, 2016.

SOUZA, Pedro F.N.; MARQUES, Lidyane S.M.; OLIVEIRA, Jose T.A.; LIMA, Patrícia G.; DIAS, Lucas P.; A.S. NETO, Nilton; LOPES, Francisco E.s.; SOUSA, Jeanlex S.; SILVA, Ayrles F.B.; CANEIRO, Rômulo F.. Synthetic antimicrobial peptides: from choice of the best sequences to action mechanisms. **Biochimie**, [S.L.], v. 175, p. 132-145, ago. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2020.05.016>.

SOUZA, Pedro F.N.; MARQUES, Lidyane S.M.; OLIVEIRA, Jose T.A.; LIMA, Patrícia G.; DIAS, Lucas P.; A.S. NETO, Nilton; LOPES, Francisco E.s.; SOUSA, Jeanlex S.; SILVA, Ayrles F.B.; CANEIRO, Rômulo F.. Synthetic antimicrobial peptides: from choice of the best sequences to action mechanisms. **Biochimie**, [S.L.], v. 175, p. 132-145, ago. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2020.05.016>.

SOUZA, Pedro F.N.; MARQUES, Lidyane S.M.; OLIVEIRA, Jose T.A.; LIMA, Patrícia G.; DIAS, Lucas P.; A.S. NETO, Nilton; LOPES, Francisco E.s.; SOUSA, Jeanlex S.; SILVA, Ayrles F.B.; CANEIRO, Rômulo F.. Synthetic antimicrobial peptides: from choice of the best sequences to action

mechanisms. **Biochimie**, [S.L.], v. 175, p. 132-145, ago. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2020.05.016>.

SOUZA, Pedro F.N.; MARQUES, Lidyane S.M.; OLIVEIRA, Jose T.A.; LIMA, Patrícia G.; DIAS, Lucas P.; A.S. NETO, Nilton; LOPES, Francisco E.s.; SOUSA, Jeanlex S.; SILVA, Ayrles F.B.; CANEIRO, Rômulo F.. Synthetic antimicrobial peptides: from choice of the best sequences to action mechanisms. **Biochimie**, [S.L.], v. 175, p. 132-145, ago. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2020.05.016>.

SOUZA, Pedro F.N.; MARQUES, Lidyane S.M.; OLIVEIRA, Jose T.A.; LIMA, Patrícia G.; DIAS, Lucas P.; A.S. NETO, Nilton; LOPES, Francisco E.s.; SOUSA, Jeanlex S.; SILVA, Ayrles F.B.; CANEIRO, Rômulo F.. Synthetic antimicrobial peptides: from choice of the best sequences to action mechanisms. **Biochimie**, [S.L.], v. 175, p. 132-145, ago. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2020.05.016>.

STERGIOPOULOS, Chrysanthos; TSOPELAS, Fotios; VALKO, Klara. Prediction of hERG inhibition of drug discovery compounds using biomimetic HPLC measurements. *Admet And Dmpk*, [S.L.], p. 0-00, 10 jun. 2021. **International Association of Physical Chemists (IAPC)**. <http://dx.doi.org/10.5599/admet.995>.

SUN, Juan; LV, Peng-Cheng; ZHU, Hai-Liang. Tyrosyl-tRNA synthetase inhibitors: a patent review. **Expert Opinion On Therapeutic Patents**, [S.L.], v. 27, n. 5, p. 557-564, 9 jan. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/13543776.2017.1273350>.

SUN, Juan; LV, Peng-Cheng; ZHU, Hai-Liang. Tyrosyl-tRNA synthetase inhibitors: a patent review. **Expert Opinion On Therapeutic Patents**, [S.L.], v. 27, n. 5, p. 557-564, 9 jan. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/13543776.2017.1273350>.

THAKKAR, Shraddha; LI, Ting; LIU, Zhichao; WU, Leihong; ROBERTS, Ruth; TONG, Weida. Drug-induced liver injury severity and toxicity (DIList): binary classification of 1279 drugs by human hepatotoxicity. **Drug Discovery Today**, [S.L.], v. 25, n. 1, p. 201-208, jan. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2019.09.022>.

THAKUR, Akshita; SHARMA, Akanksha; ALAJANGI, Hema K.; JAISWAL, Pradeep Kumar; LIM, Yong-Beom; SINGH, Gurpal; BARNWAL, Ravi Pratap. In pursuit of next-generation therapeutics: antimicrobial peptides against superbugs, their sources, mechanism of action, nanotechnology-based delivery, and clinical applications. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 218, p. 135-156, out. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.07.103>.

THAKUR, Akshita; SHARMA, Akanksha; ALAJANGI, Hema K.; JAISWAL, Pradeep Kumar; LIM, Yong-Beom; SINGH, Gurpal; BARNWAL, Ravi Pratap. In pursuit of next-generation therapeutics:

antimicrobial peptides against superbugs, their sources, mechanism of action, nanotechnology-based delivery, and clinical applications. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 218, p. 135-156, out. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.07.103>.

THAKUR, Akshita; SHARMA, Akanksha; ALAJANGI, Hema K.; JAISWAL, Pradeep Kumar; LIM, Yong-Beom; SINGH, Gurpal; BARNWAL, Ravi Pratap. In pursuit of next-generation therapeutics: antimicrobial peptides against superbugs, their sources, mechanism of action, nanotechnology-based delivery, and clinical applications. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 218, p. 135-156, out. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.07.103>.

THEVENET, P.; SHEN, Y.; MAUPETIT, J.; GUYON, F.; DERREUMAUX, P.; TUFFERY, P.. PEP-FOLD: an updated de novo structure prediction server for both linear and disulfide bonded cyclic peptides. **Nucleic Acids Research**, [S.L.], v. 40, n. 1, p. 288-293, 11 maio 2012. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gks419>.

UDDIN, Tanvir Mahtab; CHAKRABORTY, Arka Jyoti; KHUSRO, Ameer; ZIDAN, Bm Redwan Matin; MITRA, Saikat; EMRAN, Talha Bin; DHAMA, Kuldeep; RIPON, Md. Kamal Hossain; GAJDÁCS, Márió; SAHIBZADA, Muhammad Umar Khayam. Antibiotic resistance in microbes: history, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. **Journal Of Infection And Public Health**, [S.L.], v. 14, n. 12, p. 1750-1766, dez. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiph.2021.10.020>.

VAN BAMBEKE, Françoise; MINGEOT-LECLERCQ, Marie-Paule; GLUPCZYNSKI, Youri; TULKENS, Paul M.. Mechanisms of Action. **Infectious Diseases**, [S.L.], p. 1162-1180, 2017. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-7020-6285-8.00137-4>.

WANG, Cheng; HONG, Tingting; CUI, Pengfei; WANG, Jianhao; XIA, Jiang. Antimicrobial peptides towards clinical application: delivery and formulation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.L.], v. 175, p. 113818, ago. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2021.05.028>.

WANG, G.; LI, X.; WANG, Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. **Nucleic acids research**, v. 44, n. D1, p. D1087-93, jan. 2016.

WANG, G.; LI, X.; WANG, Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. **Nucleic acids research**, v. 44, n. D1, p. D1087-93, jan. 2016.

WANG, Qin; LI, Xiao; YANG, Hongbin; CAI, Yingchun; WANG, Yinyin; WANG, Zhuang; LI, Weihua; TANG, Yun; LIU, Guixia. In silico prediction of serious eye irritation or corrosion potential of chemicals. *Rsc Advances*, [S.L.], v. 7, n. 11, p. 6697-6703, 2017. **Royal Society of Chemistry (RSC)**. <http://dx.doi.org/10.1039/c6ra25267b>.

WEI, Daixu; ZHANG, Xuwei. Biosynthesis, bioactivity, biotoxicity and applications of antimicrobial peptides for human health. **Biosafety And Health**, [S.L.], fev. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bsheal.2022.02.003>.

WEI, Daixu; ZHANG, Xuwei. Biosynthesis, bioactivity, biotoxicity and applications of antimicrobial peptides for human health. **Biosafety And Health**, [S.L.], v. 4, n. 2, p. 118-134, abr. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bsheal.2022.02.003>.

WEI, Wei; SHI, Wei-Kang; WANG, Peng-Fei; ZENG, Xiao-Tong; LI, Pan; ZHANG, Ji-Rong; LI, Qian; TANG, Zhi-Ping; PENG, Jia; WU, Lang-Zhou. Adenosine analogs as inhibitors of tyrosyl-tRNA synthetase: design, synthesis and antibacterial evaluation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 23, n. 20, p. 6602-6611, out. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2015.09.018>.

WU, Huizi; HUANG, Jiaguo. Optimization of Protein and Peptide Drugs Based on the Mechanisms of Kidney Clearance. **Protein & Peptide Letters**, [S.L.], v. 25, n. 6, p. 514-521, 28 ago. 2018. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/0929866525666180530122835>.

XUE, Hui; LI, Yuexin; ZHAO, Zhengrong; REN, Jiacheng; YU, Wenting; WANG, Fang; LI, Xianghua; LI, Jiaxin; XIA, Qianqian; ZHANG, Yuxin. Deacetylation mechanism and potential reversal strategy of long QT syndrome on hERG K⁺ channel under hypoxia. *Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Molecular Basis Of Disease*, [S.L.], v. 1868, n. 11, p. 166487, nov. 2022. **Elsevier BV**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2022.166487>.

YAP, Pei Gee; GAN, Chee Yuen. In vivo challenges of anti-diabetic peptide therapeutics: gastrointestinal stability, toxicity and allergenicity. **Trends In Food Science & Technology**, [S.L.], v. 105, p. 161-175, nov. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2020.09.005>.

YEN, Nguyen Thi Hai; PARK, Se-Myo; THU, Vo Thuy Anh; PHAT, Nguyen Ky; CHO, Yong-Soon; YOON, Seokjoo; SHIN, Jae-Gook; KIM, Dong Hyun; OH, Jung-Hwa; LONG, Nguyen Phuoc. Genome-wide gene expression analysis reveals molecular insights into the drug-induced toxicity of nephrotoxic agents. **Life Sciences**, [S.L.], v. 306, p. 120801, out. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120801>.

ZHUANG, Mei; ACHMON, Yigal; CAO, Yuping; LIANG, Xiaomin; CHEN, Liang; WANG, Hui; SIAME, Bupe A.; LEUNG, Ka Yin. Distribution of antibiotic resistance genes in the environment. **Environmental Pollution**, [S.L.], v. 285, p. 117402, set. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117402>.

ZONARI, Alessandra; BRACE, Lear E.; ALENCAR-SILVA, Thuany; PORTO, William F.; FOYT, Daniel; GUIANG, Mylieneth; CRUZ, Edgar Andres Ochoa; FRANCO, Octavio L.; OLIVEIRA, Carolina R.; BORONI, Mariana. In vitro and in vivo toxicity assessment of the senotherapeutic Peptide

14. **Toxicology Reports**, [S.L.], v. 9, p. 1632-1638, 2022. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxrep.2022.07.018>.