



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOCIÊNCIAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

PABLO LEANDRO FILGUEIRA FEITOSA

**CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* DE TIONINAS E SNAKINAS COM POTENCIAL
ANTIMICROBIANO CONTRA *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*
MULTIRRESISTENTE**

Mossoró-RN

2026

PABLO LEANDRO FILGUEIRA FEITOSA

**CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* DE TIONINAS E SNAKINAS COM POTENCIAL
ANTIMICROBIANO CONTRA *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*
MULTIRRESISTENTE**

Monografia apresentada à Banca Examinadora,
como trabalho final da componente curricular
Estágio Supervisionado Obrigatório III do Curso de
graduação em Biotecnologia, da Universidade
Federal Rural do Semi-Árido.

Orientador(a): Prof(a) Dr. Francisco Silvestre
Brilhante Bezerra

Mossoró-RN

2026

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

F311c Feitosa, Pablo Leandro Filgueira.
Caracterização in silico de tioninas e snakinas
com potencial antimicrobiano contra pseudomonas
aeruginosa multirresistente / Pablo Leandro
Filgueira Feitosa. - 2026.
77 f. : il.

Orientador: Francisco Silvestre Brilhante
Bezerra.

Coorientador: Francisco Silvestre Brilhante
Bezerra.

Monografia (graduação) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Curso de
Biotecnologia, 2026.

1. Peptídeos antimicrobianos vegetais. 2.
Bioinformática. 3. Resistência bacteriana. I.
Bezerra, Francisco Silvestre Brilhante, orient.
II. Bezerra, Francisco Silvestre Brilhante, co-orient. III.
Título.

Ficha catalográfica elaborada por sistema gerador automático em conformidade
com AACR2 e os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Biblioteca Campus Mossoró / Setor de Informação e Referência
Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva

CRB: 15/120

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

PABLO LEANDRO FILGUEIRA FEITOSA

**CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* DE TIONINAS E SNAKINAS COM POTENCIAL
ANTIMICROBIANO CONTRA *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*
MULTIRRESISTENTE**

Monografia apresentada à Banca Examinadora,
como trabalho final da componente curricular
Estágio Supervisionado Obrigatório III do
Curso de graduação em Biotecnologia, da
Universidade Federal Rural do Semi-Árido.

Defendida em: 03 / 06 / 2026.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **FRANCISCO SILVESTRE BRILHANTE BEZERRA**
Data: 08/06/2026 16:19:26-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Francisco Silvestre Brilhante Bezerra
Presidente e Orientador

Documento assinado digitalmente
 **BARBARA MONIQUE DE FREITAS VASCONCELOS**
Data: 08/06/2026 18:07:05-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Me. Bárbara Monique de Freitas Vasconcelos
Membro Examinador

Documento assinado digitalmente
 **LARA VITORIA DA COSTA BEZERRA**
Data: 08/06/2026 16:08:58-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Bel. Lara Vitória da Costa Bezerra
Membro Examinador

*À minha mãe, que incansavelmente
lutou para que eu tivesse a melhor
vida possível.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe, Liduina, por estar sempre presente em minha vida e por me proporcionar as oportunidades necessárias para estudar, crescer e me desenvolver. À minha irmã, Dara, e ao meu cunhado, Mayk, pelo apoio e incentivo ao longo dessa jornada.

Agradeço também às minhas amigas, Letícia e Meilangy, pela amizade, companhia e por estarem presentes nos momentos mais importantes dessa trajetória.

Minha sincera gratidão aos professores, que compartilharam seus conhecimentos e contribuíram significativamente para minha formação acadêmica e pessoal.

Agradeço, ainda, aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade, atenção e pelas valiosas contribuições na avaliação deste trabalho.

Por fim, agradeço a todos que, de alguma forma, fizeram parte desta caminhada e contribuíram para a realização deste momento.

*“O conhecimento é uma
arma. Arme-se bem antes
de ir para a batalha”*

Meistre Aemon

RESUMO

A resistência antimicrobiana representa uma das principais ameaças à saúde pública mundial, destacando-se *Pseudomonas aeruginosa* como importante patógeno multirresistente associado a infecções nosocomiais. Nesse contexto, peptídeos antimicrobianos vegetais, como tioninas e snakinas, apresentam potencial biotecnológico para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi caracterizar *in silico* peptídeos antimicrobianos das classes de tionina e snakina e avaliar seu potencial de interação com a proteína OprF de *Pseudomonas aeruginosa*. Foram analisadas 146 sequências de tioninas e 2.454 de snakinas obtidas do banco oneKP. As sequências foram processadas pelo SignalP 6.0 e avaliadas quanto à presença de domínios conservados utilizando HMMER. As propriedades físico-químicas e o potencial antimicrobiano foram determinados com Biopython, EMBOSS Pepstats e CAMPR4. As estruturas tridimensionais foram modeladas pelo AlphaFold2. Os melhores peptídeos foram submetidos a *docking* molecular com a proteína OprF utilizando ClusPro, com análises complementares pelo PDBSum e ChimeraX. Entre as sequências analisadas, 71,2% das tioninas e 92,6% das snakinas apresentaram peptídeo sinal. Após filtragem por domínios conservados, permaneceram 126 tioninas e 2.351 snakinas. A maioria das sequências apresentou elevada probabilidade de atividade antimicrobiana e baixa tendência à formação de agregados insolúveis. Os estudos de *docking* evidenciaram forte afinidade molecular entre os peptídeos selecionados e a proteína OprF. Os resultados demonstram que peptídeos das classes de tionina e snakina apresentam características estruturais promissoras para aplicações antimicrobianas contra *Pseudomonas aeruginosa*, destacando seu potencial para futuros estudos experimentais e desenvolvimento biotecnológico.

Palavras chaves: Peptídeos antimicrobianos vegetais; Bioinformática; Resistência bacteriana

ABSTRACT

Antimicrobial resistance represents one of the major threats to global public health, with *Pseudomonas aeruginosa* standing out as an important multidrug-resistant pathogen associated with nosocomial infections. In this context, plant antimicrobial peptides, such as thionins and snakins, have shown biotechnological potential for the development of new therapeutic strategies. This study aimed to characterize antimicrobial peptides from the thionin and snakin classes *in silico* and evaluate their interaction potential with the OprF protein of *Pseudomonas aeruginosa*. A total of 146 thionin sequences and 2,454 snakin sequences obtained from the OneKP database were analyzed. The sequences were processed using SignalP 6.0 and evaluated for the presence of conserved domains with HMMER. Physicochemical properties and antimicrobial potential were determined using Biopython, EMBOSS Pepstats, and CAMPR4. Three-dimensional structures were predicted using AlphaFold2. The best-performing peptides were subjected to molecular *docking* against the OprF protein using ClusPro, followed by complementary analyses with PDBSum and ChimeraX. Among the analyzed sequences, 71.2% of thionins and 92.6% of snakins contained signal peptides. After filtering for conserved domains, 126 thionins and 2,351 snakins remained for further analysis. Most sequences exhibited a high probability of antimicrobial activity and a low tendency to form insoluble aggregates. *Docking* studies revealed strong molecular affinity between the selected peptides and the OprF protein. These findings demonstrate that thionin- and snakin-class peptides possess promising structural characteristics for antimicrobial applications against *Pseudomonas aeruginosa*, highlighting their potential for future experimental studies and biotechnological development.

Keywords: Plant antimicrobial peptides; Bioinformatics; Bacterial resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fluxograma da metodologia utilizada.....	28
Figura 2 - Alinhamento das sequências de peptídeos de tionina com pró-domínio ácido. A figura ilustra as sequências que apresentam similaridades com as sequências de comparação (destacadas em vermelho).....	35
Figura 3 - Alinhamento múltiplo das sequências de peptídeos da classe tionina agrupadas conforme a conservação, quantidade e posicionamento dos resíduos de cisteína ao longo da cadeia peptídica	38
Figura 4 - Alinhamento múltiplo das sequências de peptídeos da classe snakina agrupadas conforme a conservação, quantidade e posicionamento dos resíduos de cisteína ao longo da cadeia peptídica	43
Figura 5 - Probabilidade de formação de corpos de inclusão para as sequências de peptídeos de tionina e snakina.....	55
Figura 6 - Distribuição dos escores de atividade antimicrobiana das sequências de peptídeos de tionina e snakina.....	56
Figura 7 - Peptídeos da classe de tionina e snakina com os melhores escores de pLDDT entre as sequências analisadas.....	58
Figura 8 - Peptídeos de cada grupamento de tionina que apresentaram os maiores escores de pLDDT.....	59
Figura 9 - Peptídeos de cada grupamento de snakina que apresentaram os maiores escores de pLDDT.....	60
Figura 10 - Acoplamento molecular entre a proteína receptora OprF e os peptídeos: A) CSUV_16040; B) BXBF_5999; C) QNIK_96290; D) XSSD_77024; E) UTQR_12466; F) NUZN_54167.....	64
Figura 11 - Representação das interações intermoleculares preditas entre a proteína OprF de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e os peptídeos antimicrobianos selecionados das classes tionina e snakina.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Posições dos Resíduos de Cisteína em Sequências de Tionina.....	39
Tabela 2 - Posições dos Resíduos de Cisteína em Sequências de Snakina.....	44
Tabela 3 - Características físico-químicas das sequências de peptídeos de tionina.....	47
Tabela 4 - Composição de aminoácidos das sequências de peptídeos de tionina.....	48
Tabela 5 - Características físico-químicas das sequências de peptídeos de snakina.....	50
Tabela 6 - Composição de aminoácidos das sequências de peptídeos de snakina.....	52
Tabela 7 - Peptídeos antimicrobianos das classes tionina e snakina selecionados com base nos parâmetros estruturais, físico-químicos e nos escores preditivos de atividade antimicrobiana obtidos por análises <i>in silico</i>	62
Tabela 8 - Complexos moleculares preditos entre a proteína de membrana OprF de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e peptídeos antimicrobianos das classes tionina e snakina obtidos por <i>docking</i> molecular <i>in silico</i>	65
Tabela 9 - Análise das interações proteína-peptídeo entre a proteína OprF de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e peptídeos antimicrobianos das classes tionina e snakina obtidas por <i>docking</i> molecular.....	67

LISTA DE QUADRO

Quadro 1 - Características físico-químicas e das posições das cisteínas das classes de tionina e snakina.....	33
--	----

.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

16S rRNA RmtD	Metiltransferase do RNA ribossomal 16s
AMPs	Peptídeos antimicrobianos
CDC	Centro de controle de doenças
LTPs	Proteínas de transferência de lipídeos
MBL	Metalobetalactamase
OneKp	One thousand plant
OprF	Outer membrane protein F
OMS	Organização mundial da saúde
PAN-BR	Plano de ação nacional
PDB	Protein data bank
pI	Ponto Isoelétrico
plDDT	Local Distance Difference Test
pH	Potencial hidrogeniônico
RAM	Resistência antimicrobiana
SPM-1	Medida de Processamento Sensorial-1
SN	Snakina

LISTA DE SÍMBOLO

°	Grau
±	Mais ou menos
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	19
2.1. Resistência antimicrobiana.....	19
2.1.2. Mecanismos de resistência antimicrobiana.....	19
2.1.3. Resistência Microbiana no Brasil.....	20
2.2. Pseudomonas aeruginosa.....	21
2.3. Peptídeos Antimicrobiano.....	21
2.3.1. Snakina e Tionina.....	22
3. HIPÓTESES.....	24
4. JUSTIFICATIVA.....	25
5. OBJETIVOS DA PESQUISA.....	26
5.1. OBJETIVO GERAL.....	26
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
6. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
6.1. Seleção das Sequências no Banco de Dados oneKp.....	27
6.2. Remoção do Peptídeo Sinal.....	27
6.3. Análises de Domínios Conservados.....	27
6.4. Verificação das Predições das Sequências.....	27
6.5. Alinhamento das Sequências Analisadas.....	27
6.6. Predição das Características Físico-Químicas.....	28
6.7. Predição da Formação de Agregados Insolúveis.....	28
6.8. Predição da Atividade Antimicrobiana.....	28
6.9. Modelagem Tridimensional dos Peptídeos.....	29
6.10. Seleção dos Melhores Peptídeos.....	29
6.11. Seleção do Alvo.....	29
6.11.1. Análise da Topologia da Proteína-Alvo.....	30
6.12. Docking Molecular.....	30
6.12.1. Análise das Ligações Formadas na Interação Peptídeo-Proteína.....	30
6.12.2. Visualização da Interação Peptídeo-Proteína.....	31
7. RESULTADOS.....	32
7.1. Seleção das Sequências no Banco de Dados oneKp.....	32
7.2. Remoção do Peptídeo Sinal.....	32
7.3. Análises de Domínios Conservados.....	32
7.4. Verificação das Predições das Sequências.....	32
7.5. Alinhamento das Sequências Analisadas.....	33
Tabela 1 - Posições dos Resíduos de Cisteína em Sequências de Tionina.....	39
Tabela 2 - Posições dos Resíduos de Cisteína em Sequências de Snakina.....	44
7.6. Predição das Características Físico-Químicas.....	46
7.7. Presença de Agregados de Peptídeos Insolúveis.....	54

7.8. Predição da Atividade Antimicrobiana.....	55
7.9. Modelagem Tridimensional dos Peptídeos.....	57
7.10. Seleção dos Melhores Peptídeos.....	60
7.11. Seleção do Alvo.....	63
7.11.1. Análise da Topologia da Proteína-Alvo.....	63
7.12. Docking Molecular.....	64
7.12.1. Análise das Ligações Formadas na Interação Peptídeo-Proteína.....	66
8. DISCUSSÃO.....	69
9. CONCLUSÃO.....	73
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (World Health Organization, 2023), a resistência de microrganismos a antibióticos constitui uma grave ameaça à saúde e à economia global. A resistência antimicrobiana é a capacidade de microrganismos, como as bactérias, desenvolverem resistência a medicamentos comumente usados, os permitindo sobreviver e continuar se proliferando. Essas resistências ocorrem por meio da seleção de microrganismos que sofreram mutações ou adquiriram genes de resistência aos antibióticos (Cdc, 2024; Huan *et al.*, 2020). Torna-se, portanto, necessário desenvolver novos tratamentos para combater essas ameaças (Ho *et al.*, 2024).

Dentre esses microrganismos, está a *Pseudomonas aeruginosa* que é uma bactéria patogênica multirresistente, responsável por provocar infecções nosocomiais, com uma alta taxa de mortalidade (Reynolds; Kollef, 2021). No Brasil, os principais mecanismos relacionados com fenótipos multirresistentes de *P. aeruginosa* são a presença da metalobetalactamase (MBL) do tipo SPM-1, presença de metilase 16S rRNA RmtD, perda de porina OprF e superexpressão de bombas de efluxo, o que pode explicar os altos índices de resistência a carbapenêmicos e aminoglicosídeos. O surgimento de cepas com essas características é preocupante, tendo em vista a escassez de tratamento contra as infecções por esse patógeno (Neves *et al.*, 2011).

Diante desse cenário, é imperativo encontrar novas formas de combater esses microrganismos resistentes. Uma abordagem promissora é o uso de peptídeos antimicrobianos (AMPs), moléculas encontradas em diferentes formas de vida, desde plantas até humanos (Martin; Ganz; Lehrer, 1995). Os AMPs são geralmente pequenas moléculas, com 12 a 50 resíduos de aminoácidos, possuem cargas positivas e uma estrutura anfipática, isto é, apresentam uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica, apresentando afinidade por ambientes polares ou apolares (Lai; Gallo, 2009). O AMP possui a capacidade de ser atraído para a bicamada fosfolipídica devido às diferenças de cargas do peptídeo, que é altamente positiva, desestabilizando a membrana ao criar poros pelos quais o conteúdo celular é extravasado, resultando na morte celular (Brogden, 2005).

Os AMPs de origem vegetal podem ser encontrados em qualquer parte da planta, atuando contra patógenos invasores (Hintz; Matthews; Di, 2015). Esses peptídeos são classificados em diferentes classes, como snakinas, tioninas, defensinas vegetais, proteínas de transferências de

lipídeos (LTPs), ciclotídeos, heveínas e knotinas (Hintz; Matthews; Di, 2015). Cada classe é caracterizada pela quantidade e disposição dos resíduos de cisteína, número de aminoácidos e a estrutura tridimensional da sequência (Lay; Anderson, 2005). Os peptídeos antimicrobianos de tionina e snakina são moléculas pequenas, carregadas positivamente e responsáveis pela defesa das plantas contra patógenos (Li *et al.*, 2021).

Estudos anteriores demonstraram que as moléculas de tioninas apresentam grande atividade biológica contra uma diversidade de bactérias, onde Vila-Perelló *et al.* (2003) demonstrou que elas apresentam atividade antimicrobiana contra bactérias gram-negativas e positivas vegetais, sendo as negativas a *Rhizobium meliloti*, *Xanthomonas campestris* e *Xanthomonas translucens*, enquanto as positivas foram *Clavibacter michiganensis*. As moléculas de snakina demonstraram atividade contra bactérias da batata, trigo e alface, demonstrando seu grande potencial como agente antimicrobiano agrícola (Almasia *et al.*, 2020). Lima *et al.* (2022) demonstraram que o potencial de peptídeos antimicrobianos vegetais não se limita apenas a patógenos vegetais. Esses pesquisadores avaliaram a eficácia de 140 peptídeos de NCR extraídos de leguminosas contra as bactérias gram-negativas *E. faecalis*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *P. aeruginosa* e contra as gram-positivas *E. coli*, *K. pneumoniae* e *K. pneumoniae*, onde foi possível observar alta eficiência na inibição dos patógenos.

Mediante tal cenário, são necessários mais estudos com peptídeos de origem vegetal para expandir o conhecimento sobre as diferentes classes encontradas e aumentar o número de peptídeos com ação antimicrobiana para ser utilizado em pesquisas. Além de encontrar novas moléculas antimicrobianas capazes de suprir a necessidade de novos medicamentos capazes de combater a resistência antimicrobiana.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Resistência antimicrobiana

A resistência antimicrobiana (RAM) é a capacidade de um microrganismo, podendo ele ser uma bactéria, fungo, vírus ou um parasita, de desenvolver resistência a um medicamento comumente usado para o seu combate (Cdc, 2024). Em 2023, a OMS elegeu a RAM como uma das 10 principais ameaças globais à saúde pública, onde se tem um número estimado de 5 milhões de mortes por resistência bacteriana anualmente (World Health Organization, 2023). A resistência a medicamentos é desenvolvida em microrganismos, quando os mesmos são expostos a medicamentos de forma excessiva ou descontrolada. A pressão seletiva acaba selecionando os microrganismos que possuem resistência, natural ou adquirida, permitindo sua sobrevivência e reprodução (Prestinaci; Pezzotti; Pantosti, 2015).

Além disso, o desenvolvimento de resistência aos medicamentos comumente usados, ocasiona impactos econômicos, por necessitar do desenvolvimento de novas drogas, muitas vezes com menor eficiência, aumento do tempo de internação dos infectados, leitos isolados para evitar a disseminação, sem falar da necessidade de desenvolvimento de novas drogas para suprir essa resistência (Friedman; Temkin; Carmeli, 2016; Dadgostar, 2019). A OMS estima que até 2050 a RAM ocasionará um prejuízo de 100 trilhões de dólares, caso não seja controlado (World Health Organization, 2023).

2.1.1. Mecanismos de resistência antimicrobiana

A RAM ocorre pela presença de mecanismos genéticos de resistência, podendo ser obtida de forma adquirida por mutações genéticas ou herdadas dos progenitores (Macgowan; Macnaughton, 2017). O processo de aquisição de resistência a medicamentos é um processo natural que pode ocorrer com qualquer microrganismo, quer seja pelo uso excessivo e descontrolado de medicamentos, automedicação, higiene pessoal precária, entre outros fatores (Chokshi *et al.*, 2019).

A aquisição de resistência pode ocorrer de forma natural, por: 1. Mutações genéticas: modificações em pares de bases durante a replicação de genes importantes para o organismo,

como enzimas, proteínas ou moléculas regulatórias, provocando o desenvolvimento de organismos resistentes; 2. Conjugação: A resistência se dá pela transferência de material genético que codifica a resistência do plasmídeo de um microrganismo para outro por meio de mecanismos como o pilo ou adesinas na superfície celular; 3. Transformação: Algumas bactérias são capazes de absorver e expressar fragmentos de DNA que foram liberados no meio extracelular por bactérias mortas, onde esses fragmentos podem levar a bactéria a expressar resistência aos antibióticos; 4. Transdução: Os bacteriófagos apresentam a capacidade de transferir genes específicos do seu DNA cromossômico ou plasmidial para seu hospedeiro, com o intuito de auxiliar na sua sobrevivência e reprodução do patógeno (Macgowan; Macnaughton, 2017; Von Wintersdorff *et al.*, 2016).

As pressões ambientais também podem contribuir para o RAM, são elas: 1. Pressão seletiva: Impacta na resistência quando as condições ambientais, tais como a utilização de antimicrobianos, quando seleciona os microrganismos que apresentam genes de resistência, os levando a se proliferarem; 2. Uso inadequado de medicamentos: O uso da medicação inadequada para um determinado tipo de microrganismo pode provocar mutações nos microrganismos presentes, os tornando resistentes (Cdc, 2024). Além disso, a automedicação pode gerar imprecisões na dose e tempo adequados para tratar a infecção, culminando no mascaramento da doença e no desenvolvimento de resistência dos microrganismos (Skliros *et al.*, 2010).

2.1.3. Resistência Microbiana no Brasil

No Brasil a RAM tem sido um problema crescente no país, sendo as infecções responsáveis por 34 mil mortes anualmente e 138 mil por problemas associados à resistência (Ministério da Saúde, 2024). Como forma de enfrentar o crescimento da resistência, foi desenvolvido o estratégia nacional para o controle e a prevenção da resistência antimicrobiana Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos (PAN-BR), que consiste em estratégias de monitoramento do desenvolvimento de resistência bacteriana, melhoria das infraestruturas de pesquisa, estímulo à inovação e diagnóstico e em campanhas de conscientização (Ministério da Saúde, 2019).

As principais bactérias resistentes que causam problemas de saúde e na economia no Brasil são: (1) *Staphylococcus aureus*, responsável por infecções na pele e nas vias respiratórias,

apresenta resistência a múltiplos antibióticos, como a oxacilina, clindamicina, trimetoprima-sulfametoxazol e ciprofloxacino (Gales *et al.*, 2009; Zorzetto, 2024); (2) *Streptococcus pneumoniae*, que ocasiona pneumonia, principalmente em crianças com menos de 5 anos de idade, apresenta resistência à penicilina, que é o principal antibiótico usado no combate, porém também apresentou níveis de resistência contra tetraciclina, eritromicina e cloranfenicol (Brandileone *et al.*, 2006; Zorzetto, 2024); (3) *Pseudomonas aeruginosa* é um grande causador de infecções hospitalares no Brasil e apresenta uma multirresistência a diversas drogas comumente usadas, como os antibióticos carbapenemas (Gales, 2003; Zorzetto, 2024).

2.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria patogênica gram negativa que infecta indivíduos, que normalmente apresentam algum tipo de imunocomprometimento, como fibrose cística, câncer, queimaduras ou pneumonia (Reynolds; Kollef, 2021, 2021; Qin *et al.*, 2022). O tratamento da *P. aeruginosa* apresenta dificuldades em decorrência do rápido desenvolvimento de resistência, onde o patógeno adquire rapidamente genes de resistência por via plasmidial ou modificação do DNA cromossômico (Blomquist; Nix, 2020).

P. aeruginosa, por ser um microrganismo gram negativo, apresenta uma membrana externa rica em lipopolissacarídeos, que atua como uma barreira contra antibióticos (Remans *et al.*, 2010). Além dessa barreira natural, essa espécie apresenta genes de carbapenemases importantes para sua sobrevivência, esses genes são responsáveis por codificar enzimas que hidrolisam as moléculas do carbapenêmicos (Blomquist; Nix, 2020). Os principais genes de carbapenemases encontrados são os bla_{SPM}, bla_{KPC}, bla_{NDM}, bla_{IMP} e bla_{VIM}, porém até 2017 só foi identificado o bla_{SPM} no Brasil (Ministério da Saúde, 2024). Diante disso, os peptídeos antimicrobianos vêm sendo pesquisados como estratégia no combate ao RAM.

2.3. Peptídeos Antimicrobianos

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) são moléculas de baixo peso molecular que apresentam altas taxas de atividade antimicrobiana e que nos últimos anos se demonstraram como

uma grande alternativa para o combate das bactérias resistentes, pois apresentam uma baixa taxa de aquisição de resistência por essas moléculas (Jenssen; Hamill; Hancock, 2006; Magana *et al.*, 2020). Essas moléculas, normalmente apresentam caráter anfipático e alta carga positiva, o que permite se ligam a membrana celular de organismos e as destruam por meio da formação de poros na membrana (Jenssen; Hamill; Hancock, 2006; Brogden, 2005).

Os AMPs são moléculas que podem ser encontradas em diversos organismos, desde plantas a mamíferos, sendo eles responsáveis pela defesa do organismo contra diferentes patógenos, como vírus e parasitas (Bahar; Ren, 2013). Normalmente, os AMPs são expressos em órgãos e tecidos que estão expostos aos patógenos invasores (Zasloff, 2002). Essas moléculas podem ser classificadas de acordo com sua atividade, podendo ser: (1) Peptídeos antivirais; (2) Peptídeos antibacterianos; (3) Peptídeos antifúngicos; e (4) Peptídeos antiparasitários (Bahar; Ren, 2013). Os AMPs são classificados de acordo com suas características bioquímicas e estruturais, neste contexto a classe de tioninas e snakinas tem ganhado notoriedade no meio científico.

2.3.1. Snakina e Tionina

Os peptídeos antimicrobianos de snakina e tionina são moléculas expressas por plantas com intuito de combater patógenos invasores (Li *et al.*, 2021). Os AMPs da classe tionina são peptídeos pequenos, com peso molecular de cerca de 5 kDa, possuem carga líquida positiva em pH neutro e são ricos em aminoácidos de arginina, lisina e cisteína, apresentando 6 ou 8 cisteínas. Essa classe é subdividida em cinco tipos: Tipo 1 e 2 possuem 45-47 aminoácidos, dos quais oito são cisteínas, e apresentam uma estrutura tridimensional em forma de “L”, com o braço longo composto por duas regiões helicoidais alfa e o braço curto por duas beta folhas antiparalelas; Tipo 3 apresenta seis cisteínas, sendo obtida do caule e das folhas de plantas da espécie de visco, como *Viscum album*; Tipo 4 é encontrado nas plantas *Crambe abyssinica*, apresentam seis cisteínas na composição; Tipo 5 foi isolada das raízes de *Helleborus purpurascens*, apresentando oito cisteína (Nawrot *et al.*, 2014; Vernon, 1992). Essa classificação, entretanto, encontra-se em revisão, com Hong *et al.* (2021) propondo uma nova categorização ao identificar variações nas sequências de tioninas que não se encaixavam nos tipos anteriormente descritos.

De maneira semelhante à classificação das tioninas, os peptídeos da classe snakina também são organizados em subtipos, especificamente a snakina-1 (SN1) e snakina-2 (SN2) que foram inicialmente isoladas da batata (Segura *et al.*, 1999; Berrocal-Lobo *et al.*, 2002). A SN1 apresenta peso molecular de 6,9 kDa e 63 resíduos de aminoácidos, enquanto a SN2 possui peso molecular de 7,02 kDa e 66 resíduos de aminoácidos, onde 12 desses resíduos são cisteínas, o que confere grande estabilidade à classe devido a presença de seis pontes dissulfeto (Segura *et al.*, 1999; Berrocal-Lobo *et al.*, 2002). As sequências de snakina apresentam duas alfa-hélices longas e uma hélice 3_{10} curta (Porto; Franco, 2013).

3. HIPÓTESES

H1 - Peptídeos antimicrobianos das classes de tioninas e snakinas apresentam características estruturais e físico-químicas compatíveis com suas respectivas famílias e possuem potencial para interagir com proteínas essenciais da membrana de *Pseudomonas aeruginosa*, podendo atuar como agentes antimicrobianos promissores.

H0 - Peptídeos antimicrobianos das classes de tioninas e snakinas não apresentam características estruturais e físico-químicas compatíveis com suas respectivas famílias e não demonstram capacidade de interação com proteínas essenciais da membrana de *Pseudomonas aeruginosa*.

4. JUSTIFICATIVA

A resistência antimicrobiana é uma grave ameaça global, tornando muitos tratamentos contra infecções bacterianas ineficazes. Peptídeos antimicrobianos, como tioninas e snakinas, destacam-se por seu potencial de combater patógenos multirresistentes, graças ao seu mecanismo de ação único e seu baixo potencial de provocar resistência. No entanto, muitos desses peptídeos permanecem pouco explorados, necessitando de análises aprofundadas acerca de suas características e seu potencial.

Este trabalho busca caracterizar, prospectar e validar, por meio de ferramentas bioinformáticas, o potencial antimicrobiano, juntamente com suas características funcionais e estruturais, dessas moléculas para o combate e o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas contra *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente.

5. OBJETIVOS DA PESQUISA

5.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar *in silico* peptídeos antimicrobianos das famílias de tionina e snakina a partir do banco de dados oneKP e avaliar seu potencial terapêutico no combate à infecção por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar e processar sequências de tionina e snakinas presentes no banco de dados OneKp;
- Identificar os domínios conservados presentes nas sequências peptídicas;
- Predizer características físico-químicas;
- Modelar estruturas tridimensionais dos peptídeos elucidando sua possível conformação estrutural;
- Avaliar o potencial antimicrobiano das sequências dos peptídeos *in silico*;
- Verificar a interação entre os peptídeos e alvos proteicos de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente.

6. MATERIAL E MÉTODOS

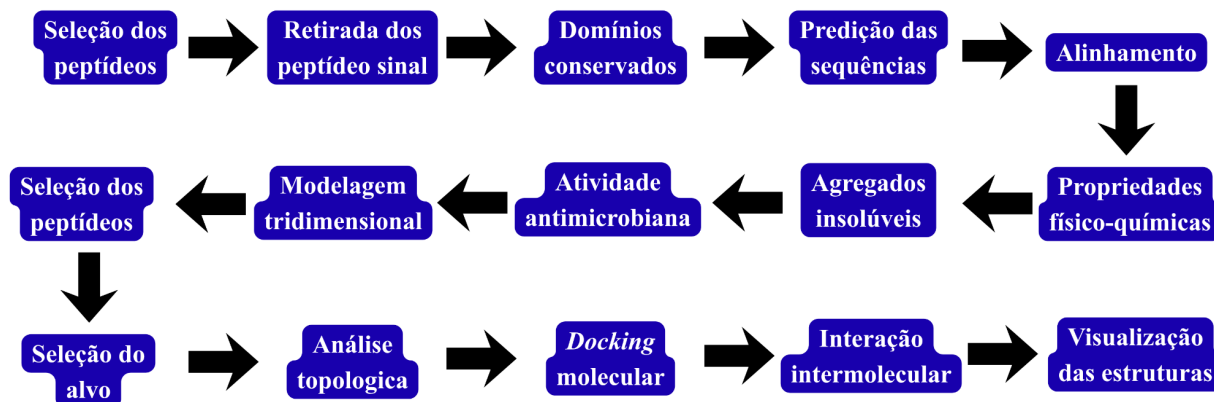


Figura 1 - Fluxograma da metodologia utilizada

6.1. Seleção das Sequências no Banco de Dados OneKp

Para este estudo, foram selecionadas as sequências de peptídeos antimicrobianos (AMP) das famílias de tionina e snakina, previamente preditas por Quintans (2019) e ainda não caracterizadas, disponíveis no banco de dados oneKP (Carpenter *et al.*, 2019).

6.2. Remoção do Peptídeo Sinal

As sequências de peptídeos antimicrobianos previamente selecionadas, foram maturadas utilizando o programa SignalP 6.0 (Teufel *et al.*, 2022), onde foram preditos os pontos de clivagem para a retirada dos peptídeos sinais de cada sequência.

6.3. Análises de Domínios Conservados

As sequências selecionadas das classes de tionina e snakina foram analisadas quanto à presença de domínios conservados de suas respectivas classes, por meio do programa HMMER (Eddy, 1992). As sequências que apresentarem tais domínios prosseguiram para as próximas análises, permitindo identificar e priorizar sequências que possivelmente apresentem funções

biológicas importantes e relevantes para o estudo.

6.4. Verificação das Predições das Sequências

Foi utilizado o banco de dados BLASTp (Altschul *et al.*, 1990) para verificar se as sequências selecionadas foram utilizadas em estudos anteriores, sendo verificadas a presença de estruturas tridimensionais (3D), características físico-químicas e atividade antimicrobiana.

6.5. Alinhamento das Sequências Analisadas

As sequências de tionina foram alinhadas utilizando as sequências de Hong *et al.* (2021), para avaliar a presença de pró-domínio ácido entre as sequências, essas sequências se caracterizam por apresentarem 14 ou 12 cisteína, sendo respectivamente 8 e 6 delas presentes no domínio tionina, enquanto o restante faz parte do domínio ácido e se faz necessário ser clivado. Após a maturação, as sequências de tionina e snakina foram alinhadas utilizando sua similaridade, levando em consideração o número e a posição das cisteínas na sequência.

Todos os alinhamentos foram realizados utilizando o programa Clustal Omega (Sievers; Higgins, 2017) e visualizados pelo Jalview (Waterhouse *et al.*, 2009), onde foram aplicadas colorações específicas para facilitar a interpretação dos resultados e melhorar a visualização das similaridades e diferenças entre as sequências.

6.6. Predição das Características Físico-Químicas

As propriedades físico-químicas das sequências de análise foram realizadas utilizando o pacote de ferramentas Bio.SeqUtils.ProtParam do Biopython (Cock *et al.*, 2009), sendo avaliada a composição de aminoácidos, peso molecular, número de resíduos, carga líquida, ponto isoelétrico e índice de instabilidade do peptídeo. Posteriormente, foi verificado se as características das sequências analisadas estão de acordo com o descrito na literatura.

6.7. Predição da Formação de Agregados Insolúveis

A predição da probabilidade de formação de agregados insolúveis, que são formados em sistemas de expressão de proteínas recombinantes, foi realizada por meio do programa EMBOSS Pepstats (Madeira *et al.*, 2022). Essa análise tem como objetivo a avaliação da otimização da expressão desses peptídeos em sistemas heterólogos.

6.8. Predição da Atividade Antimicrobiana

As sequências foram submetidas ao programa CAMP_{R4} (Collection of Anti-Microbial Peptides) (Gawde *et al.*, 2022), onde foi previsto a probabilidade de atividade antimicrobiana cada peptídeo por meio da maquinaria de aprendizagem Random Forest (RF) (Breiman, 2001), onde se o score for maior ou igual a 0.5, o peptídeo apresenta ação antimicrobiana (Gawde *et al.*, 2022). Essa análise proporcionou insights valiosos sobre o potencial antimicrobiano das sequências das classes de tionina e snakina, auxiliando na identificação de candidatos promissores para futuros estudos e aplicações biomédicas.

6.9. Modelagem Tridimensional dos Peptídeos

Os peptídeos foram modelados em sua estrutura tridimensional (3D) utilizando o programa AlphaFold2 (Mirdita *et al.*, 2022), onde foi verificado o grau de confiabilidade da modelagem por meio do pLDDT (Local Distance Difference Test) (Mirdita *et al.*, 2022). O pLDDT permite avaliar a qualidade das distâncias entre os átomos de aminoácidos, dando um score de 0 a 100, onde pontuações mais altas, de 70 a 100, indicam as melhores modelagem, ou seja, os átomos dos aminoácidos estão dispostos nas melhores posições, já os scores mais baixos, de 69 para baixo, os aminoácidos apresentaram piores disposições atômicas (Mirdita *et al.*, 2022).

6.10. Seleção dos Melhores Peptídeos

Foi realizada uma triagem para selecionar os melhores peptídeos para as próximas etapas,

onde foram separadas as sequências que apresentarem as características físico-químicas mais próximas da descrita na literatura, as menores probabilidades de formação de agregados insolúveis, as maiores probabilidade de atividade antimicrobianas e as estruturas tridimensionais que apresentarem os maiores pLDDTs. Esses peptídeos selecionados foram utilizados para a realização do *docking* molecular, onde foi possível analisar a interação proteína-proteína de forma mais eficiente.

6.11. Seleção do Alvo

Foi selecionada uma proteína de membrana da bactéria resistente *Pseudomonas aeruginosa* do banco de dados PDB. Este banco de dados apresenta estruturas tridimensionais de proteínas que já foram validadas (Berman, 2000). Foi buscada uma proteína de membrana que apresenta características essenciais para a sobrevivência do patógeno, como alimentação, transporte ou transdução de sinal.

6.11.1. Análise da Topologia da Proteína-Alvo

O programa DeepTMHMM foi utilizado para predizer a topologia das proteínas receptoras, ou seja, predizer a posição dos aminoácidos em relação à bicamada fosfolipídica (Hallgren *et al.*, 2022). Isso permite a seleção de complexos, gerados no *docking*, biologicamente possíveis, pois em um *docking* entre um peptídeo e uma proteína receptora, a interação ocorrerá na região extracelular, então saber onde os aminoácidos estão localizados é de vital importância para a seleção dos melhores complexos.

6.12. Docking Molecular

A interação proteína-peptídeo foi realizada utilizando o programa ClusPro 2.0 (Kozakov *et al.*, 2017). Esse servidor utiliza o método PIPER, ou seja, o método de encaixe de corpo rígido, onde analisa as possíveis rotações e translações de uma proteína ligante com um receptor e então classifica as interações a fim de selecionar os melhores complexos (Kozakov *et al.*, 2006). O

programa realiza 3 etapas para analisar a interação, onde a primeira realiza o encaixe de corpo rígido com bilhões de conformações, o segundo agrupa os 1000 complexos com menor energia gerada e o terceiro refina os complexos com a minimização de energia (Kozakov *et al.*, 2017).

Com isso, os peptídeos ligantes selecionados das famílias de tionina e snakina foram analisados quanto ao receptor da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* a fim de verificar a interação e possível inibição desse receptor a fim de combater esse microrganismo resistente.

6.12.1. Análise das Ligações Formadas na Interação Peptídeo-Proteína

Foram analisadas as ligações formadas entre a interação das cadeias proteicas por meio do servidor PDBSum (Laskowski *et al.*, 2017). O algoritmo prediz os tipos de ligações formadas entre os aminoácidos do peptídeo ligante com a proteína alvo, retornando um gráfico com a interação entre os aminoácidos, indicando se essa interação forma uma ligação de hidrogênio, contatos não ligantes ou pontes salinas (Laskowski *et al.*, 2017).

6.12.2. Visualização da Interação Peptídeo-Proteína

O *docking* molecular foi visualizado por meio do software ChimeraX, que é uma ferramenta de análise de estruturas tridimensionais, onde o complexo foi colorido e modificado para melhorar a interpretação dos dados (Pettersen *et al.*, 2020).

7. RESULTADOS

7.1. Seleção das Sequências no Banco de Dados oneKP

Foram obtidas 146 sequências de peptídeos pertencentes à classe das tioninas e 2.454 da classe das snakinas no banco de dados OneKP. As sequências foram recuperadas no formato FASTA e utilizadas nas análises subsequentes.

7.2. Remoção do Peptídeo Sinal

O programa SignalP 6.0 foi utilizado para identificar e remover os peptídeos sinal das sequências analisadas. Entre as 146 sequências de tioninas, 71,2% (104 peptídeos) apresentaram peptídeo sinal, sendo submetidas à clivagem. Para a classe das snakinas, das 2.454 sequências avaliadas, 92,6% (2.274) continham regiões sinal, que também foram clivadas, a fim de obter as formas maduras das moléculas para as análises subsequentes.

7.3. Análises de Domínios Conservados

A análise da presença de domínios conservados por meio do programa HMMER demonstrou que 20 sequências de tioninas e 56 de snakinas não apresentavam os domínios conservados correspondentes às suas respectivas classes. Essas sequências foram, portanto, excluídas das análises, resultando em um total de 126 sequências de tioninas e 2.185 de snakinas selecionadas para a continuidade do estudo.

7.4. Verificação das Predições das Sequências

A busca realizada no banco de dados BLASTp indicou que as sequências selecionadas não haviam sido previamente investigadas ou modeladas em estudos anteriores, reforçando o caráter inédito das análises conduzidas neste trabalho.

7.5. Alinhamento das Sequências Analisadas

No alinhamento das 126 sequências de tionina e 2185 de snakina, foram observadas variações na composição em relação ao número de resíduos de cisteína e suas posições na sequência, em comparação com dados disponíveis na literatura. O Quadro 1 apresenta a representação das posições das cisteínas em sequências de oito e doze cisteínas das classes de tionina e snakina, respectivamente, de acordo com a literatura, além de suas principais características físico-químicas.

Família	Aminoácidos	Peso molecular (kDa)	Carga	Posições dos resíduos de cisteína	Referências
Tionina	45-47	5	Positiva	X ₂ -CC-X ₇ -C-X ₃ -C-X ₈ -C-X ₃ -C- X ₁ -C-X ₈ -C-X ₆	Nawrot <i>et al.</i> , 2014; Broekaert <i>et al.</i> , 1997; Padovan <i>et al.</i> , 2010; Lay & Anderson, 2005
Snakina	63	6.9	Positiva	C-X ₃ -C-X ₃ -C-X _{ 7,11}-C-X ₃ -C-X ₂ -CC-X ₂ -C-X _{1,3} - C-X ₁₁ -C-X _{1,2} -C- X _{11,14} -K-C-P	Nawrot <i>et al.</i> , 2014; Oliveira-Lima <i>et al.</i> , 2017; Silverstein <i>et</i> <i>al.</i> , 2007

Quadro 1 - Características físico-químicas e das posições das cisteínas das classes de tionina e snakina.

A análise do alinhamento de sequências de tioninas revelou que 8,73% das 126 sequências possuem o pró-domínio ácido. A Figura 1 ilustra as sete sequências que apresentam oito resíduos de cisteína no domínio de tionina e seis cisteínas no pró-domínio ácido. Exceção feita ao peptídeo ZMGN_83565, que possui sete cisteínas no pró-domínio ácido. Adicionalmente, três sequências apresentam sete cisteínas no domínio de tionina e seis no pró-domínio ácido, enquanto uma sequência apresentou seis cisteínas no domínio de tionina e sete no pró-domínio ácido.

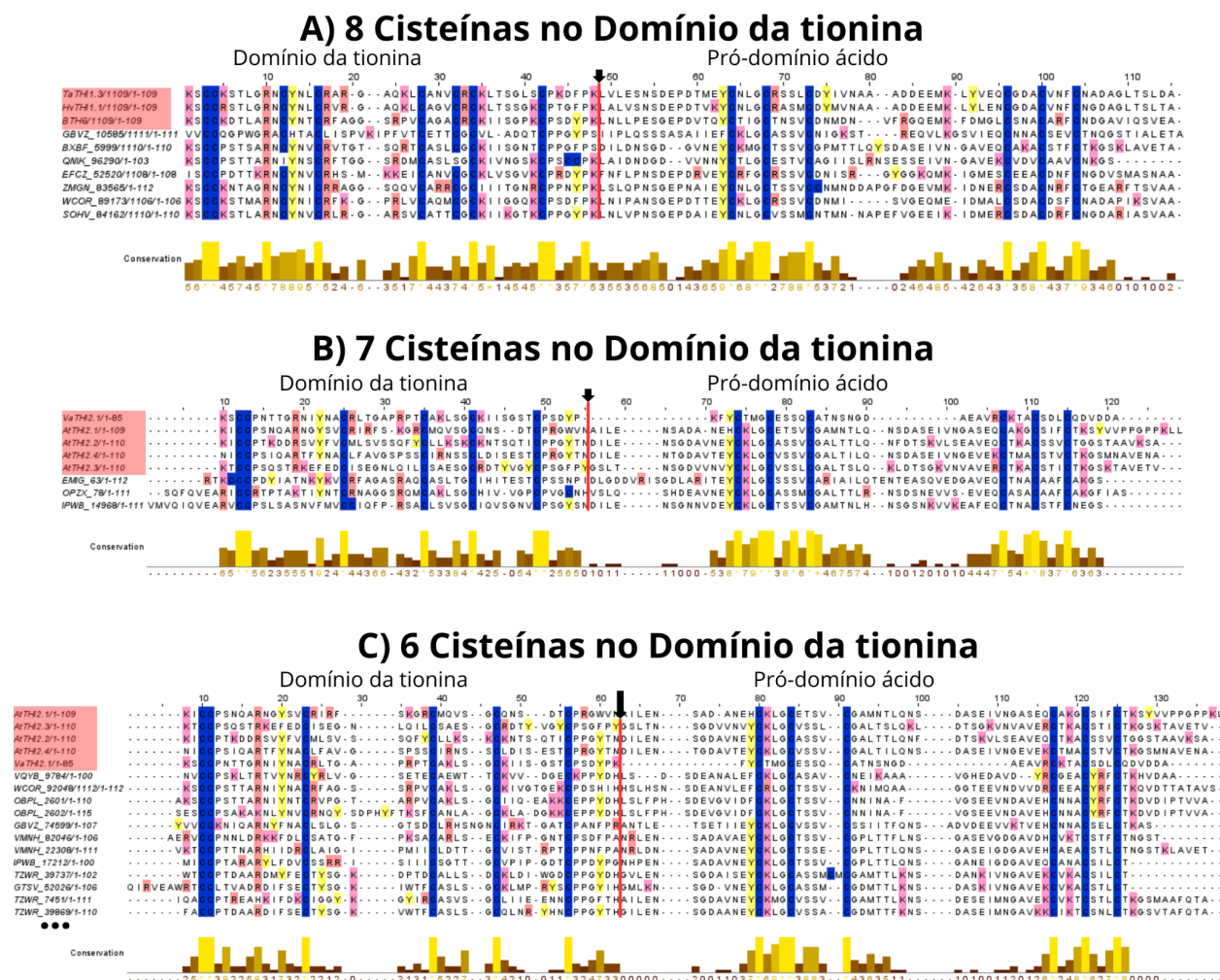


Figura 2 - Alinhamento das sequências de peptídeos de tionina com pró-domínio ácido. A figura ilustra as sequências que apresentam similaridades com as sequências de comparação (destacadas em vermelho).

No alinhamento das sequências de tionina e snakina, foi observado que 50% dos 126 peptídeos de tionina e 58,1% dos 2.351 peptídeos de snakina mostraram similaridade com dados presentes na literatura.

A Figura 2 ilustra o alinhamento das sequências de tionina, agrupadas com base em suas similaridades, resultando em 18 grupamentos. Desses, cinco grupos apresentaram um número de resíduos de cisteína consistente com o reportado na literatura, incluindo 21 sequências do tipo 1 (com oito cisteínas), e 42 sequências do tipo 2 (com seis cisteínas). Além disso, foram identificadas variantes dentro desses tipos. No grupo das sequências do tipo 1, o peptídeo QNIK_96290 apresentou uma dupla repetição de resíduos de cisteína, enquanto o peptídeo ZENX_85558 exibiu uma tripla repetição. No caso das sequências do tipo 2, o peptídeo GJNX_6672 apresentou variações nas posições dos resíduos de cisteína 4 e 5.

Na Tabela 1, são apresentadas as posições dos resíduos de cisteína em cada grupamento, juntamente com a quantidade de peptídeos que os compõem. Destaca-se que alguns grupamentos possuem um número expressivo de peptídeos, o que confere maior confiabilidade aos resultados.

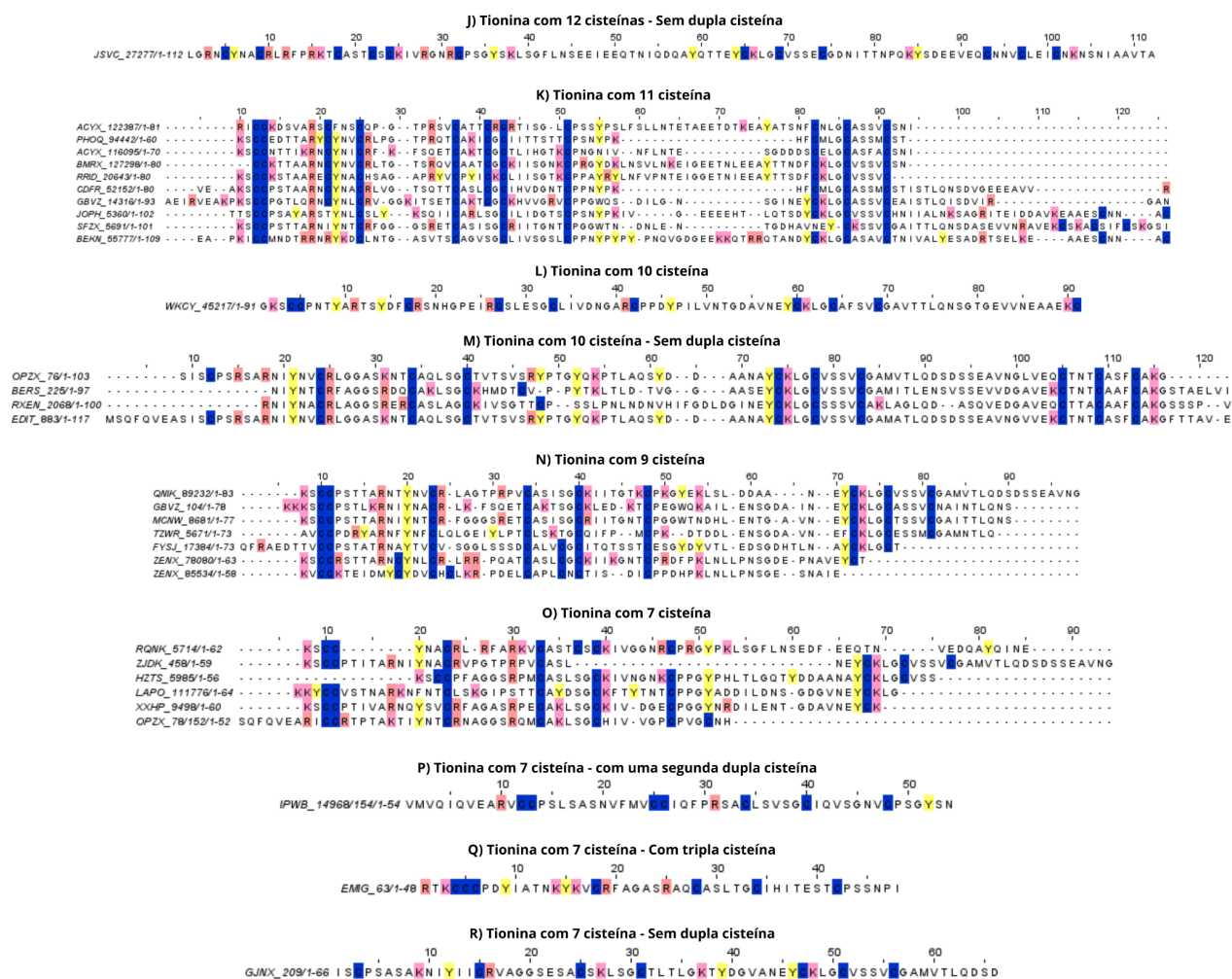


Figura 3 - Alinhamento múltiplo das sequências de peptídeos da classe tionina agrupadas conforme a conservação, quantidade e posicionamento dos resíduos de cisteína ao longo da cadeia peptídica

Tabela 1 - Posições dos Resíduos de Cisteína em Sequências de Tionina.

Grupos	Quantidade de sequências	Posições dos resíduos de cisteína
Tionina Tipo 1 - 8 Cisteína	13	X{2,5}-CC-X{3,7}-C-X{3}-C-X{8,9}-C-X{3}-C-X{1}-C-X{6,8}-C-X{18,25}
8 Cisteína - Com triplo resíduo de cisteína	1	X{2}-CCC-X{10}-C-X{9}-C-X{5}-C-X{6}-C-X{3}-C-X{13}
Tionina Tipo 2 - 6 cisteínas	9	X{2,3}-CC-X{11,12}-C-X{8,12}-C-X{5,9}-C-X{5,8}-C-X{5,18}
15 Cisteína	2	X{2}-CC-X{7}-C-X{3}-C-X{8,9}-C-X{3}-C-X{1}-C-X{7}-C-X{7,21}-C-X{3,32}-C-X{3,4}-C-X{0,4}-C-X{19,20}-C-X{3}-C-X{3}-C-X{1,11}
14 Cisteína	28	X{2,8}-CC-X{7,11}-C-X{3,9}-C-X{5,11}-C-X{2,7}-C-X{1,2}-C-X{0,7}-C-X{8,37}-C-X{3}-C-X{4}-C-X{15,26}-C-X{3}-C-X{3}-C-X{0,11}
13 Cisteína	5	X{2,11}-CC-X{4,11}-C-X{0,9}-C-X{3,7}-C-X{1,7}-C-X{7,19}-C-X{3,32}-C-X{3,4}-C-X{4,1}-C-X{15,21}-C-X{3}-C-X{3}-C-X{1,7}
13 Cisteínas - Com triplo resíduo de cisteína	1	X{3}-CCC-X{11}-C-X{9}-C-X{5}-C-X{7}-C-X{24}-C-X{3}-C-X{4}-C-X{23}-C-X{3}-C-X{3}-C-X{4}
12 Cisteína	38	X{1,9}-CC-X{11,14}-C-X{3,14}-C-X{1,7}-C-X{5,8}-C-

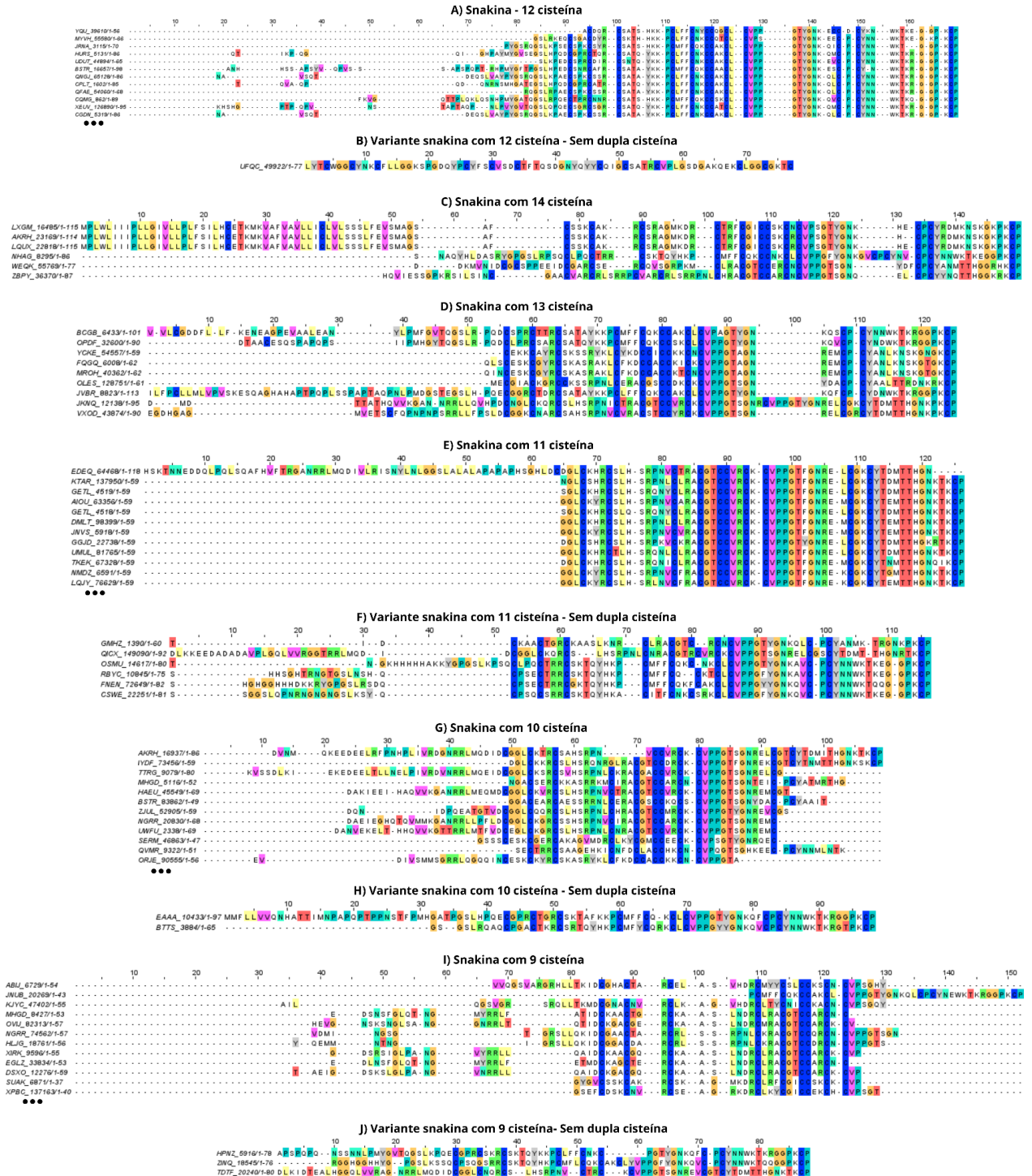
			$X\{14,32\}-C-X\{3\}-C-X\{4\}-C-X\{17,26\}-C-X\{3\}-C-X\{3\}-C-X\{1,12\}$
12 cisteínas - Sem duplo resíduos de cisteína	1		$X\{4\}-C-X\{3\}-C-X\{8\}-C-X\{3\}-C-X\{1\}-C-X\{7\}-C-X\{32\}-C-X\{3\}-C-X\{4\}-C-X\{18\}-C-X\{3\}-C-X\{3\}-C-X\{11\}$
11 Cisteína	10		$X\{0,11\}-CC-X\{7,11\}-C-X\{3,9\}-C-X\{5,10\}-C-X\{3,7\}-C-X\{1,29\}-C-X\{3,7\}-C-X\{4,30\}-C-X\{3,26\}-C-X\{3,4\}-C-X\{0,19\}$
10 Cisteína	1		$X\{3\}-CC-X\{11\}-C-X\{9\}-C-X\{5\}-C-X\{8\}-C-X\{17\}-C-X\{3\}-C-X\{4\}-C-X\{21\}-C$
10 cisteínas - Sem duplo resíduos de cisteína	4		$X\{3,11\}-C-X\{9,11\}-C-X\{5,9\}-C-X\{5,7\}-C-X\{19,28\}-C-X\{3\}-C-X\{4\}-C-X\{19,21\}-C-X\{3\}-C-X\{3\}-C-X\{3,10\}$
9 Cisteínas	7		$X\{2,9\}-CC-X\{7,11\}-C-X\{3,10\}-C-X\{1,8\}-C-X\{1,7\}-C-X\{1,19\}-C-X\{1,20\}-C-X\{3,22\}-C-X\{1,20\}$
7 Cisteína	5		$X\{2,3\}-CC-X\{3,11\}-C-X\{5,9\}-C-X\{3,7\}-C-X\{1,20\}-C-X\{3,19\}-C-X\{1,31\}$
7 Cisteína - sem a da posição 3	1		$X\{2\}-C-X\{11\}-C-X\{9\}-C-X\{5\}-C-X\{15\}-C-X\{3\}-C-X\{4\}-C-X\{10\}$

Legenda: Agrupamentos estruturais das sequências de tionina com base na quantidade, distribuição e padrão de posicionamento dos resíduos de cisteína identificados após alinhamento múltiplo das sequências analisadas. A tabela apresenta a quantidade de sequências em cada grupo, juntamente com as respectivas posições dos resíduos de cisteína, evidenciando as variações estruturais observadas nas diferentes classes de tioninas.

Os grupamentos das sequências com 6 cisteínas corresponde a 33,3% dos peptídeos de tionina analisados, com 41 peptídeos apresentando cisteínas nas posições X{1,9}-CC-X{11,12}-C-X{6,14}-C-X{5,7}-C-X{5,8}-C-X{1,18}. Uma das sequências, no entanto, apresentou uma variação, com variações nas posições dos resíduos, resultando em cisteínas nas posições X{2}-CC-X{11}-C-X{12}-C-X{9}-C-X{5}-C-X{11}.

As sequências contendo 14 cisteínas representam 17,4% dos peptídeos analisados, com os resíduos de cisteína localizados nas posições X{2,8}-CC-X{7}-C-X{3}-C-X{8,9}-C-X{2,3}-C-X{1}-C-X{2,7}-C-X{8,37}-C-X{3}-C-X{4}-C-X{15,26}-C-X{3}-C-X{3}-C-X{0,11}. Já as sequências do tipo 1, que possuem 8 cisteínas, correspondem a 16,6% dos peptídeos, com 19 dessas sequências seguindo o padrão descrito na literatura. Nessas, as cisteínas encontram-se nas posições X{2,5}-CC-X{3,7}-C-X{3}-C-X{8,11}-C-X{3}-C-X{1}-C-X{6,8}-C-X{6,25}. No entanto, duas sequências apresentaram variações: uma com dois duplos resíduos de cisteína, seguindo o padrão X{2}-CC-X{11}-C-X{9}-C-X{5}-C-X{7}-C-X{2}-CC-X{2}, e outra com um triplo resíduo de cisteína, com o padrão X{2}-CCC-X{10}-C-X{9}-C-X{5}-C-X{6}-C-X{3}-C-X{13}.

As sequências da classe snakina foram agrupadas em 18 grupos distintos, conforme ilustrado na Figura 3. Dois desses grupos apresentaram características consistentes com a literatura, ou seja, contendo 12 resíduos de cisteína. No entanto, uma variação foi observada no peptídeo UFQC_49922, que não apresentou o duplo resíduo de cisteína. Os demais grupos apresentaram variações tanto no número quanto nas posições dos resíduos de cisteína. Alguns desses grupamentos destacaram-se pela quantidade significativa de peptídeos, como mostrado na Tabela 2.



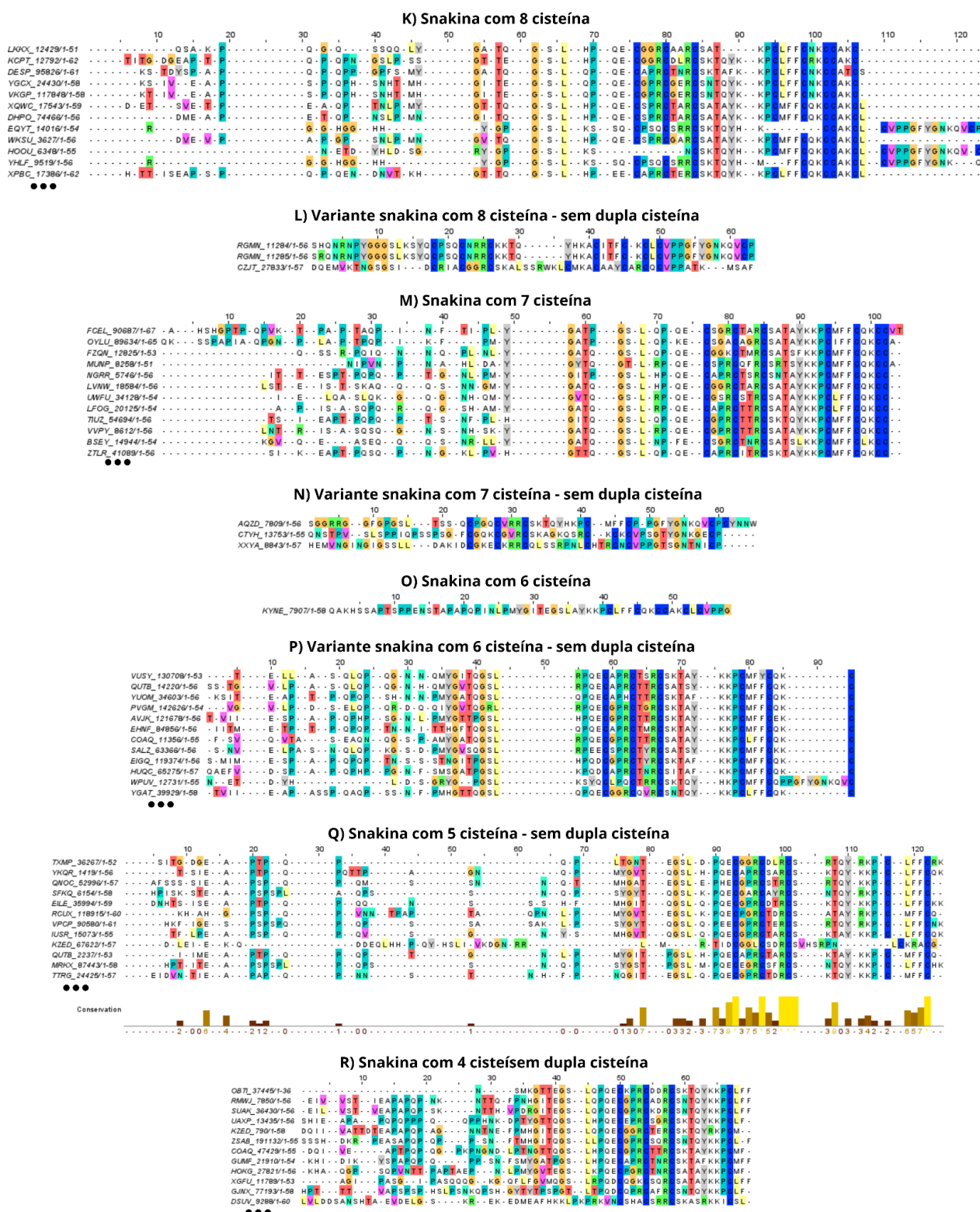


Figura 4 - Alinhamento múltiplo das sequências de peptídeos da classe snakina agrupadas conforme a conservação, quantidade e posicionamento dos resíduos de cisteína ao longo da cadeia peptídica

Tabela 2 - Posições dos Resíduos de Cisteína em Sequências de Snakina

Grupos	Quantidade de sequências	Posições dos resíduos de cisteína
Snakina - 12 Cisteína	1270	X{0,60}-C-X{3,0}-C-X{1,8}-C-X{0,9}-C-X{2,3}-C-X{0,2}-C-X{0,2}-C-X{0,2}-C-X{1,10}-C-X{0,17}-C-X{1,11}-C-X{1,15}-C-X{0,1}
12 Cisteína - Sem duplo resíduos de cisteína	1	X{3}-C-X{3}-C-X{3}-C-X{13}-C-X{3}-C-X{3}-C-X{12}-C-X{3}-C-X{4}-C-X{12}-C-X{3}-C-X{3}-C
14 Cisteína	6	X{8,23}-C-X{1,14}-C-X{3,17}-C-X{3,8}-C-X{3}-C-X{2,8}-C-X{0,3}-C-X{2}-C-X{0,1}-C-X{2,11}-C-X{1}-C-X{3,11}-C-X{1}-C-X{12}-C-X{1}
13 Cisteína	8	X{0,25}-C-X{3,38}-C-X{3}-C-X{0,8}-C-X{3,8}-C-X{0,3}-C-X{0,2}-C-X{0,2}-C-X{1,2}-C-X{1,9}-C-X{11}-C-X{1,2}-C-X{12}-C-X{1}
11 Cisteína	224	X{0,63}-C-X{3,12}-C-X{3,8}-C-X{3,9}-C-X{0,3}-C-X{0,7}-C-X{0,3}-C-X{1,2}-C-X{0,13}-C-X{1,13}-C-X{1,12}-C-X{0,13}
11 Cisteína - Sem duplo resíduos de cisteína	6	X{3,32}-C-X{3}-C-X{3}-C-X{8}-C-X{3}-C-X{1,3}-C-X{1,3}-C-X{1}-C-X{11}-C-X{1,2}-C-X{12}-C-X{1}
10 Cisteína	40	X{2,36}-C-X{3,45}-C-X{3,12}-C-X{2,8}-C-X{0,8}-C-X{0,3}-C-X{0,2}-C-X{0,11}-C-X{1,16}-C-X{1,21}-C-X{0,9}
10 Cisteína - Sem duplo resíduos de cisteína	2	X{9,42}-C-X{3}-C-X{3}-C-X{8}-C-X{3}-C-X{2,3}-C-X{1}-C-X{1}-C-X{1}-C-X{1}-C-X{12}-C-X{1}
9 Cisteína	476	X{1,48}-C-X{3,21}-C-X{2,6}-C-X{0,10}-C-X{0,8}-C-X{1,3}-C-X{0,11}-C-X{0,11}-C-X{1,12}-C-X{0,15}
9 Cisteína - Sem duplo resíduos de cisteína	3	X{18,28}-C-X{3,7}-C-X{3,8}-C-X{3,8}-C-X{2,3}-C-X{1,2}-C-X{9,13}-C-X{1,2}-C-X{12}-C-X{1}
8 Cisteína	83	X{4,42}-C-X{2,36}-C-X{0,8}-C-X{2,9}-C-X{0,8}-C-X{0,3}-C-X{0,

		2}-C-X{0,11}-C-X{0,11}
8 Cisteína - Sem duplo resíduos de cisteína	3	X{14,17}-C-X{3}-C-X{3}-C-X{8,10}-C-X{3}-C-X{1,3}-C-X{1,2}- C-X{1,11}-C-X{1,10}
7 Cisteína	120	X{13,39}-C-X{3,8}-C-X{3}-C-X{2,8}-C-X{0,3}-C-X{2}-C-X{0,1}- C-X{0,12}
7 Cisteína - Sem duplo resíduos de cisteína	3	X{17,20}-C-X{3}-C-X{3}-C-X{8}-C-X{1,3}-C-X{1,10}-C-X{1,11}- C-X{1,4}
6 Cisteína	1	X{40}-C-X{3}-C-X{2}-CC-X{2}-C-X{1}-C-X{4}
6 Cisteína - Sem duplo resíduos de cisteína	26	X{19,38}-C-X{2,3}-C-X{1,3}-C-X{8,11}-C-X{1,3}-C-X{2,12}-C-X {0,1}
5 Cisteína	56	X{24,57}-C-X{3}-C-X{3}-C-X{8,14}-C-X{1,3}-C-X{0,6}
4 Cisteína	23	X{15,42}-C-X{3}-C-X{3}-C-X{8}-C-X{1,3}

Legenda: Distribuição dos grupamentos estruturais das sequências de snakina conforme o número, posicionamento e conservação dos resíduos de cisteína após alinhamento das sequências peptídicas. A tabela apresenta a quantidade de sequências em cada grupo, juntamente com as respectivas posições dos resíduos de cisteína, destacando a variabilidade na composição e as características específicas de cada grupamento.

O grupamento com 12 cisteínas foi o mais representativo, contendo 54,06% das 2.351 sequências analisadas, totalizando 1.270 peptídeos. Nesses, os resíduos de cisteína foram localizados nas posições X{0,60}-C-X{3,0}-C-X{1,8}-C-X{0,9}-C-X{2,3}-C-X{0,2}-C-X{0,2}-C-X{0,2}-C-X{1,10}-C-X{0,17}-C-X{1,11}-C-X{1,15}-C-X{0,1}. Uma variante, contudo, não apresentou o duplo resíduo de cisteína, sendo a sequência X{3}-C-X{3}-C-X{3}-C-X{13}-C-X{3}-C-X{3}-C-X{12}-C-X{3}-C-X{4}-C-X{12}-C-X{3}-C-X{3}-C.

O grupamento contendo 9 cisteínas compreendeu 20,37% dos peptídeos, com 476 sequências exibindo resíduos de cisteína nas posições X{1,48}-C-X{3,21}-C-X{2,6}-C-X{0,10}-C-X{0,8}-C-X{1,3}-C-X{0,11}-C-X{0,11}-C-X{1,12}-C-X{0,15}. Outras três sequências apresentaram variações nas posições X{18,28}-C-X{3,7}-C-X{3,8}-C-X{3,8}-C-X{2,3}-C-X{1,2}-C-X{9,13}-C-X{1,2}-C-X{12}-C-X{1}.

As sequências com 11 cisteínas representaram 9,78% dos peptídeos analisados, com 224 deles exibindo cisteínas nas posições X{0,63}-C-X{3,12}-C-X{3,8}-C-X{3,9}-C-X{0,3}-C-X{0,7}-C-X{0,3}-C-X{1,2}-C-X{0,13}-C-X{1,13}-C-X{1,12}-C-X{0,13}. Seis dessas sequências não apresentaram o duplo resíduo de cisteína, com suas cisteínas localizadas nas posições X{3,32}-C-X{3}-C-X{3}-C-X{8}-C-X{3}-C-X{1,3}-C-X{1,3}-C-X{1}-C-X{11}-C-X{1,2}-C-X{12}-C-X{1}.

7.6. Predição das Características Físico-Químicas

A análise das 126 sequências de tioninas e 2.351 de snakina avaliadas revelou dados relevantes sobre suas características físico-químicas, incluindo composição de aminoácidos, peso molecular, tamanho das sequências, carga líquida, ponto isoelétrico e índice de instabilidade. Essas informações são cruciais para entender a funcionalidade e estabilidade dessas moléculas, uma vez que tais propriedades influenciam diretamente sua interação com alvos biológicos e sua aplicabilidade terapêutica.

Os resultados obtidos para as tioninas estão apresentados nas Tabelas 3 e 4, que detalham os maiores e menores valores observados para cada grupamento analisado, juntamente com as respectivas médias e a composição de aminoácidos.

Tabela 3 - Características físico-químicas das sequências de peptídeos de tionina.

Índice	Peso Molecular (kDa)	Comprimento	Carga	Ponto Isoelétrico	Índice de Instabilidade
Tionina Tipo 1 - 8 Cisteína					
Valores	4,76±7,22	45±65	-2,65±9,34	4,93±9,65	28,52±68,32
Média	6,03	54,94	4,15	8,59	48,97
Tionina Tipo 1 - Com segunda dupla cisteína					
Valores	5,95	56	2,35	8,5	28,18
8 Cisteína - Com triplo resíduo de cisteína					
Valores	4,82	46	5,35	9,1	62,28
Tionina Tipo 2 - 6 cisteínas					
Valores	4,29±6,09	40±56	-6,56±9,41	4,05±11,17	18,46±68,86
Média	5,19	48,22	2,44	8,51	46,51
Tionina Tipo 2 - Variação na posição das cisteínas					
Valores	5,9	56	-1,57	5,62	49,75
15 Cisteína					
Valores	13	118	1,18	7,94	47,48
14 Cisteína					
Valores	9,21±13,37	86±122	-3,8±3,23	5,14±8,4	34,02±64,75
Média	12,17	110,82	-0,59	6,77	53,25
13 Cisteína					
Valores	11,58±11,67	104±106	-0,79±0,22	6,43±7,54	49,13±65,66
Média	11,63	105	-0,29	6,99	57,39
12 Cisteína					
Valores	12,15±12,98	113±121	-2,75±-0,64	5,18±6,87	41,84±62,41
Média	12,64	117,50	-1,85	5,89	51,96
12 cisteínas - Sem duplo resíduos de cisteína					
Valores	12,44	112	-1,75	5,46	62,82
11 Cisteína					
Valores	6,51±11,73	60±109	-4,00±3,36	5,21±8,55	21,04±68,05
Média	9,15	85,60	0,58	7,45	44,83
10 Cisteína					
Valores	9,62	91	-3,66	4,91	27,98

10 cisteínas - Sem duplo resíduos de cisteína					
Valores	10,03±12,20	97±117	-1,67±0,99	5,67±8,03	16,07±59,52
Média	10,78	104,25	-0,58	6,71	42,86
9 Cisteínas					
Valores	6,47±8,60	58±83	-5,63±5,32	4,23±9,00	28,96±63,03
Média	7,76	72,14	-0,36	6,79	42,39
7 Cisteína					
Valores	5,57±7,00	52±64	0,36±4,15	7,7±9,05	16,01±59,65
Média	6,31	58,83	1,51	8,17	37,58
7 Cisteína - Com segunda dupla cisteína					
Valores	5,67	54	0,35	7,71	38,76
7 Cisteína - Com triplo resíduo de cisteína					
Valores	6,7	66	-0,63	6,26	56,29
7 Cisteína - Sem duplo resíduos de cisteína					
Valores	5,17	48	3,41	8,81	42,36

Legenda: A tabela inclui os valores observados para peso molecular, comprimento, carga líquida, ponto isoelétrico e índice de instabilidade, fornecendo uma visão detalhada das propriedades das diferentes variantes de tionina analisadas.

Tabela 4 - Composição de aminoácidos das sequências de peptídeos de tionina

Resíduo	Quantidade de aminoácidos	Frequência de aparecimento
Lisina (K)	571	6,27%
Serina (S)	895	9,84%
Cisteína (C)	1135	12,47%
Valina (V)	431	4,74%
Asparagina (N)	664	7,30%
Treonina (T)	648	7,12%
Alanina (A)	663	7,29%
Arginina (R)	489	5,37%
Tirosina (Y)	325	3,57%
Leucina (L)	447	4,91%
Glicina (G)	607	6,67%
Glutamina (Q)	238	2,62%
Fenilalanina (F)	191	2,10%
Isoleucina (I)	434	4,77%

Histidina (H)	85	0,93%
Ácido aspártico (D)	299	3,29%
Prolina (P)	412	4,53%
Metionina (M)	49	0,54%
Ácido glutâmico (E)	494	5,43%
Triptofano (W)	23	0,25%
Total	9100	100%

Legenda: A tabela apresenta a frequência de ocorrência de cada resíduo de aminoácido nas 126 sequências analisadas, destacando a predominância de cisteínas e outros resíduos relevantes para a funcionalidade dos peptídeos.

A composição de aminoácidos das 126 sequências de tioninas contaram com 9.100 resíduos de aminoácidos, sendo o resíduo de cisteína o mais frequente, com um total de 1.135 resíduos, correspondendo a uma frequência de aparecimento de 12.47%. A serina foi o segundo aminoácido mais frequente, com 895 resíduos e uma frequência de 9.84%. Em contraste, o triptofano foi o aminoácido menos presente, com apenas 23 resíduos e uma frequência de 0.25%.

O peso molecular variou entre 4.29 kDa, observado no peptídeo CSUV_16040 das sequências do tipo 2 com seis cisteínas, e 13.37 kDa, encontrado no peptídeo BEKN_282920 do grupamento de quatorze cisteínas. O peso médio foi de 7,86 kDa, com desvio padrão de 3,02. As sequências do tipo 2 apresentaram o peso mais próximo desse valor, com o peso médio de 5.19 kDa, seguido pela variante de 7 cisteína sem duplo resíduo, com 5,17 kDa, porém a sequência com 15 resíduos apresentou o maior peso, com 13 kDa.

O tamanho das sequências de aminoácidos variou entre um mínimo de 40 resíduos para o peptídeo CSUV_16040, do grupo do tipo 2, e um máximo de 122 resíduos para o BEKN_282920, pertencente ao grupamento com de quatorze cisteínas. A média de tamanho foi de aproximadamente 72,63 resíduos de aminoácidos, com um desvio padrão de 27.61. Observou-se que a sequência variante do tipo 1, com triplo resíduo de cisteína apresentou o comprimento médio mais próximo ao descrito na literatura, com 46 resíduos, seguido pelo grupamento variante de 7 cisteína, sem duplo resíduo, com 48 resíduos. Em contrapartida, o grupamento com quinze cisteínas apresentou o maior tamanho, com um comprimento médio de 115 resíduos de aminoácidos.

A carga líquida dos peptídeos apresentou uma variação significativa, variando de -6.56, observada no peptídeo TZWR_39737, a um máximo de 9,41 no peptídeo BXBF_97156, ambas das sequências do tipo 2. A carga média foi de 1,41, com um desvio padrão de 2,75. Observou-se que a sequência variante do tipo 1, com triplo resíduo de cisteína, apresentou a maior carga líquida, 5,35, seguido pelo grupamento do tipo 1, com carga 4,15. Em contrapartida, o grupo com dez cisteínas apresentou a menor carga líquida, com uma média de -3.66.

O ponto isoelétrico (pI) variou de 4.05, observado no peptídeo TZWR_39737, a 11.17, encontrado no peptídeo BXBF_97156, ambos os peptídeos das sequências do tipo 2. O pI médio foi de 7.72, com um desvio padrão de 1.43. Na análise realizada, constatou-se que peptídeos que apresentaram variações na carga líquida também demonstraram variações correspondentes em seus pls. Isso indica uma correlação direta entre a carga líquida dos peptídeos e seus respectivos pontos isoelétricos.

O índice de instabilidade (II) das sequências analisadas apresentou uma variação considerável, oscilando entre 16.01 para o peptídeo LAPO_111776 do grupamento com sete cisteínas e 68.86 para o peptídeo OINM_23796, pertencente às tioninas do tipo 2. O índice de instabilidade médio foi de 47,56, com um desvio padrão 12.11. Observou-se que a sequência com dez cisteínas apresentou um II de 27.98, seguido pela variante do tipo 1, com um segundo duplo resíduo de cisteína, com um II de 28.18. No entanto, a variante de doze cisteínas, sem duplo resíduo, apresentou o maior índice de instabilidade, com a média de 62,82.

De maneira semelhante às sequências de tionina, as 2.351 sequências da classe de snakina foram analisadas quanto às suas características físico-químicas, podendo ser visualizado na Tabela 5 e 6, onde é apresentado as características físico químicas dos diferentes grupamentos encontrados nas sequências de snakina, como também a composição de aminoácidos.

Tabela 5 - Características físico-químicas das sequências de peptídeos de snakina

Índice	Peso Molecular (kDa)	Comprimento	Carga	Ponto Isoelétrico	Índice de Instabilidade
Snakina - 12 Cisteína					
Valores	6,19±13,38	56±120	-2,67±16,05	5,66±10,0	17,08±108,2
Média	8,77	80,05	7,51	8,99	50,35
12 Cisteína - Sem duplo resíduos de cisteína					
Valores	8,30	77	0,24	7,56	42,38

14 Cisteína					
Valores	8,34±12,64	77±115	-0,72±12,31	6,83±9,52	36,16±70,23
Média	10,88	99,00	8,92	8,87	51,60
13 Cisteína					
Valores	6,53±12,15	59±113	4,95±9,21	8,71±9,12	13,62±76,81
Média	8,83	81,40	6,80	8,90	41,21
11 Cisteína					
Valores	5,29±12,87	50±118	-0,68±13,42	6,71±9,75	15,67±102,25
Média	6,91	62,89	6,66	8,97	45,16
11 Cisteína - Sem duplo resíduos de cisteína					
Valores	6,44±10,0	60±92	4,35±12,12	8,72±9,48	36,85±56,66
Média	8,67	78,33	8,95	9,23	49,01
10 Cisteína					
Valores	5,02±9,65	47±86	0,11±11,07	7,49±9,58	11,18±94,99
Média	7,04	64,45	5,01	8,74	53,11
10 Cisteína - Sem duplo resíduos de cisteína					
Valores	7,38±10,69	65±97	9,13±11,32	9,38±9,56	47,6±63,2
Média	9,04	81,00	10,23	9,47	55,40
9 Cisteína					
Valores	3,98±9,13	37±80	-1,66±11,43	5,15±9,88	20,26±111,78
Média	6,42	58,82	5,26	8,89	54,45
9 Cisteína - Sem duplo resíduos de cisteína					
Valores	8,39±8,71	76±80	3,44±11,35	8,67±9,58	27,86±60,77
Média	8,60	78,00	8,41	9,25	48,44
8 Cisteína					
Valores	5,38±8,93	51±80	-2,59±17,62	4,77±10,29	4,04±99,21
Média	6,46	58,65	5,32	8,91	57,30
8 Cisteína - Sem duplo resíduos de cisteína					
Valores	6,10±6,35	56±57	5,35±9,07	9,08±9,57	65,64±73,71
Média	6,26	56,33	7,51	9,36	3,55
7 Cisteína					
Valores	4,52±7,64	40±67	-2,54±13,09	5,15±10,27	24,92±110,44
Média	6,38	57,54	5,49	9,05	56,36
7 Cisteína - Sem duplo resíduos de cisteína					
Valores	5,66±6,18	55±57	2,45±6,37	8,59±9,36	47,57±74,94
Média	5,98	56,00	4,97	9,09	61,95
6 Cisteína					
Valores	6,12	58,00	2,43	8,63	61,54

6 Cisteína - Sem duplo resíduos de cisteína					
Valores	5,89±7,03	53±63	-5,51±11,20	4,67±10,26	39,48±92,81
Média	6,41	57,69	4,29	8,92	63,96
5 Cisteína					
Valores	5,72±9,24	52±80	-4,49±8,74	4,97±9,98	10,54±95,66
Média	6,35	57,39	2,98	8,64	62,84
4 Cisteína					
Valores	4,16±6,97	36±62	-5,50±8,47	4,67±10,06	33,58±125,47
Média	6,29	56,61	2,99	8,64	64,93

Legenda: A tabela apresenta os valores observados para peso molecular, comprimento, carga líquida, ponto isoelétrico e índice de instabilidade, oferecendo uma visão abrangente das propriedades das diferentes variantes de snakina analisadas.

Tabela 6 - Composição de aminoácidos das sequências de peptídeos de snakina

Resíduo	Quantidade de aminoácidos	Frequência de aparecimento
Lisina (K)	9.015	7.97%
Serina (S)	11.229	4.48%
Cisteína (C)	8.772	7.32%
Valina (V)	3.965	3.80%
Asparagina (N)	24.785	11.87%
Treonina (T)	4.709	5.89%
Alanina (A)	7.253	2.50%
Arginina (R)	14.462	6.78%
Tirosina (Y)	4.327	0.96%
Leucina (L)	2.675	4.60%
Glicina (G)	7.147	5.17%
Glutamina (Q)	14.540	5.94%
Fenilalanina (F)	2.733	0.74%
Isoleucina (I)	3.475	2.09%
Histidina (H)	13.913	3.80%
Ácido aspártico (D)	11.232	9.97%
Prolina (P)	9.862	7.22%
Metionina (M)	747	0.20%

Ácido glutâmico (E)	6.011	3.20%
Triptofano (W)	5.852	5.48%
Total	166.704	100%

Legenda: A tabela apresenta a frequência de ocorrência de cada resíduo de aminoácido nas 2.351 sequências de snakina analisadas, destacando a abundância de cisteínas e outros aminoácidos relevantes para a atividade biológica dos peptídeos.

A composição dos aminoácidos das sequências de snakina contou com 166.704 resíduos de aminoácidos, sendo os resíduos de cisteína o mais frequente na composição, com 24.785 resíduos e uma frequência de aparecimento de 11.87%. O segundo aminoácido mais frequente foi a lisina, com 14.540 resíduos e uma frequência de 5.94%. Em contraste, o triptofano apresentou a menor quantidade de resíduos, com 747 resíduos e uma frequência de 0.20%.

O peso molecular das sequências variou de 3.98 kDa para o peptídeo SUAK_6871, do grupamento de sequências com nove cisteínas, a 13.38 para o peptídeo GHLP_54852, do grupamento com doze cisteínas. O peso médio das sequências de snakina foi de 7.7 kDa, com o desvio padrão de 1.52. Observou-se que as sequências com onze cisteínas apresentaram o peso molecular médio correspondente ao descrito na literatura, seguido pelo grupamento com dez cisteínas, com um peso médio de 7.04 kDa.

O comprimento das sequências variou de 36 aminoácido no peptídeo OBTI_37445, do grupamento das sequências com quatro cisteínas, a 120 resíduos nos peptídeos GHLP_54852 e SKNL_69568, do grupamento dos peptídeos com doze cisteínas. A média foi de 70,91 resíduos, com um desvio padrão de 13.79. Isso pode ser observado nos grupamentos de sequências com onze e dez cisteínas, que apresentam um comprimento médio próximo ao da literatura, com 62,89 e 64,45 resíduos, respectivamente.

A carga líquida variou de -5.51 para o peptídeo TVSH_15322, do grupamento das sequências variantes de seis cisteínas, a 17.62 no peptídeo QAUE_31192, do grupamento de oito cisteínas. A carga líquida média foi de 6.57, com o desvio padrão de 3.01.

O ponto isoelétrico (pI) variou de 4.67, observado nos peptídeos TVSH_15322, do grupamento variante de seis cisteínas e TVSH_16768, do grupamento de quatro cisteína, até 10.29 no peptídeo QAUE_31192, do grupamento com oito cisteínas. O pI médio foi de 8,95, com

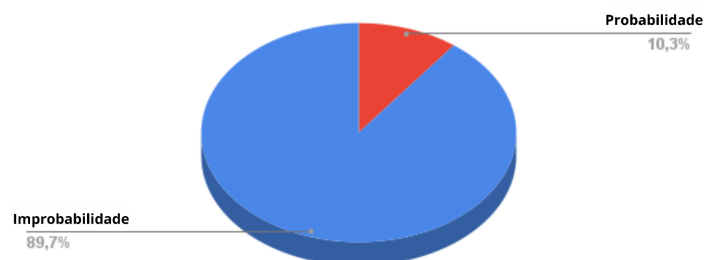
um desvio padrão de 0.52. Assim, para neutralizar os peptídeos TVSH_15322 e TVSH_16768, seria necessário um pl de 4.67, enquanto para o QAUE_31192, seria necessário um pl de 10.29.

Já o índice de instabilidade (II) variou de 4.04 para o peptídeo VZCI_9518, do grupamento com oito cisteínas, a 125.47 para o peptídeo WWQZ_29991, do grupamento com quatro cisteínas. O II médio foi de 51,88, com um desvio padrão de 14.16. Observa-se que os peptídeos dos grupamentos de sequências com treze e variante de doze cisteínas apresentaram os melhores índices de instabilidade, sendo de 41.21 e 42.38, respectivamente.

7.7. Presença de Agregados de Peptídeos Insolúveis

Os resultados da análise das sequências de tioninas e snakinas evidenciam o potencial de expressão heteróloga desses peptídeos antimicrobianos. Conforme ilustrado na Figura 4, a análise revelou que 89,7% das tioninas e 65,9% das snakinas apresentaram baixa probabilidade de formação de corpos de inclusão, indicando uma tendência favorável à expressão na forma solúvel e, conseqüentemente, à redução da formação de agregados insolúveis. Em contrapartida, apenas 10,3% das tioninas e 34,1% das snakinas demonstraram uma propensão elevada à formação de corpos de inclusão, sugerindo uma maior tendência à agregação insolúvel durante a expressão heteróloga.

A Improbabilidade das sequências de tionina expressarem em corpos de inclusão



B Improbabilidade das sequências de snakina expressarem em corpos de inclusão

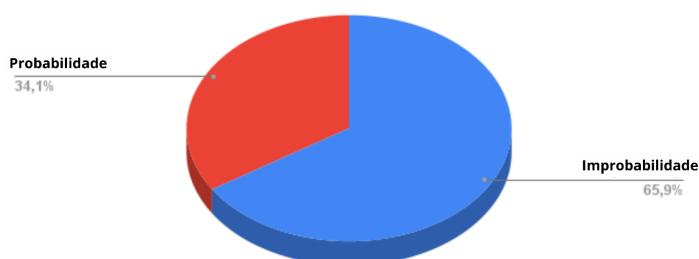


Figura 5 - Probabilidade de formação de corpos de inclusão para as sequências de peptídeos de tionina e snakina.

Na classe das tioninas, os peptídeos MCNW_8681, OINM_23796, HZTS_5985 e BJSW_9651 apresentaram os maiores escores de improbabilidade de formação de corpos de inclusão, com os dois primeiros apresentando um escore de 0,979 e os dois segundos, 0,978. Em contrapartida, os peptídeos TZWR_39737, SOHV_84162 e BXBF_97156 demonstraram os maiores escores de probabilidade de formação de corpos de inclusão, sendo, respectivamente, 0,979, 0,977 e 0,904.

Na classe das snakinas, os peptídeos IPWB_8895, TZWR_35498 e SNBI_89872 apresentaram os maiores escores de improbabilidade de expressão, com um escore de 0,91. Por outro lado, os peptídeos SUAK_6871, MRKX_76110 e QAUE_31192 evidenciaram os maiores escores de probabilidade de expressão, alcançando 0,979.

7.8. Predição da Atividade Antimicrobiana

A predição da atividade antimicrobiana das sequências de tioninas e snakinas revelou um elevado potencial desses peptídeos como agentes antimicrobianos. Os resultados indicam que 92,1% das tioninas e 93,7% das snakinas apresentam alta probabilidade de serem peptídeos antimicrobianos, com escores iguais ou superiores a 0,5. Em contrapartida, 7,9% das tioninas e 6,3% das snakinas exibiram escores inferiores a 0,5, sugerindo uma baixa probabilidade de apresentarem atividade antimicrobiana.

A Figura 5 apresenta um gráfico de dispersão que ilustra a predição da atividade antimicrobiana das sequências de tioninas e snakinas, destacando a distribuição dos escores e a concentração das sequências.

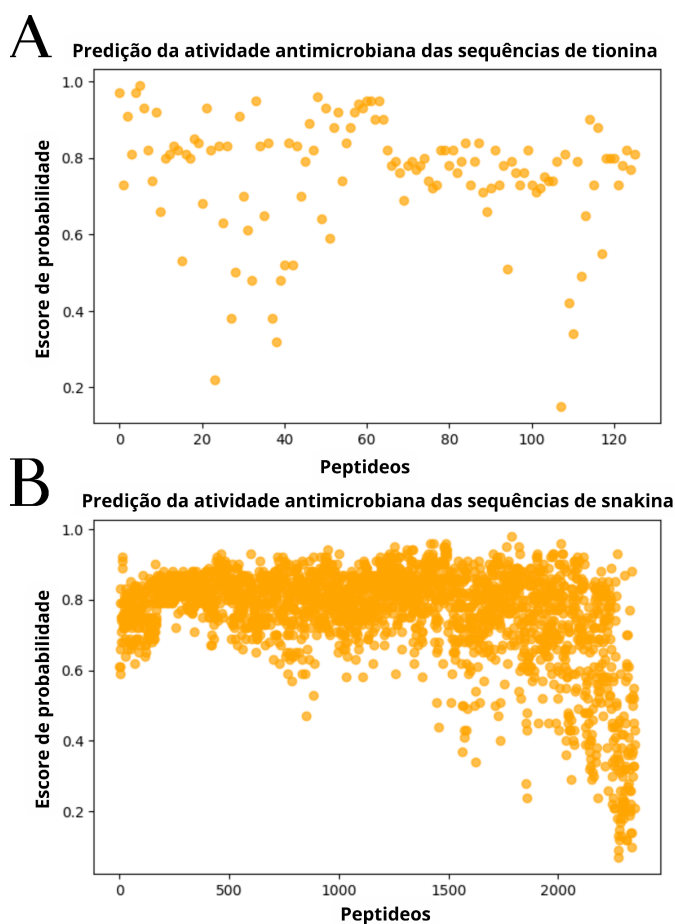


Figura 6 - Distribuição dos escores de atividade antimicrobiana das sequências de peptídeos de tionina e snakina.

Pode-se observar que a maioria das sequências de tioninas concentrou-se em torno do escore 0,8. No entanto, algumas sequências apresentaram escores superiores, aproximando-se de 1, enquanto outras exibiram escores próximos a 0. Os peptídeos SOHV_84162, ZMGN_83565 e

WCOR_89173 destacaram-se com os maiores escores de atividade antimicrobiana, sendo o primeiro com um escore de 0,99 e os outros dois com 0,97. Em contrapartida, os peptídeos TZWR_5671, TZWR_39737 e VMNH_22308 apresentaram os menores escores, com valores de 0,15, 0,22 e 0,32, respectivamente.

Já as sequências de snakina, também apresentaram sequências em torno do escore 0,8, porém pode-se observar uma alta concentração de sequências em escores superiores. Os peptídeos SUAK_6871, HOKG_103849 e IUSR_21097 apresentaram os maiores escores de atividade antimicrobiana, sendo o primeiro 0,98, enquanto os outros dois 0,96. Entretanto os peptídeos PCNH_10701, KTWL_86002 e ULKT_16876 apresentaram os menores escores de atividade, sendo respectivamente, 0,07, 0,09 e 0,10.

7.9. Modelagem Tridimensional dos Peptídeos

A modelagem tridimensional das sequências de tionina e snakina oferece insights importantes sobre a qualidade estrutural e o potencial funcional desses peptídeos antimicrobianos. A análise das 126 sequências de tionina indicou que 31% das sequências foram classificadas no nível “Ok”, com valores de pLDDT entre 70-79, o que reflete uma modelagem de qualidade moderada. Além disso, 27,8% das sequências atingiram o nível “Bom” (pLDDT entre 80-89), e 4% foram classificadas como “Muito Bom”, com pLDDT superior a 90, sugerindo um alto grau de estabilidade estrutural. No entanto, um percentual considerável das sequências apresentou desafios de dobramento, com 31% classificados como “Ruim” (pLDDT entre 50-59) e 6,4% no nível “Muito Ruim”, com valores de pLDDT abaixo de 50.

Em contraste, as 2.351 sequências de snakina demonstraram uma modelagem tridimensional predominantemente de alta qualidade, com 45,3% das sequências classificadas como “Bom” (pLDDT entre 80-89), 32,1% como “Ok” (pLDDT entre 70-79), e 14,3% no nível “Muito Bom” (pLDDT superior a 90). Apenas 7,4% das sequências apresentaram modelagem de baixa qualidade, com índices de pLDDT entre 60-69, e uma parcela mínima de 0,6% foi classificada como “Muito Ruim” (pLDDT inferior a 60).

Na Figura 6, são destacados os peptídeos que obtiveram os maiores valores de pLDDT entre as sequências de tionina e snakina, bem como os tipos de dobramento observados. Entre as tioninas, os peptídeos XWMS_50300, PDIE_6005 e CSUV_16040 apresentaram os melhores

índices, com pLDDTs de 93.20, 92.90 e 92.40, respectivamente. Por sua vez, as sequências de snakina destacam-se pelos peptídeos GCFE_50513, XSSD_77024 e HGSM_67416, com escores de 97,20 e 97,10 para os dois últimos.

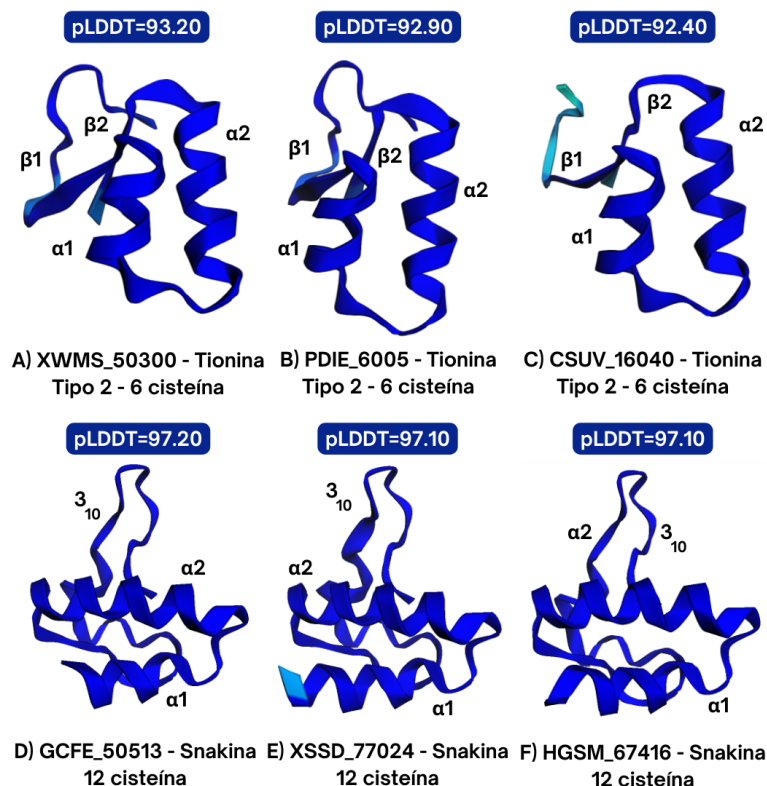


Figura 7 - Peptídeos da classe de tionina e snakina com os melhores escores de pLDDT entre as sequências analisadas.

Pode-se observar que as sequências de tionina apresentaram duas alfas hélices antiparalelas e duas folhas betas nas extremidades das sequências formando um “L”. Já as snakinas apresentaram duas alfas hélices paralelas e uma hélice 3_{10} curta.

Na Figura 7, são apresentados os peptídeos que obtiveram os maiores valores de pLDDT para cada grupamento de tionina identificado, destacando aqueles com altos índices e estruturas tridimensionais compatíveis com as descrições da literatura. Entre eles, encontram-se os peptídeos BXBF_5999, QNIK_96290, XWMS_50300, IPWB_14968 e EMIG_63, que representam, respectivamente, os grupamentos de tioninas do tipo 1, variante do tipo 1 (com duas duplas cisteínas), tipo 2 e variantes de 7 cisteínas (com dois duplos resíduos e sem dupla cisteína).

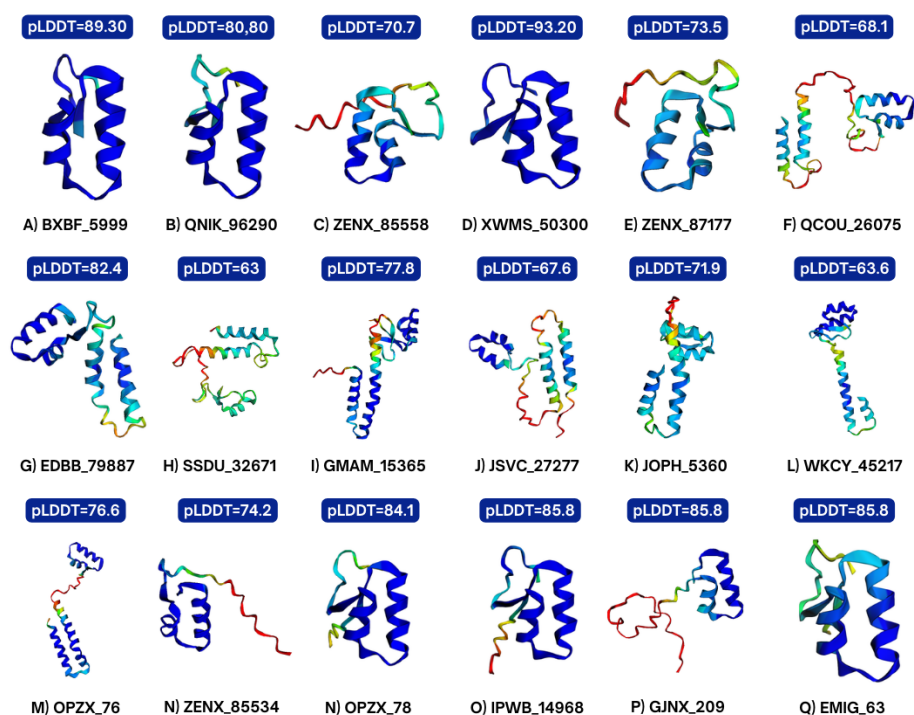


Figura 8 - Peptídeos de cada grupamento de tionina que apresentaram os maiores escores de pLDDT.

Além disso, é possível observar variações estruturais significativas em algumas sequências, como nos peptídeos SSDU_32671, GMAM_15365, JSVC_27277, JOPH_5360, WKCY_45217 e OPZX_76. Estes peptídeos correspondem, respectivamente, aos grupamentos com 13 cisteínas, 12 cisteínas, variante de 12 cisteínas (sem duplo resíduo de cisteína), 11 cisteínas, 10 cisteínas e sua variante (sem duplo resíduo).

A Figura 8 apresenta os peptídeos de snakina que obtiveram os melhores índices de modelagem em cada grupamento. Observa-se que os peptídeos GCFE_50513, YCKE_54557, ENQF_16339, GDZS_29494 e GMHZ_1390 destacaram-se entre os diferentes grupamentos, pois, além de exibirem uma estrutura compatível com as descrições da literatura, apresentaram os maiores valores de pLDDT. Esses peptídeos representam, respectivamente, os grupamentos com 12 cisteínas, 13 cisteínas, 11 cisteínas e sua variante (sem duplo resíduo de cisteína).

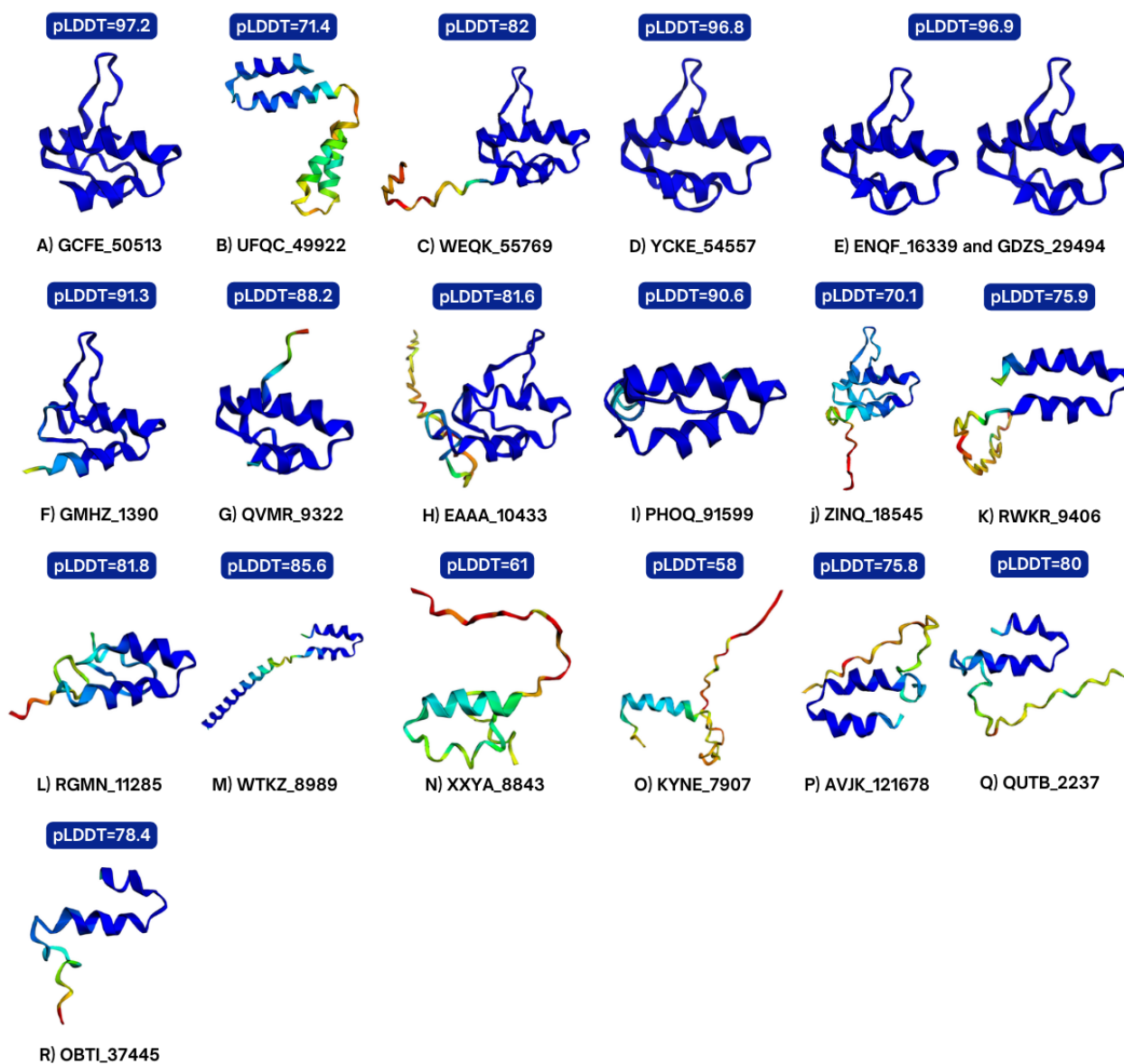


Figura 9 - Peptídeos de cada grupamento de snakina que apresentaram os maiores escores de pLDDT.

Em contraste, os peptídeos UFQC_49922, WTKZ_8989, XXYA_8843 e KYNE_7907 mostraram variações estruturais significativas em relação à literatura. Esses peptídeos correspondem aos grupamentos de variante de 12 cisteínas (sem duplo resíduo de cisteína), 7 cisteínas, variante de 7 cisteínas (sem duplo resíduo) e 6 cisteínas, respectivamente.

7.10. Seleção dos Melhores Peptídeos

Foram selecionados seis peptídeos, sendo desses seis, três pertencentes à classe de tionina e três de snakina. Esses peptídeos foram analisados como apresentando as características físico-químicas mais próximas da descrita na literatura, as menores probabilidades de formação de agregados insolúveis, as maiores probabilidade de atividade antimicrobiana e as estruturas tridimensionais que apresentarem os maiores pI-DDTs, como pode ser observado na Tabela 7.

Tabela 7 - Peptídeos antimicrobianos das classes tionina e snakina selecionados com base nos parâmetros estruturais, físico-químicos e nos escores preditivos de atividade antimicrobiana obtidos por análises *in silico*. A tabela apresenta os peptídeos das classes tionina e snakina selecionados para as etapas subsequentes do estudo com base na combinação de critérios bioinformáticos, incluindo probabilidade predita de atividade antimicrobiana, características físico-químicas compatíveis com peptídeos antimicrobianos descritos na literatura, baixa propensão à formação de agregados insolúveis e elevada confiabilidade estrutural obtida nas modelagens tridimensionais. Os escores apresentados refletem o potencial biotecnológico das sequências para interação com alvos proteicos de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente.

Peptídeo	PLDDT	Quantidade de Cisteína	Peso molecular	Comprimento	Carga líquida	Ponto isoelétrico	Índice de instabilidade	Classe AMP	Improbabilidade de formação de corpos de inclusão
Tionina									
CSUV_16040	92,40 (Muito Bom)	6	4,29	40	3,05	8,88	37,96	AMP (0,74)	Improbabilidade (0,613)
BXBF_5999	89,30 (Bom)	8	4,76	46	4,35	8,95	37,16	AMP (0,7)	Improbabilidade (0,889)
QNIK_96290	80,80 (Bom)	8	5,95	56	2,35	8,5	28,18	AMP (0,73)	Improbabilidade (0,889)
Snakina									
XSSD_77024	97,1 (Muito Bom)	12	6,9	62	2,97	8,46	36,01	AMP (0,89)	Improbabilidade (0,856)
UTQR_12466	96,7 (Muito Bom)	12	6,96	63	5,28	8,76	30,54	AMP (0,84)	Improbabilidade (0,683)
NUZN_54167	96,5 (Muito Bom)	12	6,91	63	4,24	8,62	39,21	AMP (0,89)	Improbabilidade (0,817)

Na classe das tioninas, foram selecionados os peptídeos CSUV_16040, BXBF_5999 e QNIK_9629, enquanto na classe das snakinas foram escolhidos XSSD_77024, UTQR_12466 e NUZN_54167, por apresentarem elevados índices de confiabilidade estrutural, com valores de pLDDT superiores a 80, sendo então classificados como bons e muito bons.

As sequências selecionadas demonstraram características compatíveis com a literatura. Entre as tioninas, o peptídeo CSUV_16040 apresentou seis resíduos de cisteínas, enquanto BXBF_5999 e QNIK_9629 apresentaram oito resíduos. Já nas snakinas, as três moléculas apresentaram doze resíduos de cisteínas. O peso molecular variou entre 4,9 e 5,95 kDa nas tioninas e entre 6,9 e 6,96 nas snakinas, com comprimento entre 40 e 56 resíduos nas tioninas e 62 e 63 nas snakinas.

Em ambas as classes, observou-se carga líquida positiva e pontos isoeletrônicos. Os índices de instabilidade foram inferiores a 40 para todos os peptídeos, indicando boa estabilidade, conforme proposto por Guruprasad. Adicionalmente, todas as moléculas foram classificadas como peptídeos antimicrobianos, com escores superiores a 0,5. Por fim, a predição da improbabilidade de formação de corpos de inclusão sugere que as moléculas apresentam alta probabilidade de se expressarem em sistemas recombinantes.

7.11. Seleção do Alvo

Como proteína receptora foi selecionada a proteína OprF, sob o código de acesso 4RLC. Essa proteína é a principal porina da membrana externa da *Pseudomonas aeruginosa*.

7.11.1. Análise da Topologia da Proteína-Alvo

A análise topológica da proteína OprF indicou que ela é uma proteína de membrana do tipo β , caracterizada pela presença de estruturas em β -folha que atravessam a membrana. A predição mostrou a presença de oito regiões transmembranas com conformação em β -folha, localizadas nos intervalos de resíduos 22–29, 43–52, 56–63, 84–91, 100–108, 128–136, 143–150 e 165–173. Além dessas regiões transmembranares, foram identificadas cinco regiões periplasmáticas, indo dos resíduos 11–21, 53–55, 92–99, 137–142 e 174–175. Também foram observadas quatro regiões extracelulares, localizadas entre os resíduos 30–42, 64–83, 109–127 e

151–164, sendo essa região escolhida para realizar o acoplamento dos peptídeos antimicrobianos no *docking* molecular.

7.12. *Docking* Molecular

A análise da interação proteína-peptídeo obtida por meio do *docking* molecular demonstrou afinidade favorável entre os peptídeos das famílias de tioninas e snakinas e o receptor OprF da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. Esses resultados podem ser observados na Figura 9 e na Tabela 8, que apresentam, respectivamente, a representação gráfica das interações formadas no *docking* e os escores de energia associados aos complexos gerados.

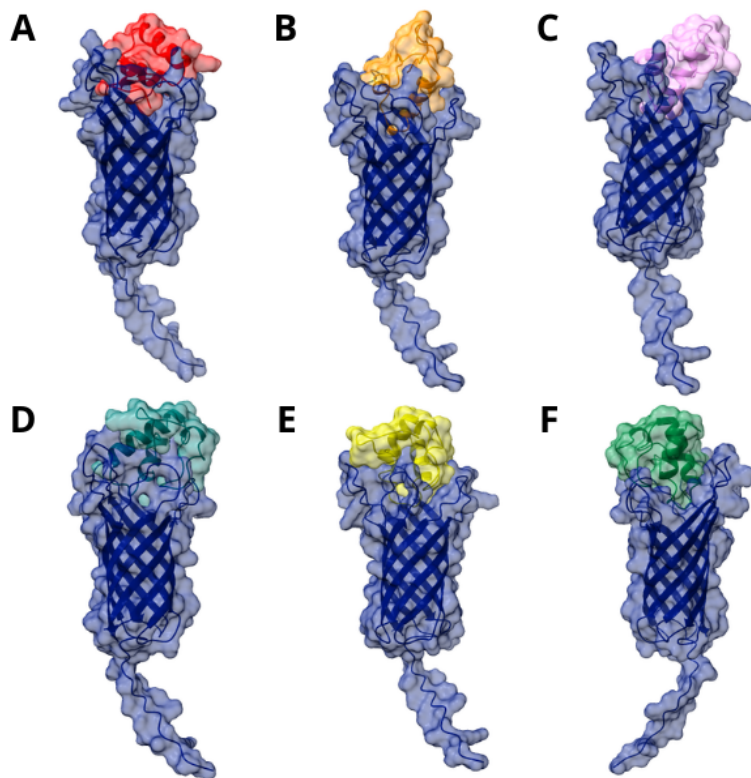


Figura 10 - Acoplamento molecular entre a proteína receptora OprF e os peptídeos: A) CSUV_16040; B) BXBF_5999; C) QNIK_96290; D) XSSD_77024; E) UTQR_12466; F) NUZN_54167.

Tabela 8 - Complexos moleculares preditos entre a proteína de membrana OprF de *Pseudomonas aeruginosa* e peptídeos antimicrobianos das classes tionina e snakina obtidos por *docking* molecular *in silico*. A figura apresenta os complexos proteína-peptídeo gerados por *docking* molecular entre a proteína OprF de *Pseudomonas aeruginosa* e os peptídeos antimicrobianos selecionados das classes tionina e snakina. As interações foram obtidas utilizando o servidor ClusPro 2.0, considerando os complexos com maior estabilidade energética e compatibilidade estrutural. A representação tridimensional evidencia as regiões de interação entre os peptídeos e os domínios extracelulares da proteína-alvo, permitindo inferir possíveis mecanismos de ligação associados ao potencial antimicrobiano das moléculas analisadas.

Peptídeos	Cluster	Membros	Representante	Escore ponderado
Tioninas				
CSUV_16040	0	182	Média	-1003.9
			Menor energia	-1164.5
BXBF_5999	0	342	Média	-929.5
			Menor energia	-1090.3
QNIK_96290	0	388	Média	-989.9
			Menor energia	-1242.7
Snakinas				
XSSD_77024	2	68	Média	-1026.8
			Menor energia	-1114.3
UTQR_12466	0	227	Média	-992.5
			Menor energia	-1251.3
NUZN_54167	1	98	Média	-1116.7
			Menor energia	-1116.7

Como pode ser observado nas interações apresentadas na Tabela 9, os peptídeos da classe das tioninas demonstraram interações favoráveis com o receptor proteico OprF. Nos três casos analisados, foi selecionado o cluster 0, por apresentar interações localizadas no sítio de ligação esperado, ou seja, na região extracelular do receptor, considerada biologicamente mais plausível. Também foi possível observar um número expressivo de membros nesses clusters, onde o complexo OprF–QNIK_96290 apresentou o maior número de conformações nessa posição, com 388 membros no cluster, seguido pelo OprF–BXBF_5999, com 342 membros, e pelo OprF–CSUV_16040, com 182 membros.

Em relação aos escores ponderados de energia de ligação utilizados na formação dos complexos, o complexo OprF–CSUV_16040 apresentou a menor média de energia entre as tioninas, com valor de -1003,9 e energia mínima no cluster de -1164,5. Em seguida, destacou-se

o complexo OprF-QNIK_96290, com média de $-989,9$ e energia mínima de $-1242,7$, enquanto o complexo OprF-BXBF_5999 apresentou energia média de $-929,5$ e energia mínima de $-1090,3$.

Para a classe das snakinas, foram selecionados os clusters 0, 1 e 2 para os peptídeos UTQR_12466, NUZN_54167 e XSSD_77024, respectivamente, por apresentarem interações estruturalmente mais plausíveis com o receptor. Esses clusters também exibiram um número considerável de membros, indicando estabilidade das conformações geradas. O complexo OprF-UTQR_12466 apresentou o maior número de membros entre as snakinas, com 227 conformações no cluster, seguido por OprF-NUZN_54167, com 98 membros, e OprF-XSSD_77024, com 68 membros.

Quanto às energias de interação, os complexos também apresentaram valores baixos, sugerindo interações favoráveis. O complexo OprF-NUZN_54167 apresentou a menor média ponderada da classe, com valor de $-1116,7$, sendo também a menor energia observada no cluster. Em seguida, destacou-se o complexo OprF-XSSD_77024, com média de $-1026,8$ e menor energia de $-1114,3$. Por fim, o complexo OprF-UTQR_12466 apresentou energia média de $-992,5$ e energia mínima de $-1251,3$, indicando também forte afinidade de interação com o receptor OprF.

7.12.1. Análise das Ligações Formadas na Interação Peptídeo-Proteína

A análise das interações intermoleculares formadas entre os peptídeos das classes tionina e snakina e a proteína receptora OprF, obtidas por meio do *docking* molecular levou a formação de diferentes tipos de interações, como as ligações de hidrogênio, contatos não ligantes e pontes salinas entre os resíduos de aminoácidos presentes nas moléculas. Por outro lado, não foi observado a formação de pontes dissulfeto entre as moléculas. Esses resultados podem ser visualizados na Figura 10 e na Tabela 9, que apresentam, respectivamente, a representação gráfica das interações e a descrição dessas interações.

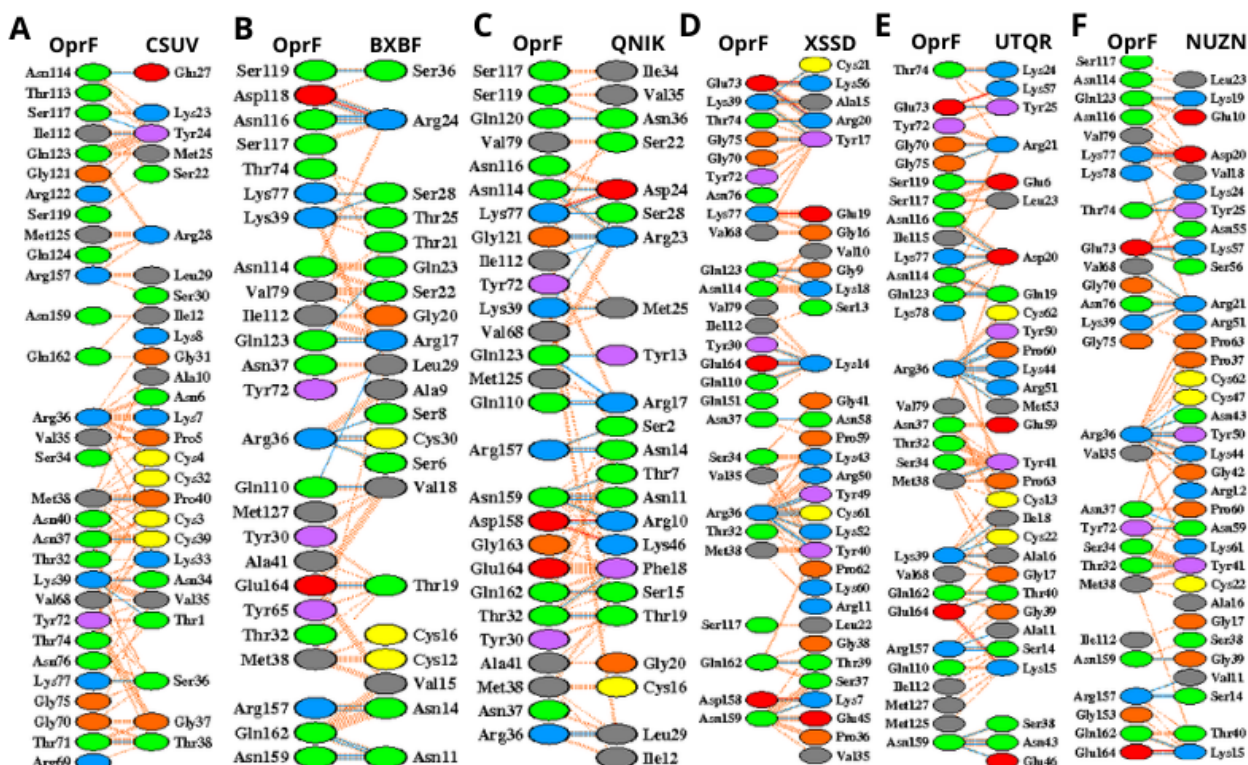


Figura 11 - Representação das interações intermoleculares previstas entre a proteína OprF de *Pseudomonas aeruginosa* e os peptídeos antimicrobianos selecionados das classes tionina e snakina. A figura apresenta os principais resíduos envolvidos nas interações proteína-peptídeo obtidas por *docking* molecular entre a proteína OprF e os peptídeos selecionados: A) CSUV_16040; B) BXB_5999; C) QNIK_96290; D) XSSD_77024; E) UTQR_12466; F) NUZN_54167. As análises evidenciam ligações intermoleculares potencialmente relevantes para a estabilidade dos complexos formados, incluindo ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e contatos eletrostáticos entre os aminoácidos do receptor e dos peptídeos ligantes.

Tabela 9: Análise das interações proteína-peptídeo entre a proteína OprF de *Pseudomonas aeruginosa* e peptídeos antimicrobianos das classes tionina e snakina obtidas por *docking* molecular. A figura ilustra os complexos moleculares formados entre a proteína de membrana OprF e os peptídeos antimicrobianos selecionados das classes tionina e snakina, destacando as regiões de interface molecular identificadas após as análises de *docking*. Os resultados demonstram diferentes padrões de interação entre receptor e ligantes, sugerindo potencial afinidade estrutural dos peptídeos com regiões funcionalmente importantes da proteína-alvo bacteriana.

Cadeias	Número de pontes salinas	Número de ligações dissulfeto	Número de pontes de hidrogênio	Número de contatos não ligados
Tioninas				
OprF	9	664		

CSUV_16040				
OprF				
BXBF_5999	1	-	25	200
OprF				
QNIK_96290	3	-	28	236
Snakinas				
OprF				
XSSD_77024	5	-	25	242
OprF				
UTQR_12466	2	-	35	286
OprF				
NUZN_54167	3	-	24	272

A análise das interações intermoleculares mostrou a formação de um elevado número de interações entre os peptídeos antimicrobianos e a proteína OprF. Entre as tioninas, pode-se observar que o peptídeo QNIK_96290 apresentou o maior número de pontes de hidrogênios e pontes salinas dentro dessa classe, com 28 ligações de hidrogênio e 3 pontes salinas. O peptídeo CSUV_16040, por sua vez, apresentou a maior quantidade de contatos não ligantes, tendo 664 interações desse tipo, além de formar 9 ligações de hidrogênio, porém não apresentou nenhuma ponte salina. Já o peptídeo BXBF_5999 formou 25 ligações de hidrogênio, 200 contatos não ligantes e 1 ponte salina.

Entre os peptídeos da classe de snakina, o UTQR_12466 destacou-se por apresentar o maior número de pontes de hidrogênio e contatos não ligantes, com 35 ligações de hidrogênio e 286 contatos não ligantes, além de formar 2 pontes salinas. O peptídeo XSSD_77024 apresentou o maior número de interações salinas dentro dessa classe, com 5 pontes salinas, além de estabelecer 25 ligações de hidrogênio e 242 contatos não ligantes. Por fim, o peptídeo NUZN_54167 formou 24 pontes de hidrogênio, 272 contatos não ligantes e 3 pontes salinas.

8. DISCUSSÃO

A resistência antimicrobiana aos antibióticos amplamente utilizados tem se tornado uma séria ameaça à saúde pública global, motivando a busca por novas moléculas com potencial terapêutico capazes de combater microrganismos resistentes, em especial a *Pseudomonas aeruginosa* (World Health Organization, 2023; Reynolfs; Kollef, 2021, 2021). Com isso, o presente estudo utilizou ferramentas de bioinformática para realizar uma triagem de sequências peptídicas, com o objetivo de identificar e selecionar moléculas que apresentassem características estruturais e físico-químicas favoráveis à atuação como agentes antimicrobianos.

O estudo apresentou elevada robustez, decorrente da grande quantidade de peptídeos avaliados. Inicialmente, a análise da presença de peptídeos sinal revelou uma alta concentração de sequências contendo essa região sinalizadora. No contexto biológico, os peptídeos sinais desempenham papel fundamental em diferentes etapas do desenvolvimento celular, desde a síntese do peptídeo até o direcionamento da molécula para compartimentos específicos ou para secreção extracelular (Zhang *et al.*, 2025). Dessa forma, em análises *in silico*, torna-se essencial a remoção dessas sequências sinalizadoras para garantir a precisão e a validação dos modelos nas análises posteriores, uma vez que o peptídeo sinal não faz parte da forma funcional madura da proteína (Teufel *et al.*, 2022).

A análise da presença de domínios conservados permitiu realizar uma triagem e selecionar apenas os peptídeos que apresentassem regiões conservadas durante a evolução e assim indicar que as moléculas fizessem parte das suas respectivas classes (Fong; Marchler-Bauer, 2008).

O alinhamento global das sequências revelou que uma parcela significativa dos peptídeos analisados apresentou variações tanto no número de resíduos de cisteína quanto em suas posições ao longo da sequência. No caso das tioninas, algumas sequências apresentaram a presença de um pró-domínio ácido, o qual contribuiu para o aumento na quantidade de cisteínas nas moléculas, como evidenciado por Hong *et al.* (2021). Apesar dessas variações, observou-se que uma grande proporção das sequências manteve características compatíveis com aquelas descritas na literatura, ou seja, as tioninas exibiram seis ou oito resíduos de cisteína em suas sequências, enquanto as snakinas apresentaram doze resíduos de cisteína (Nawrot *et al.*, 2014; Segura *et al.*, 1999).

A variação observada no número de resíduos de cisteína entre as sequências analisadas pode estar relacionada, em partes, pela escassez de estudos sobre peptídeos antimicrobianos de origem vegetal. Além disso, investigações mais recentes, como a conduzida por Hong *et al.* (2021), propõem uma reclassificação da família das tioninas com base na identificação de variações estruturais, incluindo diferenças no número de cisteínas presentes nas sequências.

As características físico-químicas dos peptídeos analisados mostraram variações relevantes em sua composição. Na classe de tionina, observou-se variações na abundância de determinados resíduos de aminoácidos, divergindo parcialmente do padrão descrito por Broekaert *et al.* (1997), que caracteriza as tioninas como predominantemente ricas em arginina, lisina e cisteína. O peso molecular também apresentou variações entre as sequências, onde são tipicamente descritas com um baixo peso molecular, em torno de 5 kDa (Nawrot *et al.*, 2014). De modo semelhante, o comprimento das sequências também divergiu da literatura, onde geralmente apresentam 45 a 47 resíduos, enquanto a média do estudo apresentou um comprimento maior (Broekaert *et al.*, 1997; Padovan *et al.*, 2010).

Por outro lado, a carga líquida média obtida corroborou com a literatura, já que as tioninas tendem a apresentar carga positiva em pH neutro (Nawrot *et al.*, 2014). As cargas positivas são corroboradas pelos valores de ponto isoelétrico, definido como o pH no qual a molécula apresenta carga líquida nula (Bhatia *et al.*, 2015). Já em relação ao índice de instabilidade, os resultados indicaram tendência à menor estabilidade média entre as sequências da classe, uma vez que o valor médio obtido (47,56) ultrapassa o limite de 40 proposto por Guruprasad *et al.* (1990).

Na classe das snakina por sua vez, também foram observadas divergências nas características físico-químicas das sequências analisadas quando comparadas com a literatura. No entanto, quanto à composição dos resíduos de aminoácidos, os dados mostraram concordância com a literatura, os quais indicam que as snakinas são geralmente ricas em resíduos de cisteínas (Nawrot *et al.*, 2014). Foram identificadas variações no peso molecular médio das sequências, onde de acordo com Nawrot *et al.* (2014), o peso molecular típico das sequências de snakinas é de 6.9 kDa. De forma semelhante, o comprimento das sequências também apresentou discrepâncias, onde essa classe é caracterizada por possuir cerca de 63 resíduos de aminoácidos (Nawrot *et al.*, 2014).

Por outro lado, observou-se convergência quanto à carga líquida, já que os peptídeos dessa classe tendem a apresentar carga positiva em pH neutro (Oliveira-Lima *et al.*, 2017). Esses resultados são corroborados pelos valores dos pontos isoelétricos das sequências, definido como o pH no qual a molécula apresenta carga líquida nula (Bhatia *et al.*, 2015). Em relação ao índice de instabilidade, os valores médios obtidos indicaram tendência à menor estabilidade das sequências de snakina, uma vez que, de acordo com Guruprasad *et al.* (1990), proteínas com índice superiores a 40 são consideradas pouco estáveis.

A análise da probabilidade de formação de corpos de inclusão indicou que a maioria das sequências de tioninas e snakinas apresentaram uma alta probabilidade de expressão solúvel, reduzindo a probabilidade de agregação proteica e favorecendo seu uso em sistemas de expressão heteróloga em *E. coli* (Bhatwa *et al.*, 2021).

A predição de probabilidade das moléculas serem AMP, mostrou uma alta taxa de peptídeos de ambas as classes com potencial ação antimicrobiana. Esse aspecto é especialmente relevante no contexto da crescente resistência bacteriana, uma vez que indica que esses peptídeos podem ser eficazes contra microrganismos resistentes, conforme observado em estudos com AMPs de origem vegetal (Hintz *et al.*, 2015).

A modelagem tridimensional das sequências mostrou uma alta robustez estrutural, com peptídeos apresentando altos escores de estruturação, em especial entre as sequências de snakinas (Mirdita *et al.*, 2022). Essa análise também permitiu verificar que as modelagens que apresentaram os melhores escores de estruturação apresentaram estruturas tridimensionais semelhantes à descrição da literatura para essas classes, sendo a tionina em um formato de “L” com duas alfas hélices antiparalelas e duas folhas betas nas extremidades e já as snakinas com duas alfas hélices paralelas e uma hélice 3_{10} curta (Stec, 2006; Porto; Franco, 2013).

Para as análises de *docking* molecular, a proteína OprF foi selecionada como receptor por se tratar de uma proteína de membrana externa da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, desempenhando funções essenciais para o desenvolvimento, integridade estrutural e virulência deste microrganismo (Bouffartigues *et al.*, 2012). A análise topológica da OprF indicou a presença de regiões expostas ao meio extracelular, o que as torna acessíveis à interação com moléculas externas, incluindo peptídeos antimicrobianos. Dessa forma, esses segmentos foram considerados alvos adequados para o acoplamento molecular, uma vez que refletem locais biologicamente plausíveis de interação (Mishra *et al.*, 2025).

A análise das interações proteína-peptídeo entre o receptor OprF e os peptídeos antimicrobianos demonstrou que todas as moléculas avaliadas foram capazes de estabelecer múltiplos contatos intermoleculares com a proteína alvo. Os complexos gerados apresentaram clusters com elevado número de membros e baixas energias de ligação, parâmetros que indicam maior estabilidade conformacional das interações preditas (Kozakov *et al.*, 2017).

Os resultados obtidos reforçam o potencial biotecnológico de tioninas e snakinas como candidatos promissores para o desenvolvimento de novas estratégias antimicrobianas. Entretanto, por se tratar de um estudo exclusivamente *in silico*, torna-se necessária a realização de validações experimentais adicionais, incluindo ensaios microbiológicos, estudos de citotoxicidade e análises funcionais, a fim de confirmar a atividade biológica predita computacionalmente.

Dessa forma, este trabalho contribui para a prospecção racional de peptídeos antimicrobianos vegetais e amplia as perspectivas para futuras aplicações biotecnológicas no combate a bactérias multirresistentes.

9. CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu a caracterização *in silico* de peptídeos antimicrobianos das classes tionina e snakina obtidos do banco de dados oneKP, evidenciando ampla diversidade estrutural entre as sequências analisadas, especialmente em relação ao número e posicionamento dos resíduos de cisteína. Parte significativa das sequências apresentou padrões compatíveis com aqueles descritos na literatura, enquanto outras revelaram variantes estruturais potencialmente inéditas, ampliando o conhecimento acerca da diversidade molecular dessas famílias de peptídeos.

As análises bioinformáticas demonstraram que diversos peptídeos selecionados apresentam características físico-químicas compatíveis com peptídeos antimicrobianos, elevada probabilidade predita de atividade antimicrobiana e estruturas tridimensionais com boa confiabilidade. Além disso, os estudos de *docking* molecular indicaram potencial capacidade de interação entre os peptídeos analisados e a proteína OprF de *Pseudomonas aeruginosa*, sugerindo possível relevância funcional dessas moléculas frente a alvos bacterianos associados à resistência antimicrobiana.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almasia, N. I. et al. Potato Snakin-1: an antimicrobial player of the trade-off between host defense and development. **Plant Cell Reports**, v. 39, n. 7, p. 839–849, 11 jun. 2020.

Altschul, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, out. 1990.

Bahar, A.; Ren, D. Antimicrobial Peptides. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 12, p. 1543–1575, 28 nov. 2013.

Berman, H. M. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235–242, 1 jan. 2000.

Berrocal-Lobo, M. et al. Snakin-2, an Antimicrobial Peptide from Potato Whose Gene Is Locally Induced by Wounding and Responds to Pathogen Infection. **Plant Physiology**, v. 128, n. 3, p. 951–961, 1 mar. 2002.

Bhatwa, A. et al. Challenges Associated With the Formation of Recombinant Protein Inclusion Bodies in Escherichia coli and Strategies to Address Them for Industrial Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, p. 630551, 2021.

Blomquist, K. C.; Nix, D. E. A Critical Evaluation of Newer β -Lactam Antibiotics for Treatment of Pseudomonas aeruginosa Infections. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 55, n. 8, p. 106002802097400, 23 nov. 2020.

Bouffartigues, E. et al. Transcription of the oprF Gene of Pseudomonas aeruginosa Is Dependent Mainly on the SigX Sigma Factor and Is Sucrose Induced. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 16, p. 4301–4311, 8 jun. 2012.

Brandileone, M.-C. C. et al. Increase in numbers of beta-lactam-resistant invasive Streptococcus pneumoniae in Brazil and the impact of conjugate vaccine coverage. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. Pt 5, p. 567–574, 1 maio 2006.

Breiman, L. Random Forests. **Machine Learning**, v. 45, n. 1, p. 5–32, 2001.

Brogden, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 238–250, mar. 2005.

Carpenter, E. J. et al. Access to RNA-sequencing data from 1,173 plant species: The 1000 Plant transcriptomes initiative (1KP). **GigaScience**, v. 8, n. 10, 1 out. 2019.

Cdc. **Antibiotic Use and Antimicrobial Resistance Facts**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/antibiotic-use/data-research/facts-stats/index.html>>. Acesso em: 29 dez. 2024.

Cdc. **About Antimicrobial Resistance**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/antimicrobial-resistance/about/?CDC_AAref_Val=https://www.cdc.gov/drugresistance/about/how-resistance-happens.html>. Acesso em: 27 dez. 2024.

Chokshi, A. et al. Global Contributors to Antibiotic Resistance. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 11, n. 1, p. 36–42, 2019.

Cock, P. J. A. et al. Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. **Bioinformatics**, v. 25, n. 11, p. 1422–1423, 20 mar. 2009.

Dadgostar, P. Antimicrobial Resistance: Implications and Costs. **Infection and Drug Resistance**, v. 12, n. 12, p. 3903–3910, dez. 2019.

Fong, J. H.; archler-Bauer, A. Protein subfamily assignment using the Conserved Domain Database. **BMC Research Notes**, v. 1, n. 1, p. 114, 2008.

Friedman, N. D.; Temkin, E.; Carmeli, Y. The negative impact of antibiotic resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 5, p. 416–422, maio 2016.

Gales, A. C. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 699–702, 1 set. 2003.

Gales, A. C. et al. Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacteria isolated in Brazilian hospitals participating in the SENTRY Program (2005-2008). **Brazilian Journal of Infectious**

Diseases, v. 13, n. 2, p. 90–98, abr. 2009.

Gawde, U. et al. CAMPR4: a database of natural and synthetic antimicrobial peptides. **Nucleic Acids Research**, v. 51, n. D1, p. D377–D383, 12 nov. 2022.

Hallgren, J. et al. DeepTMHMM predicts alpha and beta transmembrane proteins using deep neural networks. **bioRxiv**, 10 abr. 2022.

Hintz, T.; Matthews, K. K.; Di, R. The Use of Plant Antimicrobial Compounds for Food Preservation. **BioMed Research International**, v. 2015, n. 1, p. 1–12, 2015.

Ho, C. S. et al. Antimicrobial resistance: a concise update. **The Lancet Microbe**, v. 6, n. 1, p. 100947, set. 2024.

Hong, K. et al. The thionin family of antimicrobial peptides. **PLOS ONE**, v. 16, n. 7, p. e0254549, 14 jul. 2021.

Huan, Y. et al. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. 582779, 16 out. 2020.

Jenssen, H.; Hamill, P.; Hancock, R. E. W. Peptide Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 3, p. 491–511, 1 jul. 2006.

Kozakov, D. et al. PIPER: An FFT-based protein docking program with pairwise potentials. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 65, n. 2, p. 392–406, 24 ago. 2006.

Kozakov, D. et al. The ClusPro web server for protein–protein docking. **Nature Protocols**, v. 12, n. 2, p. 255–278, 12 jan. 2017.

Lai, Y.; Gallo, R. L. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. **Trends in Immunology**, v. 30, n. 3, p. 131–141, mar. 2009.

Laskowski, R. A. et al. PDBsum: Structural summaries of PDB entries. **Protein Science**, v. 27, n. 1, p. 129–134, 27 out. 2017.

Lay, F.; Anderson, M. Defensins - Components of the Innate Immune System in Plants. **Current**

Protein & Peptide Science, v. 6, n. 1, p. 85–101, 1 fev. 2005.

Li, J. et al. Plant antimicrobial peptides: structures, functions, and applications. **Botanical Studies**, v. 62, n. 5, p. 5, 29 abr. 2021.

Lima, R. M. et al. Legume Plant Peptides as Sources of Novel Antimicrobial Molecules Against Human Pathogens. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 9, 9 jun. 2022.

Macgowan, A.; Macnaughton, E. Antibiotic resistance. **Medicine**, v. 45, n. 10, p. 622–628, out. 2017.

Madeira, F. et al. Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. W1, 12 abr. 2022.

Magana, M. et al. The value of antimicrobial peptides in the age of resistance. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 20, n. 9, p. e216–e230, 1 set. 2020.

Martin, E.; Ganz, T.; Lehrer, R. I. Defensins and other endogenous peptide antibiotics of vertebrates. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 58, n. 2, p. 128–136, ago. 1995.

Ministério da Saúde. **Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única 2018-2022**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/plano_prevencao_resistencia_antimicrobianos.pdf>. Acesso em: 27 dez. 2024.

Ministério da Saúde. **RAM no Brasil**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/r/ram/ram-no-brasil>>. Acesso em: 27 dez. 2024.

Ministério da Saúde. **Microrganismos resistentes aos carbapenêmicos e sua distribuição no Brasil, 2015 a 2022**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2024/boletim-epidem-vol-55-n-2>>. Acesso em: 30 dez. 2024.

Mirdita, M. et al. ColabFold: making protein folding accessible to all. **Nature Methods**, v. 19, n.

6, p. 1–4, 30 maio 2022.

Mishra, S. et al. Extracellular domain of TREM2 possess two distinct ligand recognition sites: Insights from machine-learning guided docking and all-atoms molecular dynamics simulations. **Heliyon**, v. 11, n. 1, p. e41414, jan. 2025.

Nawrot, R. et al. Plant antimicrobial peptides. **Folia Microbiologica**, v. 59, n. 3, p. 181–196, 2014.

Pettersen, E. F. et al. UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. **Protein Science**, v. 30, n. 1, p. 70–82, 22 out. 2020.

Porto, W. F.; Franco, O. L. Theoretical structural insights into the snakain/GASA family. **Peptides**, v. 44, p. 163–167, 1 jun. 2013.

Prestinaci, F.; Pezzotti, P.; Pantosti, A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. **Pathogens and Global Health**, v. 109, n. 7, p. 309–318, 7 set. 2015.

Qin, S. et al. Pseudomonas aeruginosa: pathogenesis, Virulence factors, Antibiotic resistance, Interaction with host, Technology Advances and Emerging Therapeutics. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 1, 2022.

Remans, K. et al. Genome-wide analysis and literature-based survey of lipoproteins in Pseudomonas aeruginosa. **Microbiology**, v. 156, n. 9, p. 2597–2607, 1 set. 2010.

Reynolfs; Kollef, 2021, M. The Epidemiology and Pathogenesis and Treatment of Pseudomonas aeruginosa Infections: An Update. **Drugs**, v. 81, n. 18, p. 2117–2131, 7 nov. 2021.

Segura, A. et al. Snakin-1, a Peptide from Potato That Is Active Against Plant Pathogens. **Molecular Plant-Microbe Interactions®**, v. 12, n. 1, p. 16–23, jan. 1999.

Sievers, F.; Higgins, D. G. Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences. **Protein Science**, v. 27, n. 1, p. 135–145, 30 out. 2017.

Skliros, E. et al. Self-medication with antibiotics in rural population in Greece: a cross-sectional

multicenter study. **BMC Family Practice**, v. 11, n. 1, 8 ago. 2010.

Stec, B. Plant thionins – the structural perspective. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 63, n. 12, p. 1370–1385, 22 maio 2006.

Teufel, F. et al. SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models. **Nature Biotechnology**, v. 40, n. 1023–1025, 3 jan. 2022.

Vernon, L. P. Pyrularia Thionin: Physical Properties, Biological Responses and Comparison to Other Thionins and Cardiotoxin. **Journal of Toxicology: Toxin Reviews**, v. 11, n. 3, p. 169–191, 1 jan. 1992.

Vila-Perelló, M. et al. Synthetic and structural studies on Pyrularia puberathionin: a single-residue mutation enhances activity against Gram-negative bacteria. **FEBS Letters**, v. 536, n. 1-3, p. 215–219, 23 jan. 2003.

Von Wintersdorff, C. J. H. et al. Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 173, 19 fev. 2016.

Waterhouse, A. M. et al. Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. **Bioinformatics**, v. 25, n. 9, p. 1189–1191, 16 jan. 2009.

World Health Organization. **Antimicrobial Resistance**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>>. Acesso em: 27 dez. 2024.

Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, n. 6870, p. 389–395, jan. 2002.

Zhang, S. et al. Signal Peptides: From Molecular Mechanisms to Applications in Protein and Vaccine Engineering. **Biomolecules**, v. 15, n. 6, p. 897, 18 jun. 2025.

Zorzetto, R. **Aumenta nos hospitais brasileiros a presença de bactérias resistentes a antibióticos**. Disponível em:

<<https://revistapesquisa.fapesp.br/aumenta-nos-hospitais-brasileiros-a-presenca-de-bacterias-resistentes-a-antibioticos/>>. Acesso em: 30 dez. 2024.