

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**PeptiDuo: desenvolvimento e validação experimental de um preditor
computacional de peptídeos com dupla função como penetradores celulares e
antimicrobianos**

Rayane Monique Bernardes Loch
Doctor Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2024**

RAYANE MONIQUE BERNARDES LOCH

PeptiDuo: desenvolvimento e validação experimental de um preditor computacional de peptídeos com dupla função como penetradores celulares e antimicrobianos

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biotecnologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientadora: Maria C. Baracat Pereira

Coorientadores: Sabrina de A. Silveira
Ciro Cesar Rossi

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2024**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

L812p
2024

Loch, Rayane Monique Bernardes, 1993-

PeptiDuo: desenvolvimento e validação experimental de um preditor computacional de peptídeos com dupla função como penetradores celulares e antimicrobianos / Rayane Monique Bernardes Loch. – Viçosa, MG, 2024.

1 tese eletrônica (100 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Maria Cristina Baracat Pereira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2024.

Referências bibliográficas: f. 90-100.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2025.405>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Peptídeos - Identificação - Programas de computador.
2. Células - Membranas - Propriedades mecânicas.
3. Antibióticos. I. Pereira, Maria Cristina Baracat, 1962-.
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biotecnologia. III. Título.

CDD 22. ed. 572.650285

RAYANE MONIQUE BERNARDES LOCH

PeptiDuo: desenvolvimento e validação experimental de um preditor computacional de peptídeos com dupla função como penetradores celulares e antimicrobianos

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biotecnologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 19 de dezembro de 2024.

Assentimento:

Rayane Monique Bernardes Loch
Autora

Maria Cristina Baracat Pereira
Orientadora

Essa tese foi assinada digitalmente pela autora em 13/06/2025 às 12:32:26 e pela orientadora em 13/06/2025 às 14:03:52. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **6HAE.4TGL.GLE9** e clique no botão 'Validar documento'.

AGRADECIMENTOS

Há 6 anos atrás ingressava em uma área totalmente diferente da minha formação. Foi um caminho de muitas descobertas, aprendizados e receio de não conseguir. Tive a oportunidade e privilégio de ter uma orientadora atenta, dedicada e sempre disponível. Professora Cristina, te agradeço imensamente por ter sido mais que uma orientadora, e pela confiança e carinho que sempre teve comigo. Ao meu eterno LPBP, onde fiz grandes amizades, iniciei meu mundo na bioquímica e tive a alegria de viver tantos momentos de aprendizado e companheirismo. Um agradecimento especial também ao Professor Ciro e Professora Sabrina pelo conhecimento que consegui aplicar para desenvolver esse trabalho.

Aos meus amados pais Maria José e Roberto e meus irmãos Jéssica e Felipe, por todo amor e confiança que sempre tiveram nas minhas escolhas. Agradeço sempre a Deus pela família linda que me deu.

A toda família e amigos, que sempre me incentivaram, e que se fazem presentes mesmo na distância, meu muito obrigada.

Ao meu marido, Ruither, por ser sempre o meu maior incentivador, pela sua contribuição nesse trabalho, pela partilha de ideias e por ser a minha primeira referência de pesquisador e admirador da Ciência. Seu amor e companheirismo são fundamentais em minha vida. Amo você e a história que estamos construindo. Aos meus amores Luke, Dumbo, Frida, Valquíria, Pandora e Nina por estarem comigo todo esse tempo, trazendo alegria diária em minha vida.

Agradeço a Deus por sempre me amparar, iluminar minhas escolhas e cercar meu caminho de pessoas boas.

À Universidade Federal de Viçosa, uma universidade de excelência, me levando a uma boa e multidisciplinar formação. À FAPEMIG, CNPQ, CAPES e FINEP, pelo financiamento desse trabalho e da estrutura física para sua realização na UFV.

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

“O mais importante é ver o que
é invisível para os outros.”
Jonathan Swift

RESUMO

LOCH, Rayane Monique Bernardes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2024. **PeptiDuo: desenvolvimento e validação experimental de um preditor computacional de peptídeos com dupla função como penetradores celulares e antimicrobianos.** Orientadora: Maria Cristina Baracat Pereira. Coorientadores: Sabrina de Azevedo Silveira e Ciro Cesar Rossi.

A permeabilidade na membrana plasmática é um dos grandes desafios para o desenvolvimento e aplicação de novas moléculas terapêuticas. Peptídeos com dupla função, atuando como penetradores celulares (CPPs) e antimicrobianos (AMPs), representam uma promissora alternativa para o desenvolvimento de novos antibióticos, com a vantagem de serem menos suscetíveis à resistência bacteriana. Nesse contexto, abordagens inovadoras, como o uso de ferramentas computacionais, têm o potencial de acelerar a descoberta e a identificação de novos fármacos. Este trabalho tem como objetivo realizar a bioprospecção de peptídeos com funções antimicrobiana e de penetração celular simultaneamente, a partir de genomas e proteomas, incluindo tanto sequências completas quanto fragmentadas (criptídeos). Para alcançar esse objetivo, foram definidos os seguintes objetivos específicos: (i) desenvolver um preditor computacional para identificação de peptídeos com dupla função (CPPs e AMPs), incluindo análise de sequências completas e criptídeos; (ii) construir e modelar in silico os peptídeos mais promissores, com posterior síntese química para avaliação experimental; (iii) analisar in vitro as atividades antimicrobianas desses peptídeos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas; (iv) investigar in vitro a permeabilidade dos peptídeos em membranas bacterianas por meio de microscopia confocal; (v) clonar, expressar e purificar os peptídeos com dupla função em sistemas bacterianos; e (vi) validar o potencial terapêutico dos peptídeos expressos por meio de testes antimicrobianos in vitro. Com uma abordagem que abrange desde a bioprospecção computacional até a validação experimental, este estudo resultou no desenvolvimento de uma ferramenta computacional eficiente para identificar peptídeos com dupla função. Nossa estratégia de classificação apresentou eficiência igual ou superior aos preditores individuais de CPPs e AMPs disponíveis na literatura. Quatro peptídeos selecionados in silico foram sintetizados e avaliados experimentalmente. Ensaio in vitro confirmaram suas atividades antimicrobianas contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, enquanto estudos de microscopia confocal demonstraram sua capacidade de permeabilizar membranas bacterianas. Posteriormente os peptídeos foram clonados e expressos em sistemas bacterianos, comprovando a viabilidade de

produção recombinante, embora desafios como a formação de corpos de inclusão tenham sido observados. Essas informações confirmam o vasto potencial do preditor construído e da variabilidade de peptídeos com dupla função a serem identificados, e validaram esses peptídeos selecionados como moléculas promissoras para o desenvolvimento de novos antibióticos, ou compostos de defesa, contribuindo para o enfrentamento da resistência bacteriana, alternativas terapêuticas e agricultura sustentável.

Palavras-chave: ferramentas computacionais; criptídeos; microscopia confocal; clonagem e expressão

ABSTRACT

LOCH, Rayane Monique Bernardes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2024. ***PeptiDuo: development and experimental validation of a computational predictor of peptides with dual functions as cell penetrators and antimicrobials***. Adviser: Maria Cristina Baracat Pereira. Co-advisers: Sabrina de Azevedo Silveira and Ciro Cesar Rossi.

Plasma membrane permeability is one of the major challenges for the development and application of new therapeutic molecules. Dual-function peptides, acting as cell penetrators (CPPs) and antimicrobials (AMPs), represent a promising alternative for the development of new antibiotics, with the advantage of being less susceptible to bacterial resistance. In this context, innovative approaches, such as the use of computational tools, have the potential to accelerate the discovery and identification of new drugs. This work aims to perform the bioprospecting of peptides with antimicrobial and cell penetrating functions simultaneously, from genomes and proteomes, including both complete and fragmented sequences (cryptids). To achieve this goal, the following specific objectives were defined: (i) to develop a computational predictor for the identification of dual-function peptides (CPPs and AMPs), including analysis of complete sequences and cryptids; (ii) to construct and model in silico the most promising peptides, with subsequent chemical synthesis for experimental evaluation; (iii) to analyze in vitro the antimicrobial activities of these peptides against Gram-positive and Gram-negative bacteria; (iv) to investigate in vitro the permeability of the peptides in bacterial membranes by confocal microscopy; (v) to clone, express and purify the peptides with dual function in bacterial systems; and (vi) to validate the therapeutic potential of the expressed peptides by in vitro antimicrobial tests. With an approach that ranges from computational bioprospecting to experimental validation, this study resulted in the development of an efficient computational tool to identify peptides with dual function. Our classification strategy showed efficiency equal to or superior to individual predictors of CPPs and AMPs available in the literature. Four peptides selected in silico were synthesized and evaluated experimentally. In vitro assays confirmed their antimicrobial activities against Gram-positive and Gram-negative bacteria, while confocal microscopy studies demonstrated their ability to permeabilize bacterial membranes. The peptides were subsequently cloned and expressed in bacterial systems, proving the viability of recombinant production, although challenges such as the formation of inclusion bodies were observed. This information confirms the vast potential of the constructed predictor and the variability of dual-

function peptides to be identified, and validated these selected peptides as promising molecules for the development of new antibiotics or defense compounds, contributing to the fight against bacterial resistance, therapeutic alternatives and sustainable agriculture.

Keywords: computational tools; cryptids; confocal microscopy; cloning and expression

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Fluxograma das atividades no preditor de dupla função, PeptiDuo

Figura 2. Vetor de expressão pET-28a usado para clonar as sequências preditas de peptídeos com dupla função, CPP e AMP.

Figura 3. Alinhamento das 19 sequências únicas de criptídeos preditas no proteoma do pimentão (NCBI) com probabilidade acima de 96% para dupla função (CPP e AMP).

Figura 4. Análise de frequência, utilizando WebLogo, dos resíduos de aminoácidos das 19 sequências únicas de criptídeos preditas no proteoma do pimentão (NCBI) com probabilidade acima de 96% para dupla função (CPP e AMP)

Figura 5. Alinhamento das 38 sequências únicas de criptídeos preditas no proteoma do girassol com probabilidade acima de 96% para dupla função.

Figura 6. Análise de frequência, utilizando WebLogo, dos resíduos de aminoácidos das 38 sequências únicas de criptídeos preditas no proteoma do girassol com probabilidade acima de 96% para dupla função (CPP e AMP).

Figura 7. Alinhamento das 27 sequências únicas de criptídeos preditas no genoma da berinjela com probabilidade acima de 96% para dupla função.

Figura 8. Análise de frequência, utilizando WebLogo, dos resíduos de aminoácidos das 27 sequências únicas de criptídeos preditas no proteoma e genoma da berinjela com probabilidade acima de 96% para dupla função (CPP e AMP).

Figura 9. Curva de crescimento da bactéria Gram-negativa *Ralstonia solanacearum* ao longo de 12 h na ausência (Meio LB + bactéria) e na presença do peptídeo RB1 nas concentrações 700 μM (C1), 350 μM (C2) e 175 μM (C3). O experimento foi realizado em meio LB a 37°C, com leituras de densidade óptica a 596 nm a cada duas horas. O antibiótico canamicina a 30 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ foi utilizado como controle positivo para a morte celular, e o Meio LB, como controle negativo.

Figura 10. Curva de crescimento da bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* ao longo de 12 h na ausência (Meio LB + bactéria) e na presença do peptídeo RB1 nas concentrações 700 μM

(C1), 350 μM (C2) e 175 μM (C3). O experimento foi realizado em meio LB a 37°C, com leituras de densidade óptica a 596 nm a cada duas horas. O antibiótico canamicina a 30 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ foi utilizado como controle positivo para a morte celular, e o Meio LB, como controle negativo.

Figura 11. Curva de crescimento da bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* ao longo de 12 h na ausência (Meio LB + bactéria) e na presença do peptídeo RB1 nas concentrações 700 μM (C1), 350 μM (C2) e 175 μM (C3). O experimento foi realizado em meio LB a 37°C, com leituras de densidade óptica a 596 nm a cada duas horas. O antibiótico canamicina a 30 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ foi utilizado como controle positivo para a morte celular, e o Meio LB, como controle negativo.

Figura 12. Curva de crescimento da bactéria Gram-negativa *Ralstonia solanacearum* ao longo de 12 h na ausência (Meio LB + bactéria) e na presença do peptídeo RB2 nas concentrações 700 μM (C1), 350 μM (C2) e 175 μM (C3). O experimento foi realizado em meio LB a 37°C, com leituras de densidade óptica a 596 nm a cada duas horas. O antibiótico canamicina a 30 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ foi utilizado como controle positivo para a morte celular, e o Meio LB, como controle negativo.

Figura 13. Curva de crescimento da bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* ao longo de 12 h na ausência (Meio LB + bactéria) e na presença do peptídeo RB2 nas concentrações 700 μM (C1), 350 μM (C2) e 175 μM (C3). O experimento foi realizado em meio LB a 37°C, com leituras de densidade óptica a 596 nm a cada duas horas. O antibiótico canamicina a 30 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ foi utilizado como controle positivo para a morte celular, e o Meio LB, como controle negativo.

Figura 14. Curva de crescimento da bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* ao longo de 12 h na ausência (Meio LB + bac) e na presença do peptídeo RB2 nas concentrações 700 μM (C1), 350 μM (C2) e 175 μM (C3). O experimento foi realizado em meio LB a 37°C, com leituras de densidade óptica a 596 nm a cada duas horas. O antibiótico canamicina a 30 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ foi utilizado como controle positivo para a morte celular, e o Meio LB, como controle negativo.

Figura 15. Curva de crescimento da bactéria Gram-negativa *Ralstonia solanacearum* ao longo de 12 h na ausência (Meio LB + bactéria) e na presença do peptídeo RB3 nas concentrações 700 μM (C1), 350 μM (C2) e 175 μM (C3). O experimento foi realizado em meio LB a 37°C,

com leituras de densidade óptica a 596 nm a cada duas horas. O antibiótico canamicina a $30 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ foi utilizado como controle positivo para a morte celular, e o Meio LB, como controle negativo.

Figura 16. Curva de crescimento da bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* ao longo de 12 h na ausência (Meio LB + bactéria) e na presença do peptídeo RB3 nas concentrações $700 \mu\text{M}$ (C1), $350 \mu\text{M}$ (C2) e $175 \mu\text{M}$ (C3). O experimento foi realizado em meio LB a 37°C , com leituras de densidade óptica a 596 nm a cada duas horas. O antibiótico canamicina a $30 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ foi utilizado como controle positivo para a morte celular, e o Meio LB, como controle negativo.

Figura 17. Curva de crescimento da bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* ao longo de 12 h na ausência (Meio LB + bactéria) e na presença do peptídeo RB3 nas concentrações $700 \mu\text{M}$ (C1), $350 \mu\text{M}$ (C2) e $175 \mu\text{M}$ (C3). O experimento foi realizado em meio LB a 37°C , com leituras de densidade óptica a 596 nm a cada duas horas. O antibiótico canamicina a $30 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ foi utilizado como controle positivo para a morte celular, e o Meio LB, como controle negativo.

Figura 18. Curva de crescimento da bactéria Gram-negativa *Ralstonia solanacearum* ao longo de 12 h na ausência (meio+bactéria) e na presença do peptídeo RB4 nas concentrações $700 \mu\text{M}$ (C1), $350 \mu\text{M}$ (C2) e $175 \mu\text{M}$ (C3). O experimento foi realizado em meio LB a 37°C , com leituras de densidade óptica (DO596) a cada duas horas. O antibiótico canamicina a $30\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ foi utilizado como controle positivo para a morte celular, e o meio LB (meio), como controle negativo.

Figura 19. Curva de crescimento da bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* ao longo de 12 h na ausência (meio+bactéria) e na presença do peptídeo RB4 nas concentrações $600 \mu\text{M}$ (C1), $400 \mu\text{M}$ (C2), $300 \mu\text{M}$ (C3), $200 \mu\text{M}$ (C4) e $100 \mu\text{M}$ (C5). O experimento foi realizado em meio LB a 37°C , com leituras de densidade óptica (DO596) a cada duas horas. O antibiótico canamicina a $30\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ foi utilizado como controle positivo para a morte celular, e o meio LB (meio), como controle negativo.

Figura 20. Curva de crescimento da bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* ao longo de 12 h na ausência (meio+bactéria) e na presença do peptídeo RB4 nas concentrações $600 \mu\text{M}$ (C1), $400 \mu\text{M}$ (C2), $300 \mu\text{M}$ (C3), $200 \mu\text{M}$ (C4) e $100 \mu\text{M}$ (C5). O experimento foi realizado em meio LB a 37°C , com leituras de densidade óptica (DO596) a cada duas horas. O antibiótico

canamicina a $30\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ foi utilizado como controle positivo para a morte celular, e o meio LB (meio), como controle negativo.

Figura 21. Imagem de microscopia confocal do cultivo de *Ralstonia solanacearum* em meio LB, na ausência de peptídeos, correspondendo ao tempo 0h de ensaio (controle) para todos os peptídeos analisados. O ensaio continha 20 μL de suspensão bacteriana ($\text{OD}=0,5$) e os fluoróforos FTIC ($2\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) e iodeto de propídio ($20\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) em meio de cultura LB, perfazendo 110 μL . **A.** Fluorescência verde indica células viáveis marcadas pelo FTIC. **B.** Fluorescência vermelha representa células comprometidas identificadas pelo iodeto de propídio. **C.** Sobreposição das fluorescências verde e vermelha.

Figura 22. Imagem de microscopia confocal capturada após 4 horas de cultivo de *Ralstonia solanacearum* na presença do peptídeo RB1 ($175\mu\text{M}$). O ensaio continha 20 μL de suspensão bacteriana ($\text{OD}=0,5$) e os fluoróforos FTIC ($2\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) e iodeto de propídio ($20\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) em meio de cultura LB, perfazendo 110 μL . **A.** Fluorescência verde indica células viáveis marcadas pelo FTIC. **B.** Fluorescência vermelha representa células comprometidas identificadas pelo iodeto de propídio. **C.** Sobreposição das fluorescências verde e vermelha.

Figura 23. Imagem de microscopia confocal capturada após 8 horas de cultivo de *Ralstonia solanacearum* na presença do peptídeo RB1 ($175\mu\text{M}$). O ensaio continha 20 μL de suspensão bacteriana ($\text{OD}=0,5$) e os fluoróforos FTIC ($2\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) e iodeto de propídio ($20\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) em meio de cultura LB, perfazendo 110 μL . **A.** Fluorescência verde indica células viáveis marcadas pelo FTIC. **B.** Fluorescência vermelha representa células comprometidas identificadas pelo iodeto de propídio. **C.** Sobreposição das fluorescências verde e vermelha.

Figura 24. Imagem de microscopia confocal capturada após 4 horas de cultivo de *Ralstonia solanacearum* na presença do peptídeo RB2 ($175\mu\text{M}$). O ensaio continha 20 μL de suspensão bacteriana ($\text{OD}=0,5$) e os fluoróforos FTIC ($2\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) e iodeto de propídio ($20\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) em meio de cultura LB, perfazendo 110 μL . **A.** Fluorescência verde indica células viáveis marcadas pelo FTIC. **B.** Fluorescência vermelha representa células comprometidas identificadas pelo iodeto de propídio. **C.** Sobreposição das fluorescências verde e vermelha.

Figura 25. Imagem de microscopia confocal capturada após 8 horas de cultivo de *Ralstonia solanacearum* na presença do peptídeo RB2 ($175\mu\text{M}$). O ensaio continha 20 μL de suspensão bacteriana ($\text{OD}=0,5$) e os fluoróforos FTIC ($2\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) e iodeto de propídio ($20\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) em meio de cultura LB, perfazendo 110 μL . **A.** Fluorescência verde indica células viáveis

marcadas pelo FTIC. **B.** Fluorescência vermelha representa células comprometidas identificadas pelo iodeto de propídio. **C.** Sobreposição das fluorescências verde e vermelha.

Figura 26. Imagem de microscopia confocal capturada após 4 horas de cultivo de *Ralstonia solanacearum* na presença do peptídeo RB3 (175 μM). O ensaio continha 20 μL de suspensão bacteriana ($\text{OD}=0,5$) e os fluoróforos FTIC (2 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) e iodeto de propídio (20 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) em meio de cultura LB, perfazendo 110 μL . **A.** Fluorescência verde indica células viáveis marcadas pelo FTIC. **B.** Fluorescência vermelha representa células comprometidas identificadas pelo iodeto de propídio. **C.** Sobreposição das fluorescências verde e vermelha.

Figura 27. Imagem de microscopia confocal capturada após 8 horas de cultivo de *Ralstonia solanacearum* na presença do peptídeo RB3 (175 μM). O ensaio continha 20 μL de suspensão bacteriana ($\text{OD}=0,5$) e os fluoróforos FTIC (2 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) e iodeto de propídio (20 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) em meio de cultura LB, perfazendo 110 μL . **A.** Fluorescência verde indica células viáveis marcadas pelo FTIC. **B.** Fluorescência vermelha representa células comprometidas identificadas pelo iodeto de propídio. **C.** Sobreposição das fluorescências verde e vermelha.

Figura 28. Imagem de microscopia confocal capturada após 4 horas de cultivo de *Ralstonia solanacearum* na presença do peptídeo RB4 (175 μM). O ensaio continha 20 μL de suspensão bacteriana ($\text{OD}=0,5$) e os fluoróforos FTIC (2 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) e iodeto de propídio (20 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) em meio de cultura LB, perfazendo 110 μL . **A.** Fluorescência verde indica células viáveis marcadas pelo FTIC. **B.** Fluorescência vermelha representa células comprometidas identificadas pelo iodeto de propídio. **C.** Sobreposição das fluorescências verde e vermelha.

Figura 29. Imagem de microscopia confocal capturada após 8 horas de cultivo de *Ralstonia solanacearum* na presença do peptídeo RB4 (175 μM). O ensaio continha 20 μL de suspensão bacteriana ($\text{OD}=0,5$) e os fluoróforos FTIC (2 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) e iodeto de propídio (20 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) em meio de cultura LB, perfazendo 110 μL . **A.** Fluorescência verde indica células viáveis marcadas pelo FTIC. **B.** Fluorescência vermelha representa células comprometidas identificadas pelo iodeto de propídio. **C.** Sobreposição das fluorescências verde e vermelha.

Figura 30. Confirmação da clonagem dos genes *dfp1*, *dfp2* e *dfg1* no vetor de expressão pET28a. Eletroforese em gel de agarose a 2%, contendo os produtos de PCR obtidos após amplificação dos genes inseridos no vetor. MM: marcador molecular de DNA (100 pb 3'RTU). Controle negativo: água. Controle positivo: gene de 460 pb previamente clonado em pET28a.

Figura 31. Avaliação das proteínas expressas por dfp1, dfp2 e dfg1. SDS-Tricina PAGE das frações solúvel e de corpos de inclusão resultantes da expressão. MM: Marcador molecular com intervalo de 14,4 a 66,2 kDa. Controle positivo: proteína já expressa previamente com 15 kDa.

Figura 32. Análise de expressão das proteínas recombinantes dfp1, dfp2 e dfg1 em *Escherichia coli* por Western Blot. As amostras corresponderam a 18 µL das frações solúveis e de corpos de inclusão obtidas após a indução da expressão, com concentrações apresentadas na Tabela 9. MM: marcador de peso molecular. Controle positivo: proteína recombinante previamente validada.

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP: peptídeos antimicrobianos

CI : corpo de inclusão

CPP: peptídeos penetradores de célula

FITC: Fluoresceína Isotiocianato

FS: fração solúvel

KNN: *k-nearest neighbors*

ML: *machine learning*

OD: densidade óptica

PI: iodeto de propídio

RB1: peptídeo sintetizado originado do pimentão, com dupla função

RB2: peptídeo sintetizado originado do girassol, com dupla função

RB3: peptídeo sintetizado originado do girassol, sem dupla função (controle negativo)

RB4: peptídeo sintetizado originado da berinjela, com dupla função

SVN: *support vector machine*

PeptiDuo: Nome dado para o preditor de dupla função desenvolvido neste trabalho

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	18
2.	OBJETIVOS.....	21
2.1	Geral	21
2.2	Específicos.....	21
3.	REVISÃO DE LITERATURA.....	22
3.1	Resistência antimicrobiana e membrana plasmática	22
3.2	Peptídeos penetradores de célula	24
3.3	Peptídeos antimicrobianos.....	26
3.4	Dupla função: peptídeos penetradores de célula e antimicrobianos	28
3.5	Criptídeos.....	30
3.6	Machine learning e bioinformática	31
3.7	Preditores de peptídeos bioativos na literatura	32
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	Bioprospecção de CPP e AMP <i>in silico</i>	34
4.1.1	Construção dos bancos de dados	34
4.1.2	Atributos de treinamento.....	35
4.1.3	Modelo classificador	35
4.1.4	Entrada de dados e análise de sequência.....	35
4.1.5	Classificação final	36
4.2	Análises de bioinformática e síntese dos peptídeos	37
4.2.1	Busca de padrões	38
4.3	Ensaio antibacteriano com os peptídeos sintetizados	39
4.4	Ensaio de permeabilidade na membrana com os peptídeos sintetizados.....	39
4.5	Clonagem e expressão de proteínas recombinantes.....	40
4.5.1	Obtenção das sequências gênicas para a síntese	41
4.5.2	Confirmação das clonagens	43

4.5.3	Extração do DNA plasmidial	44
4.5.4	PCR	44
4.5.5	Expressão de proteínas	45
4.5.6	Indução e expressão das proteínas recombinantes	46
4.5.7	Lise celular e preparo das frações solúvel e de corpo de inclusão	47
4.5.8	Análise das frações por eletroforese monodimensional e Western blotting	47
5.	RESULTADOS	48
5.1	Bioprospecção de CPP e AMP <i>in silico</i>	48
5.2	Seleção do modelo	49
5.3	Análises <i>in silico</i>	51
5.3.1	Avaliação dos padrões das sequências peptídicas obtidas pelo preditor	55
5.4	Validação da permeabilidade da membrana por microscopia confocal	74
5.5	Construção e clonagem dos genes para síntese de peptídeos dupla função .	80
5.6	Expressão das proteínas	82
6.	DISCUSSÃO.....	85
7.	CONCLUSÃO	88
8.	REFERÊNCIAS	90

1. INTRODUÇÃO

As terapias baseadas em proteínas, peptídeos e ácidos nucleicos têm ganhado destaque devido à sua alta especificidade e capacidade de atingir alvos biológicos com precisão, sendo um campo de estudo promissor, com inúmeras possibilidades de investigação. Essas macromoléculas apresentam vantagens significativas que incluem a capacidade de interagir com sítios complexos que são difíceis de atingir com pequenas moléculas. No entanto, sua aplicação clínica enfrenta desafios importantes, entre eles instabilidade *in vivo*, rápida degradação enzimática, dificuldade de entrega celular e baixa biodisponibilidade (BRASSEUR; DIVITA, 2010; JURETIĆ, 2022). Enquanto isso, moléculas pequenas – compostos químicos de baixa massa molecular (< 900 Da) – continuam sendo as principais drogas utilizadas na prática clínica devido à sua estabilidade e facilidade de penetração celular. No entanto, apresentam limitações como a falta de especificidade, necessidade de altas doses que podem levar à toxicidade e o risco de gerar efeitos colaterais indesejados (EKINS et al., 2019). Além disso, o uso prolongado e muitas vezes indiscriminado desses compostos tem contribuído para o surgimento de mecanismos de resistência bacteriana, dificultando a eficácia dos tratamentos.

As bactérias podem desenvolver resistência por diferentes estratégias, incluindo: modificação do alvo do antibiótico, produção de enzimas inativadoras (como β -lactamases), redução da permeabilidade da membrana, e o uso de bombas de efluxo para expelir o antimicrobiano do interior da célula. Esses mecanismos podem ocorrer isoladamente ou em combinação, tornando o controle das infecções um desafio crescente (MUNITA; ARIAS, 2016). Assim, a busca por novas abordagens terapêuticas, como peptídeos funcionais e ferramentas que integrem características das macromoléculas e moléculas pequenas, têm sido fundamentais.

O controle seletivo da permeabilidade das moléculas através da membrana celular regula a difusão passiva e o transporte ativo para o meio intracelular, dificultando a entrada de alguns compostos terapêuticos (DE OLIVEIRA et al., 2021). Como alternativa, peptídeos penetradores de célula (CPP) têm sido especialmente estudados como uma ferramenta para melhorar o potencial de ação de antibióticos, aumentando a permeabilidade nas membranas (ZEIDERS; CHMIELEWSKI, 2021).

Os CPPs são pequenas sequências de aminoácidos capazes de atravessar membranas celulares e internalizar moléculas bioativas, como fármacos, ácidos nucleicos e proteínas, sem causar danos significativos às células. Devido à sua versatilidade e eficiência, os CPPs surgiram como ferramentas promissoras para a entrega intracelular controlada, especialmente nas áreas terapêuticas em que moléculas grandes ou hidrofílicas enfrentam barreiras para atingir seus alvos intracelulares (XU et al., 2023). Além disso, sua baixa imunogenicidade e capacidade de modificação os tornam uma alternativa atraente em comparação a outras tecnologias de entrega, como lipossomas ou nanopartículas (GHORAI et al., 2023).

Os peptídeos antimicrobianos (AMP) também têm sido foco de pesquisa como drogas para defesa por apresentarem um amplo espectro de ação contra diversos microrganismos, sendo considerados uma promissora classe de biomoléculas contra a resistência bacteriana (BUCATARU; CIOBANASU, 2024). Há a previsão de que, em 2050, mais de 10 milhões de mortes ocorrerão anualmente como resultado da resistência microbiana (WU et al., 2020). Ao lado da resistência bacteriana, a penetração da membrana em mamíferos é um importante obstáculo para que os antibióticos alcancem seu potencial terapêutico completo. Por exemplo, as opções para o tratamento de infecções por *Staphylococcus* são limitadas em função da baixa permeabilidade da membrana de mamíferos apresentada por antibióticos hidrofílicos (MARCOS; GANDIA, 2008; ZEIDERS; CHMIELEWSKI, 2021). Dessa forma, é urgente a busca por novas moléculas com potenciais antimicrobianos, dentre elas, peptídeos terapêuticos.

Existem desafios importantes em relação aos CPPs, como a eficiência de internalização na membrana, a falta de especificidade do alvo e a citotoxicidade. Uma das estratégias para explorar novas abordagens para melhorar a penetração celular de CPPs é a sua conjugação (KALAFATOVIC; GIRALT, 2017; APOSTOLOPOULOS et al., 2021), e, dadas as características que compartilham, os AMPs podem ser bons candidatos. A dupla funcionalidade de CPPs e AMPs simultaneamente, em uma única sequência, poderia potencializar não apenas a entrega intracelular de agentes antimicrobianos, mas também atuar diretamente na eliminação de patógenos.

A identificação de novos peptídeos terapêuticos por meio de técnicas experimentais é frequentemente cara, demorada e demanda o uso de laboratórios e equipamentos. Com o aumento significativo da disponibilidade de sequências em bancos de dados públicos nos últimos anos, tornou-se possível empregar análises computacionais para acelerar a bioprospecção de novos alvos terapêuticos (EKINS et al., 2019). Nesse contexto, o aprendizado

de máquinas, em inglês *machine learning* (ML), corresponde a um campo em expansão da inteligência artificial, e têm se destacado por utilizar algoritmos capazes de identificar padrões ocultos em grandes volumes de dado, sem serem explicitamente programados para isso (EKINS et al., 2019). Aplicado à bioprospecção molecular, o ML aprimora a identificação e o desenvolvimento de compostos bioativos, permitindo a análise rápida de dados genômicos e proteômicos e obtendo propriedades funcionais que seriam difíceis de avaliar manualmente. Essa abordagem acelera o processo de descoberta e também amplia as possibilidades de identificação de moléculas com diversas funcionalidades, levando a moléculas promissoras para enfrentar desafios como o combate à resistência bacteriana.

Diante desse cenário, este trabalho teve como objetivo realizar a busca *in silico* de peptídeos com dupla função: CPP e AMP. Para isso, foi desenvolvido um preditor capaz de explorar genomas e proteomas, incluindo a identificação de criptídeos por meio de análise de janelas deslizantes de resíduos. Os peptídeos identificados foram submetidos à validação bioinformática e testes antimicrobianos *in vitro* envolvendo bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, além da avaliação de permeabilidade por microscopia confocal. Após validação, os peptídeos mais promissores foram clonados, expressos em sistemas de *Escherichia coli* e avaliados quanto ao seu potencial como antibióticos inovadores. Este estudo certamente contribuirá para o desenvolvimento de novas moléculas antibióticas ou compostos de defesa, ampliando as opções terapêuticas contra bactérias resistentes e oferecendo *insights* sobre a interação entre peptídeos e membranas celulares. Ao propor a identificação de peptídeos multifuncionais ou quiméricos, este trabalho busca avançar na criação de terapias mais eficazes e menos suscetíveis à resistência bacteriana.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Novas abordagens utilizando ferramentas computacionais para a descoberta de antibióticos são empregadas para acelerar a identificação de novos potenciais fármacos. Assim, questionou-se ser possível fazer a bioprospecção de peptídeos de penetração celular com atividade antimicrobiana, e vice-versa, a fim de explorar novos antibióticos.

Nosso objetivo foi realizar a bioprospecção *in silico* de peptídeos com dupla função – antimicrobianos (AMPs) e penetradores de célula (CPPs) – em genomas e proteomas, utilizando ferramentas computacionais, com validação experimental para identificar novas moléculas terapêuticas com potencial para aplicação no combate à resistência bacteriana.

2.2 Específicos

- a. Desenvolver um preditor computacional para identificar peptídeos com dupla função (CPPs e AMPs) em genomas e proteomas, incluindo a análise de sequências completas e fragmentadas (criptídeos);
- b. Construir e modelar *in silico* os peptídeos mais promissores identificados e sintetizá-los quimicamente para avaliação experimental;
- c. Analisar *in vitro* as atividades antimicrobianas dos peptídeos com potenciais de ação contra bactérias;
- d. Analisar *in vitro* a permeabilidade dos peptídeos em membranas bacterianas por meio de microscopia confocal, para investigar sua eficiência de penetração;
- e. Clonar e expressar os peptídeos com dupla função em sistemas bacterianos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Resistência antimicrobiana e membrana plasmática

O uso indiscriminado e prolongado de antibióticos, tanto na medicina humana, veterinária e na agricultura, tem contribuído para o desenvolvimento e a disseminação de microrganismos resistentes a medicamentos (MORETTA et al., 2021). Especialmente o uso de antibióticos na agricultura não é regulamentado, o que pode desenvolver resistência em microrganismos que posteriormente poderão provocar grandes perdas agrícolas (BROWNE et al., 2020). Há a previsão de que, em 2050, mais de 10 milhões de mortes ocorrerão anualmente como resultado da resistência bacteriana (WU et al., 2020).

Em resposta a essa crescente ameaça, diversas organizações internacionais e nacionais têm estabelecido diretrizes para o uso racional de antimicrobianos. A Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) destaca que a resistência antimicrobiana aumenta os custos da atenção médica devido a estadias hospitalares mais longas e necessidade de cuidados mais intensivos, colocando em risco o cumprimento dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) implementou o Programa de Gerenciamento do Uso de Antimicrobianos (PGA), que reúne orientações sobre o uso adequado desses medicamentos e mudanças nas prescrições, além de monitoramento e divulgação dos resultados (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2023).

Nos últimos 40 anos, pesquisas levaram ao desenvolvimento de apenas três novas classes de antibióticos: lipopeptídeos, oxazolidinonas e estreptograminas, e que tratam apenas bactérias Gram-positivas (AHMED et al., 2024), e o combate a bactérias Gram-negativas é ainda um desafio (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). A Organização Mundial da Saúde (OMS) alerta que o mundo ainda não está conseguindo desenvolver os tratamentos antibacterianos necessários, apesar da crescente conscientização sobre a ameaça urgente da resistência aos antibióticos. Em 2024 a OMS atualizou sua Lista de Patógenos Bacterianos Prioritários, destacando 15 famílias de bactérias resistentes a antibióticos que representam uma ameaça significativa à saúde humana. Entre os patógenos de maior preocupação estão as bactérias Gram-negativas multirresistentes, como *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenêmicos. Esses

microrganismos apresentam níveis de resistência que não estão sendo acompanhados pelo desenvolvimento de novas terapias eficazes, representando um desafio para a saúde pública.

Dessa forma, os peptídeos bioativos destacam-se como excelentes opções para o desenvolvimento de compostos terapêuticos em função de suas diversas funções fisiológicas. Dependendo do tipo, número, sequência e propriedades dos aminoácidos que os compõem, esses peptídeos podem apresentar uma ampla gama de atividades bioativas (AKBARIAN et al., 2022). Entre eles, duas classes promissoras são os CPP e AMP. Porém um dos grandes desafios para a utilização de peptídeos como novas moléculas de defesa é a sua permeabilidade na membrana plasmática.

A membrana plasmática é formada por um complexo de lipídios e proteínas de membrana, sendo três classes principais de lipídios: os glicerofosfolipídios, esfingolipídios e colesterol, que formam uma bicamada de aproximadamente 5 nm de largura (YANG; HINNER, 2015). São responsáveis por regular o fluxo de entrada e saída de nutrientes, dão forma à célula, atuam na comunicação célula-célula e sinalização processos, além de serem uma barreira para moléculas hidrofílicas, grandes ou carregadas, como proteínas, peptídeos e oligonucleotídeos (MATSUZAKI, 2019).

Para entrar nas células, os fármacos precisam cruzar a membrana plasmática, que apresenta uma bicamada lipídica composta por fosfolipídios e colesterol. A diversidade de fosfolipídios é baseada na composição dos grupos de cabeça polar, esqueleto (glicerol ou esfingolipídeo), tipo de ácido graxo e o grau de insaturação (TROFIMENKO, 2021), e suas características influenciam na entrada de compostos nas células.

As bactérias Gram-positivas possuem uma parede celular espessa, composta principalmente por peptidoglicano, que proporciona resistência à pressão osmótica e protege contra a ação de substâncias externas. Sua membrana plasmática, mais interna, é envolvida por essa camada espessa de peptidoglicano, que torna essas bactérias mais suscetíveis a antibióticos que interferem na síntese de parede celular (HANCOCK; SAHL, 2006). Já as bactérias Gram-negativas apresentam uma camada dupla de membranas, sendo a membrana externa composta por lipopolissacarídeos, que serve como uma barreira adicional contra antibióticos. A membrana interna contém lipídios e proteínas que controlam a entrada de substâncias, tornando-as mais resistentes a muitos agentes antimicrobianos em função de sua capacidade de impedir a penetração de substâncias (BLAIR et al., 2015).

A estrutura complexa das membranas bacterianas influencia diretamente os mecanismos de ação de peptídeos bioativos, como os antimicrobianos, que interagem de forma distinta com as membranas de cada tipo bacteriano. Uma das classes estudadas para contornar esse problema de permeabilidade são os peptídeos penetradores de célula, que apresentam grande permeabilidade em membranas, e têm sido bem estudados como agentes para *delivery* intracelular em doenças como o câncer.

3.2 Peptídeos penetradores de célula

Em geral, os CPP apresentam uma sequência com no máximo 30 resíduos de aminoácidos, em sua maioria do tipo básico, e geralmente catiônicos e/ou anfipáticos (RUSESKA; ZIMMER, 2020), propriedades desejáveis para um sistema de *delivery* celular. A citotoxicidade é um importante fator a ser avaliado para o *delivery* celular, e os CPP se destacam por apresentarem até então uma baixa citotoxicidade (DERAKHSHANKHAH; JAFARI, 2018). Diferente de outros agentes de *delivery*, os CPP são capazes de penetrar células de uma forma não invasiva, e promover o transporte de pequenas drogas, ácidos nucleicos, proteínas, lipossomos, nanopartículas e vírus (XIE et al., 2020).

Em geral, a entrega do fármaco por CPP pode ser realizada via conjugação covalente das moléculas do fármaco com um CPP; encapsulação de compostos terapêuticos em nanocarreadores ao CPP; e por adsorção física dos agentes terapêuticos com CPPs via complexação de carga.

O número de aminoácidos específicos presentes nos CPPs é um fator-chave para a determinação da eficiência de sua penetração. Em ordem decrescente, o número de resíduos de triptofano, histidina, leucina, alanina, glutamina, lisina e arginina são importantes na eficiência e hidrofobicidade, e também têm influência na eficiência, a qual é diretamente proporcional ao aumento da hidrofobicidade (DAMIATI et al., 2019).

A natureza dos aminoácidos catiônicos nos peptídeos determina suas habilidades de translocação. A arginina é um aminoácido básico carregados positivamente, que contém o grupo guanidina. A guanidina pode formar duas ligações de hidrogênio, que permitem interações eletrostáticas mais estáveis com os componentes da membrana plasmática, como polissacarídeos, o que por sua vez facilita a inserção e translocação de CPP através da bicamada lipídica (TROFIMENKO, 2021).

Os CPPs podem ser classificados principalmente quanto à sua origem, ao mecanismo de ação e às propriedades físico-químicas. Na classificação em relação à origem, podem ser classificados como quiméricos, derivados de proteínas ou sintéticos.

Em relação às propriedades físico-químicas, a classe catiônica é a principal, e compreende peptídeos com cargas líquidas altamente positivas em pH fisiológico, e se originam principalmente das cadeias curtas básicas de argininas e lisinas (GUIDOTTI; BRAMBILLA; ROSSI, 2017). A posição e o número de resíduos de aminoácidos presentes nos CPPs são importantes para a habilidade de penetração celular. Resíduos de arginina contribuem muito para a absorção celular, e uma das hipóteses para isso é a presença dos grupos guanidina, capazes de formar ligações de hidrogênio bidentado com grupos carboxílicos, sulfatos e fosfatos carregados negativamente na membrana celular (GUIDOTTI; BRAMBILLA; ROSSI, 2017). As outras duas classes são a anfipática, em que as sequências apresentam alto grau de anfipatia, especialmente por causa de resíduos de lisina em sua estrutura, e a classe hidrofóbica, que contém apenas resíduos hidrofóbicos não polares.

Apesar de 30 anos da descoberta de CPPs, seu mecanismo de internalização celular ainda não é bem descrito, porém há algumas sugestões de duas principais vias como mecanismos de internalização: translocação direta e endocitose (RUSESKA; ZIMMER, 2020). As principais dificuldades para elucidação dos mecanismos são as diferenças de tamanho, propriedades físico-químicas e a concentração dos CPPs (KUMAR et al., 2018). A translocação direta é um caminho independente de energia, que inclui mecanismos, como formação de poros, *carpet-like* e *inverted-micelle*. Em todos esses modelos, o primeiro contato ocorre entre resíduos catiônicos e as cargas negativas de grupos fosfatos e carboidratos presentes na bicamada lipídica (MADANI et al., 2011).

No modelo de formação de poros, as translocações de CPPs através da membrana são obtidas pela formação de poros transitórios causados pela inserção do CPP na membrana em uma estrutura em forma de anel (YE et. al., 2016). Para o *carpet-like*, os resíduos de aminoácidos com carga positiva se ligam aos grupos de fosfolipídios presentes na membrana, se associando na forma de um tapete e promovendo uma fluidez transitória para sua inserção. Uma concentração elevada de CPPs na membrana facilita esse processo de interação eletrostática e posterior penetração na membrana (DERAKHSHANKHAH et al., 2018; RUSESKA, 2020). No modelo *inverted-micelle*, há a interação do CPP com a membrana, causando perturbação da bicamada lipídica e, posteriormente, leva à formação de estruturas

hexagonais invertidas, chamadas micelas invertidas. Nesse modelo, o CPP fica preso no meio hidrofílico do núcleo da micela, e posteriormente a interação entre os componentes da membrana com o CPP leva à estabilização das micelas formadas, liberando o CPP no citosol (YE, et. al., 2016).

A endocitose é um caminho dependente de energia, sendo um processo no qual a membrana plasmática se dobra para dentro para transportar materiais originados de fora das células e absorvê-los (DERAKHSHANKHAH; JAFARI, 2018).

3.3 Peptídeos antimicrobianos

Os AMPs apresentam um amplo espectro de ação contra diversos microrganismos, sendo considerados uma promissora classe de biomoléculas contra a resistência bacteriana (SPLITH; NEUNDORF, 2011). São definidos como moléculas que apresentam menos de 100 resíduos de aminoácidos, derivados de diferentes fontes como plantas, mamíferos, insetos, com sua carga geralmente positiva e as regiões hidrofóbicas, importantes para a interação com a membrana plasmática (PUSHPANATHAN et al.; 2013).

Esses peptídeos possuem algumas classificações principais: quanto à sua origem, quanto à estrutura, quanto ao mecanismo de ação e à sua atividade.

- Origem: AMPs Naturais, que são obtidos de fontes biológicas, como seres humanos, animais, plantas ou microrganismos. Entre os exemplos mais conhecidos de AMPs naturais estão as defensinas (encontradas em humanos e animais) e os lipopolipeptídeos produzidos por microrganismos. AMPs Sintéticos, que são projetados e produzidos em laboratório, muitas vezes com o objetivo de otimizar suas propriedades, tornando-os mais eficientes (HUAN et al., 2020).
- Estrutura: Peptídeos catiônicos, que possuem carga positiva, permitindo interagir com as membranas celulares negativas de patógenos. Peptídeos aniônicos, que possuem carga negativa e interagem com a superfície das células de patógenos de carga positiva. Peptídeos com estrutura β -folha ou α -hélice, que podem ter propriedades antibacterianas e antifúngicas, em que essas estruturas facilitam a ação contra patógenos (LUO; SONG 2021).
- Mecanismo de ação: Interferência na Membrana, em que interagem com a membrana do patógeno, formando poros e alterando sua permeabilidade, resultando na morte celular. Inibição de Funções Intracelulares, penetrando na célula e inibindo processos

metabólicos essenciais, como a síntese de proteínas ou DNA. Imunomodulação, modulando respostas imunes, além de combater os patógenos diretamente. (HUAN et al., 2020).

- Atividade: São divididos em 18 categorias e as principais subclassificações são de ação antibacteriana, antiviral, antifúngica e antitumor. A maior parte são de peptídeos antibacterianos (cerca de 60%), seguidos de antifúngicos (26%) (HUAN et al., 2020).

A estrutura secundária dos AMPs é bem diversa, e são assim divididos em quatro grupos. O primeiro grupo é representado por peptídeos lineares ou que apresentam α -hélice; no segundo grupo, peptídeos com folhas β conectados por pontes dissulfeto; o terceiro, com ligações dissulfeto, loop e harpins, e o último grupo, com aminoácidos especiais ou modificados (AVCI; AKBULUT; OZKIRIMLI, 2018).

Bactérias utilizam de vários mecanismos para desenvolver resistência a antibióticos, o que tem sido atualmente uma preocupação global (DASSONVILLEKLIMPT; SONNET, 2020). Quando uma colônia de bactérias é exposta a um antibiótico, uma parte dela pode sofrer pequenas mutações genéticas que as deixem mais resistentes, permitindo assim recolonizar a infecção (WU et al., 2020). Enquanto que essa resistência bacteriana tende a ser prontamente adquirida para antibióticos convencionais, o surgimento dela com peptídeos antimicrobianos pode ser baixa (ZASLOFF, 2002).

Como os AMPs agem sobre a membrana bacteriana, para adquirir resistência a dada bactéria, teria que mudar a composição e organização de sua membrana, o que nem sempre é vantajoso para a maioria das espécies (ZASLOFF, 2002). No entanto, já foram descritos mecanismos bacterianos de resistência a peptídeos antimicrobianos, incluindo alterações na carga da membrana, secreção de proteases que degradam os AMPs, e sistemas de efluxo (MANGONI et al., 2016). Nesse contexto, a combinação de diferentes AMPs, com distintos mecanismos de ação, pode representar uma abordagem promissora para reduzir o risco de desenvolvimento de resistência e potencializar o efeito antimicrobiano (MISHRA et al., 2017). O mecanismo de ação contra um patógeno não depende de reconhecimento de alvos, dando aos AMP um amplo espectro de ação em que, ao permeabilizar a membrana, leva à morte celular (JORGE et al., 2012). A maioria das novas classes de antibióticos atuam contra bactérias Gram positivas, no entanto o maior desafio atualmente são as Gram negativas devido à complexidade de sua parede celular (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Semelhante aos CPPs, os AMPs apresentam mecanismos de ação dependente e independente de energia. Os AMPs agem interrompendo a integridade das membranas celulares pela interação de suas regiões catiônicas com componentes da superfície celular carregados negativamente, principalmente fosfolipídios (SPLITH; NEUNDORF, 2011). O modelo *carpet-like* é o mais citado, e nele os peptídeos se associam à superfície da membrana, formam um tapete e, assim como para o CPPs, quando a concentração específica necessária é atingida, ocorre a permeação na membrana e sua ruptura, levando à lise celular (PUSHPANATHAN et al., 2013).

Além de seu papel natural na resistência vegetal, AMPs derivados de plantas vêm sendo cada vez mais investigados como agentes terapêuticos, substitutos ou adjuvantes de antibióticos convencionais, sendo essa classe alvo de estudo desse trabalho. Sua ação direta contra microrganismos humanos e a baixa propensão ao desenvolvimento de resistência tornam essas moléculas candidatas atrativas para aplicações farmacêuticas e agrícolas (TAM et al., 2015). Ainda, os AMPs vegetais possuem a vantagem de serem considerados seguros, biodegradáveis e com menor toxicidade em relação a compostos sintéticos (YOUNT; YEAMAN, 2013).

Diversas classes de AMPs foram descritas em plantas, incluindo defensinas, tionaínas, quimarinas, heveínas e ciclopeptídeos. Cada grupo apresenta características estruturais específicas, mas geralmente compartilham a capacidade de se ligar a componentes da parede ou membrana dos patógenos, provocando sua destruição. A diversidade de AMPs em espécies vegetais reflete a coevolução com os microrganismos do ambiente, formando um arsenal bioquímico eficiente de proteção (SELS et al., 2008).

3.4 Dupla função: peptídeos penetradores de célula e antimicrobianos

Peptídeos com dupla função, atuando tanto como CPPs quanto AMPs, têm atraído atenção devido à sua capacidade de combinar atividades funcionais distintas em uma única molécula. CPPs e AMPs apresentam algumas características em comuns, como uma sequência de aminoácidos curta, caráter catiônico e anfifilicidade. Estudos mostraram que o CPP Tat apresenta atividade antibacteriana potente contra um amplo espectro de patógenos, incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, como *Staphylococcus aureus* e também fungos como *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans* (SPLITH; NEUNDORF, 2011). A Tabela 1 apresenta alguns CPPs que possuem também atividade antimicrobiana.

Tabela 1. Atividades inibitórias de peptídeos penetradores de membrana

Peptide	MIC (μ M)		
	Gram-negative	Gram-positive	Fungi
Tat (48–60)	2 (<i>E. coli</i> KCTC1682)	4 (<i>B. subtilis</i> KCTC1918) 4 (<i>S. aureus</i> KCTC1621)	24 (<i>S. cerevisiae</i> KCTC7296)
Penetratin	2 (<i>E. coli</i> KCTC1682) 25 (<i>E. coli</i> K12)	0.5 (<i>B. subtilis</i> KCTC3068) 1 (<i>S. aureus</i> KCTC1621) 1 (<i>B. megaterium</i>)	>25 (<i>S. cerevisiae</i> BY4741)
pVEC	25 (<i>E. coli</i> K12)	>10 (<i>B. subtilis</i> 168) >10 (<i>S. aureus</i> RN4220) 1 (<i>B. megaterium</i>)	>25 (<i>S. cerevisiae</i> BY4741)
Pep-1	32 (<i>E. coli</i> KCTC1682)	8 (<i>B. subtilis</i> KCTC3068) 64 (<i>S. aureus</i> KCTC1621)	Not reported
TP10	>10 (<i>E. coli</i> K12)	>10 (<i>B. subtilis</i>) 4 (<i>S. aureus</i>)	8 (<i>S. cerevisiae</i> BY4741)
MAP	25 (<i>E. coli</i> K12)	1 (<i>B. megaterium</i>)	>25 (<i>S. cerevisiae</i>)

Fonte: Splith; Neundorf, 2011

O trabalho de Lee et al. (2019), ao fazer a conjugação química de um peptídeo CPP da classe de argininas (R9) com AMP (magainin e M15) aumentou de 2 a 4 vezes a atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, e de 4 a 16 vezes contra bactérias Gram-negativas. Este aumento de eficiência antimicrobiana ocorre pelo fato de os peptídeos de dupla função possuírem uma capacidade aprimorada de se ligar e penetrar as membranas celulares, o que facilita a ação contra microrganismos.

Burns et al (2016) e Eksteen et al. (2020) também realizaram conjugação com sequências catiônicas e obtiveram compostos que apresentaram atividades contra células cancerígenas.

Nos bases de dados de AMPs e CPPs, a maioria das sequências depositadas são originadas de bactérias ou animais. Apenas 0,8% dos CPPs nas bases de dados são correspondentes às plantas (FREIRE et al., 2015), revelando um grande potencial inexplorado, que inclui a produção de moléculas bioativas para defesa contra patógenos, predadores e condições ambientais adversas.

Neste trabalho, a bioprospecção dos proteomas de girassol (*Helianthus annuus*) e pimentão (*Capsicum annuum*), assim como do proteoma e genoma da berinjela (*Solanum melongena*), busca identificar moléculas com propriedades bioativas que possam ter aplicações biotecnológicas amplas. Estudos mostram diversas proteínas ou peptídeos derivados dessas

plantas, que apresentam atividade antibacteriana, antifúngica e antitumoral. No caso do girassol, compostos derivados de seu proteoma têm demonstrado potencial na promoção do crescimento vegetal e na resistência a pragas, além de apresentarem propriedades antimicrobianas, assim como o pimentão que, pela presença de capsaicinoides, atua com atividades antitumorais e antimicrobianas (TAM et al., 2015; LI et al., 2021). Já a berinjela é conhecida principalmente por suas propriedades antioxidantes e antifúngicas (CHIU; POUCKET; LI, 2022). A identificação de peptídeos ativos derivados dessas plantas pode contribuir para o desenvolvimento de produtos inovadores, como antibióticos alternativos, agentes anticancerígenos e compostos de defesa naturais, promovendo *one health*: saúde humana, animal, vegetal e ambiental.

3.5 Criptídeos

Além das sequências completas de proteínas ou peptídeos, os criptídeos têm se destacado como uma fonte promissora de novas moléculas com potencial terapêutico. Criptídeos são fragmentos peptídicos biologicamente ativos derivados da clivagem de proteínas, que podem exibir atividades biológicas distintas das de sua proteína precursora (NER; KOTLINSKA; SILBERRING, 2015; IAVARONE et al., 2018). Contribuindo para o potencial de exploração de novas moléculas, os criptídeos também podem ser uma fonte de novos fármacos. Dessa forma, diferentes fragmentações de uma sequência proteica podem apresentar uma atividade de CPP e AMP, que está ausente em sua sequência completa.

Pane et al. (2017), em seu trabalho, identificaram sequências intituladas de “antimicrobianos crípticos”, vindos da análise de uma proteína GVF27. Essa abordagem amplia o conjunto de moléculas candidatas à aplicação terapêutica, uma vez que a maioria das proteínas codificadas nos genomas ainda não teve suas regiões internas analisadas com essa finalidade.

Outra vantagem da utilização da fragmentação para a busca de novas moléculas é a obtenção de uma sequência com menor número de resíduos de aminoácidos que a sequência funcional original, mas que ainda tenha a atividade biológica desejada. Esse mínimo tamanho da sequência biologicamente ativa pode ser vantajoso para a produção de moléculas pequenas em larga escala, diminuindo o custo. Em muitos casos, a sequência mínima bioativa é menor e mais estável, o que favorece seu uso como fármaco em termos de síntese, solubilidade, biodisponibilidade e menor custo de produção (CHEN et al., 2015). A possibilidade de obter peptídeos bioativos curtos com propriedades desejadas a partir de fragmentações, é vantajosa

por aspectos técnicos e econômicos, e também por permitir a engenharia de peptídeos multifuncionais. Assim, é possível desenhar criptídeos que combinem atividades antimicrobianas, capacidade de penetração celular e outras funções terapêuticas, o que os torna excelentes candidatos a fármacos.

3.6 Machine learning e bioinformática

A fim de facilitar a bioprospecção de novas moléculas terapêuticas, ML se apresenta como uma ótima alternativa para otimizar tempo experimental, diminuir custos em experimentos e indicar com boa acurácia quais moléculas apresentam potencial para determinada atividade biológica desejada. Em vez de depender exclusivamente de abordagens experimentais demoradas e custosas, modelos computacionais treinados com dados biológicos permitem prever com boa acurácia quais moléculas apresentam potencial para desempenhar determinada atividade biológica, como propriedades antimicrobianas, penetração celular, imunomodulação, entre outras.

Os métodos de ML são classificados em três tipos de técnicas de aprendizagem: aprendizagem supervisionada, não supervisionada, e semi-supervisionada ou reforçada. Abordagens de aprendizagem supervisionada são usadas para desenvolver e treinar modelos de previsão com padrões de dados de entrada e saída conhecidos, a fim de obter a previsão futura de quaisquer novos dados de entrada (BASITH et al., 2020). Por exemplo, na identificação de CPPs e AMPs, o modelo pode ser treinado com sequências rotuladas como "CPP" ou "não-CPP" e "AMP" ou "não-AMP", permitindo prever a funcionalidade de sequências desconhecidas. Esse tipo de abordagem é muito aplicado para dados biológicos, sendo uma forma de otimizar por exemplo a busca por novas moléculas terapêuticas, utilizando-se de dados já disponibilizados.

Durante o treinamento supervisionado, a máquina recebe uma grande quantidade de dados para identificar padrões específicos. No caso de sequências biológicas, atributos como carga, hidrofobicidade e comprimento podem ser utilizados para discriminar entre sequências com diferentes atividades biológicas. Após o treinamento, o modelo é testado com um conjunto de dados independentes para avaliar sua capacidade de generalizar as previsões. Normalmente, cerca de 80% dos dados disponíveis são utilizados para treinamento, enquanto os 20% restantes são usados para validação e teste do modelo, garantindo a robustez e a precisão das previsões (BONETTA; VALENTINO, 2020).

A aplicação de ML tem se beneficiado enormemente do aumento do volume de dados públicos disponíveis em bancos como UniProt, PDB, APD3 (Antimicrobial Peptide Database) e CAMP. Isso tem permitido o treinamento de modelos mais robustos e confiáveis. No entanto, a qualidade dos dados é tão importante quanto sua quantidade: conjuntos de dados desbalanceados, redundantes ou com erros de anotação podem comprometer a eficácia do modelo, levando a resultados enviesados ou irreprodutíveis.

Modelos de ML baseados em algoritmos como Random Forest, Support Vector Machines (SVM), Redes Neurais Artificiais (ANNs) e, mais recentemente, aprendizagem profunda (Deep Learning) têm sido amplamente empregados em ferramentas computacionais para previsão de AMPs e CPPs e auxiliam no desenho racional de novos peptídeos, aumentando as chances de sucesso nas etapas experimentais posteriormente.

Além disso, abordagens de *in silico* como ML permitem a simulação de fragmentações de proteínas, busca de criptídeos, identificação de domínios funcionais ocultos e otimização de propriedades farmacológicas, integrando múltiplas fontes de dados com análise de bioinformática avançada (MAURYA; KUSHWAHA ; MANI, 2021).

3.7 Preditores de peptídeos bioativos na literatura

A bioprospecção de novas moléculas é essencial para o desenvolvimento de terapias inovadoras, agentes antimicrobianos e aplicações agrícolas, e o uso de ferramentas computacionais tem se destacado como uma abordagem estratégica para acelerar novas descobertas, além da caracterização. Destacamos a seguir as principais ferramentas para caracterização individual de CPPs e AMPs disponíveis para livre acesso.

O CPPsite é uma ferramenta baseada em aprendizado de máquina que utiliza propriedades físico-químicas e a composição de aminoácidos para prever peptídeos com capacidade de penetração celular. Este preditor oferece uma base de dados manualmente curada e algoritmos precisos para análise (GAUTAM et al., 2013). O CPPred utiliza redes neurais e a incorporação de características estruturais, como ordem de sequência para melhorar a identificação de CPPs, sendo especialmente útil para peptídeos complexos (QIANG et al., 2020).

Para os AMPs, o APD3 fornece um banco de dados com informações estruturais e funcionais sobre AMPs conhecidos, incluindo detalhes sobre suas propriedades antimicrobianas, espectro de ação e possíveis aplicações (WANG et al., 2016). O CAMPR4

integra algoritmos de aprendizado de máquina para prever AMPs com base em sua composição, propriedades físico-químicas e estrutura, permitindo a categorização de peptídeos por tipo de atividade, como antibacteriana, antifúngica e antiviral (GAWDE et al., 2023). O *iAMPpred* utiliza-se do método SVM para classificar AMPs, utilizando características de composição, físico-químicas e estruturais (MEHER et al., 2017).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Proteômica e Bioquímica de Proteínas (LPBP) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBB) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), sob orientação da Professora Maria Cristina Baracat-Pereira. O trabalho foi realizado em colaboração com a coorientadora Professora Sabrina Silveira, do Departamento de Informática (DPI) da UFV, e com os discentes de graduação e de doutorado em Ciência da Computação, Igor Brasileiro e Gustavo de Oliveira, respectivamente, envolvidos na criação da ferramenta de prospecção baseada em *Machine Learning* (Aprendizado de Máquinas). O professor Ciro Rossi, coordenador do LPBP, e a Pós-Doutoranda Geniana da Silva Gomes, ambos do DBB, participaram nas etapas de análises bioquímicas, ensaios antimicrobianos e etapas de clonagem e expressão dos peptídeos desenhados. As TNS Karla Veloso e Cristiane Cesário, do Núcleo de Microscopia e Microanálise, auxiliaram nas análises de microscopia que confirmaram a ação antimicrobiana dos peptídeos desenhados.

4.1 Bioprospecção de CPP e AMP *in silico*

O preditor desenvolvido - intitulado de PeptiDuo -, foi projetado para identificar potenciais peptídeos de penetração celular (CPP) e atividade antimicrobiana (AMP), isoladamente, além de identificar os peptídeos com dupla função, a saber CPP e AMP simultaneamente. A ferramenta foi construída para analisar sequências presentes em genomas e proteomas de diferentes organismos, com foco específico em espécies vegetais, com sequências postadas em bases de dados disponíveis livremente na rede mundial de computadores.

4.1.1 Construção dos bancos de dados

Foram utilizados dois bancos de dados curados e válidos para a obtenção das sequências de CPP, o CPPsite 2.0 (Gautam et al., 2012; Agrawal et al., 2015), com cerca de 1.883 sequências retiradas da literatura e de patentes, e que continham validação experimental (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/cppsite/downloads.php>), e o C2Pred Server (Tang et al., 2016), contendo 411 sequências de CPP e 411 não-CPP (<http://lin-group.cn/server/C2Pred>). Sequências de AMPs foram obtidas de três principais bancos de dados, o DRAMP - Data Repository of Antimicrobial Peptides (Shi et al., 2022), com 5.819 sequências (<http://dramp.cpu-bioinfor.org/>), o APD3 - Antimicrobial Peptide Database (Wang et al., 2016), com 3.273 sequências (<https://aps.unmc.edu/>), e o 'LAMP2' (ZHAO et al., 2013,

<https://ngdc.cncb.ac.cn/databasecommons/database/id/4562>) com 23.253 sequências. Todos esses bancos de dados e os números de sequências depositadas são referentes ao período de outubro/2021 a junho/2022.

4.1.2 Atributos de treinamento

Alguns atributos foram selecionados para o treinamento do preditor. Os atributos carga líquida do peptídeo, hidrofobicidade, ponto isoelétrico, número de resíduos totais e massa molecular foram calculadas pelo PepDraw (<http://pepdraw.com>), e razão de resíduos hidrofílicos / número total de resíduos, pelo Peptide Calculator (<https://www.bachem.com/knowledge-center/peptide-calculator>). Além desses parâmetros, calculamos o número de resíduos de arginina, lisina, glutamina, alanina, leucina, triptofano, composição dipeptídica e composição atômica, usualmente utilizados para previsões biológicas.

4.1.3 Modelo classificador

Foram testados três classificadores: SVN (support vector machine, VAPNIK; CHERVONENKIS, 1970), Extra Trees (GEURTS; ERNST; WEHENKEL, 2006) e KNN (k-nearest neighbors, FIX, 1985) para a obtenção da maior precisão na previsão dos dados. Cada classificador possui um conjunto de parâmetros que deve ser otimizado durante o treinamento para que as métricas como precisão e acurácia sejam maiores e próximas de 1.

Para a validação cruzada, os bancos de dados foram divididos aleatoriamente em dez partições, de forma que nove foram usadas para a validação do algoritmo, e uma foi usada para o teste de predição. Esse processo foi repetido até que todas as partições tivessem sido utilizadas para o teste de predição.

4.1.4 Entrada de dados e análise de sequência

Para a entrada de dados, o preditor permite arquivos no formato multi-fasta, contendo sequências genômicas ou proteômicas. Estes arquivos podem incluir tanto sequências completas de genomas quanto de proteomas das espécies de interesse, sendo processados para identificação de peptídeos com potenciais atividades biológicas.

A análise das sequências ocorre de duas maneiras, permitindo maior flexibilidade e precisão na detecção de peptídeos com propriedades desejadas:

- Análise com Janela Deslizante (foco em criptídeos): Envolve o uso de uma janela deslizante, na qual o usuário determina o intervalo de aminoácidos da sequência que será analisada. Essa análise permite examinar sub-regiões específicas das sequências em busca de peptídeos com características de CPP, AMP ou dupla função. A janela deslizante possibilita a identificação de regiões com potencial funcional, mesmo que as propriedades desejadas não tenham sido detectadas para a sequência completa.
- Análise da Sequência Completa: Para complementar a análise da sequência em fragmentos, o preditor também realiza a avaliação da sequência completa. Essa abordagem é útil para identificar peptídeos que, quando considerados em sua totalidade, exibem atividade combinada de CPP e AMP, mas que poderiam ser perdidos na análise fragmentada.

A bioprospecção foi realizada utilizando proteínas de plantas depositadas no banco de dados NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) até 06/06/2022, e as análises pelo preditor foram realizadas por cerca de 2 meses. Foram selecionadas proteínas de espécies vegetais da família Solanaceae, como pimentão (*Capsicum annuum*), tomate (*Solanum lycopersicum*) e berinjela (*Solanum melongena*), e família Asteraceae, o girassol (*Helianthus annuus*). No caso da berinjela, tanto o proteoma quanto o genoma da planta foram utilizados, ampliando as possibilidades de identificação de peptídeos com características de dupla função.

4.1.5 Classificação final

Após a análise das sequências, o preditor utilizou métricas para classificar os peptídeos em três categorias com base em suas atividades biológicas: CPP, AMP e Dupla Função. Cada peptídeo gerado recebeu *scores* calculados a partir de parâmetros físico-químicos, como hidrofobicidade, carga líquida, potencial de interação com membranas e outras propriedades associadas à bioatividade dessas moléculas. Sendo assim, tivemos:

CPP: Classificados como capazes de atravessar membranas celulares com base em *scores* que indicam eficiência de internalização em células.

AMP: Avaliados quanto à capacidade de inibir ou matar patógenos, sendo classificados com *scores* elevados para características antimicrobianas, como potencial de lise da membrana bacteriana.

Dupla Função: Peptídeos que atingiram *scores* altos tanto nos critérios de penetração celular quanto nos de atividade antimicrobiana, sugerindo a dupla função.

A comparação entre os peptídeos gerados e os bancos de sequências utilizados para treinar o modelo foi realizada por meio das métricas de acurácia, precisão e sensibilidade. Essas métricas foram aplicadas para avaliar a eficácia do preditor em identificar corretamente os peptídeos de cada categoria. Os peptídeos com os maiores *scores* de predição em cada família foram ainda analisados por ferramentas de bioinformática para refinamento da bioprospecção. A Figura 1 esboça o esquema geral do desenvolvimento do preditor, com o qual, ao final, obtivemos a classificação de peptídeos como CPPs, AMPs e dupla função.

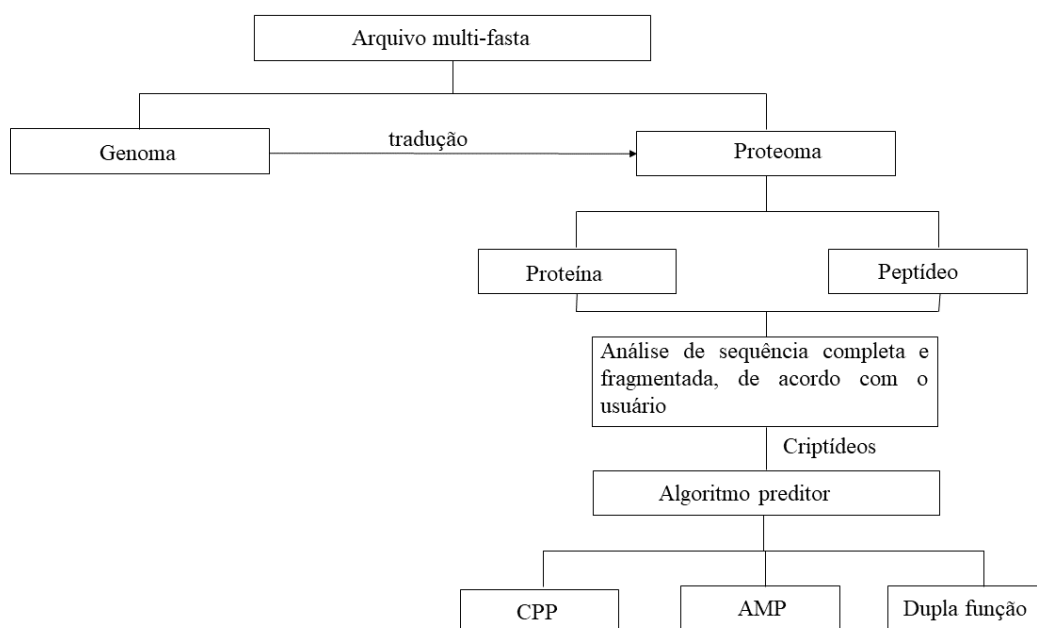


Figura 1. Fluxograma das atividades no preditor de dupla função, PeptiDuo

4.2 Análises de bioinformática e síntese dos peptídeos

Análises de bioinformática foram realizadas para os peptídeos melhor pontuados na predição para cada família para determinar qual a melhor sequência candidata para a síntese química. Dois preditores de CPP, MLCPP - Machine-learning-based prediction of cell-penetrating peptides (MANAVALAN et al., 2018; <http://www.thegleelab.org/MLCPP/>) e C2Pred (TANG et al., 2016, <http://lin-group.cn/server/C2Pred>) e três preditores de AMP, CAMP_{R4} - Collection of Anti-Microbial Peptides (GAWDE et al., 2023, <http://www.camp.bicnirrh.res.in/predict/>), AI4AMP - Identify Anti-Microbial Peptides in AI

(LIN et al., 2021, <https://axp.iis.sinica.edu.tw/AI4AMP/>) e *iAMPpred* - Improved Prediction of Antimicrobial Peptides (MEHER et al., 2017, <http://cabgrid.res.in:8080/amppred/server.php>) foram utilizados para a comparação de *score* obtidos em nosso preditor. Para avaliar carga líquida em pH 7, ponto isoelétrico e massa molecular, foi utilizado PepCal.com - Peptide property calculator (LEAR; COBB, 2016, <https://pepcalc.com/>) e o número de resíduos de aminoácidos positivos, negativos e hidrofobicidade, o Heliquest (GAUTIER et al., 2008, <https://heliquest.ipmc.cnrs.fr/cgi-bin/ComputParams.py>).

A capacidade dos peptídeos sintéticos de penetrar na célula, alergenicidade, resistência à proteólise, imunogenicidade, toxicidade e localização celular foram avaliados usando, respectivamente, as seguintes ferramentas de livre acesso: MLCPP, (MANAVALAN et al., 2018, <http://www.thegleelab.org/MLCPP/>); AllerTOP (DIMITROV et al., 2014; <https://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/>); Peptide Cutter (GASTEIGER et al., 2005, http://web.expasy.org/peptide_cutter/), Immunogenicity (CALIS et al., 2013, <http://tools.iedb.org/immunogenicity/>), Toxin (GUPTA et al., 2013, https://webs.iiitd.edu.in/raghava/toxinpred/multi_submit.php) e (KROGH et al., 2001, <https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>).

Três peptídeos preditos com dupla função e um predito como não apresentando atividade antimicrobiana ou de penetração celular foram selecionados para síntese na GeneOne (São Paulo, Brasil, <https://geneone-dev.azurewebsites.net/>), e a qualidade e pureza foram analisadas por cromatografia líquida de fase reversa e espectrometria de massa. Os peptídeos foram nomeados RB1 (LLRLHGRYRLWRRRRRRY, origem pimentão), RB2 (WYKRRQKRRNRR, origem girassol), RB3 (EAIIQEYKEEDE, origem girassol, controle negativo, sem dupla função) e RB4 (RHRRNRKRPYRN, origem berinjela).

4.2.1 Busca de padrões

Para identificar padrões em peptídeos com dupla funcionalidade (CPP e AMP) nas famílias de plantas analisadas, foram realizadas análises computacionais detalhadas. O alinhamento de sequências foi conduzido utilizando Clustal Omega (SIEVERS; HIGGINS, 2014, <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), uma ferramenta para alinhamento múltiplo de sequências. As propriedades físico-químicas, localização e repetição de resíduos de aminoácidos foram visualizadas no Mview (BROWN ; LEROY; SANDER, 1998), permitindo a identificação de padrões estruturais e funcionais relevantes.

Além disso, utilizou-se a ferramenta WebLogo (CROOKS et al., 2004, <https://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>) para criar representações gráficas que destacassem os resíduos de aminoácidos mais comuns em cada posição da sequência. Nessas representações, a altura total das pilhas dos resíduos de aminoácidos mostra o grau de conservação da posição em uma determinada sequência, enquanto a altura individual dos resíduos de aminoácidos indica sua frequência relativa. Isso permitiu identificar resíduos altamente conservados, sugerindo regiões para a funcionalidade dos peptídeos.

Para essas análises, foi preparado um arquivo FASTA contendo apenas um criptídeo por proteína, selecionado com base no maior *score* preditivo, ou seja, acima de 97% de probabilidade de apresentar ambas as funções (CPP e AMP). Essa abordagem resultou em listas otimizadas de peptídeos únicos para cada família de plantas.

4.3 Ensaio antibacteriano com os peptídeos sintetizados

Os quatro peptídeos sintetizados (RB1, RB2, RB3 e RB4) foram testados *in vitro* contra a bactéria patogênica Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (cepa ATCC 29213) e contra as bactérias patogênicas Gram-negativas *Escherichia coli* (cepa ATCC 35218) e *Ralstonia solanacearum* (cepa LPF 0710). Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços, de fundo plano, e foram acrescidos nos poços meio Luria Bertani (LB), 10 µL do inóculo com densidade óptica (OD) = 0,5 e o peptídeo nas concentrações finais de 700, 350 e 175µM, sendo o volume do ensaio final de 100 µL. Os ensaios foram realizados a 37°C por 24 h, e a absorvância a 596 nm foi determinada a cada 2 h, ao longo de todo o experimento. As análises foram feitas em triplicata. O antibiótico canamicina (30µg.µL⁻¹) foi utilizado como controle positivo para a morte celular. O controle negativo correspondeu apenas ao meio LB (RODRIGUES et al., 2023).

4.4 Ensaio de permeabilidade na membrana com os peptídeos sintetizados

Para avaliar o efeito dos peptídeos preditos na permeabilidade da membrana de células bacterianas, foram realizados ensaios antimicrobianos utilizando a bactéria *Ralstonia solanacearum*, monitorados por microscopia confocal, para os quatro peptídeos sintetizados (RB1, RB2, RB3 e RB4). Esse método permitiu verificar alterações na integridade da membrana celular ao longo do tempo, utilizando marcadores fluorescentes.

Foi preparado um inóculo de *Ralstonia solanacearum* em meio LB, incubado a 37°C sob agitação lenta, até que a OD a 596 nm alcançasse 0,5. Em Eppendorf, foi realizada a seguinte preparação: 20 µL do inóculo de *Ralstonia solanacearum* (OD = 0,5), 35 µL do peptídeo a ser testado, ajustado para uma concentração final de 175 µM, e 55 µL de meio LB, perfazendo 110 µL por ensaio, tendo sido preparado um ensaio individual para cada tempo avaliado e o ensaio na ausência dos peptídeos como controle (tempo zero). Cada mistura foi incubada à temperatura de 37°C, e as leituras foram realizadas em intervalos de 4 e 8 horas após a adição do peptídeo, permitindo a avaliação de efeitos imediatos e prolongados sobre a membrana bacteriana.

Para visualização da permeabilidade membranar, cada ensaio de microscopia foi preparado com a adição de uma gota de dois marcadores fluorescentes: Fluoresceína Isotiocianato (FITC, a 2 µg.µL⁻¹), um marcador que se associa a estruturas celulares intactas e fluoresce em verde, permitindo visualizar células com membranas preservadas, e Iodeto de Propídio (PI, a 20 µg.µL⁻¹), um corante que interage apenas com células com membranas danificadas, emitindo fluorescência vermelha ao se ligar ao DNA intracelular.

Os ensaios foram então montados em lâminas para análise de fluorescência em microscópio confocal. A leitura foi realizada imediatamente após a adição dos corantes para o tempo zero, e em intervalos de 4 e 8 h, para observar a progressão dos danos de permeabilidade induzidos pelo peptídeo ao longo do tempo.

4.5 Clonagem e expressão de proteínas recombinantes

Três sequências de peptídeos com dupla função, identificadas por predições realizadas com o PeptiDuo, foram selecionadas para a etapa de clonagem. Duas dessas sequências foram originadas do pimentão, enquanto a terceira foi derivada do girassol. O gene *dfp1* foi projetado a partir do peptídeo RB1, cuja sequência peptídica é LLRLHGRYRLWRRRRRRY. O gene *dfp2* foi derivado de uma sequência peptídica semelhante, LLRLHGRARLRRRRRRRY, também oriunda do pimentão. O gene *dfg1*, por sua vez, foi construído com base na sequência do peptídeo RB2, WYKRRQKRRNRR, originado do girassol. Os genes foram sintetizados e preparados para posterior expressão em sistemas heterólogos, visando a validação experimental das funções preditas e a avaliação de sua atividade biológica.

4.5.1 Obtenção das sequências gênicas para a síntese

Como a massa molecular de cada peptídeo era inferior a 15 kDa, foram criadas versões quiméricas de cada sequência, combinando repetições em *tandem* do peptídeo em uma única sequência, em que os resíduos de aminoácidos aromáticos foram substituídos por resíduos similares não aromáticos, mantendo-se a dupla função prevista. Essa modificação foi essencial para permitir a posterior clivagem entre cada sequência, usando-se a protease quimotripsina.

Dessa forma, as sequências finais obtidas foram:

Quimera dfp1:

LLRLHGRLRLRRRRRRYLLRLHGRLRLRRRRRRYLLRLHGRLRLRRRRRRYLLR
LHGRLRLRRRRRRYLLRLHGRLRLRRRRRRYLLRLHGRLRLRRRRRRYLLRLHG
RLRRRRRRY

Quimera dfp2:

LLRLHGRARLRRRRRRYLLRLHGRARLRRRRRRYLLRLHGRARLRRRRRRYLL
RLHGRARLRRRRRRYLLRLHGRARLRRRRRRYLLRLHGRARLRRRRRRYLLRL
HGRARLRRRRRRY

Quimera dfg1:

WLKRRQKRRNRRWLKRRQKRRNRRWLKRRQKRRNRRWLKRRQKRRNRRWLKRR
QKRRNRRWLKRRQKRRNRRWLKRRQKRRNRRWLKRRQKRRNRRWLKRRQKRRN
RR

Com o objetivo de prever a presença de peptídeos sinal, as três sequências foram submetidas à análise utilizando o programa SignalP (ALMAGRO ARMENTEROS et al., 2019, <https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>). Em paralelo, o software TMHMM (KROGH et al., 2001, <https://services.healthtech.dtu.dk/services-/TMHMM-2.0/>) foi usado para identificar alças transmembranas.

Posteriormente, as sequências gênicas foram clonadas no vetor pET28a (Figura 2), ideal para expressão em *Escherichia coli* DH5 α . As inserções foram realizadas entre os sítios de restrição das enzimas NheI e XhoI, permitindo a expressão intracelular das proteínas-alvo com adição de uma cauda de hexa histidina (6xHis) na extremidade N-terminal. A inserção correta

das sequências clonadas foi verificada por meio de ferramentas de bioinformática descritas a seguir, para assegurar a precisão e integridade da sequência clonada.

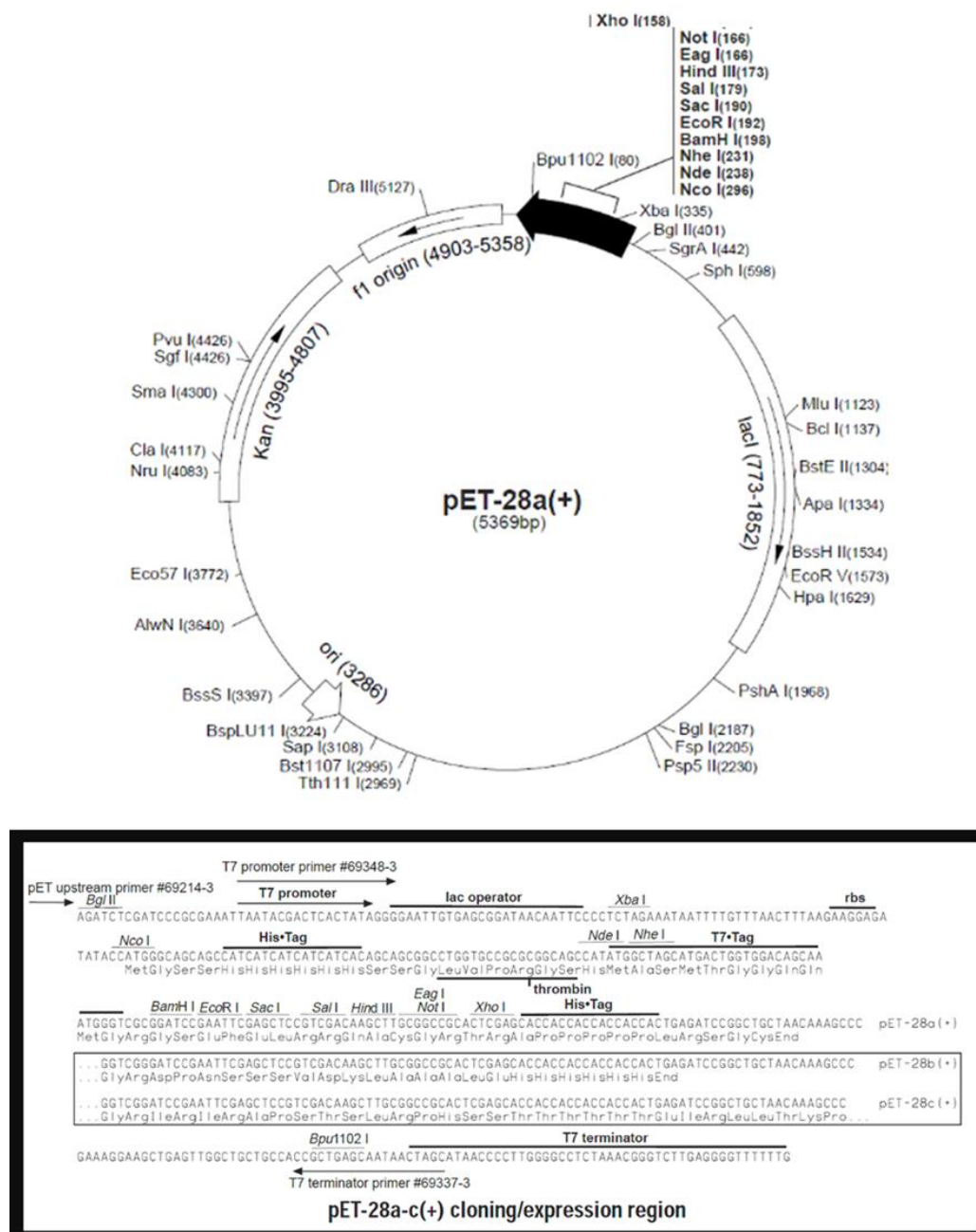


Figura 2. Vetor de expressão pET-28a usado para clonar as sequências previstas de peptídeos com dupla função, CPP e AMP.

Para maximizar a eficiência de expressão em *E. coli* da linhagem DH5 α , as sequências gênicas das proteínas-alvo foram otimizadas utilizando a ferramenta IDT Codon Optimization

Tool (Integrated DNA Technologies; <https://www.idtdna.com/pages/tools/codon-optimization-tool>). Essa ferramenta realiza a adaptação dos códons, ajustando-os para aqueles mais comumente utilizados por *E. coli*, o que favorece uma tradução mais eficiente e uma produção maior das proteínas recombinantes. Em seguida, as sequências geradas foram analisadas com o NEBcutter (VINCZE et al., 2003, <https://nc3.neb.com/NEBcutter/prj/>) para garantir a ausência de sítios de restrição indesejados, mantendo a integridade das sequências e facilitando o processo de clonagem.

Para a validação final, as sequências gênicas das proteínas recombinantes foram submetidas a uma tradução *in silico* e alinhadas com as sequências originais, utilizando as ferramentas Translate Tool (GASTEIGER, E. et al, 2005, <https://web.expasy.org/translate/>) e Clustal Omega (SIEVERS; HIGGINS, 2014, <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Esse procedimento assegurou que as proteínas clonadas correspondiam às originais, sem alterações prejudiciais nas sequências proteicas.

Após as validações acima, os genes abaixo foram obtidos e sintetizados pela FastBio (São Paulo, Brasil, <https://fastbio.com.br/>).

4.5.2 Confirmação das clonagens

Os clones das proteínas-alvo (pET28a/dfp1, pET28a/dfp2 e pET28a/dfg1) foram introduzidos na cepa *Escherichia coli* DH5 α por meio de transformação bacteriana utilizando o método de choque térmico.

Para as transformações, foram preparadas alíquotas de 100 μ L de células competentes de *E. coli* DH5 α . Após retiradas do ultra-freezer, 100 ng de DNA plasmidial de cada clone foram adicionados às células competentes. As amostras foram mantidas em banho de gelo por 30 min e, em seguida, submetidas a um choque térmico a 42 °C por 45 s em banho-maria. Imediatamente após, as células foram resfriadas em banho de gelo por 2 min. Após o tratamento térmico, as células transformadas foram ressuspensas em 1 mL de meio LB sem antibiótico e incubadas sob agitação a 180 rpm, a 37 °C, durante 2 h para recuperação celular, e então centrifugadas a 2.795 g por 5 min. O sobrenadante foi descartado, mantendo-se um volume de aproximadamente 100 μ L, utilizado para ressuspender o *pellet* celular. Essa suspensão foi então distribuída em placas de LB-ágar contendo canamicina (50 μ g.mL⁻¹) como agente de seleção. As células foram espalhadas com uma alça de Drigalski e as placas foram incubadas a 37 °C por 16 h para permitir o desenvolvimento das colônias. Os clones transformantes foram

selecionados com base na resistência à canamicina, e a extração do DNA plasmidial foi realizada seguindo o protocolo de minipreparação de plasmídeos.

4.5.3 Extração do DNA plasmidial

Para a extração do DNA plasmidial pelo método de miniprep, foram utilizados 5 mL de cada cultura bacteriana contendo os clones de DNA das proteínas-alvo. As culturas derivadas de colônias isoladas foram cultivadas em meio LB e selecionadas previamente durante as transformações. Essas culturas foram centrifugadas a 11.180 g por 2 min, e o pellet celular resultante foi ressuscitado em 200 µL da Solução 1 (contendo 25 mM de Tris-HCl, 10 mM de EDTA, 50 mM de glicose) com a adição de 5 µL de RNase (10 mg.mL⁻¹), seguida de incubação à temperatura ambiente por 10 min.

Após a incubação inicial, 200 µL da Solução 2 (200 mM de NaOH e SDS 10%) foram adicionados à suspensão, que foi misturada suavemente por inversão e incubada em banho de gelo por 5 min. Em seguida, 200 µL da Solução 3 (5 M de acetato de potássio e 2 M de ácido acético) foram acrescentados, e a amostra foi centrifugada a 11.180 g por 10 min. O sobrenadante foi cuidadosamente recolhido para a etapa de precipitação do DNA plasmidial, utilizando 800 µL de isopropanol, com uma incubação a -20 °C por 2 h. Após esse período, as amostras foram novamente centrifugadas a 11.180 g, e o sobrenadante foi descartado. O pellet de DNA foi lavado com 500 µL de etanol a 70% v/v e submetido a uma última centrifugação a 11.180 g. Finalmente, o pellet de DNA plasmidial foi eluído em 20 µL de água livre de RNase e armazenado a -20 °C.

4.5.4 PCR

A clonagem dos DNAs plasmidiais em *E. coli* DH5α foi confirmada por PCR, que visou amplificar um fragmento correspondente à região do promotor T7 do vetor pET28a, que engloba a área do sítio de clonagem em que as proteínas-alvo foram inseridas. Os *primers* utilizados estão apresentados na Tabela 2, e a composição da reação de PCR encontra-se detalhada na Tabela 3. As reações foram realizadas no termociclador sob as condições padronizadas: 95 °C por 5 min para desnaturação inicial, 35 ciclos de: 95 °C por 30 s para desnaturação, 48 °C por 30 s para anelamento e 72 °C por 1 min para extensão, e por fim 7 min a 72 °C para completar a extensão final. Água foi usada como controle negativo e DNA de uma proteína previamente clonada em pET28a (460 pb), como controle positivo. Cada reação de PCR utilizou 2 µL de DNA da amostra em um volume final de 25 µL por reação.

Tabela 2. Sequências de primers promotor T7 vetor pET28a

Primers	Sequência	Amplicon
T7 promotor (<i>forward</i> - F)	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	300 pb (vetor vazio)
T7 terminador (<i>reverse</i> - R)	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'	

Tabela 3. Reação padrão utilizada para preparo de PCR

Reagente	Volume (μ L)
Tampão Taq DNA polimerase com Mg^{2+}	5,00
dNTPs	1,00
Primer F	1,00
Primer R	1,00
DNA a ser avaliado	2,00
Taq DNA polimerase	0,25
Água nuclease <i>free</i>	39,75
Total	50,00

Os produtos de PCR de cada amostra de DNA foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%, para confirmar a presença das bandas amplificadas específicas correspondentes a cada clone. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta para verificar as bandas amplificadas.

4.5.5 Expressão de proteínas

Para a expressão das proteínas recombinantes, cada DNA plasmidial pET28a/dfp1, pET28a/dfp2 ou pET28a/dfg1 foi introduzido nas cepas de expressão *Escherichia coli* SHuffle® T7 e ArcticExpress. Realizou-se uma transformação por choque térmico para cada proteína em ambas as cepas, conforme já descrito, com algumas adaptações específicas para as cepas de expressão.

Primeiramente, as culturas selvagens de *E. coli* SHuffle® T7 e ArcticExpress foram cultivadas em 5 mL de meio LB sem antibiótico por 16 h a 37 °C, sob agitação a 180 rpm. Durante esse processo, a cepa *E. coli* ArcticExpress foi suplementada com gentamicina (35 mg.mL⁻¹), em função da sua resistência intrínseca ao antibiótico. Em seguida, ambas as cepas foram tratadas com cloreto de cálcio (CaCl₂) para aumentar a competência celular.

O pré-tratamento com CaCl₂ foi realizado utilizando uma solução de CaCl₂ 0,1 M. Para isso, 1 mL de cada cultura foi centrifugado a 7.155 g por 5 min, e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, o pellet celular foi lavado com CaCl₂ 0,1 M e mantido em banho de gelo. Após nova centrifugação nas mesmas condições, o sobrenadante foi novamente descartado, e o pellet foi ressuspensionado em 100 µL de CaCl₂ 0,1 M.

As colônias selecionadas foram cultivadas em 5 mL de meio LB com canamicina (50 mg.mL⁻¹) a 37 °C, sob agitação a 180 rpm por 16 h. Após o crescimento, realizou-se a extração do DNA plasmidial e a confirmação da correta inserção dos genes das proteínas-alvo nas cepas de expressão por meio de PCR. Isso garantiu a presença e a integridade das construções plasmidiais para a etapa de expressão das proteínas recombinantes nas cepas selecionadas.

4.5.6 Indução e expressão das proteínas recombinantes

Para garantir a qualidade do inóculo, iniciou-se com um pré-inóculo utilizando clones positivos de pET28a/dfp1 (*E. coli* SHuffle® T7), pET28a/dfp2 e pET28a/dfg1 (*E. coli* ArcticExpress). Cada cultura foi iniciada com 20 µL de estoques de clones, armazenados em glicerol a 20% v/v, em 15 mL de meio LB contendo os antibióticos canamicina (50 mg.mL⁻¹, 2 µL) e gentamicina (35 mg.mL⁻¹, 1 µL) para a *E. coli* SHuffle® T7 e apenas canamicina (50 mg.mL⁻¹, 2 µL) para *E. coli* ArcticExpress. As culturas foram incubadas a 37 °C, sob agitação de 180 rpm, por 16 h.

Após essa etapa, todo o volume de cada pré-inóculo foi transferido para 500 mL de meio LB, suplementado com as mesmas concentrações de canamicina e gentamicina, e incubado a 30 °C com agitação a 180 rpm até que a densidade óptica a 600 nm atingisse entre 0,4 e 0,6. Em seguida, a expressão proteica foi induzida com a adição de 500 µL de Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) a 1 mM nas culturas, que foram mantidas a 12 °C e agitação de 180 rpm durante 24 h (*E. coli* SHuffle) e por 37 °C e agitação de 180 rpm por 3 h (*E. coli* ArcticExpress). Ao final do cultivo, as células foram centrifugadas a 11.180 g por 15 min a 4 °C, e os pellets resultantes foram armazenados a -20 °C para posterior análise.

4.5.7 Lise celular e preparo das frações solúvel e de corpo de inclusão

Para análise da expressão das proteínas, os pellets foram lisados com tampão PBS (137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 10 mM de Na₂HPO₄, 1,8 mM de KH₂PO₄) contendo 5% v/v de glicerol, 1 mM de fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF, inibidor de serino proteases) e 200 µg.mL⁻¹ de lisozima. Para cada 30 mL de cultura, foram adicionados 6 mL do tampão de lise, e as amostras foram incubadas em banho de gelo por 15 min. A ruptura celular foi realizada por sonicação (a 100% de amplitude por 5 min, com intervalos de 30 s).

Após a sonicação, as amostras foram centrifugadas a 11.180 g por 15 min a 4 °C. A fração solúvel, obtida do sobrenadante, foi separada, e o pellet, contendo o corpo de inclusão, foi ressuspensionado em 3 mL da solução anterior. A concentração de proteínas nas frações foi determinada pela metodologia Qubit Fluorometric Quantification (Thermo Fisher Scientific, MA, USA).

4.5.8 Análise das frações por eletroforese monodimensional e Western blotting

A fração solúvel e a fração contendo os corpos de inclusão das proteínas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 14%. A confirmação da expressão foi realizada por Western blotting, utilizando anticorpos específicos para a marcação da cauda 6xHis, permitindo a identificação das proteínas recombinantes.

SDS-Tricina PAGE (SCHAGGER e von JAGOW, 1987), foi utilizada para a separação de proteínas de baixa massa molecular. Nesse gel, dispomos de três camadas: empilhamento (5% T e 2,6% C), espaçador (10% T e 3% C) e separação (16,5% T e 3% C). Para cada corrida, foram separados 18 µL das amostras, previamente misturados com tampão de amostra contendo SDS e β-mercaptoetanol, garantindo a carga negativa e a desnaturação das proteínas, respectivamente.

A corrente elétrica foi mantida constante a 80 V até que as proteínas atingissem a extremidade inferior do gel. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R250 por 30 min, seguido de descoloração em solução de ácido acético 7,5% v/v e metanol 25% v/v.

Para a confirmação da expressão das proteínas recombinantes, foi realizada a técnica de Western blotting, em que 18 µL das frações solúvel e de corpos de inclusão provenientes da expressão das proteínas foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida, como

descrito anteriormente. Após a corrida eletroforética, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) utilizando um sistema semisseco a 400 mA por 1 h, em tampão de transferência composto por 39 mM de glicina, 48 mM de Tris base e 20% v/v de metanol.

Após a transferência, as membranas foram lavadas três vezes por 5 min em tampão PBS-T (PBS contendo 0,1% v/v de Tween 20) para remover excesso de reagente. A seguir, a membrana foi corada com solução de Ponceau S (0,1% Ponceau S em ácido acético glacial 10% v/v) para visualização das proteínas transferidas, permitindo a confirmação da transferência eficiente para a membrana.

Em seguida, a membrana foi incubada por 1 h em uma solução de bloqueio contendo 450 mg de albumina sérica bovina (BSA) diluída em PBS-T para bloquear sítios não específicos. Para a imunodeteção das proteínas de interesse, a membrana foi incubada por 1 h com o anticorpo primário anti-HIS produzido em camundongo, diluído na proporção 1:3000 em PBS-T. Posteriormente, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo, diluído 1:5000 em PBS-T, por 1 h. Após cada incubação com os anticorpos, a membrana foi lavada três vezes por 5 min em PBS-T para remover os anticorpos não ligados.

A detecção das proteínas foi realizada pela incubação da membrana com solução de revelação, contendo 10 mg do reagente 3,3-diaminobenzidina (DAB) dissolvido em 10 mL de Tris-HCl a 100 mM, pH 7,6, com 0,1% de NiCl₂ e adição de 10 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). As bandas de proteínas de interesse foram visualizadas e registradas para análises posteriores.

5. RESULTADOS

5.1 Bioprospecção de CPP e AMP *in silico*

Para a construção dos bancos de dados utilizados no desenvolvimento do preditor de dupla função, foram coletadas 1.460 sequências não-CPP e 871 sequências CPP, além de 21.074 sequências não-AMP e 6.783 sequências AMP. As sequências redundantes foram removidas para garantir a qualidade nos bancos finais.

Considerando a natureza biológica do sistema, os atributos escolhidos para as análises basearam-se em propriedades físico-químicas características das famílias de CPP e AMP. Entre essas propriedades, destacam-se a carga catiônica e o grau de hidrofobicidade, que são padrões

comuns a esses peptídeos. A seleção dos atributos foi fundamentada em estudos prévios sobre a construção de preditores, garantindo que as características selecionadas fossem relevantes para a classificação.

O treinamento inicial foi realizado para a classe CPP, que apresentava menor disponibilidade de informações. Após a obtenção de métricas satisfatórias de acurácia, precisão e revocação, os mesmos atributos foram testados para a classe AMP. Nesse caso, não foram necessárias alterações, e o modelo apresentou desempenho igualmente robusto.

No entanto, foi observado um desbalanceamento entre o número de sequências negativas (não-CPPs e não-AMPs) e positivas (CPPs e AMPs), particularmente para AMP, pois as sequências não-AMPs superaram em quantidade as AMPs. Esse desbalanceamento poderia influenciar na classificação, favorecendo a predição de novas sequências como negativas. Para diminuir esse problema, foi utilizada uma estratégia de reorganização do *dataset* baseada em técnicas de *ensemble learning*. As sequências negativas para AMP foram divididas em duas partes, enquanto o total de sequências positivas foi mantido intacto, resultando em dois subconjuntos mais equilibrados. O treinamento foi realizado separadamente em cada subconjunto, e as métricas finais foram obtidas pela média do desempenho nesses subconjuntos. Essa abordagem permitiu que tanto o preditor CPP quanto o preditor AMP alcançassem resultados consistentes, mesmo em cenários de desbalanceamento, assegurando uma alta qualidade de predição para ambos os casos.

5.2 Seleção do modelo

A escolha do modelo foi realizada por meio da otimização de parâmetros durante o treinamento, com o objetivo de maximizar métricas de desempenho, como acurácia, precisão e revocação, para os classificadores testados. Esses parâmetros foram ajustados para alcançar valores próximos de 1, garantindo previsões mais assertivas. Após a aplicação de validação cruzada para os modelos testados, o modelo Extra Trees se destacou pelo melhor desempenho. Este método apresentou uma acurácia de 98% para a predição de AMPs e 96% para CPPs, sendo a acurácia definida como a proporção de previsões corretas (positivas e negativas) em relação ao total de previsões realizadas. Além disso, o modelo demonstrou métricas adicionais de desempenho significativas. Para a métrica de precisão, que avalia a proporção de classificações positivas que foram realmente corretas, os valores obtidos foram 96% para AMPs e 80% para CPPs. Já a revocação, que mede a proporção de rótulos positivos corretamente classificados, apresentou 98% para AMPs e 75% para CPPs.

O modelo Extra Trees utiliza a construção de múltiplas árvores de decisão aleatórias, agregando os resultados por meio de uma média para obter a classificação final. Essa abordagem é vantajosa por reduzir vieses, resultado da aleatoriedade na geração de árvores (GEURTS et al., 2006).

A análise das métricas avaliadas indicou um desempenho superior para a predição dos AMPs, possivelmente em função da maior disponibilidade de sequências positivas em seu conjunto de dados de treinamento. No caso da predição dos CPPs, apesar de métricas um pouco inferiores, os valores foram considerados satisfatórios, dada a menor disponibilidade de informações e a novidade do tema na literatura. O classificador foi projetado para operar em dois filtros sequenciais: inicialmente classifica as sequências como CPPs, e posteriormente como AMPs. Sequências positivas em ambas as categorias são listadas separadamente, apresentando as respectivas porcentagens para cada classe.

A estratégia de classificação utilizada neste trabalho demonstrou eficiência similar ou superior à de preditores individuais de CPPs e AMPs reportados na literatura. Esses resultados indicaram que o modelo Extra Trees pode ser aplicado de forma eficaz em cenários de bioprospecção, mesmo em condições de dados desbalanceados. A Tabela 4 compara os resultados de acurácia obtidos com o preditor aqui desenvolvido, nomeado PeptiDuo, com os resultados de preditores já descritos, evidenciando a competitividade do método proposto.

Tabela 4 - Performance de comparação dos preditores de AMP e de CPP reportados na literatura com o preditor desenvolvido neste trabalho, nomeado PeptiDuo

	Preditor	% de Acurácia
AMP	iAMPred	90
	AI4AMP	88
	CAMPR4	93
	PeptiDuo	98
CPP	C2Pred	83
	MLCPP	93
	PeptiDuo	96

Os descritores mais relevantes identificados pelo modelo preditivo desenvolvido foram o ponto isoelétrico, a carga líquida e os resíduos de aminoácidos específicos K (lisina), R (arginina) e L (leucina). A composição de dipeptídeos, como RN (arginina-asparagina), KG (lisina-glicina) e RG (arginina-glicina), apresentou alta prevalência em peptídeos de dupla função. Esses atributos estão diretamente ligados com as propriedades físico-químicas e estruturais associadas aos CPPs e AMPs.

Para sua funcionalidade, na entrada de dados, o preditor permite arquivos multi-fasta contendo sequências genômicas ou proteômicas das espécies de interesse, sendo processadas para identificação de peptídeos com potenciais atividades biológicas.

Empregando a valiosa função do preditor de analisar arquivos multi-fasta com sequências genômicas ou proteômicas de espécies de interesse, foram aqui processadas independentemente as sequências completas de um genoma e de três proteomas para identificar peptídeos com potenciais atividades biológicas, conforme a seguir. Além de avaliar as sequências completas, pelo método de janela deslizante, foram examinadas sub-regiões específicas de sequências genômicas ou proteômicas. Essa abordagem possibilitou a identificação de criptídeos pequenos, com potencial funcional, localizados dentro das sequências maiores funcionais, permitindo identificar os peptídeos cuja atividade biológica só poderia ser observada se a sequência íntegra fosse analisada, otimizando dessa forma a busca de peptídeos de dupla função. O resultado final dos peptídeos preditos é gerado em uma tabela no formato "CSV" (Comma-Separated Values), contendo os dados preditos para cada sequência analisada do genoma ou proteoma.

Embora as análises tenham sido realizadas apenas em espécies vegetais neste trabalho, o preditor foi treinado utilizando um conjunto abrangente de sequências depositadas em bancos de dados contendo sequências de organismos diversos. Isso confere amplitude à nossa ferramenta, permitindo sua aplicação para a avaliação de peptídeos de diferentes organismos e levando a possibilidades de exploração e bioprospecção de uma grande abrangência de novas moléculas bioativas.

5.3 Análises *in silico*

Após todas as análises dos proteomas do pimentão, do girassol e da berinjela pelo preditor para identificar peptídeos de dupla função, utilizamos ferramentas de bioinformática para selecionar os melhores candidatos para que a síntese química fosse realizada. A Tabela 5

mostra alguns dos parâmetros utilizados para a comparação e seleção dos peptídeos. Ao final, selecionamos três peptídeos que foram preditos com dupla função (RB1, RB2 e RB4) e um que foi predito como não funcional, intitulado como controle negativo (RB3). Esses peptídeos tiveram como origem o proteoma de pimentão, girassol e berinjela. A Tabela 6 apresenta mais algumas sequências preditas como promissoras pelo PeptiDuo, porém que não foram sintetizadas.

Tabela 5. Alguns parâmetros analisados para a escolha das sequências sintetizadas nesse trabalho (RB1, RB2, RB3 e RB4), previstas pelo PeptiDuo

Peptídeos previstos pelo PeptiDuo		Preditor Dupla Função (Score, %)*		Outros preditores de CPP (Score, %)*		Outros preditores de AMP (Score, %)*			Atributos			
Origem	Sequência Obtida	PeptiDuo para CPP	PeptiDuo para AMP	MLCPP	C2PRED	CAMP R3	iAMPred	AI4AMP	Carga líquida em pH 7	pI teórico	MW (g.mol ⁻¹)	toxicidade
Pimentão (RB1)	LLRLHGRYRLWWWW WWY	98,59	98,5	99,04	99,28	99,9	79	98,84	3	10,9	2763,21	não- tóxico
Girassol (RB2)	WYKRRQKRRNRR	98,8	99,5	98,7	98,8	99,7	79	94,54	8	12,41	1803,09	não- tóxico
Girassol Controle negativo, sem dupla função (RB3)	EAIQYKKEEDE	10,95	11,2	15,9	12,7	5	3,2	1	-5	3,83	1495,54	não- tóxico
Berinjela (RB4)	RHRRNRKRPYRN	95	97,6	98,71	98,6	99,5	0,64	74,8	7	12,41	1708,94	não- tóxico

* Os valores obtidos para cada preditor, em %, correspondem à pontuação (*score*) para classificação quanto à probabilidade de funcionalidade como CPP (por MLCPP e C2Pred) ou AMP (por CAMP R3, *i*AMPred e AI4AMP) ou peptídeo dupla função (por PeptiDuo, valores individuais para CPP e AMP).

Tabela 6. Outros criptídeos obtidos com melhores avaliações pelo PeptiDuo

Origem	Sequência Obtida	Preditor Dupla Função (Score, %)		Outros preditores de CPP (Score, %)			Outros preditores de AMP (Score, %)			Atributos			
		PeptiDuo para CPP	PeptiDuo para AMP	MLCPP	C2PRED	eficácia de penetração	CAMP R3	iAMPred	AI4AMP	Carga líquida em pH 7	pI teórico	MW (g/mol)	toxicidade
Pimentão	RRHCRRRRW WR	97,2	96	99,3	99,2	alta	99,5	70	99	7	12,5	1724,02	não- tóxico
	ARRNKRKRA NLRAKLLR L	97,1	95,3	98,5	99,4	alta	97,7	61	97,7	10	12,8	2361,89	não- tóxico
	REKCRRSRE RRRKK	97	95,4	98,2	98,8	baixa	86,1	77	86	7,9	12,1	1944,29	não- tóxico
Girassol	WWRWWRKL RWCWRWRW CR	98,1	97,6	93,8	97,6	alta	1	81	99	6,9	12,1	2892,4	não- tóxico
	PHHHRHRHR HCRRHRR	98,1	96,7	92,2	92,2	alta	99	66	91	7,6	12,5	2271,55	não- tóxico
	RKKLKRNR HRRWWL	98,1	95,4	99,4	99	alta	98	68	87	9,1	12,81	2375,84	não- tóxico
Berinjela	RRKGRIGSRK GARR	95,3	97,6	98,16	29,6	baixa	90,2	91	90	8	12,81	1653,94	não- tóxico
	RCRKSCRLR WLNYLPHI KR	95,2	96,8	94	97,9	alta	91,4	82	67,6	8	11,85	2655,21	não- tóxico

Valores de *score* positivos, individualmente para CPP e AMP, foram obtidos na predição dos peptídeos de interesse pela nossa ferramenta, PeptiDuo. Valores de *score* similares foram também obtidos para outros preditores individuais de CPP ou AMP da literatura, reforçando os valiosos resultados obtidos por nossa ferramenta. As características físico-químicas descritas como padrão para essas moléculas, como carga líquida, ponto isoelétrico e hidrofobicidade, foram determinantes na escolha final para a síntese química. De forma complementar, sinais de toxicidade ou alergenicidade foram critérios eliminatórios, já que o objetivo é aplicar essas moléculas em sistemas biológicos.

5.3.1 Avaliação dos padrões das sequências peptídicas obtidas pelo preditor

As sequências geradas pelo preditor PeptiDuo, com criptídeos únicos e acurácia superior a 96% para dupla função (CPP e AMP), foram submetidas a alinhamentos e análises para identificação de padrões. Para o pimentão, analisamos 19 sequências únicas, 38 para o girassol e 27 para berinjela. A seguir, estão descritos os principais resultados para cada proteoma e genoma analisado usando PeptiDuo.

5.3.1.1 Sequências do Proteoma de Pimentão

No proteoma de pimentão, os alinhamentos revelaram que 90% das sequências apresentaram resíduos catiônicos nas posições 14 e 16 (Figura 3). Esses padrões foram confirmados pela análise no WebLogo, que mostrou alta frequência de resíduos de arginina e, em menor proporção, glicina nas sequências (Figura 4). A arginina contribui significativamente para a anfifilicidade e a carga positiva das sequências, características essenciais para as funções de penetração celular e atividade antimicrobiana.

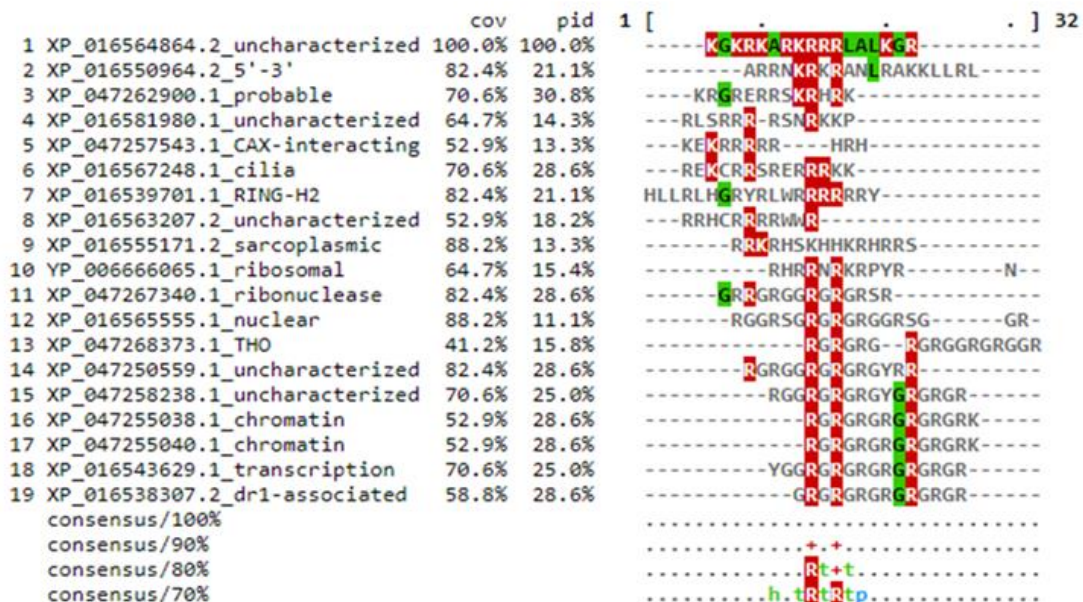


Figura 3. Alinhamento das 19 seqüências únicas de criptídeos preditas no proteoma do pimentão (NCBI) com probabilidade acima de 96% para dupla função (CPP e AMP).

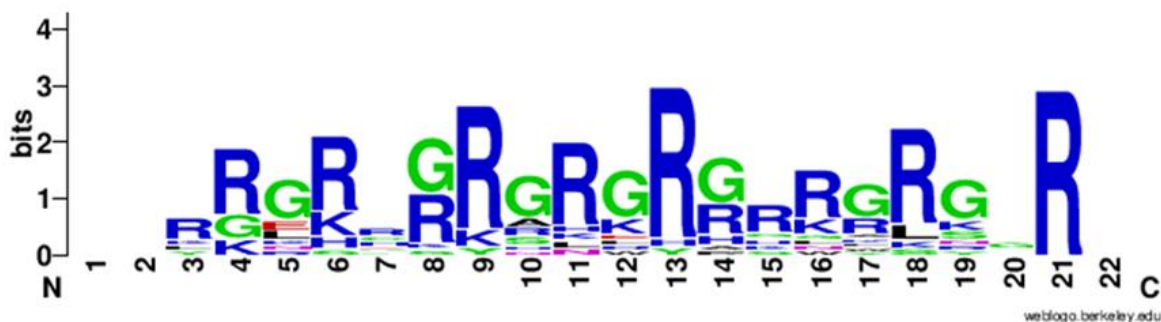


Figura 4. Análise de frequência, utilizando WebLogo, dos resíduos de aminoácidos das 19 seqüências únicas de criptídeos preditas no proteoma do pimentão (NCBI) com probabilidade acima de 96% para dupla função (CPP e AMP)

5.3.1.2 Sequências do Proteoma de Girassol

O proteoma do girassol apresentou o maior número de seqüências com alta predição para dupla funcionalidade (acima de 96% de probabilidade). Nos alinhamentos, 90% das seqüências exibiram resíduos hidrofóbicos na posição 19 e arginina na posição 21 do alinhamento (Figura 5). Esses padrões sugerem uma forte conservação de resíduos associados à interação com membranas. A análise complementar no WebLogo corroborou a intensa

presença de resíduos de argininas e glicinas, destacando padrões semelhantes aos encontrados nas sequências do pimentão, mas com maior variação em posições adjacentes (Figura 6).

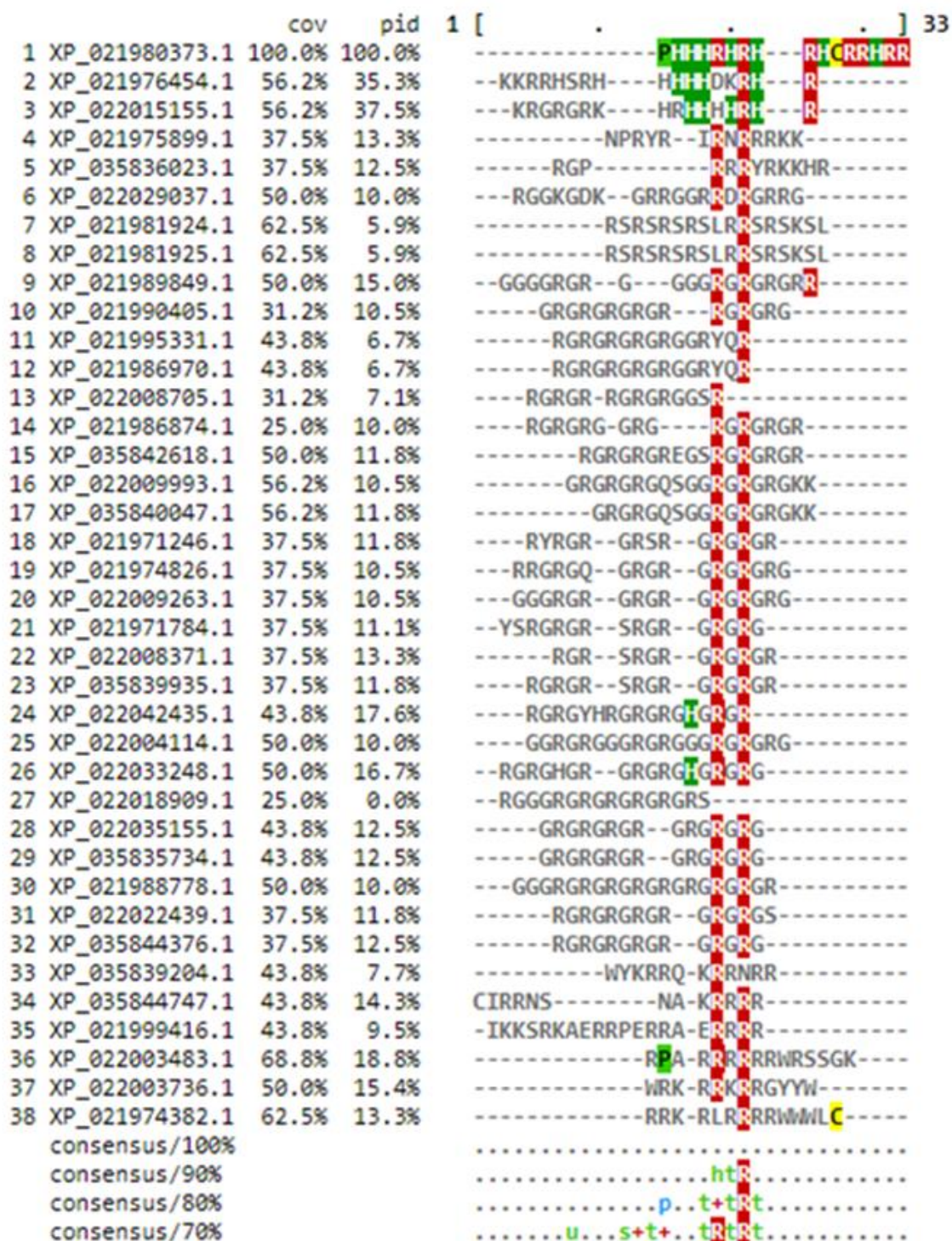


Figura 5. Alinhamento das 38 sequências únicas de criptídeos previstas no proteoma do girassol com probabilidade acima de 96% para dupla função.

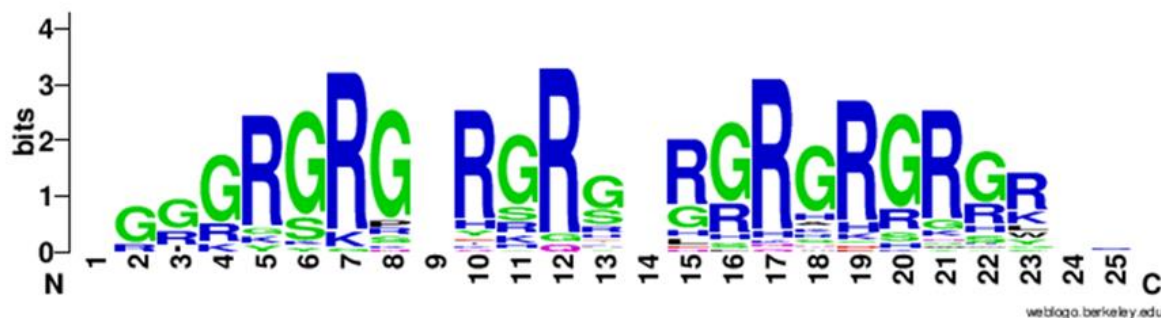


Figura 6. Análise de frequência, utilizando WebLogo, dos resíduos de aminoácidos das 38 sequências únicas de criptídeos preditas no proteoma do girassol com probabilidade acima de 96% para dupla função (CPP e AMP).

5.3.1.3 Sequências do Proteoma e do Genoma de Berinjela

Nas sequências analisadas da berinjela, os resíduos hidrofóbicos nas posições 16 e 18 apresentaram maior diversidade quando comparados às outras famílias. Foram observados resíduos como arginina, lisina e histidina, sugerindo maior variação estrutural entre os criptídeos identificados (Figura 7). Essa análise foi realizada com dados derivados majoritariamente do genoma, uma vez que o proteoma apresentou número limitado de proteínas disponíveis para bioprospecção.

Os padrões identificados no WebLogo mostraram maior variação de aminoácidos, refletindo uma menor conservação das sequências (Figura 8). Os valores no eixo das ordenadas, que representa a conservação em posições específicas, foram os menores entre todas as análises realizadas, reforçando o caráter mais diversificado das sequências oriundas da berinjela.

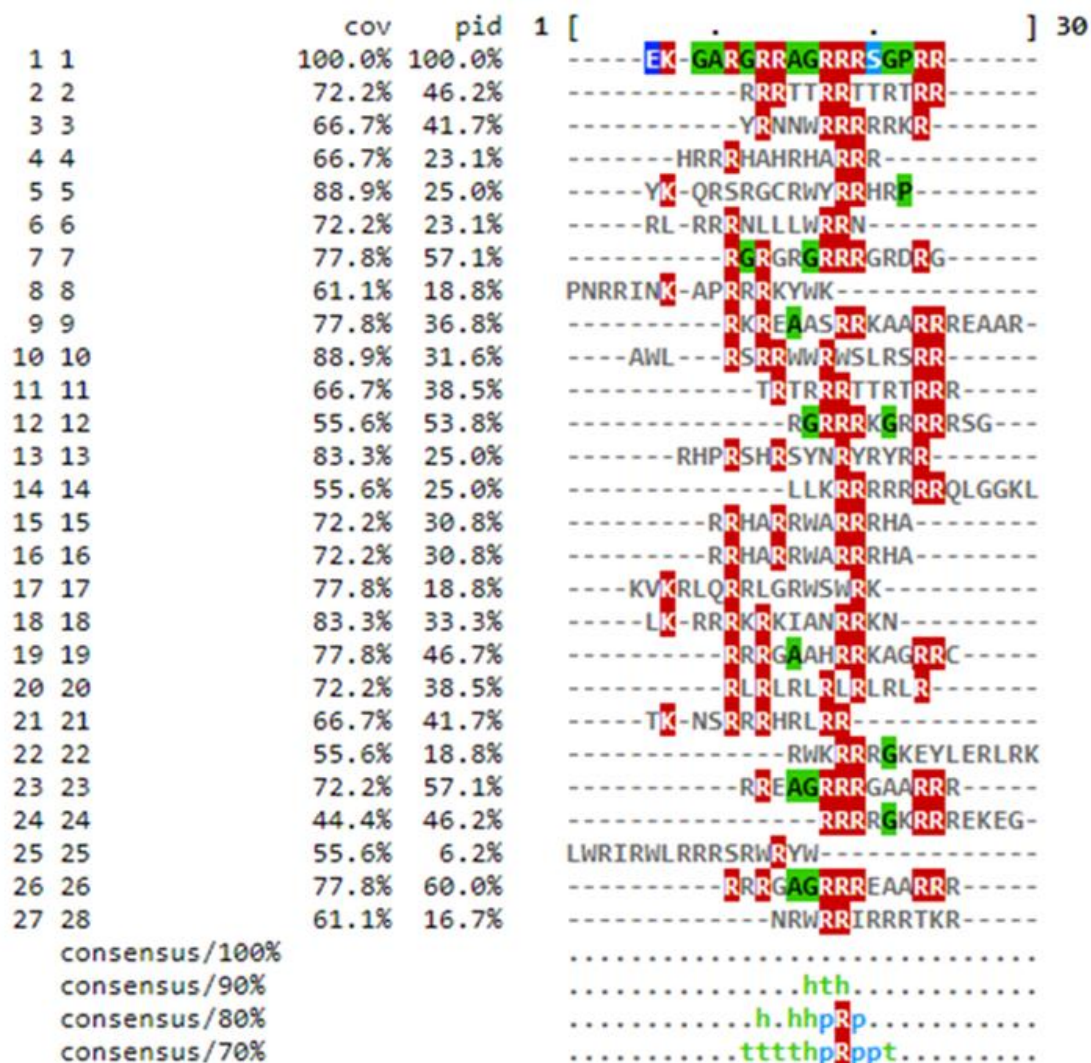


Figura 7. Alinhamento das 27 seqüências únicas de criptídeos preditas no genoma da berinjela com probabilidade acima de 96% para dupla função.

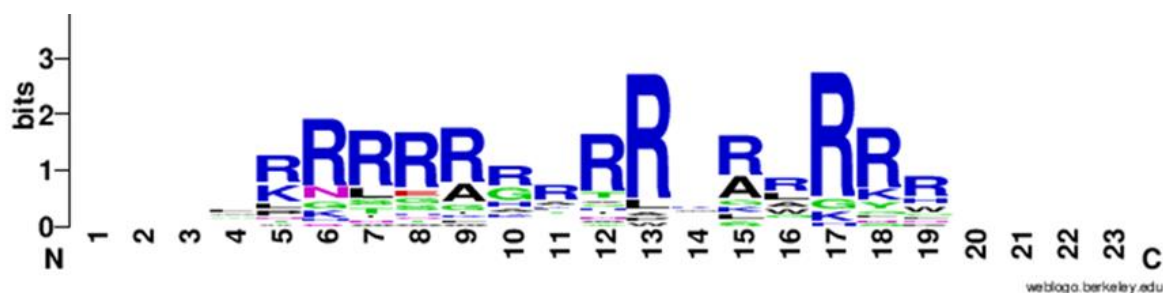


Figura 8. Análise de frequência, utilizando WebLogo, dos resíduos de aminoácidos das 27 seqüências únicas de criptídeos preditas no proteoma e genoma da berinjela com probabilidade acima de 96% para dupla função (CPP e AMP).

5.4 Validação da atividade antibacteriana dos peptídeos preditos com dupla função

Os peptídeos RB1 (origem pimentão e predito com dupla função), RB2 (origem girassol e predito com dupla função), RB3 (origem girassol, controle negativo, sem dupla função) e RB4 (origem berinjela e predito com dupla função) foram avaliados quanto à sua capacidade de inibição de crescimento bacteriano contra a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* e as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* e *Ralstonia solanacearum*. As análises foram realizadas por 12 horas de cultivo, tempo após o qual as bactérias encontravam-se em suas fases estacionárias de crescimento. Os resultados indicaram haver variabilidade na eficácia dos peptídeos, dependente tanto da concentração quanto da espécie bacteriana testada.

O peptídeo RB1, predito com dupla função, demonstrou um perfil de inibição bacteriana promissor após 12 h de cultivo, com destaque para sua alta atividade contra as bactérias Gram-negativas e inibição crescente com a concentração. Contra para *Ralstonia solanacearum* (Figura 9), observou-se que a concentração de 175 μM promoveu a inibição parcial (34%) do crescimento bacteriano, enquanto que as concentrações de 350 μM e 700 μM de RB1 foram suficientes para inibir totalmente o crescimento, indicando uma resposta muito eficiente de RB1 para este fitopatógeno. Contra *Escherichia coli* (Figura 10), o peptídeo RB1 mostrou uma atividade crescente e consistente, com inibição de 67% para 175 μM , de 94% para 350 μM e inibição total para 700 μM , demonstrando uma correlação positiva entre a concentração e a eficácia. Já em relação à bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (Figura 11), RB1 inibiu o crescimento de forma parcial e não proporcional às concentrações testadas, com 92% de inibição para a concentração de 175 μM de RB1, 67% para 350 μM e 70% para 700 μM . Observa-se que os valores de absorvância menores que o inicial detectados ao longo do crescimento podem estar relacionados à morte bacteriana. RB1 apresentou portanto um comportamento mais efetivo para bactérias Gram-negativas, inferindo-se que o tipo de membrana bacteriana pode interferir diretamente na ação de penetração celular e antimicrobiana. Para a bactéria Gram positiva, indica-se estudar se esse comportamento poderia estar relacionado à saturação ou a interações que favorecem a ação em concentrações intermediárias.

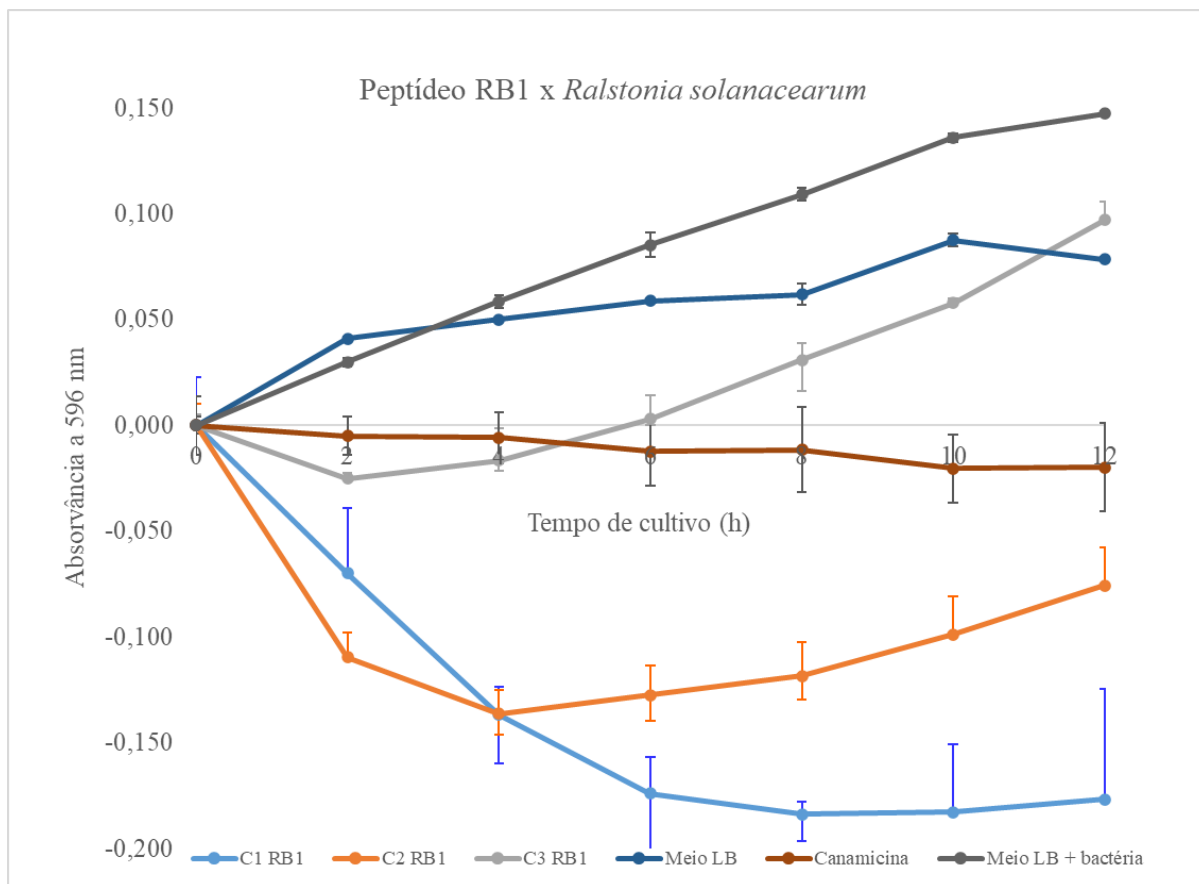


Figura 9. Curva de crescimento da bactéria Gram-negativa *Ralstonia solanacearum* ao longo de 12 h na ausência (Meio LB + bactéria) e na presença do peptídeo RB1 nas concentrações 700 μM (C1), 350 μM (C2) e 175 μM (C3). O experimento foi realizado em meio LB a 37°C, com leituras de densidade óptica a 596 nm a cada duas horas. O antibiótico canamicina a 30 μg.μL⁻¹ foi utilizado como controle positivo para a morte celular, e o Meio LB, como controle negativo.

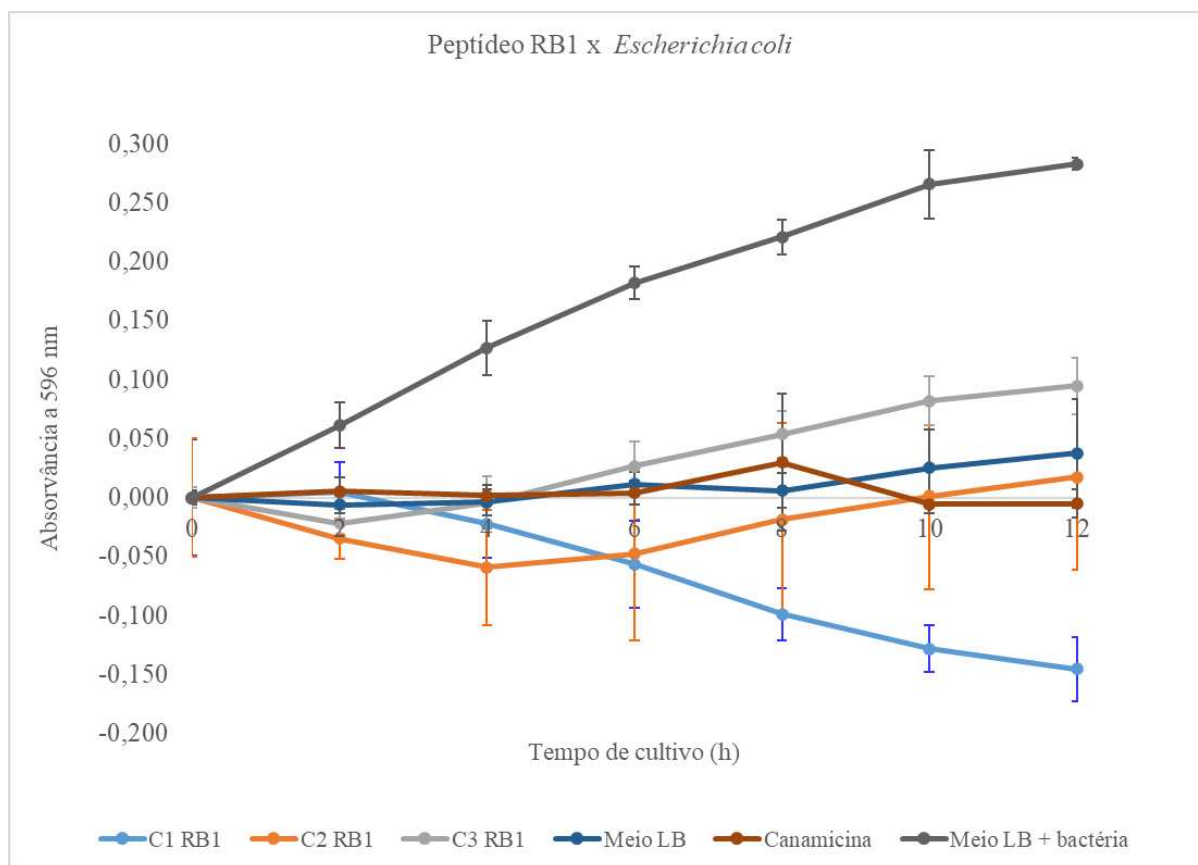


Figura 10. Curva de crescimento da bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* ao longo de 12 h na ausência (Meio LB + bactéria) e na presença do peptídeo RB1 nas concentrações 700 μM (C1), 350 μM (C2) e 175 μM (C3). O experimento foi realizado em meio LB a 37°C, com leituras de densidade óptica a 596 nm a cada duas horas. O antibiótico canamicina a 30 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ foi utilizado como controle positivo para a morte celular, e o Meio LB, como controle negativo.

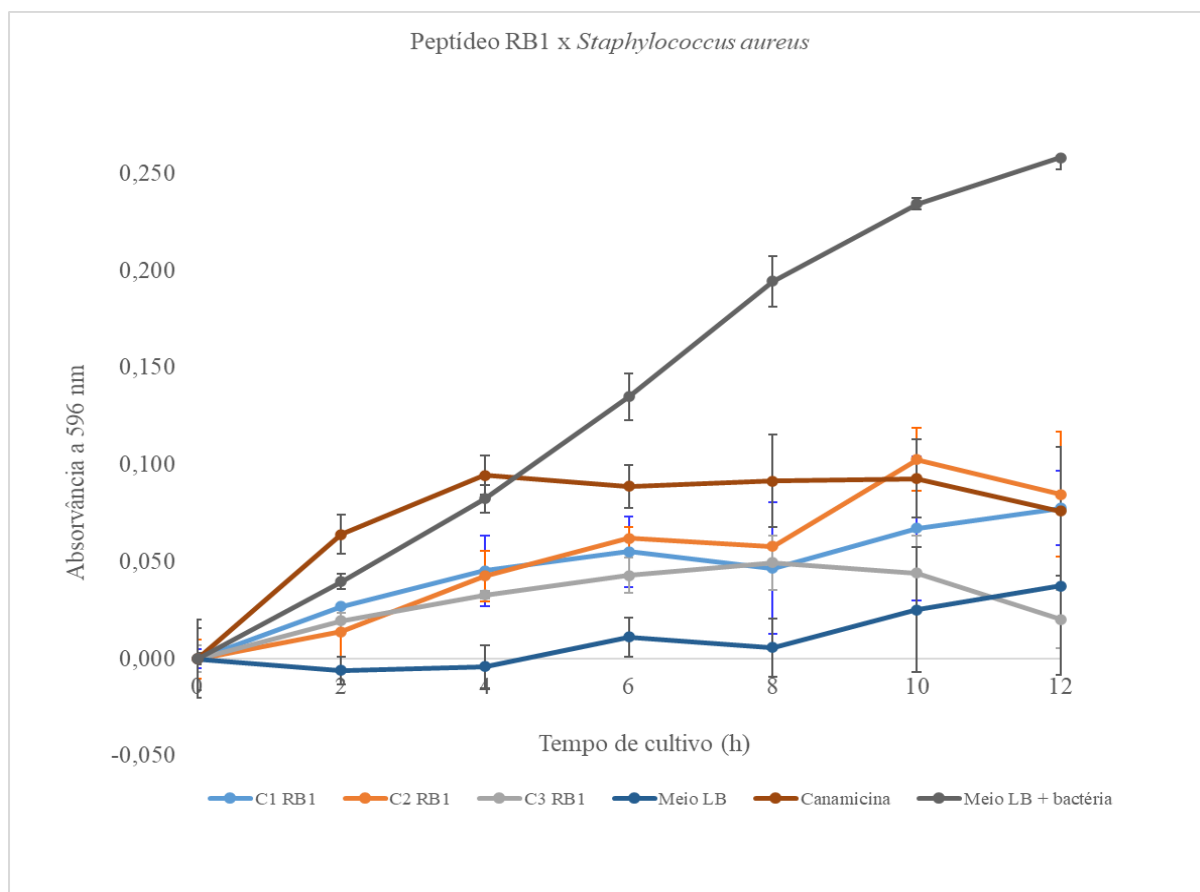


Figura 11. Curva de crescimento da bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* ao longo de 12 h na ausência (Meio LB + bactéria) e na presença do peptídeo RB1 nas concentrações 700 μM (C1), 350 μM (C2) e 175 μM (C3). O experimento foi realizado em meio LB a 37°C, com leituras de densidade óptica a 596 nm a cada duas horas. O antibiótico canamicina a 30 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ foi utilizado como controle positivo para a morte celular, e o Meio LB, como controle negativo.

O peptídeo RB2, também predito com dupla função, após 12h de cultivo, mostrou contra *R. solanacearum* (Figura 12) a maior inibição, de 71%, na maior concentração testada, 700 μM , enquanto que as concentrações de 350 μM e 175 μM resultaram em 34% e 19% de inibição, respectivamente, havendo inibição de forma proporcional à concentração de RB2. Contra *E. coli* (Figura 13), a 700 μM , o peptídeo inibiu 74%, contra 48% e 46% para a concentração de 350 e 175 μM , respectivamente, indicando que para bactérias Gram-negativas, as inibições pelo peptídeo foram mais promissoras. Por fim, para *S. aureus* a inibição ocorreu de forma não proporcional às concentrações, com 31% de inibição para 175 μM de RB2, 65% para 350 μM e 39% para 700 μM (Figura 14).

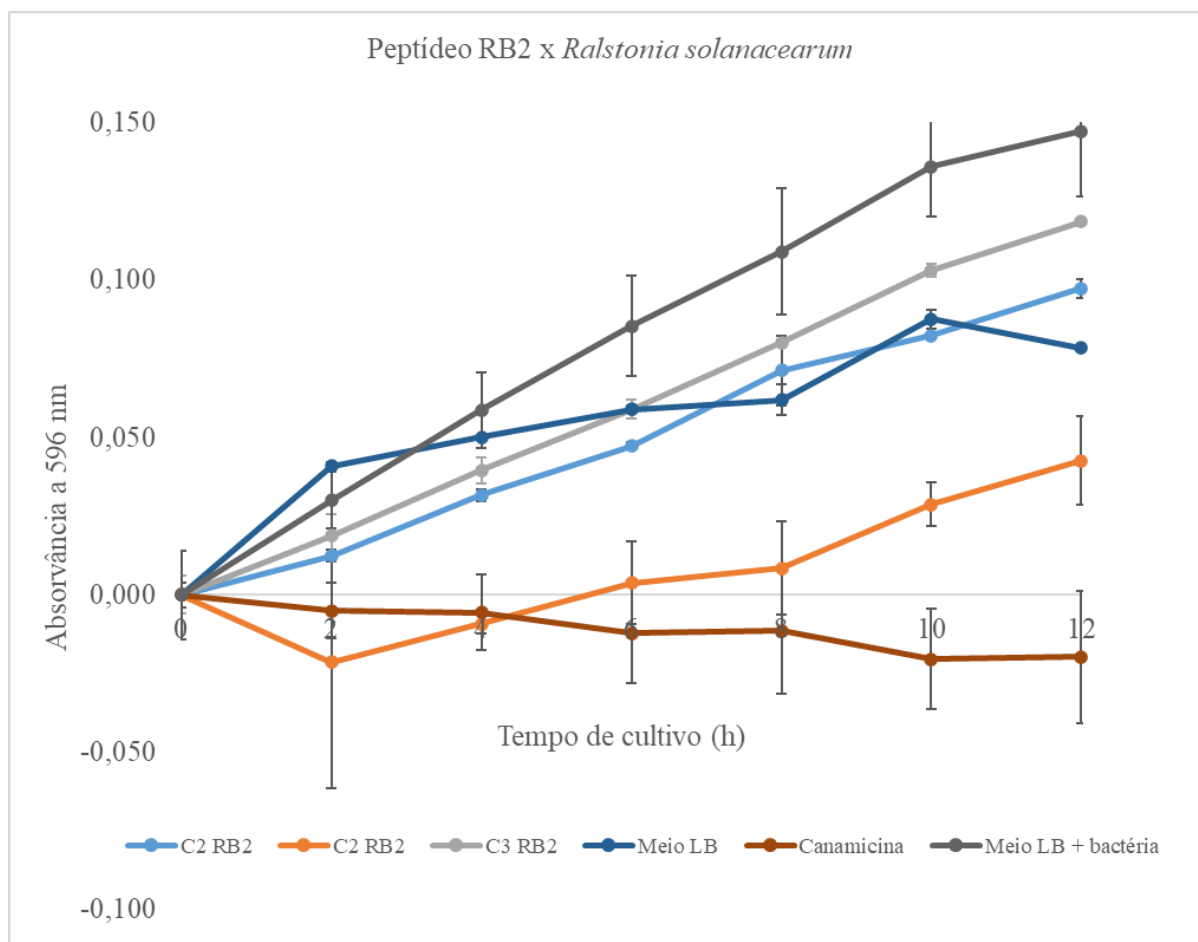


Figura 12. Curva de crescimento da bactéria Gram-negativa *Ralstonia solanacearum* ao longo de 12 h na ausência (Meio LB + bactéria) e na presença do peptídeo RB2 nas concentrações 700 μM (C1), 350 μM (C2) e 175 μM (C3). O experimento foi realizado em meio LB a 37°C, com leituras de densidade óptica a 596 nm a cada duas horas. O antibiótico canamicina a 30 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ foi utilizado como controle positivo para a morte celular, e o Meio LB, como controle negativo.

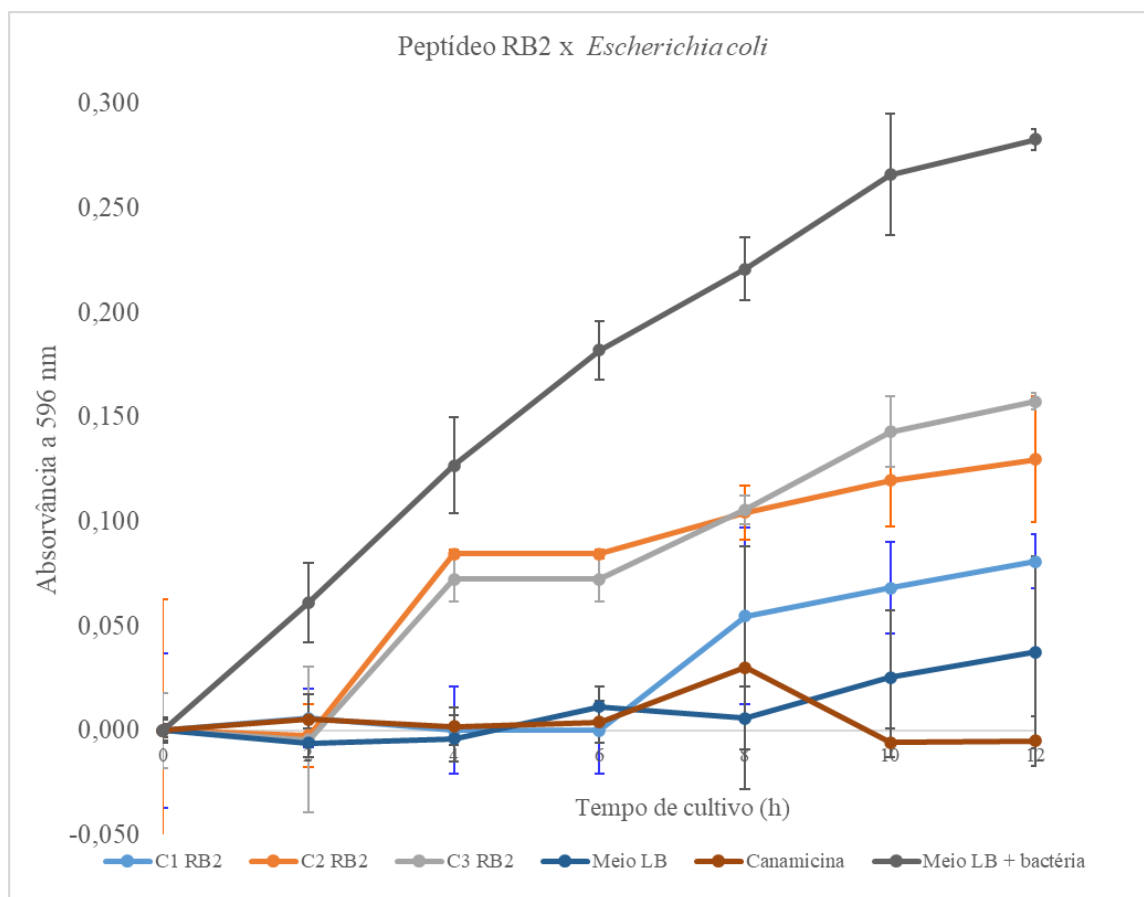


Figura 13. Curva de crescimento da bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* ao longo de 12 h na ausência (Meio LB + bactéria) e na presença do peptídeo RB2 nas concentrações 700 μM (C1), 350 μM (C2) e 175 μM (C3). O experimento foi realizado em meio LB a 37°C, com leituras de densidade óptica a 596 nm a cada duas horas. O antibiótico canamicina a 30 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ foi utilizado como controle positivo para a morte celular, e o Meio LB, como controle negativo.

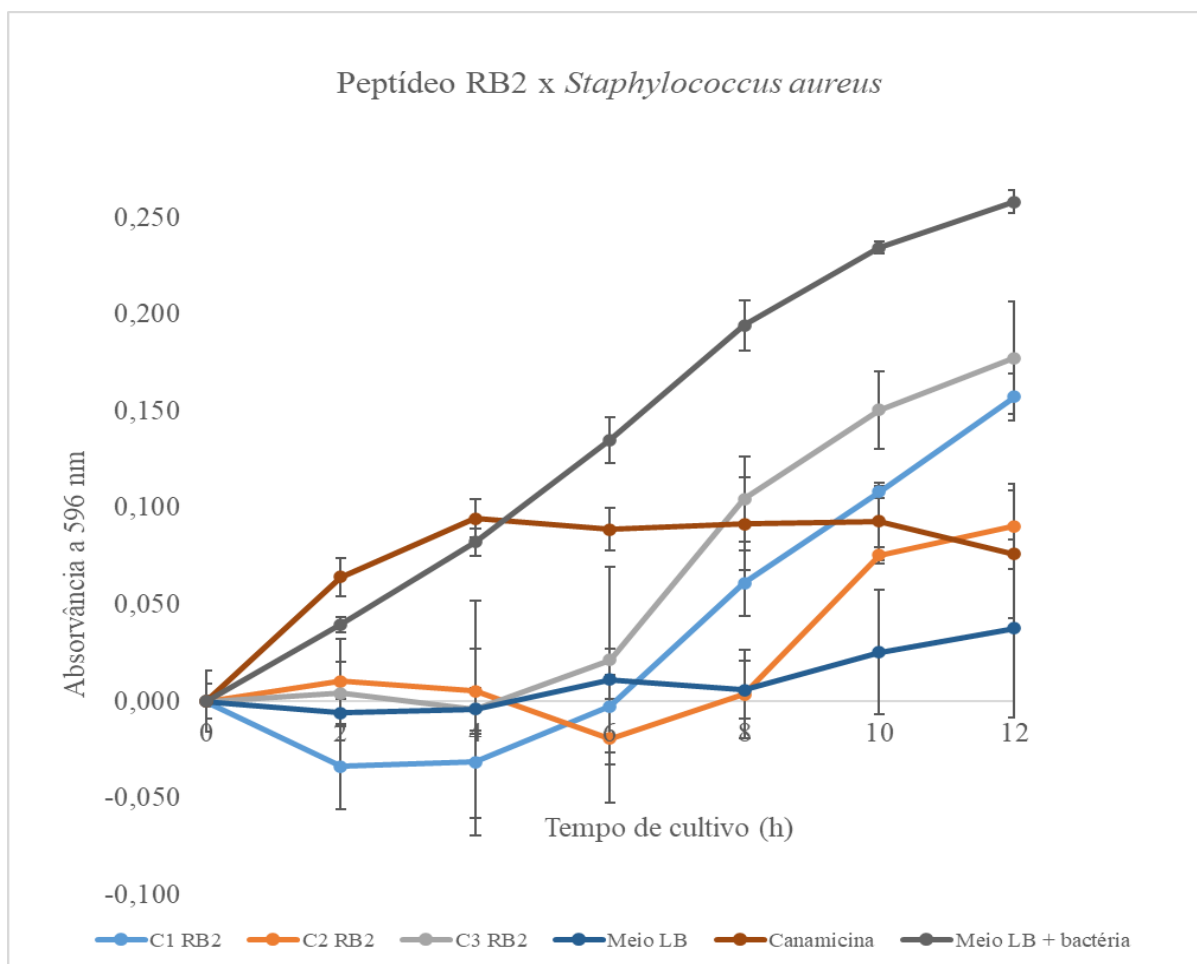


Figura 14. Curva de crescimento da bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* ao longo de 12 h na ausência (Meio LB + bactéria) e na presença do peptídeo RB2 nas concentrações 700 μM (C1), 350 μM (C2) e 175 μM (C3). O experimento foi realizado em meio LB a 37°C, com leituras de densidade óptica a 596 nm a cada duas horas. O antibiótico canamicina a 30 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ foi utilizado como controle positivo para a morte celular, e o Meio LB, como controle negativo.

O peptídeo RB3, predito como negativo para CPP e AMP, foi usado como controle negativo e apresentou os resultados esperados, com baixa ou nenhuma atividade antimicrobiana. Mesmo na presença da maior concentração, 700 μM , às 12 h de cultivo, a inibição do crescimento foi nula ou inferior a 10% para *R. solanacearum* (Figura 15), *E. coli* (Figura 16) e *S. aureus* (Figura 17). Esses resultados validam o uso de RB3 como um controle negativo para a predição de peptídeos dupla função (CPP e AMP), apropriado para as análises, e evidenciam a especificidade dos demais peptídeos.

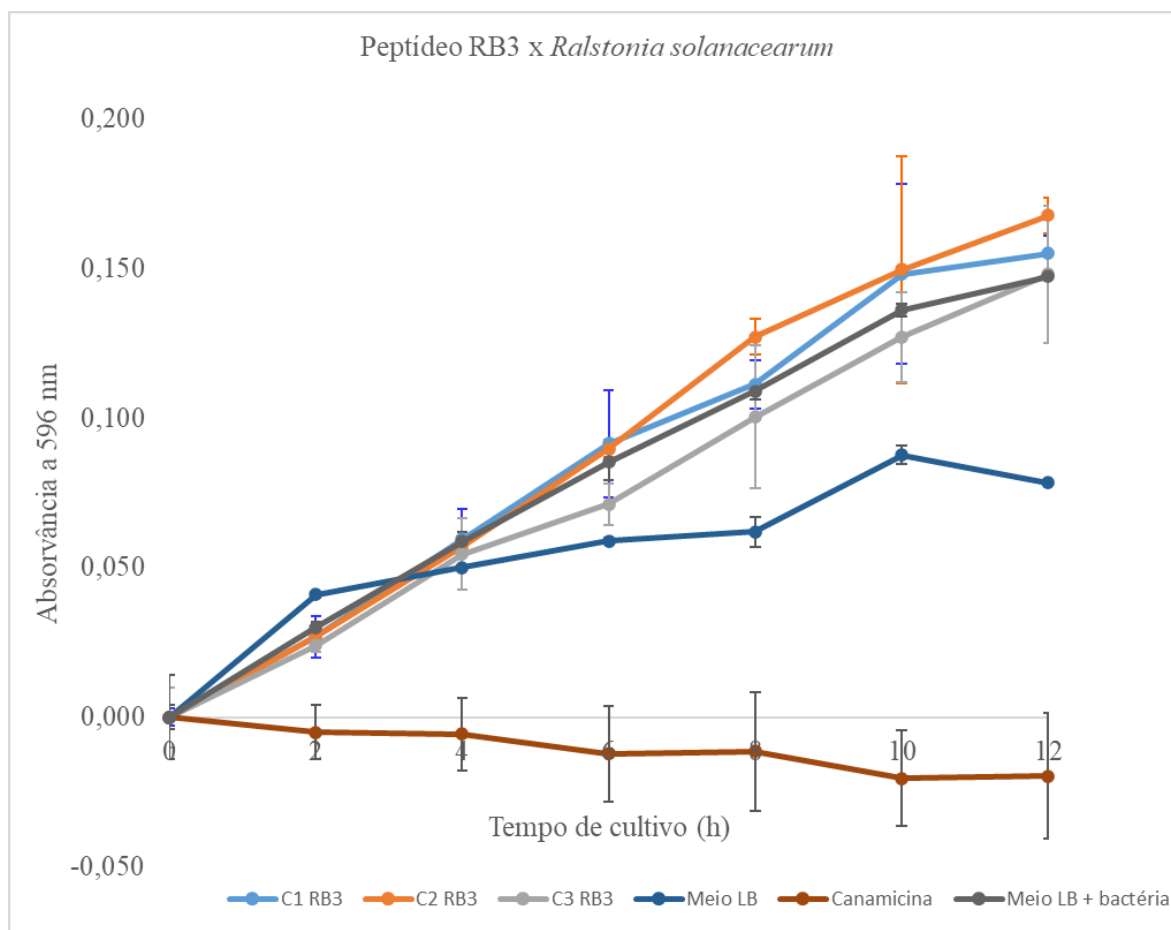


Figura 15. Curva de crescimento da bactéria Gram-negativa *Ralstonia solanacearum* ao longo de 12 h na ausência (Meio LB + bactéria) e na presença do peptídeo RB3 nas concentrações 700 μM (C1), 350 μM (C2) e 175 μM (C3). O experimento foi realizado em meio LB a 37°C, com leituras de densidade óptica a 596 nm a cada duas horas. O antibiótico canamicina a 30 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ foi utilizado como controle positivo para a morte celular, e o Meio LB, como controle negativo.

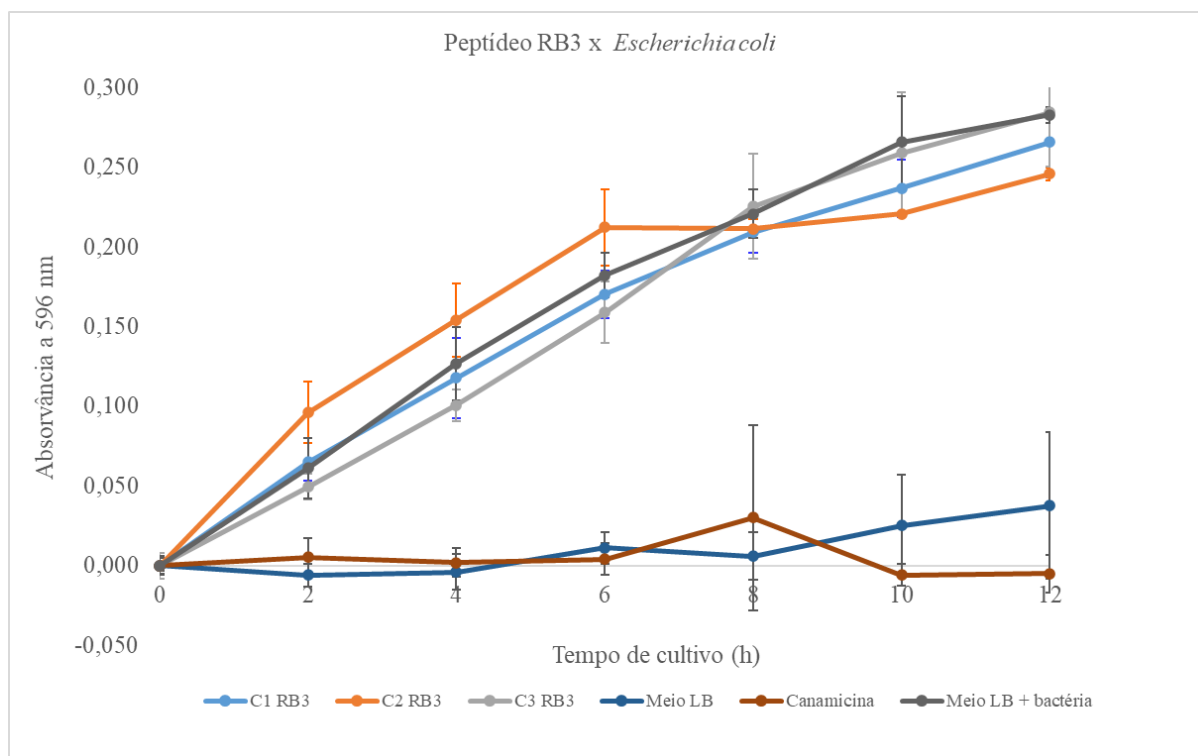


Figura 16. Curva de crescimento da bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* ao longo de 12 h na ausência (Meio LB + bactéria) e na presença do peptídeo RB3 nas concentrações 700 μM (C1), 350 μM (C2) e 175 μM (C3). O experimento foi realizado em meio LB a 37°C, com leituras de densidade óptica a 596 nm a cada duas horas. O antibiótico canamicina a 30 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ foi utilizado como controle positivo para a morte celular, e o Meio LB, como controle negativo.

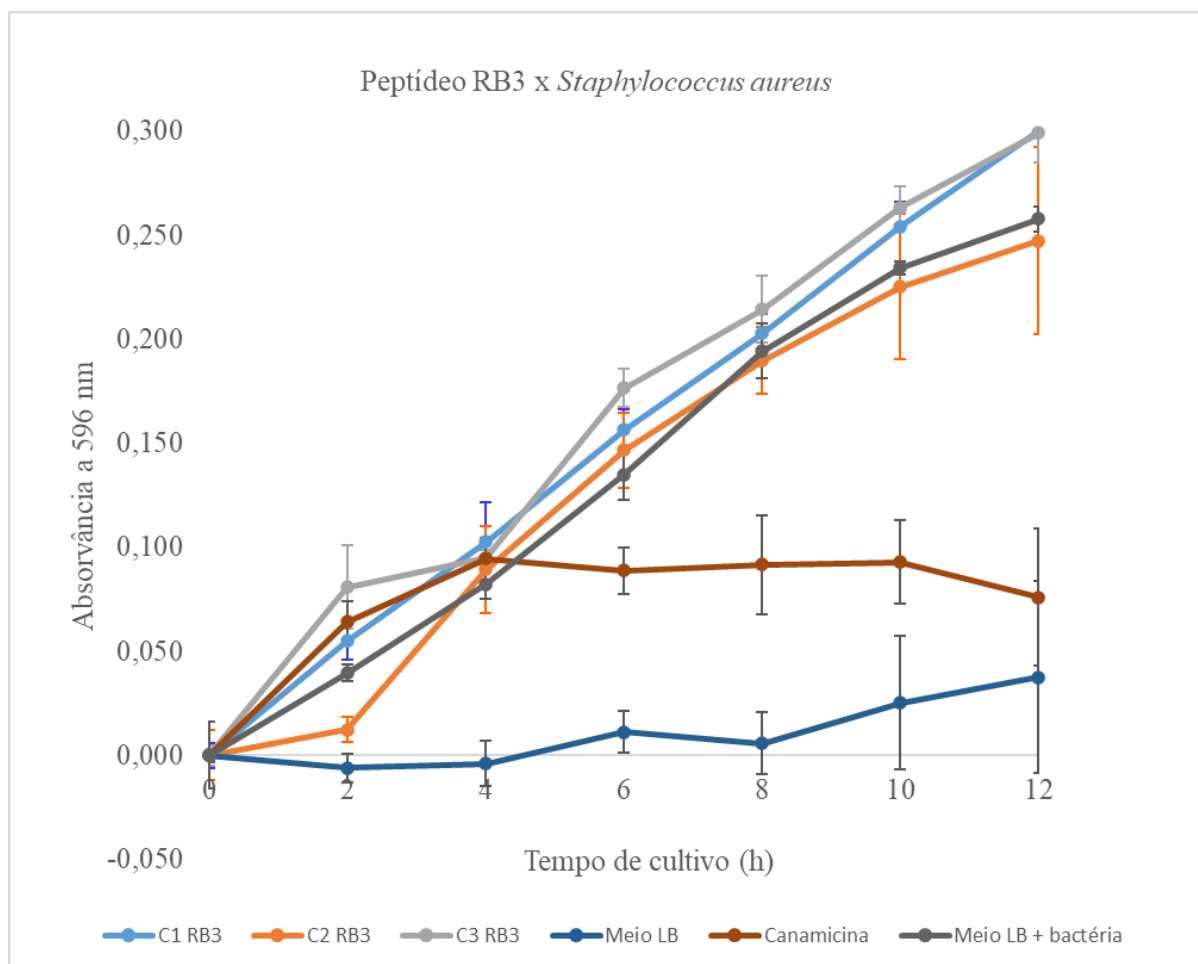


Figura 17. Curva de crescimento da bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* ao longo de 12 h na ausência (Meio LB + bactéria) e na presença do peptídeo RB3 nas concentrações 700 μM (C1), 350 μM (C2) e 175 μM (C3). O experimento foi realizado em meio LB a 37°C, com leituras de densidade óptica a 596 nm a cada duas horas. O antibiótico canamicina a 30 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ foi utilizado como controle positivo para a morte celular, e o Meio LB, como controle negativo.

O peptídeo RB4, também predito com dupla função, mostrou melhor desempenho contra *S. aureus* e *E. coli* em concentrações mais altas e de forma proporcional à concentração, exceto para *E. coli* na menor concentração testada, 100 μM . Contra *R. solanacearum* (Figura 18), a inibição foi de aproximadamente 50% (52% e 57% 47%) para as três concentrações testadas (700, 350 e 175 μM , respectivamente). A 600 μM , a inibição foi de 37% para *E. coli* (Figura 19) e 43% para *S. aureus* (Figura 20).

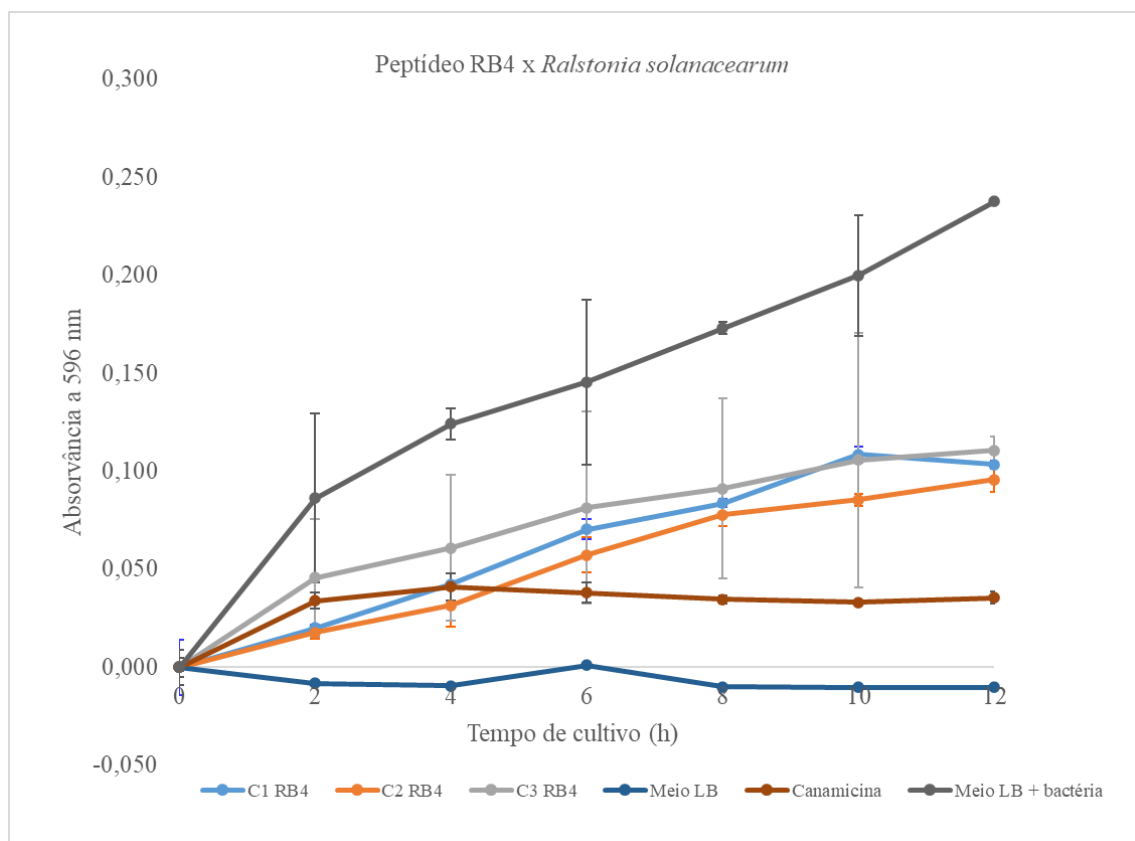


Figura 18. Curva de crescimento da bactéria Gram-negativa *Ralstonia solanacearum* ao longo de 12 h na ausência (Meio LB + bactéria) e na presença do peptídeo RB4 nas concentrações 700 μM (C1), 350 μM (C2) e 175 μM (C3). O experimento foi realizado em meio LB a 37°C, com leituras de densidade óptica a 596 nm a cada duas horas. O antibiótico canamicina a 30 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ foi utilizado como controle positivo para a morte celular, e o meio LB (meio), como controle negativo.

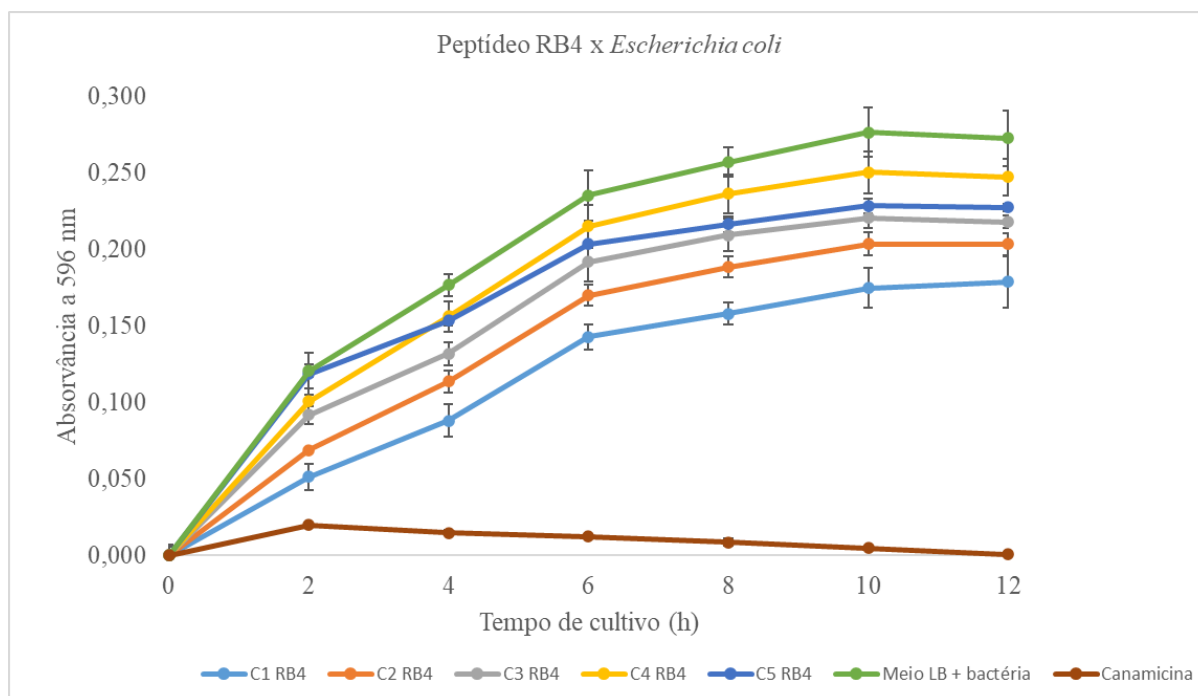


Figura 19. Curva de crescimento da bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* ao longo de 12 h na ausência (Meio LB + bactéria) e na presença do peptídeo RB4 nas concentrações 600 μM (C1), 400 μM (C2), 300 μM (C3), 200 μM (C4) e 100 μM (C5). O experimento foi realizado em meio LB a 37°C, com leituras de densidade óptica a 596 nm a cada duas horas. O antibiótico canamicina a 30 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ foi utilizado como controle positivo para a morte celular, e o meio LB (meio), como controle negativo.

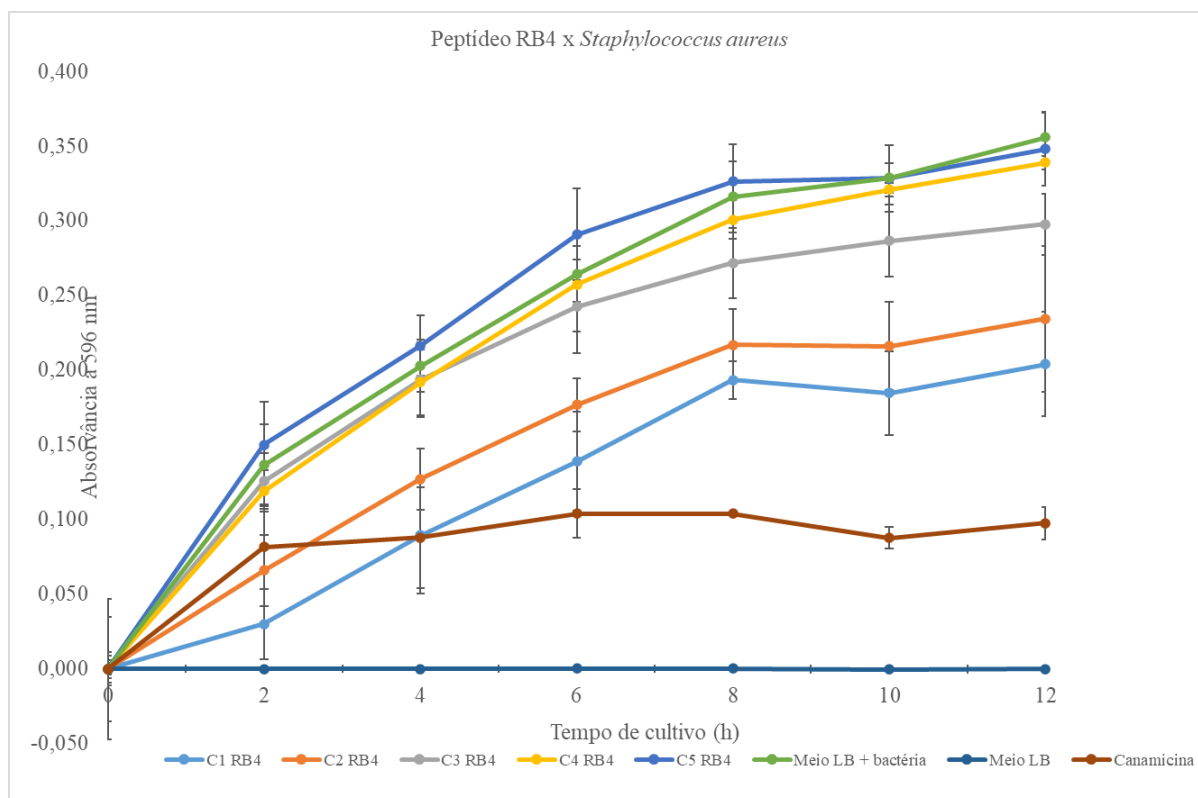


Figura 20. Curva de crescimento da bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* ao longo de 12 h na ausência (Meio LB + bactéria) e na presença do peptídeo RB4 nas concentrações 600 µM (C1), 400 µM (C2), 300 µM (C3), 200 µM (C4) e 100 µM (C5). O experimento foi realizado em meio LB a 37°C, com leituras de densidade óptica a 596 nm a cada duas horas. O antibiótico canamicina a 30 µg.µL⁻¹ foi utilizado como controle positivo para a morte celular, e o meio LB (meio), como controle negativo.

Os valores de MIC (concentração mínima inibitória) para os peptídeos RB1, RB2, RB3 e RB4 foram avaliados contra as bactérias *Ralstonia solanacearum*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* após 10 horas de ensaio. Os resultados revelam variações na eficácia dos peptídeos, dependendo da bactéria alvo e da concentração utilizada (Tabela 7)

Tabela 7. Cálculo de Concentração Mínima Inibitória (MIC) do crescimento das bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Ralstonia solanacearum* em 10 h de cultivo. As equações lineares ajustadas para o cálculo do MIC estão apresentadas.

Bactéria-teste	MIC por RB1 (μM)	MIC por RB2 (μM)	MIC por RB3 (μM)	MIC por RB4 (μM)
<i>S. aureus</i>	ND ^(1,3)	ND ^(1,4)	ND ^(1,2)	1.092,85 ⁽⁶⁾
<i>E. coli</i>	370,43 ⁽⁷⁾	1180,56 ⁽⁸⁾	ND ^(1,2)	1519,71 ⁽⁹⁾
<i>R. solanacearum</i>	233,71 ⁽¹⁰⁾	907,11 ⁽¹¹⁾	ND ^(1,2)	ND ^(1,5)

1. ND – MIC não determinado pela falta de linearidade da inibição em relação à concentração do peptídeo. 2. RB3 é controle negativo, com crescimento bacteriano similar à ausência de peptídeos. 3. Inibição do crescimento de 92%, 67% e 70% nas concentrações de 175, 350 e 700 μM de RB1. 4. Inibição do crescimento de 31%, 65% e 39% nas concentrações de 175, 350 e 700 μM de RB2. 5. Inibição do crescimento de 52%, 57% e 47% para as concentrações de 175, 350 e 700 μM de RB4. 6. $y = 0,1068x - 16,716$; $R^2 = 0,9149$. 7. $y = 0,149x + 44,806$. $R^2 = 0,9966$. 8. $y = 0,0537x + 36,604$. $R^2 = 0,9995$. 9. $y = 0,0659x - 1,492$. $R^2 = 0,9667$. 10. $y = 0,3138x + 26,662$. $R^2 = 0,8741$. 11. $y = 0,1052x + 4,5722$. $R^2 = 0,9961$.

O peptídeo RB1 apresentou valores de MIC diferentes para as bactérias testadas. Contra *R. solanacearum*, o MIC foi de 233,71 μM , enquanto para *E. coli*, foi de 370,43 μM . RB1 apresentou os maiores valores de atividade antimicrobiana contra ambas as bactérias Gram-negativas, especialmente contra *R. solanacearum*, em que a concentração necessária para atingir a inibição total foi menor. Por outro lado, contra *S. aureus*, não foi possível calcular o MIC, uma vez que a inibição variou de 55% a 80%, mas de forma não proporcional às concentrações testadas. Esse comportamento não linear sugere uma interação diferente com a célula bacteriana, possivelmente dependente de condições específicas do ambiente ou da membrana celular da bactéria Gram-positiva.

O peptídeo RB2 demonstrou menor eficácia em comparação ao RB1. O MIC contra *R. solanacearum* foi de 907,11 μM , enquanto contra *E. coli* foi de 1.108,56 μM . Para *S. aureus*,

embora o MIC não tenha sido calculado devido à falta de proporcionalidade na inibição, observou-se até 65% de inibição na menor concentração (175 μ M).

O controle negativo RB3, classificado como sem dupla função predita, confirmou a ausência de atividade antimicrobiana relevante contra *R. solanacearum*, *E. coli* e *S. aureus*, não apresentando inibição nessas condições. Esses resultados reforçam o papel de RB3 como um controle, evidenciando que sua estrutura não possui características favoráveis à atividade antimicrobiana, e reafirmando mais uma vez a validação do nosso preditor.

O peptídeo RB4 apresentou uma resposta diferente contra *R. solanacearum*, inibindo cerca de 50% do crescimento bacteriano para todas as concentrações testadas, mas sem proporcionalidade suficiente para o cálculo do MIC, possivelmente não estando relacionada com a concentração utilizada, mas as suas características. Contra *E. coli*, o MIC foi de 1.519,71 μ M, enquanto para *S. aureus* foi de 1.092,85 μ M.

Os resultados de ação dos peptídeos preditos sobre diferentes bactérias evidenciaram respostas diferentes e sem um padrão aparente para peptídeos, bactérias e concentrações avaliadas. Esse comportamento sugere que diferentes peptídeos preditos podem atuar de formas e em concentrações variadas sobre diferentes bactérias, sejam Gram-positivas ou Gram-negativas, sejam patógenos com diferentes atuações (de humanos ou fitopatógenos), o que reforça a importância de ferramentas como o PeptiDuo para uma mais rápida e eficiente prospecção de novos agentes de defesa para fins diversos, tão necessários nos dias atuais.

5.4 Validação da permeabilidade da membrana por microscopia confocal

Pelas análises da microscopia confocal para os peptídeos RB1 (origem pimentão e predito com dupla função), RB2 (origem girassol e predito com dupla função), RB3 (origem girassol, controle negativo, sem dupla função) e RB4 (origem berinjela e predito com dupla função), em diferentes tempos de incubação (0h, 4h e 8h) com *R. solanacearum*, visualizou-se ter ocorrido a permeabilidade dos peptídeos selecionados em membrana bacteriana. No tempo 0h (Figura 21), utilizado como controle, o experimento incluiu apenas o meio LB, a suspensão da bactéria *R. solanacearum* e os fluoróforos FTIC (marcador de células viáveis) e iodeto de propídio (marcador de células comprometidas). Como esperado, foram detectados pouquíssimos sinais fluorescentes nas células, indicando a ausência de interação inicial com os peptídeos e confirmando que, nesse tempo, nenhuma internalização ocorreu.

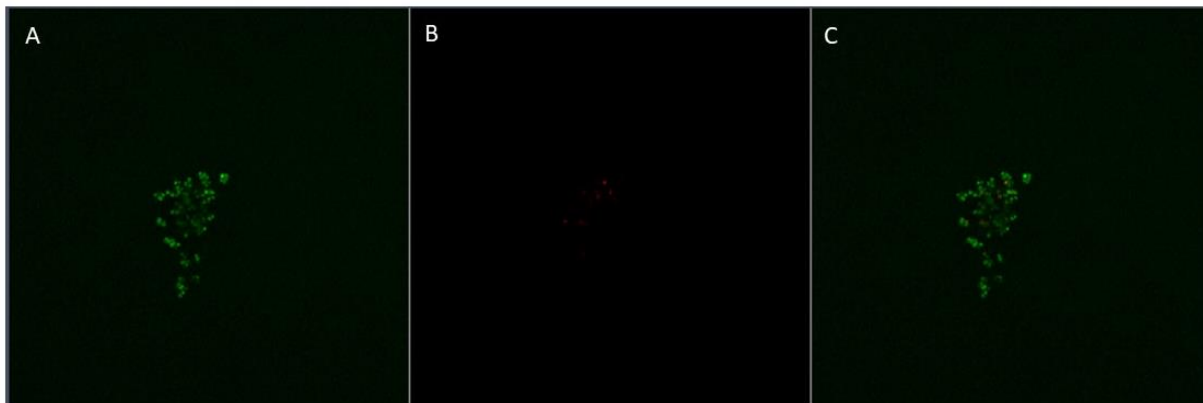


Figura 21. Imagem de microscopia confocal do cultivo de *Ralstonia solanacearum* em meio LB, na ausência de peptídeos, correspondendo ao tempo 0h de ensaio (controle) para todos os peptídeos analisados. O ensaio continha 20 μL de suspensão bacteriana ($\text{OD}=0,5$) e os fluoróforos FTIC ($2 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) e iodeto de propídio ($20 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) em meio de cultura LB, perfazendo 110 μL . **A.** Fluorescência verde indica células viáveis marcadas pelo FTIC. **B.** Fluorescência vermelha representa células comprometidas identificadas pelo iodeto de propídio. **C.** Sobreposição das fluorescências verde e vermelha.

Após quatro horas de incubação, foi observada uma boa internalização de RB1, evidenciada pela localização intracelular do marcador fluorescente (Figura 22). Essa internalização foi ainda mais acentuada no tempo de 8 horas (Figura 23), demonstrando claramente a capacidade de RB1 de penetrar membrana plasmática bacteriana. Esses resultados confirmam experimentalmente o potencial de RB1 como peptídeo de penetração celular, predito pela ferramenta desenvolvida.

Para RB2, após 4 horas de ensaio observamos também um aumento na presença de células marcadas por iodeto de propídio (vermelho), indicando que houveram danos significativos na membrana bacteriana (Figura 24), o que está de acordo com os resultados antimicrobianos quantitativos para essa bactéria. No tempo de 8h após o início do ensaio, (Figura 25) observamos uma redução no número de células viáveis (verde), mostrando o impacto cumulativo do RB2 sobre o inóculo de *R. solanacearum*.

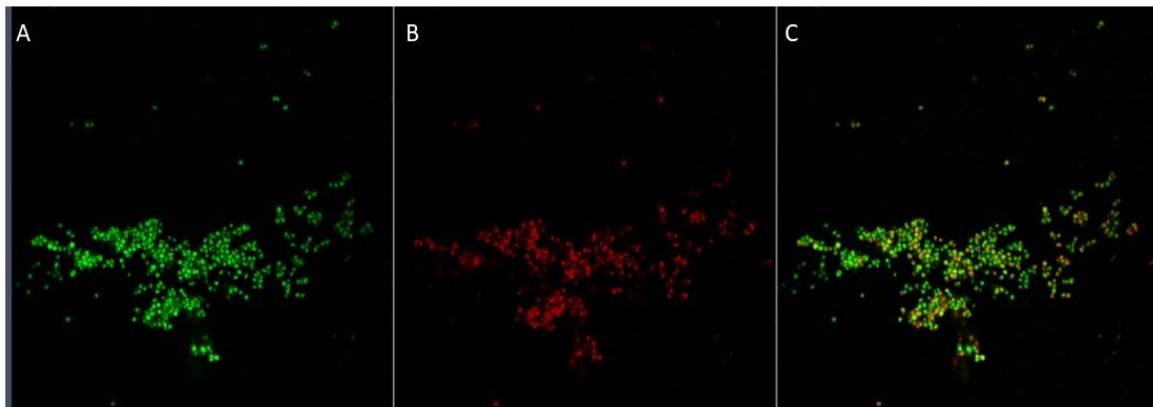


Figura 22. Imagem de microscopia confocal capturada após 4 horas de cultivo de *Ralstonia solanacearum* na presença do peptídeo RB1 (175 μM). O ensaio continha 20 μL de suspensão bacteriana ($\text{OD}=0,5$) e os fluoróforos FTIC ($2 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) e iodeto de propídio ($20 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) em meio de cultura LB, perfazendo 110 μL . **A.** Fluorescência verde indica células viáveis marcadas pelo FTIC. **B.** Fluorescência vermelha representa células comprometidas identificadas pelo iodeto de propídio. **C.** Sobreposição das fluorescências verde e vermelha.

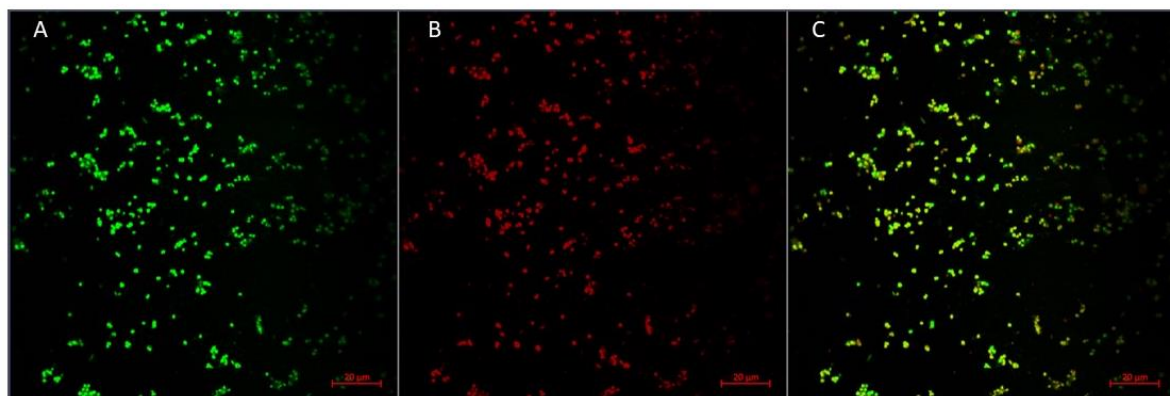


Figura 23. Imagem de microscopia confocal capturada após 8 horas de cultivo de *Ralstonia solanacearum* na presença do peptídeo RB1 (175 μM). O ensaio continha 20 μL de suspensão bacteriana ($\text{OD}=0,5$) e os fluoróforos FTIC ($2 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) e iodeto de propídio ($20 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) em meio de cultura LB, perfazendo 110 μL . **A.** Fluorescência verde indica células viáveis marcadas pelo FTIC. **B.** Fluorescência vermelha representa células comprometidas identificadas pelo iodeto de propídio. **C.** Sobreposição das fluorescências verde e vermelha.

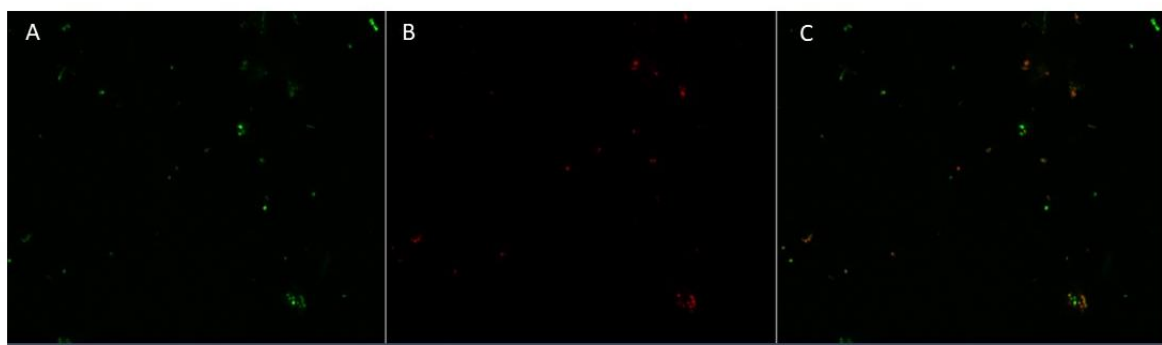


Figura 24. Imagem de microscopia confocal capturada após 4 horas de cultivo de *Ralstonia solanacearum* na presença do peptídeo RB2 (175 μM). O ensaio continha 20 μL de suspensão bacteriana ($\text{OD}=0,5$) e os fluoróforos FTIC (2 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) e iodeto de propídio (20 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) em meio de cultura LB, perfazendo 110 μL . **A.** Fluorescência verde indica células viáveis marcadas pelo FTIC. **B.** Fluorescência vermelha representa células comprometidas identificadas pelo iodeto de propídio. **C.** Sobreposição das fluorescências verde e vermelha.

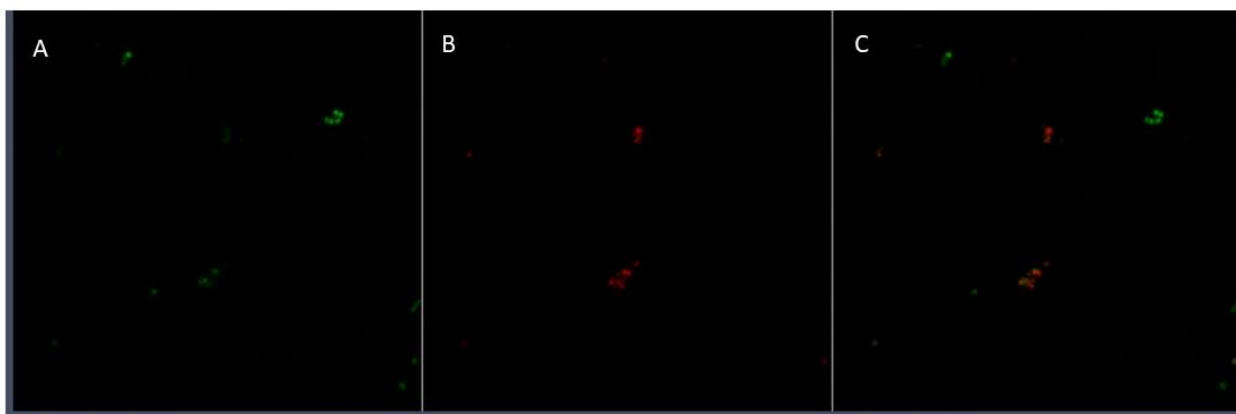


Figura 25. Imagem de microscopia confocal capturada após 8 horas de cultivo de *Ralstonia solanacearum* na presença do peptídeo RB2 (175 μM). O ensaio continha 20 μL de suspensão bacteriana ($\text{OD}=0,5$) e os fluoróforos FTIC (2 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) e iodeto de propídio (20 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) em meio de cultura LB, perfazendo 110 μL . **A.** Fluorescência verde indica células viáveis marcadas pelo FTIC. **B.** Fluorescência vermelha representa células comprometidas identificadas pelo iodeto de propídio. **C.** Sobreposição das fluorescências verde e vermelha.

RB3, peptídeo classificado como não-CPP e não-AMP pelo PeptiDuo, nos tempos de 4h (Figura 26) e 8h (Figura 27), apresentou pouquíssimos sinais de internalização, e a predominância de viabilidade celular, à semelhança do que foi observado para o controle

(Figura 21). Esses resultados, mais uma vez, reforçam que RB3 não possui características de CPP, validando sua classificação como controle negativo em nossa ferramenta.

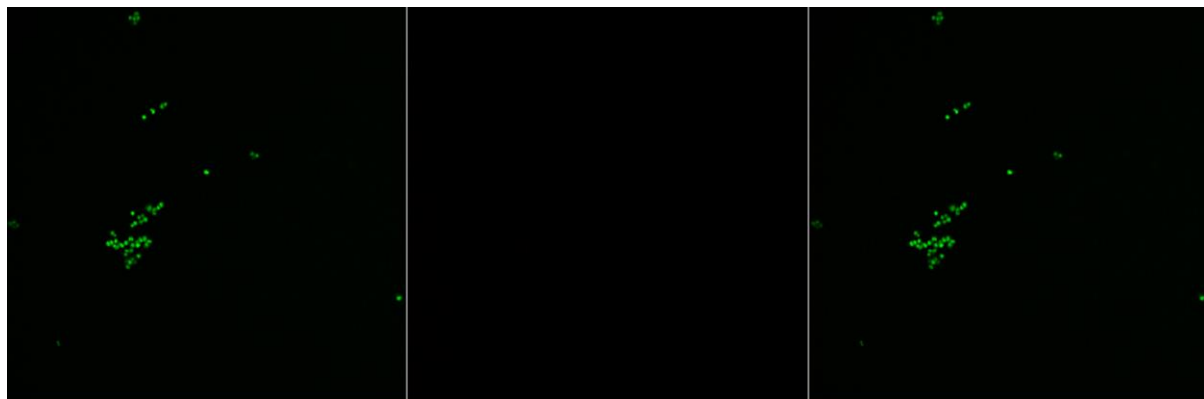


Figura 26. Imagem de microscopia confocal capturada após 4 horas de cultivo de *Ralstonia solanacearum* na presença do peptídeo RB3 (175 μM). O ensaio continha 20 μL de suspensão bacteriana ($\text{OD}=0,5$) e os fluoróforos FTIC (2 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) e iodeto de propídio (20 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) em meio de cultura LB, perfazendo 110 μL . **A.** Fluorescência verde indica células viáveis marcadas pelo FTIC. **B.** Fluorescência vermelha representa células comprometidas identificadas pelo iodeto de propídio. **C.** Sobreposição das fluorescências verde e vermelha.



Figura 27. Imagem de microscopia confocal capturada após 8 horas de cultivo de *Ralstonia solanacearum* na presença do peptídeo RB3 (175 μM). O ensaio continha 20 μL de suspensão bacteriana ($\text{OD}=0,5$) e os fluoróforos FTIC (2 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) e iodeto de propídio (20 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) em meio de cultura LB, perfazendo 110 μL . **A.** Fluorescência verde indica células viáveis marcadas pelo FTIC. **B.** Fluorescência vermelha representa células comprometidas identificadas pelo iodeto de propídio. **C.** Sobreposição das fluorescências verde e vermelha.

Comparado com os demais peptídeos, RB4 foi o que apresentou menor presença de danos à membrana para os tempos de 4 h (Figura 28) e 8h (Figura 29). Em nossa bioprospecção

no PeptiDuo, essa sequência era a que havia obtido o menor score de CPP, e na microscopia conseguimos observar isso também.

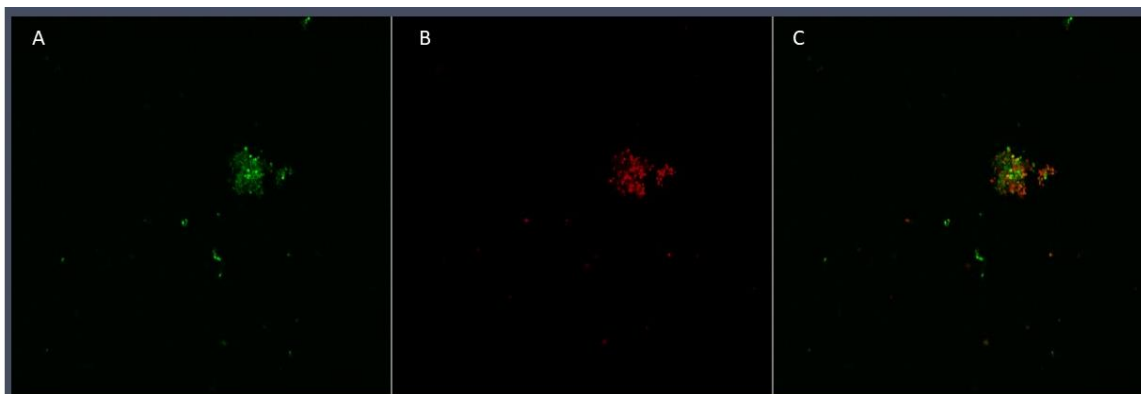


Figura 28. Imagem de microscopia confocal capturada após 4 horas de cultivo de *Ralstonia solanacearum* na presença do peptídeo RB4 (175 μM). O ensaio continha 20 μL de suspensão bacteriana ($\text{OD}=0,5$) e os fluoróforos FTIC (2 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) e iodeto de propídio (20 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) em meio de cultura LB, perfazendo 110 μL . **A.** Fluorescência verde indica células viáveis marcadas pelo FTIC. **B.** Fluorescência vermelha representa células comprometidas identificadas pelo iodeto de propídio. **C.** Sobreposição das fluorescências verde e vermelha.

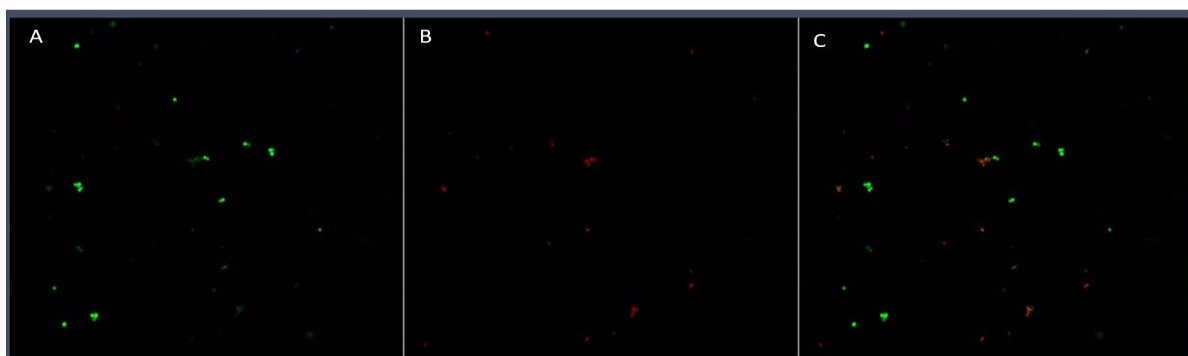


Figura 29. Imagem de microscopia confocal capturada após 8 horas de cultivo de *Ralstonia solanacearum* na presença do peptídeo RB4 (175 μM). O ensaio continha 20 μL de suspensão bacteriana ($\text{OD}=0,5$) e os fluoróforos FTIC (2 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) e iodeto de propídio (20 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) em meio de cultura LB, perfazendo 110 μL . **A.** Fluorescência verde indica células viáveis marcadas pelo FTIC. **B.** Fluorescência vermelha representa células comprometidas identificadas pelo iodeto de propídio. **C.** Sobreposição das fluorescências verde e vermelha.

Análises *in silico* indicaram que nenhuma das proteínas possui predição de alças transmembrana, o que favorece a expressão eficiente em sistemas intracelulares, minimizando problemas relacionados à inserção na membrana. Além disso, a ausência de peptídeos-sinal nas sequências contribuiu para a clonagem bem-sucedida e para a correta expressão das proteínas recombinantes.

A amplificação dos genes foi confirmada por PCR, e os produtos amplificados foram inseridos no vetor de expressão pET28a. A Figura 30 apresenta as bandas amplificadas correspondentes às cepas de expressão *Escherichia coli* SHuffle® T7 e ArcticExpress, para todos os clones, evidenciando diferenças. A seleção das cepas foi assim baseada na eficiência de amplificação observada, sendo a cepa de expressão *E. coli* SHuffle® T7 utilizada para o clone pET28a/dfp1 e a *E. coli* ArcticExpress empregada para os clones pET28a/dfp2 e pET28a/dfg1.

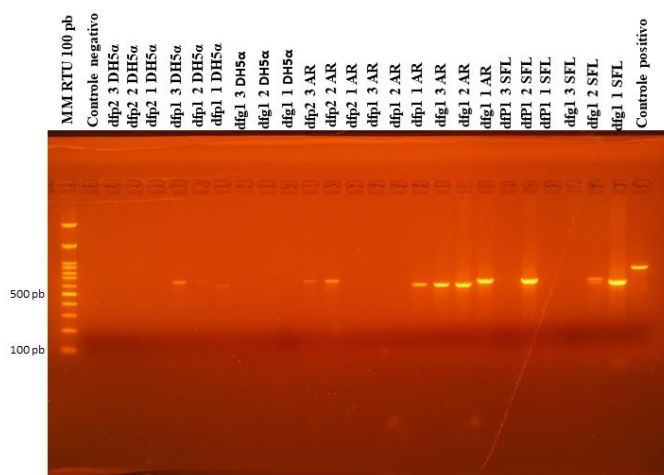


Figura 30. Confirmação da clonagem dos genes *dfp1*, *dfp2* e *dfg1* no vetor de expressão pET28a. Eletroforese em gel de agarose a 2%, contendo os produtos de PCR obtidos após amplificação dos genes inseridos no vetor. MM: marcador molecular de DNA (100 pb 3'RTU). Controle negativo: água. Controle positivo: gene de 460 pb previamente clonado em pET28a.

Bandas amplificadas foram então observadas no padrão esperado para os três clones, na faixa de aproximadamente 600 pb. O par de primers referente ao promotor T7 do vetor amplifica um fragmento de DNA de cerca de 300 pb. Com a inserção do gene de interesse no vetor, o fragmento amplificado aumenta proporcionalmente ao tamanho do gene, resultando em produtos de PCR maiores, como esperado para os clones positivos. Esses resultados confirmam a inserção dos genes nos vetores de expressão.

5.6 Expressão das proteínas

A expressão das proteínas foi induzida com 1 mM de IPTG, e a análise da expressão foi feita com o tempo de 24 h para a *E. coli* SHuffle® T7, e 3h para *E. coli* ArcticExpress. A Figura 31 apresenta o resultado da separação, por SDS-PAGE, das proteínas presentes nas frações solúvel e corpo de inclusão da expressão de dfp1, dfp2 e dfg1. Bandas foram observadas em aproximadamente 15 kDa, que correspondem à massa molecular esperada para as proteínas recombinantes.

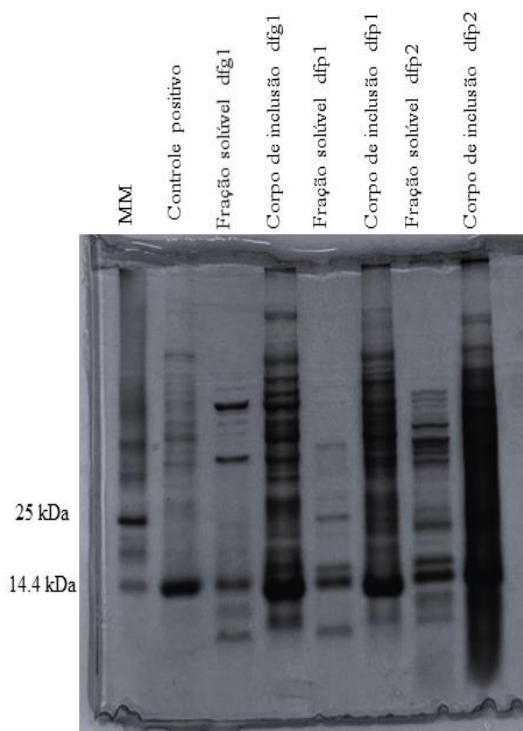


Figura 31. Avaliação das proteínas expressas por dfp1, dfp2 e dfg1. SDS-Tricina PAGE das frações solúvel e de corpos de inclusão resultantes da expressão. MM: Marcador molecular com intervalo de 14,4 a 66,2 kDa. Controle positivo: proteína já expressa previamente com 15 kDa.

As proteínas recombinantes dfp1, dfp2 e dfg1 foram analisadas por Western Blot (Figura 32) para confirmar sua expressão e avaliar a distribuição das proteínas de interesse expressas entre as frações solúvel e corpos de inclusão, que foram observadas próximas a 15 kDa, conforme esperado. Nas frações solúveis, as bandas foram pouco visíveis, indicando menor expressão das proteínas em sua forma solúvel, devendo ser observado que a concentração protéica das frações solúveis no gel era de 2 a 3 vezes menor do que a

concentração das frações contendo os corpos de inclusão (Tabela 9). Comparando-se com as frações solúveis, as frações referentes aos corpos de inclusão apresentaram bandas intensas, demonstrando que as proteínas foram mais intensamente expressas na forma insolúvel, porém tendo ocorrido também alta expressão nas frações solúveis. O padrão de expressão em corpos de inclusão é característico de proteínas recombinantes expressas em sistemas bacterianos, especialmente quando em altas concentrações, podendo resultar em agregação e formação de corpos de inclusão. A análise do controle positivo validou a funcionalidade do ensaio, com bandas bem definidas no gel. Esses dados reforçam que as proteínas recombinantes foram corretamente expressas e oferecem um ponto de partida para estudos futuros de purificação e aplicação biotecnológica.

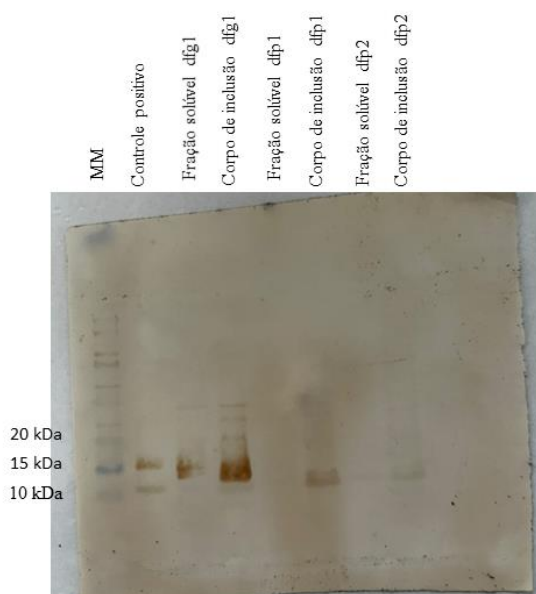


Figura 32. Análise de expressão das proteínas recombinantes dfp1, dfp2 e dfg1 em *Escherichia coli* por Western Blot. As amostras corresponderam a 18 μ L das frações solúveis e de corpos de inclusão obtidas após a indução da expressão, com concentrações apresentadas na Tabela 9. MM: marcador de peso molecular. Controle positivo: proteína recombinante previamente validada.

Tabela 9. Concentração de proteínas nas frações expressas dos clones dfp1, dfp2 e dfg1, determinada pela metodologia Qubit Fluorometric Quantification (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)

Clonagem	Proteína na fração solúvel ($\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)	Proteína na fração corpos de inclusão ($\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)
dfp1	1,86	4,16
dfp2	2,68	4,18
dfg1	1,82	2,92

6. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo confirmam a eficiência do preditor desenvolvido para identificar peptídeos com dupla função, a saber, peptídeos de penetração celular (CPPs) e peptídeos antimicrobianos (AMPs) simultaneamente. De acordo com a literatura atual, não existem ferramentas de predições *duplas* específicas para peptídeos com atividades antimicrobiana e de penetração celular simultaneamente. As abordagens experimentais descritas na literatura, em sua maioria, buscam criar moléculas multifuncionais por meio da fusão de sequências distintas de CPPs e AMPs. Descrevemos, assim, a primeira proposta de preditor de dupla função para CPPs e AMPs, e peptídeos aqui descritos foram ensaiados e o preditor foi validado por ensaios antimicrobianos e microscopia, buscando-se também sua expressão para aplicação biotecnológica.

Uma das grandes dificuldades dos peptídeos com mais de uma função é integrar diversas propriedades em uma única sequência de forma eficiente. Estratégias tradicionais muitas vezes envolvem a fusão de diferentes peptídeos por meio de *linkers* ou a adição de propriedades adicionais em peptídeos já caracterizados, o que pode limitar o desempenho final e a eficiência do design racional (HSUEH et al., 2023), além de custos de produção e dificuldades adicionais na síntese em larga escala. Dessa forma o uso de aprendizado de máquina (*machine learning*, em inglês) surge como uma abordagem eficiente, permitindo o desenho de sequências peptídicas que combinem simultaneamente múltiplas características desejadas, como atividades antimicrobianas e de penetração celular. Essa abordagem facilita a identificação de novos candidatos, com maior potencial terapêutico, e reduz a dependência de técnicas laboratoriais, em geral demoradas e de alto custo.

A validação *in silico* revelou que os peptídeos selecionados apresentaram características esperadas para atividades antimicrobiana e de penetração celular, como carga positiva elevada e presença de resíduos hidrofóbicos, propriedades essenciais para a interação com membranas celulares (BUCATARU; CIOBANASU, 2024; HUANG; LI, 2023). Resíduos catiônicos e hidrofóbicos estão muito presentes nas sequências peptídicas obtidas, como era esperado, visto que aumentam tanto a interação eletrostática com a membrana plasmática, quanto a penetração celular. Apesar de arginina e lisina serem resíduos de aminoácidos catiônicos, a presença da arginina mostra-se mais eficiente para a penetração na membrana, o que foi também obtido em nossas análises. Além disso, a arginina apresenta um maior volume de ligações de hidrogênio

nas interações cátion- π , o que facilita a interação com as cargas negativas presentes na membrana bacteriana (CHAN et al., 2006).

Esses resultados destacam o potencial do PeptiDuo como ferramenta para acelerar a descoberta de novos peptídeos terapêuticos, conforme os trabalhos recentes na bioinformática para explorar sequências proteômicas e/ou genômicas em busca de novos candidatos antimicrobianos.

Além disso, um diferencial importante do preditor desenvolvido neste trabalho foi a capacidade de identificar criptídeos, ou seja, fragmentos de sequências, caso o usuário opte por essa abordagem. Essa funcionalidade amplia vastamente as possibilidades de bioprospecção, permitindo a análise de partes de sequências de proteínas ou de genes que possam conter regiões funcionalmente relevantes, mesmo que a sequência completa não apresente propriedades antimicrobianas ou de penetração celular evidentes ou ainda descritas. Neste trabalho, todas as sequências peptídicas obtidas com alta predição para dupla função sintetizadas tiveram entre 12 e 18 resíduos de aminoácidos, um tamanho protéico relativamente pequeno, que pode diminuir os custos de produção em larga escala quando da aplicação biotecnológica. Além disso, sequências curtas podem apresentar maior estabilidade e menor potencial de respostas imunogênicas (STROM et al., 2003).

A atividade antimicrobiana dos peptídeos foi confirmada por ensaios *in vitro*, com inibição significativa do crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Esse resultado reforça a eficácia dos peptídeos identificados, que provavelmente agem desestabilizando a membrana bacteriana, um mecanismo amplamente descrito para AMPs (XUAN et al., 2023). Além disso, a microscopia confocal evidenciou a interação dos peptídeos com as membranas bacterianas, confirmando a permeabilização. Estudos prévios já apontam que CPPs e AMPs compartilham características estruturais que facilitam a translocação e inserção em membranas bacterianas (BUCCINI; CARDOSO; FRANCO, 2021).

Os AMPs apresentam um risco menor de induzir resistência em microrganismos, e quando combinados com fragmentos de CPPs, sua capacidade de penetração celular é amplificada, permitindo a entrega intracelular eficiente, tanto de AMPs quanto de outros agentes terapêuticos. Essa integração entre AMPs e CPPs representa um campo de pesquisa em evidência, com grande potencial para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas

e diagnósticas (KRAVCHENKO et al., 2023). A identificação de peptídeos com dupla função em nosso trabalho mostra um método mais eficiente e simplificado para enfrentar patógenos.

Continuando essa abordagem, a clonagem e expressão das proteínas recombinantes dfp1, dfp2 e dfg1 possibilitaram a produção de moléculas que aliam atividade antimicrobiana à capacidade de penetração celular em sistemas heterólogos. Todas as proteínas foram expressas, embora com maior presença no corpo de inclusão. Este resultado pode ser comum em proteínas recombinantes expressas em *Escherichia coli*, ocorrendo por exemplo devido ao dobramento incorreto das proteínas (ROSANO; CECCARELLI, 2014), ou como são pequenos, da interação entre grupamento hidrofóbicos de regiões não dobradas. Uma forma de reduzir a formação de corpos de inclusão em proteínas recombinantes é interromper a expressão proteica após a indução inicial. Isso pode ser realizado removendo o indutor e substituindo o meio por um fresco, suplementado com cloranfenicol, um inibidor da síntese proteica. Esse procedimento promove o recrutamento de chaperonas moleculares, que auxiliam no dobramento correto dos polipeptídeos recém-sintetizados, melhorando a solubilidade das proteínas recombinantes (CARRIÓ; VILLAVARDE, 2002). Ainda sim, a presença de proteínas nas frações solúveis foi promissora, e indica a possibilidade de otimização do processo para aumentar a solubilidade. A confirmação da identidade das proteínas recombinantes por Western blotting reforçou a especificidade e eficiência do sistema de expressão utilizado.

A integração das abordagens *in silico* e *in vitro* permitiu uma análise abrangente das características e do potencial terapêutico dos peptídeos estudados. A capacidade de identificar e expressar proteínas ou peptídeos com propriedades antimicrobianas e de penetração celular representa um avanço significativo na busca por alternativas aos antibióticos convencionais, especialmente em um cenário de aumento da resistência bacteriana (DEL RIO; TREJO PEREZ; BRIZUELA, 2022).

Além das aplicações terapêuticas, os peptídeos propostos no trabalho também apresentam potencial significativo em outras áreas, como a agricultura. AMPs têm sido amplamente explorados como compostos de defesa em culturas agrícolas devido à sua capacidade de atuar contra patógenos fúngicos e bacterianos que causam prejuízos econômicos relevantes (MONTESINOS, 2007). As defensinas, por exemplo, têm sido empregadas em plantas transgênicas para aumentar a resistência a doenças e reduzir o uso de pesticidas químicos, contribuindo para agriculturas mais sustentáveis (MARCOS; GANDIA, 2008). Neste contexto, os peptídeos com dupla função identificados no presente estudo poderiam ser

aplicados como agentes antimicrobianos em tratamentos tópicos ou em sistemas de liberação controlada, protegendo as plantas de infecções enquanto minimizam os impactos ambientais. Essa versatilidade reforça a importância de integrar abordagens computacionais, como o preditor desenvolvido, para acelerar a descoberta de moléculas bioativas com múltiplas aplicações, desde a saúde humana até a proteção ambiental.

7. CONCLUSÃO

Este estudo abordou de forma abrangente a identificação e caracterização de peptídeos bioativos com dupla função, atuando tanto como penetradores celulares quanto como antimicrobianos. Por meio de uma abordagem envolvendo a bioprospecção *in silico* de genomas e proteomas de espécies vegetais, incluindo berinjela, girassol e pimentão, foi possível identificar novas sequências peptídicas promissoras. Até onde se sabe, não existem ferramentas que realizem a predição integrada de dupla funcionalidade, sendo capaz de explorar as propriedades compartilhadas por CPPs e AMPs. Essas características permitem a interação com membranas celulares, e também facilitam a atuação antimicrobiana. A inclusão de sequências mínimas no processo de predição apresenta uma vantagem significativa, especialmente na redução de custos de síntese e na viabilidade de produção em larga escala. O desenvolvimento do PeptiDuo, ferramenta aqui proposta, um preditor baseado em aprendizado de máquina capaz de classificar eficientemente peptídeos com essas funções, representou um avanço significativo em relação aos preditores existentes, mostrando alta precisão na análise de sequências completas e fragmentadas (criptídeos). Essa inovação destaca o potencial dos criptídeos como fontes de moléculas bioativas, ampliando as possibilidades para aplicações biotecnológicas e terapêuticas.

Os peptídeos selecionados apresentaram propriedades características de CPPs e AMPs, como carga positiva elevada e anfifilicidade, confirmadas por análises *in silico* e validações experimentais *in vitro*. Os ensaios demonstraram atividade antimicrobiana significativa contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de capacidade de permeabilização de membranas bacterianas, confirmada por microscopia confocal. Além disso, a clonagem e expressão dos peptídeos em sistemas heterólogos possibilitaram a obtenção de proteínas recombinantes, embora ainda que com desafios relacionados à formação de corpos de inclusão.

Os resultados obtidos ressaltam o potencial dos peptídeos bioativos identificados para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, particularmente no combate à resistência bacteriana, um dos maiores desafios da saúde pública global. Em paralelo, suas aplicações na agricultura como agentes antimicrobianos sustentáveis oferecem uma alternativa promissora para a proteção de culturas contra patógenos, reduzindo a dependência de pesticidas químicos.

A abordagem ampla deste trabalho, integrando bioinformática, bioquímica de proteínas, biotecnologia e análises laboratoriais, reforça a importância da utilização de ferramentas computacionais para acelerar a descoberta de novas moléculas bioativas. Os resultados obtidos fornecem informações para estudos futuros, incluindo a otimização dos peptídeos identificados, a avaliação de suas aplicações em modelos *in vivo* e o desenvolvimento de produtos para uso clínico e agrícola. Assim, este estudo contribui de maneira relevante para a exploração do potencial biotecnológico de peptídeos vegetais, ampliando o conhecimento sobre sua funcionalidade e suas aplicações práticas em diferentes áreas.

8. REFERÊNCIAS

AGRAWAL, Piyush et al. CPPsite 2.0: a repository of experimentally validated cell-penetrating peptides. **Nucleic acids research**, v. 44, n. D1, p. D1098-D1103, 2016. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1266>

AHMED, Firuj et al. Combating antimicrobial resistance: a paradigm shift from general to precision medicine. **Chemical Biology Letters**, v. 11, n. 2, p. 662-662, 2024. <https://doi.org/10.62110/sciencein.cbl.2024.v11.662>

AKBARIAN, Mohsen et al. Bioactive peptides: Synthesis, sources, applications, and proposed mechanisms of action. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 3, p. 1445, 2022. <https://doi.org/10.3390/ijms23031445>

ALMAGRO ARMENTEROS, José Juan et al. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. **Nature biotechnology**, v. 37, n. 4, p. 420-423, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0036-z>

APOSTOLOPOULOS, Vasso et al. A global review on short peptides: frontiers and perspectives. **Molecules**, v. 26, n. 2, p. 430, 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26020430>

AVCI, Fatma; AKBULUT, Berna; OZKIRIMLI, Elif. Membrane active peptides and their biophysical characterization. **Biomolecules**, vol, 8, no 77, 2018. <https://doi.org/10.3390/biom8030077>

BASITH, Shaherin; MANAVALAN, Balachandran; HWAN SHIN, Tae; LEE, Gwang. Machine intelligence in peptide therapeutics: A next-generation tool for rapid disease screening. **Medicinal Research Reviews**, vol. 40, no. 4, p. 1276–1314, 2020. <https://doi.org/10.1002/med.21658>.

BLAIR, Jessica MA et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature reviews microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42-51, 2015. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>

BONETTA, Rosalin; VALENTINO, Gianluca. Machine learning techniques for protein function prediction. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 88, n. 3, p. 397-413, 2020. <https://publons.com/publon/10.1002/prot.25832>

BRASSEUR, Robert; DIVITA, Gilles. Happy birthday cell penetrating peptides: Already 20years. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, vol. 1798, no. 12, p. 2177–2181, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.09.001>

BROWN, Nigel P.; LEROY, Christophe; SANDER, Chris. MView: a web-compatible database search or multiple alignment viewer. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 14, n. 4, p. 380-381, 1998. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/14.4.380>

BROWNE, Katrina, et al. A new era of antibiotics: The clinical potential of antimicrobial peptides. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 21, no. 19, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21197047>.

BUCATARU, Cezara; CIOBANASU, Corina. Antimicrobial peptides: Opportunities and challenges in overcoming resistance. **Microbiological Research**, p. 127822, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2024.127822>

BUCCINI, Danieli F.; CARDOSO, Marlon H.; FRANCO, Octavio L. Antimicrobial peptides and cell-penetrating peptides for treating intracellular bacterial infections. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 10, p. 612931, 2021. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.612931>

BURNS, Kelly E.; MCCLEEREY, Tanner P.; THÉVENIN, Damien. pH-selective cytotoxicity of pHLIP-antimicrobial peptide conjugates. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 28465, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep28465>

CALIS, Jorg JA et al. Properties of MHC class I presented peptides that enhance immunogenicity. **PLoS computational biology**, v. 9, n. 10, p. e1003266, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003266>.

CARRIO,M.M.; VILLAVERDE,A. Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. **J. Biotechnol**, v. 96, p. 3–12 , 2002. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(02\)00032-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00032-9)

CHAN, David; PRENNER, Elmar; VOGEL, Hans. Tryptophan-and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, vol. 1758, no. 9, p. 1184–1202, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.04.006>

CHEN, Lei et al. Prediction and analysis of cell-penetrating peptides using pseudo-amino acid composition and random forest models. **Amino acids**, v. 47, p. 1485-1493, 2015.

CHIU, Tiffany; POU CET, Theo; LI, Yanran. The potential of plant proteins as antifungal agents for agricultural applications. **Synthetic and systems biotechnology**, v. 7, n. 4, p. 1075-1083, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2022.06.009>

CROOKS, Gavin E. et al. WebLogo: a sequence logo generator. **Genome research**, v. 14, n. 6, p. 1188-1190, 2004. [doi/10.1101/gr.849004](https://doi.org/10.1101/gr.849004).

DAMIATI, Safa A.; ALAOFI, Ahmed L.; DHAR, Prajnaparamita; ALHAKAMY, Nabil A. Novel machine learning application for prediction of membrane insertion potential of cell-penetrating peptides. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 567, no. June, p. 118453, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118453>.

DASSONVILLE-KLIMPT, Alexandra; SONNET, Pascal. Advances in “Trojan horse” strategies in antibiotic delivery systems. **Future Medicinal Chemistry**, vol. 12, no. 11, p. 983–986, 2020. <https://doi.org/10.4155/fmc-2020-0065>.

DE OLIVEIRA, Ewerton Cristhian Lima; SANTANA, Kauê; JOSINO, Luiz; LIMA E LIMA, Anderson Henrique; DE SOUZA DE SALES JÚNIOR, Claudomiro. Predicting cell-penetrating peptides using machine learning algorithms and navigating in their chemical space. **Scientific Reports**, vol. 11, no. 1, p. 1–15, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87134-w>.

DEL RIO, Gabriel; TREJO PEREZ, Mario A.; BRIZUELA, Carlos A. Antimicrobial peptides with cell-penetrating activity as prophylactic and treatment drugs. **Bioscience reports**, v. 42, n. 9, p. BSR20221789, 2022. [doi: 10.1042/BSR20221789](https://doi.org/10.1042/BSR20221789)

DERAKHSHANKHAH, Hossein; JAFARI, Samira. Cell penetrating peptides: A concise review with emphasis on biomedical applications. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, vol. 108, no. June, p. 1090–1096, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.097>.

DIMITROV, Ivan et al. AllerTOP v. 2—a server for in silico prediction of allergens. **Journal of molecular modeling**, v. 20, p. 1-6, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00894-014-2278-5>

EKINS, Sean; PUHL, Ana C.; ZORN, Kimberley M.; LANE, Thomas R.; RUSSO, Daniel P.; KLEIN, Jennifer J.; HICKEY, Anthony J.; CLARK, Alex M. Exploiting machine learning for end-to-end drug discovery and development. **Nature Materials**, vol. 18, no. 5, p. 435–441, 1 May 2019. <https://doi.org/10.1038/s41563-019-0338-z>.

EKSTEEN, J. Johannes et al. Selective intracellular delivery of thiolated cargo to tumor and neovasculature cells using histidine-rich peptides as vectors. **ACS omega**, v. 5, n. 10, p. 4937–4942, 2020. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b00700>

FIX, Evelyn. Discriminatory analysis: nonparametric discrimination, consistency properties. USAF school of Aviation Medicine, 1985.

FREIRE, João. Miguel., ALMEIDA DIAS, Susana., FLORES, Luís., VEIGA, Ana. Salomé.; CASTANHO, Miguel. Mining viral proteins for antimicrobial and cellpenetrating drug delivery peptides. **Bioinformatics**, vol. 31, no. 14, p. 2252–2256, 2015. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv131>

GASTEIGER, E. et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: Walker, J.M. (eds) **The Proteomics Protocols Handbook. Springer Protocols Handbooks**. Humana Press, 2005. <https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571>

GAUTAM, Ankur et al. CPPsite: a curated database of cell penetrating peptides. **Database**, v. 2012, p. bas015, 2012. <https://doi.org/10.1093/database/bas015>

Gautier, R., Douguet, D., Antony, B., & Drin, G. (2008). HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific α -helical properties. **Bioinformatics**, 24(18), 2101-2102. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn392>

GAWDE U, Chakraborty S, Waghun FH, Barai RS, Khanderkar A, Indraguru R, Shirsat T, Idicula-Thomas S. CAMPR4: a database of natural and synthetic antimicrobial peptides. **Nucleic Acids Research**, 2023, Vol. 51, D377–D383. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac933>

GEURTS, Pierre; ERNST, Damien; WEHENKEL, Louis. Extremely randomized trees. **Machine learning**, v. 63, p. 3-42, 2006. <https://doi.org/10.1007/s10994-006-6226-1>

GHORAI, Soma Mondal et al. Cell-penetrating and targeted peptides delivery systems as potential pharmaceutical carriers for enhanced delivery across the blood–brain barrier (BBB). **Pharmaceutics**, v. 15, n. 7, p. 1999, 2023. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15071999>

GUIDOTTI, Giulia; BRAMBILLA, Liliana; ROSSI, Daniela. Cell-Penetrating Peptides: From Basic Research to Clinics. **Trends in Pharmacological Sciences**, vol. 38, no. 4, p. 406–424, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.01.003>.

GUPTA, Sudheer et al. In silico approach for predicting toxicity of peptides and proteins. **PloS one**, v. 8, n. 9, p. e73957, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073957>

HANCOCK, Robert EW; SAHL, Hans-Georg. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nature biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 1551-1557, 2006. <https://doi.org/10.1038/nbt1267>

HSUEH, Henry T. et al. Machine learning-driven multifunctional peptide engineering for sustained ocular drug delivery. **Nature communications**, v. 14, n. 1, p. 2509, 2023. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38056-w>

HUAN, Yuchen et al. Antimicrobial peptides: classification, design, application and research progress in multiple fields. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 582779, 2020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582779>

HUANG, Xucheng; LI, Guoli. Antimicrobial peptides and cell-penetrating peptides: non-antibiotic membrane-targeting strategies against bacterial infections. **Infection and Drug Resistance**, p. 1203-1219, 2023. <https://doi.org/10.2147/IDR.S396566>

IAVARONE, Federica; DESIDERIO, Claudia; VITALI, Alberto; MESSANA, Irene; MARTELLI, Claudia.; CASTAGNOLA, Massimo; CABRAS, Tiziana. Cryptides: Latent peptides everywhere. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, vol. 53, no. 3, p. 246–263, 2018. <https://doi.org/10.1080/10409238.2018.1447543>

JORGE, Paula; LOURENCO, Analia; PEREIRA, Maria Olivia. New trends in peptide based anti-biofilm strategies: a review of recent achievements and bioinformatic approaches. **Biofouling**, vol. 28, no. 10, p. 1033–1061, 2012. <http://dx.doi.org/10.1080/08927014.2012.728210>

JURETIĆ, Davor. Designed multifunctional peptides for intracellular targets. **Antibiotics**, v. 11, n. 9, p. 1196, 2022. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11091196>

KALAFATOVIC, Daniela; GIRALT, Ernest. Cell-penetrating peptides: Design strategies beyond primary structure and amphipathicity. **Molecules**, vol. 22, no. 11, p. 1929, 2017. <https://doi.org/10.3390/molecules22111929>

KRAVCHENKO, Sergey V. et al. Enhancing the Antimicrobial Properties of Peptides through Cell-Penetrating Peptide Conjugation: A Comprehensive Assessment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 23, p. 16723, 2023. <https://doi.org/10.3390/ijms242316723>

KROGH, Anders et al. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. **Journal of molecular biology**, v. 305, n. 3, p. 567-580, 2001. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4315>

KUMAR, Vinod; AGRAWAL, Piyush; KUMAR, Rajesh; BHALLA, Sherry; USMANI, Salman Sadullah; VARSHNEY, Grish C.; RAGHAVA, Gajendra P.S. Prediction of cell-penetrating potential of modified peptides containing natural and chemically modified residues. **Frontiers in Microbiology**, vol. 9, no. APR, p. 1–10, 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00725>.

LEAR, Sam; COBB, Steven L. Pep-Calc. com: a set of web utilities for the calculation of peptide and peptoid properties and automatic mass spectral peak assignment. **Journal of computer-aided molecular design**, v. 30, p. 271-277, 2016. <https://doi.org/10.1007/s10822-016-9902-7>

LEE, H., LIM S. I., SHIN, S. H., LIM, Y., KOH, J. W., YANG, S. (2019). Conjugation of cell-penetrating peptides to antimicrobial peptides enhances antibacterial activity. **ACS omega**, vol. 4, no. 13, p. 15694–15701, 2019. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b02278>.

LI, Junpeng et al. Plant antimicrobial peptides: structures, functions, and applications. **Botanical Studies**, v. 62, n. 1, p. 5, 2021. <https://doi.org/10.1186/s40529-021-00312-x>

LIN, Tzu-Tang et al. AI4AMP: an antimicrobial Peptide predictor using physicochemical property-Based encoding method and deep learning. **Msystems**, v. 6, n. 6, p. e00299-21, 2021. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00299-21>

LUO, Ying; SONG, Yuzhu. Mechanism of antimicrobial peptides: antimicrobial, anti-inflammatory and antibiofilm activities. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 21, p. 11401, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms222111401>

MADANI, Fatemeh; LINDNBERG, Sttavan; LANGEL, ÜLO; FUTAKI, Shiroh; GRANSLUND, Astrid,. Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. **Journal of biophysics**, 2011. doi:10.1155/2011/414729

Manavalan, B., Subramaniyam, S., Shin, T. H., Kim, M. O., & Lee, G. (2018). Machine-learning-based prediction of cell-penetrating peptides and their uptake efficiency with improved accuracy. **Journal of Proteome Research**, 17(8), 2715-2726. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.8b00148>

MANGONI, Maria Luisa; MCDERMOTT, Alison M.; ZASLOFF, Michael. Antimicrobial peptides and wound healing: biological and therapeutic considerations. **Experimental dermatology**, v. 25, n. 3, p. 167-173, 2016.

MARCOS, Jose F.; GANDÍA, Mónica. Antimicrobial peptides: to membranes and beyond. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 4, n. 6, p. 659-671, 2009. [10.1517/17460440902992888](https://doi.org/10.1517/17460440902992888)

MATSUZAKI, Katsumi. Antimicrobial peptides: basics for clinical application. Springer, 2019.

MAURYA, Neha S.; KUSHWAHA, Sandeep; MANI, Ashutosh. Recent advances and computational approaches in peptide drug discovery. **Current pharmaceutical design**, v. 25, n. 31, p. 3358-3366, 2019.

Meher, P. K., Sahu, T. K., Saini, V. and Rao, A. R. (2017). Predicting antimicrobial peptides with improved accuracy by incorporating the compositional, physico-chemical and structural features into Chou's general PseAAC. **Scientific Reports**,7(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/srep42362>

MISHRA, Biswajit et al. Host defense antimicrobial peptides as antibiotics: design and application strategies. **Current opinion in chemical biology**, v. 38, p. 87-96, 2017.

MONTESINOS, Emilio. Antimicrobial peptides and plant disease control. **FEMS microbiology letters**, v. 270, n. 1, p. 1-11, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00683.x>

MORETTA, Antonio; SCIEUZO, Carmen; PETRONE, Anna Maria; SALVIA, Rosanna; MANNIELLO, Michele Dario; FRANCO, Antonio; LUCCHETTI, Donatella; VASSALLO,

Antonio; VOGEL, Heiko; SGAMBATO, Alessandro; FALABELLA, Patrizia. Antimicrobial Peptides: A New Hope in Biomedical and Pharmaceutical Fields. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, vol. 11, 14 Jun. 2021. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.668632>.

MUNITA, Jose M.; ARIAS, Cesar A. Mechanisms of antibiotic resistance. **Virulence mechanisms of bacterial pathogens**, p. 481-511, 2016. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00820-y>.

NER, Joanna; H KOTLINSKA, Jolanta; SILBERRING, Jerzy. Crypteins-an overlooked piece of peptide systems. **Current Protein and Peptide Science**, v. 16, n. 3, p. 203-218, 2015

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Resistência antimicrobiana. 2023. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/resistencia-antimicrobiana>.

PANE, Katia et al. Antimicrobial potency of cationic antimicrobial peptides can be predicted from their amino acid composition: Application to the detection of “cryptic” antimicrobial peptides. **Journal of theoretical biology**, v. 419, p. 254-265, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2017.02.012>

PUSHPANATHAN, Muthuirulan; GUNASEKARAN, Paramasamy; RAJENDHRAN, Jeyaprakash. Antimicrobial peptides: versatile biological properties. **International journal of peptides**, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/675391>.

QIANG, Xiaoli et al. CPPred-FL: a sequence-based predictor for large-scale identification of cell-penetrating peptides by feature representation learning. **Briefings in Bioinformatics**, v. 21, n. 1, p. 11-23, 2020. <https://doi.org/10.1093/bib/bby091>

RODRIGUES, Fábio Assad. Féres; SILVA, Giarlã Cunha; SANTANA, Matheus Ferreira; BAZZOLLI, Denise Mara. Soares; ROSSI, Ciro César; DIAZ, Marisa Alves Nogueira. Essential oils isolated from popular medicinal plants and spices as alternative antimicrobial and antibiofilm compounds against the pig pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Ciência Rural**, vol. 53, no. 5, 2023.

ROSANO, Germán L.; CECCARELLI, Eduardo A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 172, 2014. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>

RUSESKA, Ivana; ZIMMER, Andreas. Internalization mechanisms of cell-penetrating peptides. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, vol. 11, p. 101–123, 2020. <https://doi.org/10.3762/bjnano.11.10>.

SELS, Jan et al. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. **Plant physiology and biochemistry**, v. 46, n. 11, p. 941-950, 2008.

Shi G, Kang X, Dong F, Liu Y, Zhu N, Hu Y, Xu H, Lao X, Zheng H. DRAMP 3.0: an enhanced comprehensive data repository of antimicrobial peptides. **Nucleic Acids Res.** 2022 Jan 7; 50(D1):D488-D496. doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gkab651>

SIEVERS, Fabian; HIGGINS, Desmond G. Clustal omega. **Current protocols in bioinformatics**, v. 48, n. 1, p. 3.13. 1-3.13. 16, 2014. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0313s48>

SPLITH, Katrin; NEUNDORF, Ines. Antimicrobial peptides with cell-penetrating peptide properties and vice versa. **European Biophysics Journal**, vol. 40, no. 4, p. 387–397, 2011. <https://doi.org/10.1007/s00249-011-0682-7>.

STRØM, Morten, HAUG, Bengt, SKAR, Merete, STENSEN, Wenchen, STILBERG, Trine, SVENDSEN, Jhon. The pharmacophore of short cationic antibacterial peptides. **Journal of medicinal chemistry**, vol. 4, .no. 9, p. 1567–1570, 2003. <https://doi.org/10.1021/jm0340039>

TAM, James P. et al. Antimicrobial peptides from plants. **Pharmaceuticals**, v. 8, n. 4, p. 711-757, 2015. <https://doi.org/10.3390/ph8040711>

TANG, Hua et al. Prediction of cell-penetrating peptides with feature selection techniques. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 477, n. 1, p. 150-154, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.06.035>

TROFIMENKO, Evgeniya. Novel insights into direct translocation and endocytosis of cell-penetrating peptides. **Tese de doutorado**, 2021. Available at: <http://serval.unil.ch>.

VAPNIK, V; CHERVONENKIS, A. On the uniform convergence of relative frequencies of events to their probabilities. **Theory of Probability and its Applications**, 16(2):283–305, 1971.

VINCZE, Tamas; POSFAI, Janos; ROBERTS, Richard J. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. **Nucleic acids research**, v. 31, n. 13, p. 3688-3691, 2003.

Wang, G., Li, X. and Wang, Z., APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education, **Nucleic Acids Research**, Volume 44, Issue D1, 4 January 2016, Pages D1087–D1093, <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1278>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Antibacterial agents in clinical development: analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis. **Medecine et Maladies Infectieuses**, vol. 26, no. 1, p. 22–25, 2017. [https://doi.org/10.1016/S0399-077X\(96\)80260-5](https://doi.org/10.1016/S0399-077X(96)80260-5).

WU, Aimin; MARCH, Lyn; ZHENG, Xuanqi; HUANG, Jinfeng; WANG, Xiangyang; ZHAO, Jie; M.BLYTH, Fiona; SMITH, Emma; BUCHBINDER, Rachelle; HOY, Damian. A new era of antibiotics: the clinical potential of antimicrobial peptides. **Nature**, vol. 388, p. 1–14, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21197047>

XIE, Jing; BI, Ye; ZHANG, Huan; DONG, Shiyan; TENG, Lesheng; LEE, Robert J.; YANG, Zhaogang. Cell-Penetrating Peptides in Diagnosis and Treatment of Human Diseases: From Preclinical Research to Clinical Application. **Frontiers in Pharmacology**, vol. 11, no. May, p. 1–23, 2020. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00697>.

XU, Jiangkang et al. Penetrating peptides: Applications in drug delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 84, p. 104475, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104475>

XUAN, Jiaqi et al. Antimicrobial peptides for combating drug-resistant bacterial infections. **Drug Resistance Updates**, v. 68, p. 100954, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2023.100954>

YANG, Nicole ; HINNER, Marlon J. Getting across the cell membrane: an overview for small molecules, peptides, and proteins. **Methods in molecular biology** , vol. 1266, p. 29–53, 2015. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2272-7_3.

YE, Junxiao; ERGANG, Liu, ZHILI Yu; XING, Pei; SUNHUI, Chen; PENGWEI, Zhang; MEONG-CHEOL, Shin; JUNBO, Gong; HUINING, He; VICTOR, Yang. CPP assisted intracellular drug delivery, what is next? **International journal of molecular sciences**, vol., 17, no.11, 2016. <https://doi.org/10.3390/ijms17111892>

YOUNT, Nannette Y.; YEAMAN, Michael R. Peptide antimicrobials: cell wall as a bacterial target. **Annals of the New York Academy of sciences**, v. 1277, n. 1, p. 127-138, 2013.

ZASLOFF, Michael. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, vol. 415, no. January, p. 389–395, 2002.

ZEIDERS, Samantha M.; CHMIELEWSKI, Jean. Antibiotic–cell-penetrating peptide conjugates targeting challenging drug-resistant and intracellular pathogenic bacteria. **Chemical Biology and Drug Design**, 2021. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13930>.

ZHAO, Xiaowei et al. LAMP: a database linking antimicrobial peptides. **PloS one**, v. 8, n. 6, p. e66557, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066557>