

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

ANNA KAROLINE DE SOUSA LIMA

AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DE PEPTÍDEOS
GERADOS POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA FRAÇÃO
LECTINA DE GRÃOS DE SOJA (*Glycine max* L. Merrill)

JOÃO PESSOA – PB

2024

ANNA KAROLINE DE SOUSA LIMA

**AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DE PEPTÍDEOS
GERADOS POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA FRAÇÃO
LECTINA DE GRÃOS DE SOJA (*Glycine max* L. Merrill)**

JOÃO PESSOA – PB

2024

ANNA KAROLINE DE SOUSA LIMA

**AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DE PEPTÍDEOS
GERADOS POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA FRAÇÃO
LECTINA DE GRÃOS DE SOJA (*Glycine max* L. Merrill)**

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento dos pré-requisitos para obtenção do título em Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Almeida Gadelha

JOÃO PESSOA – PB

2024

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

L732a Lima, Anna Karoline de Sousa.

Avaliação da bioatividade de peptídeos gerados por hidrólise enzimática da fração lectina de grãos de soja (Glycine max L. Merrill) / Anna Karoline de Sousa Lima. - João Pessoa, 2024.

161 f. : il.

Orientação: Carlos Alberto de Almeida Gadelha.
Tese (Doutorado) - UFPB/CT.

1. Tecnologia de alimentos. 2. Hidrólise sequencial.
3. Peptídeos bioativos. 4. Anticâncer. I. Gadelha,
Carlos Alberto de Almeida. II. Título.

UFPB/BC

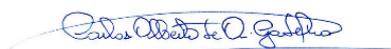
CDU 664(043)

ANNA KAROLINE DE SOUSA LIMA

**AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DE PEPTÍDEOS GERADOS POR
HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA FRAÇÃO LECTINA DE GRÃOS DE SOJA
(*Glycine max* L. Merrill)**

Tese APROVADA em 27/ JUNHO/ 2024.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Carlos Alberto Almeida Gadelha – PPGCTA/CT/UFPB
Presidente da Banca Examinadora

Documento assinado digitalmente
gov.br TALIANA KENIA ALENCAR BEZERRA
Data: 28/06/2024 13:48:41-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof^a. Dra. Taliana Kenia Alencar Bezerra – PPGCTA/CT/UFPB
Examinador Interno

Documento assinado digitalmente
gov.br FABIO ANDERSON PEREIRA DA SILVA
Data: 01/07/2024 12:12:42-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. Fábio Anderson Pereira da Silva – PPGCTA/CCHSA/UFPB
Examinador Interno

Documento assinado digitalmente
gov.br GLAUCIA VERÍSSIMO FAHEINA MARTINS
Data: 28/06/2024 14:05:19-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof^a. Dra. Glauca Veríssimo Faheina Martins – DBM/CCEN/UFPB
Examinador Externo

Documento assinado digitalmente
gov.br EMMANUEL SILVA MARINHO
Data: 28/06/2024 16:21:34-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. Emmanuel Silva Marinho – UECE
Examinador Externo

*A Deus
À minha família e em especial à minha
avó Severina Araújo de Sousa (in
memoriam) que foi meu maior exemplo
de fé e fonte de força durante essa
jornada.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus e Nossa Senhora por serem minha força para enfrentar todas as dificuldades que surgiram durante esta jornada.

Aos meus pais, Ana Ferreira e Antonio Roberto, por todo apoio durante toda a minha vida. Vocês sempre acreditaram em mim e me incentivaram a continuar na busca deste sonho. Amo vocês e, se cheguei até aqui, foi por vocês e para vocês.

À toda minha família, que sempre me ajudou, apoiou, torceu por cada conquista da minha vida e sempre esteve presente. Amo todos vocês.

À minha avó Severina, que sempre incentivou o estudo de todos os filhos e se orgulhava das conquistas de todos os netos. Obrigada por todo o amor e por acreditar tanto em mim. A senhora sempre estará viva no meu coração, e esta conquista é sua.

Ao meu orientador, Professor Dr. Carlos Alberto Gadelha, pela confiança, incentivo, ensinamentos partilhados e por toda parceria desenvolvida nesses últimos sete anos.

À professora Tatiane Santi, que abriu as portas do seu laboratório para que eu pudesse realizar os experimentos. Agradeço por toda sua ajuda, por compartilhar seu conhecimento e por estar sempre disponível para o que eu precisasse. Meu muito obrigada.

À minha banca examinadora, aos professores do PPGCTA, Dra. Taliana Kenia e Dr. Fábio Anderson, e aos membros externos, Prof. Dra. Glaucia Faheina e Dr. Emmanuel Marinho, agradeço pela disponibilidade e preciosas contribuições.

Aos amigos Pedro, Geovane, Eugenia, Ju, Mayara, Anne, Leticia, Cristina, Júlia e Kaique, que mesmo de longe sempre me ajudaram, incentivaram e me fizeram rir. Só tenho a agradecer.

À minha amiga Thaianaly, que compartilhou todos os perrengues desde o mestrado e se tornou uma amiga dentro e fora da universidade. Obrigada por todo apoio e por sua torcida durante todo esse tempo. Amo você, amiga!

À Bel, que se tornou mais que uma colega de laboratório, se tornou uma irmã na minha vida! Obrigada por acreditar em mim mesmo quando eu não acreditava. Você foi fundamental para este momento chegar, amiga! Obrigada por estar presente nos piores e melhores momentos desses últimos seis anos da minha vida. Amo você e não tenho como te agradecer pela amiga maravilhosa que você é.

A todas as pessoas maravilhosas que apareceram no meu caminho e colaboraram para a realização deste trabalho: Profa. Cristiani Grisi, Prof. Wagner, Renato, Alcides, Thalles e Profa. Maria Juliano.

A todos os componentes do ToxGen/UFPB: Professora Glaucia, Jeremias, Diogo, Thaís, Vitória e Amanda, por toda ajuda nos experimentos e por toda a força nesses últimos meses. Que Deus abençoe sempre vocês!

A todos os funcionários do Departamento de Biologia Molecular, por quem tenho profundo respeito e gratidão.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, a todos os professores que o constituem e à Fernanda, pela competência, dedicação e paciência.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa.

RESUMO

A bioatividade da lectina de soja é amplamente relatada na literatura, sendo essas bioatividades geralmente relacionadas a sequências específicas da molécula, chamadas de peptídeos bioativos, que apresentam melhor desempenho em comparação à proteína parental devido ao seu tamanho e características químicas. A principal forma de produzir esses peptídeos é pela hidrólise enzimática da proteína parental. Há uma lacuna no conhecimento sobre a potencialidade dos peptídeos obtidos por hidrólise enzimática da lectina de soja. Com isto, objetivou-se com essa pesquisa purificar, hidrolisar a lectina de soja, e avaliar as características físico-químicas e bioativas dos peptídeos gerados. A lectina foi purificada por precipitação (*salting out*), cromatografia de troca iônica e cromatografia de exclusão molecular. A fração de lectina obtida foi então hidrolisada com as enzimas alcalase, papaína e um processo sequencial alcalase-papaína. Os peptídeos gerados foram caracterizados por espectrometria de massas, FTIR, MEV, TGA e gel de eletroforese tris-tricina. A estabilidade dos peptídeos foi avaliada através de simulação de digestão *in vitro*, seguida de análises de fluorescência intrínseca, tamanho de partícula e potencial zeta. A potencialidade antioxidante dos peptídeos foi avaliada pelo percentual de captura *in vitro* dos radicais ABTS e DPPH, e a atividade antiproliferativa foi avaliada em células de adenocarcinoma de cólon humano. Análises *in silico* foram realizadas para predição de bioatividade e as ligações dos peptídeos com moléculas relacionadas a essas bioatividades foram avaliadas por docking molecular. A purificação resultou em uma lectina semi-purificada, com presença de banda de 31 kDa e bandas de menor peso molecular. A hidrólise produziu três hidrolisados: HA (alcalase), HP (papaína) e HAP (alcalase-papaína), onde foram gerados 393, 387 e 489 peptídeos nos experimentos, respectivamente, com tamanhos variando entre 6-2500 Da. Devido ao maior grau de hidrólise e menores peptídeos, além de mais predições de bioatividades, o peptídeo HAP foi selecionado para caracterização físico-química e de bioatividade. A análise de FTIR mostrou que o peptídeo HAP é majoritariamente composto por estruturas secundárias de do tipo folhas- β , e a análise TGA demonstrou termoestabilidade tanto da fração de lectina quanto do hidrolisado HAP. A microscopia eletrônica, revelou que os peptídeos tendem a formar grumos com superfície porosa, enquanto a fração de lectina apresenta uma estrutura mais plana e fina. Após a digestão, observou-se mudanças na estrutura terciária da proteína e a agregação dos hidrolisados foi confirmada pela análise de tamanho de partícula. A avaliação do potencial antioxidante do peptídeo HAP resultou em percentuais de captura de 49,34% e 68,69% para os radicais ABTS e DPPH, respectivamente. A atividade antiproliferativa mostrou que tanto a fração de lectina quanto o HAP reduziram a viabilidade celular da linhagem HT-29, com CI_{50} de 258,4 e 188,9 $\mu\text{g/mL}$ para a fração de lectina e hidrolisado, respectivamente. Para a linhagem LoVo, as CI_{50} foram 193,2 e 175,6 $\mu\text{g/mL}$, e o HAP induziu apoptose celular conforme demonstrado pela citometria de fluxo. As análises *in silico* previram as seguintes bioatividades para o HAP: antioxidante, inibição da ECA, inibição da DPP-IV, anti-inflamatória, antiangiogênica, inibição do quórum sensing e atividade anticâncer. Avaliou-se ainda a ligação de diferentes peptídeos com moléculas relacionadas a essas atividades para compreender o mecanismo de ação dos peptídeos.

Palavras-chave: hidrólise sequencial; peptídeos bioativos; *in silico*; anticâncer.

ABSTRACT

The bioactivity of soybean lectin is widely reported in the literature, with these bioactivities generally attributed to specific sequences within the molecule, known as bioactive peptides, which exhibit superior performance compared to the parent protein due to their size and chemical characteristics. The primary method for producing these peptides is through enzymatic hydrolysis of the parent protein. There is a gap in the knowledge regarding the potential of peptides obtained by enzymatic hydrolysis of soybean lectin. Therefore, this research aimed to purify and hydrolyze soybean lectin, and to evaluate the physicochemical and bioactive characteristics of the generated peptides. The lectin was purified by precipitation (salting out), ion exchange chromatography, and size exclusion chromatography. The resulting lectin fraction was then hydrolyzed using the enzymes alcalase, papain, and a sequential alcalase-papain process. The generated peptides were characterized by mass spectrometry, FTIR, SEM, TGA, and Tris-Tricine gel electrophoresis. The stability of the peptides was assessed through *in vitro* digestion simulation, followed by analyses of intrinsic fluorescence, particle size, and zeta potential. The antioxidant potential of the peptides was evaluated by the *in vitro* scavenging percentage of ABTS and DPPH radicals, and the antiproliferative activity was assessed in human colon adenocarcinoma cells. *In silico* analyses were conducted to predict bioactivity, and the binding of peptides to molecules related to these bioactivities was evaluated through molecular docking. The purification resulted in a semi-purified lectin with the presence of a 31 kDa band and lower molecular weight bands. Hydrolysis produced three hydrolysates: HA (alcalase), HP (papain), and HAP (alcalase-papain), generating 393, 387, and 489 peptides in the experiments, respectively, with sizes ranging from 6-2500 Da. Due to a higher degree of hydrolysis and smaller peptides, as well as more bioactivity predictions, the HAP peptide was selected for physicochemical and bioactivity characterization. FTIR analysis showed that the HAP peptide is predominantly composed of β -sheet secondary structures, and TGA analysis demonstrated thermostability in both the lectin fraction and the HAP hydrolysate. Microscopy revealed that the peptides tend to form clumps with a porous surface, while the lectin fraction exhibits a flatter and thinner structure. After digestion, changes in the tertiary structure of the protein were observed, and the aggregation of hydrolysates was confirmed by particle size analysis. The antioxidant potential evaluation of the HAP peptide showed scavenging percentages of 49,34% and 68,69% for ABTS and DPPH radicals, respectively. The antiproliferative activity showed that both the lectin fraction and HAP reduced the viability of the HT-29 cell line, with IC_{50} values of 258,4 and 188,9 $\mu\text{g/mL}$ for the lectin fraction and hydrolysate, respectively. For the LoVo cell line, the IC_{50} values were 193.2 and 175,6 $\mu\text{g/mL}$, and HAP induced cell apoptosis as demonstrated by flow cytometry. *In silico* analyses predicted the following bioactivities for HAP: antioxidant, ACE inhibition, DPP-IV inhibition, anti-inflammatory, anti-angiogenic, quorum sensing inhibition, and anticancer activity. The binding of different peptides to molecules related to these activities was also evaluated to understand the mechanism of action of the peptides.

Keywords: sequential hydrolysis; bioactive peptides; *in silico*; anticancer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Efeito da ingestão de proteínas vegetais em fatores de risco de doença cardiovascular e seu mecanismo. Onde: CT – colesterol total; LDL – lipoproteínas de baixa densidade; VLDL – lipoproteína de muito baixa densidade; TG – triglicerídeos	22
Figura 2	Classificação das proteínas vegetais e da proteína de soja	24
Figura 3	Benefícios relacionados ao consumo das proteínas e peptídeos presentes em grãos de soja	25
Figura 4	Estruturas de lectinas com diferentes exemplos de sítios de reconhecimento de carboidratos e outras funções	28
Figura 5	Representação da lectina de soja	29
Figura 6	Representação do processo de hidrólise enzimática para produção de peptídeos bioativos	34
Figura 7	Esquema simplificada para avaliação de proteínas e peptídeos bioativos através de bioinformática	38
Figura 8	Dois modelos de docking molecular. A) modelo chave-fechadura; B) modelo de acoplamento flexível	39
Figura 9	Esquema de representação da abordagem híbrida para avaliação de bioatividade de proteínas	41
Figura 10	Etapas de execução da pesquisa	42
Figura 11	Fluxograma do processo de obtenção da lectina de grãos de soja (<i>Glycine max</i> L.)	44
Figura 12	Fluxograma de etapas realizadas para obtenção dos hidrolisados proteicos de soja	46
Figura 13	Processo de simulação da digestão gastrointestinal <i>in vitro</i> da lectina e do hidrolisado	48

ARTIGO 1

Figura 1	A) Representação do tamanho do peptídeo com base nos resíduos de aminoácidos; B) Massa molecular obtida dos peptídeos analisados. HA- hidrolisado alcalase/ HP- hidrolisado papaína/ HAP – hidrolisado alcalase-papaína	80
Figura 2	A) Parâmetros químicos GRAVY, ponto isoeletrico e carga avaliados nos peptídeos HP- hidrolisado papaína/ HAP – hidrolisado alcalase-papaína; B) Diagrama de Venn criado a partir dos peptídeos da lectina de soja, obtidos pela hidrólise com alcalase, papaína e hidrólise consecutiva alcalase-papaína	81
Figura 3	Diagrama de árvore com as bioatividades preditas para os peptídeos em cada tratamento. A) Hidrolisado alcalase; B) Hidrolisado papaína; C) Hidrolisado alcalase-papaína	83
Figura 4	A) Resíduos de aminoácidos presentes nos peptídeos HAP e sua incidência; B) Diagrama de Venn das bioatividades mais recorrentes apresentadas pelo hidrolisado HAP	84
Figura 5	Estruturas química (A) e bioquímica (C) do peptídeo KFVVPKQPNMILQ; C) carga líquida do peptídeo em diferentes faixas de pH	88
Figura 6	Docking molecular do peptídeo KFVVPKQPNMILQ com as proteínas A) XIAP; B) Caspase-3; C) Caspase-7	90
Figura 7	A) Efeito do extrato de lectina e do hidrolisado de lectina sobre a viabilidade da linhagem tumoral HT-29 em 72h (n=3), B): Efeito do extrato de lectina e do hidrolisado de lectina sobre a viabilidade da linhagem tumoral LoVo em 72h (n=3), analisada pela técnica de MTT. Os dados representam à média de três experimentos em triplicata, sendo expressos como média ± erro padrão, e foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. ** p< 0,01, *** p< 0,001 em relação ao controle (células apenas com meio DMEM)	92
Figura 8	Imagens microscópicas das placas com células LoVo A) amostra controle – apenas células; B) células com isolado lectinico; e C) células com hidrolisado HAP	93
Figura 9	A) O gráfico de barras com a média de três experimentos em duplicata e expressos como média ± erro padrão; B) Imagens representativas do ensaio de indução de apoptose, quantificada por citometria de fluxo na linhagem humana LoVo (adenocarcinoma colorretal), após 24h de incubação com extrato de lectina na CI ₅₀ (200 µg/mL) e CI _{50/2} (100 µg/mL) ou o controle positivo 5-FU (100 µM), usando o método de marcação com anexinaV/iodeto de propídeo.	94

Quadrante inferior esquerdo: % células viáveis. Quadrante inferior direito: % células em apoptose precoce. Quadrante superior direito: % de células em apoptose tardia. Quadrante superior esquerdo: % células em necrose

- Figura 10** A) O gráfico de barras representa a média de três experimentos em duplicata e expressos como média \pm erro padrão; B) Imagens representativas do ensaio de indução de apoptose, quantificada por citometria de fluxo na linhagem humana LoVo (adenocarcinoma colorretal), após 24h de incubação, com hidrolisado de lectina com a CI_{50} (200 $\mu\text{g/mL}$) e $CI_{50/2}$ (100 $\mu\text{g/mL}$) ou o controle positivo 5-FU (100 μM), usando o método de marcação com anexinaV/iodeto de propídeo. Quadrante inferior esquerdo: % células viáveis. Quadrante inferior direito: % células em apoptose precoce. Quadrante superior direito: % de células em apoptose tardia. Quadrante superior esquerdo: % células em necrose 95

ARTIGO 2

- Figura 1** Processo de purificação da lectina de soja. A- Cromatograma troca iônica; B- cromatograma exclusão molecular; C- SDS-Page, onde a coluna A representa o marcador molecular e linha B a fração lectina; D – TRIS-Tricina onde a coluna A representa o marcador de baixo peso molecular e a linha B o hidrolisado da fração lectina. 116
- Figura 2** Espectros de absorção FTIR da fração lectina e do hidrolisado de lectina de soja (HLS). A) Espectro completo de 4000 a 400 cm^{-1} ; B) Região da amida I; C) Região da amida I do espectro de absorção deconvoluído da fração lectina; D) Região da amida I do espectro de absorção deconvoluído do hidrolisado (HLS) 118
- Figura 3** Curva termogravimétrica da A) fração lectina de soja e B) hidrolisado de lectina de soja. Curva da perda de massa com o aumento da temperatura 120
- Figura 4** Fotografias de MeV da A) fração lectina e B) SLH 122
- Figura 5** Espectro de fluorescência intrínseca da fração lectina, hidrolisado de lectina de soja, fração lectina pós digestão e hidrolisados de lectina pós digestão 124
- Figura 6** A) Curva de distribuição do tamanho de partículas; e B) Potencial zeta das amostras 126
- Figura 7** Comparação da atividade antioxidante da fração lectina, hidrolisado alcalase-papaina (SLH), fração lectina pós digestão (SLD) e hidrolisados pós digestão 127

(SHD), frente os radicais A) ABTS e B) DPPH. *Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey

- Figura 8** A) número de resíduos de aminoácidos dos peptídeos obtidos pela hidrólise sequencial da lectina de soja; B) distribuição da massa molecular dos peptídeos 129
- Figura 9** Estrutura química e bioquímica dos peptídeos que apresentaram maior atividade A) antioxidante; B) inibição da ECA e; C) inibição da DPP-IV 135
- Figura 10** Docking molecular dos peptídeos A) Peptídeo FSWNKFVP com a enzima MPO; B) Peptídeo SWDPPNPH com a enzima DPP-IV e; C) Peptídeo SFSWNKFVPK com a enzima ECA 136

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Propriedades funcionais de diferentes fontes proteicas e seu teor de proteína	23
Tabela 2	Classificação de lectinas de plantas	27
Tabela 3	Fontes alimentares de peptídeos bioativos	32
Tabela 4	Enzimas utilizadas para produção de peptídeos bioativos	34
Tabela 5	Lista com alguns repositórios (banco de dados) e servidores disponíveis que ajudam na análise <i>in silico</i> de proteínas e peptídeos bioativos	36

ARTIGO 1

Tabela S1	Características químicas dos peptídeos HA, HP e HAP.....	154
Tabela S2	Atividade anticâncer predita para os peptídeos obtidos pela hidrólise consecutiva HAP	161

ARTIGO 2

Tabela 1	Estrutura secundária da fração lectina e do hidrolisado de lectina de soja (HLS), obtidos através da segunda derivada e ajuste Gaussiano dos espectros da região amida I	119
Tabela 2	Sequências obtidas através da hidrólise sequencial com alcalase e papaína da fração lectina com score $\geq 0,8$ obtidos pelo PeptideRanker e análise das suas propriedades físico-químicas	130
Tabela 3	Cálculo dos valores de A e B dos peptídeos em relação as atividades de inibição da ECA, inibição da DPP-IV e atividade antioxidante	131
Tabela 4	Avaliação ADMET <i>in silico</i> dos peptídeos escolhidos	139
Tabela 5	Peptídeos liberados após a simulação da digestão gastrointestinal <i>in silico</i> .	140
Tabela 6	Parâmetros de Lipinski avaliados nos peptídeos pós-digestão simulada <i>in silico</i>	141

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1 PROTEÍNAS VEGETAIS	21
2.2 LECTINAS	26
2.3 PEPTÍDEOS BIOATIVOS	30
2.4 OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS A PARTIR DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS	33
2.5 AVALIAÇÃO <i>in silico</i> DA BIOATIVIDADE DE PROTEÍNAS E PEPTÍDEOS	35
3 MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1 OBTENÇÃO DA FARINHA DE SOJA (<i>Glycine max</i> Merrill)	43
3.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO PROTEICO	43
3.3 ISOLAMENTO DA FRAÇÃO LECTINA	44
3.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA <i>in vitro</i> DA FRAÇÃO LECTINA DA PROTEÍNA DE SOJA	45
3.5 AVALIAÇÃO DA DIGESTIBILIDADE <i>in vitro</i> DA FRAÇÃO LECTINA E DO HIDROLISADO DE SOJA	47
3.6 CARACTERIZAÇÃO PROTEICA E DOS PEPTÍDEOS APÓS HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	49
3.6.1 Identificação dos peptídeos	49
3.6.1.1 Espectrometria de massas	49
3.6.2 Sequenciamento dos peptídeos	49
3.6.2 Grau de hidrólise (GH)	50
3.6.3 Eletroforese SDS-PAGE / Tris-Tricina	50
3.6.4 Avaliação da fluorescência intrínseca	51
3.6.6 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier - FTIR	51
3.6.7 Tamanho de partícula e potencial zeta	51
3.6.8 Microscopia Eletrônica de Varredura – MeV	52
3.7 AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DOS PEPTÍDEOS	52
3.7.1 Atividade antioxidante	52
3.7.2 Atividade antiproliferativa	53
3.8 AVALIAÇÃO <i>in silico</i> PARA PREDIÇÃO DE BIOATIVIDADE DOS PEPTÍDEOS	55
3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	56
4 RESULTADOS	70
ARTIGO 1: Peptídeos de lectina de soja (<i>Glycine max</i> L. Merrill) como agentes anticâncer: Uma Análise <i>In silico</i> e <i>In Vitro</i>	71

ARTIGO 2: Produção de Peptídeos Bioativos a partir da hidrólise enzimática de Lectina de Soja: Análise Estrutural, digestibilidade e Predições <i>In Silico</i>.....	105
5. CONCLUSÕES GERAIS	153

1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* L. Merrill) se configura como uma das principais fontes de proteína vegetal e óleo para consumo humano e de animais, tendo sido domesticada a partir da soja selvagem na China há mais de 5000 anos. Em 2023, a produção no Brasil foi mais de 154 mil toneladas com uma área plantada de 44 mil hectares. É considerada uma das principais commodities agrícolas do mundo, onde o aumento da produção no Brasil está associado a avanços tecnológicos no setor agrícola (TOLOI et al., 2021; ZHANG et al., 2022; Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB, 2024).

Os grãos de soja têm um dos maiores teores de proteínas em peso seco entre as leguminosas, cerca de 40%, e por conter uma variedade de aminoácidos essenciais e componentes fisiológicos benéficos, tem sido considerada uma fonte de proteína substituta para as proteínas de origem animal. As globulinas 7S e 11S são as duas proteínas de armazenamento principais, representando de 60-80% da proteína total da semente. Outras proteínas também são encontradas em menores quantidades, como os inibidores de proteases de Kunitz e Bowman-Birk, albumina 2S e as lectinas que representam cerca de 10% da proteína total em sementes maduras (CABANOS; MATSUOKA; MARUYAMA, 2021; GUO et al., 2022; PAN et al., 2021; QIN; WANG; LUO, 2022).

A lectina de soja, uma glicoproteína tetramérica formada por 4 subunidades de 30 kDa, é conhecida como um “fator antinutricional” devido à sua resistência às enzimas digestivas do trato gastrointestinal. No entanto, esse termo é inadequado já que estes compostos desempenham diversas atividades biológicas que são positivas para a saúde humana (LIU et al., 2021; SÁ; MORENO; CARCIOFI, 2020a).

As lectinas começaram a ser estudadas como possíveis aplicações terapêuticas devido à especificidade e seletividade aos carboidratos presentes na superfície celular. A principal função é o reconhecimento de carboidratos e glicoconjugados em uma ampla variedade de espécies. Desempenham também, um importante papel na resposta imune e na localização de proteínas, além disso, as lectinas apresentam propriedades antivirais, antifúngicas, antidiabéticas, antibacterianas e anticancerígenas (BALA SUBRAMANIYAN; VEERAPPAN, 2024; JAIN et al., 2024; LIU et al., 2021).

A bioatividade da soja tem sido associada principalmente a presença de peptídeos bioativos, que são geralmente formados por uma cadeia de 2-20 aminoácidos pouco

reativos na estrutura nativa da proteína, mas que se tornam moléculas ativas quando liberados. Muitos peptídeos bioativos de soja já foram identificados como possuindo uma variedade de funções biológicas como, propriedade antioxidante, anti-hipertensiva, anticancerígena e inibição da enzima convertidora de angiotensina (ECA). Por terem tamanho menor, podem ser absorvidos pelo intestino, entrar na corrente sanguínea e causar efeitos fisiológicos ou sistêmicos no corpo humano. (CABANOS; MATSUOKA; MARUYAMA, 2021; YING et al., 2021).

A segurança, baixa toxicidade e alta biocompatibilidade tornam os peptídeos bioativos temas recorrentes de pesquisa para o uso como nutracêuticos ou alimentos funcionais, com o objetivo de trazer benefícios a saúde humana. Atualmente, existem mais de 400 medicamentos a base de peptídeos em desenvolvimento clínico global, sendo mais de 60 aprovados para uso clínico em países da Europa, no Japão e Estados Unidos (LEE et al., 2019; YING et al., 2021; ZHANG et al., 2024).

A obtenção de peptídeos bioativos inclui processos físicos, químicos e biológicos, sendo uma das principais formas usadas, o processo de hidrólise enzimática. O uso de enzimas proteolíticas é um método seguro e eficaz para melhorar as propriedades funcionais das proteínas, e se baseia na hidrólise proteolítica das ligações peptídicas com o consumo de uma molécula de água por ligação peptídica quebrada (ISLAM et al., 2022; MANZOOR; SINGH; GANI, 2022).

Um dos fatores determinantes para a eficiência da hidrólise é a seleção das enzimas a serem utilizadas, pois estas, apresentam especificidade quanto ao substrato, o que resulta no desenvolvimento de peptídeos com propriedades bioativas bem definidas (MANZOOR; SINGH; GANI, 2022a). O uso de enzimas como alcalase® (ZHANG et al., 2023), pepsina (XU et al., 2023), papaína (FARIAS et al., 2023), protamex® (ISLAM et al., 2022), flavourzyme® (DENT; CAMPANELLA; MALEKY, 2023), entre outras, foram relatadas na literatura para obtenção de peptídeos bioativos a partir da proteína de soja. Entretanto, pesquisas envolvendo a hidrólise enzimática da lectina de soja ainda são escassas.

A produção de peptídeos por hidrólise enzimática pode melhorar características funcionais, a partir da redução do peso molecular, desdobrando a estrutura, aumentando a flexibilidade, liberando peptídeos ativos, e melhorando as propriedades antioxidantes (WU et al., 2023).

Nesse contexto, proteínas e peptídeos biologicamente ativos derivados de alimentos têm sido incorporados as dietas como importantes ingredientes funcionais e nutracêuticos que promovem saúde, ajudando na prevenção de doenças devido sua bioatividade (ÖZTÜRK; ORAÇ, 2024).

Dessa forma, o objetivo da presente pesquisa foi obter peptídeos bioativos a partir da fração lectínica de grãos de soja (*Glycine max* L. Merrill), caracterizar o perfil peptídico, e o potencial bioativo desses peptídeos por meio de análises *in silico* e *in vitro*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PROTEÍNAS VEGETAIS

As proteínas são macronutrientes essenciais na dieta humana por serem componentes estruturais e funcionais que estão envolvidos na síntese de anticorpos, no equilíbrio de fluidos no corpo, e sua ingestão adequada permite que o corpo mantenha seus processos biológicos básicos em ambientes de mudança. Dessa forma, nos últimos anos, houve um aumento na popularidade de dietas ricas em proteínas, com a procura crescente por fontes de proteínas tanto de origem animal quanto vegetal (HERTZLER et al., 2020; SÁ; MORENO; CARCIOFI, 2020b).

A conscientização dos consumidores em relação à ingestão de proteínas de alta qualidade trouxe consigo uma nova preocupação em relação a sustentabilidade ambiental, levando pesquisadores a procurarem fontes de proteínas mais ecológicas e sustentáveis; assim, as proteínas vegetais têm sido cada vez mais utilizadas como uma opção de escolha, já que as proteínas de origem animal são mais dispendiosas, limitadas no fornecimento, e sua produção está relacionada ao esgotamento de água doce, às alterações climáticas e perda de biodiversidade (KUMAR et al., 2021).

Tendo em vista os benefícios de sustentabilidade das proteínas vegetais, tem havido destaque crescente dos benefícios da mudança para dietas mais ricas em proteínas de origem vegetal, que estão amplamente disponíveis e podem ser encontradas em cereais (trigo, milho, arroz), leguminosas (soja, lentilha, grão-de-bico), nozes (amendoim), bem como comercialmente na forma de farinhas de proteína, concentrados de proteína e isolados proteicos que apresentam conteúdo de proteína superior a 80% (GAO; RAO; CHEN, 2024; SALDANHA DO CARMO et al., 2023).

Tal mudança justifica-se, pois o consumo excessivo de carne vermelha está relacionado a um maior risco de desenvolvimento de diversas doenças, como o aumento nos níveis de colesterol e doenças cardiovasculares. Um estudo realizado com pacientes homens, não fumantes, com índice de massa corporal normal e níveis altos de colesterol, avaliou a substituição de 60% da proteína animal por proteína de soja por seis semanas. Após o período de avaliação, observou-se uma diminuição nos níveis de colesterol total

dos pacientes, triglicerídeos e no índice de massa corporal (IMC). A Figura 1, mostra o efeito da ingestão de proteínas vegetais sobre os fatores de risco para desenvolvimento de doenças cardiovasculares e seu possível mecanismo (SOUSA DE OLIVEIRA et al., 2020; ZHUBI-BAKIJA et al., 2021).

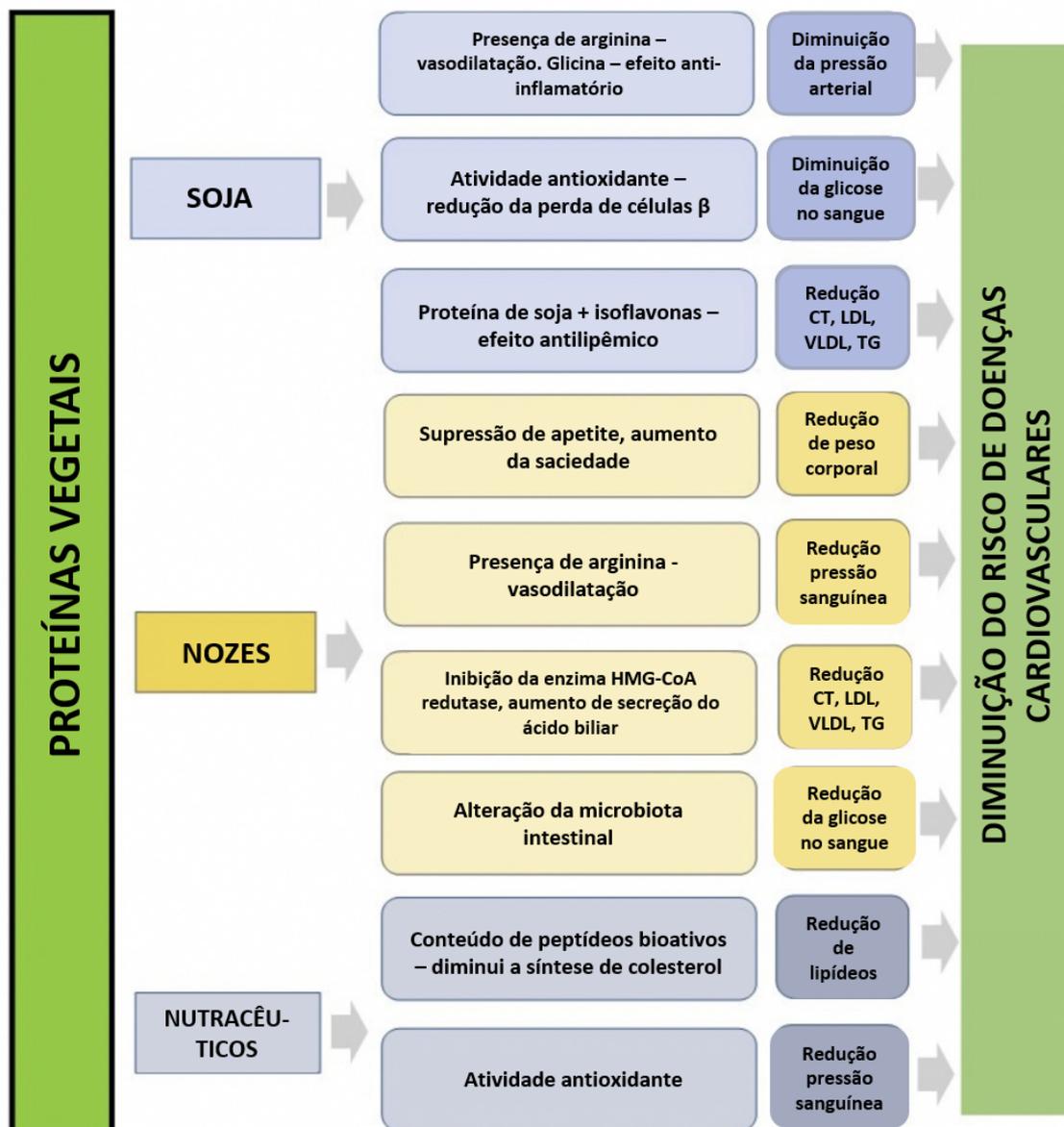


Figura 1 - Efeito da ingestão de proteínas vegetais em fatores de risco de doença cardiovascular e seu mecanismo. Onde: CT – colesterol total; LDL – lipoproteínas de baixa densidade; VLDL – lipoproteína de muito baixa densidade; TG – triglicerídeos.

Fonte: Adaptado de ZHUBI-BAKIJA et al., 2021.

Além do apelo nutricional, as proteínas são amplamente utilizadas na indústria de alimentos por sua funcionalidade em formulações de produtos. As proteínas vegetais têm igual importância funcional sendo utilizadas como ingredientes na produção de alimentos para conferir sabor, cor, textura e estrutura aos produtos alimentícios. A natureza anfipática das proteínas faz com que estas sejam amplamente utilizadas como emulsificantes, agentes espumantes, modificadores de textura e espessantes. Na Tabela 1, observa-se as propriedades funcionais desenvolvidas por diferentes fontes de proteínas vegetais (AKHARUME; ALUKO; ADEDEJI, 2021; MOOKERJEE; TANAKA, 2023a).

Tabela 1 - Propriedades funcionais de diferentes fontes proteicas e seu teor de proteína

Fonte da proteína	Teor de proteína (%)	Funções/Aplicações
Soja	40	Gelificação, formação de fibras, emulsificação, interação proteína-proteína
Ervilha	20-25	Formação de fibra, gelificação, emulsificação
Feijão de corda	40	Formação de gel, emulsificação, formação de espuma, espessante
Zeína (milho)	45-50	Solubilidade, formação de espuma, absorção de umidade
Feijão fava	29	Melhora a estabilidade física e oxidativa de emulsões água e óleo
Trigo	14	Elasticidade, extensibilidade, estrutura de fibra
Girassol	20-28	Alimentos e rações
Amendoim	38	Alimentos e rações, cobertura comestível
Sorgo	22	Alimentos e rações
Mostarda	24-35	Alimentos e rações
Cevada	12,5	Alimentos e rações

Fonte: Adaptado de SURYA ULHAS et al., 2023.

Entre as alternativas às proteínas animais, a proteína de soja (*Glycine max* L.) se destaca devido às suas propriedades gelificantes, capacidade de retenção de água,

absorção de gordura e capacidade emulsificante. Nos últimos anos, a soja tem sido considerada uma proteína completa por conter os aminoácidos essenciais necessários ao ser humano e por ter taxa de digestibilidade semelhante às proteínas do leite e do soro de leite, o que a torna uma proteína vegetal de alta qualidade (SURYA ULHAS et al., 2023; TAN; TAN; TAN, 2023).

A soja contém cerca de 35-40% de teor de proteína, podendo estas ser separadas através de centrifugação em quatro grandes frações: 2S, 7S, 11S e 15S (Figura 2). Na fração 2S estão contidas a maior parte das albuminas e proteínas de baixo peso molecular, como os inibidores de tripsina de Kunitz e de Bowman-Birk. A fração 7S (40% da proteína de soja) é composta pela β -conglucina, lipoxigenase e lectina. A globulina 11S ou glicinina corresponde a 30% da proteína de soja e é considerada sua principal proteína. A fração 15S é considerada um polímero, sendo o menor componente e representando 10% da proteína de soja (CHEN; HSIEH, 2019; SUI; ZHANG; JIANG, 2021). Desta forma, a soja se destaca por ser uma leguminosa com uma quantidade maior de proteínas do que outras leguminosas e com menores teores de carboidratos e gorduras.

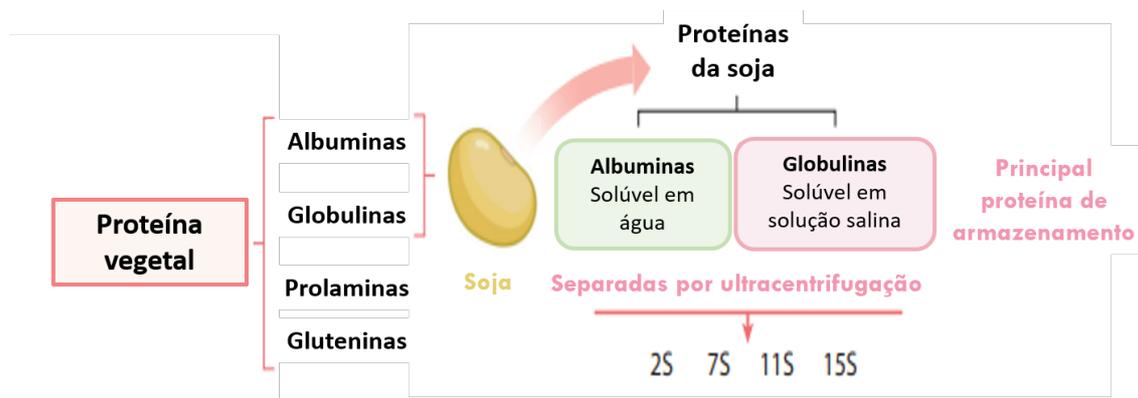


Figura 2 – Classificação das proteínas vegetais e da proteína de soja

Fonte: Adaptado de SUI; ZHANG; JIANG, 2021.

A soja (*Glycine max* L.) é uma das culturas agrícolas mais importantes da agricultura mundial, sendo o Brasil um dos maiores produtores e exportadores globais. Atualmente, o Brasil é o maior produtor, tendo em 2023 produzido 155,3 milhões de toneladas, e exportado entre janeiro e dezembro do mesmo ano 101,86 milhões de toneladas (GARBELINI et al., 2020; Conab, 2024).

Sua importância está relacionada principalmente aos elevados teores de óleo e proteína, sendo matéria-prima de inúmeros produtos na indústria alimentícia. Após a extração do óleo, há a formação de um subproduto denominado farelo de soja, que é

utilizado em diversas cadeias produtivas, como ração para aves, suínos e gado leiteiro e de corte, sendo este o principal produto derivado desta cultura (BALBINOT JUNIOR et al., 2024).

Os impactos do consumo da proteína de soja na saúde humana foram responsáveis pelo constante interesse no desenvolvimento de novas pesquisas científicas, onde observou-se a relação do consumo de proteínas de soja com uma diminuição da perda óssea causada pela osteoporose (GEORGE et al., 2020), atividade antiproliferativa de células de adenocarcinoma de cólon (REBOLLO – HERNANZ et al. 2023), efeito hipolipidêmico (LEE et al., 2021), efeito anti-hipertensivo (DALIRI et al., 2019), controle de diabetes tipo II (KONYA et al., 2019), entre outros. Esses benefícios à saúde estão relacionados a compostos bioativos presentes na soja como proteínas e peptídeos, isoflavonas, antocianinas, carboidratos e lipídeos (Figura 3) (KIM; YANG; KIM, 2021).

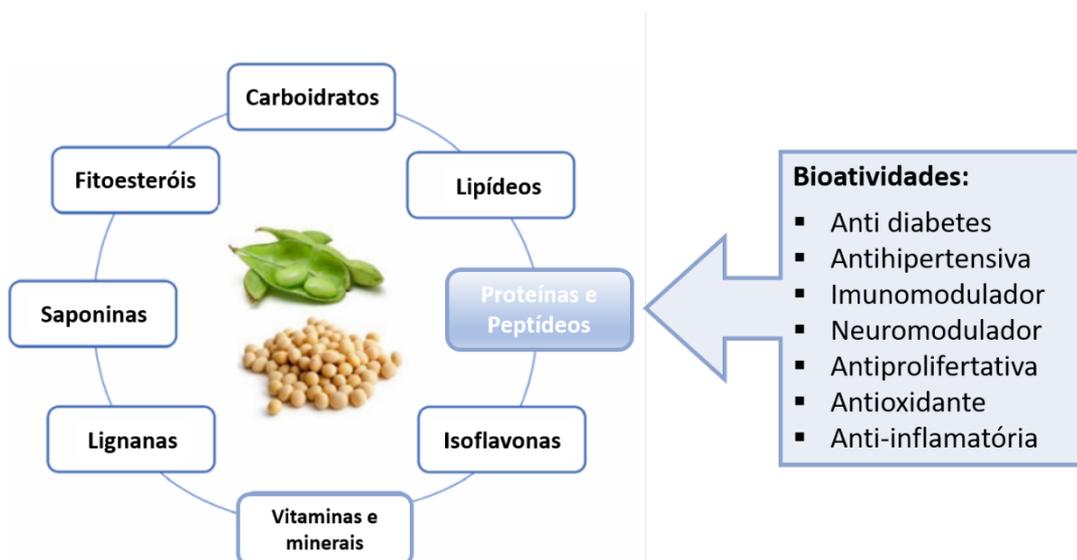


Figura 3 – Benefícios relacionados ao consumo das proteínas e peptídeos presentes em grãos de soja.

Fonte: Adaptado de KIM; YANG; KIM, 2021.

Desta forma, o estudo das proteínas de soja, desde sua estrutura molecular até suas potenciais aplicações, tem sido contínuo motivo de pesquisa, visando descobrir novas atividades e alcançar uma compreensão completa do mecanismo de ação dessas proteínas na execução da sua bioatividade (SUI; ZHANG; JIANG, 2021).

2.2 LECTINAS

O termo lectina é derivado do latim de “legere” que significa “selecionar”. Essas moléculas foram observadas pela primeira vez em 1888 pelo doutor Hermann Stillmark, ao descrever propriedades hemaglutinantes em extratos de mamona que estavam relacionadas a um fator proteico chamado de ricina. Na década seguinte, em 1907, os pesquisadores Landsteiner e Raunitschek relataram a presença de lectinas nas leguminosas *Phaseolus vulgaris* (feijão), *Pisum sativum* (ervilha), *Lens culinaris* (lentilha) e *Vicia sativa* (ervilhaca), posteriormente, muitas outras lectinas foram isoladas; e em 1919 Summer descreveu a purificação da Concanavalina A (ConA) das sementes de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) e relatou a capacidade dessa proteína de aglutinar células sanguíneas, observando-se que essa reação poderia ser inibida pela adição de uma solução de sacarose (TSANEVA; VAN DAMME, 2020).

Lectinas são descritas como um grupo heterogêneo de proteínas de origem não imune que se ligam de forma não covalente a carboidratos tais como manose, galactose, lactose, N-acetil glicosamina, N- acetil galactosamina, glicose e ramnose. A interação com estes carboidratos, é realizada por meio de um sítio de reconhecimento de carboidratos que se liga específica e reversivelmente a diferentes partes dos açúcares presentes na superfície celular, estruturas citoplasmáticas e na matriz extracelular (RUBEENA; PREETHAM, 2019; SINGH; WALIA; KENNEDY, 2019)

Lectinas já foram relatadas em várias formas de vida, incluindo plantas, animais, e microrganismos, como fungos, bactérias e protozoários. Em microrganismos e animais, desempenham papéis na defesa contra infecções, síntese de glicoproteínas e regulação do ciclo celular. Nas plantas, estas funcionam principalmente como proteínas de armazenamento e defesa contra patógenos e predadores (como insetos). A concentração de lectinas em plantas, varia de acordo com a parte da planta. Podendo chegar a 10% do teor de proteína total nas sementes maduras (LUCIUS, 2020).

A classificação destas lectinas em famílias é um desafio devido à sua diversidade. Apesar de várias classificações terem sido propostas, não existe uma classificação universalmente aceita para essas proteínas. Observa-se que elas podem ser subdivididas de acordo com sua especificidade de ligação a carboidratos, em doze famílias, que compreendem várias lectinas conhecidas e caracterizadas até hoje. A Tabela 2 apresenta

uma classificação de lectinas vegetais e seu carboidrato de ligação (CAGLIARI; KREMER; PINTO, 2018; FU et al., 2011).

Tabela 2 – Classificação de lectinas de plantas

Família	Lectina Representante	Abreviação	Açúcar específico de ligação
<i>Agaricius bisporus</i> agglutinin homologs	<i>Agaricius bisporus</i> agglutinin	ABA	Galactose
Homólogos de quitinase de classe V com atividade de lectina	Aglutinina relacionada à quitinase	CRA	N-glicanos com alto teor de manose
Família de Cianovirina	Cianovirina-N	CV-N	Manose
Família EEA	Aglutinina <i>euonymus europaeus</i>	EEA	Manose/galactose
Família GNA	Lectina de <i>Polygonatum cyrtonema</i>	PCL	Manose/ácido siálico
Proteínas com domínios heveínicos	Aglutinina de gérmen de trigo	WGA	N-acetil-D-glucosamina
Jacalinas	Jacalin	JAC	Manose
Proteínas com domínios de lectina de leguminosas	Concanavalin A	ConA	D-manose
Família Nictaba	Lectina de <i>Cucurbitaceae phloem</i>	CPL	
Família Ricina-B	Lectina de visco europeu	ML-I	Beta-galactose

Fonte: Adaptado de FU et al., 2011.

Outra classificação para as lectinas é de acordo com a natureza e organização dos sítios de reconhecimento de carboidratos (Figura 4). São classificadas em merolectinas (possuem um único sítio de reconhecimento), hololectinas (possuem pelo menos dois sítios de reconhecimento idênticos; a maioria das lectinas vegetais pertence a este grupo), quimerolectinas (possuem pelo menos um sítio de reconhecimento de carboidrato e um outro sítio independente que pode ter uma função diferente, como por exemplo, atividade enzimática) e superlectinas (dispõem de pelo menos dois sítios de ligação a carboidratos

que não são idênticos e apresentam especificidade para açúcares estruturalmente diferentes) (NAITHANI et al., 2021).

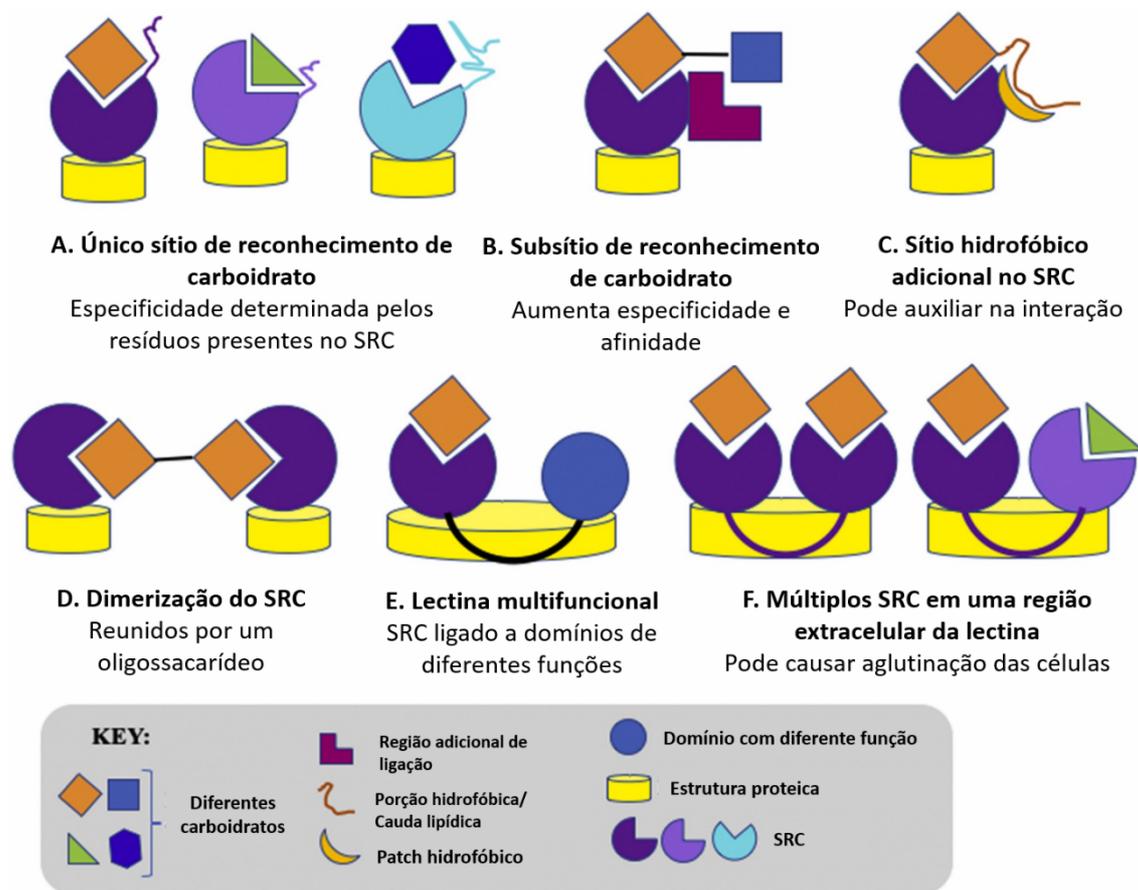


Figura 4 – Estruturas de lectinas com diferentes exemplos de sítios de reconhecimento de carboidratos e outras funções

Fonte: Adaptado de NAITHANI et al., 2021

Uma das lectinas vegetais mais bem caracterizadas é a lectina de soja, que foi purificada a partir de suas sementes em 1952 por Liener & Pallansch. Essa destaca-se por ter sido a primeira lectina que foi clonada em 1983 e, desde então, tem sido um objeto de estudo notável entre pesquisadores (TANG et al., 2024; VAN HOLLE; VAN DAMME, 2015).

A lectina de soja, uma glicoproteína, é composta por quatro subunidades idênticas de 30 kDa, unidas por ligações não covalentes, e possui dois sítios de ligação a carboidratos. Sua estrutura tridimensional consiste em duas folhas β de 12 fitas voltadas uma para outra. Essa disposição estrutural leva a formação de um canal central no tetrâmero, como pode ser observado na Figura 5 (HAN et al., 2023).

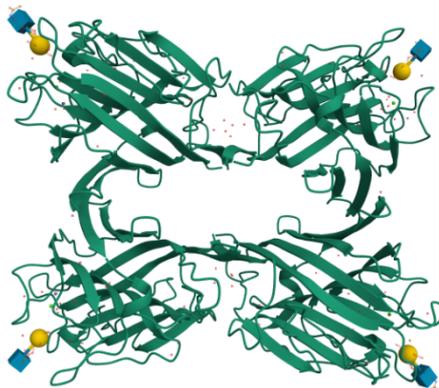


Figura 5 – Representação da lectina de soja

Fonte: Uniprot - P05046, 2024.

A capacidade das lectinas de aglutinar células vermelhas do sangue já é bem conhecida há vários anos. Entretanto, com base em seu mecanismo de ação, as lectinas vegetais podem exercer influência em diversos processos biológicos, tais como adesão celular, reconhecimento de células tumorais malignas, uso como ferramenta biotecnológica em estudos glicoproteômicos, proteção fitossanitária, atividade antifúngica e, ainda, reduzem a carga viral de pacientes contaminados com hepatite C (BHUTIA et al., 2019; LOSSIO et al., 2017; RIBEIRO; FERREIRA; FREITAS, 2018; WU et al., 2016).

As lectinas são um dos fitoquímicos que vêm sendo mais estudados por seu potencial no tratamento do câncer. Ao se aderirem à membrana das células cancerígenas, as lectinas causam citotoxicidade induzida por apoptose e aumentam o conteúdo de espécies reativas de oxigênio, desencadeando autofagia ou necrose celular. Há mais de 60 anos, Liener relatou a capacidade da lectina de soja em inibir o crescimento de tumores de Walker transplantado em ratos, a partir da ingestão de uma dose diária de 25 mg/Kg (LIENER; SETO, 1955). Em estudos *in vitro* e *in vivo* no modelo de camundongos portadores de linfoma de Dalton, Panda et al. (2014) observaram que a lectina de soja induziu apoptose, danos ao DNA e autofagia em células HeLa, através da geração de espécies reativas de oxigênio. A administração de uma dosagem da lectina de 1 e 2 mg/Kg (peso corporal do camundongo) por 10 dias resultou numa eficácia antiproliferativa de 74 e 82%, respectivamente, a partir da indução de autofagia e morte celular (GUPTA, 2020; PANDA et al., 2014).

Assim, a propriedade das lectinas de reconhecer outras moléculas de forma distinta as torna importantes em pesquisas, *in vitro/in vivo*, e em áreas diversas como a biologia molecular e celular, farmacologia, microbiologia e análises clínicas, sendo promissoras moléculas para uso como medicamentos para tratamento e diagnóstico de doenças humanas, além de se aplicar na área tecnológica, como, por exemplo, agentes inseticidas na agricultura (GAUTAM et al., 2020).

2.3 PEPTÍDEOS BIOATIVOS

A busca dos consumidores por compostos naturais com apelo de serem benéficos a saúde tem sido um tema de grande interesse nos últimos anos, com isto, proteínas e peptídeos tem ganhado especial atenção. Proteínas provenientes dos alimentos, proporcionam diversos benefícios à saúde devido seu impacto em vias metabólicas específicas, onde a maioria dessas atividades são devidas a peptídeos bioativos que estão inativos até que sejam liberados e ativados através de reações hidrolíticas que ocorrem no processamento e digestão gastrointestinal dos alimentos (BABINI et al., 2017; GIANFRANCESCHI et al., 2018; LAMMI et al., 2019).

Os peptídeos bioativos são definidos como sequências de 2 a 20 aminoácidos, derivados de proteínas alimentares que ao serem liberados podem exercer diferentes funções. Vários ensaios bioquímicos (*in vitro*), com modelos celulares, modelos animais (*in vivo*) e ensaios clínicos têm sido aplicados e otimizados com o objetivo de testar a bioatividade desses peptídeos (AMIGO; HERNÁNDEZ-LEDESMA, 2020; MAQSOULOU et al., 2019; MORA; ARISTOY; TOLDRÁ, 2018).

Estas moléculas geralmente estão na forma inativa na proteína precursora e podem ser obtidas a partir de dois mecanismos diferentes, a hidrólise enzimática e fermentação. O uso da hidrólise enzimática torna-se mais adequado em relação à fermentação microbiana por ser mais facilmente adaptado, tempo de reação menor e ser mais previsível (BHANDARI et al., 2020).

Para que esses peptídeos exerçam efeitos fisiológicos, é necessário que permaneçam intactos após o processo digestivo, e só então, atravessarem a membrana intestinal e sejam transportados pela corrente sanguínea até atingir seus locais-alvo e terem um efeito sistêmico (CIAN et al., 2019; MORA et al., 2019).

Alguns passos são necessários para que estes compostos bioativos sejam efetivamente absorvidos, e estes são: serem liberados da matriz alimentar, serem incorporados pelas micelas de sais biliares, serem absorvidos pelas células epiteliais e, por fim, precisam ser transportados pelos quilomícrons para serem secretados ao sistema linfático e entrarem na circulação sanguínea (INDRATI, 2022).

As sequências de aminoácidos das cadeias dos peptídeos são cruciais para entender os mecanismos moleculares envolvidos nas suas bioatividades. Numerosas sequências já foram identificadas dentro de uma ampla gama de proteínas alimentares, estando relacionadas a propriedades bioativas avaliadas *in vitro*. A partir disso, observou-se que peptídeos ativos tem propriedades estruturais semelhantes, como tamanho da cadeia de aminoácidos, presença de aminoácidos hidrofóbicos, e resistência a proteólise. Para que peptídeos desempenhem atividade antioxidante, é necessária a presença de aminoácidos como lisina, valina, tirosina, alanina, histidina, leucina, metionina, prolina, cisteína e triptofano, enquanto a presença de valina-alanina-prolina está relacionada a uma forte atividade de inibição da ECA (FADIMU et al., 2022a).

As características físico-químicas dos resíduos de aminoácidos, como hidrofobicidade, carga molecular e cadeia lateral, estão diretamente relacionadas à bioatividade dos peptídeos. Já existe na literatura relatos de propriedades anti-hipertensivas, antioxidantes, antidiabéticas, imunomoduladoras, antimicrobianas, entre outras. Algumas dessas atividades estão listadas na Tabela 3 (BABINI et al., 2017; FENG et al., 2019; FERNÁNDEZ-TOMÉ et al., 2019; NONGONIERMA; FITZGERALD, 2017).

Sensorialmente, peptídeos bioativos são caracterizados por um sabor amargo, implicando em uma baixa aceitabilidade dos consumidores que os ingerem em produtos funcionais ou terapêuticos. Esse amargor está geralmente relacionado com a hidrofobicidade desses peptídeos, e várias soluções têm sido desenvolvidas para reduzi-lo, como separação dos aminoácidos hidrofóbicos, extração com álcool, precipitação isoelétrica, ou ainda o uso de agentes mascaradores de sabor, como a menta (CRUZ-CASAS et al., 2021a; GÖRGÜÇ; GENÇDAĞ; YILMAZ, 2020).

A utilização de peptídeos bioativos como agentes terapêuticos e ingredientes alimentares têm atraído interesse devido à crescente preocupação com a toxicidade e alto custo das drogas sintéticas. Peptídeos bioativos surgem então como uma alternativa segura e econômica com poucos efeitos adversos. Entretanto, ainda existem obstáculos para o avanço da indústria de peptídeos, como a falta de dados confiáveis *in vivo* que

apoiem as alegações de segurança e saúde (CHALAMAIAH et al., 2019a; XU; WANG; LI, 2019).

Tabela 3 – Fontes alimentares de peptídeos bioativos

Alimento fonte da proteína	Benefício relacionado a saúde	Enzima utilizada na hidrólise
Proteína da semente de chia	Inibição de ECA de hidrolisados e frações peptídicas	Alcalase/Flavourzyme
Sementes de feijão alado	Inibição de ECA de hidrolisados	Flavourzyme/Bromelina/Alcalase e Papaína
Proteína do soro de leite	Atividade antioxidante dos hidrolisados	Pepsina/Tripsina/Alcalase e Flavourzyme
Concentrado proteico de lentilhas	Inibição de ECA de hidrolisados	Alcalase/Protamex
Colágeno de galinhas	Antioxidante e Inibição de ECA de hidrolisados	Flavourzyme/Neutrase e Alcalase
Proteína de batata	Proteção cardíaca <i>in vivo</i> de hidrolisados	Alcalase
Proteína de tilápia	Capacidade de ligação de cálcio de peptídeos	Alcalase/Flavourzyme/Protease e Papaína

Fonte: Adaptado de CHEW; TOH; ISMAIL, 2018.

A descoberta de diversos peptídeos bioativos derivados de proteínas vegetais, leva a necessidade de mais pesquisas visando aprofundar os conhecimentos em relação ao isolamento, caracterização e definição dos mecanismos de ação desses compostos. Isso vai permitir uma melhor atividade, estabilidade e facilidade de aplicação dessas moléculas em produtos (YANG et al., 2021).

2.4 OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS A PARTIR DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS

O interesse em proteínas alimentares para além de sua função nutricional vem aumentando recentemente devido à descoberta de características tecno-funcionais e múltiplas atividades biológicas que podem contribuir na prevenção ou tratamento de doenças. A maioria dessas proteínas de fontes alimentares possui peptídeos bioativos que estão inativos na sequência da proteína, mas que podem ser liberados através de hidrólise (RIVAS-VELA et al., 2021).

Os hidrolisados proteicos são uma mistura complexa de peptídeos, oligopeptídeos e aminoácidos livres que são obtidos após a hidrólise das ligações peptídicas das proteínas. Esses hidrolisados contêm peptídeos bioativos que são pequenos fragmentos de proteínas e várias técnicas têm sido aplicadas para obtenção deles, como hidrólise por microrganismos proteolíticos, hidrólise por enzimas digestivas, hidrólise através de ácidos e bases ou hidrólise por enzimas proteolíticas de origem vegetal ou microbiana (KUMAR et al., 2022).

O método de hidrólise enzimática por enzimas comerciais derivadas de plantas, animais ou microrganismos é o mais utilizado por apresentar benefícios como a utilização de condições amenas de temperatura e pH, a seletividade da enzima comercial em comparação com a hidrólise química, a ausência de produtos secundários que podem ser gerados durante a fermentação microbiana. (MORA; TOLDRÁ, 2023).

Para que o processo enzimático ocorra, é necessário que a enzima primeiro se ligue ao substrato e depois continue a catálise enzimática. As enzimas possuem sítios ativos específicos que se ligam temporariamente ao substrato, formando o complexo enzima-substrato. Essas ligações podem ser feitas através de pontes de hidrogênio, ligações hidrofóbicas ou interações de Van der Waals. Quando este complexo enzima-substrato atinge uma conformação específica, ocorre a hidrólise da proteína, como observado na Figura 6 (CRUZ-CASAS et al., 2021).

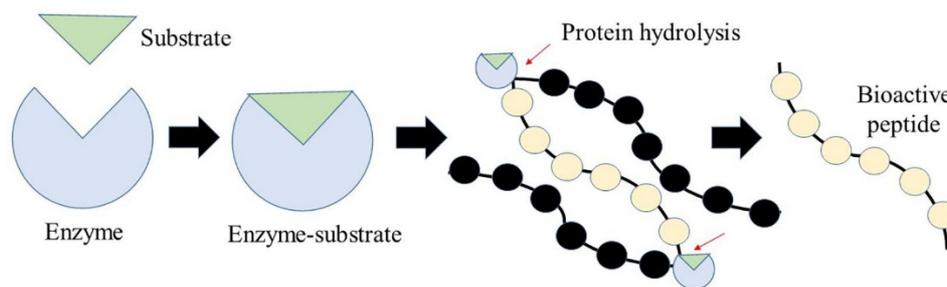


Figura 6 – Representação do processo de hidrólise enzimática para produção de peptídeos bioativos.

Fonte: Adaptado de (CRUZ-CASAS et al., 2021b)

A composição final dos hidrolisados obtidos por hidrólise enzimática varia de acordo com fatores como a matriz alimentar da qual os peptídeos serão liberados, a especificidade das enzimas utilizadas, das condições de tempo e temperatura e da relação enzima/substrato. Esses parâmetros influenciam diretamente no peso molecular, composição de aminoácidos, sequência dos peptídeos obtidos e, conseqüentemente, suas atividades biológicas. Enzimas proteolíticas como alcalase, pepsina, tripsina, papaína, quimiotripsina e flavourzyme são reconhecidamente seguras para uso. A Tabela 4 apresenta exemplos de proteases utilizadas na hidrólise de diferentes fontes proteicas para produzir peptídeos bioativos (NASRI, 2017; ZHANG; ROMERO, 2020).

Tabela 4 – Enzimas utilizadas para produção de peptídeos bioativos

Bioatividade	Fonte proteica	Enzima utilizada
Antioxidante	Soja	Flavourzyme
	Amendoin	Alcalase
	Farinha de milho	Alcalase
Antimicrobiana	Arroz	Validase, Alcalase e Neutrase
	Caseína	Termolisina
Anticancerígena	Soro de leite de cabra	Alcalase
	Carne	Alcalase, Termolisina, Proteínase A e K
Anti-inflamatória	Farelo de arroz	Alcalase
Hipoalergênica	Soro de leite de vaca	Alcalase
	Soja	Proleather FG-F

Fonte: Adaptado de DOS SANTOS AGUILAR; SATO, 2018.

Uma das abordagens que tem sido utilizada para melhorar a hidrólise enzimática é a combinação de diferentes enzimas, o que resulta na formação de fragmentos menores e mais suscetíveis a serem bioativos. Nesse tipo de protocolo, as enzimas podem ser adicionadas simultaneamente ou sequencialmente, dependendo das condições de temperatura e pH de cada enzima (MORA; TOLDRÁ, 2023).

O grau de hidrólise, que é a razão entre o número de ligações peptídicas quebradas e o total de ligações peptídicas, indica a extensão das alterações causadas nos hidrolisados. Graus de hidrólise baixos a moderados (10-15%) levam à exposição de aminoácidos hidrofóbicos, aumentando propriedades anfifílicas das proteínas. As informações disponíveis na literatura sugerem que altos graus de hidrólise estão relacionados à liberação de peptídeos de baixo peso molecular constituídos por aminoácidos hidrofóbicos, levando à agregação das proteínas e consequente precipitação (FADIMU et al., 2022; MOOKERJEE; TANAKA, 2023).

Dessa forma, a modificação das proteínas pela hidrólise enzimática pode conferir melhores propriedades funcionais (solubilidade, gelificação, emulsificação e formação de espuma), nutritivas e sensoriais. Isso aumenta seu valor como uma fonte alternativa de ingredientes funcionais na indústria alimentícia. A produção de peptídeos bioativos constitui uma área em franco desenvolvimento, e com grande frequência novos peptídeos e suas funções vêm sendo discutidas na literatura (CHALAMAIAH et al., 2019).

2.5 AVALIAÇÃO *in silico* DA BIOATIVIDADE DE PROTEÍNAS E PEPTÍDEOS

A avaliação da atividade de proteínas a partir de métodos tradicionais é amplamente aceita como padrão, pois ilustra tanto sistemas *in vitro* como *in vivo*. Entretanto, as análises laboratoriais são custosas e demandam tempo e esforço devido às complexas interações das moléculas. Dessa forma, têm surgido métodos alternativos ou complementares a essas técnicas que ajudam a preencher lacunas e fornecem base para análises posteriores (MACALINO et al., 2018).

Com o avanço da bioinformática e a disponibilidade de muitos bancos de dados, as abordagens *in silico* estão sendo amplamente utilizadas para investigar as características bioativas de proteínas e peptídeos, como também para produção de novos peptídeos a partir de proteínas alimentares. A avaliação *in silico* também reduz o tempo

de trabalho laboratorial e ajuda na identificação de características negativas que podem surgir durante a produção desses peptídeos, como a presença de alergênicos, surgimento de sabor amargo, entre outros (AGYEI; BAMBARANDAGE; UDENIGWE, 2018; LANGYAN et al., 2021).

Diversos bancos de dados estão descritos na literatura (Tabela 5), os quais fornecem informações como sequências de proteínas e peptídeos, predições de bioatividade, previsões de alergenicidade e toxicidade, simulações de hidrólise a partir de enzimas específicas, características físico-químicas e sensoriais de proteínas e peptídeos etc. Cada banco de dados possui seu sistema próprio para obter esses dados e precisa ser atualizado constantemente (CHEN et al., 2022).

Tabela 5 - Alguns repositórios (banco de dados) e servidores disponíveis que ajudam na análise *in silico* de proteínas e peptídeos bioativos

Banco de dados	Descrição	Endereço eletrônico
BIOPEP	Sequência de proteínas e peptídeos, predição de alergenicidade e simulação de hidrólise	https://biochemia.uwm.edu.pl/en/biopep-uwm-2/
UniProtKB	Sequência de diferentes proteínas	https://www.uniprot.org
NCBI Protein database	Sequência de diferentes proteínas	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/
MBPDB	Sequência de peptídeos bioativos derivados de proteínas de leite de qualquer espécie	https://mbpdb.nws.oregonstate.edu
PeptideRanker	Predição de bioatividade de peptídeos	http://distilldeep.ucd.ie/PeptideRanker/
PeptideCutter	Predição de possíveis sítios de ação de enzimas para uma determinada sequência	https://web.expasy.org/peptide_cutter/
PepCalc	Predição de propriedades físico-químicas de peptídeos	http://pepcalc.com
PepDraw	Predição de propriedades físico-químicas de peptídeos	http://www.tulane.edu/~biochem/WW/PepDraw/

ToxinPred	Predição de peptídeos tóxicos ou presença de regiões tóxicas	http://crdd.osdd.net/raghava/toxinpred/
AlgPred	Predição da alergenicidade de proteínas	https://webs.iiitd.edu.in/raghava/algpred/submission
Allergen FP v.1.0	Predição da alergenicidade de proteínas	https://ddg-pharmfac.net/AllergenFP/index

Apesar dos benefícios do uso do método *in silico* para avaliar a bioatividade de peptídeos, alguns cuidados precisam ser levados em consideração ao analisar os resultados. As atualizações das bases de dados com novas informações sobre peptídeos podem resultar em diferenças nos resultados obtidos em diferentes períodos. Um outro fator é a variação nos resultados obtidos *in silico* daqueles obtidos *in vitro/in vivo*. A simulação da hidrólise enzimática em softwares muitas vezes é baseada na especificidade da enzima pelos sítios de ligação da proteína nativa, não levando em consideração fatores como pH, temperatura, tempo de hidrólise, proporção enzima:substrato, bem como outras características da enzima (IWANIAK et al., 2019).

Várias metodologias têm sido utilizadas para avaliar *in silico* a atividade biológica de proteínas e peptídeos provenientes de alimentos. Com o uso dessas ferramentas é possível prever suas atividades biológicas, estudar o mecanismo de ação desses bioativos e estabelecer a relação entre a estrutura e a sua atividade biológica. A Figura 7 ilustra de forma simplificada as etapas possíveis de métodos de estudo de proteínas via bioinformática (MANZOOR; SINGH; GANI, 2022).

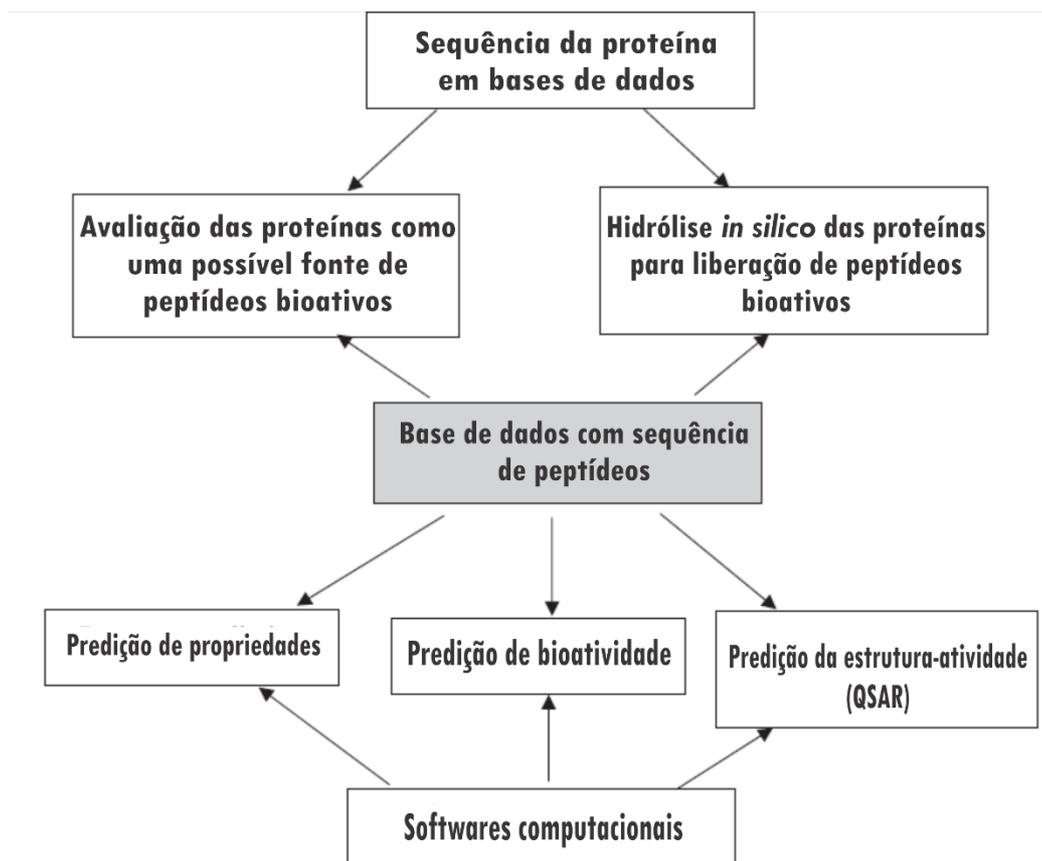


Figura 7 - Esquema simplificado para avaliação de proteínas e peptídeos bioativos através de bioinformática.

Fonte: Adaptado de IWANIAK et al., 2019.

A predição da bioatividade dos peptídeos *in silico* pode ser através de ferramentas online como o PeptideRanker ou pela Relação Quantitativa Estrutura/Atividade (QSAR). Estudos da QSAR vêm sendo realizados para identificar as estruturas dos peptídeos responsáveis pelas atividades biológicas. Essa predição depende da estrutura das moléculas e dos átomos presentes no composto, e a partir de funções matemáticas, a atividade biológica é entendida em termos de valores numéricos. Isso permite avaliar a biodisponibilidade, concentração inibitória, ou mesmo presença ou ausência de uma condição (PEREDO-LOVILLO et al., 2022; PETER et al., 2019).

Uma outra estratégia é o docking molecular, que é baseado na estrutura tridimensional das moléculas. Esse método permite prever a interação entre ligantes e receptores, bem como a orientação ideal de ligação para a formação de um complexo estável. No geral, envolve dois passos: prever a conformação, posição e orientação do ligante dentro de locais específicos ou sítios; e, em seguida, avaliar a afinidade dessa ligação. Esse método é útil para realizar uma triagem virtual, classificando os resultados

em conjuntos de compostos e identificando moléculas que apresentem uma alta afinidade de ligação em relação aos compostos avaliados (CRAMPON et al., 2022; LIU; CHENG; WU, 2019). A partir da estrutura 3D das duas moléculas, o ligante e o alvo, pode-se prever a orientação preferida do ligante em relação ao alvo quando estes estão unidos formando um complexo estável. O primeiro modelo de ligação proposto foi o chave-fechadura, que enfatizava a importância da geometria complementar entre as duas moléculas. Esse modelo estabelecia o acoplamento rígido entre o receptor e o ligante na orientação correta para a “chave” abrir a “fechadura”. No entanto, o processo de acoplamento real é flexível, e receptores e ligantes necessitam mudar sua conformação para se ajustarem bem, e dessa forma, foi desenvolvido o modelo de ajuste induzido (Figura 8) (FAN; FU; ZHANG, 2019).

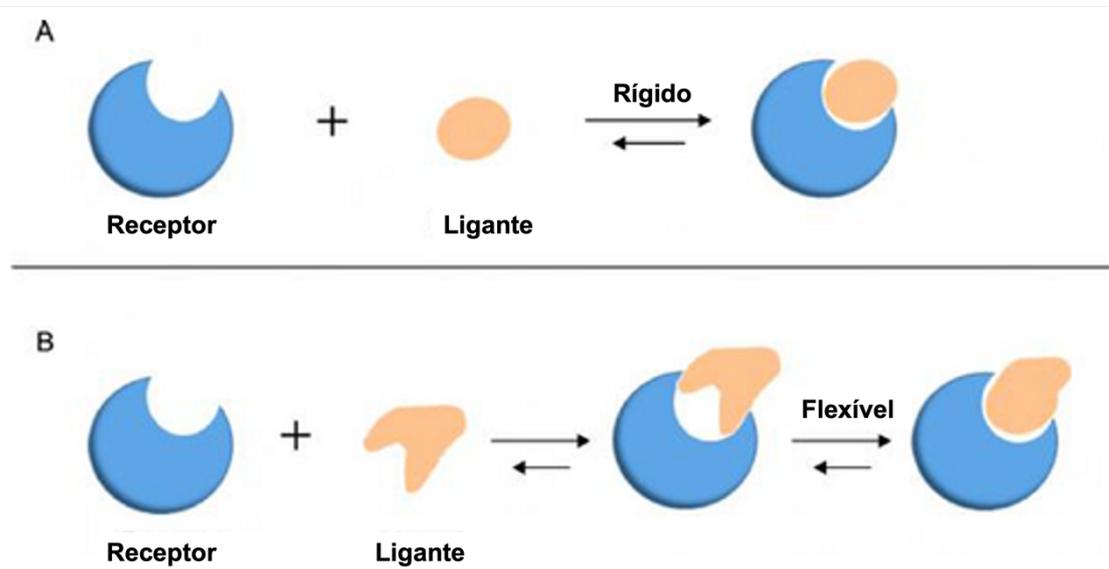


Figura 8 – Dois modelos de docking molecular. A) modelo chave-fechadura; B) modelo de acoplamento flexível.

Fonte: Adaptado de FAN; FU; ZHANG, 2019.

Ao avaliar a ligação entre as moléculas por meio do docking, são obtidas diferentes posições onde o ligante pode se unir ao receptor e pontuações para estas posições. A pontuação mais baixa, ou mais negativa, sugere que a interação entre a proteína e o ligante é mais forte. Assim, dois tipos de análises são realizados no docking: a avaliação dos escores de docking, para prever qual ligante tem maior probabilidade de se ligar favoravelmente à proteína; e a análise da posição de ligação, para determinar quais são as interações mais importantes na ligação entre a proteína e o ligante (MORRIS; CORTE, 2021).

O aumento no número de estruturas tridimensionais de proteínas, ligantes e complexos proteicos disponíveis, tem estimulado o estudo da dinâmica dessas proteínas em um nível atômico, tudo isto foi possibilitado com o advento da simulação da dinâmica molecular (LAZIM; SUH; CHOI, 2020).

A simulação da dinâmica molecular é um método de simulação computacional que avalia os átomos no tempo e espaço através de um campo de força, permitindo compreender as modificações dinâmicas durante o movimento de um único átomo. Essa tecnologia permite a simulação de diversas condições experimentais, como mudanças no pH, temperatura e solvente. Atualmente, a simulação da dinâmica molecular tem sido aplicada em pesquisas sobre a interação de proteínas alimentares, como também em pesquisas de sistemas alimentares mais complexos com diversas interações (BAI et al., 2023; HU et al., 2023).

O uso dessa técnica permite observar as interações proteicas, através de suas propriedades termodinâmicas, mecânicas e modelos de interação das proteínas sob condições extremas que seriam difíceis de se obter em laboratório. Nos últimos anos, essa ciência vem sendo amplamente utilizada nos campos da física, química, ciências dos materiais, biomedicina e na ciência dos alimentos (HU et al., 2023; ZHU et al., 2024).

Os programas de docking e dinâmica molecular são ferramentas bem utilizadas e amplamente aplicáveis, eles são frequentemente utilizados para descoberta de novas drogas e facilitados por seu baixo custo computacional. Os programas de dinâmica molecular exigem mais recursos computacionais, entretanto, eles permitem estudar a natureza dinâmica das proteínas, contribuindo nas pesquisas de dobramentos de proteínas, design de medicamentos e engenharia de proteínas (MORRIS; CORTE, 2021)

Os estudos têm utilizado as abordagens clássicas e *in silico* de forma combinada, o que é denominado abordagem integrada (Figura 9). Essa abordagem combina a bioinformática com a validação experimental a partir do uso de peptídeos obtidos através de experimentos laboratoriais. Os benefícios de cada abordagem são combinados, e isso pode ser adequado para melhorar a descoberta de novos peptídeos e sua aplicação em alimentos funcionais ou em produtos voltados à melhora da saúde do consumidor, ou para adicionar novas bioatividades a peptídeos que já possuem uma sequência conhecida (AGYEI; BAMBARANDAGE; UDENIGWE, 2018; UDENIGWE, 2014).

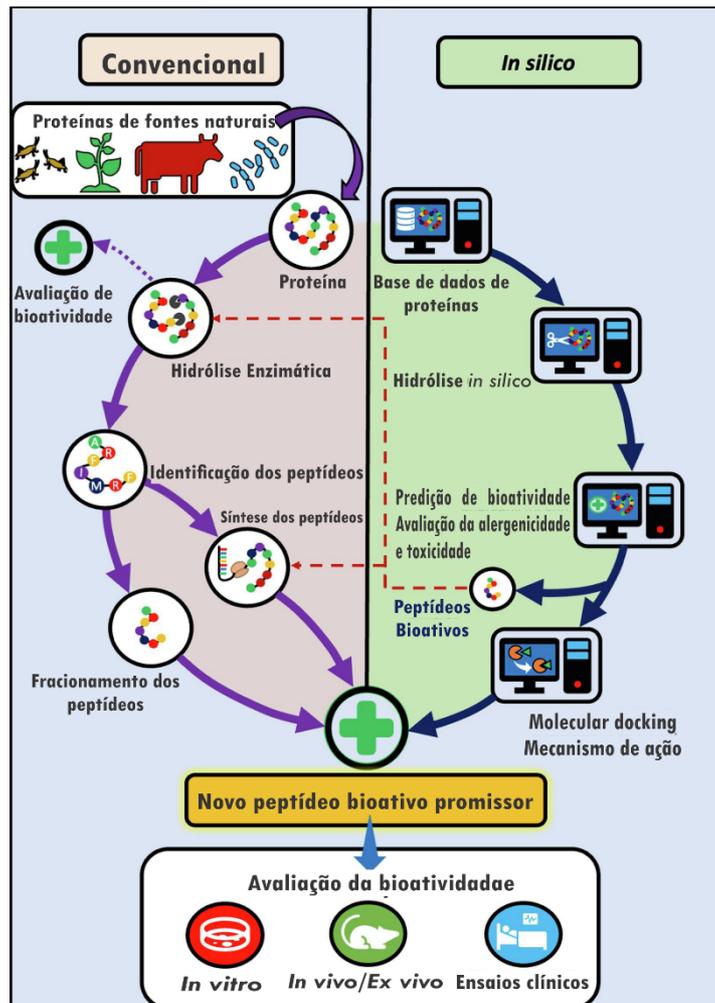


Figura 9 - Esquema de representação da abordagem híbrida para avaliação de bioatividade de proteínas

Fonte: Adaptado de PEREDO-LOVILLO et al., 2022.

Desta forma, a bioinformática tem se tornado uma útil ferramenta que ajuda na rápida descoberta de novos peptídeos bioativos e ajuda a explicar a relação entre sua estrutura e a bioatividade desempenhada pela sequência de aminoácidos. Essas informações podem servir como base para estudos *in vitro* e *in vivo*, fortalecendo o uso da informática na pesquisa de bioativos derivados de proteínas alimentares.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Proteômica Estrutural (LAPROTE) juntamente com o Laboratório Química de Proteínas e Peptídeos (LQPP), localizados no Departamento de Biologia Molecular (DBM) da Universidade Federal da Paraíba, e demais laboratórios com os quais exercem parcerias; e a execução foi realizada conforme as etapas a seguir: 1ª etapa – Purificação da lectina: obtenção da farinha de soja, extração e precipitação das proteínas por *salting out*, cromatografia de troca iônica e de exclusão molecular; 2ª etapa – Estudo da hidrólise enzimática: avaliação da atividade de 2 enzimas diferentes em relação à lectina purificada, simulação da digestão gastrointestinal *in vitro*, perfil dos peptídeos a partir de eletroforese (SDS-Page) e espectrometria de massas; 3ª etapa – Avaliação da bioatividade da lectina e dos hidrolisados: atividade antioxidante frente aos radicais ABTS e DPPH, atividade antiproliferativa e análises *in silico*. Tais etapas estão simplificadas na Figura 10.

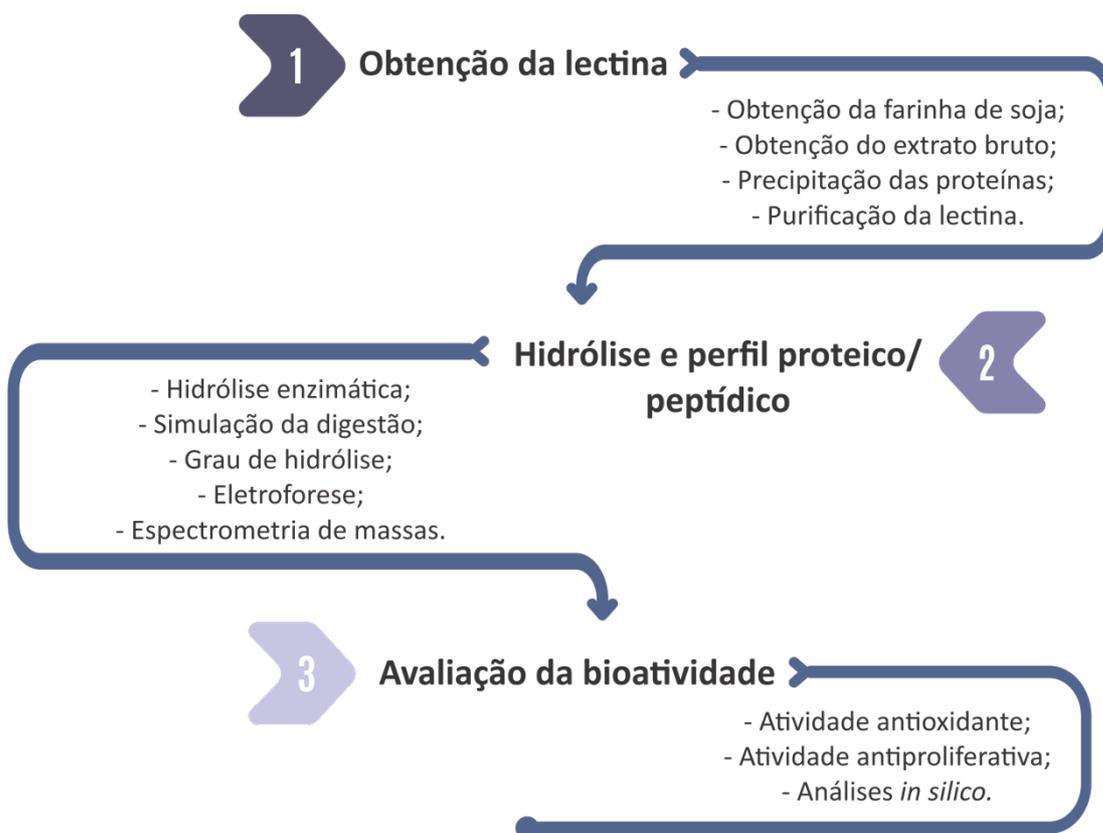


Figura 10 – Etapas de execução da pesquisa

Fonte: Autoria própria (2024)

3.1 OBTENÇÃO DA FARINHA DE SOJA (*Glycine max* Merrill)

As sementes de soja foram adquiridas em comércio local no município de João Pessoa – Paraíba – Brasil. Os grãos, selecionados manualmente quanto a integridade, foram moídos em moinho elétrico de café doméstico (Moulinex®) para obtenção de uma farinha, que foi peneirada utilizando uma malha de aço inox com abertura de 80 mesh até obtenção de um pó fino. Para retirada dos lipídeos, o pó fino foi suspenso em hexano na proporção de 1:4 (p/v) e agitado, com auxílio de agitador magnético, por 60 min a 150 rpm. Em seguida, a dispersão foi centrifugada a 2000 x g/ 10 min e o sobrenadante contendo os lipídeos removido. Esse processo foi repetido duas vezes e o precipitado obtido foi deixado em bandeja de plástico *overnight* para evaporação do hexano (VERFAILLIE et al., 2023).

3.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO PROTEICO

A obtenção do extrato foi realizada de acordo com metodologia de Franco-Fraguas et al., 2003. A farinha delipidada foi suspensa em uma solução de NaCl 0,15M, na proporção de 1:4 (p/v), mantida sob agitação por 2h, e centrifugada a 4900 x g/ 40 min/ 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado, saturado a 40%, utilizando sulfato de amônio, e deixado em repouso 4h/ 4 °C. A mistura foi centrifugada novamente nas mesmas condições anteriores, o sobrenadante resultante, coletado e saturado com sulfato de amônio a 80, foi deixado em repouso por mais 4h/ 4 °C e novamente centrifugado (4900 x g/ 40 min/ 4 °C). O precipitado foi coletado, diluído em NaCl 0,15M, e em seguida dialisado repetidamente contra água, em uma membrana de diálise de 8-14 kDa, sendo realizadas 10 trocas em intervalos de 1 hora à temperatura ambiente. Após dialisado, o extrato foi liofilizado e o pó obtido armazenado a temperatura ambiente para realização das próximas etapas.

3.3 ISOLAMENTO DA FRAÇÃO LECTINA

A lectina presente nos grãos de soja foi isolada de acordo com metodologia descrita por Roy et al., 2018. O processo de isolamento está ilustrado na Figura 11.

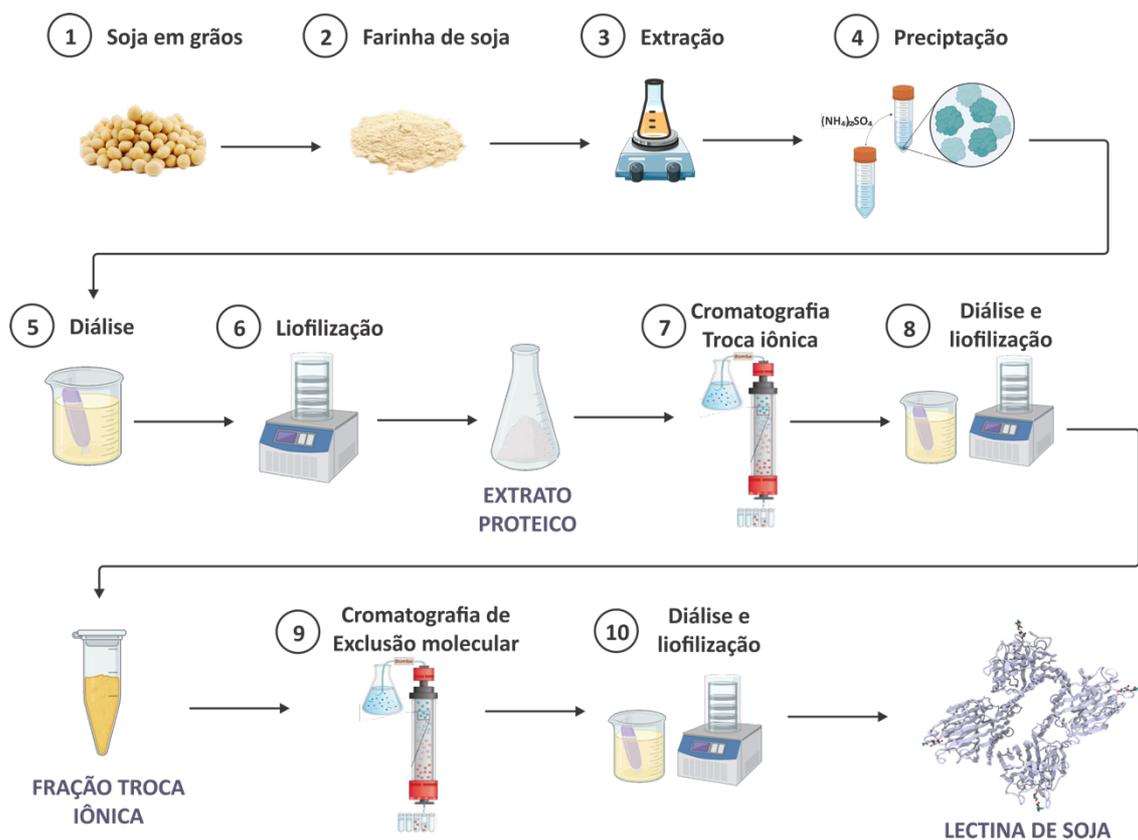


Figura 11 – Fluxograma do processo de obtenção da lectina de sementes soja (*Glycine max* L.)

Fonte: Autoria própria (2023).

O extrato proteico liofilizado foi solubilizado em tampão Tris – HCl 25 mM pH 8,1, na concentração de 35 mg/mL, e aplicado em coluna de troca iônica DEAE - Sephacel (1,6 x 9,0 cm) pré – equilibrada com o mesmo tampão de diluição da amostra. As proteínas negativamente carregadas, eluídas em fluxo constante de 1 mL/min, sob gradiente linear de NaCl de 0 – 750 mM, foram coletadas em frações de 2mL, tendo o eluato sido monitorado por espectrofotometria UV em comprimento de onda de 280 nm.

Para avaliar a presença da lectina nas frações coletadas, foi realizada a atividade hemaglutinante utilizando uma solução de hemácias a 2% (PANDA et al., 2014). Os

eritrócitos humanos do tipo A utilizados na análise, foram obtidos a partir de bolsas de transfusão sanguínea com prazo de validade expirado, cedidas pela Agência Transfusional do Hospital Universitário Lauro Wanderley – HULW/UFPB, João Pessoa – PB.

O ensaio de atividade hemaglutinante foi feito em tubos de ensaio adicionando-se, 100 µL da solução de hemácias a 2% e 100 µL de cada fração obtida na cromatografia, em seguida, os tubos foram incubados a 37 °C por 30 minutos e decorrido o tempo, a avaliação da atividade hemaglutinante foi feita visualmente.

Dessa forma, baseado na absorbância a 280 nm e na atividade hemaglutinante, as frações contendo lectina (hemaglutinação positiva) foram coletadas, dialisadas contra água e liofilizadas.

A proteína liofilizada (fração troca iônica) foi suspensa em tampão fosfato 20 mM pH 7,5 na concentração de 25 mg/mL, e aplicada em coluna de exclusão molecular Sephadex G-50 (1,8x50 cm). A eluição foi realizada com o mesmo tampão de diluição da amostra em um fluxo constante de 0,2 mL/min, sendo o eluido monitorado a 280nm.

As frações cromatográficas foram avaliadas quanto sua atividade hemaglutinante e aquelas que apresentaram hemaglutinação foram coletadas, dialisadas (membrana 8 – 14 kDa) contra água e liofilizadas. Sendo assim obtido um isolado lectinico de soja que foi utilizado para a etapa seguinte de hidrólise enzimática.

3.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA *in vitro* DA FRAÇÃO LECTINA DA PROTEÍNA DE SOJA

A hidrólise enzimática *in vitro* da lectina de soja foi realizada utilizando as enzimas alcalase e papaína, e por meio da hidrólise subsequente utilizando as mesmas enzimas, seguindo a metodologia de Tong et al., 2020 com modificações. O processo de hidrólise seguiu as etapas representadas no fluxograma da Figura 12.

Primeiramente, a fração lectina foi solubilizada em tampão Tris-HCl 25mM pH 8,0 na concentração de 1% (10 mg/mL) e colocada em banho maria a 55 °C antes da adição da enzima. Para a hidrólise com apenas uma enzima, alcalase (5% v/p; pH 8,0; 55 °C) ou papaína (5% p/p; pH 7,0; 55 °C) foi adicionada a solução de amostra e incubada em uma incubadora shaker com agitação orbital a 150 rpm por 4h. Depois da incubação,

a amostra foi aquecida em banho maria a 85 °C por 10 min, para inativar a enzima, e em seguida colocada em banho de gelo com o objetivo de baixar a temperatura. Após a reação a solução foi centrifugada (3000 x g/ 20 min/ 4 °C), dialisada contra água, em membrana de 1 kDa, e em seguida liofilizada.

Na hidrólise enzimática subsequente, o processo de diluição e aquecimento da amostra foi repetido, em seguida adicionou-se a alcalase (5% v/p; pH 8,0; 55 °C) e a mistura foi incubada por 4h, tendo sua atividade inativada em banho maria a 85 °C e resfriada. Em seguida o pH da solução foi ajustado para 7,0, com solução de HCl 0,1M, e a papaína adicionada (5% p/p; pH 7,0; 55°C) sendo incubada por mais 4h. Ao final do processo, repetiu-se o procedimento de inativação enzimática, e a amostra foi dialisada contra água, em membrana de 1KDa, e em seguida liofilizada

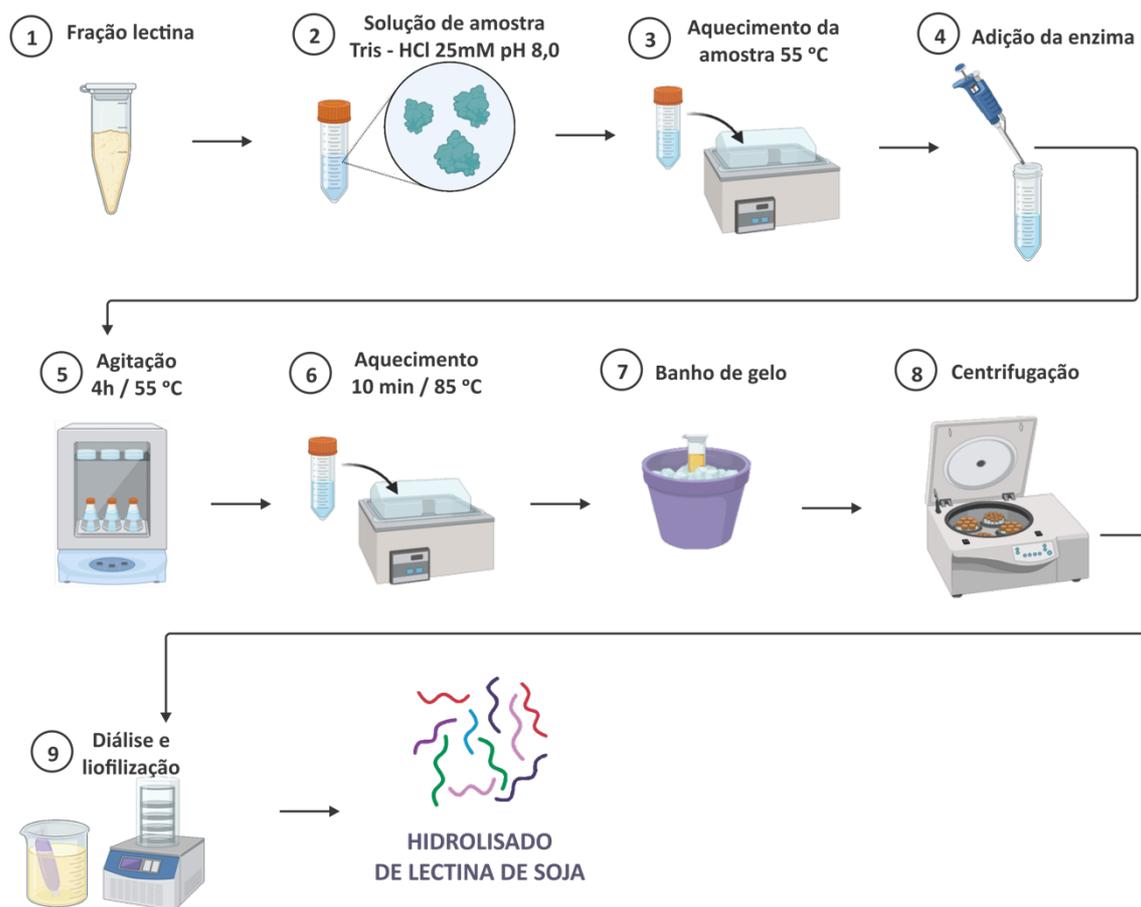


Figura 12 – Fluxograma de etapas realizadas para obtenção dos hidrolisados proteicos de soja.

Fonte: Autoria própria (2023).

Dessa forma, obtiveram-se os hidrolisados proteicos de soja com a enzima alcalase (HA), hidrolisado com a enzima papaína (HP) e o hidrolisado resultante da hidrólise consecutiva com as enzimas alcalase e papaína (HAP).

A partir desses hidrolisados foram realizadas as análises de grau de hidrólise e espectrometria de massas, sendo o hidrolisado que apresentou o maior grau de hidrólise e melhor perfil de bioatividade avaliado quanto suas atividades biológicas.

3.5 AVALIAÇÃO DA DIGESTIBILIDADE *in vitro* DA FRAÇÃO LECTINA E DO HIDROLISADO DE SOJA

De forma avaliar a atividade das enzimas digestivas sobre a fração lectina de soja e seu hidrolisado, foi realizada a simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal seguindo o protocolo harmonizado da INFOGEST (BRODKORB et al., 2019), representado na Figura 13.

As amostras foram diluídas em água na concentração de 10 mg/mL, conforme metodologia de Wang et al., 2021 e o processo de simulação realizado a 37 °C em incubadora shaker em 200 rpm. A fase oral, iniciou-se com a adição do fluido salivar simulado a amostra sendo deixado sob agitação por 2 min. Para simulação da fase gástrica, o bolo oral foi misturado com o fluido estomacal simulado e o pH ajustado para 3,0, em seguida, pepsina (2000 U/mL) foi adicionada e a mistura colocada sob agitação por 2h. A simulação da fase intestinal foi realizada a partir da mistura do bolo estomacal com o fluido intestinal simulado e a elevação do pH da mistura para 7,0, em seguida foram adicionados os sais de bile (10 mM) e a pancreatina (100 U/mL) e a mistura novamente agitada por mais 2h. Como branco, foi feito o mesmo processo em um tubo contendo água no lugar da amostra.

Ao fim da fase intestinal, a reação de digestão foi interrompida pelo aquecimento em banho maria (85 °C/ 10 min) da amostra e em seguida resfriamento em banho de gelo, logo após, a amostra digerida foi centrifugada (3000 x g/ 20 min/ 4 °C), dialisada contra água em membrana de 1 kDa e liofilizada.

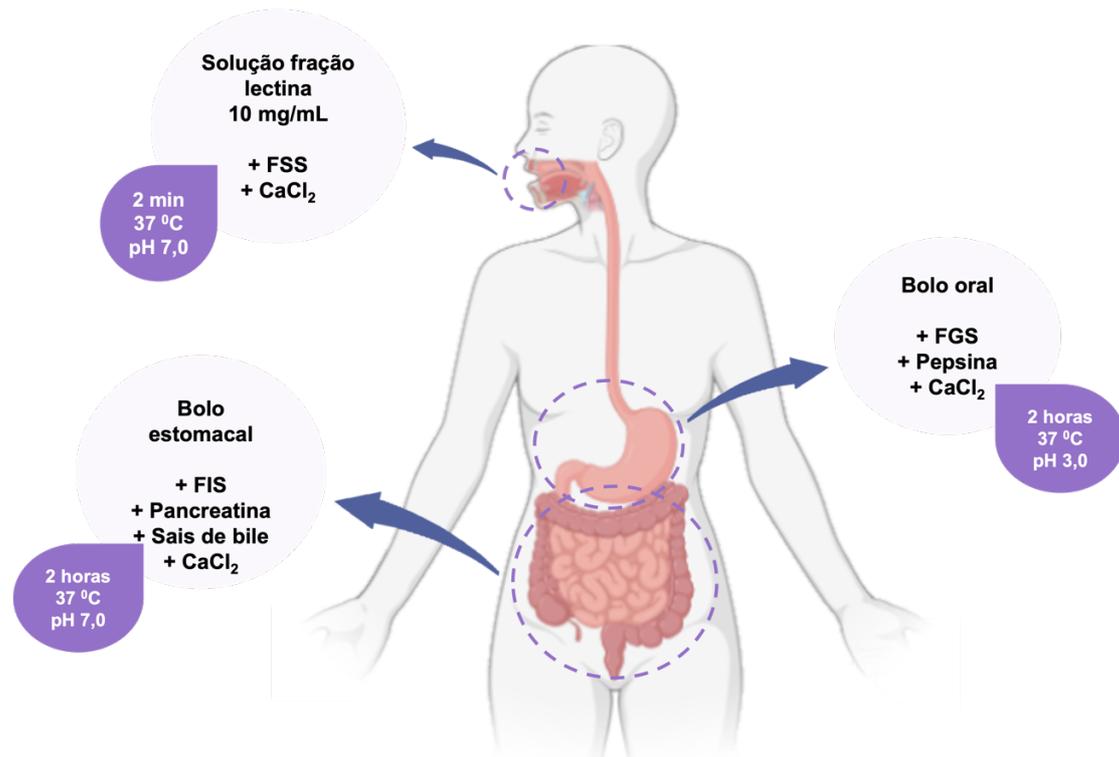


Figura 13 – Processo de simulação da digestão gastrointestinal *in vitro* da lectina e do hidrolisado.

Fonte: Autoria própria (2024).

A digestibilidade da proteína foi calculada de acordo com metodologia de Canelli et al., 2023, a partir do teor de proteína da amostra, corrigida pelo teor de proteína do experimento do branco, e o teor de proteína do sobrenadante após a centrifugação (corrigido pelo teor de proteína do branco) e expresso em porcentagem, de acordo com a equação 1.

$$Digestibilidade(\%) = \left(\frac{\text{Teor de proteína sobrenadante} - \text{Teor de proteína do branco}}{\text{Teor de proteína da amostra} - \text{Teor de proteína do branco}} \right) * 100\%$$

3.6 CARACTERIZAÇÃO PROTEICA E DOS PEPTÍDEOS APÓS HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

3.6.1 Identificação dos peptídeos

3.6.1.1 Espectrometria de massas

As misturas de peptídeos de cada amostra foram dessalinizadas e concentradas em coluna C18 inseridas em microponteiras. Em seguida, os peptídeos foram submetidos a separação offline e análise em um sistema de cromatografia líquida em nanoescala acoplado a um espectrômetro de massas com ionização por eletrospray e aquisição de dados em modo sequencial (*nano Liquid chromatography-electrospray-MS/MS in tandem, LC-ESI-MSMS*). Os dados de MS foram adquiridos em um espectrômetro TimsTOF (Bruker Daltonics, Germany) com mobilidade iônica em modo de aquisição independente dos dados (*Data-Independent Acquisition - DIA*) para uma abordagem *4D-DIA proteomics*.

3.6.2 Sequenciamento dos peptídeos

Os arquivos de dados brutos (.d) foram carregados no PEAKS Studio v.11 (Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, ON, Canadá), onde o fluxo de trabalho padrão PEAKS, incorporando sequenciamento de peptídeos de novo e PeaksDB, foi usado para identificação de peptídeos e proteínas .

Os espectros MS/MS foram comparados com o banco de dados de proteoma de referência Glycine max (Soybean), disponível em UniProtKB (Proteome ID UP000008827, contendo 74.862 entradas de proteínas, com data de lançamento em abril de 2024). Para a identificação dos peptídeos do produto hidrolisado, foi estabelecida uma tolerância de massa do precursor de 10 ppm, com uma tolerância de massa do fragmento de 0,02 Da. A clivagem enzimática inespecífica foi permitida e a oxidação da metionina (+15,99 Da) foi considerada uma modificação variável. Para identificação da fração proteica, a tripsina foi definida como enzima específica, permitindo até duas clivagens perdidas. A carbamidometilação na cisteína (+57,02 Da) foi usada como uma

modificação fixa, e a oxidação na metionina (+15,99 Da) foi uma modificação variável. Uma taxa de descoberta falsa (FDR) de 1% foi aplicada para proteínas e peptídeos na análise de hidrolisado e fração proteica, e pelo menos um peptídeo único necessário para identificação de proteínas.

3.6.2 Grau de hidrólise (GH)

O grau de hidrólise foi determinado pelo método de OPA (o-ftaldialdeído) (NIELSEN; PETERSEN; DAMBMANN, 2001). O reagente OPA foi preparado no dia da realização da análise e utilizou-se serina (0,1 mg/mL) como padrão e água deionizada como branco. Para realização da análise foram preparadas soluções de 1 mg/mL de cada hidrolisado.

Em tubos de ensaio foram adicionados 400 µL de amostra e 3 mL do reagente OPA, a mistura foi agitada em vórtex por 5 segundos e lida em espectrofotômetro a 340 nm após 2 minutos de reação.

O cálculo do grau de hidrólise foi feito a partir das equações:

$$DH(\%) = \frac{h}{h_{tot}} * 100\%$$

$$h = (SerineNH2 - \beta) / \alpha$$

$$SerinaNH2 = \frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco})}{(Abs_{padrão} - Abs_{branco})} * 0,9516 \text{ meqv serina/L} * \frac{0,1 * 100}{X * P}$$

Onde:

α e β e h_{total} são constantes definidas de acordo com a matéria-prima utilizada (para a soja, os valores das constantes são $\alpha= 0,970$; $\beta= 0,342$ e $h_{tot} = 7,8$); X é a massa de proteína utilizada para análise (g) e P é o percentual de proteína na amostra.

3.6.3 Eletroforese SDS-PAGE / Tris-Tricina

O perfil proteico da fração lectina e dos peptídeos foram obtidos por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE e Tris-tricina, respectivamente. As amostras foram preparadas a partir da sua diluição em tampão de amostra em condição redutora (contendo SDS e β – mercaptoetanol), aquecidas a 100 °C por 10 minutos, resfriadas e centrifugadas (6000 rpm/1min).

O sistema SDS-PAGE, para avaliação do perfil da lectina, foi montado a partir de dois géis de poliacrilamida, um gel de concentração de 3,5% e um gel de separação de 12%.

A produção dos peptídeos foi verificada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de Tricina (SDS-PAGE Tris-Tricina), de acordo com o método de Schägger; Von Jagow (1987). O sistema foi montado a partir de 3 géis de poliacrilamida sendo: gel de separação (16% T e 3% C), gel espaçador (10% T e 3% C) e o gel de concentração 4%. Os pesos moleculares das frações de baixo peso foram comparados mediante utilização de marcador de peso molecular, com massas moleculares de 3,5 – 38 kDa. (GE Healthcare Life Sciences, Nova Jersey, USA).

Após a corrida, ambos os géis foram fixados por 1 hora em solução metanol/ácido acético/ água (5:1:4), corados por Comassie Brilliant Blue G-250 e posteriormente descorados em 10% de ácido acético.

3.6.4 Avaliação da fluorescência intrínseca

A avaliação de mudanças na estrutura terciária da proteína foi avaliada a partir da fluorescência intrínseca da molécula. A análise foi realizada a partir de metodologia descrita por Zhang et al., 2023, em um espectrofluorímetro (RF- 20AXS, Horiba Ltd., Japão). A lectina e os hidrolisados foram diluídos na concentração de 0,1 mg/mL em água deionizada e a emissão da fluorescência entre 300 e 450 nm com excitação em 280 nm, a fenda de emissão foi ajustada em 5 nm e os espectros corrigidos pela subtração do tampão utilizado para diluir a amostra.

3.6.6 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier - FTIR

Foram avaliados a fração lectina e os hidrolisados a partir da adição de KBr, as amostras foram misturadas, pressurizadas e escaneadas em espectrofotômetro Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) (IR Prestige 21 SHIMADZU, Japão), utilizando o método de reflectância atenuada (ATR). Os espectros foram obtidos no modo de transmitância na faixa de 4000 – 500 cm⁻¹ (XU et al., 2023).

3.6.7 Tamanho de partícula e potencial zeta

O tamanho da partícula e o potencial zeta da lectina e dos hidrolisados foram avaliados em um Nano ZS90 Zetasizer (Malvern Instruments Co., Ltd., Worcestershire, UK). A análise foi realizada de acordo com metodologia de Wu et al., 2023 com pequenas modificações. As amostras foram diluídas em água deionizada na concentração de 0,01% (p/v). O índice de refração da amostra utilizado foi de 1,45 e do dispersante (água) 1,333, o índice de absorvidade da amostra utilizado foi de 0,001.

3.6.8 Microscopia Eletrônica de Varredura – MeV

As microestruturas da fração lectina e do hidrolisado obtido pela hidrólise sequencial foram avaliadas utilizando um microscópio eletrônico de varredura LEO 1430 com detector eletro secundário (Zeiss, Goettingen, Alemanha) a uma tensão de aceleração de 10 kV (FANG et al., 2021).

3.7 AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DOS PEPTÍDEOS

3.7.1 Atividade antioxidante

Avaliação do sequestro do radical ABTS:

O ensaio com o radical ABTS [2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid] foi conduzido seguindo metodologia proposta por Evangelho et al., 2017. O radical foi preparado a partir da reação de uma solução de 7 mM ABTS com uma solução de 140 mM de persulfato de potássio. A mistura permaneceu no escuro por 16 horas à temperatura ambiente e, após esse tempo, 1 mL dessa mistura foi diluído com etanol para se obter uma absorbância de $0,700 \pm 0,050$ a 734 nm.

Para realização da análise, as amostras foram diluídas em água na concentração de 10 mg/mL. Alíquotas de 100 μ L da amostra foram adicionados a 1,9 mL da solução de ABTS e a absorbância medida aos 6 minutos de reação a 734 nm. O branco foi realizado nas mesmas condições, substituindo a amostra por água deionizada. A porcentagem de inibição foi calculada utilizando a equação:

$$\%Captura = \left[1 - \left(\frac{Abs_{amostra}}{Abs_{branco}} \right) \right] * 100$$

Avaliação do sequestro do radical DPPH:

A atividade antioxidante da lectina e dos hidrolisados contra o radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) foi realizada de acordo com metodologia descrita por Zhang et al., 2019. Foi utilizada a mesma solução de amostra do ensaio com o radical ABTS, e análise realizada em placa de 96 poços. 100 µL de amostra foi misturada com 100 µL da solução de DPPH (100 µM em 95% de metanol) em cada poço e mantida no escuro a temperatura ambiente por 30 minutos. A placa foi analisada a 517 nm em espectrofotômetro de microplacas (Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific) e o % de captura do radical DPPH calculado a partir da mesma equação utilizada no radical ABTS.

3.7.2 Atividade antiproliferativa

A citotoxicidade das amostras fração lectina de soja e do hidrolisado foi avaliada utilizando o método de MTT (brometo 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2il-tetrazólico), que tem como princípio determinar a capacidade das células em reduzir o MTT formando cristais de formazan, que apresentam coloração violeta (LIU; SCHUBERT, 1997).

Cultura das células

Foram utilizadas células de câncer de cólon das linhagens HT-29 e Lovo e cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino e penicilina e incubadas a 37 °C na presença de 5% de CO₂.

Para avaliar a viabilidade celular, as células foram coradas com Azul de Trypan e em seguida fez-se a contagem em Câmara de Neubauer, a viabilidade das células foi estimada a partir da equação abaixo

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{n^{\circ} \text{ células viáveis}}{n^{\circ} \text{ de células total}} * 100$$

As células foram semeadas em placas de 96 poços na concentração de 2×10^4 células/poço suspensas em meio DMEM e levadas para estufa para crescimento por overnight, para em seguida realizar o teste de citotoxicidade das amostras com o método colorimétrico do MTT.

Ensaio de MTT

As células foram depositadas em placas de 96 poços e mantidas por overnight a 37°C com 5% de CO_2 numa densidade de 2×10^4 células/poço. Em seguida os compostos foram adicionados para triagem nas concentrações de 6,25-200 $\mu\text{g/mL}$ (Faheina-Martins et al., 2012), sendo em seguida incubadas por 72h. Após o período de tratamento removeu-se 110 μL do sobrenadante, e foi adicionado 10 μL solução de MTT (5mg/mL em PBS) (m/v). As placas foram incubadas por 3-4 horas, para redução do sal e formação dos cristais de formazan, e em seguida foram solubilizados com a adição de 100 μL de DMSO. As placas foram lidas em um espectrofotômetro de microplacas (MultiskanTM GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific) à 570 nm.

3.7.3 Investigação da apoptose por citometria de fluxo

As células LoVo foram adicionadas em placas com 24 poços na concentração de 3×10^5 células/poço e tratadas com o extrato de lectinas e com o hidrolisado nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$ ou com 5-Fluoroufacil (100 μM) por 24 h. Após os períodos de incubação, as células foram ressuspensas após remover o sobrenadante e adição de uma solução de 0,45 mM de EDTA estéril por 3 min. Em seguida as células foram centrifugadas (1.400 rpm, 5 minutos) e ressuspensas em 100 μL de tampão de ligação e 1 μL de anexina V-Alexa Fluor 488 (Invitrogen, EUA) por 15 minutos, no escuro. Posteriormente foram adicionados 400 μL do tampão de ligação e 1 $\mu\text{g/mL}$ de iodeto de propídeo (Invitrogen, EUA), realizando-se a leitura em citômetro de fluxo CYTOFLEX SRT (Beckman Coulter, EUA) com os filtros 525 (verde) e 690 (vermelho).

3.8 AVALIAÇÃO *in silico* PARA PREDIÇÃO DE BIOATIVIDADE DOS PEPTÍDEOS

Os peptídeos identificados nas amostras de hidrolisado da fração lectina de soja foram avaliados quanto à bioatividade utilizando o servidor PeptideRanker, que se baseia em uma nova rede neural N-para-1 baseada na probabilidade do peptídeo ser bioativo. Esse servidor tem um limite de calibração (que varia de 0 a 1) onde os resultados acima de 0,5 significam que o peptídeo pode ser dito como bioativo (RIVERO-PINO; MILLAN-LINARES; MONTSERRAT-DE-LA-PAZ, 2023).

Assim, os peptídeos que apresentaram pontuação acima de 0,5 foram avaliados quanto às características químicas usando as seguintes ferramentas: O ExPasy-Compute (http://web.expasy.org/compute_pi/) foi usado para estimar a hidropatia média geral (GRAVY) e o índice de Bowman. A carga líquida em pH neutro, o ponto isoelétrico do peptídeo e a solubilidade em água foram acessados pelo PepCalc.com - Peptide property calculator da Innovagen (<https://pepcalc.com/>).

A ferramenta ToxinPred (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/toxinpred/index.html>) foi utilizada para acessar a toxicidade, a hidrofobicidade, a hidropatia, a anfipaticidade, a hidrofiliabilidade e o hidrogênio líquido.

Após esses testes, os peptídeos com uma pontuação de bioatividade acima de 0,8 foram avaliados quanto às suas prováveis atividades funcionais por uma ferramenta de machine learning: CSM-peptides (https://biosig.lab.uq.edu.au/csm_peptides/), que permite a identificação de 8 tipos diferentes bioatividades que podem estar relacionadas as sequencias de peptídeos, sendo estas: Antiangiogênico (AAP), Antibacteriano (ABP), Anticâncer (ACP), Anti-inflamatório (AIP), Antiviral (AVP), Capacidade de penetração de células (CPP), Quórum sensing (QSP) e Ligação de superfície (SBP).

O tratamento que apresentou maiores quantidades de peptídeos com propriedades anticâncer foi selecionado para realizar um ensaio com diferentes tipos de câncer e linhagens celulares por uma nova plataforma de predição: pdCSM-cancer (https://biosig.lab.uq.edu.au/pdcsm_cancer/). Essa ferramenta consiste em 74 modelos de regressão com dez tipos de tecidos diferentes que são validados por meio de dados experimentais baseados na mínima concentração de inibição do crescimento (CI_{50%}). As sequencias de peptídeos foram convertidos para a forma de cadeia SMILES usando a ferramenta PepSMI (<https://www.novoprolabs.com/tools/convert-peptide-to-smiles-string>).

A sequência de peptídeo que apresentou atividade no maior número de linhagens e tecidos celulares foi determinada quanto a sua estrutura química, a partir da ferramenta PepDraw (<https://pepdraw.com/>), e sua estrutura 3D pelo servidor PEP-FOLD 4 (<https://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD4/>)

As possíveis interações intermoleculares que estão envolvidas no potencial anticâncer desta sequência foram verificadas através de docking molecular contra as proteínas XIAP, caspase-3 e caspase-7. As estruturas moleculares dos alvos foram obtidas a partir de the RCSB PDB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). O docking molecular foi realizado usando o programa AutoDock Vina e os cálculos das energias de ligações foram realizados utilizando o algoritmo genético de Lamarckian. Os resultados das interações e as imagens 3D foram avaliados utilizando o software AutoDock Server.

Os peptídeos que apresentaram as atividades antioxidante, inibição da DDP-IV, e inibição da ECA foram avaliados quanto suas propriedades de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (propriedades ADMET), por meio da plataforma ADMETLab2.0 (<https://admetmesh.scbdd.com>).

Foi realizada a predição de ligação entre os peptídeos selecionados e as seguintes estruturas: enzima conversora de angiotensina humana - ECA (1O86), dipeptidyl peptidase IV humana- DPP IV(1NU6) e da mieloperoxidase de leucócitos humanos - MPO (3F9P) obtidas a partir da base de dados Protein Data Bank protein database (<https://www.rcsb.org/>). O docking molecular foi realizado usando AutoDock Vina (versão 1.1.2), usando o Algoritmo Genético Lamarckiano através do software PyRx v.0.9.7. Os resultados das interações e as imagens 3D foram avaliados utilizando o software AutoDock Server.

3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os ensaios foram realizados em triplicata e os dados analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA). As diferenças entre os grupos estudados foram analisadas utilizando o teste de média Tukey para comparação de médias ao nível de 5% de significância utilizando-se o software STATISTICA 7.0® (STATSOFT Inc., USA). Para todas as análises considerou-se significativo $p < 0,05$.

REFERÊNCIAS

AGYEI, Dominic; BAMBARANDAGE, Erandi; UDENIGWE, Chibuike C. The role of bioinformatics in the discovery of bioactive peptides. *Em: Encyclopedia of Food Chemistry*. [s.l.] : Elsevier, 2018. p. 337–344. DOI: 10.1016/B978-0-08-100596-5.21863-5.

AKHARUME, Felix U.; ALUKO, Rotimi E.; ADEDEJI, Akinbode A. Modification of plant proteins for improved functionality: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 198–224, 2021. DOI: 10.1111/1541-4337.12688.

AMIGO, Lourdes; HERNÁNDEZ-LEDESMA, Blanca. Current Evidence on the Bioavailability of Food Bioactive Peptides. **Molecules**, [S. l.], v. 25, n. 19, p. 4479, 2020. DOI: 10.3390/molecules25194479.

BABINI, Elena; TAGLIAZUCCHI, Davide; MARTINI, Serena; DEI PIÙ, Lucilla; GIANOTTI, Andrea. LC-ESI-QTOF-MS identification of novel antioxidant peptides obtained by enzymatic and microbial hydrolysis of vegetable proteins. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 228, p. 186–196, 2017. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.01.143.

BAI, Genpeng et al. Research advances of molecular docking and molecular dynamic simulation in recognizing interaction between muscle proteins and exogenous additives. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 429, p. 136836, 2023. DOI: 10.1016/j.foodchem.2023.136836.

BALA SUBRAMANIYAN, Siva; VEERAPPAN, Anbazhagan. Lectins as the prominent potential to deliver bioactive metal nanoparticles by recognizing cell surface glycans. **Heliyon**, [S. l.], v. 10, n. 8, p. e29394, 2024. DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e29394.

BALBINOT JUNIOR, Alvadi Antonio; DEBIASI, Henrique; FRANCHINI, Julio Cezar; OLIVEIRA, Marcelo Alvares De; COELHO, Antônio Eduardo; MORAES, Moacir Tuzzin De. Soybean yield, seed protein and oil concentration, and soil fertility affected by off-season crops. **European Journal of Agronomy**, [S. l.], v. 153, p. 127039, 2024. DOI: 10.1016/j.eja.2023.127039.

BHANDARI, Divya; RAFIQ, Shafiya; GAT, Yogesh; GAT, Punam; WAGHMARE, Roji; KUMAR, Vikas. A Review on Bioactive Peptides: Physiological Functions, Bioavailability and Safety. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, [S. l.], v. 26, n. 1, p. 139–150, 2020. DOI: 10.1007/s10989-019-09823-5.

BHUTIA, Sujit K. et al. Plant lectins in cancer therapeutics: Targeting apoptosis and autophagy-dependent cell death. **Pharmacological Research**, [S. l.], v. 144, p. 8–18, 2019. DOI: 10.1016/j.phrs.2019.04.001.

BRODKORB, André et al. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. **Nature Protocols**, [S. l.], v. 14, n. 4, p. 991–1014, 2019. DOI: 10.1038/s41596-018-0119-1.

- CABANOS, Cerrone; MATSUOKA, Yuki; MARUYAMA, Nobuyuki. Soybean proteins/peptides: A review on their importance, biosynthesis, vacuolar sorting, and accumulation in seeds. **Peptides**, [S. l.], v. 143, p. 170598, 2021. DOI: 10.1016/j.peptides.2021.170598.
- CAGLIARI, Rafael; KREMER, Frederico Schmitt; PINTO, Luciano da Silva. **Bauhinia lectins: Biochemical properties and biotechnological applications**. **International Journal of Biological Macromolecules** Elsevier B.V., , 2018. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.07.156.
- CANELLI, Greta; ABIUSI, Fabian; VIDAL GARCIA, Albert; CANZIANI, Stefano; MATHYS, Alexander. Amino acid profile and protein bioaccessibility of two *Galdieria sulphuraria* strains cultivated autotrophically and mixotrophically in pilot-scale photobioreactors. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, [S. l.], v. 84, p. 103287, 2023. DOI: 10.1016/j.ifset.2023.103287.
- CHALAMAIAH, Meram; KESKIN ULUG, Sule; HONG, Hui; WU, Jianping. Regulatory requirements of bioactive peptides (protein hydrolysates) from food proteins. **Journal of Functional Foods**, [S. l.], v. 58, p. 123–129, 2019. a. DOI: 10.1016/j.jff.2019.04.050.
- CHALAMAIAH, Meram; KESKIN ULUG, Sule; HONG, Hui; WU, Jianping. Regulatory requirements of bioactive peptides (protein hydrolysates) from food proteins. **Journal of Functional Foods**, [S. l.], v. 58, p. 123–129, 2019. b. DOI: 10.1016/j.jff.2019.04.050.
- CHEN, Junbo; YU, Xiaodong; CHEN, Qianzi; WU, Qiyun; HE, Qiyi. Screening and mechanisms of novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from rabbit meat proteins: A combined in silico and in vitro study. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 370, p. 131070, 2022. DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.131070. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814621020768>.
- CHEN, Sheng-I; HSIEH, Chia-Chien. Chemoprevention by means of soy proteins and peptides – current status and future approaches: a review. **International Journal of Food Science & Technology**, [S. l.], v. 54, n. 5, p. 1460–1466, 2019. DOI: 10.1111/ijfs.14053.
- CHEW, Lye Yee; TOH, Gaik Theng; ISMAIL, Amin. Application of proteases for the production of bioactive peptides. *Em: Enzymes in Food Biotechnology: Production, Applications, and Future Prospects*. [s.l.] : Elsevier, 2018. p. 247–261. DOI: 10.1016/B978-0-12-813280-7.00015-3.
- CIAN, Raúl E.; CAMPOS-SOLDINI, Andrea; CHEL-GUERRERO, Luis; DRAGO, Silvina R.; BETANCUR-ANCONA, David. Bioactive *Phaseolus lunatus* peptides release from maltodextrin/gum arabic microcapsules obtained by spray drying after simulated gastrointestinal digestion. **International Journal of Food Science and Technology**, [S. l.], v. 54, n. 6, p. 2002–2009, 2019. DOI: 10.1111/ijfs.14031.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (Conab). *Acompanhamento da safra brasileira: grãos, safra 2023/24 - décimo segundo levantamento*. Brasília, DF:

Conab, 2024. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/>. Acesso em: 21 jun. 2024.

CRAMPON, Kevin; GIORKALLOS, Alexis; DELDOSSI, Myrtille; BAUD, Stéphanie; STEFFENEL, Luiz Angelo. Machine-learning methods for ligand–protein molecular docking. **Drug Discovery Today**, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 151–164, 2022. DOI: 10.1016/j.drudis.2021.09.007.

CRUZ-CASAS, Dora Elisa; AGUILAR, Cristóbal N.; ASCACIO-VALDÉS, Juan A.; RODRÍGUEZ-HERRERA, Raúl; CHÁVEZ-GONZÁLEZ, Mónica L.; FLORES-GALLEGOS, Adriana C. Enzymatic hydrolysis and microbial fermentation: The most favorable biotechnological methods for the release of bioactive peptides. **Food Chemistry: Molecular Sciences**, [S. l.], v. 3, p. 100047, 2021. a. DOI: 10.1016/j.fochms.2021.100047.

CRUZ-CASAS, Dora Elisa; AGUILAR, Cristóbal N.; ASCACIO-VALDÉS, Juan A.; RODRÍGUEZ-HERRERA, Raúl; CHÁVEZ-GONZÁLEZ, Mónica L.; FLORES-GALLEGOS, Adriana C. Enzymatic hydrolysis and microbial fermentation: The most favorable biotechnological methods for the release of bioactive peptides. **Food Chemistry: Molecular Sciences**, [S. l.], v. 3, p. 100047, 2021. b. DOI: 10.1016/j.fochms.2021.100047. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2666566221000381>.

DALIRI, Eric Banan-Mwine; OFOSU, Fred Kwame; CHELLIAH, Ramachandran; KIM, Jong-Hak; OH, Deog-Hwan. Development of a Soy Protein Hydrolysate with an Antihypertensive Effect. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 20, n. 6, p. 1496, 2019. DOI: 10.3390/ijms20061496.

DENT, Terrence; CAMPANELLA, Osvaldo; MALEKY, Farnaz. Enzymatic hydrolysis of soy and chickpea protein with Alcalase and Flavourzyme and formation of hydrogen bond mediated insoluble aggregates. **Current Research in Food Science**, [S. l.], v. 6, p. 100487, 2023. DOI: 10.1016/j.crfs.2023.100487.

DOS SANTOS AGUILAR, Jessika Gonçalves; SATO, Hélia Harumi. **Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates**. **Food Research International** Elsevier Ltd, , 2018. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.10.044.

EVANGELHO, Jarine Amaral Do; VANIER, Nathan Levien; PINTO, Vânia Zanella; BERRIOS, Jose J. De; DIAS, Alvaro Renato Guerra; ZAVAREZE, Elessandra da Rosa. Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein hydrolysates: Physicochemical and functional properties. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 214, p. 460–467, 2017. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.07.046.

FADIMU, Gbemisola J.; LE, Thao T.; GILL, Harsharn; FARAHNAKY, Asgar; OLATUNDE, Oladipupo Odunayo; TRUONG, Tuyen. Enhancing the Biological Activities of Food Protein-Derived Peptides Using Non-Thermal Technologies: A Review. **Foods**, [S. l.], v. 11, n. 13, p. 1823, 2022. a. DOI: 10.3390/foods11131823.

FADIMU, Gbemisola J.; LE, Thao T.; GILL, Harsharn; FARAHNAKY, Asgar; OLATUNDE, Oladipupo Odunayo; TRUONG, Tuyen. Enhancing the Biological

Activities of Food Protein-Derived Peptides Using Non-Thermal Technologies: A Review. **Foods**, [S. l.], v. 11, n. 13, p. 1823, 2022. DOI: 10.3390/foods11131823.

FAN, Jiyu; FU, Ailing; ZHANG, Le. Progress in molecular docking. **Quantitative Biology**, [S. l.], v. 7, n. 2, p. 83–89, 2019. DOI: 10.1007/s40484-019-0172-y.

FANG, Jiaqi et al. Structural properties, antioxidant and immune activities of low molecular weight peptides from soybean dregs (Okara). **Food Chemistry: X**, [S. l.], v. 12, p. 100175, 2021. DOI: 10.1016/j.fochx.2021.100175.

FARIAS, T. C.; ABREU, J. P.; OLIVEIRA, J. P. S.; MACEDO, A. F.; RODRÍGUEZ-VEGA, A.; TONIN, A. P.; CARDOSO, F. S. N.; MEURER, E. C.; KOBLITZ, M. G. B. Bioactive properties of peptide fractions from Brazilian soy protein hydrolysates: In silico evaluation and experimental evidence. **Food Hydrocolloids for Health**, [S. l.], v. 3, p. 100112, 2023. DOI: 10.1016/j.fhfh.2022.100112.

FENG, Li; PENG, Fei; WANG, Xiaojing; LI, Mei; LEI, Hongjie; XU, Huaide. Identification and characterization of antioxidative peptides derived from simulated in vitro gastrointestinal digestion of walnut meal proteins. **Food Research International**, [S. l.], v. 116, p. 518–526, 2019. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.08.068.

FERNÁNDEZ-TOMÉ, Samuel; HERNÁNDEZ-LEDESMA, Blanca; CHAPARRO, María; INDIANO-ROMACHO, Pedro; BERNARDO, David; GISBERT, Javier P. Role of food proteins and bioactive peptides in inflammatory bowel disease. **Trends in Food Science & Technology**, [S. l.], v. 88, p. 194–206, 2019. DOI: 10.1016/j.tifs.2019.03.017.

FRANCO-FRAGUAS, Laura; PLÁ, Alicia; FERREIRA, Fernando; MASSALDI, Hugo; SUÁREZ, Norma; BATISTA-VIERA, Francisco. Preparative purification of soybean agglutinin by affinity chromatography and its immobilization for polysaccharide isolation. **Journal of Chromatography B**, [S. l.], v. 790, n. 1–2, p. 365–372, 2003. DOI: 10.1016/S1570-0232(03)00086-2.

FU, Lei-lei; ZHOU, Cheng-cheng; YAO, Shun; YU, Jia-ying; LIU, Bo; BAO, Jin-ku. Plant lectins: Targeting programmed cell death pathways as antitumor agents. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, [S. l.], v. 43, n. 10, p. 1442–1449, 2011. DOI: 10.1016/j.biocel.2011.07.004.

GAO, Kun; RAO, Jiajia; CHEN, Bingcan. Plant protein solubility: A challenge or insurmountable obstacle. **Advances in Colloid and Interface Science**, [S. l.], v. 324, p. 103074, 2024. DOI: 10.1016/j.cis.2023.103074.

GARBELINI, Luiz Gustavo; FRANCHINI, Júlio Cezar; DEBIASI, Henrique; BALBINOT JUNIOR, Alvadi Antônio; BETIOLI JUNIOR, Edner; TELLES, Tiago Santos. Profitability of soybean production models with diversified crops in the autumn–winter. **Agronomy Journal**, [S. l.], v. 112, n. 5, p. 4092–4103, 2020. DOI: 10.1002/agj2.20308.

GAUTAM, Ajay Kumar; SHARMA, Divakar; SHARMA, Juhi; SAINI, Khem Chand. Legume lectins: Potential use as a diagnostics and therapeutics against the cancer.

International Journal of Biological Macromolecules, [*S. l.*], v. 142, p. 474–483, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.09.119.

GEORGE, Kelli S.; MUÑOZ, Joseph; AKHAVAN, Neda S.; FOLEY, Elizabeth M.; SIEBERT, Shalom C.; TENENBAUM, Gershon; KHALIL, Dania A.; CHAI, Sheau C.; ARJMANDI, Bahram H. Is soy protein effective in reducing cholesterol and improving bone health? **Food & Function**, [*S. l.*], v. 11, n. 1, p. 544–551, 2020. DOI: 10.1039/C9FO01081E.

GIANFRANCESCHI, Gian Luigi; GIANFRANCESCHI, Giuseppe; QUASSINTI, Luana; BRAMUCCI, Massimo. Biochemical requirements of bioactive peptides for nutraceutical efficacy. **Journal of Functional Foods**, [*S. l.*], v. 47, p. 252–263, 2018. DOI: 10.1016/j.jff.2018.05.034.

GÖRGÜÇ, Ahmet; GENÇDAĞ, Esra; YILMAZ, Fatih Mehmet. Bioactive peptides derived from plant origin by-products: Biological activities and techno-functional utilizations in food developments – A review. **Food Research International**, [*S. l.*], v. 136, p. 109504, 2020. DOI: 10.1016/j.foodres.2020.109504.

GUO, Bingfu et al. Soybean genetic resources contributing to sustainable protein production. **Theoretical and Applied Genetics**, [*S. l.*], v. 135, n. 11, p. 4095–4121, 2022. DOI: 10.1007/s00122-022-04222-9.

GUPTA, Anita. Emerging applications of lectins in cancer detection and biomedicine. **Materials Today: Proceedings**, [*S. l.*], v. 31, p. 651–661, 2020. DOI: 10.1016/j.matpr.2020.05.810.

HAN, Xiao; SUN, Yu; HUANGFU, Bingxin; HE, Xiaoyun; HUANG, Kunlun. Ultra-high-pressure passivation of soybean agglutinin and safety evaluations. **Food Chemistry: X**, [*S. l.*], v. 18, p. 100726, 2023. DOI: 10.1016/j.fochx.2023.100726.

HERTZLER, Steven R.; LIEBLEIN-BOFF, Jacqueline C.; WEILER, Mary; ALLGEIER, Courtney. Plant Proteins: Assessing Their Nutritional Quality and Effects on Health and Physical Function. **Nutrients**, [*S. l.*], v. 12, n. 12, p. 3704, 2020. DOI: 10.3390/nu12123704.

HU, Xia; ZENG, Zhen; ZHANG, Jing; WU, Di; LI, Hui; GENG, Fang. Molecular dynamics simulation of the interaction of food proteins with small molecules. **Food Chemistry**, [*S. l.*], v. 405, p. 134824, 2023. DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.134824.

INDRATI, Retno. Bioactive Peptides from Legumes and Their Bioavailability. *Em: Legumes Research - Volume 2*. [s.l.] : IntechOpen, 2022. DOI: 10.5772/intechopen.99979.

ISLAM, Monirul; HUANG, Yatao; ISLAM, Serajul; FAN, Bei; TONG, Litao; WANG, Fengzhong. Influence of the Degree of Hydrolysis on Functional Properties and Antioxidant Activity of Enzymatic Soybean Protein Hydrolysates. **Molecules**, [*S. l.*], v. 27, n. 18, p. 6110, 2022. DOI: 10.3390/molecules27186110.

IWANIAK, Anna; DAREWICZ, Małgorzata; MOGUT, Damir; MINKIEWICZ, Piotr. Elucidation of the role of in silico methodologies in approaches to studying bioactive

peptides derived from foods. **Journal of Functional Foods**, [S. l.], v. 61, p. 103486, 2019. DOI: 10.1016/j.jff.2019.103486.

JAIN, Monika et al. Exploration of the antiproliferative activity of lectin-like protein from seeds of *Datura stramonium*: An in vitro study. **Journal of King Saud University - Science**, [S. l.], v. 36, n. 6, p. 103216, 2024. DOI: 10.1016/j.jksus.2024.103216.

KIM, Il-Sup; YANG, Woong-Suk; KIM, Cheorl-Ho. Beneficial Effects of Soybean-Derived Bioactive Peptides. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 22, n. 16, p. 8570, 2021. DOI: 10.3390/ijms22168570.

KONYA, Judit; SATHYAPALAN, Thozhukat; KILPATRICK, Eric S.; ATKIN, Stephen L. The Effects of Soy Protein and Cocoa With or Without Isoflavones on Glycemic Control in Type 2 Diabetes. A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Study. **Frontiers in Endocrinology**, [S. l.], v. 10, 2019. DOI: 10.3389/fendo.2019.00296.

KUMAR, Manoj et al. Advances in the plant protein extraction: Mechanism and recommendations. **Food Hydrocolloids**, [S. l.], v. 115, p. 106595, 2021. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2021.106595.

KUMAR, Manoj et al. Plant-based proteins and their multifaceted industrial applications. **LWT**, [S. l.], v. 154, p. 112620, 2022. DOI: 10.1016/j.lwt.2021.112620.

LAMMI, Carmen; AIELLO, Gilda; BOSCHIN, Giovanna; ARNOLDI, Anna. Multifunctional peptides for the prevention of cardiovascular disease: A new concept in the area of bioactive food-derived peptides. **Journal of Functional Foods**, [S. l.], v. 55, p. 135–145, 2019. DOI: 10.1016/j.jff.2019.02.016.

LANGYAN, Sapna; KHAN, Fatima Nazish; YADAVA, Pranjali; ALHAZMI, Alaa; MAHMOUD, Samy F.; SALEH, Dalia I.; ZUAN, Ali Tan Kee; KUMAR, Ashok. In silico proteolysis and analysis of bioactive peptides from sequences of fatty acid desaturase 3 (FAD3) of flaxseed protein. **Saudi Journal of Biological Sciences**, [S. l.], v. 28, n. 10, p. 5480–5489, 2021. DOI: 10.1016/j.sjbs.2021.08.027.

LAZIM, Raudah; SUH, Donghyuk; CHOI, Sun. Advances in Molecular Dynamics Simulations and Enhanced Sampling Methods for the Study of Protein Systems. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 21, n. 17, p. 6339, 2020. DOI: 10.3390/ijms21176339.

LEE, Andy Chi-Lung; HARRIS, Janelle Louise; KHANNA, Kum Kum; HONG, Ji-Hong. A Comprehensive Review on Current Advances in Peptide Drug Development and Design. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 20, n. 10, p. 2383, 2019. DOI: 10.3390/ijms20102383.

LEE, Haksoo; SHIN, Eunguk; KANG, Hyunkoo; YOUN, HyeSook; YOUN, BuHyun. Soybean-Derived Peptides Attenuate Hyperlipidemia by Regulating Trans-Intestinal Cholesterol Excretion and Bile Acid Synthesis. **Nutrients**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 95, 2021. DOI: 10.3390/nu14010095.

LIENER, Irvin E.; SETO, T. A. Nonspecific Effect of Soybean Hemagglutinin on Tumor Growth*. **Cancer Research**, [S. l.], v. 15, n. 6, p. 407–409, 1955.

- LIU, Rui; CHENG, Jianming; WU, Hao. Discovery of Food-Derived Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitory Peptides: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 20, n. 3, p. 463, 2019. DOI: 10.3390/ijms20030463.
- LIU, Yuanbin; SCHUBERT, David. Cytotoxic Amyloid Peptides Inhibit Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction by Enhancing MTT Formazan Exocytosis. **Journal of Neurochemistry**, [S. l.], v. 69, n. 6, p. 2285–2293, 1997. DOI: 10.1046/j.1471-4159.1997.69062285.x.
- LIU, Zhi-Wei; NIU, Debao; ZHOU, Ying-Xue; CHENG, Jun-Hu; EL-DIN BEKHIT, Alaa; AADIL, Rana Muhammad. Oxidation induced by dielectric-barrier discharge (DBD) plasma treatment reduces soybean agglutinin activity. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 340, p. 128198, 2021. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.128198.
- LOSSIO, Claudia F. et al. Lectin from *Canavalia villosa* seeds: A glucose/mannose-specific protein and a new tool for inflammation studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 105, p. 272–280, 2017. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.07.038.
- LUCIUS, Khara. Dietary Lectins: Gastrointestinal and Immune Effects. **Alternative and Complementary Therapies**, [S. l.], v. 26, n. 4, p. 168–174, 2020. DOI: 10.1089/act.2020.29286.klu.
- MACALINO, Stephani Joy Y.; BASITH, Shaherin; CLAVIO, Nina Abigail B.; CHANG, Hyerim; KANG, Soosung; CHOI, Sun. Evolution of In silico Strategies for Protein-Protein Interaction Drug Discovery. **Molecules**, [S. l.], v. 23, n. 8, p. 1963, 2018. DOI: 10.3390/molecules23081963.
- MANZOOR, Mehnaza; SINGH, Jagmohan; GANI, Adil. Exploration of bioactive peptides from various origin as promising nutraceutical treasures: In vitro, in silico and in vivo studies. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 373, p. 131395, 2022. a. DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.131395.
- MANZOOR, Mehnaza; SINGH, Jagmohan; GANI, Adil. Exploration of bioactive peptides from various origin as promising nutraceutical treasures: In vitro, in silico and in vivo studies. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 373, p. 131395, 2022. b. DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.131395.
- MAQSOU DLOU, Atefe; SADEGHI MAHOONAK, Alireza; MORA, Leticia; MOHEBODINI, Hossein; GHORBANI, Mohamad; TOLDRA, Fidel. Controlled enzymatic hydrolysis of pollen protein as promising tool for production of potential bioactive peptides. **Journal of Food Biochemistry**, [S. l.], v. 43, n. 5, p. e12819, 2019. DOI: 10.1111/jfbc.12819.
- MOOKERJEE, Abhiroop; TANAKA, Takuji. Influence of enzymatic treatments on legume proteins for improved functional and nutritional properties: expansion of legume protein utilization as food ingredients. **Current Opinion in Food Science**, [S. l.], v. 49, p. 100974, 2023. a. DOI: 10.1016/j.cofs.2022.100974.
- MOOKERJEE, Abhiroop; TANAKA, Takuji. Influence of enzymatic treatments on legume proteins for improved functional and nutritional properties: expansion of

legume protein utilization as food ingredients. **Current Opinion in Food Science**, [*S. l.*], v. 49, p. 100974, 2023. b. DOI: 10.1016/j.cofs.2022.100974.

MORA, Leticia; ARISTOY, M. Concepción; TOLDRÁ, Fidel. Bioactive peptides. *Em: Encyclopedia of Food Chemistry*. [s.l.] : Elsevier, 2018. p. 381–389. DOI: 10.1016/B978-0-08-100596-5.22397-4.

MORA, Leticia; GALLEGO, Marta; ARISTOY, M. Concepción; REIG, Milagro; TOLDRÁ, Fidel. Bioactive peptides. *Em: Innovative Thermal and Non-Thermal Processing, Bioaccessibility and Bioavailability of Nutrients and Bioactive Compounds*. [s.l.] : Elsevier, 2019. p. 333–345. DOI: 10.1016/B978-0-12-814174-8.00012-3.

MORA, Leticia; TOLDRÁ, Fidel. Advanced enzymatic hydrolysis of food proteins for the production of bioactive peptides. **Current Opinion in Food Science**, [*S. l.*], v. 49, p. 100973, 2023. DOI: 10.1016/j.cofs.2022.100973.

MORRIS, Connor J.; CORTE, Dennis Della. Using molecular docking and molecular dynamics to investigate protein-ligand interactions. **Modern Physics Letters B**, [*S. l.*], v. 35, n. 08, p. 2130002, 2021. DOI: 10.1142/S0217984921300027.

NAITHANI, Sushma; KOMATH, Sneha Sudha; NONOMURA, Arthur; GOVINDJEE, Govindjee. Plant lectins and their many roles: Carbohydrate-binding and beyond. **Journal of Plant Physiology**, [*S. l.*], v. 266, p. 153531, 2021. DOI: 10.1016/j.jplph.2021.153531.

NASRI, M. Protein Hydrolysates and Biopeptides. *Em: [s.l: s.n.]*. p. 109–159. DOI: 10.1016/bs.afnr.2016.10.003.

NIELSEN, P. M.; PETERSEN, D.; DAMBMANN, C. **Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis** **Food Chemistry and Toxicology JFS: Food Chemistry and Toxicology**. [s.l: s.n.].

NONGONIERMA, Alice B.; FITZGERALD, Richard J. Unlocking the biological potential of proteins from edible insects through enzymatic hydrolysis: A review. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, [*S. l.*], v. 43, p. 239–252, 2017. DOI: 10.1016/j.ifset.2017.08.014.

ÖZTÜRK, Hale İnci; ORAÇ, Aysun. Harvesting bioactive peptides from sustainable protein sources: Unveiling technological and functional properties through in silico analyses. **Food and Humanity**, [*S. l.*], v. 2, p. 100294, 2024. DOI: 10.1016/j.foohum.2024.100294.

PAN, Li; LIU, Yan; LAN, Hainan; BAO, Nan; ZHAO, Yuan; SUN, Hui; QIN, Guixin; FAROUK, Mohammed Hamdy. Biological Mechanisms Induced by Soybean Agglutinin Using an Intestinal Cell Model of Monogastric Animals. **Frontiers in Veterinary Science**, [*S. l.*], v. 8, 2021. DOI: 10.3389/fvets.2021.639792.

PANDA, Prashanta Kumar et al. Antitumor effect of soybean lectin mediated through reactive oxygen species-dependent pathway. **Life Sciences**, [*S. l.*], v. 111, n. 1–2, p. 27–35, 2014. a. DOI: 10.1016/j.lfs.2014.07.004.

PANDA, Prashanta Kumar et al. Antitumor effect of soybean lectin mediated through reactive oxygen species-dependent pathway. **Life Sciences**, [S. l.], v. 111, n. 1–2, p. 27–35, 2014. b. DOI: 10.1016/j.lfs.2014.07.004.

PEREDO-LOVILLO, Audry; HERNÁNDEZ-MENDOZA, Adrián; VALLEJO-CORDOBA, Belinda; ROMERO-LUNA, Haydee Eliza. Conventional and in silico approaches to select promising food-derived bioactive peptides: A review. **Food Chemistry**: X, [S. l.], v. 13, p. 100183, 2022. DOI: 10.1016/j.fochx.2021.100183.

PETER, Swathik Clarancia; DHANJAL, Jaspreet Kaur; MALIK, Vidhi; RADHAKRISHNAN, Navaneethan; JAYAKANTHAN, Mannu; SUNDAR, Durai. Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR): Modeling Approaches to Biological Applications. *Em*: **Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology**. [s.l.] : Elsevier, 2019. p. 661–676. DOI: 10.1016/B978-0-12-809633-8.20197-0.

QIN, Pingxu; WANG, Taoran; LUO, Yangchao. A review on plant-based proteins from soybean: Health benefits and soy product development. **Journal of Agriculture and Food Research**, [S. l.], v. 7, p. 100265, 2022. DOI: 10.1016/j.jafr.2021.100265.

RIBEIRO, Ana Cristina; FERREIRA, Ricardo; FREITAS, Regina. Plant Lectins: Bioactivities and Bioapplications. *Em*: [s.l.: s.n.]. p. 1–42. DOI: 10.1016/B978-0-444-64056-7.00001-5.

RIVAS-VELA, Carlos I.; AMAYA-LLANO, Silvia L.; CASTAÑO-TOSTADO, Eduardo; CASTILLO-HERRERA, Gustavo A. Protein Hydrolysis by Subcritical Water: A New Perspective on Obtaining Bioactive Peptides. **Molecules**, [S. l.], v. 26, n. 21, p. 6655, 2021. DOI: 10.3390/molecules26216655.

RIVERO-PINO, Fernando; MILLAN-LINARES, Maria C.; MONTSERRAT-DE-LA-PAZ, Sergio. Strengths and limitations of in silico tools to assess physicochemical properties, bioactivity, and bioavailability of food-derived peptides. **Trends in Food Science & Technology**, [S. l.], v. 138, p. 433–440, 2023. DOI: 10.1016/j.tifs.2023.06.023.

ROY, Uttam K.; LAVIGNAC, Nathalie; RAHMAN, Azizur M.; NIELSEN, Birthe V. Purification of lectin and Kunitz trypsin inhibitor from soya seeds. **Journal of Chromatographic Science**, [S. l.], v. 56, n. 5, p. 436–442, 2018. DOI: 10.1093/chromsci/bmy018.

RUBEENA, Abdul Salam; PREETHAM, Elumalai. Antimicrobial properties and phenoloxidase activation of the lectin isolated from kadal shrimp (*Metapenaeus dobsoni*). **Fish & Shellfish Immunology**, [S. l.], v. 90, p. 118–125, 2019. DOI: 10.1016/j.fsi.2019.04.305.

SÁ, Amanda Gomes Almeida; MORENO, Yara Maria Franco; CARCIOFI, Bruno Augusto Mattar. Food processing for the improvement of plant proteins digestibility. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [S. l.], v. 60, n. 20, p. 3367–3386, 2020. a. DOI: 10.1080/10408398.2019.1688249.

- SÁ, Amanda Gomes Almeida; MORENO, Yara Maria Franco; CARCIOFI, Bruno Augusto Mattar. Food processing for the improvement of plant proteins digestibility. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [S. l.], v. 60, n. 20, p. 3367–3386, 2020. b. DOI: 10.1080/10408398.2019.1688249.
- SALDANHA DO CARMO, Cátia; RIEDER, Anne; VARELA, Paula; ZOBEL, Hanne; DESSEV, Tzvetelin; NERSTEN, Solveig; GABER, Sara M.; SAHLSTRØM, Stefan; KNUTSEN, Svein Halvor. Texturized vegetable protein from a faba bean protein concentrate and an oat fraction: Impact on physicochemical, nutritional, textural and sensory properties. **Future Foods**, [S. l.], v. 7, p. 100228, 2023. DOI: 10.1016/j.fufo.2023.100228.
- SINGH, Ram Sarup; WALIA, Amandeep Kaur; KENNEDY, John F. Structural aspects and biomedical applications of microfungus lectins. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 134, p. 1097–1107, 2019. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.05.093.
- SOUSA DE OLIVEIRA, Tamires; FREITAS-SILVA, Otniel; MENDONÇA KLUCZKOVSKI, Ariane; HENRIQUE CAMPELO, Pedro. Potential use of vegetable proteins to reduce Brazil nut oil oxidation in microparticle systems. **Food Research International**, [S. l.], v. 137, p. 109526, 2020. DOI: 10.1016/j.foodres.2020.109526.
- SUI, Xiaonan; ZHANG, Tianyi; JIANG, Lianzhou. Soy Protein: Molecular Structure Revisited and Recent Advances in Processing Technologies. **Annual Review of Food Science and Technology**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 119–147, 2021. DOI: 10.1146/annurev-food-062220-104405.
- SURYA ULHAS, Rutwick; RAVINDRAN, Rajeev; MALAVIYA, Alok; PRIYADARSHINI, Anushree; TIWARI, Brijesh K.; RAJAURIA, Gaurav. A review of alternative proteins for vegan diets: Sources, physico-chemical properties, nutritional equivalency, and consumer acceptance. **Food Research International**, [S. l.], v. 173, p. 113479, 2023. DOI: 10.1016/j.foodres.2023.113479.
- TAN, Seok Tyug; TAN, Seok Shin; TAN, Chin Xuan. Soy protein, bioactive peptides, and isoflavones: A review of their safety and health benefits. **PharmaNutrition**, [S. l.], v. 25, p. 100352, 2023. DOI: 10.1016/j.phanu.2023.100352.
- TANG, Chunya; JIANG, Xingyi; LIU, Changqi; WASHBURN, Brian K.; SATHE, Shridhar K.; RAO, Qinchun. Effect of temperature on structural configuration and immunoreactivity of pH-stressed soybean (*Glycine max*) agglutinin. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 442, p. 138376, 2024. DOI: 10.1016/j.foodchem.2024.138376.
- TOLOI, Marley Nunes Vituri; BONILLA, Silvia Helena; TOLOI, Rodrigo Carlo; SILVA, Helton Raimundo Oliveira; NÄÄS, Irenilza de Alencar. Development Indicators and Soybean Production in Brazil. **Agriculture**, [S. l.], v. 11, n. 11, p. 1164, 2021. DOI: 10.3390/agriculture11111164.
- TONG, Xiaohong; LIAN, Ziteng; MIAO, Liming; QI, Baokun; ZHANG, Shuang; LI, Yang; WANG, Huan; JIANG, Lianzhou. An innovative two-step enzyme-assisted aqueous extraction for the production of reduced bitterness soybean protein

hydrolysates with high nutritional value. **LWT**, [*S. l.*], v. 134, p. 110151, 2020. DOI: 10.1016/j.lwt.2020.110151.

TSANEVA, Mariya; VAN DAMME, Els J. M. 130 years of Plant Lectin Research. **Glycoconjugate Journal**, [*S. l.*], v. 37, n. 5, p. 533–551, 2020. DOI: 10.1007/s10719-020-09942-y.

UDENIGWE, Chibuike C. Bioinformatics approaches, prospects and challenges of food bioactive peptide research. **Trends in Food Science & Technology**, [*S. l.*], v. 36, n. 2, p. 137–143, 2014. DOI: 10.1016/j.tifs.2014.02.004.

VAN HOLLE, Sofie; VAN DAMME, Els. Distribution and Evolution of the Lectin Family in Soybean (*Glycine max*). **Molecules**, [*S. l.*], v. 20, n. 2, p. 2868–2891, 2015. DOI: 10.3390/molecules20022868.

VERFAILLIE, Diète; JANSSEN, Frederik; VAN ROYEN, Geert; WOUTERS, Arno G. B. A systematic study of the impact of the isoelectric precipitation process on the physical properties and protein composition of soy protein isolates. **Food Research International**, [*S. l.*], v. 163, p. 112177, 2023. DOI: 10.1016/j.foodres.2022.112177.

WANG, Ying Ying; WANG, Chen Ying; WANG, Shuang Tong; LI, Ying Qiu; MO, Hai Zhen; HE, Jin Xing. Physicochemical properties and antioxidant activities of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) seed protein hydrolysates obtained with different proteases. **Food Chemistry**, [*S. l.*], v. 345, p. 128765, 2021. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.128765. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814620326273>.

WU, Jinhong; WANG, Jun; WANG, Shaoyun; RAO, Pingfan. Lunatin, a novel lectin with antifungal and antiproliferative bioactivities from *Phaseolus lunatus* billb. **International Journal of Biological Macromolecules**, [*S. l.*], v. 89, p. 717–724, 2016. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.04.092.

WU, Tianyi; LIN, Ling; ZHANG, Xinyi; WANG, Xinyue; DING, Jian. Covalent modification of soy protein hydrolysates by EGCG: Improves the emulsifying and antioxidant properties. **Food Research International**, [*S. l.*], v. 164, p. 112317, 2023. a. DOI: 10.1016/j.foodres.2022.112317.

WU, Tianyi; LIN, Ling; ZHANG, Xinyi; WANG, Xinyue; DING, Jian. Covalent modification of soy protein hydrolysates by EGCG: Improves the emulsifying and antioxidant properties. **Food Research International**, [*S. l.*], v. 164, p. 112317, 2023. b. DOI: 10.1016/j.foodres.2022.112317.

XU, Jingwen; WANG, Weiqun; LI, Yonghui. Dough properties, bread quality, and associated interactions with added phenolic compounds: A review. **Journal of Functional Foods**, [*S. l.*], v. 52, p. 629–639, 2019. DOI: 10.1016/j.jff.2018.11.052.

XU, Yue et al. Characterization of the structure, antioxidant activity and hypoglycemic activity of soy (*Glycine max* L.) protein hydrolysates. **Food Research International**, [*S. l.*], v. 173, p. 113473, 2023. a. DOI: 10.1016/j.foodres.2023.113473.

XU, Yue et al. Characterization of the structure, antioxidant activity and hypoglycemic activity of soy (*Glycine max* L.) protein hydrolysates. **Food Research International**, [S. l.], v. 173, p. 113473, 2023. b. DOI: 10.1016/j.foodres.2023.113473.

YANG, Fu-jia; CHEN, Xu; HUANG, Mu-chen; YANG, Qian; CAI, Xi-xi; CHEN, Xuan; DU, Ming; HUANG, Jian-lian; WANG, Shao-yun. Molecular characteristics and structure–activity relationships of food-derived bioactive peptides. **Journal of Integrative Agriculture**, [S. l.], v. 20, n. 9, p. 2313–2332, 2021. DOI: 10.1016/S2095-3119(20)63463-3.

YING, Fan; LIN, Shiqi; LI, Jingyu; ZHANG, Xuewu; CHEN, Gu. Identification of monoamine oxidases inhibitory peptides from soybean protein hydrolysate through ultrafiltration purification and in silico studies. **Food Bioscience**, [S. l.], v. 44, p. 101355, 2021. DOI: 10.1016/j.fbio.2021.101355.

ZHANG, Min et al. Progress in soybean functional genomics over the past decade. **Plant Biotechnology Journal**, [S. l.], v. 20, n. 2, p. 256–282, 2022. DOI: 10.1111/pbi.13682.

ZHANG, Qiaozhi; TONG, Xiaohong; LI, Yang; WANG, Huan; WANG, Zhongjiang; QI, Baokun; SUI, Xiaonan; JIANG, Lianzhou. Purification and Characterization of Antioxidant Peptides from Alcalase-Hydrolyzed Soybean (*Glycine max* L.) Hydrolysate and Their Cytoprotective Effects in Human Intestinal Caco-2 Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 67, n. 20, p. 5772–5781, 2019. DOI: 10.1021/acs.jafc.9b01235.

ZHANG, Xiaoying; DU, Hengjun; XU, Zheng; WANG, Ying; GUO, Xiaojing; XIAO, Hang; LI, Yang. A novel alcalase-hydrolyzed soybean meal hydrolysates prepared using by-product material: Structure, function property, sensory property, and biological activity. **Food Bioscience**, [S. l.], v. 56, p. 103324, 2023. a. DOI: 10.1016/j.fbio.2023.103324.

ZHANG, Xiaoying; YIN, Chengpeng; HAO, Jiaqi; MA, Danhua; LI, Ziyu; LI, Yang; QI, Baokun. Improving the biological activity, functional properties, and emulsion stability of soybean meal hydrolysate via covalent conjugation with polyphenol. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 422, p. 136255, 2023. b. DOI: 10.1016/j.foodchem.2023.136255.

ZHANG, Yinxiao; ZHANG, Chi; WANG, Jingyi; WEN, Yanchao; LI, He; LIU, Xinqi. The investigation of soybean protein isolates and soybean peptides assisting *Lactobacillus plantarum* K25 to inhibit *Escherichia coli*. **Current Research in Food Science**, [S. l.], v. 8, p. 100662, 2024. DOI: 10.1016/j.crf.2023.100662.

ZHANG, Yue; ROMERO, Hollman Motta. Exploring the structure-function relationship of Great Northern and navy bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein hydrolysates: A study on the effect of enzymatic hydrolysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 162, p. 1516–1525, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.08.019.

ZHU, Peng-yu et al. Elucidating the interaction mechanism of rice glutelin and soybean 11S globulin using multi-spectroscopy and molecular dynamics simulation methods.

Food Chemistry, [S. l.], v. 442, p. 138615, 2024. DOI: 10.1016/j.foodchem.2024.138615.

ZHUBI-BAKIJA, Fjolla et al. The impact of type of dietary protein, animal versus vegetable, in modifying cardiometabolic risk factors: A position paper from the International Lipid Expert Panel (ILEP). **Clinical Nutrition**, [S. l.], v. 40, n. 1, p. 255–276, 2021. DOI: 10.1016/j.clnu.2020.05.017.

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos com a realização desta tese permitiram a elaboração de dois (02) artigos científicos.

ARTIGO 1: Peptídeos de lectina de soja (*Glycine max* L. Merrill) como agentes anticâncer: Uma Análise *In silico* e *In Vitro*

Submetido a revista Food Research International – Fator de impacto: 8,1

ARTIGO 2: Produção de Peptídeos Bioativos a partir da hidrólise enzimática de Lectina de Soja: Análise Estrutural, digestibilidade e Predições *In silico*.

Submetido a revista Food Bioscience – Fator de impacto: 5,2

ARTIGO 1: Peptídeos de lectina de soja (*Glycine max* L. Merrill) como agentes anticâncer: Uma Análise *In silico* e *In Vitro*

Resumo

A lectina de soja é uma proteína com diversas bioatividades, mas há poucas informações sobre peptídeos derivados desta proteína. Este estudo hidrolisou uma fração lectínica de soja usando as enzimas alcalase, papaína e um processo sequencial alcalase-papaína. Os peptídeos obtidos foram sequenciados por LC-MS/MS e identificados por métodos de bioinformática. Abordagens *in silico*, como PeptideRanker, PepCalc, ToxinPred e CSM-peptides, foram utilizadas para avaliar o potencial bioativo dos peptídeos derivados da lectina. A atividade anticâncer dos peptídeos foi prevista usando a ferramenta pdCSM-cancer, e a atividade antiproliferativa *in vitro* foi avaliada pelo método MTT, o mecanismo de morte celular foi estudado por citometria de fluxo. A hidrólise enzimática da fração de lectina de soja resultou em 393, 387 e 489 peptídeos para os tratamentos com alcalase (HA), papaína (HP) e sequencial (HAP), respectivamente. A avaliação da predição de bioatividade indicou potenciais atividades anti-inflamatória, antiangiogênica, de inibição do quorum-sensing e anticâncer. O hidrolisado HAP, apresentou o número de sequências bioativas, e foi escolhido para predição de atividade anticâncer e avaliação antiproliferativa *in vitro*. O HAP mostrou potencial bioativo contra células de câncer de mama, cólon, pulmão, leucemia, próstata, renal e do sistema nervoso central, destacando-se o peptídeo KFVPKQPNMILQ pela maior atividade contra diversas linhagens celulares. Análises de docking molecular com proteínas relacionadas à apoptose celular (XIAP, Caspase-3 e Caspase-7) revelaram que as características químicas do peptídeo e suas ligações de hidrogênio com essas proteínas podem ser responsáveis por sua atividade anticâncer. A atividade *in vitro* do HAP contra células de carcinoma de cólon das linhagens HT-29 e LoVo mostrou que tanto a fração de lectina quanto o hidrolisado reduziram a viabilidade celular, com o hidrolisado apresentando melhor atividade, com CI_{50} de 188,9 $\mu\text{g/mL}$ e 175,6 $\mu\text{g/mL}$ para HT-29 e LoVo, respectivamente. Conclui-se que a hidrólise foi eficiente em produzir peptídeos bioativos com atividade melhorada em relação à fração de lectina, com potencial atividade anticâncer observada *in vitro* e *in silico*.

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença que ocorre em órgãos ou na corrente sanguínea que altera a funcionalidade adequada do órgão. Se estima que, em 2020, houve cerca de 10 milhões de mortes, sendo considerado como a segunda principal causa de morte no mundo. Uma das principais estratégias de tratamento é a quimioterapia, porém os pacientes enfrentam diversos efeitos colaterais, devido à toxicidade da medicação para células normais, resistência, inespecificidade e altos custos. Assim, há uma crescente demanda por estudos que explorem moléculas que contenham efeitos anticancerígenos (AYAZ et al., 2022; KONOZY; OSMAN, 2022; SEUKEP; KUETE, 2024).

As lectinas são proteínas com potencial de identificar e se ligar a carboidratos, que normalmente são consideradas tóxicas e antinutricionais. Entretanto, lectinas de vegetais têm ganhado popularidade por apresentar propriedades ligadas à ação anticancerígena como estimular o sistema imune, reduzir a proliferação celular e induzir a apoptose (BEKTAS; KAPTAN, 2023; GAUTAM et al., 2020; JABEEN et al., 2024).

Dentre as lectinas vegetais, a lectina de soja apresenta atividade anticancerígena, atuando na membrana da célula tumoral, levando a uma diminuição da proliferação celular, induzindo citotoxicidade específica em macrófagos do tumor, desencadeando à apoptose. Ao testar a atividade da lectina de soja em ratos com linfoma de Dalton Panda et al. (2014), observaram que a administração, de 1-2 mg/kg de peso corporal, da lectina, durante 10 dias, levou à indução da autofagia e morte celular (PAN et al., 2023)

Na literatura já constam diversos peptídeos derivados das proteínas de soja que exercem bioatividade, entre elas atividade anticancerígena. Os peptídeos anti câncer são uma alternativa promissora às drogas convencionais por sua biocompatibilidade, amplo espectro de atividade e mecanismo único de morte. São uma classe de peptídeos curtos (10-60 aminoácidos), geralmente anfipáticos, contendo mais de 2 cargas positivas líquidas e um alto teor de aminoácidos hidrofóbicos (IWANIYAK et al., 2020; WU et al., 2024; YAN et al., 2024; ZHANG et al., 2024).

Medicamentos à base de peptídios disponíveis para venda, como leuprolide, gossorelina e octreotida, movimentam anualmente no mercado um faturamento superior a 1 bilhão de dólares. Dentre as vantagens desse tipo de molécula estão a imunogenicidade reduzida e o custo melhorado. Os estudos nesse campo estão em pleno avanço e, por mais que já existam evidências que favoreçam o uso de peptídeos no tratamento de câncer, mais pesquisas são necessárias para entender sua gama de efeitos e sua aplicação no

tratamento (NOROUZI; MIRMOHAMMADI; HOUSHDAR TEHRANI, 2022; XIONG et al., 2024; YAN et al., 2024a).

O crescente interesse em peptídeos derivados de alimentos com propriedades biológicas, leva ao desenvolvimento de novos métodos que aprimorem as limitações das abordagens convencionais para produção e identificação desses peptídeos bioativos. A partir do uso de ferramentas de bioinformática (*in silico*), pode-se realizar uma triagem e identificação de potentes peptídeos anticancerígenos, o que auxilia o pesquisador na tomada de decisão em relação aos peptídeos com maior potencial a serem estudados (KORDI et al., 2023; MANZOOR; SINGH; GANI, 2022a; WONG; WONG; LEE, 2024).

O rápido desenvolvimento da tecnologia nas últimas décadas levou as estratégias baseadas em bioinformática a avançarem muito rapidamente, tendo atualmente uma grande quantidade de dados biológicos estruturados em diversos bancos de dados. O uso da inteligência artificial e de *machine learning* permite fazer previsões cada vez mais precisas da atividade desses peptídeos, suas interações e resultados funcionais (DAROIT; BRANDELLI, 2021; ÖZTÜRK; ORAÇ, 2024).

Diversas pesquisas com peptídeos obtidos através de hidrólise enzimática de isolados proteicos de soja já foram desenvolvidas, entretanto, são escassos os estudos que avaliam o potencial anticarcinogênico de peptídeos gerados pela hidrólise da lectina de soja. Dessa forma, essa pesquisa tem como objetivo obter e caracterizar peptídeos obtidos por hidrólise enzimática da lectina de soja e avaliar a potencial atividade anticâncer através de avaliação *in silico* e *in vitro*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Purificação da lectina de soja

Os grãos de soja foram adquiridos do comércio local (João Pessoa – Paraíba - Brasil), em seguida moídos e peneirados em malha de aço inox (80 mesh) para obtenção de um pó fino. O pó foi delipidado utilizando hexano seguindo metodologia de Verfaille et al., 2023.

A extração das proteínas foi realizada de acordo com metodologia de Fraguas et al., 2003. O extrato proteico liofilizado foi diluído em tampão Tris-HCl 25 mM pH 8,1 e aplicado em coluna de troca iônica DEAE – Sephacel (Cytiva, Uppsala, Sweden) pré-equilibrada com o tampão de diluição da amostra. As proteínas negativamente carregadas

foram eluídas em fluxo constante de 1 mL/min, com um gradiente de NaCl de 0 – 750 mM, foram coletadas frações de 2 mL e o eluído monitorado a 280 nm. Para avaliar a presença da lectina nas frações coletadas, foi realizada a atividade hemaglutinante utilizando uma solução de hemácias a 2%, utilizando eritrócitos humanos do tipo A (PANDA et al., 2014). Dessa forma, baseado na absorbância a 280 nm e na atividade hemaglutinante, as frações contendo lectina foram coletadas, dialisadas contra água e liofilizadas.

A proteína liofilizada (fração troca iônica) foi suspensa em tampão fosfato 20 mM pH 7,5, na concentração de 25 mg/mL, e aplicada em coluna de exclusão molecular Sephadex G-50 (GE Healthcare Life Sciences, Inc., Maidstone, UK). A eluição foi realizada com o mesmo tampão de diluição da amostra em um fluxo constante de 0,2 mL/min, sendo o eluído monitorado a 280 nm. As frações foram avaliadas quanto sua atividade hemaglutinante e aquelas que apresentaram hemaglutinação foram coletadas, dialisadas contra água e liofilizadas. Sendo obtida a fração lectina de soja.

2.2 Hidrólise enzimática

Os peptídeos da lectina de soja foram obtidos usando as enzimas alcalase e papaína, e a partir da hidrólise subsequente com as mesmas enzimas de acordo com a metodologia de Tong et al., 2020, com pequenas modificações. A fração lectina foi solubilizada em tampão Tris-HCl 25 mM pH 8,0 a uma concentração de 1% (p/v) e aquecida a 55 °C antes da adição da enzima. Para a hidrólise, a solução foi incubada com alcalase (5% v/p; pH 8,0; 55 °C) ou papaína (5% p/p; pH 7,0; 55 °C) por 4 horas. Em seguida, a enzima foi inativada aquecendo a amostra a 85°C por 10 minutos. A solução foi então centrifugada, dialisada e liofilizada. Para a hidrólise subsequente, repetiu-se o processo de hidrólise com alcalase e após a inativação enzimática, ajustou-se o pH da solução para 7,0, com HCl 0,1M, e a papaína adicionada (5% p/p; pH 7,0; 55 °C) sendo incubada por mais 4h. Resultando nos hidrolisados proteicos de alcalase (HA), papaína (HP) e a combinação de ambas (HAP).

O grau de hidrólise foi avaliado através de metodologia descrita por NIELSEN; PETERSEN; DAMBMANN, 2001, pelo método de OPA (o-ftaldialdeído). Para realização da análise foram preparadas soluções de 1 mg/mL de cada hidrolisado, e utilizou-se serina (0,1 mg/mL) como padrão e água deionizada como branco. Para o cálculo, considerou-se as constantes $\alpha = 0,970$; $\beta = 0,342$ e $h_{tot} = 7,8$.

2.3 Identificação dos peptídeos gerados por hidrólise

2.3.1 Espectrometria de massas

2.3.2 Sequenciamento dos peptídeos

Os arquivos de dados brutos (.d) foram carregados no PEAKS Studio v.11 (Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, ON, Canadá), onde o fluxo de trabalho padrão PEAKS, incorporando sequenciamento de peptídeos de novo e PeaksDB, foi usado para identificação de peptídeos. Os espectros MS/MS foram comparados com o banco de dados de proteoma de referência Glycine max (Soybean), disponível em UniProtKB (Proteome ID UP000008827, contendo 74.862 entradas de proteínas, com data de lançamento em abril de 2024).

Para a identificar os peptídeos do produto hidrolisado, foi estabelecida uma tolerância de massa do precursor de 10 ppm, com tolerância de massa do fragmento de 0,02 Da. A clivagem enzimática inespecífica foi permitida e a oxidação da metionina (+15,99 Da) foi considerada uma modificação variável.

Para identificação da fração proteica, a tripsina foi definida como enzima específica, permitindo até duas clivagens perdidas. A carbamidometilação na cisteína (+57,02 Da) foi usada como uma modificação fixa, e a oxidação na metionina (+15,99 Da) foi uma modificação variável. Uma taxa de descoberta falsa (FDR) de 1% foi aplicada para peptídeos na análise de hidrolisado, e pelo menos um peptídeo único necessário para identificação de proteínas.

2.4 Avaliação *in silico* dos peptídeos obtidos pela hidrólise enzimática da lectina de soja

Os peptídeos identificados nas amostras de hidrolisado da fração lectina de soja foram avaliados quanto à bioatividade utilizando o servidor PeptideRanker, que se baseia em uma nova rede neural N-para-1 baseada na probabilidade do peptídeo ser bioativo. Esse servidor tem um limite de calibração (que varia de 0 a 1) onde os resultados acima de 0,5 significam que o peptídeo pode ser dito como bioativo (RIVERO-PINO; MILLAN-LINARES; MONTSERRAT-DE-LA-PAZ, 2023).

Assim, os peptídeos que apresentaram pontuação acima de 0,5 foram avaliados quanto às características químicas usando as seguintes ferramentas: O ExPasy-Compute (http://web.expasy.org/compute_pi/) foi usado para estimar a hidropatia média geral (GRAVY) e o índice de Bowman. A carga líquida em pH neutro, o ponto isoelétrico do peptídeo e a solubilidade em água foram acessados pelo PepCalc.com - Peptide property calculator da Innovagen (<https://pepcalc.com/>). A ferramenta ToxinPred (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/toxinpred/index.html>) foi utilizada para acessar a toxicidade, a hidrofobicidade, a hidropatia, a anfipaticidade, a hidrofiliabilidade e o hidrogênio líquido.

Após esses testes, os peptídeos com uma pontuação de bioatividade acima de 0,8 foram avaliados quanto às suas prováveis atividades funcionais por uma ferramenta de machine learning: CSM-peptides (https://biosig.lab.uq.edu.au/csm_peptides/), que permite a identificação de 8 tipos diferentes bioatividades que podem estar relacionadas as sequências de peptídeos, sendo estas: Antiangiogênico (AAP), Antibacteriano (ABP), Anticâncer (ACP), Anti-inflamatório (AIP), Antiviral (AVP), Capacidade de penetração de células (CPP), Quórum sensing (QSP) e Ligação de superfície (SBP).

O tratamento que apresentou maiores quantidades de peptídeos com propriedades anticâncer foi selecionado para realizar um ensaio com diferentes tipos de câncer e linhagens celulares por uma nova plataforma de predição: pdCSM-cancer (https://biosig.lab.uq.edu.au/pdcs_m_cancer/). Essa ferramenta consiste em 74 modelos de regressão com dez tipos de tecidos diferentes que são validados por meio de dados experimentais baseados na mínima concentração de inibição do crescimento (CI_{50%}). As sequências de peptídeos foram convertidos para a forma de cadeia SMILES usando a ferramenta PepSMI (<https://www.novoprolabs.com/tools/convert-peptide-to-smiles-string>).

A sequência de peptídeo que apresentou atividade no maior número de linhagens e tecidos celulares foi determinada quanto a sua estrutura química, a partir da ferramenta PepDraw (<https://pepdraw.com/>), e sua estrutura 3D pelo servidor PEP-FOLD 4 (<https://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD4/>).

As possíveis interações intermoleculares que estão envolvidas no potencial anticâncer desta sequência foram verificadas através de Docking molecular contra as proteínas XIAP, caspase-3 e caspase-7. As estruturas moleculares dos alvos foram obtidas a partir de the RCSB PDB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). O docking molecular foi realizado usando o programa AutoDock Vina e os cálculos das

energias de ligações foram realizados utilizando o algoritmo genético de Lamarckian. Os resultados das interações e as imagens 3D foram avaliados utilizando o software AutoDock Server.

2.5 Atividade antiproliferativa

2.5.1 Ensaio antiproliferativo *in vitro*

Células de adenocarcinoma de cólon humano, das linhagens HT-29 e LoVo, foram utilizadas para avaliar a citotoxicidade da fração lectina de soja e do hidrolisado. As células foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino e penicilina e incubadas a 37 °C na presença de 5% de CO₂.

As células foram plaqueadas em placa de 96 poços na concentração de 2×10^5 células/mL e colocadas para crescer por 24h nas condições anteriores antes da adição das amostras. O tratamento foi realizado a partir de diferentes concentrações (6,25 - 200 µg/mL) do isolado lectinico e hidrolisado solubilizados em tampão PBS. Após 72h de incubação, a viabilidade das células tratadas foi avaliada utilizando o método colorimétrico do MTT (Promega, Madison, WI, USA). Após a remoção do meio DMEM foram adicionados 10 µL do MTT (5 mg/mL em PBS) e as placas foram novamente incubadas (4h/ 37 °C) e em seguida foram solubilizados com a adição de 100 µL de DMSO. Os resultados foram baseados no nível de formação de cristais de formazan (coloração roxo), a partir da leitura da absorbância em 570 nm em leitor de placas (Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific) (FAHEINA-MARTINS et al., 2012).

2.5.2 Investigação da apoptose por citometria de fluxo

As células LoVo foram adicionadas em placas com 24 poços na concentração de 3×10^5 células/poço e tratadas com o extrato de lectinas e com o hidrolisado nas concentrações de 100 e 200 µg/mL ou com 5-Fluoroufacil (100 µM) por 24 h. Após os períodos de incubação, as células foram ressuspensas após remover o sobrenadante e adição de uma solução de 0,45 mM de EDTA estéril por 3 min. Em seguida as células foram centrifugadas (1.400 rpm, 5 minutos) e ressuspensas em 100 µl de tampão de

ligação e 1 µl de anexina V-Alexa Fluor 488 (Invitrogen, EUA) por 15 minutos, no escuro. Posteriormente foram adicionados 400 µl do tampão de ligação e 1 µg/mL de iodeto de propídeo (Invitrogen, EUA), realizando-se a leitura em citômetro de fluxo CYTOFLEX SRT (Beckman Coulter, EUA) com os filtros 525 (verde) e 690 (vermelho).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Grau de hidrólise

A soja vem se destacando na como uma fonte de peptídeos bioativos devido o baixo custo das matérias-primas utilizadas na sua produção, seu alto teor de proteínas e também devido à segurança no uso desses bioativos para tratamento, diferente de outras leguminosas, a soja apresenta a maioria dos aminoácidos necessário para a nutrição humana (LI et al., 2022; SWALLAH et al., 2023).

Um dos fatores chave na produção de a produção de peptídeos é a escolha da enzima proteolítica já que estas apresentam especificidade de substrato e irá permitir o desenvolvimento de peptídeos com propriedades bem definidas (MANZLOOR; SINGH; GANI, 2022).

A análise de grau de hidrólise da fração lectina demonstrou que a utilização das diferentes enzimas gerou peptídeos com diferentes graus de hidrólise ($p < 0,05$, teste de Tukey), sendo HAP (hidrolisado alcalase-papaína) o que apresentou maior grau de hidrólise $22,63^a \pm 0,10\%$, seguido do HA (hidrolisado de alcalase) $16,60^b \pm 0,10\%$ e o menor grau foi observado no HP (hidrolisado papaína) $13,27^c \pm 0,48\%$.

Hidrolisados de soja obtidos com alcalase são reportados na literatura, sendo comumente relatados graus de hidrólise maiores, quando comparados com outras enzimas, isso ocorre devido a ampla especificidade dessa enzima.

A papaína quebra preferencialmente ligações peptídicas envolvendo aminoácidos como arginina ou lisina, e que possuem uma grande cadeia lateral. Apesar de ser uma enzima de fácil obtenção e baixo custo ainda não é tão explorada para obtenção de peptídeos (TACIAS-PASCACIO et al., 2021).

Os melhores resultados verificados no HAP podem ser explicados pela alta habilidade da alcalase em hidrolisar a proteína em peptídeos de diversos pesos

moleculares expõem sítios para serem clivados na segunda etapa com a enzima papaína, diminuindo o peso molecular final (CUI et al., 2022; VOSS et al., 2019).

3.2 Características físico-químicas dos peptídeos da fração lectina de soja obtidos através da hidrólise enzimática

As características físico-químicas dos peptídeos como tamanho, solubilidade, hidrofobicidade, carga líquida, ponto isoelétrico, entre outras, são determinantes para avaliar o comportamento como bioativo e como esse peptídeo será absorvido, distribuído e absorvido e assim, alcançará o órgão alvo para realização da bioatividade (RIVERO-PINO; MILLAN-LINARES; MONTSERRAT-DE-LA-PAZ, 2023).

Através do tratamento enzimático foram obtidos 393, 387 e 489 peptídeos para os hidrolisados HA, HP e HAP, respectivamente. O peso dos peptídeos obtidos da lectina de soja e a sua extensão estão apresentados na Figura 1.

Os peptídeos obtidos do tratamento com alcalase e alcalase-papaína revelaram massa molecular variando de 6 – 2500 Da, o tratamento com papaína o tamanho entre 7 – 2100 Da. Esses resultados são importantes uma vez que, peptídeos com baixo peso molecular derivados de alimentos geralmente apresentam atividade bioativa melhor do que seus equivalentes de maior tamanho (DHAOUAFI et al., 2024).

Os dados obtidos quando comparados aos de outros autores que também hidrolisaram soja são bem variados. Farias et al., 2023, obtiveram 101 peptídeos através da hidrólise de um concentrado de soja com papaína (na proporção enzima:substrato 1:80 durante 30 min), ao hidrolisarem um concentrado proteico de soja com hidrólise sequencial com papaína e flavourzyme. Liu et al., 2024, observaram a prevalência de formação de peptídeos com peso molecular menor que 1 kDa e grau de hidrólise de 51%. Em relação a enzima alcalase, Zhang et al., 2023 observaram que a hidrólise de um farelo de soja com 5% de alcalase durante 2h produziu 537 peptídeos com peso molecular variando entre 500 – 3000 Da.

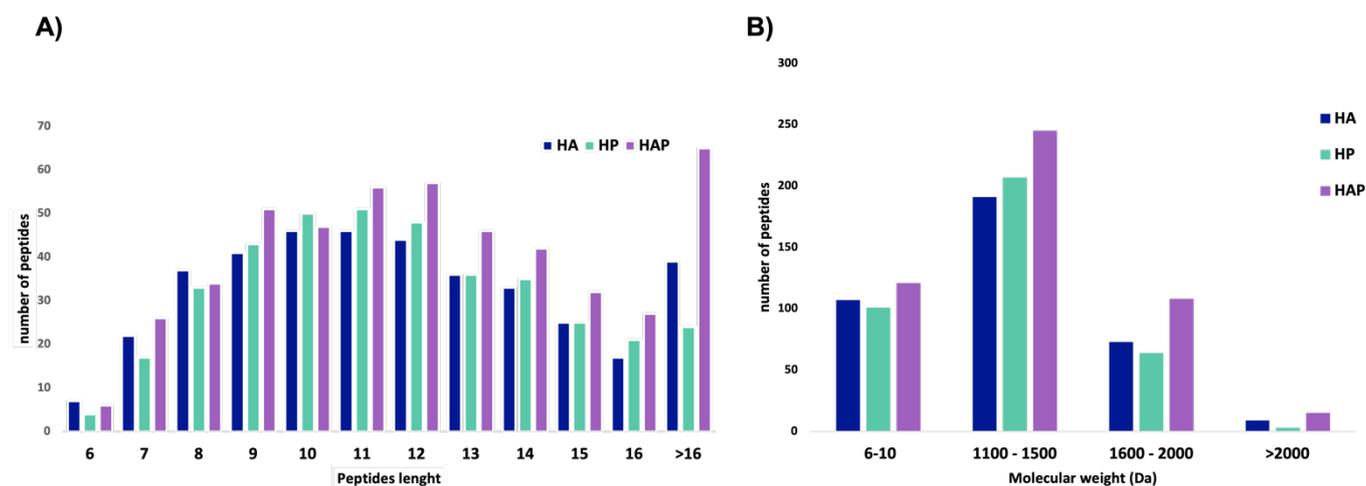


Figura 1: A) Representação do tamanho do peptídeo com base nos resíduos de aminoácidos; B) Massa molecular obtida dos peptídeos analisados. HA- hidrolisado alcalase/ HP- hidrolisado papaína/ HAP – hidrolisado alcalase-papaína.

Apesar da grande variação observada, devido ao tipo de enzima e a amostra, o comprimento da cadeia da maioria dos peptídeos bioativos varia entre 2-20 aminoácidos. Cadeias mais longas foram reportadas desempenhando atividade anticâncer e hipocolesterolêmica, como é o caso do peptídeo derivado da soja lunasin que é composto por 43 aminoácidos. Neste estudo, mais de 80% dos peptídeos obtidos nos três ensaios possuem de 7-15 resíduos de aminoácidos (ULUG; JAHANDIDEH; WU, 2021).

O diagrama de Venn (Figura 2B) revelou que 55 peptídeos, o que corresponde a 47% do total dos peptídeos são comuns nos três tratamentos de hidrolisados. O tratamento com maior número de peptídeos únicos, aproximadamente 15, foi o hidrolisado alcalase-papaína HAP, seguido do tratamento apenas alcalase. As sequências de aminoácidos dos peptídeos obtidos e suas características químicas estão apresentadas na Tabela S1.

O índice de Boman está relacionado ao potencial de ligação do peptídeo a um receptor de proteína. Peptídeos que apresentam índice de Boman elevado (superior a 2,48) podem exibir comportamento multifuncional ao serem capazes de interagir com uma variedade de proteínas (JI; UDENIGWE; AGYEI, 2019).

Nesse estudo, o tratamento HAP apresentou o maior número de sequências com índice de Boman > 2,48, com 15 sequências. Os tratamentos com papaína e alcalase apresentaram 13 e 12 sequências, respectivamente.

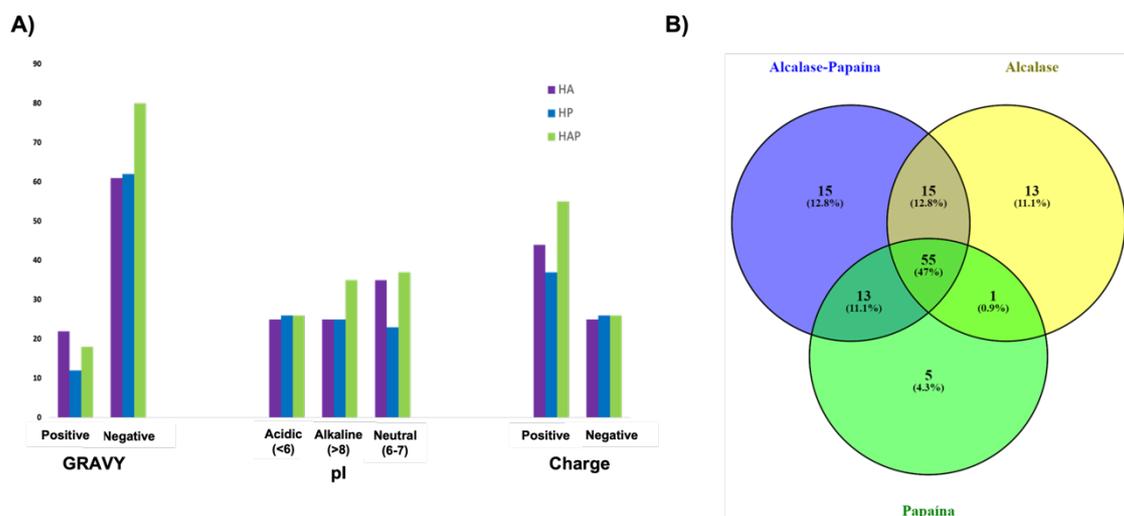


Figura 2: A) Parâmetros químicos GRAVY, ponto isoelétrico e carga avaliados nos peptídeos HP- hidrolisado papaína/ HAP – hidrolisado alcalase-papaína; B) Diagrama de Venn criado a partir dos peptídeos da lectina de soja, obtidos pela hidrólise com alcalase, papaína e hidrólise consecutiva alcalase-papaína

A hidrofobicidade dos peptídeos identificados foi avaliada pelo valor médio geral de hidropatia (GRAVY), que normalmente o índice varia entre +2 e -2. Quanto mais negativo o valor, mais hidrofílico será e quanto mais positivo, maior será sua hidrofobicidade. A avaliação desse fator é de grande relevância, visto que a hidrofobicidade exerce um papel fundamental na interação do peptídeo com moléculas-alvo (DHAOUAFI et al., 2024).

Os resultados dos tratamentos estão apresentados na Figura 2B, onde observa-se que o tratamento HAP apresentou o maior número de peptídeos com valores negativos, sendo estes mais hidrofílicos. Em relação à carga, observou-se que há a prevalência de peptídeos catiônicos. Cargas positivas facilitam a interação dos peptídeos com outras moléculas, sendo esta uma das principais características dos peptídeos antimicrobianos. Geralmente, esses peptídeos reconhecem seus alvos via interação eletrostática com a superfície negativamente carregada da membrana lipídica das bactérias (DESLOUCHES et al., 2020; TINCHO; GABERE; PRETORIUS, 2016).

A análise de predição de toxicidade dos peptídeos demonstrou que todos os peptídeos avaliados foram identificados como não tóxicos. De acordo com a literatura, peptídeos com baixo peso molecular são considerados não tóxicos e possuem baixo potencial alergênico, quando comparados a estrutura intacta da proteína, dessa forma,

estes podem ser utilizados com segurança nos setores terapêuticos e alimentícios (TACIAS-PASCACIO et al., 2020).

3.3 Predição das bioatividades desempenhadas pelos peptídeos da lectina de soja

As lectinas são glicoproteínas com potencial de aplicação nas áreas de biotecnologia, diagnósticos, implicações farmacológicas e terapêuticas. A lectina de soja foi relacionada a bioatividades como atividade antitumoral, antifúngica, antiviral e antibacteriana. Pesquisas apontam que tanto as proteínas, na sua forma intacta, quanto aminoácidos livres ou peptídeos podem desempenhar essas funções biológicas. No entanto, os peptídeos têm maior propensão a apresentar essas atividades devido o seu potencial de serem mais bem absorvidos pelo epitélio do intestino delgado (BASSON et al., 2021; PEIGHAMBARDOUST et al., 2021)

A geração dos peptídeos bioativos ocorre pela hidrólise da proteína parental em fragmentos menores, através de enzimas endógenas ou exógenas. Diferentes fatores como fonte proteica, condições de processamento, peso molecular e distribuição de carga, sequência e composição dos aminoácidos podem influenciar diretamente a funcionalidade dos peptídeos bioativos (CATALINI et al., 2021; NINGRUM et al., 2022).

Todos os peptídeos obtidos nos três tratamentos (HA, HP e HAP) apresentaram a predição de exercer alguma atividade biológica. A atividade desempenhada e a ocorrência em cada tratamento estão representados no gráfico de árvore da Figura 3.

Na Figura 4A, são ilustrados os resíduos de aminoácidos presentes nos peptídeos HAP, destacando a prevalência dos resíduos de Prolina (P, Pro), Asparagina (N, Asn), Isoleucina (I, Ile) e Serina (S, Ser), com frequência de 16,5%, 10,9%, 8,1% e 6,6%, respectivamente. Não foram observados nenhum resíduo de Cisteína nos peptídeos dos tratamentos avaliados, devido a ausência desse resíduo na sequência da lectina de soja.

A presença de prolina na cadeia peptídica está intrinsecamente relacionada a determinação da estrutura e do dobramento do peptídeo, sendo frequentemente encontradas nas curvas da cadeia desempenhando um papel específico nas voltas das folhas β (CATALINI et al., 2021).

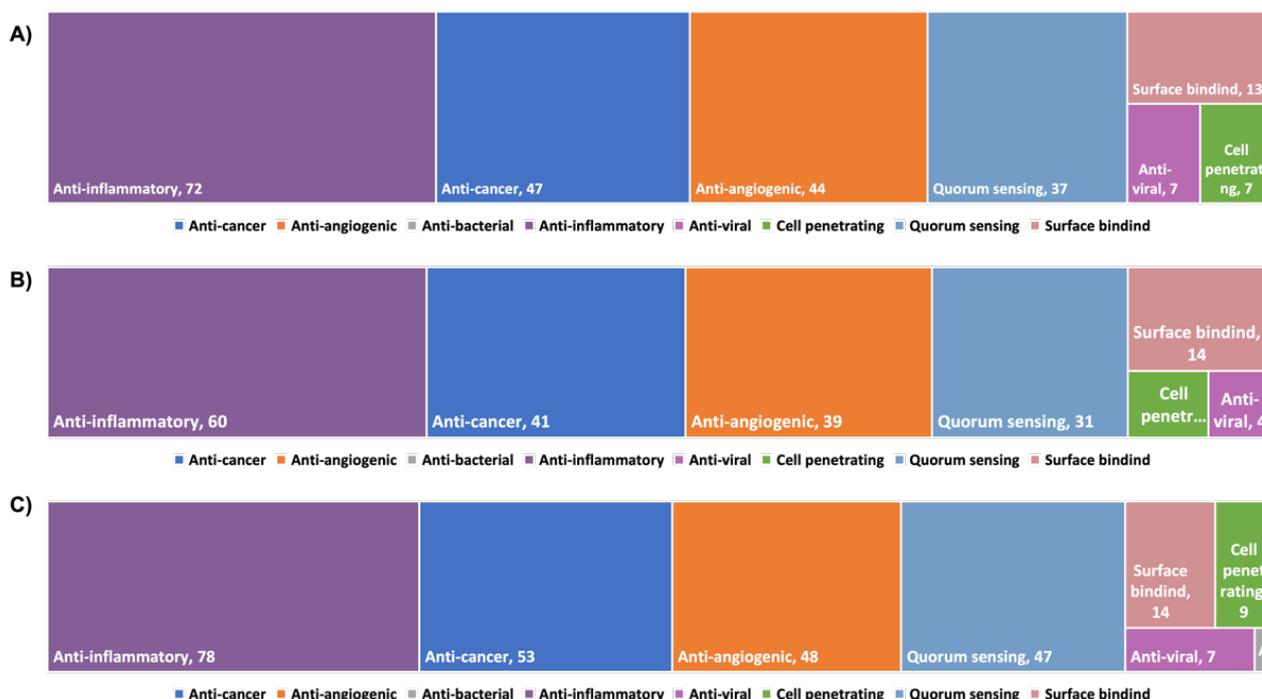


Figura 3: Diagrama de árvore com as bioatividades previstas para os peptídeos em cada tratamento. A) Hidrolisado alcalase; B) Hidrolisado papaína; C) Hidrolisado alcalase-papaína

O diagrama de Venn (Figura 4B) ilustra as bioatividades mais prevalentes apresentadas pelos peptídeos obtidos através da hidrólise sequencial alcalase-papaína. Esse tratamento demonstrou o maior número de peptídeos possíveis de exercer as diferentes funcionalidades e de acordo com DALIRI; OH; LEE, 2017 peptídeos que exercem múltiplas atividades são mais versáteis por poder desempenhar múltiplas atividades benéficas ao mesmo tempo.

Aproximadamente 30% das sequências apresentaram atividade anti-inflamatória em todos os tratamentos, a inflamação é uma resposta do sistema imune a danos ao corpo. Quando a homeostase é desfavorável, os macrófagos podem causar danos ao tecido, levando a formação de radicais livres e outros elementos oxidantes que são tóxicos para as células (KUSUMAH; GONZALEZ DE MEJIA, 2022).

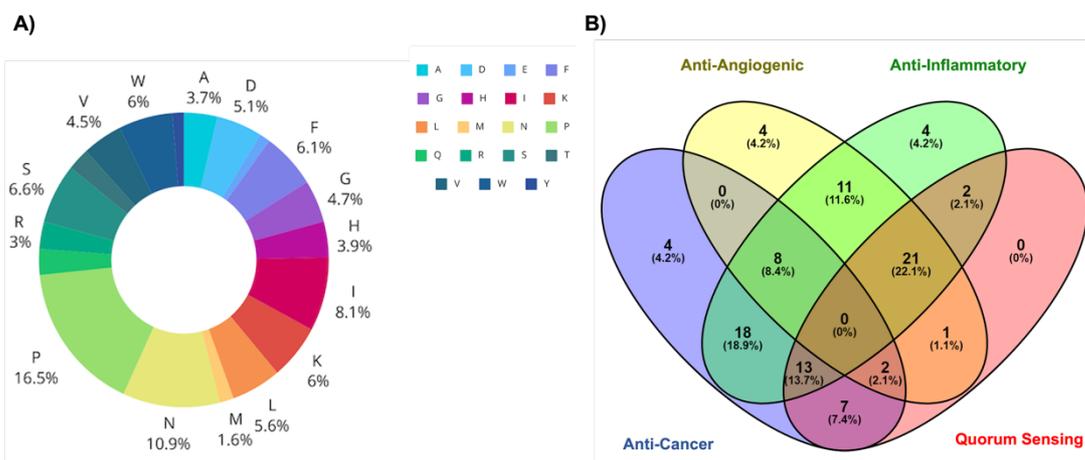


Figura 4: A) Resíduos de aminoácidos presentes nos peptídeos HAP e sua incidência; B) Diagrama de Venn das bioatividades mais recorrentes apresentadas pelo hidrolisado HAP.

A atividade anti-inflamatória dos peptídeos está relacionada a presença de aminoácidos hidrofóbicos como valina, isoleucina e prolina e aminoácidos carregados positivamente (histidina, arginina e lisina). Quando os aminoácidos hidrofóbicos estão presentes no N-terminal pode melhorar a interação entre o peptídeo e a membrana celular promovendo a sua atividade anti-inflamatória. Estudos *in vitro* revelaram que o mecanismo anti-inflamatório da proteína de soja ou dos hidrolisados está relacionada a inibição do fator de transcrição NF- κ B e também da subunidade p-38, o que sugere que a atividade está relacionada a via MAPK (RIVERO-PINO; MILLAN-LINARES; MONTSERRAT-DE-LA-PAZ, 2023).

A partir da hidrólise sequencial com papaína e flavourzyme, Liu e colaboradores observaram uma maior atividade anti-inflamatória *in vitro* desses peptídeos quando comparados que apresentaram peptídeos de massa molecular menor (hidrolisados de alcalase-flavourzyme). Os resultados levaram os autores concluírem que o peso molecular influencia na atividade anti-inflamatória dos peptídeos, entretanto, as características da sequência de aminoácidos foi o fator determinante. Peptídeos com cadeias ramificadas no N-terminal podem regular a fosforilação da proteína Akt e p-I κ B, enquanto o TLR4 e iNOS podem ser inibidos pela presença de arginina no C-terminal (LIU et al., 2024; WEN et al., 2022).

A angiogênese é o processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos existentes, sendo um facilitador de patologias como doença vascular da retina, doenças cardiovasculares e processos inflamatórios. Com isto, esse é um campo de estudo que tem crescido nos últimos anos com a descoberta de terapias antiangiogênicas (LATH

et al., 2023a; LIN et al., 2022). Em diversos tipos de câncer esse é um processo vital para o crescimento de tumores e de metástase. Atualmente, estão sendo utilizados algumas drogas antiangiogênicas baseadas no bloqueio da via de sinalização do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF-A)/ (VEGFR-2) no tratamento de alguns tipos de câncer, muitas vezes em combinação com outras terapias antitumorais (ZANJANCHI et al., 2022).

Proteínas com atividade de inibir a angiogênese são grandes e possuem estruturas complexas o que dificulta na penetração nos tecidos alvo. Dessa forma, os peptídeos surgem como uma nova geração terapêutica, por apresentarem a vantagem de ser uma molécula pequena, sendo mais estável e mais biodisponível, com alta especificidade e potência (ZANJANCHI et al., 2022).

Ao avaliar 135 sequências de peptídeos antiangiogênicos obtidas através de artigos científicos e patentes, Laengsri et al., 2019 observaram a abundância de resíduos dos aminoácidos Cys, Ser, Gly, Pro e Arg nas regiões de N e C-terminais. A atividade foi favorecida principalmente naqueles peptídeos com Cys, Ser e Arg no C-terminal, concluindo que a cisteína é o aminoácido mais importante para inibição da angiogênese (LAENGSRI et al., 2019). Por outro lado, ao avaliar sequências de hexapeptídeos selecionados pela inibição da interação entre o VEGF e seu receptor VEGF-R em banco de dados, Bae e colaboradores mostraram que peptídeos com mais resíduos de Arg, Lys e His apresentaram maiores atividades antioangiogênicas, tendo o peptídeo RRKRRR apresentado o bloqueio do crescimento e metástase de células tumorais de carcinoma de cólon humano (HM7) transplantada em camundongos (BAE et al., 2000).

Dessa forma pode-se concluir que os peptídeos antiangiogênicos apresentam cadeias com no máximo 50 resíduos de aminoácidos, com estrutura de folhas beta antiparalelas, com incidência alta de resíduos hidrofóbicos e catiônicos (BLANCO et al., 2018; LAENGSRI et al., 2019).

Quorum sensing (QS) ou comunicação célula-célula, é um sistema de comunicação bacteriana através do qual as bactérias produzem moléculas sinalizadoras para comunicação célula a célula. Esse processo, é crucial para formação de fatores de virulência em bactérias, expressão de genes para formação de biofilmes, estruturas formadoras de esporos e associação mútua com o auxílio de moléculas sinalizadoras (autoindutoras) (TUNG; QUOC, 2021; VADAKKAN et al., 2024).

A inibição do quorum sensing é uma estratégia atraente às atuais práticas de controle bacteriano. Ao invés de eliminar as bactérias, o bloqueio da comunicação célula

a célula pode inibir a expressão de fenótipos com menor probabilidade de desenvolvimento de resistência. Estudos demonstram que esse tipo de alternativa protege o hospedeiro das toxinas que são resultado da atividade excessiva das bactérias (SILVA; ARAÚJO, 2021; TUNG; QUOC, 2021).

Com a incidência de bactérias patogênicas multirresistentes o tratamento antimicrobiano tradicional tem demonstrado certa ineficácia. Existe uma preocupação no desenvolvimento de novas metodologias para o tratamento dessas infecções, pesquisas que relacionam a atividade de peptídeos com a inibição da comunicação célula-célula ainda são escassas. Gasu et al. (2019) projetaram dois peptídeos sintéticos com 6 resíduos de aminoácidos, cada um contendo 50% de resíduos hidrofóbicos e 50% de resíduos ácidos ou básicos (1. LIVRRK e 2. LIVRHK) e avaliaram seus efeitos sobre a formação de biofilme e produção de alguns fatores de resistência da cepa PAO1 de *P. aeruginosa*. Os resultados demonstraram que os peptídeos foram eficazes em inibir a formação de biofilmes, sendo quanto maior a concentração da dose de peptídeo maior a atividade, como também em inibir a expressão de genes reguladores do quorum sensing (*lasI*, *lasR*, *rhlI*, *rhlR*), dessa forma, os autores sugerem que peptídeos catiônicos representam uma estrutura importante para encontrar novos compostos anti-QS (TAHA et al., 2019).

Uma análise *in silico* da composição de aminoácidos de peptídeos inibidores de biofilme (BIPs) realizada por Gupta et al. (2016), mostrou que os BIPs são formados preferencialmente por aminoácidos aromáticos carregados positivamente e são ricos em lisina e leucina, o potencial de atividade inibitória de biofilme desses peptídeos foi relacionada principalmente a inibição do QS (GUPTA et al., 2016).

Propriedades de inibição do crescimento bacteriano são excessivamente exploradas em estudos sobre peptídeos bioativos, e esse mecanismo de ação está relacionado a produção de moléculas sinalizadoras envolvidas no quórum sensing, com isto, a falta de literatura sobre esse tema pode oferecer um campo de possibilidades em pesquisas futuras (HIAGO BELLAVER et al., 2024).

3.3 Peptídeos anticâncer

A lectina de soja (SBA) demonstrou atividade anticancerígena contra vários tipos de câncer como leucemia, câncer de cólon, mama, estômago e meningiomas. No câncer de mama, são observadas alterações nos padrões de expressão de açúcar nas superfícies celulares. Essas alterações foram identificadas pela ligação específica da SBA com essas

células, dessa forma, a SBA tem valor prognóstico para o câncer de mama, onde quanto maior a afinidade lectina com o tecido, pior o prognóstico para o paciente (CASAÑAS PIMENTEL et al., 2016).

Embora os resultados com a SBA intacta serem promissores e frequentemente explorados, há ainda poucas pesquisas com peptídeos gerados pela hidrólise da SBA. Com base nisso, realizamos 3 processos de hidrólise: com alcalase (HA), papaína (HP) e a combinação dos dois consecutivamente (HAP). Esses processos demonstraram ser efetivos em produzir peptídeos com atividade anticâncer a partir da lectina de soja.

O resultado desse processo resultou em 141 peptídeos com potencial atividade anticâncer, sendo o maior número de sequências bioativas observada nos peptídeos obtidos pelo processo consecutivo (HAP), que apresentou 53 sequências (Fig 3C).

Os métodos tradicionais para o combate ao câncer apesar de serem bem estabelecidos e na maioria das vezes serem eficazes, são acompanhados de efeitos colaterais e até danos a tecidos saudáveis (ZHANG et al., 2024).

A partir do sequenciamento destes peptídeos, foram realizadas análises de predição *in silico* da atividade antiproliferativa utilizando células de câncer de mama, pulmão, colón, leucemia, próstata, renal, pele e do sistema nervoso central, com diversas linhagens. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela S2.

Os peptídeos anticâncer (PACs) são uma classe de pequenos peptídeos (5-50 aminoácidos), possuem estruturas anfipáticas contendo 2 ou mais cargas positivas líquidas e um alto conteúdo de resíduos hidrofóbicos (COMERT ONDER; AY, 2022). Diversos mecanismos contribuem para esses efeitos incluindo inibição da angiogênese, interação proteína-proteína, inibição de enzimas, além da significativa indução de apoptose em tumores (ZAFAR et al., 2021).

Na avaliação da Tabela S2, pode-se observar que o peptídeo KFVPMKQPNMILQ que apresenta 12 resíduos de aminoácidos, dos quais 58% são hidrofóbicos, peso molecular de 1,44 kDa e pI de 10,69.

O peptídeo, NH₂- Lys - Phe - Val - Pro - Lys - Gln - Pro - Asn - Met - Ile - Leu - Gln -COOH, apresenta carga líquida 2+, devido a presença dos dois resíduos de lisina, sendo considerado catiônico, apresentou atividade para diversas linhagens avaliadas de diferentes células de câncer, com exceção do câncer de pulmão de pequenas células. O peptídeo, suas estruturas bioquímicas e químicas estão apresentadas na Figura 5.

Com isto, observa-se a presença no peptídeo de todas as características levantadas na literatura para atividade anticâncer de peptídeos, justificando sua atividade contra diversas linhagens das células de câncer avaliadas.

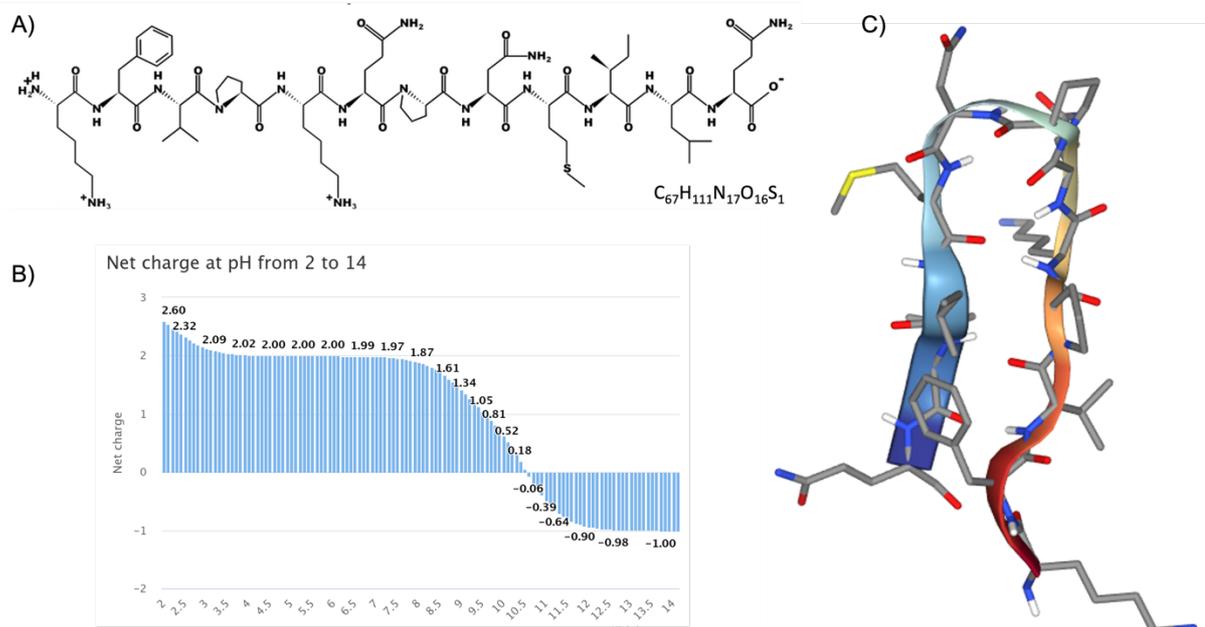


Figura 5: Estruturas química (A) e bioquímica (C) do peptídeo KLVPKQPNIILQ; B) carga líquida do peptídeo em diferentes faixas de pH.

A estrutura tridimensional do peptídeo HAP (Figura 6) se apresenta na forma de folha - β , estabilizada por ligações de hidrogênio entre os aminoácidos. Peptídeos anticâncer, principalmente derivados de plantas, se apresentam na forma de folha β -pregueada, muitas vezes possuem duas ou mais pontes dissulfeto e ainda apresentam melhores perspectivas em modelos de drogas anticâncer por ser menos tóxicas para células de tecidos normais (LATH et al., 2023).

A atividade anticâncer de peptídeos derivados de soja vem sendo relatada na literatura na investigação em vários tipos de câncer. Um dos principais peptídeos derivados da soja é a lunasina, peptídeo composto por 43 resíduos de aminoácidos e peso molecular de 5,5 kDa. Ao avaliar a atividade da lunasina contra células de câncer de mama (MDA-MB-231), Hao et al. (2020) observaram a inibição no crescimento das células de 43% utilizando uma concentração de 4 mg/mL do peptídeo (HAO et al., 2020).

HSIEH et al., 2022, testaram a atividade dos peptídeos contra células de câncer de boca (HCS-3), e verificaram inibição de 53% no peptídeo obtido com termosilina com CI_{50} de 1,69 mg/mL e 15% no hidrolisado de bromelina com CI_{50} de 4,01 mg/mL. CHEN et al., 2019 hidrolisaram um isolado de soja preta com alcalase e isolaram um peptídeo

Leu/Ile-Val-Pro-Lys (L/I-VPK) de 455 Da, esse peptídeo foi avaliado quanto sua atividade antiproliferativa em células de câncer cervical humano, câncer de fígado e câncer de pulmão. O peptídeo apresentou alto potencial citotóxico contra essas células apresentando CI_{50} de 0,22; 0,15 e 0,32 μ M para as células de câncer de fígado, pulmão e cervical, respectivamente.

A pesquisa com peptídeos bioativos é ampla, com peptídeos anticâncer despertando interesse devido à resistência e baixa seletividade dos medicamentos convencionais. Há evidências promissoras do potencial desses peptídeos no tratamento do câncer. Entretanto, são necessários mais estudos para compreender melhor seus efeitos e aplicação clínica em pacientes oncológicos (LISCANO; OÑATE-GARZÓN; DELGADO, 2020; YAN et al., 2024).

3.4 Docking molecular

O docking molecular tem se tornado uma ferramenta cada vez mais popular na predição dos mecanismos de interação entre os peptídeos e as moléculas receptoras. Essa abordagem pode fornecer soluções para doenças de importância mundial como hipertensão, câncer, e o COVID-19 (PEREDO-LOVILLO et al., 2022).

O processo de apoptose celular é programado e essencial nas células durante o desenvolvimento animal, homeostase e respostas imunológicas. Um dos alvos que tem sido intensamente estudados no desenvolvimento de novas moléculas ativas, é a família das caspases. Até o momento se identificaram 14 caspases, sendo as caspase-2,-3,-6,-7,-8,-9 e -10 descritas como caspases apoptóticas (EL-SHEREF et al., 2020).

A docagem entre o peptídeo escolhido e as proteínas relacionadas a apoptose de células de câncer, foi avaliada da perspectiva da afinidade de ligação e da posição dessa ligação. A afinidade está relacionada à força de interação, onde quanto menor o valor de afinidade da ligação, mais forte e mais estável é a interação entre as moléculas ((NURHAYATI et al., 2022; SIDDIQUI et al., 2021).

O potencial de ligação entre o peptídeo KFVPKQPNMILQ e as proteínas XIAP, caspase-3 e caspase-7 foi visualizada utilizando o software AutoDock Vina. Os resultados mostraram que o peptídeo se encaixou bem nos sítios ativos das proteínas-alvo, como apresentado na Figura 6. A energia de ligação do peptídeo com a XIAP, caspase-3 e caspase-7 foram de -5,2, -6,5 e -6,4 kcal/mol, respectivamente.

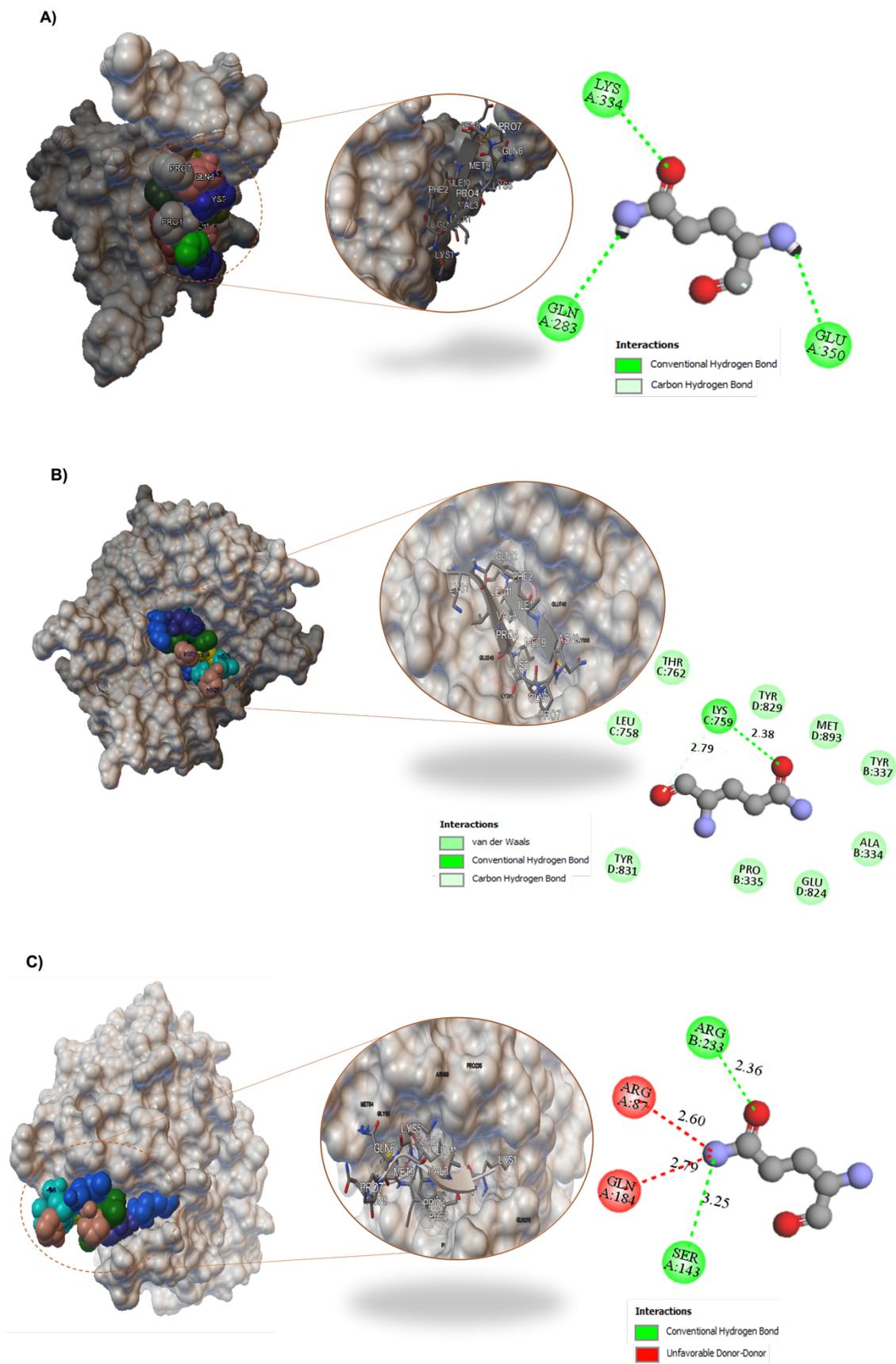


Figura 6: Docking molecular do peptídeo KFVPKQP com as proteínas A) XIAP; B) Caspase-3; C) Caspase-7

As células cancerígenas podem escapar da morte induzida pelos tratamentos devido a presença de proteínas pró-sobrevivência altamente expressas, o que é uma das principais razões de fracasso no tratamento com quimioterapia (OPO et al., 2021).

Uma causa importante de câncer é a deficiência da apoptose celular, que está ligada a uma proteína anti-apoptótica chamada XIAP. Essa proteína, da família IAP, é capaz de neutralizar a caspase-9 via o domínio BIR3, enquanto as caspases executoras-3 e 7 são neutralizadas pelo domínio BIR2.

Estudos estruturais e bioquímicos demonstraram que o mecanismo de interação da XIAP com a caspase-3, -7 e -9, está relacionado ao domínio BIR2 que utiliza tanto o sulco interativo quanto as regiões de ligação para obstruir totalmente os sítios ativos das caspases e inibir sua atividade proteolítica (SARVAGALLA et al., 2021).

Conforme mostrado na Figura 7, observa-se que o peptídeo interage com o inibidor de apoptose XIAP (Fig. 6A) por meio de ligações de hidrogênio convencional com Gln283, Lys334 e Glu350, além de ligação de hidrogênio com carbono com Glu350.

Em relação a Caspase-3 (Fig. 6B) as interações são feitas por ligações de hidrogênio convencional com Lys759, ligação de hidrogênio com carbono com Lys759 e interações de Van der Waals com outras moléculas.

Na Caspase-7 (Fig. 6C) através de ligações de hidrogênio convencional em Ser143 e Arg233, havendo também presença de duas interações desfavoráveis de doador-doador com Arg87 e Gln184.

Uma das principais ligações entre as moléculas é a ligação de hidrogênio, responsável por estabilizar a estrutura tridimensional de proteínas e ácidos nucleicos. A presença desse tipo de ligação entre o peptídeo e as moléculas analisadas demonstra a estabilidade dos complexos formados entre eles (NINGRUM et al., 2022).

A aplicação do docking molecular entre o peptídeo KFVPKQPNMILQ e as proteínas XIAP, caspase-3 e caspase-7, demonstra que tanto as características químicas, já discutidas no tópico anterior, quanto as ligações de hidrogênio podem ser responsáveis por sua potencial biotividade. Esses resultados auxiliam na elucidação dos mecanismos de ação do peptídeo em relação a moléculas relacionadas a apoptose.

3.5 Avaliação *in vitro* da atividade antiproliferativa frente às células tumorais

3.5.1 Ensaio MTT

A partir dos resultados obtidos *in silico*, foi determinado que os peptídeos obtidos pela hidrólise sequencial de alcalase com papaína (HAP) seriam utilizados para a realização do ensaio *in vitro*.

Os gráficos apresentados na Figura 7, ilustram o potencial citotóxico do isolado lectínico e do HAP testado nas linhagens tumorais humanas HT-29 (figura 7A) e LoVo (figura 7B). O ensaio do MTT, realizado por um período de 72 horas de exposição, demonstraram que as amostras foram citotóxicas para ambas as células tumorais nas maiores concentrações analisadas.

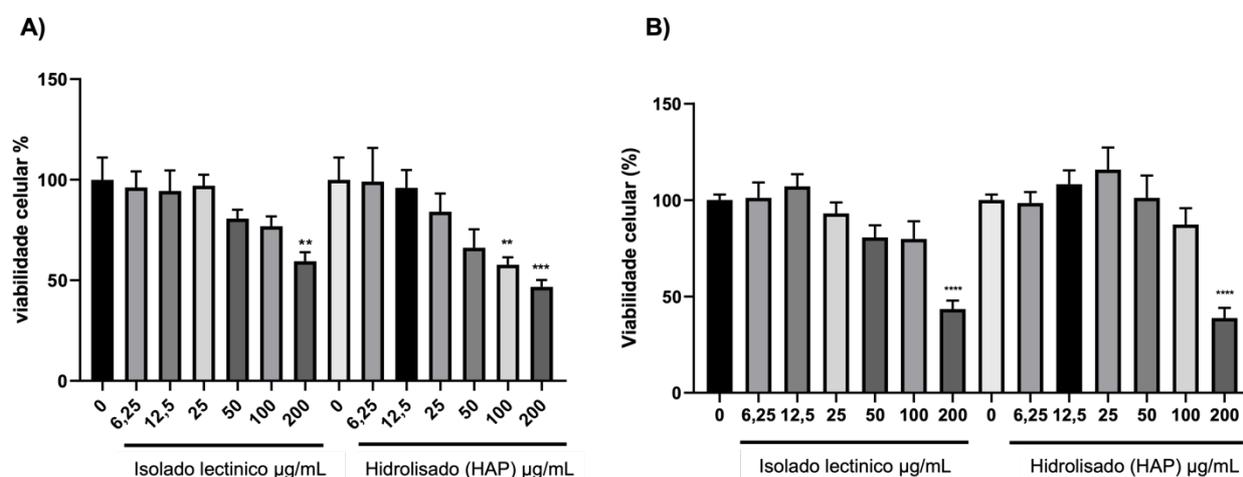


Figura 7: **A)** Efeito do extrato de lectina e do hidrolisado de lectina sobre a viabilidade da linhagem tumoral HT-29 em 72h (n=3), **B):** Efeito do extrato de lectina e do hidrolisado de lectina sobre a viabilidade da linhagem tumoral LoVo em 72h (n=3), analisada pela técnica de MTT. Os dados representam à média de três experimentos em triplicata, sendo expressos como média \pm erro padrão, e foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ em relação ao controle (células apenas com meio DMEM).

Os valores de CI_{50} obtidos para a linhagem HT-29 foram de 258,4 e 188,9 $\mu\text{g/mL}$, para o isolado e HAP, respectivamente. Para a linhagem LoVo as CI_{50} obtidas foram de 193,2 e 175,6 $\mu\text{g/mL}$. Observa-se que as células LoVo foram mais responsivas tanto ao isolado quanto ao hidrolisado, tendo a amostra HAP apresentado uma maior potência de inibição.

De acordo com Fernández-Tome et al. (2020) há uma relação inversa entre o consumo de soja e o risco de desenvolvimento de câncer de colón retal. O que pode estar associado aos efeitos quimiopreventivos de compostos presentes nos grãos como compostos fenólicos (isofalvonas e saponinas), proteínas e peptídeos bioativos, como

lectinas e inibidores de proteases. Ao avaliar o efeito do peptídeo lunasina obtida de forma sintética contra células de câncer de colón da linhagem HCT-116, os autores observaram um efeito dose dependente na inibição das células, obtendo um CI_{50} de 107 μ M (FERNÁNDEZ-TOMÉ et al., 2020).

Peptídeos de soja obtidos pela simulação da digestão *in vitro* foi realizada por González-Montoya et al. (2018). Ao testar a atividade de peptídeos, de tamanho entre 5-10 kDa, frente células de câncer de cólon das linhagens HT-29 e HCT-116 os autores obtiveram CI_{50} de 2,22 mg/mL e 1,49 mg/mL, respectivamente. Ao analisar a espectrometria de massas desses peptídeos, observou-se que os peptídeos continham pelo menos um resíduo de glutamina, que foi associado a atividade dos peptídeos frente a essas linhagens.

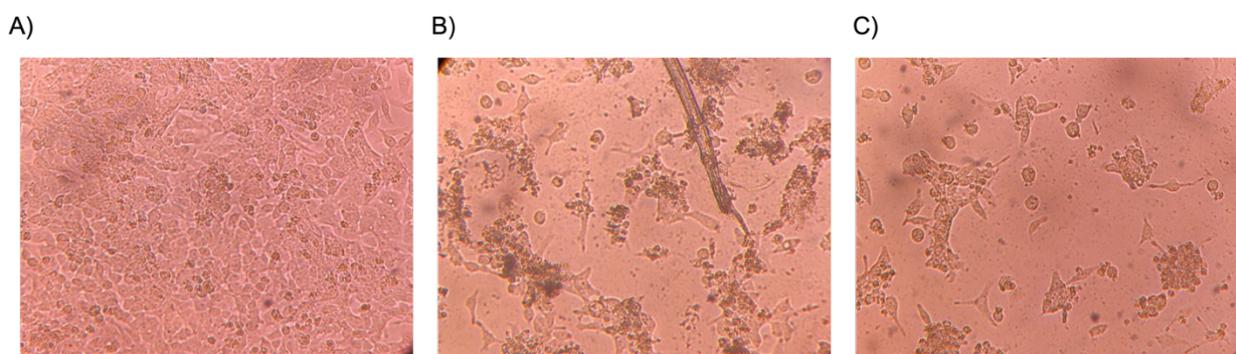


Figura 8: Imagens microscópicas das placas com células LoVo A) amostra controle – apenas células; B) células com isolado lectínico; e C) células com hidrolisado HAP

A análise microscópica das placas (Figura 8A) das células LoVo não tratadas ilustra as células dispersas em grande quantidade e uniformemente. Em contraste, o tratamento das células com 200 μ g/mL da fração lectina (figura 8B) e HAP (figura 8C) provocaram alterações marcantes na morfologia, principalmente em relação ao tamanho e a forma. As alterações mais proeminentes, foram observadas no tratamento com o HAP, corroborando com os dados obtidos pelo ensaio do MTT.

3.5.2 Análise da indução de apoptose

Para determinar qual o tipo de morte celular desencadeada pela fração lectina, bem como pelo HAP, foi realizado o ensaio de detecção da externalização da

fosfatidilserina por citometria de fluxo. As células foram tratadas com as concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$ da fração lectina ou do HAP.

Após 24 h de incubação a fração lectina não induziu morte celular de forma significativa, seja por apoptose ou necrose (Figura 9A). Diferentemente do HAP, que promoveu um aumento significativo de células em apoptose, passando de 11,38% no controle para 20,24 e 23,98% nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$ do HAP (Figura 10A), respectivamente, indicando uma atividade dose-dependente.

Por outro lado, o percentual de morte induzido pelo 5-Fluorouracil foi significativo em relação ao controle, passando de 11,38% no controle para 24,15% na concentração de 100 μM .

O 5-FU (5-fluorouracil) é um medicamento amplamente utilizado no tratamento do câncer, onde age interferindo na síntese do DNA das células cancerosas, causando interrupção da replicação celular (GHAFOURI-FARD et al., 2021). Os resultados obtidos nesse trabalho são promissores para HAP para linhagem LoVo, uma vez que se assemelha na maior dose ao 5-FU.

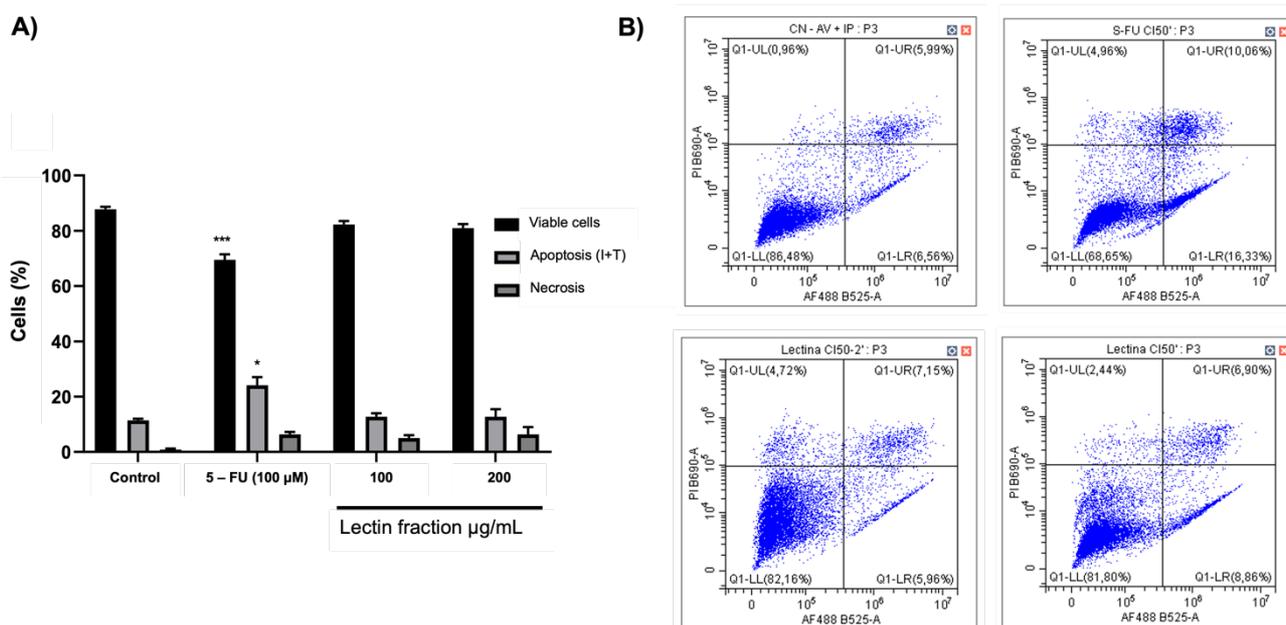


Figura 9: A) O gráfico de barras com a média de três experimentos em duplicata e expressos como média \pm erro padrão; B) Imagens representativas do ensaio de indução de apoptose, quantificada por citometria de fluxo na linhagem humana LoVo (adenocarcinoma colorretal), após 24h de incubação com extrato de lectina na CI_{50} (200 $\mu\text{g/mL}$) e $CI_{50/2}$ (100 $\mu\text{g/mL}$) ou o controle positivo 5-FU (100 μM), usando o método de marcação com anexinaV/iodeto de propídeo. Quadrante inferior esquerdo: % células viáveis. Quadrante inferior direito: % células em apoptose precoce. Quadrante superior direito: % de células em apoptose tardia. Quadrante superior esquerdo: % células em necrose.

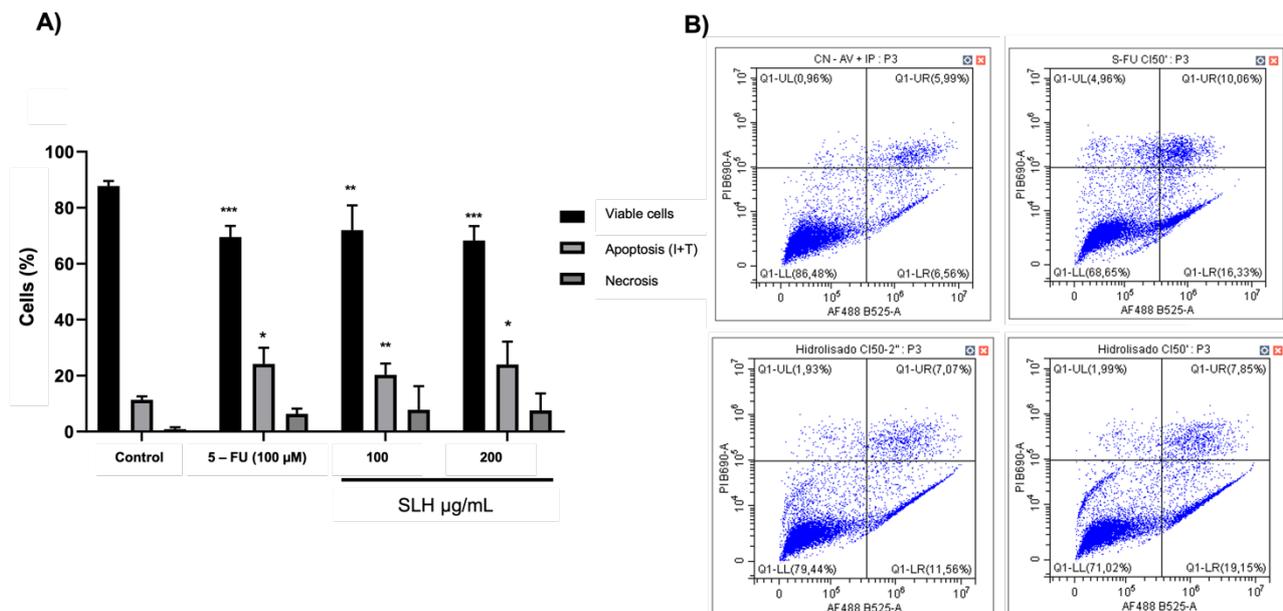


Figura 10: A) O gráfico de barras representa a média de três experimentos em duplicata e expressos como média \pm erro padrão; B) Imagens representativas do ensaio de indução de apoptose, quantificada por citometria de fluxo na linhagem humana LoVo (adenocarcinoma colorretal), após 24h de incubação, com hidrolisado de lectina com a CI_{50} (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e $CI_{50/2}$ (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou o controle positivo 5-FU (100 μM), usando o método de marcação com anexinaV/iodeto de propídeo. Quadrante inferior esquerdo: % células viáveis. Quadrante inferior direito: % células em apoptose precoce. Quadrante superior direito: % de células em apoptose tardia. Quadrante superior esquerdo: % células em necrose.

As imagens de citometria de fluxo da fração lectina (Figura 9B) mostram que o tratamento das células com a CI_{50} quando comparados ao controle negativo resultou em uma diminuição na quantidade de células viáveis, de 86,48% para 81,80%. No apoptose inicial observou-se um aumento de 6,56% no controle negativo para 8,86% na amostra tratada, e um aumento na necrose de 0,96% para 2,44%.

Ao tratar as células com a CI_{50} do hidrolisado SLH (Figura 10B), houve uma diminuição das células viáveis de 86,46% para 71,02% em comparação ao controle negativo. A apoptose inicial aumentou para 19,15% nas células tratadas, comparado a 6,56% no grupo controle negativo. Esse valor foi superior à apoptose inicial causada pelo 5-FU, uma droga utilizada no tratamento do câncer, que foi de 16,33%. Para apoptose tardia e necrose, os valores aumentaram de 5,95% e 0,96% no controle negativo para 7,85% e 1,99%, respectivamente.

Os dados obtidos *in silico*, guiaram os experimentos e corroboraram com aqueles observados *in vitro*. Os dados *in vitro* validaram os dados *in silico*, mostrando que os hidrolisados HAP podem exercer atividade anticâncer.

4 CONCLUSÕES

A bioatividade da lectina de soja foi comprovada em vários estudos. O emprego da hidrólise enzimática consecutiva dessa proteína, utilizando enzimas microbianas e vegetais (alcalase e papaína), permitiu a obtenção de um hidrolisado com atividade antiproliferativa em células de câncer de colon retal, gerando uma inibição da viabilidade das células com CI_{50} para a linhagem HT-29 de 258,4 e 188,9 $\mu\text{g/mL}$, para a fração lectina e HAP, respectivamente. Para a linhagem LoVo as CI_{50} obtidas foram de 193,2 e 175,6 $\mu\text{g/mL}$, além disso o HAP induziu a apoptose celular conforme demonstrado pela citometria de fluxo.

Através da análise *in silico*, foi demonstrado que os peptídeos obtidos apresentaram atividades bioativas como anti-inflamatória, antiangiogênica, inibição da comunicação célula-célula, entre outras.

O peptídeo KFVPKQPNMILQ, apresentou atividade contra diversas linhagens de diferentes tipos de câncer para realização do docking molecular.

O estudo das interações do peptídeo com proteínas relacionadas a apoptose em células cancerígenas, revelou que as características químicas e as ligações de hidrogênio feitas pelo peptídeo podem ser responsáveis pela potencial atividade anticâncer do peptídeo.

Há uma lacuna na literatura de informações acerca de peptídeos oriundos da lectina de soja. Para melhor demonstração do potencial bioativo desse trabalho, novos estudos precisam ser conduzidos para confirmar essa bioatividade, incluindo a síntese do peptídeo com o potencial anticâncer e mais ensaios *in vitro* e *in vivo*.

5 REFERÊNCIAS

AYAZ, Muhammad et al. Underlying Anticancer Mechanisms and Synergistic Combinations of Phytochemicals with Cancer Chemotherapeutics: Potential Benefits and Risks. **Journal of Food Quality**, [S. l.], v. 2022, p. 1–15, 2022. DOI: 10.1155/2022/1189034.

BAE, Dong-Goo; GHO, Yong-Song; YOON, Wan-Hee; CHAE, Chi-Bom. Arginine-rich Anti-vascular Endothelial Growth Factor Peptides Inhibit Tumor Growth and Metastasis by Blocking Angiogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 275, n. 18, p. 13588–13596, 2000. DOI: 10.1074/jbc.275.18.13588.

BASSON, Abigail Raffner; AHMED, Saleh; ALMUTAIRI, Rawan; SEO, Brian; COMINELLI, Fabio. Regulation of Intestinal Inflammation by Soybean and Soy-Derived Compounds. **Foods**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. 774, 2021. DOI: 10.3390/foods10040774.

BEKTAS, Suna; KAPTAN, Engin. Therapeutic potential of lectins in the treatment of breast cancer: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 249, p. 126073, 2023. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2023.126073.

BLANCO, Jose Liñares; PORTO-PAZOS, Ana B.; PAZOS, Alejandro; FERNANDEZ-LOZANO, Carlos. Prediction of high anti-angiogenic activity peptides in silico using a generalized linear model and feature selection. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 15688, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-33911-z.

CASAÑAS PIMENTEL, Rocio Guadalupe; ROBLES BOTERO, Viviana; SAN MARTÍN MARTÍNEZ, Eduardo; GÓMEZ GARCÍA, Consuelo; HINESTROZA, Juan Paulo. Soybean agglutinin-conjugated silver nanoparticles nanocarriers in the treatment of breast cancer cells. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, [S. l.], v. 27, n. 3, p. 218–234, 2016. DOI: 10.1080/09205063.2015.1116892.

CATALINI, Sara; ROSSI, Barbara; TORTORA, Mariagrazia; FOGGI, Paolo; GESSINI, Alessandro; MASCIOVECCHIO, Claudio; BRUNI, Fabio. Hydrogen Bonding and Solvation of a Proline-Based Peptide Model in Salt Solutions. **Life**, [S. l.], v. 11, n. 8, p. 824, 2021. DOI: 10.3390/life11080824.

CHEN, Zhongqin; LI, Weiwei; SANTHANAM, Ramesh Kumar; WANG, Cong; GAO, Xudong; CHEN, Yue; WANG, Chunli; XU, Leilei; CHEN, Haixia. Bioactive peptide with antioxidant and anticancer activities from black soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] byproduct: isolation, identification and molecular docking study. **European Food Research and Technology**, [S. l.], v. 245, n. 3, p. 677–689, 2019. DOI: 10.1007/s00217-018-3190-5.

COMERT ONDER, Ferah; AY, Mehmet. Recent developments in natural bioactive peptides: Anticancer potential and structure–activity relationships. *Em*: [s.l: s.n.]. p. 329–365. DOI: 10.1016/B978-0-323-91250-1.00009-4.

CUI, Qiang; SUN, Yuxue; CHENG, Jianjun; GUO, Mingruo. Effect of two-step enzymatic hydrolysis on the antioxidant properties and proteomics of hydrolysates of milk protein concentrate. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 366, p. 130711, 2022. DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.130711.

DALIRI, Eric; OH, Deog; LEE, Byong. Bioactive Peptides. **Foods**, [S. l.], v. 6, n. 5, p. 32, 2017. DOI: 10.3390/foods6050032.

DAROIT, Daniel Joner; BRANDELLI, Adriano. In vivo bioactivities of food protein-derived peptides – a current review. **Current Opinion in Food Science**, [*S. l.*], v. 39, p. 120–129, 2021. DOI: 10.1016/j.cofs.2021.01.002.

DESLOUCHES, Berthony; MONTELARO, Ronald C.; URISH, Ken L.; DI, Yuanpu P. Engineered Cationic Antimicrobial Peptides (eCAPs) to Combat Multidrug-Resistant Bacteria. **Pharmaceutics**, [*S. l.*], v. 12, n. 6, p. 501, 2020. DOI: 10.3390/pharmaceutics12060501.

DHAOUAFI, Jihen; ROMDHANI, Montassar; DERACINOIS, Barbara; FLAHAUT, Christophe; NEDJAR, Naima; BALTI, Rafik. Fractionation and identification of bioactive peptides from red macroalgae protein hydrolysates: In silico analysis and in vitro bioactivities. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [*S. l.*], v. 58, p. 103211, 2024. a. DOI: 10.1016/j.bcab.2024.103211.

DHAOUAFI, Jihen; ROMDHANI, Montassar; DERACINOIS, Barbara; FLAHAUT, Christophe; NEDJAR, Naima; BALTI, Rafik. Fractionation and identification of bioactive peptides from red macroalgae protein hydrolysates: In silico analysis and in vitro bioactivities. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [*S. l.*], v. 58, p. 103211, 2024. b. DOI: 10.1016/j.bcab.2024.103211.

EL-SHEREF, Essmat M.; ALY, Ashraf A.; ALSHAMMARI, Mohammed B.; BROWN, Alan B.; ABDEL-HAFEZ, Sara Mohamed Naguib; ABDELZAHER, Walaa Yehia; BRÄSE, Stefan; ABDELHAFEZ, ElShimaa M. N. Design, Synthesis, Molecular Docking, Antiapoptotic and Caspase-3 Inhibition of New 1,2,3-Triazole/Bis-2(1H)-Quinolinone Hybrids. **Molecules**, [*S. l.*], v. 25, n. 21, p. 5057, 2020. DOI: 10.3390/molecules25215057.

FAHEINA-MARTINS, Glaucia V.; DA SILVEIRA, Alethéia Lacerda; CAVALCANTI, Bruno C.; RAMOS, Márcio V.; MORAES, Manoel O.; PESSOA, Cláudia; ARAÚJO, Demetrius A. M. Antiproliferative effects of lectins from *Canavalia ensiformis* and *Canavalia brasiliensis* in human leukemia cell lines. **Toxicology in Vitro**, [*S. l.*], v. 26, n. 7, p. 1161–1169, 2012. DOI: 10.1016/j.tiv.2012.06.017.

FARIAS, T. C.; ABREU, J. P.; OLIVEIRA, J. P. S.; MACEDO, A. F.; RODRÍGUEZ-VEGA, A.; TONIN, A. P.; CARDOSO, F. S. N.; MEURER, E. C.; KOBLITZ, M. G. B. Bioactive properties of peptide fractions from Brazilian soy protein hydrolysates: In silico evaluation and experimental evidence. **Food Hydrocolloids for Health**, [*S. l.*], v. 3, p. 100112, 2023. DOI: 10.1016/j.fhfh.2022.100112.

FERNÁNDEZ-TOMÉ, Samuel; XU, Fei; HAN, Yanhui; HERNÁNDEZ-LEDESMA, Blanca; XIAO, Hang. Inhibitory Effects of Peptide Lunasin in Colorectal Cancer HCT-116 Cells and Their Tumorsphere-Derived Subpopulation. **International Journal of Molecular Sciences**, [*S. l.*], v. 21, n. 2, p. 537, 2020. DOI: 10.3390/ijms21020537.

GAUTAM, Ajay Kumar; SHARMA, Divakar; SHARMA, Juhi; SAINI, Khem Chand. Legume lectins: Potential use as a diagnostics and therapeutics against the cancer. **International Journal of Biological Macromolecules**, [*S. l.*], v. 142, p. 474–483, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.09.119.

GHAFOURI-FARD, Soudeh; ABAK, Atefe; TONDRO ANAMAG, Farhad; SHOOREI, Hamed; FATTAHI, Faranak; JAVADINIA, Seyed Alireza; BASIRI, Abbas; TAHERI, Mohammad. 5-Fluorouracil: A Narrative Review on the Role of Regulatory Mechanisms in Driving Resistance to This Chemotherapeutic Agent. **Frontiers in Oncology**, [*S. l.*], v. 11, 2021. DOI: 10.3389/fonc.2021.658636.

- GUPTA, Sudheer; SHARMA, Ashok K.; JAISWAL, Shubham K.; SHARMA, Vineet K. Prediction of Biofilm Inhibiting Peptides: An In silico Approach. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 7, 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00949.
- HAO, Yuqiong; FAN, Xin; GUO, Huimin; YAO, Yang; REN, Guixing; LV, Xiaolei; YANG, Xiushi. Overexpression of the bioactive lunasin peptide in soybean and evaluation of its anti-inflammatory and anti-cancer activities in vitro. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [S. l.], v. 129, n. 4, p. 395–404, 2020. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2019.11.001.
- HIAGO BELLAVER, Emyr; ELIZA REDIN, Eduarda; MILITÃO DA COSTA, Ingrid; SCHITTLER MORONI, Liziane; PINTO KEMPKA, Aniela. Food peptidomic analysis of bovine milk fermented by *Lactocaseibacillus casei* LBC 237: In silico prediction of bioactive peptides and anticancer potential. **Food Research International**, [S. l.], v. 180, p. 114060, 2024. DOI: 10.1016/j.foodres.2024.114060.
- HSIEH, Cheng-Hong; WANG, Tzu-Yuan; TUNG, Bo-Chen; LIU, Hui-Ping; YEH, Lien-Te; HSU, Kuo-Chiang. The Hydrolytic Peptides of Soybean Protein Induce Cell Cycle Arrest and Apoptosis on Human Oral Cancer Cell Line HSC-3. **Molecules**, [S. l.], v. 27, n. 9, p. 2839, 2022. DOI: 10.3390/molecules27092839.
- IWANIAK, Anna; HRYNKIEWICZ, Monika; MINKIEWICZ, Piotr; BUCHOLSKA, Justyna; DAREWICZ, Małgorzata. Soybean (*Glycine max*) Protein Hydrolysates as Sources of Peptide Bitter-Tasting Indicators: An Analysis Based on Hybrid and Fragmentomic Approaches. **Applied Sciences**, [S. l.], v. 10, n. 7, p. 2514, 2020. DOI: 10.3390/app10072514.
- JABEEN, Ifrah; ALTEMIMI, Ammar B.; RABAIL, Roshina; KAFEEL, Sadia; SHAHID, Arashi; INAM-UR-RAHEEM, Muhammad; MOUSAVI KHANEGHAH, Amin; AADIL, Rana Muhammad. Exploring the astonishing beneficial effects of round gourd (*Praecitrullus fistulosus*) and plant lectins towards cancer: A comprehensive review. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 271, p. 132629, 2024. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2024.132629.
- JI, Dawei; UDENIGWE, Chibuikwe C.; AGYEI, Dominic. Antioxidant peptides encrypted in flaxseed proteome: An in silico assessment. **Food Science and Human Wellness**, [S. l.], v. 8, n. 3, p. 306–314, 2019. DOI: 10.1016/j.fshw.2019.08.002.
- KONOZY, Emadeldin Hassan E.; OSMAN, Makarim El-fadil M. Plant lectin: A promising future anti-tumor drug. **Biochimie**, [S. l.], v. 202, p. 136–145, 2022. DOI: 10.1016/j.biochi.2022.08.002.
- KORDI, Masoumeh; BORZOUYI, Zeynab; CHITSAZ, Saideh; ASMAEI, Mohammad hadi; SALAMI, Robab; TABARZAD, Maryam. Antimicrobial peptides with anticancer activity: Today status, trends and their computational design. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [S. l.], v. 733, p. 109484, 2023. DOI: 10.1016/j.abb.2022.109484.
- KUSUMAH, Jennifer; GONZALEZ DE MEJIA, Elvira. Impact of soybean bioactive compounds as response to diet-induced chronic inflammation: A systematic review. **Food Research International**, [S. l.], v. 162, p. 111928, 2022. DOI: 10.1016/j.foodres.2022.111928.
- LAENGSRU, Vishuda; NANTASENAMAT, Chanin; SCHADUANGRAT, Nalini; NUCHNOI, Pornlada; PRACHAYASITTIKUL, Virapong; SHOOMBUTONG, Watshara. TargetAntiAngio: A Sequence-Based Tool for the Prediction and Analysis of Anti-Angiogenic Peptides. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 20, n. 12, p. 2950, 2019. a. DOI: 10.3390/ijms20122950.

LAENGSRİ, Vishuda; NANTASENAMAT, Chanin; SCHADUANGRAT, Nalini; NUCHNOI, Pornlada; PRACHAYASITTIKUL, Virapong; SHOOMBUEATONG, Watshara.

TargetAntiAngio: A Sequence-Based Tool for the Prediction and Analysis of Anti-Angiogenic Peptides. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 20, n. 12, p. 2950, 2019. b. DOI: 10.3390/ijms20122950.

LATH, Amit; SANTAL, Anita Rani; KAUR, Nameet; KUMARI, Poonam; SINGH, Nater Pal. Anti-cancer peptides: their current trends in the development of peptide-based therapy and anti-tumor drugs. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, [S. l.], v. 39, n. 1, p. 45–84, 2023. a. DOI: 10.1080/02648725.2022.2082157.

LATH, Amit; SANTAL, Anita Rani; KAUR, Nameet; KUMARI, Poonam; SINGH, Nater Pal. Anti-cancer peptides: their current trends in the development of peptide-based therapy and anti-tumor drugs. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, [S. l.], v. 39, n. 1, p. 45–84, 2023. b. DOI: 10.1080/02648725.2022.2082157.

LI, Tingna; ZHANG, Xiaorui; REN, Yuanyuan; ZENG, Yijia; HUANG, Qinwan; WANG, Chao. Antihypertensive effect of soybean bioactive peptides: A review. **Current Opinion in Pharmacology**, [S. l.], v. 62, p. 74–81, 2022. DOI: 10.1016/j.coph.2021.11.005.

LIN, Liyuan; HE, Yuan-Lin; TANG, Yanfei; HONG, Pengzhi; ZHOU, Chunxia; SUN, Shengli; QIAN, Zhong-Ji. Mechanism analysis of octapeptide from microalgae, *Isochrysis zhanjiangensis* for suppressing vascular injury and angiogenesis in human umbilical vein endothelial cell. **International Immunopharmacology**, [S. l.], v. 111, p. 109149, 2022. DOI: 10.1016/j.intimp.2022.109149.

LISCANO, Yamil; OÑATE-GARZÓN, Jose; DELGADO, Jean Paul. Peptides with Dual Antimicrobial–Anticancer Activity: Strategies to Overcome Peptide Limitations and Rational Design of Anticancer Peptides. **Molecules**, [S. l.], v. 25, n. 18, p. 4245, 2020. DOI: 10.3390/molecules25184245.

LIU, Wanlu; YU, Shengjuan; HAN, Yu; CHEN, Linfeng; AN, Jiulong; LI, He; LIU, Xinqi. Systematic sequence characterization of enzymatic-derived soybean peptides for precision enhancement of anti-inflammatory properties. **Food Bioscience**, [S. l.], v. 60, p. 104292, 2024. a. DOI: 10.1016/j.fbio.2024.104292.

LIU, Wanlu; YU, Shengjuan; HAN, Yu; CHEN, Linfeng; AN, Jiulong; LI, He; LIU, Xinqi. Systematic sequence characterization of enzymatic-derived soybean peptides for precision enhancement of anti-inflammatory properties. **Food Bioscience**, [S. l.], v. 60, p. 104292, 2024. b. DOI: 10.1016/j.fbio.2024.104292.

MANZOOR, Mehnaza; SINGH, Jagmohan; GANI, Adil. Exploration of bioactive peptides from various origin as promising nutraceutical treasures: In vitro, in silico and in vivo studies. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 373, p. 131395, 2022. a. DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.131395.

MANZOOR, Mehnaza; SINGH, Jagmohan; GANI, Adil. Exploration of bioactive peptides from various origin as promising nutraceutical treasures: In vitro, in silico and in vivo studies. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 373, p. 131395, 2022. b. DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.131395.

NIELSEN, P. M.; PETERSEN, D.; DAMBMANN, C. **Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis** *Food Chemistry and Toxicology JFS: Food Chemistry and Toxicology*. [s.l: s.n.].

NINGRUM, Andriati; WARDANI, Dian Wahyu; VANIDIA, Nurul; SARIFUDIN, Achmat; KUMALASARI, Rima; EKAFITRI, Riyanti; KRISTANTI, Dita; SETIABOMA, Woro;

MUNAWAROH, Heli Siti Halimatul. In silico Approach of Glycinin and Conglycinin Chains of Soybean By-Product (Okara) Using Papain and Bromelain. **Molecules**, [S. l.], v. 27, n. 20, p. 6855, 2022. a. DOI: 10.3390/molecules27206855.

NINGRUM, Andriati; WARDANI, Dian Wahyu; VANIDIA, Nurul; SARIFUDIN, Achmat; KUMALASARI, Rima; EKAFITRI, Riyanti; KRISTANTI, Dita; SETIABOMA, Woro; MUNAWAROH, Heli Siti Halimatul. In silico Approach of Glycinin and Conglycinin Chains of Soybean By-Product (Okara) Using Papain and Bromelain. **Molecules**, [S. l.], v. 27, n. 20, p. 6855, 2022. b. DOI: 10.3390/molecules27206855.

NOROUZI, Peiman; MIRMOHAMMADI, Maryam; HOUSHDAR TEHRANI, Mohammad Hassan. Anticancer peptides mechanisms, simple and complex. **Chemico-Biological Interactions**, [S. l.], v. 368, p. 110194, 2022. DOI: 10.1016/j.cbi.2022.110194.

OPO, Firoz A. Dain Md; RAHMAN, Mohammed M.; AHAMMAD, Foysal; AHMED, Istiak; BHUIYAN, Mohiuddin Ahmed; ASIRI, Abdullah M. Structure based pharmacophore modeling, virtual screening, molecular docking and ADMET approaches for identification of natural anti-cancer agents targeting XIAP protein. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 4049, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-83626-x.

ÖZTÜRK, Hale İnci; ORAÇ, Aysun. Harvesting bioactive peptides from sustainable protein sources: Unveiling technological and functional properties through in silico analyses. **Food and Humanity**, [S. l.], v. 2, p. 100294, 2024. DOI: 10.1016/j.foohum.2024.100294.

PAN, Li et al. The apoptotic effects of soybean agglutinin were induced through three different signal pathways by down-regulating cytoskeleton proteins in IPEC-J2 cells. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 5753, 2023. DOI: 10.1038/s41598-023-32951-4.

PANDA, Prashanta Kumar et al. Antitumor effect of soybean lectin mediated through reactive oxygen species-dependent pathway. **Life Sciences**, [S. l.], v. 111, n. 1–2, p. 27–35, 2014. DOI: 10.1016/j.lfs.2014.07.004.

PEIGHAMBARDOUST, Seyed Hadi; KARAMI, Zohreh; PATEIRO, Mirian; LORENZO, José M. A Review on Health-Promoting, Biological, and Functional Aspects of Bioactive Peptides in Food Applications. **Biomolecules**, [S. l.], v. 11, n. 5, p. 631, 2021. DOI: 10.3390/biom11050631.

PEREDO-LOVILLO, Audry; HERNÁNDEZ-MENDOZA, Adrián; VALLEJO-CORDOBA, Belinda; ROMERO-LUNA, Haydee Eliza. Conventional and in silico approaches to select promising food-derived bioactive peptides: A review. **Food Chemistry: X**, [S. l.], v. 13, p. 100183, 2022. DOI: 10.1016/j.fochx.2021.100183.

RIVERO-PINO, Fernando; MILLAN-LINARES, Maria C.; MONTSERRAT-DE-LA-PAZ, Sergio. Strengths and limitations of in silico tools to assess physicochemical properties, bioactivity, and bioavailability of food-derived peptides. **Trends in Food Science & Technology**, [S. l.], v. 138, p. 433–440, 2023. a. DOI: 10.1016/j.tifs.2023.06.023.

RIVERO-PINO, Fernando; MILLAN-LINARES, Maria C.; MONTSERRAT-DE-LA-PAZ, Sergio. Strengths and limitations of in silico tools to assess physicochemical properties, bioactivity, and bioavailability of food-derived peptides. **Trends in Food Science & Technology**, [S. l.], v. 138, p. 433–440, 2023. b. DOI: 10.1016/j.tifs.2023.06.023.

RIVERO-PINO, Fernando; MILLAN-LINARES, Maria C.; MONTSERRAT-DE-LA-PAZ, Sergio. Strengths and limitations of in silico tools to assess physicochemical properties,

- bioactivity, and bioavailability of food-derived peptides. **Trends in Food Science & Technology**, [S. l.], v. 138, p. 433–440, 2023. c. DOI: 10.1016/j.tifs.2023.06.023.
- SARVAGALLA, Sailu; LIN, Tzu-Yu; KONDAPURAM, Sree Karani; CHEUNG, Chun Hei Antonio; COUMAR, Mohane Selvaraj. Survivin - caspase protein-protein interaction: Experimental evidence and computational investigations to decipher the hotspot residues for drug targeting. **Journal of Molecular Structure**, [S. l.], v. 1229, p. 129619, 2021. DOI: 10.1016/j.molstruc.2020.129619.
- SEUKEP, Armel J.; KUETE, Victor. Established anticancer agents from plants. *Em*: [s.l: s.n.]. DOI: 10.1016/bs.abr.2023.12.001.
- SIDDIQUI, Sahabjada; UPADHYAY, Shivbrat; AHMAD, Imran; HUSSAIN, Arshad; AHAMED, Maqsood. Cytotoxicity of *Moringa oleifera* fruits on human liver cancer and molecular docking analysis of bioactive constituents against caspase-3 enzyme. **Journal of Food Biochemistry**, [S. l.], v. 45, n. 5, 2021. DOI: 10.1111/jfbc.13720.
- SILVA, Nathália Regina Galvão; ARAÚJO, Francielly Negreiros De. Antibacterial Activity of Plant Lectins: a Review. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [S. l.], v. 64, 2021. DOI: 10.1590/1678-4324-2021200631.
- SWALLAH, Mohammed Sharif; YANG, Xiaoqing; LI, Jiabin; KORESE, Joseph Kudadam; WANG, Sainan; FAN, Hongliang; YU, Hansong; HUANG, Qing. The Pros and Cons of Soybean Bioactive Compounds: An Overview. **Food Reviews International**, [S. l.], v. 39, n. 8, p. 5104–5131, 2023. DOI: 10.1080/87559129.2022.2062763.
- TACIAS-PASCACIO, Veymar G.; CASTAÑEDA-VALBUENA, Daniel; MORELLON-STERLING, Roberto; TAVANO, Olga; BERENGUER-MURCIA, Ángel; VELA-GUTIÉRREZ, Gilber; RATHER, Irfan A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Bioactive peptides from fisheries residues: A review of use of papain in proteolysis reactions. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 184, p. 415–428, 2021. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.06.076.
- TACIAS-PASCACIO, Veymar G.; MORELLON-STERLING, Roberto; SIAR, El-Hocine; TAVANO, Olga; BERENGUER-MURCIA, Ángel; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Use of Alcalase in the production of bioactive peptides: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 165, p. 2143–2196, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.10.060.
- TAHA, Mostafa N.; SAAFAN, Amal E.; AHMEDY, A.; EL GEBALY, Eman; KHAIRALLA, Ahmed S. Two novel synthetic peptides inhibit quorum sensing-dependent biofilm formation and some virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Journal of Microbiology**, [S. l.], v. 57, n. 7, p. 618–625, 2019. DOI: 10.1007/s12275-019-8548-2.
- TINCHO, Marius Belmondo; GABERE, Musa Nur; PRETORIUS, Ashley. In silico Identification and Molecular Validation of Putative Antimicrobial Peptides for HIV Therapy. **Journal of AIDS & Clinical Research**, [S. l.], v. 7, n. 9, 2016. DOI: 10.4172/2155-6113.1000606.
- TONG, Xiaohong; LIAN, Ziteng; MIAO, Liming; QI, Baokun; ZHANG, Shuang; LI, Yang; WANG, Huan; JIANG, Lianzhou. An innovative two-step enzyme-assisted aqueous extraction for the production of reduced bitterness soybean protein hydrolysates with high nutritional value. **LWT**, [S. l.], v. 134, p. 110151, 2020. DOI: 10.1016/j.lwt.2020.110151.

- TUNG, Truong Thanh; QUOC, Thang Nguyen. Discovery of novel β -turn mimetic-based peptides as novel quorum sensing inhibitors of gram-negative bacteria. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S. l.], v. 46, p. 128170, 2021. a. DOI: 10.1016/j.bmcl.2021.128170.
- TUNG, Truong Thanh; QUOC, Thang Nguyen. Discovery of novel β -turn mimetic-based peptides as novel quorum sensing inhibitors of gram-negative bacteria. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S. l.], v. 46, p. 128170, 2021. b. DOI: 10.1016/j.bmcl.2021.128170.
- ULUG, Sule Keskin; JAHANDIDEH, Forough; WU, Jianping. Novel technologies for the production of bioactive peptides. **Trends in Food Science & Technology**, [S. l.], v. 108, p. 27–39, 2021. DOI: 10.1016/j.tifs.2020.12.002.
- VADAKKAN, Kayeen; SATHISHKUMAR, Kuppusamy; KUTTIYACHAN URUMBIL, Sithara; PONNENKUNNATHU GOVINDANKUTTY, Sreejesh; KUMAR NGANGBAM, Ajit; DEVI NONGMAITHEM, Bijayalakshmi. A review of chemical signaling mechanisms underlying quorum sensing and its inhibition in *Staphylococcus aureus*. **Bioorganic Chemistry**, [S. l.], v. 148, p. 107465, 2024. DOI: 10.1016/j.bioorg.2024.107465.
- VERFAILLIE, Diete; JANSSEN, Frederik; VAN ROYEN, Geert; WOUTERS, Arno G. B. A systematic study of the impact of the isoelectric precipitation process on the physical properties and protein composition of soy protein isolates. **Food Research International**, [S. l.], v. 163, p. 112177, 2023. DOI: 10.1016/j.foodres.2022.112177.
- VOSS, Glenise B.; OSORIO, Hugo; VALENTE, Luísa M. P.; PINTADO, Manuela E. Impact of thermal treatment and hydrolysis by Alcalase and *Cynara cardunculus* enzymes on the functional and nutritional value of Okara. **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 83, p. 137–147, 2019. DOI: 10.1016/j.procbio.2019.05.010.
- WEN, Lingrong; BI, Huimin; ZHOU, Xuesong; JIANG, Yueming; ZHU, Hong; FU, Xiong; YANG, Bao. Structure characterization of soybean peptides and their protective activity against intestinal inflammation. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 387, p. 132868, 2022. DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.132868.
- WONG, Kah Ming; WONG, Yong Hui; LEE, Sau Har. In silico Discovery of LL13, a Shortened Pardaxin 6 Peptide Derivative with Anti-proliferative Activity. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, [S. l.], v. 30, n. 4, p. 38, 2024. DOI: 10.1007/s10989-024-10615-9.
- WU, Xiaoyan et al. Rational design of a new short anticancer peptide with good potential for cancer treatment. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 273, p. 116519, 2024. DOI: 10.1016/j.ejmech.2024.116519.
- XIONG, Yingxin; WANG, Jiawei; ZHOU, Xing; LI, Xiaohui. The Development of a Stable Peptide-Loaded Long-Acting Injection Formulation through a Comprehensive Understanding of Peptide Degradation Mechanisms: A QbD-Based Approach. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 16, n. 2, p. 266, 2024. DOI: 10.3390/pharmaceutics16020266.
- YAN, Zheng; GUI, Yang; LIU, Chunhong; ZHANG, Xiaohai; WEN, Chaoling; OLATUNJI, Opeyemi Joshua; SUTTIKHANA, Itthanon; ASHAOLU, Tolulope Joshua. Gastrointestinal digestion of food proteins: Anticancer, antihypertensive, anti-obesity, and immunomodulatory mechanisms of the derived peptides. **Food Research International**, [S. l.], v. 189, p. 114573, 2024. a. DOI: 10.1016/j.foodres.2024.114573.

YAN, Zheng; GUI, Yang; LIU, Chunhong; ZHANG, Xiaohai; WEN, Chaoling; OLATUNJI, Opeyemi Joshua; SUTTIKHANA, Itthanan; ASHAOLU, Tolulope Joshua. Gastrointestinal digestion of food proteins: Anticancer, antihypertensive, anti-obesity, and immunomodulatory mechanisms of the derived peptides. **Food Research International**, [S. l.], v. 189, p. 114573, 2024. b. DOI: 10.1016/j.foodres.2024.114573.

ZAFAR, Sobiya; BEG, Sarwar; PANDA, Sunil K.; RAHMAN, Mahfoozur; ALHARBI, Khalid S.; JAIN, Gaurav K.; AHMAD, Farhan J. Novel therapeutic interventions in cancer treatment using protein and peptide-based targeted smart systems. **Seminars in Cancer Biology**, [S. l.], v. 69, p. 249–267, 2021. DOI: 10.1016/j.semcancer.2019.08.023.

ZANJANCHI, Pegah; ASGHARI, S. Mohsen; MOHABATKAR, Hassan; SHOURIAN, Mostafa; SHAFIEE ARDESTANI, Mehdi. Conjugation of VEGFR1/R2-targeting peptide with gold nanoparticles to enhance antiangiogenic and antitumoral activity. **Journal of Nanobiotechnology**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 7, 2022. a. DOI: 10.1186/s12951-021-01198-4.

ZANJANCHI, Pegah; ASGHARI, S. Mohsen; MOHABATKAR, Hassan; SHOURIAN, Mostafa; SHAFIEE ARDESTANI, Mehdi. Conjugation of VEGFR1/R2-targeting peptide with gold nanoparticles to enhance antiangiogenic and antitumoral activity. **Journal of Nanobiotechnology**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 7, 2022. b. DOI: 10.1186/s12951-021-01198-4.

ZHANG, Lichao; HU, Xueli; XIAO, Kang; KONG, Liang. Effective identification and differential analysis of anticancer peptides. **BioSystems**, [S. l.], v. 241, p. 105246, 2024. a. DOI: 10.1016/j.biosystems.2024.105246.

ZHANG, Lichao; HU, Xueli; XIAO, Kang; KONG, Liang. Effective identification and differential analysis of anticancer peptides. **BioSystems**, [S. l.], v. 241, p. 105246, 2024. b. DOI: 10.1016/j.biosystems.2024.105246.

ZHANG, Xiaoying; DU, Hengjun; XU, Zheng; WANG, Ying; GUO, Xiaojing; XIAO, Hang; LI, Yang. A novel alcalase-hydrolyzed soybean meal hydrolysates prepared using by-product material: Structure, function property, sensory property, and biological activity. **Food Bioscience**, [S. l.], v. 56, p. 103324, 2023. DOI: 10.1016/j.fbio.2023.103324.

ARTIGO 2: Produção de Peptídeos Bioativos a partir da hidrólise enzimática de Lectina de Soja: Análise Estrutural, digestibilidade e Predições *In Silico*

Resumo

A lectina de soja foi purificada por precipitação com sulfato de amônio e cromatografia líquida. A lectina purificada foi hidrolisada de forma sucessiva pelas enzimas alcalase e papaína, e o hidrolisado obtido caracterizado por espectrometria de massas, eletroforese Tris-Tricina, FTIR, MEV e TGA. A digestibilidade dos peptídeos foi avaliada por simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal, e os peptídeos foram caracterizados quanto às mudanças na estrutura por fluorescência intrínseca, tamanho de partícula, potencial zeta e atividade antioxidante *in vitro* contra os radicais ABTS e DPPH. A bioatividade de três peptídeos foi predita por avaliação *in silico*, docking molecular e predição das características ADMET. A purificação parcial da lectina resultou em uma banda de 31 kDa e através da hidrólise sequencial produziu-se um peptídeo (SLH) com grau de hidrólise de 22%, e 489 sequências de peptídeos com tamanhos entre 6 – 2500 Da. A análise de FTIR mostrou predominância de folhas e dobras β nos peptídeos, e a estabilidade térmica foi confirmada com massas residuais de 11% e 44% para o peptídeo e a fração lectina, respectivamente. A microscopia revelou que o hidrolisado obtido é responsável pela formação de agregados porosos, enquanto a fração lectina é mais plana. Esta agregação também foi confirmada por fluorescência, tamanho de partícula e potencial zeta. O hidrolisado demonstrou maior digestibilidade (81%) comparado à lectina (35%), e melhor atividade antioxidante frente aos radicais ABTS e DPPH, antes e após a digestão. A análise *in silico* indicou que os peptídeos têm potencial antioxidante e inibidor das enzimas ECA e DPP-IV. O docking molecular confirmou a ligação dos peptídeos às três enzimas, sugerindo potencial inibidor. Quanto às propriedades ADMET, os peptídeos mostraram-se seguros e estáveis. Esses resultados destacam o potencial dos peptídeos derivados da hidrólise da lectina de soja como compostos bioativos com diversas aplicações potenciais em nutrição, saúde e biotecnologia.

1. INTRODUÇÃO

A lectina de soja é uma glicoproteína bioativa natural que possui a capacidade única de se ligar especificamente a açúcares. O interesse nessas proteínas tem aumentado devido aos seus inúmeros benefícios biológicos apresentados, como efeitos anti-inflamatórios, anti-hemolíticos, potencial para cicatrização de feridas cutâneas e principalmente, atividade anticarcinogênica que pode ser benéfica ao tratamento do câncer (PAN et al., 2023; SHEA et al., 2024).

Uma forma de potencializar as atividades relacionadas as proteínas, é por meio da modificação estrutural, para produção de moléculas menores, chamadas peptídeos bioativos. Esses peptídeos normalmente estão inativos na estrutura intacta das proteínas parentais e tornam-se ativos após a clivagem dessas proteínas (AKBARIAN et al., 2022).

A hidrólise enzimática utilizando diferentes enzimas proteolíticas é o método mais conveniente e comum na produção desses peptídeos. As condições com que essa hidrólise é realizada influencia diretamente na produção e composição desses peptídeos bioativos (ZHU et al., 2023).

Diversas pesquisas relatam a produção de peptídeos bioativos a partir de proteínas de soja utilizando diferentes enzimas como alcalase (ZHANG et al., 2023), papaína (FARIAS et al., 2023), simulação da digestão gastrointestinal utilizando pepsina – pancreatina (REBOLLO-HERNANZ et al., 2023), corolase (COSCUETA et al., 2019).

A combinação de múltiplas enzimas para realização da hidrólise é utilizada para produzir peptídeos com baixo peso molecular e maior grau de hidrólise, devido ao aumento do número de locais de clivagem em cada etapa, aumentando assim a eficiência do processo. Além disso, os peptídeos produzidos por esse tipo de hidrólise apresentam atividades biológicas promissoras e mais estáveis (WEN et al., 2022).

Vários estudos tanto *in vitro* quanto *in vivo* demonstraram que peptídeos obtidos pela hidrólise enzimática de proteínas de soja apresentam potenciais propriedades funcionais e atividades fisiológicas, como antioxidante, anti-hipertensiva e imunomodulatória (TONG et al., 2020). Entretanto, estudos que avaliem o potencial bioativo de hidrolisados obtidos de lectina de soja são limitados, sendo necessárias pesquisas que esclareçam sua estrutura e características funcionais.

Para contornar essas limitações tem-se utilizado abordagens de bioinformática, onde as sequências de aminoácidos dos peptídeos são utilizadas para uma triagem das potenciais bioatividades dos peptídeos, explorar mecanismos de interação, avaliar

propriedades de biodisponibilidade, alergenicidade e propriedades de Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade (ADMET). Esse campo está em pleno avanço com desenvolvimento de diversos algoritmos, softwares e estratégias de docking molecular. Dessa forma, a união da peptidômica com a bioinformática pode ser um potente método para avaliação de hidrolisados proteicos quanto as suas bioatividades (DU; COMER; LI, 2023).

Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi analisar e caracterizar os peptídeos produzidos pela hidrólise enzimática sequencial *in vitro* da lectina de soja, utilizando as enzimas alcalase e papaína. Por meio de simulação *in vitro* da simulação da digestão gastrointestinal foi avaliada ainda a estabilidade dos peptídeos e sua atividade antioxidante pelo percentual de captura dos radicais ABTS e DPPH. Adicionalmente, as potenciais bioatividades dos peptídeos foram exploradas utilizando ferramentas *in silico*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DA FRAÇÃO LECTINA

Os grãos de soja foram adquiridos em comércio local no município de João Pessoa – Paraíba – Brasil. Para obtenção da farinha de soja, os grãos foram triturados em moinho elétrico doméstico e peneirados em malha de aço inox de 80 mesh, para obtenção de um pó fino. O processo de remoção dos lipídeos foi realizado utilizando hexano, seguindo metodologia de VERFAILLIE et al., 2023.

O extrato proteico foi obtido por meio de metodologia de Franco-Fraguas et al., 2003. Este foi precipitado utilizando sulfato de amônio na faixa de 40-80%, e em seguida centrifugado (4900 x g/ 40 min/ 4 °C). O precipitado foi coletado, diluído em NaCl 0,15M, dialisado contra água em membrana de 8-14 kDa, e liofilizado.

A lectina presente no extrato liofilizado, foi isolada de acordo com metodologia de Roy et al., 2018. Assim, o extrato foi solubilizado em tampão Tris– HCl 25 mM pH 8,1 e aplicado em coluna de troca iônica DEAE - Sephacel (Cytiva, Uppsala, Sweden) pré – equilibrada com o mesmo tampão de diluição da amostra. As proteínas negativamente carregadas foram eluídas em fluxo constante de 1 mL/min, com um gradiente de NaCl de 0 – 750 mM. Coletaram-se frações de 2mL e o eluato monitorado a 280 nm. A presença da lectina nas frações foi constatada através de ensaio de atividade hemaglutinante utilizando solução de hemácias humanas do tipo A à 2% (PANDA et al.,

2014). As frações que apresentaram atividade hemaglutinante foram coletadas, dialisadas e liofilizadas.

A proteína liofilizada obtida por troca iônica foi suspensa em tampão fosfato 20 mM pH 7,5, e então aplicada em coluna de exclusão molecular de Sephadex G-50 (GE Healthcare Life Sciences, Inc., Maidstone, UK) (1,8x50 cm). A eluição foi realizada com o mesmo tampão de diluição da amostra, em um fluxo constante de 0,2 mL/min, sendo o eluato monitorado a 280nm.

As frações foram avaliadas quanto sua atividade hemaglutinante e aquelas que apresentaram hemaglutinação foram coletadas, dialisadas, contra água e liofilizadas. Sendo, por fim, obtida a fração de lectina de soja.

O perfil proteico da fração lectina foi obtido por meio de eletroforese SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970). As amostras 5 mg foram preparadas a partir da sua diluição em tampão de amostra em condição redutora (contendo SDS e β – mercaptoetanol), e aquecimento a 100 °C por 10 min, seguido de resfriamento e centrifugação 4900 x g /1min. O sistema SDS-PAGE, para avaliação do perfil da lectina, foi montado a partir de dois géis de poli(acrilamida), um gel de concentração de 3,5% e um gel de separação de 12%.

2.2 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA *IN VITRO* DA FRAÇÃO LECTINA

A hidrólise enzimática *in vitro* da fração lectina de soja foi realizada utilizando as enzimas alcalase e papaína através da hidrólise subsequente, seguindo metodologia de Tong et al., 2020 com modificações.

Primeiramente, a fração lectina foi solubilizada em tampão Tris-HCl 25mM pH 8,0 na concentração de 1% (10 mg/mL) e colocada em banho maria a 55 °C antes da adição da enzima. O processo iniciou-se com a hidrólise da alcalase (5% v/p; pH 8,0; 55 °C) sendo incubada sob agitação a 150 rpm por 4h. Depois da incubação, a amostra foi aquecida em banho maria a 85 °C por 10 min, para inativação da enzima, e em seguida colocada em banho de gelo.

A segunda etapa da hidrólise iniciou-se a partir do ajuste do pH da solução para 7,0 com solução de HCl 0,1M, e então a papaína foi adicionada (5% p/p; pH 7,0; 55 °C) sendo incubada nas mesmas condições anteriores. Ao término da reação, realizou-se a inativação enzimática seguindo os mesmos procedimentos com alcalase. Em seguida o hidrolisado foi centrifugado (3000 x g/ 20 min/ 4 °C), dialisado contra água, em

membrana de 1 kDa, e em seguida liofilizado, resultando na obtenção do hidrolisado de lectina de soja (SLH).

O perfil dos peptídeos foi verificado por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de Tricina (SDS-PAGE Tris-Tricina), de acordo com o método de Schägger; Von Jagow (1987). O sistema foi montado a partir de 3 géis de poliacrilamida sendo: gel de separação (16% T e 3% C), gel espaçador (10% T e 3% C) e o gel de concentração 4%. Os pesos moleculares foram comparados com marcadores de peso molecular, com pesos moleculares de 3,5 – 38 kDa. (GE Healthcare Life Sciences, Nova Jersey, USA).

2.3 CARACTERIZAÇÃO DO HIDROLISADO

2.3.1 Grau de hidrólise (GH)

O grau de hidrólise foi determinado pelo método de OPA (o-ftaldialdeído) (NIELSEN; PETERSEN; DAMBMANN, 2001).

Em tubos de ensaio foram adicionados 400 µL de amostra (1 mg/mL) e 3 mL do reagente OPA, a mistura foi agitada em vórtex por 5 segundos e lida em espectrofotômetro a 340 nm após 2 min de reação.

O cálculo do grau de hidrólise foi feito a partir das equações:

$$DH(\%) = \frac{h}{h_{tot}} * 100\%$$

$$h = (SerineNH_2 - \beta) / \alpha$$

$$SerinaNH_2 = \frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco})}{(Abs_{padrão} - Abs_{branco})} * 0,9516 \text{ meqv serina/L} * \frac{0,1 * 100}{X * P}$$

Onde:

α e β e h_{total} são constantes definidas de acordo com a matéria-prima utilizada (para a soja, os valores das constantes são $\alpha = 0,970$; $\beta = 0,342$ e $h_{tot} = 7,8$); X é a massa de proteína utilizada para análise (g) e P é o percentual de proteína na amostra.

2.3.2 FTIR

Nesse método foram avaliados a fração lectina e o hidrolisado (SLH), após a adição de KBr, as amostras foram misturadas, pressurizadas e escaneadas em espectrofotômetro Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) (IR Prestige 21

SHIMADZU, Japão), utilizando o método de reflectância atenuada (ATR). Os espectros foram obtidos no modo de transmitância na faixa de 4000 – 500 cm^{-1} (XU et al., 2023).

2.3.3 Análise de Termogravimétrica (TGA)

A fração lectina e seu hidrolisado foram avaliados quanto a resistência térmica por análise termogravimétrica (TGA). As amostras pesando em média 5mg, foram aquecidas em analisador termogravimétrico (DTG-60 H; Shimadzu, Kyoto, Japan), de 30 – 500 °C, para o hidrolisado e 30 – 900 °C para a fração lectina, a uma taxa de aquecimento de 10 °C min^{-1} sob nitrogênio a uma taxa de 50 mL min^{-1} (FERREIRA et al., 2021).

2.3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura – MeV

As microestruturas da fração lectina e do hidrolisado foram avaliadas utilizando um microscópio eletrônico de varredura LEO 1430 com detector eletro secundário (Zeiss, Goettingen, Alemanha) a uma tensão de aceleração de 10 kV (FANG et al., 2021).

2.3.5 Identificação dos peptídeos

As misturas de peptídeos do hidrolisado (SLH) foram dessalinizadas e concentradas em coluna C18 inseridas em micropontérias. Em seguida, os peptídeos foram submetidos a separação offline e análise em um sistema de cromatografia líquida em nanoescala acoplado a um espectrometro de massas com ionização por eletrospray e aquisição de dados em modo sequencial (*nano Liquid chromatography-electrospray-MS/MS in tandem*, LC-ESI-MSMS). Os dados de MS foram adquiridos em um espectrometro TimsTOF (Bruker Daltonics, Germany) como mobilidade iônica em modo de aquisição independente dos dados (*Data-Independent Acquisition - DIA*) para uma abordagem *4D-DIA proteomics* no Laboratório Multiusuários de Proteômica, Metabolômica e Lipidômica da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - ESALQ/USP.

2.3.5.1 Sequenciamento dos peptídeos

Os arquivos de dados brutos (.d) foram carregados no PEAKS Studio v.11 (Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, ON, Canadá), onde o fluxo de trabalho padrão PEAKS, incorporando sequenciamento de peptídeos de novo e PeaksDB, foi usado para identificação de peptídeos.

Na identificação dos peptídeos do hidrolisado (SLH), foi estabelecida uma tolerância de massa do precursor de 10 ppm, e tolerância de massa do fragmento de 0,02 Da. A clivagem enzimática inespecífica foi permitida e a oxidação da metionina (+15,99 Da) foi considerada uma modificação variável. A carbamidometilação na cisteína (+57,02 Da) foi usada como uma modificação fixa, e a oxidação na metionina (+15,99 Da) foi uma modificação variável. Uma taxa de descoberta falsa (FDR) de 1% foi aplicada para os peptídeos na análise de hidrolisado, e pelo menos um peptídeo único necessário para identificação de proteínas.

2.4 AVALIAÇÃO DA DIGESTIBILIDADE *in vitro* DA FRAÇÃO LECTINA E DO HIDROLISADO DE SOJA

Para avaliar a atividade das enzimas digestivas sobre a fração lectina de soja e seu hidrolisado, foi realizada a simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal seguindo o protocolo harmonizado da INFOGEST (BRODKORB et al., 2019). Assim, como na metodologia descrita por Wang et al., 2021, as amostras foram diluídas em água na concentração de 10 mg/mL, e colocadas sob agitação em incubadora shaker a 37 °C e 200 rpm. A fase oral, iniciou-se com a adição do fluido salivar simulado (SSF) a amostra, sendo deixado sob agitação por 2 min. Para simulação da fase gástrica, o bolo oral foi misturado com o fluido estomacal simulado e o pH ajustado para 3,0 com HCl 0,1 M, e em seguida, pepsina (2000 U/mL) foi adicionada e a mistura colocada sob agitação por 2 h.

A simulação da fase intestinal foi realizada a partir da mistura do bolo estomacal com o fluido intestinal simulado e a elevação do pH da mistura para 7,0, utilizando NaOH 0,1M, e em seguida, foram adicionados os sais de bile (10 mM) e a pancreatina (100 U/mL), sendo a mistura novamente deixada sob agitação por 2 h. Como branco, foi feito o mesmo processo em um tubo contendo água no lugar da amostra.

Ao fim da fase intestinal, a reação de digestão foi interrompida pelo aquecimento em banho maria (85 °C/ 10 min) da amostra e em seguida resfriamento em banho de gelo, logo após, a amostra digerida foi centrifugada (3000 x g/ 20 min/ 4 °C), dialisada contra água em membrana de 1 kDa e liofilizada.

Após a simulação da digestão foram obtidas as amostras pós-digestão da fração lectina (SLD) e do hidrolisado de lectina (SHD).

A digestibilidade da proteína foi calculada de acordo com metodologia de (Canelli et al., 2023), a partir do teor de proteína da amostra, corrigida pelo teor de proteína do experimento do branco, e o teor de proteína do sobrenadante após a centrifugação (corrigido pelo teor de proteína do branco) e expresso em porcentagem, de acordo com a equação abaixo:

$$\text{Digestibilidade}(\%) = \left(\frac{\text{Teor de proteína sobrenadante} - \text{Teor de proteína do branco}}{\text{Teor de proteína da amostra} - \text{Teor de proteína do branco}} \right) * 100\%$$

2.5 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS PÓS-DIGESTÃO

2.5.1 Fluorescência intrínseca

As mudanças na estrutura terciária da fração lectina, hidrolisado alcalase-papaina (SHL) e hidrolisados obtidos da digestão (SLD e SHD) foram avaliadas a partir da fluorescência intrínseca da molécula. A análise foi realizada a partir de metodologia descrita por Zhang et al., 2023, em um espectrofluorímetro (RF- 20AXS, Horiba Ltd., Japão). A fração lectina e os hidrolisados foram diluídos na concentração de 0,1 mg/mL em água deionizada e a emissão da fluorescência entre 300 e 450 nm com excitação em 280 nm, a fenda de emissão foi ajustada em 5 nm e os espectros corrigidos pela subtração do tampão utilizado para diluir a amostra.

2.5.2 Tamanho de partícula e Potencial Zeta

O tamanho da partícula e o potencial zeta da fração lectina e dos hidrolisados foram avaliados em um Nano ZS90 Zetasizer (Malvern Instruments Co., Ltd., Worcestershire, UK). A análise foi realizada de acordo com metodologia de Wu et al., 2023 com pequenas modificações. As amostras foram diluídas em água deionizada na concentração de 0,01% (p/v). O índice de refração da amostra utilizado foi de 1,45 e do dispersante (água) 1,333.

2.6 AVALIAÇÃO *in silico* DA BIOATIVIDADE DOS HIDROLISADOS

2.6.1 Análise de predição das propriedades ADMET

Por meio da plataforma ADMETLab2.0 (<https://admetmesh.scbdd.com>) foram avaliadas as propriedades de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (propriedades ADMET) das 3 sequências que retornaram os melhores perfis de bioatividade de acordo com a base de dados BIOPEP-UWM.

Inicialmente realizou-se a conversão da sequência de aminoácidos do peptídeo para o formato SMILES (Simplified molecular input line) através da ferramenta de conversão disponível na base de dados BIOPEP-UWM. Esse formato então foi submetido a predição das propriedades.

De acordo com a ferramenta disponível em ADMETLab2.0 foram avaliadas as seguintes características dos peptídeos: as constantes de dissociação ácida e básica, a facilidade de síntese (Gras Score), a absorção intestinal humana e a permeabilidade em células do tipo Caco-2 (absorção); O volume de distribuição no estado estacionário (VDss) uma propriedade farmacocinética (PK) que mede a eficácia com que uma molécula do composto é distribuída por todo o corpo (distribuição).

A característica do peptídeo de ser inibidor ou substrato das enzimas Citocromo P450 que estão envolvidas nas reações metabólicas (Metabolismo); A Meia vida do peptídeo (Excreção) e as possíveis reações de toxicidade: mutagenicidade (Ames), carcinogênese e hematotoxicidade. Os resultados obtidos foram interpretados de acordo com os critérios descritos por RITCHIE; ERTL; LEWIS, 2011.

2.6.2 Docking molecular

As interações entre os três peptídeos identificados no hidrolisado proteico da lectina de soja foram avaliadas por análises de docking molecular. Para a predição das atividades foram utilizadas as seguintes estruturas: enzima conversora de angiotensina humana - ECA (1O86), dipeptidyl peptidase IV humana- DPP IV(1NU6) e da mieloperoxidase de leucócitos humanos - MPO (3F9P) obtidas a partir da base de dados Protein Data Bank protein database (<https://www.rcsb.org/>) acesso em junho de 2024. Todas as estruturas enzimáticas foram obtidas por difração de raio x e possuíam resoluções de 2.00 Å, 2.10 Å e 2.93 Å, respectivamente.

Antes do docking as estruturas de ECA, DPP IV e MPO foram preparadas usando o software UCSF Chimera X seguindo os seguintes passos: foram removidas as moléculas não proteicas associadas as estruturas, em seguida foram adicionadas cargas e

hidrogênios para posterior análise de docking. As sequências de peptídeos foram modeladas utilizando a ferramenta de novo PEP-FOLD (LAMIABLE et al., 2016).

O docking molecular foi realizado usando AutoDock Vina (versão 1.1.2), usando o Algoritmo Genético Lamarckiano através do software PyRx v.0.9.7. A caixa de grade utilizada para cada enzima foi centralizada e seguiu as seguintes coordenadas: Dimensões de x, y e z ECA: 62.7483 Å, 73.0538 Å e 67.5284 Å; DPP IV: 88.5810, 89.2378 e 126.8429; MPO: 107.2701, 64.1220 e 87.1214. A exaustão do sistema foi configurada para 8 e para cada complexo de peptídeo-enzima foram obtidas 10 configurações de ligação como padrão (DALLAKYAN; OLSON, 2015).

A melhor posição foi escolhida com base na menor energia de ligação obtida sendo posteriormente examinada utilizando o Discovery Studio Visualizer free (v17.2.0.16349, Dassault Systemes Biovia) para identificar as possíveis interações ocorridas entre o peptídeo e as moléculas receptoras, quais os possíveis sítios e os principais tipos químicos de ligações.

2.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Avaliação do sequestro do radical ABTS:

O ensaio com o radical ABTS [2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid] foi conduzido seguindo metodologia proposta por Evangelho et al., 2017. Para realização da análise, as amostras (fração lectina, SLH, SLD e SHD) foram diluídas em água na concentração de 10 mg/mL. Alíquotas de 100 µL da amostra foram adicionados a 1,9 mL da solução de ABTS e a absorbância medida aos 6 min de reação a 734 nm. O branco foi realizado nas mesmas condições, substituindo a amostra por água deionizada. A porcentagem de inibição foi calculada utilizando a equação:

$$\%Captura = \left[1 - \left(\frac{Abs_{amostra}}{Abs_{branco}} \right) \right] * 100$$

Avaliação do sequestro do radical DPPH:

A atividade antioxidante da fração lectina e dos hidrolisados contra o radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) foi realizada de acordo com metodologia descrita

por Zhang et al., 2019. Foi utilizada a mesma solução de amostra do ensaio com o radical ABTS (10 mg/m), e a análise realizada em placa de 96 poços. 100 μ L da amostra foi misturada com 100 μ L da solução de DPPH (100 μ M em 95% de metanol) em cada poço e mantida no escuro a temperatura ambiente por 30 minutos. A placa foi analisada a 517 nm em espectrofotômetro multiplacas (MultiskanTM GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific) e o % de captura do radical DPPH calculado a partir da mesma equação utilizada no radical ABTS.

2.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os ensaios foram realizados em triplicata e os dados analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA). As diferenças entre os grupos estudados foram analisadas utilizando o teste de média Tukey para comparação de médias ao nível de 5% de significância utilizando-se o software STATISTICA 7.0[®] (STATSOFT Inc., USA). Para todas as análises foi considerado significativo $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Obtenção da lectina e processo de hidrólise

A lectina foi purificada a partir das sementes de soja através de três etapas consecutivas de purificação, precipitação por salting out, cromatografia de troca iônica e cromatografia de exclusão molecular, (Figura 1A-1B). Na SDS-Page (Figura 1C) foi possível observar a presença de uma banda na faixa de 31 kDa, o que corresponde o tamanho da proteína da lectina de soja. Devido a presença de outras bandas, além da lectina, a amostra foi denominada fração lectina.

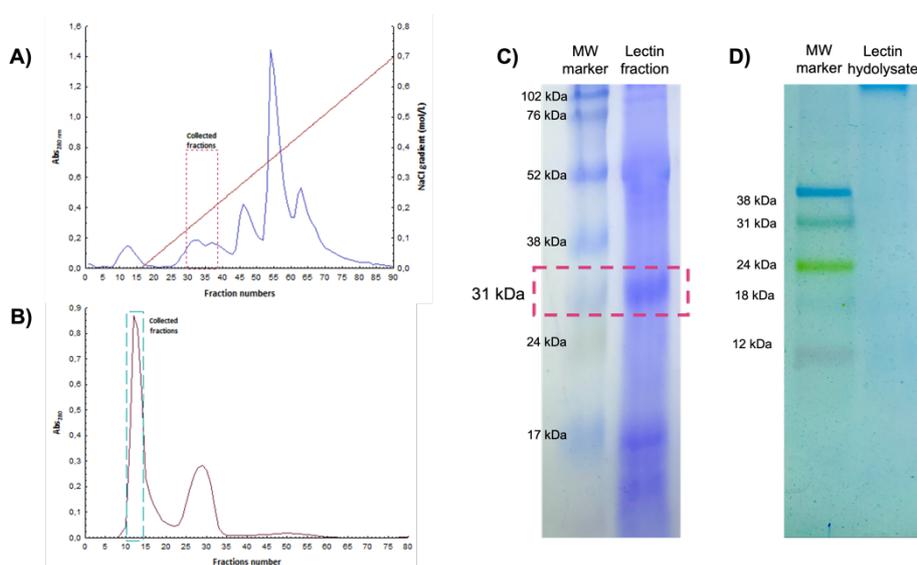


Figura 1: Processo de purificação da lectina de soja. A- Cromatograma troca iônica; B- cromatograma exclusão molecular; C- SDS-Page; D – TRIS-Tricina.

A fração lectina foi submetida a hidrólise sequencial com alcalase (4h/ 55 °C) seguida de papaína (4h/ 55 °C), e a extensão da hidrólise avaliada através da análise de grau de hidrólise sendo obtido um valor de $22,62 \pm 0,09$ %. Ao avaliar o gel de SDS-PAGE Tris-Tricina, do hidrolisado não foram observadas bandas correspondentes a peptídeos no gel, confirmando a hidrólise. No estudo realizado por Chang et al., 2021 a hidrólise de um isolado de soja com bromelina, neutrase e flavourzyme realizada simultaneamente, os autores verificaram resultados semelhantes aos resultados obtidos em nossas análises. Os autores justificaram o desaparecimento das bandas no gel devido ao maior grau de hidrólise e menor tamanho de peptídeo, já que ao avaliarem o peso molecular dos peptídeos os autores constaram a presença de peptídeos de 400Da,

indicando a eficácia da hidrólise. O tamanho dos peptídeos da lectina de soja será tratado em próximos tópicos.

A hidrólise enzimática é um processo baseado na especificidade das enzimas proteolíticas, o uso de uma mistura de proteases se torna mais eficiente que a utilização individual. Estudos indicam que a combinação de enzimas produz peptídeos mais estáveis e com menor peso molecular, devido a presença de múltiplos sítios de clivagem e maior extensão de hidrólise, o que pode resultar em peptídeos com bioatividade refinada (KALITA et al., 2024; WEN et al., 2022).

Ao hidrolisar um isolado proteico de soja com diferentes enzimas, Xu et al., 2023, obtiveram graus de hidrólise de 28,9 e 22,76% para alcalase e papaína respectivamente. Essa diferença pode ser explicada devido a capacidade de enzimas alcalinas, como a alcalase, quebrar as proteínas por possuir vários sítios de clivagem na cadeia de peptídeos (XU et al., 2023).

Ao realizar a hidrólise consecutiva em isolado proteico de grãos de tremoço, com diferentes combinações enzimáticas, Schlegel et al., 2020, observaram um grau de hidrólise no experimento alcalase-papaína de 12,0% sendo o menor entre os experimentos realizados, entretanto, o hidrolisado alcalase-papaína demonstrou-se ser mais eficaz em inibir a formação de sítios reativos IgE.

As diferenças de graus de hidrólise observadas nas pesquisas podem estar relacionadas a afinidade e especificidade da enzima, a fonte de proteína utilizada e sua pureza, a maneira como a hidrólise foi realizada e seu monitoramento (ALNUAIMI et al., 2023; EL HAJJ et al., 2023).

No processo de hidrólise em duas etapas, a segunda enzima hidrolisa novos sítios de clivagem que foram expostos pela primeira enzima, resultando em uma hidrólise adicional, produzindo pequenos peptídeos ou aminoácidos livres na segunda etapa (JIANG et al., 2024).

Dessa forma, o uso da combinação de diferentes enzimas para hidrolisar proteínas facilita a obtenção de hidrolisados contendo vários tipos de peptídeos, o que amplia a potencialidade bioativa desses hidrolisados (WU et al., 2024).

Esses estudos destacam a importância da escolha adequada das enzimas e suas combinações na otimização do processo de hidrólise de proteínas, visando a produção de peptídeos bioativos com potencial aplicação em diversas áreas, incluindo alimentos funcionais e farmacêutica.

3.2 FTIR

Os espectros de FTIR da fração lectina e do HLS obtidos na faixa de comprimento de onda de 4000 – 500 cm^{-1} estão apresentados na Figura 2A. Neste, foram destacados três picos relacionados com mudanças de estrutura: a região de amida A que está associada com vibração de estiramento C-N acoplado com ligações de hidrogênio, a lectina de soja apresentou intensidade máxima em 3284 e o HSL em 3261 cm^{-1} . Na região de amida I as intensidades máximas foram de 1644 e 1639 cm^{-1} para a lectina de soja e o hidrolisado, respectivamente. A região de amida II está relacionada ao estiramento das ligações C-N e à flexão das ligações N-H em proteínas e peptídeos, e nessa região a lectina apresentou intensidade em 1530 e o hidrolisado em 1542 cm^{-1} . Todas essas alterações na intensidade e posição dos picos espectrais estão relacionadas a mudanças na estrutura da proteína (HUANG et al., 2021).

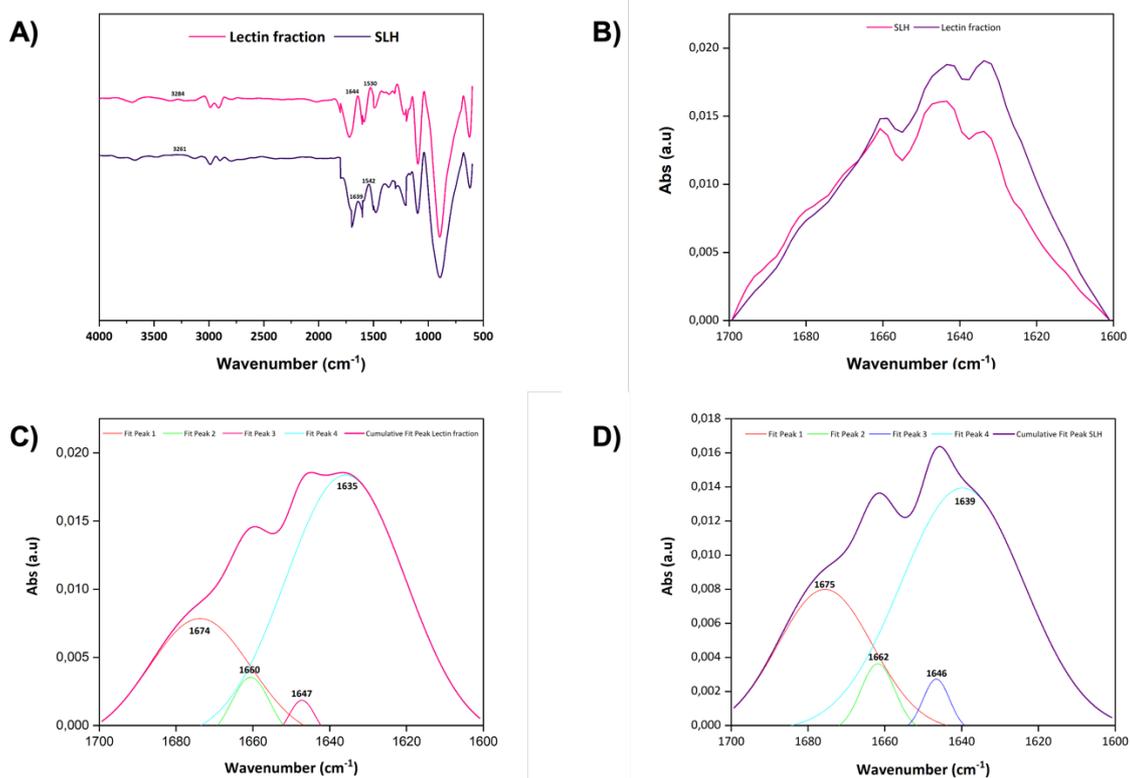


Figura 2: Espectros de absorção FTIR da fração lectina e do hidrolisado de lectina de soja (HLS). A) Espectro completo de 4000 a 400 cm^{-1} ; B) Região da amida I; C) Região da amida I do espectro de absorção deconvoluído da fração lectina; D) Região da amida I do espectro de absorção deconvoluído do hidrolisado (HLS).

A região de amida I é muito sensível às estruturas secundárias das proteínas, como α -hélice, folha- β , dobra- β e padrões não-repetitivos (random coil). A análise quantitativa dessa região pode ser realizada através do ajuste da curva usando espectros deconvoluídos e de segunda derivada.

A deconvolução é um método que pode melhorar a resolução do espectro de infravermelho separando picos sobrepostos, e a intensidade do pico dos espectros deconvoluídos é relacionada a estrutura proteica. As sub-bandas foram determinadas de acordo com (LI et al., 2024), considerando as seguintes faixas 1600 – 1640 cm^{-1} para folha- β , 1641–1650 cm^{-1} para random coil, 1651–1660 cm^{-1} para α -hélice e 1661–1700 cm^{-1} para dobra- β (TIAN et al., 2020).

Através do ajuste das curvas dos espectros da banda amida I, da fração lectina e do hidrolisado (Figura 2C e 2D respectivamente), foi possível obter a provável estrutura secundária que está apresentado na Tabela 1.

Tabela 1: Estrutura secundária da fração lectina e do hidrolisado de lectina de soja (HLS), obtidos através da segunda derivada e ajuste Gaussiano dos espectros da região amida I.

	Second structure (%)			
	α -Helix	β -sheet	β -turn	Random coil
Lectin fraction	5,08	66,86	25,82	2,23
SLH	-	63,69	33,40	2,91

Structural composition of amide-I band, obtained from the área under of each deconvoluted peak and expressed as a percentage of total área.

Os espectros de FTIR mostraram diferentes tendências entre a fração lectina e o hidrolisado de lectina, especificamente, a banda amida I deslocou-se de 1644 cm^{-1} para 1639 cm^{-1} , indicando que a hidrólise teve efeitos significativos na estrutura secundária da proteína, isto também pode ser observado através do desaparecimento da proporção α -hélice no LSH, corroborando com estudos de Tian et al., 2020, que ao avaliarem o efeito da hidrólise em um isolado de soja com alcalase observaram uma diminuição de 10% na fração α -hélice entre os tratamentos de 20 minutos de hidrólise e 180 min.

Através dos dados da Tabela 1, pode-se observar que a predominância de estruturas de folhas- β tanto na fração lectina quanto no SLH, o tratamento de hidrólise levou ao desaparecimento de estruturas α -hélice, durante a hidrólise se altera significativamente a estrutura da proteína o que significa que ela se dobra e redobra

durante o processo, o que leva a destruição da estrutura de α -hélice da proteína e ajuda na sua flexibilidade (YAN et al., 2021).

Observa-se também um aumento no conteúdo de estruturas com padrões não repetidos (random coil). De acordo com Xu et al., 2023, a atividade das enzimas pode despolimerizar as estruturas em α -hélice e folhas- β , provendo a formação de estruturas de padrão não repetitivo, levando a uma mudança estrutural da ordem para a desordem dentro do sistema proteico

As alterações conformacionais sofridas pela fração lectina pela hidrólise consecutiva com alcalase e papaína, estão relacionadas as condições em que o processo foi realizado, a hidrólise levou a diminuição da intensidade dos picos das bandas de amida I e II, que foram causadas por alterações na estrutura secundária da proteína.

3.2 Análise termogravimétrica (TGA)

Métodos de análise térmica são utilizados para estudar reações químicas e transições de fase que ocorrem com o aquecimento ou resfriamento da amostra. A medida da perda de massa a partir da curva TG fornece informações sobre mudanças na composição da amostra e estabilidade térmica da substância (GOLONKA et al., 2023). A curva TG obtida para a fração lectina e o SLH estão apresentados na figura 3A e 3B, respectivamente.

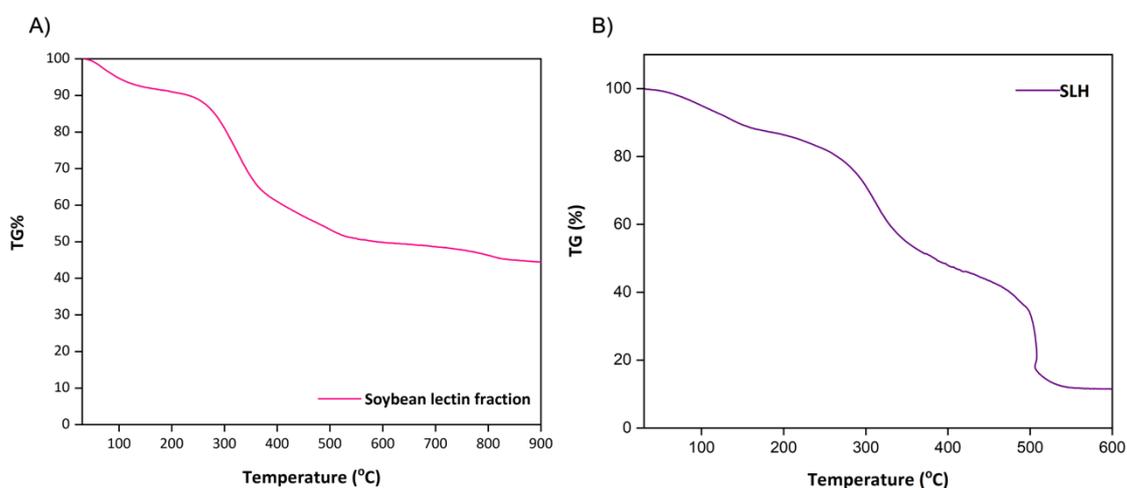


Figura 3: Curva termogravimétrica da A) fração lectina de soja e B) hidrolisado de lectina de soja.

Na curva TG da fração lectina (Fig. 3A) foi possível observar uma perda de massa inicial de aproximadamente 9% entre 50 e 204 °C. Em seguida, no segundo estágio ocorreu uma perda mais acentuada entre 200 – 386 °C que correspondeu a 26% de massa total. O último estágio se deu entre 380 – 507 °C, contribuindo com por 13% de perda de massa.

Em relação ao hidrolisado de lectina de soja (SLH), a perda de massa inicial foi de aproximadamente 12%, entre 50 – 164 °C, assim como na lectina. O segundo estágio apresentou uma perda mais acentuada, de 41,55% com a temperatura variando até 380°C. No terceiro estágio, na temperatura de 385 – 500 °C houve uma perda de 29,1%. A massa residual ao fim do experimento foi de 44,43% e 11,45% para a lectina e o hidrolisado, respectivamente. Esses resultados sugerem que o processo de hidrólise utilizado promoveu a quebra de estruturas mais complexas da lectina em peptídeos menores e aminoácidos livres, o que resultando em uma maior perda de massa nas temperaturas mais elevadas observadas no SLH.

De acordo com Ferreira et al., 2021 a perda inicial de massa está relacionada a perda de umidade da amostra. A temperatura em que as proteínas começam a se degradar é assumida como o início da segunda etapa de perda de massa. Os autores relacionam a terceira perda de massa com as quebras das ligações S-S, N-O e O-O das proteínas.

Ao avaliar a estabilidade térmica de diferentes proteínas vegetais como grão de bico, lentilha, feijão e ervilha, Ricci et al., 2018 observaram o mesmo comportamento térmico para todas as amostras, sendo as maiores perdas de massa ocorrendo no estágio intermediário de temperatura, assim como foi observado para lectina de soja e seu hidrolisado

As mudanças que ocorrem na faixa entre 200 – 500 °C estão relacionadas à degradação da amostra, à descarboxilação e à despolimerização, que resultam da quebra das ligações peptídicas. A lectina e o peptídeo demonstraram uma boa estabilidade térmica, sendo a lectina mais termoestável que o hidrolisado. As diferenças observadas entre as amostras são atribuídas às suas estruturas, ou seja, das diferentes interações entre as sequências de aminoácidos (GOLONKA et al., 2023).

3.3 MeV

As alterações na microestrutura da fração lectina de soja e do hidrolisado foram observados por microscopia eletrônica de varredura, conforme ilustrado na Figura 4.

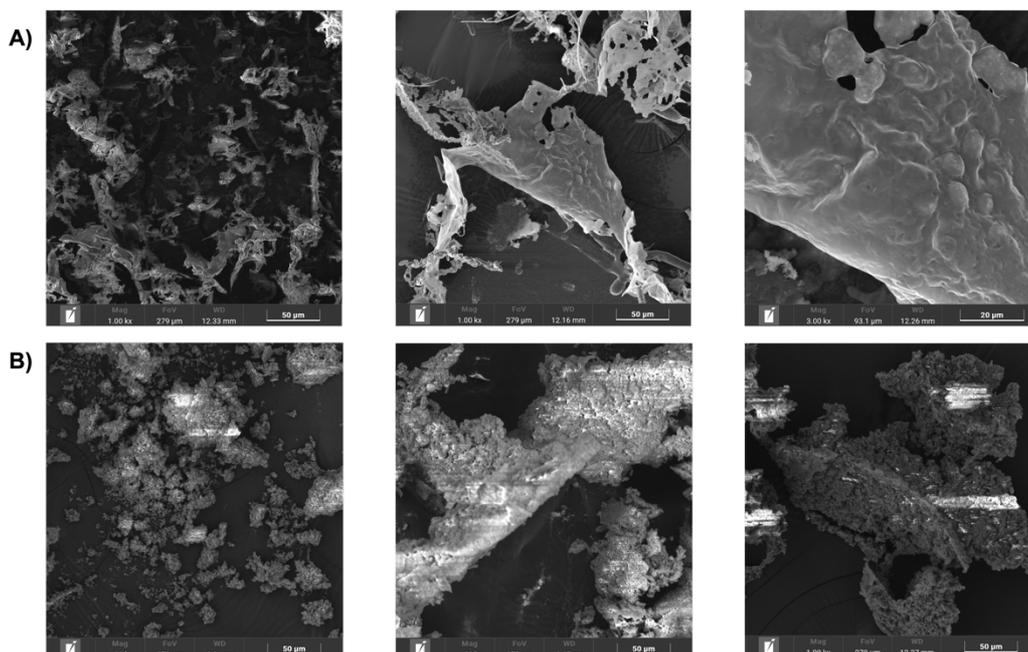


Figura 4: Fotografias de MeV da A) fração lectina e B) SLH.

Através das imagens obtidas, foi possível observar a morfologia microestrutural das amostras. A fração lectina (Fig. 4A) apresenta uma estrutura mais desordenada, lamelar e lisa, semelhante a folhas lisas com bordas afiadas. Por outro lado, o padrão de microestrutura resultante do processo de hidrólise levou a formação de peptídeos unidos na forma de agregados esféricos porosos com outros pequenos fragmentos soltos (Fig. 4B)

A estrutura secundária de uma proteína pode desempenhar um papel no controle da sua propensão a agregação. Estudos mostram que a agregação induzida pela liofilização de diversas proteínas foi associada ao percentual de folhas β nas estruturas das moléculas (WANG; ROBERTS, 2018). Como observado na análise de FTIR, a amostra SLH apresenta aproximadamente 97% de sua estrutura em folhas e dobras β , o que pode explicar a agregação visualizada na microscopia.

Além disso, a quebra da proteína através da hidrólise pode levar a exposição de aminoácidos hidrofóbicos, que estão frequentemente presentes em agregados peptídicos de hidrolisados de soja. O tamanho das partículas em agregados proteicos está diretamente relacionado a quantidade de aminoácidos hidrofóbicos, principalmente aromáticos, na cadeia polipeptídica (SUN et al., 2023).

3.4 Simulação da digestão gastrointestinal *in vitro*

Para que exerçam o efeito é necessário que os peptídeos bioativos resistam a degradação ou melhorem a atividade no processo de digestão, de modo a serem absorvidos e alcancem a corrente sanguínea em uma forma ativa e assim poder agir no seus órgãos-alvo. Os protocolos de digestão *in vitro* oferecem informações relevantes a cerca da digestibilidade e mudanças conformacionais das proteínas em condições fisiológicas simuladas (COSCUETA et al., 2019b; SANTOS-HERNÁNDEZ et al., 2020).

O desempenho à resistência da simulação da digestão gastrointestinal *in vitro* da fração lectina e do seu hidrolisado foi avaliado através da atividade antioxidante, contra os radicais ABTS e DPPH. Além disso, os produtos da digestão foram caracterizados em relação a características estruturais como fluorescência intrínseca e tamanho de partícula.

Um dos principais benefícios obtidos pela simulação da digestão gastrointestinal é a digestibilidade das proteínas. Embora estudos *in vivo* sejam preferíveis, os estudos *in vitro* podem fornecer dados uteis com menor custo, tempo de análise mais curto e maior facilidade de análise (ABEER; TRAJKOVIC; BRAYDEN, 2021).

A digestibilidade *in vitro* da fração lectina e do hidrolisado foi avaliada após o processo de hidrólise, o hidrolisado apresentou digestibilidade muito maior ($p < 0,05$) que a lectina, os valores obtidos foram de $81,16 \pm 0,62\%$, enquanto a lectina de $35,41 \pm 0,46\%$.

A lectina é conhecida como fator antinutricional, devido aos seus efeitos fisiológicos indesejáveis, como diminuição da absorção de nutrientes. Estudos mostram que embora possa ser lentamente degradada pela pepsina, a lectina de soja não pode ser hidrolisada pela tripsina, resultando em uma baixa digestibilidade, o que pode causar danos ao tecido intestinal ao se ligar a receptores específicos na superfície das células do intestino delgado (HAN et al., 2023).

Uma das formas mais clássicas de inativar a ação antinutricional das lectinas é através da aplicação de calor, entretanto, esse processo leva a destruição de outros nutrientes essenciais e de regiões bioativas na estrutura das proteínas (COSCUETA et al., 2023).

O uso da hidrólise consecutiva com alcalase seguida de papaína se mostrou eficiente em aumentar a digestibilidade da fração lectina de soja, se mostrando um método que pode ser utilizado em detrimento da ação de calor.

3.4.1 Fluorescência intrínseca

As alterações na estrutura, da fração lectina e do hidrolisado, após o processo de digestão foi realizada por meio da análise de espectroscopia de fluorescência intrínseca. A partir da monitoração da intensidade da fluorescência e do comprimento de onda máximo, foi possível observar mudanças na estrutura terciária da proteína. Os resultados obtidos para a fração lectina, SLH, fração lectina pós-digestão (SLD) e hidrolisados pós-digestão (SHD), estão apresentados na Figura 5.

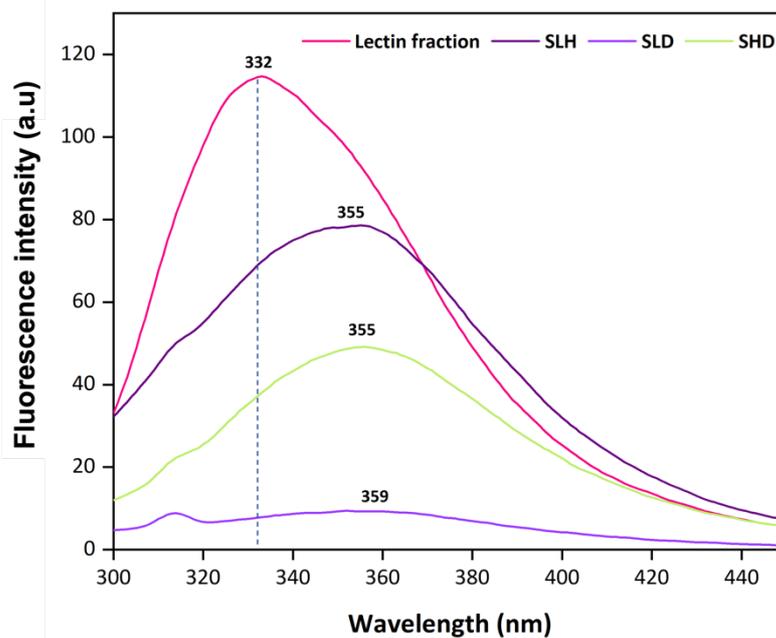


Figura 5: Espectro de fluorescência intrínseca da fração lectina, hidrolisado de lectina de soja (SLH), fração lectina pós digestão (SLD) e hidrolisados de lectina pós digestão (SHD).

Quando a sonda fluorescente encontra uma proteína/peptídeo, o sistema formado pode emitir luz após ser excitado por um comprimento de onda que pode ser ultravioleta ou visível. A intensidade da luz emitida por esse sistema indicará as variações na estrutura da proteína. As mudanças na intensidade da fluorescência estão relacionadas ao número de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina e fenilalanina) expostos na superfície da proteína ou peptídeo (FANG et al., 2021).

Em comparação com a fração lectina de soja, pode-se observar um red shift em todos os tratamentos, ou seja, o comprimento de onda de emissão máximo (λ_{max}) aumentou, em relação a amostra de lectina de soja, de 332 para 355 nm para o SLH e

SHD, e de 332 para 359 nm para a lectina de soja pós digestão (SLD), e isto indica um aumento na hidrofobicidade. De acordo com, Wang et al., 2021, normalmente os resíduos de aminoácidos aromáticos que podem produzir fluorescência estão protegidos no interior da proteína, com o processo de hidrólise, essa estrutura se desdobra e os grupos das cadeias laterais desses aminoácidos vão sendo gradualmente expostos, aumentando a polaridade do ambiente em que esses aminoácidos estão localizados. Esse comportamento explica o red shift do comprimento máximo do seu pico de absorção.

Os resultados da análise das intensidades de fluorescência, demonstraram que todos os hidrolisados apresentaram uma intensidade mais baixa do que a fração lectina intacta, sendo a menor intensidade observada na fração lectina que passou por digestão simulada.

Esse comportamento é observado em tratamentos enzimáticos e está relacionado a agregação dos hidrolisados. Os grupos hidrofóbicos expostos são recapturados nos aglomerados de proteína, reduzindo o número de grupos hidrofóbicos disponíveis, e conseqüentemente, fazendo com que ocorra uma diminuição da intensidade da fluorescência (XU et al., 2023). Esse fenômeno, pode ser observado através da análise de MeV, onde a amostra SLH se apresentou na forma de aglomerados diferentemente da fração lectina que tinha uma forma mais plana.

Outros estudos com proteínas de soja como àqueles de Fang et al., (2021); Xu et al., (2023); Yuan et al., (2021), relataram comportamento semelhante de hidrolisados obtidos com diferentes enzimas.

3.4.2 Tamanho de partícula e potencial zeta

A Figura 6A, mostra que as soluções de amostras avaliadas exibiram picos de distribuição monomodal de tamanho de partícula, com os picos deslocados mais a direita. A fração lectina, amostra com menor tamanho, corresponde a aproximadamente 141 nm, o maior tamanho foi da fração lectina pós-digestão com 565,5 nm. Corroborando com os dados da fluorescência intrínseca, onde evidenciou-se que maior tamanho de apresentou a menor intensidade de fluorescência, e está relacionado a agregação desses peptídeos. Isto pode ser constatado pelo fato do hidrolisado SLH, cujo tamanho de partícula era de 328,9 nm, após ser submetido a simulação da digestão (SHD), passou a apresentar tamanho de partícula de 265,8 nm.

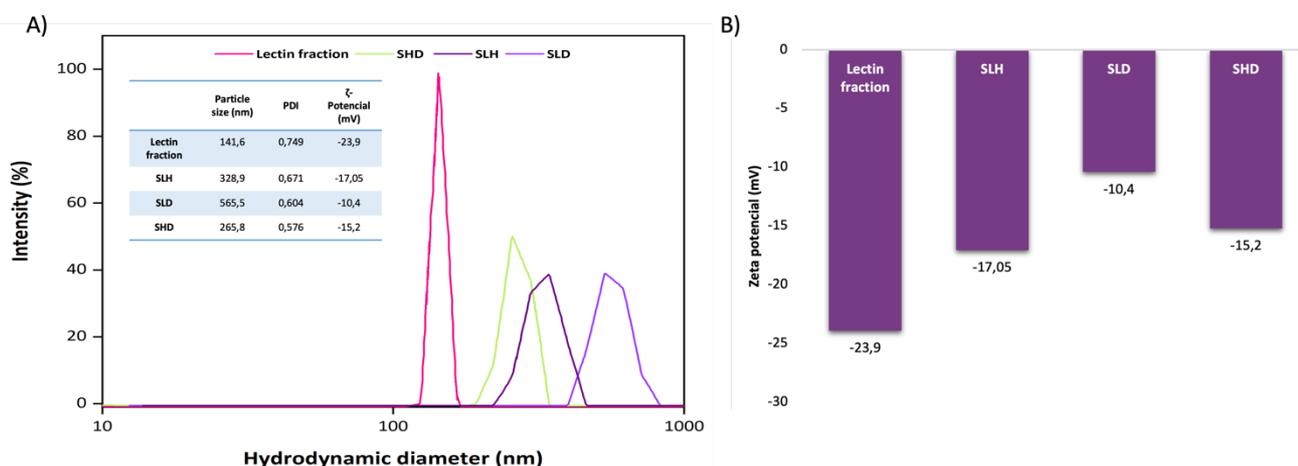


Figura 6: A) Curva de distribuição do tamanho de partículas; e B) Potencial zeta das amostras.

O índice de polidispersidade (PDI) avalia as propriedades dispersivas de polímeros macromoleculares, esse índice varia até 1 sendo que valores mais baixos indicam uma melhor dispersibilidade em água (WANG et al., 2021). Ao comparar o PDI (Figura 7A) da fração lectina com o dos hidrolisados, observa-se que a hidrólise melhorou as propriedades dispersivas das amostras em água, principalmente no hidrolisado pós-digestão.

O potencial zeta reflete a estabilidade de uma solução. Quanto maior seu valor mais estável é a solução, ou apresenta partículas menores. O potencial zeta obtido das amostras está representado na Figura 6B, as mudanças apresentadas foram consistentes com o tamanho de partícula observada, o maior potencial zeta foi observado na fração lectina, enquanto o menor foi obtido na lectina pós-digestão. De acordo com Yu et al., 2022, as variações de potencial zeta estão relacionadas a extensão da hidrólise, onde os peptídeos tendem a se agregar, causando aglomeração ou dissociação dos grupos carregados.

3.4.3 Atividade antioxidante

O potencial antioxidante das amostras frente aos radicais ABTS e DPPH estão ilustrados na Figura 7. Os resultados mostraram que todas as amostras apresentaram atividade antioxidante em relação aos radicais testados. Para o radical ABTS, o maior percentual foi observado para o hidrolisado alcalase-papaína, com um percentual de

captura de 49,34% e o menor na fração lectina de 34,28%, não foi observada diferença estatística entre este tratamento e a lectina pós-digestão (SLD) que apresentou 36,39% de inibição.

Em relação ao radical DPPH, as amostras apresentaram uma alta capacidade de captura, sendo o hidrolisado (SLH) a amostra com o maior percentual de captura 68,69%. Todavia, não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre esse tratamento e o hidrolisado pós-digestão (SHD). A fração lectina foi a amostra que apresentou o menor percentual de captura 26,40%.

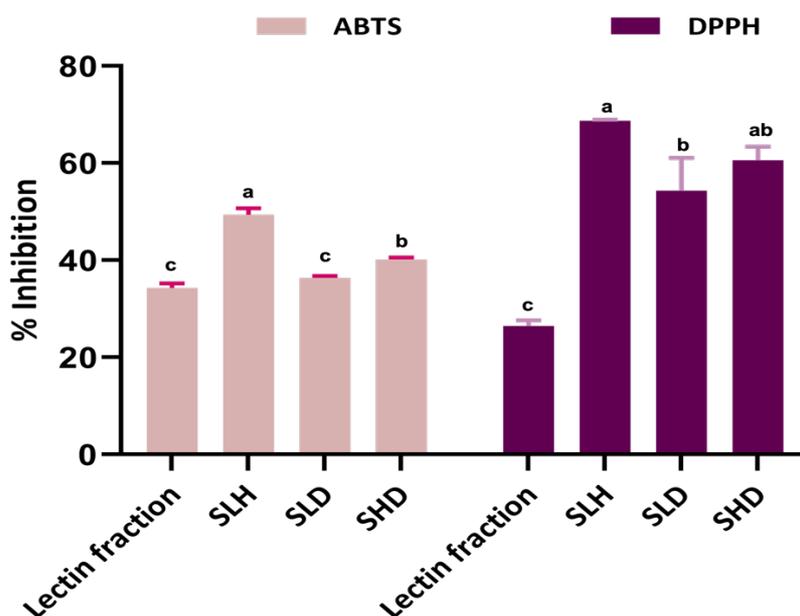


Figura 7: Comparação da atividade antioxidante da fração lectina, hidrolisado alcalase-papaína (SLH), fração lectina pós digestão (SLD) e hidrolisados pós digestão (SHD), frente os radicais ABTS e DPPH. *Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey

Os resultados mostraram que os peptídeos obtidos pela hidrólise consecutiva alcalase-papaína foram os mais eficazes na captura dos dois radicais avaliados. Ao avaliar hidrolisados de proteína de soja com alcalase, Tian e colaboradores (2020) observaram um maior percentual de captura frente ao radical DPPH com o aumento no tempo de hidrólise, este aumento está relacionado à exposição de resíduos de aminoácidos e cadeias laterais com capacidades antioxidantes após a hidrólise, além disso, peptídeos com atividade antioxidante significativas são moléculas pequenas em tamanho, geralmente $< 1\text{kDa}$ (TIAN et al., 2020).

Ao avaliar a atividade antioxidante frente ao radical DPPH de peptídeos de soja obtidos por hidrólise enzimática com alcalase e protamex, Islam et al., 2022 obtiveram resultados de 62 e 59% de inibição para os hidrolisados de protamex e alcalase, respectivamente. Os resultados reportados no experimento, demonstram atividade antioxidante inferiores, ao realizados com as amostras do presente estudo. Onde 10 mg/mL de cada amostra testada, obtidos da hidrólise consecutiva alcalase-papaína foi mais eficiente na geração de peptídeos com atividade antioxidante frente ao radical DPPH do que os reportados por Islam et al. (2022).

Resultados semelhantes foram obtidos pela hidrólise de farelo de soja com alcalase. Zhang et al., 2023, que o hidrolisado apresenta melhor atividade que a proteína intacta, os autores obtiveram uma captura de 64% do radical ABTS testando a concentração de 10 mg/mL e relacionaram essa atividade a presença de peptídeos que continham resíduos dos aminoácidos Thr, Asp, Lys, Glu, Met e Gly. Além disso, os peptídeos com peso molecular mais baixo desempenham um papel importante na atividade antioxidantes, pois, estes favorecem a ligação às moléculas

A partir da análise da atividade antioxidante *in vitro* das amostras, foi possível observar que a atividade se mantém após a simulação da digestão gastrointestinal, não havendo diferença significativa ($p < 0,05$) no percentual de captura, para o radical DPPH, do hidrolisado alcalase-papaína e do produto resultante da sua digestão (SHD). Isso sugere que os peptídeos foram resistentes à simulação da digestão ou mesmo que parcialmente degradados em peptídeos menores, sua atividade biológica permaneceu (COSCUETA et al., 2019).

3.5 Avaliação *in silico* dos peptídeos gerados pela hidrólise enzimática consecutiva de alcalase-papaína

3.5.1 Características físico-químicas e potencial bioativo dos hidrolisados

O perfil peptídico do hidrolisado de lectina de soja com alcalase-papaína foi determinado através de análise em Nano LC-ESI-MS/MS. Os resultados expostos na Figura 8, ilustram que um total de 489 sequências com massas variando de 6 a 2500 Da foram identificadas a partir da hidrólise da fração lectina de soja, com tamanho variando entre 6 – 22 resíduos de aminoácidos. As concentrações mais altas de peptídeos (61% do total) foram

encontradas apresentando comprimento de resíduos de 11 a 18 aminoácidos, sendo que 50% destes apresentam tamanho entre 1,1-1,5 kDa (Figura 8B).

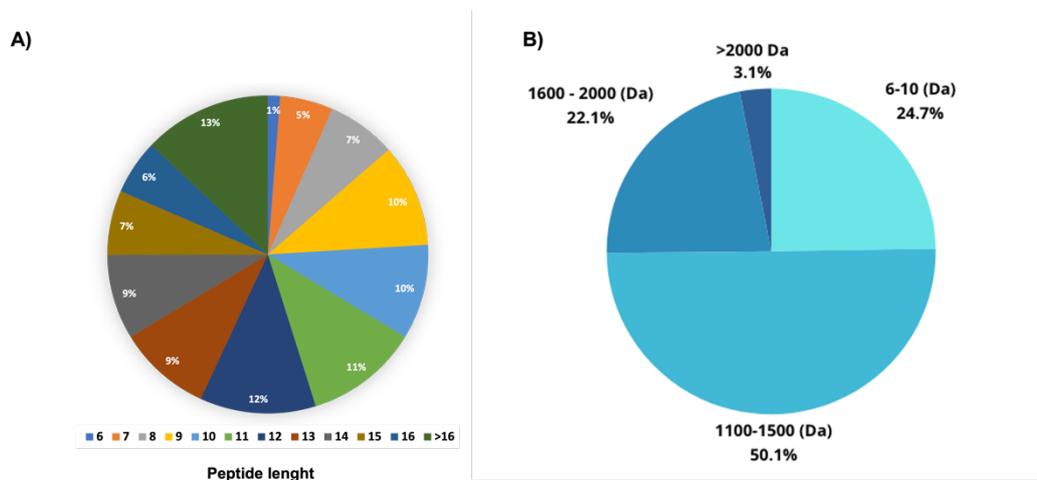


Figura 8: A) número de resíduos de aminoácidos dos peptídeos obtidos pela hidrólise sequencial da lectina de soja; B) distribuição da massa molecular dos peptídeos.

Ao hidrolisar um isolado de soja através de hidrólise consecutiva com alcalase e neutrase, Wen et al., 2022, observaram a formação de oligopeptídeos dos quais 76% apresentaram peso molecular de até 1kDa, e 18% massa entre 1 e 3 kDa. Assim, podemos justificar a falta de bandas no gel de eletrorese (Figura 1D), onde o menor peso molecular no gel foi de 12kDa.

Os peptídeos que apresentam massa molecular menor que 5000 Da são chamados de peptídeos de baixo peso molecular (LMWPs). Mais de 90% desses peptídeos podem ser absorvidos pelo corpo e desempenhar atividades como inibição de radicais livres, aceleração da síntese proteica, melhora a absorção e utilização de minerais e melhora na imunidade. Além disso, esses peptídeos apresentam ótimas características químicas e funções fisiológicas, e isso tem levado a um maior número de estudos que buscam sua extração e identificação (YANG et al., 2021).

Com objetivo de realizar uma triagem inicial do potencial bioativo das sequências de aminoácidos identificadas, utilizou-se o software PeptideRanker. Esse software avalia os peptídeos em uma escala variando de 0-1, onde quanto maior a pontuação maior a probabilidade de bioatividade. Um limiar de pontuação de 0,5 é amplamente utilizado nos estudos, mas quando se tem probabilidades $\geq 0,8$, o peptídeo é considerado bioativo. Dessa forma, os autores têm preferido utilizar o limiar de 0,8 ao invés de 0,5 para evitar falsos negativos (RIVERO-PINO; MILLAN-LINARES; MONTSERRAT-DE-LA-PAZ,

2023). Através dessa triagem foram obtidas 19 sequências de aminoácidos que estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2: Sequências obtidas através da hidrólise sequencial com alcalase e papaína da fração lectina com score $\geq 0,8$ obtidos pelo PeptideRanker e análise das suas propriedades físico-químicas

Sequence	PeptideRanker score	Molecular weight (g/mol)	pI	GRAVY	Charge
SFSWNKFVPKQPNMIL	0,901275	1936,54	10,02	-0,250	2,00
FSWNKFVP	0,899919	1024,29	9,11	-0,113	1,00
FSWNKFVPKQPNMIL	0,889566	1849,45	10,02	-0,213	2,00
WDPPNPHIGI	0,888577	1145,43	5,09	-0,730	-0,50
WDPPNPHIG	0,887907	1032,25	5,09	-1,311	-0,50
WDPPNPH	0,878879	862,00	5,09	-2,271	-0,50
SWDPPNPHIGI	0,87765	1232,52	5,09	-0,736	-0,50
WDPPNPHIGIN	0,874991	1259,55	5,09	-0,982	-0,50
SWDPPNPHIG	0,86999	1119,34	5,09	-1,260	-0,50
SWNKFVPKQPNMIL	0,861274	1702,26	10,02	-0,429	2,00
SWDPPNPHIGIN	0,858542	1346,64	5,09	-0,967	-0,50
SWDPPNPH	0,857623	949,09	5,09	-2,088	-0,50
FSWNKFVPK	0,854589	1152,48	10,02	-0,533	2,00
SFSWNKFVPK	0,844659	1239,57	10,02	-0,560	2,00
WNKFVPKQPNMIL	0,834572	1615,17	10,02	-0,400	2,00
SFSWNKFVPKQPNMILQ	0,828903	2064,69	10,02	-0,441	2,00
SLPEWVRIGF	0,824436	1203,55	6,36	0,360	0,00
LPEWVRIGF	0,804587	1116,46	6,36	0,489	0,00
SWNKFVP	0,816006	877,10	9,11	-0,529	1,00

Parâmetros como solubilidade, carga e ponto isoelétrico são importantes características a serem consideradas no desenvolvimento de novos medicamentos e na utilização em alimentos como nutracêuticos, devido seu papel na distribuição no corpo humano e no direcionamento a bactérias, vírus, células ou proteínas (NINGRUM et al., 2022).

O índice de média ponderada de hidrofobicidade (GRAVY) é utilizado para estimar a hidrofobicidade ou hidrofiliidade de uma proteína, o índice GRAVY varia de -2 a +2, e seu valor será positivo em sequências de aminoácidos hidrofóbicas (CAVALIERE et al., 2021). Dos 19 peptídeos avaliados, 89% são hidrofílicos, apenas os peptídeos SLPEWVRIGF e LPEWVRIGF apresentaram índice GRAVY positivo, indicando ser hidrofóbicos.

Em relação ao ponto isoelétrico teórico, os peptídeos apresentaram valores variando entre 5,09 – 10,02. Em relação a carga 47% dos peptídeos apresentaram carga positiva em pH 7, de acordo com BERRAQUERO-GARCÍA et al., 2023, a carga positiva nos peptídeos é conhecida por facilitar sua absorção no processo de transporte, através das células, o que pode influenciar positivamente sua eficácia biológica.

Após essa seleção, as potenciais atividades biológicas desenvolvidas pelos peptídeos foram avaliadas utilizando a ferramenta de análise do BIOPEP. As atividades encontradas para os peptídeos foram majoritariamente antioxidantes, inibição da ECA e inibição da DPP-IV. Para essas atividades calculou-se os parâmetros de A e B, e os peptídeos que apresentaram maior valor de A foram escolhidos para os próximos ensaios. De acordo com a literatura quanto maior o valor de A, maior o potencial daquele peptídeo em exercer sua bioatividade (XU et al., 2023). Os valores calculados para os peptídeos estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Cálculo dos valores de A e B dos peptídeos em relação as atividades antioxidante, inibição da ECA, e inibição da DPP-IV.

Sequence	Activity	A value	B value
SFSWNKFVVPKQPN MIL	ACE inhibitor	0,5000	0,010344495
	dipeptidyl peptidase IV inhibitor	0,6875	0,000491898
	Antioxidant	0,0625	
FSWNKFVP	ACE inhibitor	0,5000	0,017245139
	dipeptidyl peptidase IV inhibitor	0,5000	0,000983796
	Antioxidant	0,1250	
	ACE inhibitor	0,4667	0,010522095

FSWNKFVPKQPN MIL	dipeptidyl peptidase IV inhibitor	0,6667	0,000524692
	Antioxidant	0,0667	
WDPPNPHIGI	ACE inhibitor	0,4000	0,000166667
	dipeptidyl peptidase IV inhibitor	0,8000	1,7064846E- 5
	Antioxidant	0,100	
WDPPNPHIG	ACE inhibitor	0,3333	9,259259E-5
	dipeptidyl peptidase IV inhibitor	0,7778	1,896094E-5
	Antioxidant	0,1111	
WDPPNPH	ACE inhibitor	0,2857	
	dipeptidyl peptidase IV inhibitor	0,8571	243783520,2
SWDPPNPHIGI	ACE inhibitor	0,3636	0,000151515
	dipeptidyl peptidase IV inhibitor	0,8182	1,551349E-5
	Antioxidant	0,0909	
WDPPNPHIGIN	ACE inhibitor	0,3636	0,000151515
	dipeptidyl peptidase IV inhibitor	0,8182	1,551349E-5
	Antioxidant	0,0909	
SWDPPNPHIG	ACE inhibitor	0,3000	8,333333E-5
	dipeptidyl peptidase IV inhibitor	0,8000	1,706484E-5
	Antioxidant	0,1000	
SWNKFVPKQPNMI L	ACE inhibitor	0,5000	0,01127367
	dipeptidyl peptidase IV inhibitor	0,7143	0,00056216
	Antioxidant	0,0714	
SWDPPNPHIGIN	ACE inhibitor	0,3333	0,00013889
	dipeptidyl peptidase IV inhibitor	0,8333	1,422070E-5

	Antioxidant	0,0833	
SWDPPNPH	ACE inhibitor	0,2500	
	dipeptidyl peptidase IV inhibitor	0,8750	2,133105E-5
FSWNKFVPK	ACE inhibitor	0,5556	0,0153290
	dipeptidyl peptidase IV inhibitor	0,5556	0,00087448
	Antioxidant	0,1111	
SFSWNKFVPK	ACE inhibitor	0,6000	0,0145641
	dipeptidyl peptidase IV inhibitor	0,6000	0,00078701
	Antioxidant	0,1000	
WNKFVPKQPNMI L	ACE inhibitor	0,5385	0,012140879
	dipeptidyl peptidase IV inhibitor	0,6923	0,000605413
SLPEWVRIGF	ACE inhibitor	0,5000	0,002984899
	dipeptidyl peptidase IV inhibitor	0,7000	0,001725275
LPEWVRIGF	ACE inhibitor	0,5556	0,00331656
	dipeptidyl peptidase IV inhibitor	0,6667	4,43557E-6
SWNKFVP	ACE inhibitor	0,5714	0,0197088
	dipeptidyl peptidase IV inhibitor	0,5714	0,0011243

A dipeptidil peptidase IV (DPP-IV) está relacionada com o desenvolvimento de diabetes tipo 2; entre os substratos dessa exopeptidase, os mais amplamente estudados são o peptídeo-1 e o polipeptídeo insulínico dependente de glicose (GIP). Essas duas moléculas desempenham papéis essenciais na manutenção da homeostase da glicose. Após a secreção da insulina, o GLP-1 e o GIP são rapidamente degradados pela DPP-IV, a inibição dessa enzima melhora a tolerância à glicose em pacientes diabéticos. Dessa forma os inibidores de DPP-IV vêm se apresentando como uma nova classe de agentes antidiabéticos orais (ANTONY et al., 2024).

Ao avaliar a hidrólise sequencial com alcalase, tripsina e flavourzyme de isolado de soja, RIVERO-PINO; ESPEJO-CARPIO; GUADIX, 2021 obtiveram inibição da DPP-IV com CI_{50} de 2,39 mg/mL, estes relacionaram a boa atividade do hidrolisado ao alto número de resíduos de prolina e alanina presentes nos peptídeos gerados.

Várias pesquisas de atividade antioxidante com peptídeos de soja já foram publicados (AMAKYE et al., 2021; CAVALIERE et al., 2021; WANG et al., 2020). Essa atividade é frequentemente relacionada à composição dos aminoácidos, muitos desses resíduos com potencial antioxidante estão localizados dentro do núcleo da proteína, onde são inacessíveis as moléculas oxidantes.

Dessa forma, a hidrólise tende a aumentar essa atividade ao expor os aminoácidos antioxidantes nas proteínas. Ao estudar a atividade antioxidante de um isolado de soja, Farias et al., 2023, observaram melhor atividade com o radical DPPH relacionando o resultado a maior afinidade do radical aos peptídeos com menor massa molecular. Esta atividade também pode ser observada nos resultados obtidos pela hidrólise da lectina de soja.

O sistema renina-angiotensina (RAS) e o sistema caliceína-cinina (KKS) são as principais vias de controle da pressão sanguínea. O aumento na pressão sanguínea é controlado pela RAS, no qual a angiotensinogênio no plasma produz continuamente angiotensina I. Essa angiotensina I será convertida em angiotensina II, através da enzima conversora de angiotensina (ECA) no sangue e no tecido pulmonar. O tratamento com drogas sintéticas utiliza inibidores sintéticos da ECA como enalapril e captopril. Há relatos na literatura de diversos peptídeos com atividade de inibir a ECA, geralmente apresentam de 2 a 15 resíduos de aminoácidos e podem ser isolados de diversos tipos de alimentos (KIM; YANG; KIM, 2021). Ao avaliar peptídeos de soja obtidos por hidrólise enzimática com uma protease alcalina, Shao et al., 2023 obtiveram inibição média de 54% da atividade da enzima.

Diversas pesquisas que envolvem peptídeos bioativos vêm sendo desenvolvidas, entretanto, para que se possa fazer as alegações de bioatividade dessas moléculas é necessário compreender a farmacologia desses peptídeos durante sua passagem pelo trato gastrointestinal, sem que ele cause efeito adversos (KIM; YANG; KIM, 2021).

Foram selecionados os três peptídeos com maior valor de A para as atividades antioxidante (FSWNKFVP), inibição da ECA (SFSWNKFVPK) e inibição da DPP-IV (SWDPPNPH) para avaliação do docking molecular e das propriedades farmacocinéticas, as estruturas químicas e bioquímicas dos peptídeos estão representadas na Figura 9.

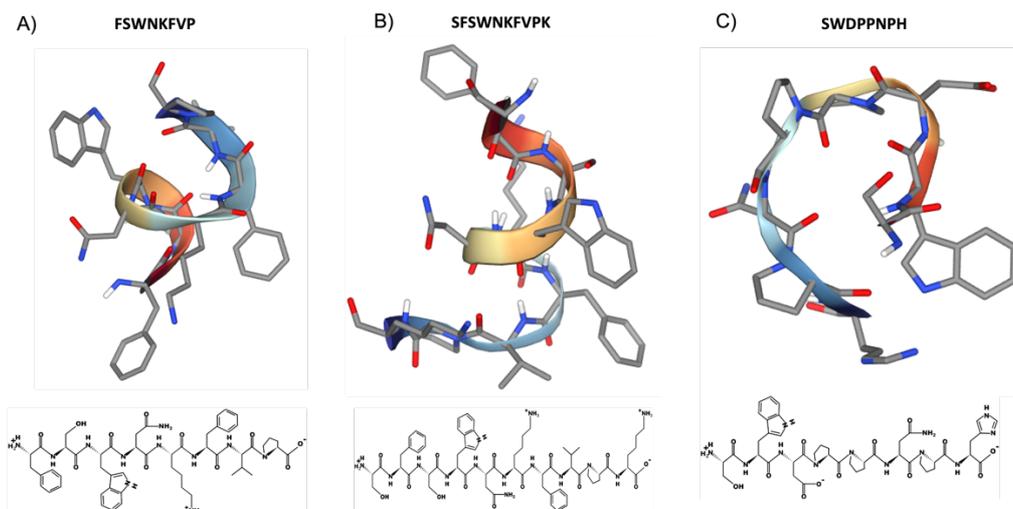


Figura 9: Estrutura química e bioquímica dos peptídeos que apresentaram maior atividade A) antioxidante; B) inibição da ECA e; C) inibição da DPP-IV

3.5.2 Docking molecular

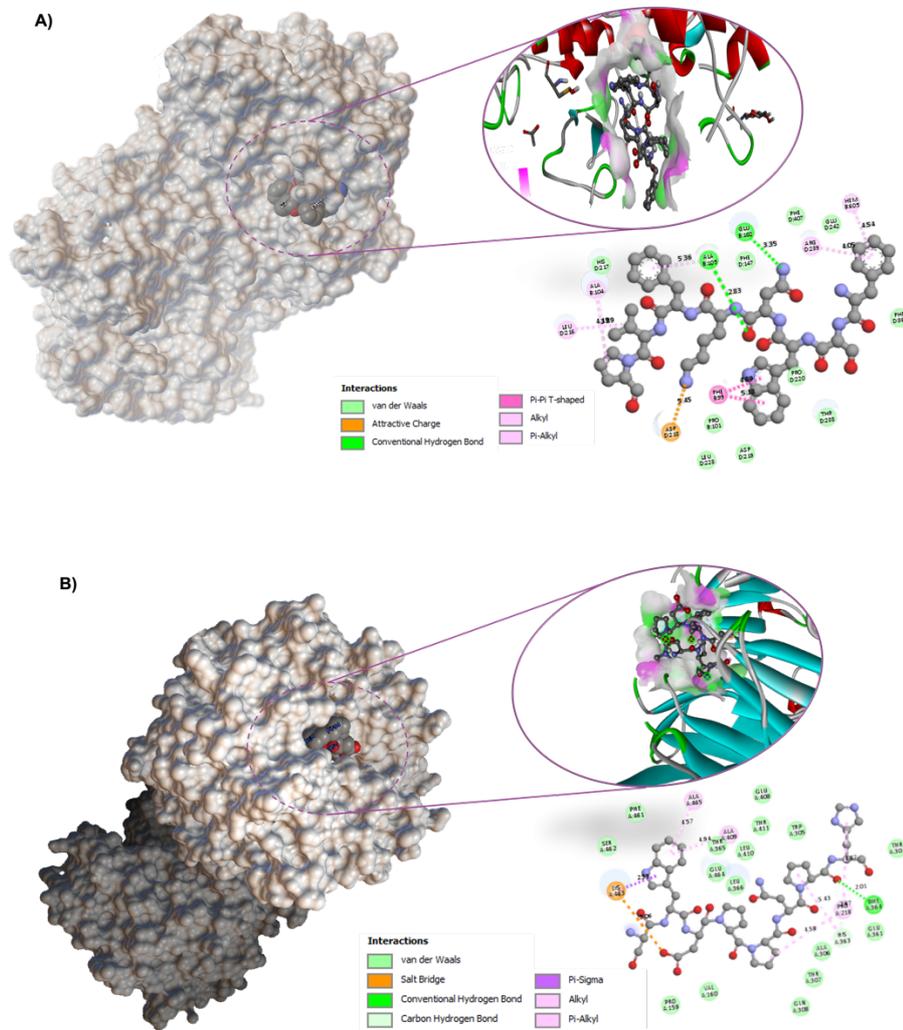
De forma a obter mais informações a respeito das interações entre os peptídeos frente às enzimas envolvidas nas bioatividades, foi realizado um estudo de docking molecular. Através do docking foi avaliada as prováveis interações entre o peptídeo SFSWNKFVPK e a enzima conversora de angiotensina ECA, o peptídeo SWDPPNPH e a enzima DPP IV e entre o peptídeo FSWNKFVP e a enzima Mieloperoxidase (MPO).

Os resultados encontrados demonstram que todos os peptídeos investigados formam complexos com as enzimas, como ilustrado na Figura 11. As energias de interação encontradas foram de $-9,8 \text{ kcal mol}^{-1}$ para o peptídeo SFSWNKFVPK com a enzima ECA (Figura 10C); $-6,8 \text{ kcal mol}^{-1}$ do SWDPPNPH com a enzima DPP IV (Figura 10B) e; $-9,4 \text{ kcal mol}^{-1}$ para o peptídeo FSWNKFVP e a MPO (Figura 10A).

Os resultados encontrados nesse trabalho foram similares aqueles obtidos por Chirino et al., 2023 que reportaram uma variação na energia de ligação -10.3 para -9.2 e de -8.5 para $-6.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ para ACE e DPP-IV, respectivamente em peptídeos obtidos de tarwi (*Lupinus mutabilis*).

O complexo formado entre SFSWNKFVPK e a ECA apresentou o maior número de interações. A menor distância entre as interações foi de $1,91 \text{ \AA}$ numa ligação do tipo ponte de hidrogênio entre o resíduo Val8 do peptídeo e Thr171 da ECA. A maior distância de ligação encontrada foi de $5,55 \text{ \AA}$ e a maioria das interações foram do tipo pontes de hidrogênio, com algumas ligações tipo eletrostáticas e hidrofóbicas, em menor proporção.

De acordo com GŁOWACKI et al., 2013 as interações de hidrogênio não covalente são reconhecidas como as mais importantes envolvidas na ligação de potenciais inibidores da enzima ECA, pois, a presença desse tipo de interação oferece estabilidade ao complexo peptídeo-ECA.



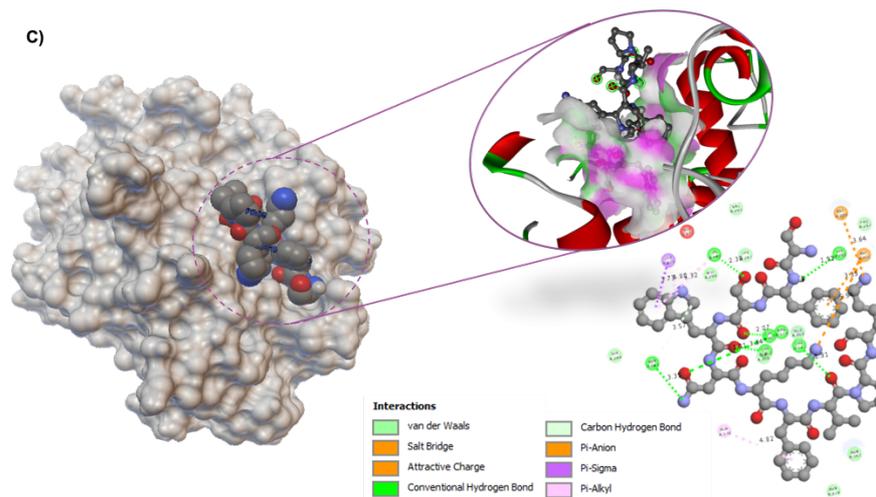


Figura 10: Docking molecular dos peptídeos A) Peptídeo FSWNKFVP com a enzima MPO; B) Peptídeo SWDPPNPH com a enzima DPP-IV e; C) Peptídeo SFSWNKFVPK com a enzima ECA.

As interações em DPP-IV aconteceram entre o resíduo Phe364 da enzima com o resíduo Pro7 do peptídeo. Já no complexo com a MPO, as interações foram entre Ala105 da enzima e Asn4 do peptídeo. Em ambos os casos, predominaram interações do tipo ponte de hidrogênio e hidrofóbicas. No entanto no complexo MPO ocorreram ainda reações do tipo eletrostáticas.

A MPO é a principal enzima envolvida na geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) *in vivo*, sob condições de H_2O_2 e haletos, a MPO gera ERO altamente ativas, resultando em lesão celular e tecidual (GAO et al., 2021).

Os complexos SWDPPNPH/DPP-IV e FSWNKFVP/MPO demonstraram resultados similares em relação a distância das interações, sendo a menor distância observada de 2,01 e 2,83, respectivamente.

3.5.3 ADMET

A ferramenta ADMET é uma importante estratégia para a análise das propriedades farmacocinéticas e da potencial toxicidade de compostos evitando propiciando um screening prévio destas propriedades antes do desenvolvimento de estudos *in vivo* de longa duração.

Após avaliados, os peptídeos SFSWNKFVPK, SWDPPNPH e FSWNKFVP demonstraram possuir potenciais efeitos de inibição da ECA, DPP IV e propriedade antioxidante, respectivamente. De acordo com os resultados obtidos pela ferramenta ADMET (Tabela 4) estas sequências são fáceis de serem sintetizadas (GrasaScore), contudo possuem baixo potencial de serem absorvidas pelo organismo.

Tal perfil pode estar associado ao tamanho dos peptídeos, as 3 sequências podem ser caracterizadas como oligopeptídeos por possuírem entre 8 e 10 resíduos de aminoácidos o que pode dificultar a absorção destas no ambiente intestinal.

Chirinos et al., 2023 observaram em peptídeos de tarwi (*Lupinus mutabilis*) que conforme aumenta o tamanho da sequência ocorre a diminuição dos parâmetros relacionados a absorção intestinal humana (HIA).

Mora-Melgem et al., 2023 obtiveram resultados positivos para esses fatores em peptídeos de grão de bico, corroborando com a relação entre o tamanho do fragmento proteico e seu maior potencial de absorção.

Com relação aos parâmetros de distribuição e metabolismo, as três sequências exibiram uma boa capacidade sistêmica de distribuição onde a sequência FSWNKFVP retornando o melhor resultado de 0,641. De acordo com Xiong et al., 2021 um composto apresenta uma excelente capacidade de disseminação pelo organismo quando os valores de V_{dss} estão entre 0,4 a 20 L/Kg.

A avaliação *in silico* da absorção gastrointestinal da molécula farmacêutica após a ingestão oral, bem como sua reação com a proteína Pgp e as isoformas da enzima citocromo CYP450, é indispensável em estudos de possíveis fármacos ou equivalentes (IGBOKWE et al., 2024).

As cinco diferentes isoformas da enzima CYP450 (CYP 3A4, 2D6, 1A2, 2C9 e 2C19) foram avaliadas pelo ADMETlab 2.0 e estão envolvidas na metabolização da maioria dos fármacos. Os resultados obtidos demonstraram que os peptídeos da lectina de soja exibem sinergia com essas enzimas, por não interagirem como inibidores da sua atividade nem como substratos. Isso significa que esses peptídeos são tanto eficazes quanto seguros, pois, não alteram a forma com que essas enzimas metabolizam medicamentos ou outros substratos enzimáticos (CHIRINOS et al., 2023).

Tabela 4: Avaliação ADMET *in silico* dos peptídeos escolhidos

Parameter	Peptides							
	SFSWNKFVPK	ED	SWDPPNPH	ED	FSWNKFVP	ED		
Properties	pka (Acid)	6,839		1,645		7,353		
	pka (Base)	8,712		5,436		7,972		
	Gasa score	easy	●	easy	●	easy	●	
Absorption	HIA HIA<30%= +; HIA>30% =-	1,0	●	0,99	●	0,964	●	
	Caco-2 Permeability Higher than -5,15	-6,328	●	-6,217	●	-6,058	●	
	VD Range 0,04- 20,0 (L/Kg)	0,496	●	0,272	●	0,641	●	
Metabolism CYO -450	CYP450 1A2 substrate	-	●	-	●	-	●	
	CYP450 1A2 inhibitor	-	●	-	●	-	●	
	CYP450 2C19 substrate	-	●	-	●	-	●	
	CYP450 2C19 inhibitor	-	●	-	●	-	●	
	CYP450 2C9 substrate	-	●	-	●	-	●	
	CYP450 2C9 inhibitor	-	●	-	●	-	●	
	CYP450 2D6 substrate	-	●	-	●	-	●	
	CYP450 2D6 inhibitor	-	●	-	●	-	●	
	CYP450 3A4 substrate	-	●	-	●	-	●	
	CYP450 3A4 inhibitor	-	●	-	●	-	●	
Excretion	T _{1/2} > 3 h = - (category 0) T _{1/2} ≤ 3 h = + (category 1) Values range: 0-1	Half life (T _{1/2}) h	1,109	●	1,336	●	0,589	●
	Toxicity	Ames toxicity	0,097	●	0,164	●	0,11	●
Carcinogens non- carcinogens -, category 0) carcinogens +, category 1		0,0	●	0,011	●	0,001	●	
Hematotoxicity Range 0 -1 0 = - 1 = +		0,011	●	0,102	●	0,031	●	

ED: Empirical decision 0-0.3: excellent (●), 0.3-0.7: medium (●) and 0.7-1.0: poor (●). Values were obtained from ADMETLab2.0 (ADMETLab2.0, <https://admetmesh.scbdd.com>). All databases were accessed on June 2024.

Os parâmetros de excreção dos peptídeos estão relacionados a sua eliminação *in vivo* e podem refletir tanto a sua eficiência quanto efeitos colaterais correspondentes a eles (ZHAO et al., 2023). Em relação a esse parâmetro, duas das sequências: SFSWNKFVPK e SWDPPNPH foram caracterizadas como do tipo short half life, pois seu tempo de meia vida estava entre 1 e 4 hrs. O peptídeo FSWNKFVP, por apresentar um tempo de excreção de menos de hora, é tido como de ultra short half life. Para os tipos de toxicidade avaliados as sequências não demonstraram causar nenhum tipo de toxicidade.

Com objetivo de avaliar as propriedades ADMET dos três peptídeos selecionados após a digestão, realizou-se a simulação da digestão utilizando a função *enzyme action* do BIOPEP-UWM, com as enzimas pepsina (EC 3.4.23.1), tripsina (EC 3.4.21.4), e quimiotripsina (EC 3.4.21.1). Os peptídeos obtidos estão expostos na Tabela 5.

Tabela 5: Peptídeos liberados após a simulação da digestão gastrointestinal *in silico*

Sequence	Peptides release		
SWDPPNPH	SWD	PPN	PH
SFSWNKFVPK	SF	SWN	VPK
FSWNKFVP	SWN	VP	

Após a digestão foram liberados di e tripeptídeos que foram novamente avaliados quanto suas propriedades ADMET. A principal diferença entre as sequências parentais das obtidas pós digestão, é em relação as regras de Lipinski. Para que um composto cumpra a regra de Lipinski é necessário que ele atenda os seguintes critérios: 1) Peso molecular < 500 Da; 2) logaritmo do coeficiente de partição octanol-água < 5; 3) doadores de ligações de hidrogênio < 5; e 4) aceitadores de ligações de hidrogênio < 10. O cumprimento desses critérios significa que aquele composto tem uma boa absorção e vai alcançar a corrente sanguínea após serem ingeridos oralmente. A Tabela 6 ilustra a avaliação dos parâmetros de Lipinski para os peptídeos obtidos pós simulação da digestão gastrointestinal (ARÁMBURO-GÁLVEZ et al., 2022).

Tabela 6: Parâmetros de Lipinski avaliados nos peptídeos pós-digestão simulada *in silico*.

Properties	SWDPPNPH						SFSWNKFVPK						FSWNKFVP	
	SWD	ED	PPN	ED	PH	ED	SF	ED	SWN	ED	VPK	ED	VP	ED
Molecular weight <500Da	406,15	●	326,16	●	252,12	●	252,11	●	405,16	●	342,23	●	214,13	●
Log octanol-water partition coefficient <5	-0,868	●	-2,644	●	-2,468	●	-0,798	●	-0,484	●	-1,03	●	-1,224	●
Hydrogen bond donors <5 (0-7)	8,0	●	5,0	●	4,0	●	5,0	●	9,0	●	6,0	●	3,0	●
hydrogen bond acceptors <10 (0 a 11)	11,0	●	9,0	●	7,0	●	6,0	●	11,0	●	8,0	●	5,0	●
Lipinski Rule	Rejected ●	Accepted ●	Rejected ●	Rejected ●	Accepted ●									

ED: Empirical decision 0–0.3: excellent (●), 0.3–0.7: medium (●) and 0.7–1.0: poor (●). Values were obtained from ADMETLab2.0

Esses resultados mostraram que a ação das enzimas digestivas sobre o hidrolisado melhorou seus aspectos farmacocinéticos, tendo os peptídeos gerados passado pelo filtro de Lipinski e alguns deles apresentados melhor absorção.

4. CONCLUSÕES

Através da precipitação, cromatografia de troca iônica e cromatografia de exclusão molecular, foi possível obter uma purificação parcial da lectina de soja, denominada fração lectina de soja, que por hidrólise sequencial, possibilitou a obtenção de peptídeos com tamanho variando entre 6 – 2100Da.

Na análise de microscopia, foi possível observar que esses peptídeos demonstram a propensão a formar agregados maiores, com superfície mais porosa. O hidrolisado (SLH), analisado por FTIR apresentou majoritariamente estruturas β , sendo dessas 63% de folhas beta e 33% de dobras beta. Ambas as amostras demonstraram boa estabilidade térmica sendo a massa residual da fração lectina de 44,43% e o hidrolisado 11,45%.

A avaliação da atividade antioxidante dos peptídeos evidenciada pós-simulação da digestão gastrointestinal, demonstrou peptídeos estáveis com percentual de captura acima de 50%, sem apresentar diferença significativa com a amostra SLH no radical DPPH.

Através da análise *in silico* das sequências foram identificados 489 peptídeos derivados da lectina de soja, dos quais 19 apresentaram potencial atividade biológica antioxidante, inibição da ECA e inibição da DPP-IV. Os peptídeos escolhidos para avaliação ADMET não apresentaram toxicidade e nem inibição da enzima CYP450. Além disso, o docking molecular mostrou que os peptídeos selecionados podem se ligar as enzimas avaliadas, principalmente através de ponte de hidrogênio.

Esses resultados sugerem o potencial dos peptídeos derivados da fração lectina de soja para aplicações biotecnológicas e farmacêuticas, enfatizando sua importância no desenvolvimento de novos produtos nutracêuticos e terapêuticos.

5. REFERÊNCIAS

ABEER, Muhammad Mustafa; TRAJKOVIC, Sanja; BRAYDEN, David J. Measuring the oral bioavailability of protein hydrolysates derived from food sources: A critical review of current bioassays. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S. l.], v. 144, p. 112275, 2021. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.112275.

AKBARIAN, Mohsen; KHANI, Ali; EGHBALPOUR, Sara; UVERSKY, Vladimir N. Bioactive Peptides: Synthesis, Sources, Applications, and Proposed Mechanisms of Action. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 23, n. 3, p. 1445, 2022. DOI: 10.3390/ijms23031445.

ALNUAIMI, Amna; FISAYO AJAYI, Feyisola; HAMDI, Marwa; MUDGIL, Priti; KAMAL, Hina; YUEN GAN, Chee; MAQSOOD, Sajid. A comparative analysis of anti-lipidemic potential of soybean (*Glycine max*) protein hydrolysates obtained from different ripening stages: Identification, and molecular interaction mechanisms of novel bioactive peptides. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 402, p. 134192, 2023. DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.134192.

AMAKYE, William Kwame; HOU, Chuanli; XIE, Liping; LIN, Xiaoling; GOU, Na; YUAN, Erdong; REN, Jiaoyan. Bioactive anti-aging agents and the identification of new anti-oxidant soybean peptides. **Food Bioscience**, [S. l.], v. 42, p. 101194, 2021. DOI: 10.1016/j.fbio.2021.101194.

ANTONY, Priya; BABY, Bincy; JOBE, Amie; VIJAYAN, Ranjit. Computational Modeling of the Interactions between DPP IV and Hemorphins. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 25, n. 5, p. 3059, 2024. DOI: 10.3390/ijms25053059.

ARÁMBURO-GÁLVEZ, Jesús Gilberto; ARVIZU-FLORES, Aldo Alejandro; CÁRDENAS-TORRES, Feliznando Isidro; CABRERA-CHÁVEZ, Francisco; RAMÍREZ-TORRES, Giovanni I.; FLORES-MENDOZA, Lilian Karem; GASTELUM-ACOSTA, Pedro Erick; FIGUEROA-SALCIDO, Oscar Gerardo; ONTIVEROS, Noé. Prediction of ACE-I Inhibitory Peptides Derived from Chickpea (*Cicer arietinum* L.): In silico Assessments Using Simulated Enzymatic Hydrolysis, Molecular Docking and ADMET Evaluation. **Foods**, [S. l.], v. 11, n. 11, p. 1576, 2022. a. DOI: 10.3390/foods11111576.

ARÁMBURO-GÁLVEZ, Jesús Gilberto; ARVIZU-FLORES, Aldo Alejandro; CÁRDENAS-TORRES, Feliznando Isidro; CABRERA-CHÁVEZ, Francisco; RAMÍREZ-TORRES, Giovanni I.; FLORES-MENDOZA, Lilian Karem; GASTELUM-ACOSTA, Pedro Erick; FIGUEROA-SALCIDO, Oscar Gerardo; ONTIVEROS, Noé. Prediction of ACE-I Inhibitory Peptides Derived from Chickpea (*Cicer arietinum* L.): In silico Assessments Using Simulated Enzymatic Hydrolysis, Molecular Docking and ADMET Evaluation. **Foods**, [S. l.], v. 11, n. 11, p. 1576, 2022. b. DOI: 10.3390/foods11111576.

BERRAQUERO-GARCÍA, Carmen; RIVERO-PINO, Fernando; OSPINA, J. Lizeth; PÉREZ-GÁLVEZ, Raúl; ESPEJO-CARPIO, F. Javier; GUADIX, Antonio; GARCÍA-MORENO, Pedro J.; GUADIX, Emilia M. Activity, structural features and in silico digestion of antidiabetic peptides. **Food Bioscience**, [S. l.], v. 55, p. 102954, 2023. DOI: 10.1016/j.fbio.2023.102954.

BRODKORB, André et al. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. **Nature Protocols**, [S. l.], v. 14, n. 4, p. 991–1014, 2019. DOI: 10.1038/s41596-018-0119-1.

- CANELLI, Greta; ABIUSI, Fabian; VIDAL GARCIA, Albert; CANZIANI, Stefano; MATHYS, Alexander. Amino acid profile and protein bioaccessibility of two *Galdieria sulphuraria* strains cultivated autotrophically and mixotrophically in pilot-scale photobioreactors. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, [S. l.], v. 84, p. 103287, 2023. DOI: 10.1016/j.ifset.2023.103287.
- CAVALIERE, Chiara et al. Production and Characterization of Medium-Sized and Short Antioxidant Peptides from Soy Flour-Simulated Gastrointestinal Hydrolysate. **Antioxidants**, [S. l.], v. 10, n. 5, p. 734, 2021. a. DOI: 10.3390/antiox10050734.
- CAVALIERE, Chiara et al. Production and Characterization of Medium-Sized and Short Antioxidant Peptides from Soy Flour-Simulated Gastrointestinal Hydrolysate. **Antioxidants**, [S. l.], v. 10, n. 5, p. 734, 2021. b. DOI: 10.3390/antiox10050734.
- CHANG, Chiung-Yueh; JIN, Jinn-Der; CHANG, Hsiao-Li; HUANG, Ko-Chieh; CHIANG, Yi-Fen; ALI, Mohamed; HSIA, Shih-Min. Antioxidative Activity of Soy, Wheat and Pea Protein Isolates Characterized by Multi-Enzyme Hydrolysis. **Nanomaterials**, [S. l.], v. 11, n. 6, p. 1509, 2021. DOI: 10.3390/nano11061509.
- CHIRINOS, Rosana; DE OLIVEIRA, Thomás Valente; GUZMÁN, Fanny; AGUILAR-GALVEZ, Ana; FIGUEROA-MERMA, Andrés; PEDRESCHI, Romina; CAMPOS, David. *In vitro* and *in silico* studies of antioxidant peptides from tarwi (*Lupinus mutabilis*) as inhibitors of angiotensin-converting enzyme and dipeptidyl peptidase <sc>IV</sc> enzyme. **International Journal of Food Science & Technology**, [S. l.], v. 58, n. 10, p. 5193–5202, 2023. a. DOI: 10.1111/ijfs.16618.
- CHIRINOS, Rosana; DE OLIVEIRA, Thomás Valente; GUZMÁN, Fanny; AGUILAR-GALVEZ, Ana; FIGUEROA-MERMA, Andrés; PEDRESCHI, Romina; CAMPOS, David. *In vitro* and *in silico* studies of antioxidant peptides from tarwi (*Lupinus mutabilis*) as inhibitors of angiotensin-converting enzyme and dipeptidyl peptidase <sc>IV</sc> enzyme. **International Journal of Food Science & Technology**, [S. l.], v. 58, n. 10, p. 5193–5202, 2023. b. DOI: 10.1111/ijfs.16618.
- COSCUETA, Ezequiel R.; CAMPOS, Débora A.; OSÓRIO, Hugo; NERLI, Bibiana B.; PINTADO, Manuela. Enzymatic soy protein hydrolysis: A tool for biofunctional food ingredient production. **Food Chemistry: X**, [S. l.], v. 1, p. 100006, 2019. a. DOI: 10.1016/j.fochx.2019.100006.
- COSCUETA, Ezequiel R.; CAMPOS, Débora A.; OSÓRIO, Hugo; NERLI, Bibiana B.; PINTADO, Manuela. Enzymatic soy protein hydrolysis: A tool for biofunctional food ingredient production. **Food Chemistry: X**, [S. l.], v. 1, p. 100006, 2019. b. DOI: 10.1016/j.fochx.2019.100006.
- COSCUETA, Ezequiel R.; CAMPOS, Débora A.; OSÓRIO, Hugo; NERLI, Bibiana B.; PINTADO, Manuela. Enzymatic soy protein hydrolysis: A tool for biofunctional food ingredient production. **Food Chemistry: X**, [S. l.], v. 1, p. 100006, 2019. c. DOI: 10.1016/j.fochx.2019.100006.
- COSCUETA, Ezequiel R.; PELLEGRINI MALPIEDI, Luciana; PINTADO, Maria Manuela; NERLI, Bibiana B. Production of soy protein concentrate with the recovery of bioactive compounds: From destruction to valorization. **Food Hydrocolloids**, [S. l.], v. 137, p. 108314, 2023. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2022.108314.
- DALLAKYAN, Sargis; OLSON, Arthur J. Small-Molecule Library Screening by Docking with PyRx. *Em*: [s.l: s.n.]. p. 243–250. DOI: 10.1007/978-1-4939-2269-7_19.

DU, Zhenjiao; COMER, Jeffrey; LI, Yonghui. Bioinformatics approaches to discovering food-derived bioactive peptides: Reviews and perspectives. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 162, p. 117051, 2023. DOI: 10.1016/j.trac.2023.117051.

EL HAJJ, Sarah; IRANKUNDA, Rachel; CAMAÑO ECHAVARRÍA, Jairo Andrés; ARNOUX, Philippe; PARIS, Cédric; STEFAN, Loic; GAUCHER, Caroline; BOSCHI-MULLER, Sandrine; CANABADY-ROCHELLE, Laetitia. Metal-chelating activity of soy and pea protein hydrolysates obtained after different enzymatic treatments from protein isolates. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 405, p. 134788, 2023. DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.134788.

EVANGELHO, Jarine Amaral Do; VANIER, Nathan Levien; PINTO, Vânia Zanella; BERRIOS, Jose J. De; DIAS, Alvaro Renato Guerra; ZAVAREZE, Elessandra da Rosa. Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein hydrolysates: Physicochemical and functional properties. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 214, p. 460–467, 2017. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.07.046.

FANG, Jiaqi et al. Structural properties, antioxidant and immune activities of low molecular weight peptides from soybean dregs (Okara). **Food Chemistry: X**, [S. l.], v. 12, p. 100175, 2021. a. DOI: 10.1016/j.fochx.2021.100175.

FANG, Jiaqi et al. Structural properties, antioxidant and immune activities of low molecular weight peptides from soybean dregs (Okara). **Food Chemistry: X**, [S. l.], v. 12, p. 100175, 2021. b. DOI: 10.1016/j.fochx.2021.100175.

FANG, Jiaqi et al. Structural properties, antioxidant and immune activities of low molecular weight peptides from soybean dregs (Okara). **Food Chemistry: X**, [S. l.], v. 12, p. 100175, 2021. c. DOI: 10.1016/j.fochx.2021.100175.

FARIAS, T. C.; ABREU, J. P.; OLIVEIRA, J. P. S.; MACEDO, A. F.; RODRÍGUEZ-VEGA, A.; TONIN, A. P.; CARDOSO, F. S. N.; MEURER, E. C.; KOBLITZ, M. G. B. Bioactive properties of peptide fractions from Brazilian soy protein hydrolysates: In silico evaluation and experimental evidence. **Food Hydrocolloids for Health**, [S. l.], v. 3, p. 100112, 2023. a. DOI: 10.1016/j.fhfh.2022.100112.

FARIAS, T. C.; ABREU, J. P.; OLIVEIRA, J. P. S.; MACEDO, A. F.; RODRÍGUEZ-VEGA, A.; TONIN, A. P.; CARDOSO, F. S. N.; MEURER, E. C.; KOBLITZ, M. G. B. Bioactive properties of peptide fractions from Brazilian soy protein hydrolysates: In silico evaluation and experimental evidence. **Food Hydrocolloids for Health**, [S. l.], v. 3, p. 100112, 2023. b. DOI: 10.1016/j.fhfh.2022.100112.

FERREIRA, Laura Fonseca et al. Characterization of cassava starch/soy protein isolate blends obtained by extrusion and thermocompression. **Industrial Crops and Products**, [S. l.], v. 160, p. 113092, 2021. a. DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.113092.

FERREIRA, Laura Fonseca et al. Characterization of cassava starch/soy protein isolate blends obtained by extrusion and thermocompression. **Industrial Crops and Products**, [S. l.], v. 160, p. 113092, 2021. b. DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.113092.

FRANCO-FRAGUAS, Laura; PLÁ, Alicia; FERREIRA, Fernando; MASSALDI, Hugo; SUÁREZ, Norma; BATISTA-VIERA, Francisco. Preparative purification of soybean agglutinin by affinity chromatography and its immobilization for polysaccharide isolation. **Journal of Chromatography B**, [S. l.], v. 790, n. 1–2, p. 365–372, 2003. DOI: 10.1016/S1570-0232(03)00086-2.

GAO, Jingxin; LI, Tiange; CHEN, Duoduo; GU, Haofeng; MAO, Xueying. Identification and molecular docking of antioxidant peptides from hemp seed protein hydrolysates. **LWT**, [S. l.], v. 147, p. 111453, 2021. DOI: 10.1016/j.lwt.2021.111453.

GŁOWACKI, Eric Daniel; IRIMIA-VLADU, Mihai; BAUER, Siegfried; SARICIFTCI, Niyazi Serdar. Hydrogen-bonds in molecular solids – from biological systems to organic electronics. **Journal of Materials Chemistry B**, [S. l.], v. 1, n. 31, p. 3742, 2013. DOI: 10.1039/c3tb20193g.

GOLONKA, Iwona; GREBER, Katarzyna E.; SZYJA, Bartłomiej M.; PETRUS, Patrycja P.; PUCUŁEK, Jakub E.; MUSIAŁ, Witold. Effect of Newly Synthesized Structures of Peptides on the Stability of the Monolayers Formed. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 24, n. 5, p. 4318, 2023. a. DOI: 10.3390/ijms24054318.

GOLONKA, Iwona; GREBER, Katarzyna E.; SZYJA, Bartłomiej M.; PETRUS, Patrycja P.; PUCUŁEK, Jakub E.; MUSIAŁ, Witold. Effect of Newly Synthesized Structures of Peptides on the Stability of the Monolayers Formed. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 24, n. 5, p. 4318, 2023. b. DOI: 10.3390/ijms24054318.

HAN, Xiao; SUN, Yu; HUANGFU, Bingxin; HE, Xiaoyun; HUANG, Kunlun. Ultra-high-pressure passivation of soybean agglutinin and safety evaluations. **Food Chemistry: X**, [S. l.], v. 18, p. 100726, 2023. DOI: 10.1016/j.fochx.2023.100726.

HUANG, Shanfen; LI, Yunliang; LI, Chengliang; RUAN, Siyu; ROKNUL AZAM, S. M.; OU YANG, Ningning; YE, Xiaofei; WANG, Yaoyao; MA, Haile. Effects of ultrasound-assisted sodium bisulfite pretreatment on the preparation of cholesterol-lowering peptide precursors from soybean protein. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 183, p. 295–304, 2021. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.04.125.

IGBOKWE, Chidimma Juliet; FENG, Yuqin; LOUIS, Hitler; BENJAMIN, Innocent; QUAISIE, Janet; DUAN, Yuqing; TULY, Jamila A.; CAI, Meihong; ZHANG, Haihua. Novel antioxidant peptides identified from coix seed by molecular docking, quantum chemical calculations and invitro study in HepG2 cells. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 440, p. 138234, 2024. DOI: 10.1016/j.foodchem.2023.138234.

ISLAM, Monirul; HUANG, Yatao; ISLAM, Serajul; FAN, Bei; TONG, Litao; WANG, Fengzhong. Influence of the Degree of Hydrolysis on Functional Properties and Antioxidant Activity of Enzymatic Soybean Protein Hydrolysates. **Molecules**, [S. l.], v. 27, n. 18, p. 6110, 2022. DOI: 10.3390/molecules27186110.

JIANG, Yutong; LI, Siyi; YUAN, Ruolin; TUO, Yanfeng; MU, Guangqing; JIANG, Shujuan. Preparation of casein hydrolysate by two-step enzymatic hydrolysis and its immunomodulatory activities in vitro and in vivo. **Food Bioscience**, [S. l.], v. 59, p. 104007, 2024. DOI: 10.1016/j.fbio.2024.104007.

KALITA, Chirantana et al. Recent trends in antioxidative peptides derived from soybean and other soy-based products: A comprehensive review. **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 136, p. 311–323, 2024. DOI: 10.1016/j.procbio.2023.11.027.

KIM, Il-Sup; YANG, Woong-Suk; KIM, Cheorl-Ho. Beneficial Effects of Soybean-Derived Bioactive Peptides. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 22, n. 16, p. 8570, 2021. a. DOI: 10.3390/ijms22168570.

KIM, Il-Sup; YANG, Woong-Suk; KIM, Cheorl-Ho. Beneficial Effects of Soybean-Derived Bioactive Peptides. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 22, n. 16, p. 8570, 2021. b. DOI: 10.3390/ijms22168570.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, [S. l.], v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970. DOI: 10.1038/227680a0. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/227680a0>.

LAMIABLE, Alexis; THÉVENET, Pierre; REY, Julien; VAVRUSA, Marek; DERREUMAUX, Philippe; TUFFÉRY, Pierre. PEP-FOLD3: faster *de novo* structure prediction for linear peptides in solution and in complex. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 44, n. W1, p. W449–W454, 2016. DOI: 10.1093/nar/gkw329.

LI, Long et al. Study of the molecular structure of proteins in fermented Maize-Soybean meal-based rations based on FTIR spectroscopy. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 441, p. 138310, 2024. a. DOI: 10.1016/j.foodchem.2023.138310.

LI, Long et al. Study of the molecular structure of proteins in fermented Maize-Soybean meal-based rations based on FTIR spectroscopy. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 441, p. 138310, 2024. b. DOI: 10.1016/j.foodchem.2023.138310.

MORA-MELGEM, José Antonio; ARÁMBURO-GÁLVEZ, Jesús Gilberto; CÁRDENAS-TORRES, Feliznando Isidro; GONZALEZ-SANTAMARIA, Jhonatan; RAMÍREZ-TORRES, Giovanni Isai; ARVIZU-FLORES, Aldo Alejandro; FIGUEROA-SALCIDO, Oscar Gerardo; ONTIVEROS, Noé. Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitory Peptides from Chickpea Proteins (*Cicer arietinum* L.): Pharmacokinetics, Molecular Interactions, and Multi-Bioactivities. **Pharmaceuticals**, [S. l.], v. 16, n. 8, p. 1109, 2023. DOI: 10.3390/ph16081109.

NIELSEN, P. M.; PETERSEN, D.; DAMBMANN, C. **Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis** **Food Chemistry and Toxicology JFS: Food Chemistry and Toxicology**. [s.l: s.n.].

NINGRUM, Andriati; WARDANI, Dian Wahyu; VANIDIA, Nurul; SARIFUDIN, Achmat; KUMALASARI, Rima; EKAFITRI, Riyanti; KRISTANTI, Dita; SETIABOMA, Woro; MUNAWAROH, Heli Siti Halimatul. In silico Approach of Glycinin and Conglycinin Chains of Soybean By-Product (Okara) Using Papain and Bromelain. **Molecules**, [S. l.], v. 27, n. 20, p. 6855, 2022. DOI: 10.3390/molecules27206855.

PAN, Li et al. The apoptotic effects of soybean agglutinin were induced through three different signal pathways by down-regulating cytoskeleton proteins in IPEC-J2 cells. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 5753, 2023. DOI: 10.1038/s41598-023-32951-4.

PANDA, Prashanta Kumar et al. Antitumor effect of soybean lectin mediated through reactive oxygen species-dependent pathway. **Life Sciences**, [S. l.], v. 111, n. 1–2, p. 27–35, 2014. DOI: 10.1016/j.lfs.2014.07.004.

REBOLLO-HERNANZ, Miguel; KUSUMAH, Jennifer; BRINGE, Neal A.; SHEN, Yu; GONZALEZ DE MEJIA, Elvira. Peptide release, radical scavenging capacity, and antioxidant responses in intestinal cells are determined by soybean variety and gastrointestinal digestion under simulated conditions. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 405, p. 134929, 2023. DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.134929.

RICCI, Lucia; UMILTÀ, Eleonora; RIGHETTI, Maria C.; MESSINA, Tiziana; ZURLINI, Chiara; MONTANARI, Angela; BRONCO, Simona; BERTOLDO, Monica. On the thermal behavior of protein isolated from different legumes investigated by <scp>DSC</scp> and

<scp>TGA</scp>. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [*S. l.*], v. 98, n. 14, p. 5368–5377, 2018. DOI: 10.1002/jsfa.9078.

RITCHIE, Timothy J.; ERTL, Peter; LEWIS, Richard. The graphical representation of ADME-related molecule properties for medicinal chemists. **Drug Discovery Today**, [*S. l.*], v. 16, n. 1–2, p. 65–72, 2011. DOI: 10.1016/j.drudis.2010.11.002.

RIVERO-PINO, Fernando; ESPEJO-CARPIO, F. Javier; GUADIX, Emilia M. Identification of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides from vegetable protein sources. **Food Chemistry**, [*S. l.*], v. 354, p. 129473, 2021. DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.129473.

RIVERO-PINO, Fernando; MILLAN-LINARES, Maria C.; MONTSERRAT-DE-LA-PAZ, Sergio. Strengths and limitations of in silico tools to assess physicochemical properties, bioactivity, and bioavailability of food-derived peptides. **Trends in Food Science & Technology**, [*S. l.*], v. 138, p. 433–440, 2023. DOI: 10.1016/j.tifs.2023.06.023.

ROY, Uttam K.; LAVIGNAC, Nathalie; RAHMAN, Azizur M.; NIELSEN, Birthe V. Purification of lectin and Kunitz trypsin inhibitor from soya seeds. **Journal of Chromatographic Science**, [*S. l.*], v. 56, n. 5, p. 436–442, 2018. DOI: 10.1093/chromsci/bmy018.

SANTOS-HERNÁNDEZ, Marta; ALFIERI, Fabio; GALLO, Veronica; MIRALLES, Beatriz; MASI, Paolo; ROMANO, Annalisa; FERRANTI, Pasquale; RECIO, Isidra. Compared digestibility of plant protein isolates by using the INFOGEST digestion protocol. **Food Research International**, [*S. l.*], v. 137, p. 109708, 2020. DOI: 10.1016/j.foodres.2020.109708.

SCHLEGEL, Katharina; SONTHEIMER, Katharina; EISNER, Peter; SCHWEIGGERT-WEISZ, Ute. Effect of enzyme-assisted hydrolysis on protein pattern, technofunctional, and sensory properties of lupin protein isolates using enzyme combinations. **Food Science & Nutrition**, [*S. l.*], v. 8, n. 7, p. 3041–3051, 2020. DOI: 10.1002/fsn3.1286.

SHAO, Ben; HUANG, Xinyu; XU, Mengdan; CHENG, Dawei; LI, Xueling; LI, Meiqing. Peptides isolated from black soybean synergistically inhibit the activity of angiotensin converting enzyme (ACE). **Journal of Functional Foods**, [*S. l.*], v. 106, p. 105604, 2023. DOI: 10.1016/j.jff.2023.105604.

SHEA, Zachary; OGANDO DO GRANJA, Matheus; FLETCHER, Elizabeth B.; ZHENG, Yaojie; BEWICK, Patrick; WANG, Zhibo; SINGER, William M.; ZHANG, Bo. A Review of Bioactive Compound Effects from Primary Legume Protein Sources in Human and Animal Health. **Current Issues in Molecular Biology**, [*S. l.*], v. 46, n. 5, p. 4203–4233, 2024. DOI: 10.3390/cimb46050257.

SUN, Huaxing; LIU, Liyu; HE, Weiwei; CAO, Chenchen; SONG, Xueying; ZHAO, Mouming; ZHANG, Jianan; SU, Guowan. Aggregates from the concentration process for soybean protein isolate hydrolysates: Impacts, characteristics and preventive strategies. **LWT**, [*S. l.*], v. 186, p. 115129, 2023. DOI: 10.1016/j.lwt.2023.115129.

TIAN, Ran; FENG, Junran; HUANG, Guo; TIAN, Bo; ZHANG, Yan; JIANG, Lianzhou; SUI, Xiaonan. Ultrasound driven conformational and physicochemical changes of soy protein hydrolysates. **Ultrasonics Sonochemistry**, [*S. l.*], v. 68, p. 105202, 2020. a. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2020.105202.

TIAN, Ran; FENG, Junran; HUANG, Guo; TIAN, Bo; ZHANG, Yan; JIANG, Lianzhou; SUI, Xiaonan. Ultrasound driven conformational and physicochemical changes of soy protein

hydrolysates. **Ultrasonics Sonochemistry**, [S. l.], v. 68, p. 105202, 2020. b. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2020.105202.

TONG, Xiaohong; LIAN, Ziteng; MIAO, Liming; QI, Baokun; ZHANG, Shuang; LI, Yang; WANG, Huan; JIANG, Lianzhou. An innovative two-step enzyme-assisted aqueous extraction for the production of reduced bitterness soybean protein hydrolysates with high nutritional value. **LWT**, [S. l.], v. 134, p. 110151, 2020. a. DOI: 10.1016/j.lwt.2020.110151.

TONG, Xiaohong; LIAN, Ziteng; MIAO, Liming; QI, Baokun; ZHANG, Shuang; LI, Yang; WANG, Huan; JIANG, Lianzhou. An innovative two-step enzyme-assisted aqueous extraction for the production of reduced bitterness soybean protein hydrolysates with high nutritional value. **LWT**, [S. l.], v. 134, p. 110151, 2020. b. DOI: 10.1016/j.lwt.2020.110151.

VERFAILLIE, Diète; JANSSEN, Frederik; VAN ROYEN, Geert; WOUTERS, Arno G. B. A systematic study of the impact of the isoelectric precipitation process on the physical properties and protein composition of soy protein isolates. **Food Research International**, [S. l.], v. 163, p. 112177, 2023. DOI: 10.1016/j.foodres.2022.112177.

WANG, Huan et al. Effect of Spray-Drying and Freeze-Drying on the Properties of Soybean Hydrolysates. **Journal of Chemistry**, [S. l.], v. 2020, p. 1–8, 2020. DOI: 10.1155/2020/9201457.

WANG, Wei; ROBERTS, Christopher J. Protein aggregation – Mechanisms, detection, and control. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 550, n. 1–2, p. 251–268, 2018. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.08.043.

WANG, Ying Ying; WANG, Chen Ying; WANG, Shuang Tong; LI, Ying Qiu; MO, Hai Zhen; HE, Jin Xing. Physicochemical properties and antioxidant activities of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) seed protein hydrolysates obtained with different proteases. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 345, p. 128765, 2021. a. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.128765. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814620326273>.

WANG, Ying-Ying; WANG, Chen-Ying; WANG, Shuang-Tong; LI, Ying-Qiu; MO, Hai-Zhen; HE, Jin-Xing. Physicochemical properties and antioxidant activities of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) seed protein hydrolysates obtained with different proteases. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 345, p. 128765, 2021. b. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.128765.

WANG, Ying-Ying; WANG, Chen-Ying; WANG, Shuang-Tong; LI, Ying-Qiu; MO, Hai-Zhen; HE, Jin-Xing. Physicochemical properties and antioxidant activities of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) seed protein hydrolysates obtained with different proteases. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 345, p. 128765, 2021. c. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.128765.

WEN, Lingrong; BI, Huimin; ZHOU, Xuesong; ZHU, Hong; JIANG, Yueming; RAMADAN, Nehal S.; ZHENG, Rongbo; WANG, Yu; YANG, Bao. Structure and activity of bioactive peptides produced from soybean proteins by enzymatic hydrolysis. **Food Chemistry Advances**, [S. l.], v. 1, p. 100089, 2022. a. DOI: 10.1016/j.focha.2022.100089.

WEN, Lingrong; BI, Huimin; ZHOU, Xuesong; ZHU, Hong; JIANG, Yueming; RAMADAN, Nehal S.; ZHENG, Rongbo; WANG, Yu; YANG, Bao. Structure and activity of bioactive peptides produced from soybean proteins by enzymatic hydrolysis. **Food Chemistry Advances**, [S. l.], v. 1, p. 100089, 2022. b. DOI: 10.1016/j.focha.2022.100089.

WEN, Lingrong; BI, Huimin; ZHOU, Xuesong; ZHU, Hong; JIANG, Yueming; RAMADAN, Nehal S.; ZHENG, Rongbo; WANG, Yu; YANG, Bao. Structure and activity of bioactive

peptides produced from soybean proteins by enzymatic hydrolysis. **Food Chemistry Advances**, [S. l.], v. 1, p. 100089, 2022. c. DOI: 10.1016/j.focha.2022.100089.

WU, Daren et al. Preparation and identification of antioxidant peptides from *Quasipaa spinosa* skin through two-step enzymatic hydrolysis and molecular simulation. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 445, p. 138801, 2024. DOI: 10.1016/j.foodchem.2024.138801.

WU, Tianyi; LIN, Ling; ZHANG, Xinyi; WANG, Xinyue; DING, Jian. Covalent modification of soy protein hydrolysates by EGCG: Improves the emulsifying and antioxidant properties. **Food Research International**, [S. l.], v. 164, p. 112317, 2023. DOI: 10.1016/j.foodres.2022.112317.

XIONG, Guoli et al. ADMETlab 2.0: an integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET properties. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 49, n. W1, p. W5–W14, 2021. DOI: 10.1093/nar/gkab255.

XU, Yue et al. Characterization of the structure, antioxidant activity and hypoglycemic activity of soy (*Glycine max* L.) protein hydrolysates. **Food Research International**, [S. l.], v. 173, p. 113473, 2023. a. DOI: 10.1016/j.foodres.2023.113473.

XU, Yue et al. Characterization of the structure, antioxidant activity and hypoglycemic activity of soy (*Glycine max* L.) protein hydrolysates. **Food Research International**, [S. l.], v. 173, p. 113473, 2023. b. DOI: 10.1016/j.foodres.2023.113473.

XU, Yue et al. Characterization of the structure, antioxidant activity and hypoglycemic activity of soy (*Glycine max* L.) protein hydrolysates. **Food Research International**, [S. l.], v. 173, p. 113473, 2023. c. DOI: 10.1016/j.foodres.2023.113473.

XU, Yue et al. Characterization of the structure, antioxidant activity and hypoglycemic activity of soy (*Glycine max* L.) protein hydrolysates. **Food Research International**, [S. l.], v. 173, p. 113473, 2023. d. DOI: 10.1016/j.foodres.2023.113473.

XU, Yue et al. Characterization of the structure, antioxidant activity and hypoglycemic activity of soy (*Glycine max* L.) protein hydrolysates. **Food Research International**, [S. l.], v. 173, p. 113473, 2023. e. DOI: 10.1016/j.foodres.2023.113473.

YAN, Shizhang; XU, Jingwen; ZHANG, Xiaoying; XIE, Fengying; ZHANG, Shuang; JIANG, Lianzhou; QI, Baokun; LI, Yang. Effect of pH-shifting treatment on the structural and functional properties of soybean protein isolate and its interactions with (–)-epigallocatechin-3-gallate. **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 101, p. 190–198, 2021. DOI: 10.1016/j.procbio.2020.10.016.

YANG, Lihua; GUO, Zonglin; WEI, Jieqiong; HAN, Ling; YU, Qun-li; CHEN, Haoyu; CHEN, Yaoxiang; ZHANG, Wei. Extraction of low molecular weight peptides from bovine bone using ultrasound-assisted double enzyme hydrolysis: Impact on the antioxidant activities of the extracted peptides. **LWT**, [S. l.], v. 146, p. 111470, 2021. DOI: 10.1016/j.lwt.2021.111470.

YU, Chunyan; ZHENG, Lin; CAI, Yongjian; ZHAO, Qiangzhong; ZHAO, Mouming. Desirable characteristics of casein peptides with simultaneously enhanced emulsion forming ability and antioxidative capacity in O/W emulsion. **Food Hydrocolloids**, [S. l.], v. 131, p. 107812, 2022. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2022.107812.

YUAN, Dan; ZHOU, Feibai; SHEN, Penghui; ZHANG, Yuanhong; LIN, Lianzhu; ZHAO, Mouming. Self-assembled soy protein nanoparticles by partial enzymatic hydrolysis for pH-Driven Encapsulation and Delivery of Hydrophobic Cargo Curcumin. **Food Hydrocolloids**, [S. l.], v. 120, p. 106759, 2021. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2021.106759.

ZHANG, Qiaozhi; TONG, Xiaohong; LI, Yang; WANG, Huan; WANG, Zhongjiang; QI, Baokun; SUI, Xiaonan; JIANG, Lianzhou. Purification and Characterization of Antioxidant Peptides from Alcalase-Hydrolyzed Soybean (*Glycine max* L.) Hydrolysate and Their Cytoprotective Effects in Human Intestinal Caco-2 Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 67, n. 20, p. 5772–5781, 2019. DOI: 10.1021/acs.jafc.9b01235.

ZHANG, Xiaoying; DU, Hengjun; XU, Zheng; WANG, Ying; GUO, Xiaoqing; XIAO, Hang; LI, Yang. A novel alcalase-hydrolyzed soybean meal hydrolysates prepared using by-product material: Structure, function property, sensory property, and biological activity. **Food Bioscience**, [S. l.], v. 56, p. 103324, 2023. a. DOI: 10.1016/j.fbio.2023.103324.

ZHANG, Xiaoying; DU, Hengjun; XU, Zheng; WANG, Ying; GUO, Xiaoqing; XIAO, Hang; LI, Yang. A novel alcalase-hydrolyzed soybean meal hydrolysates prepared using by-product material: Structure, function property, sensory property, and biological activity. **Food Bioscience**, [S. l.], v. 56, p. 103324, 2023. b. DOI: 10.1016/j.fbio.2023.103324.

ZHANG, Xiaoying; YIN, Chengpeng; HAO, Jiaqi; MA, Danhua; LI, Ziyu; LI, Yang; QI, Baokun. Improving the biological activity, functional properties, and emulsion stability of soybean meal hydrolysate via covalent conjugation with polyphenol. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 422, p. 136255, 2023. c. DOI: 10.1016/j.foodchem.2023.136255.

ZHAO, Yuan; ZHANG, Tianrong; NING, Yuzhe; WANG, Di; LI, Fan; FAN, Yupu; YAO, Jiyun; REN, Guoyan; ZHANG, Bin. Identification and molecular mechanism of novel tyrosinase inhibitory peptides from the hydrolysate of “Fengdan” peony (*Paeonia ostii*) seed meal proteins: Peptidomics and in silico analysis. **LWT**, [S. l.], v. 180, p. 114695, 2023. DOI: 10.1016/j.lwt.2023.114695.

ZHU, Yongsheng; CHEN, Gang; DIAO, Jingjing; WANG, Changyuan. Recent advances in exploring and exploiting soybean functional peptides—a review. **Frontiers in Nutrition**, [S. l.], v. 10, 2023. DOI: 10.3389/fnut.2023.1185047.

5. CONCLUSÕES GERAIS

- Através dos métodos empregados foi possível a purificação parcial da lectina de soja;
- Os três processos de hidrólise testados, alcalase, papaína e hidrólise sequencial alcalase-papaína se mostraram eficientes na obtenção de peptídeos;
- A partir da hidrólise sequencial foi possível a obtenção de um hidrolisado com maior grau de hidrólise e um maior número de peptídeos com predições bioativas;
- O uso da hidrólise sequencial também melhorou a digestibilidade da fração lectina;
- A estabilidade desse hidrolisado em relação a digestão simulada *in vitro*, foi testada através da análise antioxidante frente os radicais ABTS e DPPH, e o hidrolisado manteve sua atividade antioxidante sem ter apresentado diferença estatística ($p < 0,05$) com o hidrolisado pós digestão para o radical DPPH;
- Em relação a avaliação *in silico*, foi possível predizer diferentes atividades biológicas para os peptídeos gerados pelos três métodos de hidrólise;
- O docking molecular do peptídeo KFVPKQPNMILQ com as proteínas relacionadas a apoptose celular mostrou as ligações do peptídeo com essas proteínas, sendo sua possível atividade anticâncer devido as ligações com essas proteínas induzindo a apoptose celular.
- A análise *in vitro* da atividade antiproliferativa contra células de adenocarcinoma de colon humano (HT-29 e LoVo) indicou que a hidrólise também melhorou a inibição do crescimento das células cancerígenas, apresentando uma CI_{50} inferior ao da fração lectina. De acordo com a citometria de fluxo o hidrolisado leva a apoptose celular, diminuindo a quantidade de células viáveis.
- Por fim, com a execução da pesquisa, foi possível obter hidrolisados com características bioativas a partir da fração lectina de sementes de soja. No entanto, são necessários mais estudos para avaliar o potencial desses peptídeos, incluindo a síntese de peptídeos, avaliação *in vitro* das atividades previstas *in silico* e avaliação *in vivo*.

ANEXOS

Material Suplementar referente ao Artigo 1.

Tabela S1: Características químicas dos peptídeos HA, HP e HAP.

HA	Bowman Index	GRAVY	Solubility	pI	Amphipathicity	Charge
WDPPNPHIGI	0.69	-0,730	Poor	5.09	0.14	-0.50
WDPPNPHIG	1.31	-1,311	Poor	5.09	0.16	-0.50
WDPPNPH	2.52	-2,271	Good	5.09	0.21	-0.50
SWDPPNPHIGI	0.93	-0,736	Poor	5.09	0.13	-0.50
WDPPNPHIGIN	1.23	-0,982	Poor	5.09	0.13	-0.50
WVRIGF	-0.04	0,950	Poor	10.11	0.41	1.00
SWDPPNPHIG	1.52	-1,260	Poor	5.09	0.14	-0.50
SWNKFVPKQPNMIL	0.84	-0,429	Poor	10.02	0.61	2.00
SWDPPNPHIGIN	1.41	-0,967	Poor	5.09	0.12	-0.50
SWDPPNPH	2.63	-2,088	Good	5.09	0.18	-0.50
FSWKFVVPK	0.97	-0,533	Poor	10.02	0.82	2.00
WDPPNPHI	1.59	-1,425	Poor	5.09	0.18	-0.50
WKFVVPKQPNMIL	0.64	-0,400	Poor	10.0	0.66	2.00
SLPEWVRIGF	0.5	0,360	Poor	6.36	0.37	0.00
LPEWVRIGF	0.17	0,489	Poor	6.36	0.41	0.00
NSWDPPNPHIGI	1.41	-0,967	Poor	5.09	0.12	-0.50
WDPPNPHIGINV	0.79	-0.55	Poor	5.09	0.12	-0.50
FSWKFVVPKQPNMILQ	0.89	-0,419	Poor	10.02	0.61	2.00
NSWDPPNPHIG	1.98	-1,464	Poor	5.09	0.13	-0.50
SWDPPNPHIGINV	0.99	-0,569	Poor	5.09	0.11	-0.50
NSWDPPNPHIGIN	1.81	-1,162	Poor	5.09	0.11	-0.50
NSWDPPNPH	3.08	-2,244	Good	5.09	0.16	-0.50
SWNKFVPKQPNMILQ	1.15	-0,633	Poor	10.02	0.66	2.00
FYAPDKRL	2.46	-0,789	Good	8.93	0.68	1.00
FVPKQPNMIL	-0.14	0,310	Poor	9.11	0.49	1.00
DPPNPHIG	1.77	-1,363	Good	5.09	0.18	-0.50
SWDPPNPHIGINVN	1.39	-0,779	Poor	5.09	0.10	-0.50
DPPNPHIGIN	1.58	-0,990	Good	5.09	0.14	-0.50
SWNKFVVPK	1.47	-0,950	Good	10.02	0.92	2.00
PPNPHIG	0.77	-1,057	Poor	7.10	0.21	0.50
LAPIDTKPQTHAGYLGLF	0.08	0,083	Poor	7.09	0.35	0.50
KFVPKQPNMIL	0.37	-0,073	Poor	10.02	0.78	2.00
PPNPHIGI	0.06	-0,363	Poor	7.10	0.18	0.50
WKFVVPKQPNMILQ	0.99	-0,621	Poor	10.02	0.70	2.00
WKFVVPK	1.19	-0,971	Good	10.02	1.05	2.00
FRNSWDPPNPHIGIN	2.36	-1,120	Poor	7.10	0.26	0.50
PPNPHIGIN	0.79	-0,711	Poor	7.10	0.16	0.50

RNSWDPPNPHIGI	2.45	-1,238	Good	7.10	0.30	0.50
NSWDPPNPHIGINV	1.39	-0,779	Poor	5.09	0.10	-0.50
SWNKFVPKQPNM	1.8	-1,192	Poor	10.02	0.72	2.00
RNSWDPPNPHIGIN	2.75	-1,400	Good	7.10	0.28	0.50
STPIHIW	-0.22	0,257	Poor	7.10	0.21	0.50
FTFYAPDTKRL	1.98	-0,455	Good	8.93	0.56	1.00
RNSWDPPNPH	4.26	-2,470	Good	7.10	0.39	0.50
SLPEWVRIGFS	0.76	0,255	Poor	6.36	0.34	0.00
EFDTR	4.51	-1,100	Good	4.38	0.62	-1.00
NSWDPPNPHIGINVN	1.74	-0,960	Poor	5.09	0.10	-0.50
RNSWDPPNPHIG	3.06	-1,717	Good	7.10	0.33	0.50
KTSLPEWVRIGF	1.09	-0,083	Good	9.10	0.62	1.00
FYAPDTKRLA	2.03	-0,530	Good	8.93	0.61	1.00
SFASNLPH	1.04	-0,188	Poor	7.10	0.18	0.50
SLPEWVRIG	0.88	0,089	Good	6.36	0.41	0.00
WSFASNLPHASSNIDPL	0.97	-0,147	Poor	5.09	0.09	-0.50
RNSWDPPNPHI	3.42	-1,836	Good	7.10	0.35	0.50
SWDLANNKVAKVL	0.97	-0,031	Good	8.94	0.56	1.00
FYAPDTKR	3.38	-1,363	Good	8.93	0.77	1.00
SWNKFVPKQ	1.92	-1,233	Good	10.02	0.95	2.00
TPIHIW	-0.82	0,433	Poor	7.10	0.24	0.50
LPEWVRIGFS	0.5	0,360	Poor	6.36	0.37	0.00
YSTPIHIW	-0.17	0,063	Poor	7.09	0.18	0.50
TSLPEWVRIGF	0.68	0,264	Poor	6.36	0.34	0.00
SLPEWVRIGFSA	0.54	0,383	Poor	6.36	0.31	0.00
SLPEWVRI	1.11	0,150	Good	6.36	0.47	0.00
WSFASNLPHAS	0.69	-0,127	Poor	7.10	0.13	0.50
FYAPDTKRLADGL	1.78	-0,415	Good	6.31	0.47	0.00
YAPDTKRL	3.14	-1,238	Good	8.93	0.77	1.00
PNPHIGIN	0.89	-0,600	Poor	7.10	0.18	0.50
AFFLAPIDTKP	-0.23	0,564	Poor	6.19	0.33	0.00
KFVPKQPNMILQ	0.8	-0,358	Poor	10.02	0.82	2.00
WVRIGFS	0.44	0,700	Poor	10.11	0.35	1.00
RNSWDPPNPHIGINV	2.29	-1,027	Poor	7.10	0.26	0.50
SLPEWVR	1.97	-0,471	Good	6.36	0.53	0.00
APDTKRL	3.57	-1,229	Good	9.10	0.87	1.00
SFASNLPHASSNIDPL	1.18	-0,100	Poor	5.09	0.09	-0.50
AFFLAPIDTK	-0.25	0,780	Poor	6.19	0.37	0.00
DGLAFFLAPIDTKPQ	0.38	0,173	Poor	4.21	0.33	-1.00
WDLANNKVAKVL	0.76	0,033	Good	8.94	0.61	1.00
FFLAPIDTK	-0.08	0,667	Poor	6.19	0.41	0.00
ASSNIDPL	1.31	-0,013	Good	3.80	0.00	-1.00
LPEWVRIG	0.57	0,200	Good	6.36	0.47	0.00
SWDLANNK	2.73	-1,313	Good	6.19	0.46	0.00
ALYSTPIHIW	-0.81	0,610	Poor	7.09	0.14	0.50
TFYAPDTKRL	2.47	-0,780	Poor	8.93	0.61	1.00
RNSWDPPNPHIGINVN	2.56	-1,181	Poor	7.10	0.24	0.50

HP	Bowman Index	GRAVY	Solubility	pl	Amphipathicity	Charge
FSWNKFVP	0.4	-0,113	Poor	9.11	0.46	1.00
FSWNKFVPKQPNMIL	0.58	-0,213	Poor	10.02	0.57	2.00
WDPPNPHIGI	0.69	-0,730	Poor	5.09	0.14	-0.50
WDPPNPHIG	1.31	-1,311	Poor	5.09	0.16	-0.50
WDPPNPH	2.52	-2,271	Good	5.09	0.21	-0.50
SWDPPNPHIGI	0.93	-0,736	Poor	5.09	0.13	-0.50
WDPPNPHIGIN	1.23	-0,982	Poor	5.09	0.13	-0.50
SWDPPNPHIG	1.52	-1,260	Poor	5.09	0.14	-0.50
SWNKFVPKQPNMIL	0.84	-0,429	Poor	10.02	0.61	2.00
SWDPPNPHIGIN	1.41	-0,967	Poor	5.09	0.12	-0.50
SWDPPNPH	2.63	-2,088	Good	5.09	0.18	-0.50
FSWNKFVPK	0.97	-0,533	Poor	10.02	0.82	2.00
SFSWNKFVPK	1.22	-0,560	Poor	10.02	0.73	2.00
WNKFVPKQPNMIL	0.64	-0,4	Poor	10.02	0.66	2.00
SLPEWVRIGF	0.5	0,36	Poor	6.36	0.37	0.00
LPEWVRIGF	0.17	0,489	Poor	6.36	0.41	0.00
NSWDPPNPHIGI	1.41	-0,967	Poor	5.09	0.12	-0.50
FSWNKFVPKQPNMILQ	0.89	-0,419	Poor	10.02	0.61	2.00
NSWDPPNPHIG	1.98	-1,464	Poor	5.09	0.13	-0.50
NSWDPPNPHIGIN	1.81	-1,162	Poor	5.09	0.11	-0.50
NSWDPPNPH	3.08	-2,244	Good	5.09	0.16	-0.50
SWNKFVPKQPNMILQ	1.15	-0,633	Poor	10.02	0.66	2.00
WDPPNPHIGINVN	1.24	-0,777	Poor	5.09	0.11	-0.50
FYAPDKRL	2.46	-0,789	Good	8.93	0.68	1.00
NSWDPPNPHI	2.28	-1,570	Poor	5.09	0.14	-0.50
DPPNPHIGI	1.02	-0,711	Poor	5.09	0.16	-0.50
SWDPPNPHIGINVN	1.39	-0,779	Poor	5.09	0.10	-0.50
DPPNPHIGIN	1.58	-0,990	Good	5.09	0.14	-0.50
RLADGLAFF	0.36	0,933	Poor	6.19	0.27	0.00
FSWNKFVPKQPNM	1.43	-0,885	Poor	10.02	0.66	2.00
VFSWNKFVPK	0.74	-0,127	Poor	10.02	0.67	2.00
SWNKFVPK	1.47	-0,950	Good	10.02	0.92	2.00
PPNPHIG	0.77	-1,057	Poor	7.10	0.21	0.50
WNKFVPKQPNMILQ	0.99	-0,621	Poor	10.02	0.70	2.00
WNKFVPK	1.19	-0,971	Good	10.02	1.05	2.00
PPNPHIGIN	0.79	-0,711	Poor	7.10	0.16	0.50
NSWDPPNPHIGINV	1.39	-0,779	Poor	5.09	0.10	-0.50
RNSWDPPNPHIGIN	2.75	-1,400	Good	7.10	0.28	0.50
STPIHIW	-0.22	0,257	Poor	7.10	0.21	0.50
FTFYAPDKRL	1.98	-0,455	Good	8.93	0.56	1.00
RNSWDPPNPH	4.26	-2,470	Good	7.10	0.39	0.50

SLPEWVRIGFS	0.76	0,255	Poor	6.36	0.34	0.00
NSWDPPNPHINGINVN	1.74	-0,960	Poor	5.09	0.10	-0.50
RNSWDPPNPHIGH	3.06	-1,717	Good	7.10	0.33	0.50
FYAPDTKRLA	2.03	-0,530	Good	8.93	0.61	1.00
SLPEWVRIG	0.88	0,089	Good	6.36	0.41	0.00
AVEFDTR	2.65	-0,075	Good	4.38	0.47	-1.00
APIDTKPQTHAGYLGL	0.59	-0,319	Poor	7.09	0.40	0.50
FSWNKFVPKQP	1.3	-0,900	Poor	10.02	0.78	2.00
SWDLANNKVAKVL	0.97	-0,031	Good	8.94	0.56	1.00
FYAPDKR	3.38	-1,363	Good	8.93	0.77	1.00
SWNKFVPKQ	1.92	-1,233	Good	10.02	0.95	2.00
TPIHIW	-0.82	0,433	Poor	7.10	0.24	0.50
LPEWVRIGFS	0.5	0,360	Poor	6.36	0.37	0.00
YSTPIHIW	-0.17	0,063	Poor	7.09	0.18	0.50
TSLPEWVRIGF	0.68	0,264	Poor	6.36	0.34	0.00
FYAPDKRLADGL	1.78	-0,415	Good	6.31	0.47	0.00
DPPNPHINGINVN	1.54	-0,767	Poor	5.09	0.12	-0.50
YAPDKRL	3.14	-1,238	Good	8.93	0.77	1.00
PNPHIGIN	0.89	-0,600	Poor	7.10	0.18	0.50
SLPEWVR	1.97	-0,471	Good	6.36	0.53	0.00
APDKRL	3.57	-1,229	Good	9.10	0.87	1.00
SFASNLPHASSNIDPL	1.18	-0,100	Poor	5.09	0.09	-0.50
SWDLANN	2.33	-0,943	Poor	3.80	0.00	-1.00
LAPIDTKPQTHAGYLGL	0.26	-0,076	Poor	7.09	0.37	0.50
FSWNKFVPKQPN	1.74	-1,117	Poor	10.02	0.72	2.00
WDLANNKVAKVL	0.76	0,033	Good	8.94	0.61	1.00
ASSNIDPL	1.31	-0,013	Good	3.80	0.00	-1.00
LPEWVRIG	0.57	0,200	Good	6.36	0.47	0.00
VEFDTR	3.28	-0,343	Good	4.38	0.53	-1.00
SWDLANNK	2.73	-1,313	Good	6.19	0.46	0.00
TFYAPDKRL	2.47	-0,780	Good	8.93	0.61	1.00
RNSWDPPNPHINGINVN	2.56	-1,181	Poor	7.10	0.24	0.50
SNIDPLDL	1.59	-0,100	Good	3.57	0.00	-2.00

HAP	Bowman Index	GRAVY	Solubility	pl	Amphipathicity	Charge
SFSWNKFVPKQPNMIL	0.76	-0,250	Poor	10.02	0.54	2.00
FSWNKFVP	0.4	-0,113	Poor	9.11	0.46	1.00
FSWNKFVPKQPNMIL	0.58	-0,213	Poor	10.02	0.57	2.00
WDPPNPHIGI	0.69	-0,730	Poor	5.09	0.14	-0.50
WDPPNPHIG	1.31	-1,311	Poor	5.09	0.16	-0.50
WDPPNPH	2.52	-2,271	Good	5.09	0.21	-0.50
SWDPPNPHIGI	0.93	-0,736	Poor	5.09	0.13	-0.50
WDPPNPHIGIN	1.23	-0,982	Poor	5.09	0.13	-0.50
SWDPPNPHIG	1.52	-1,260	Poor	5.09	0.14	-0.50
SWNKFVPKQPNMIL	0.84	-0,429	Poor	10.02	0.61	2.00
SWDPPNPHIGIN	1.41	-0,967	Poor	5.09	0.12	-0.50
SWDPPNPH	2.63	-2,088	Good	5.09	0.18	-0.50
FSWNKFVPK	0.97	-0,533	Poor	10.02	0.82	2.00
SFSWNKFVPK	1.22	-0,560	Poor	10.02	0.73	2.00
WNKFVPKQPNMIL	0.64	-0,400	Poor	10.02	0.66	2.00
SFSWNKFVPKQPNMILQ	1.04	-0,441	Poor	10.02	0.58	2.00
SLPEWVRIGF	0.5	0,360	Poor	6.36	0.37	0.00
LPEWVRIGF	0.17	0,489	Poor	6.36	0.41	0.00
SWNKFVP	0.89	-0,529	Poor	9.11	0.52	1.00
NSWDPPNPHIGI	1.41	-0,967	Poor	5.09	0.12	-0.50
FSWNKFVPKQPNMILQ	0.89	-0,419	Poor	10.02	0.61	2.00
NSWDPPNPHIG	1.98	-1,464	Poor	5.09	0.13	-0.50
SWDPPNPHIGINV	0.99	-0,569	Poor	5.09	0.11	-0.50
NSWDPPNPHIGIN	1.81	-1,162	Poor	5.09	0.11	-0.50
NSWDPPNPH	3.08	-2,244	Poor	5.09	0.16	-0.50
SWNKFVPKQPNMILQ	1.15	-0,633	Poor	10.02	0.66	2.00
WDPPNPHIGINVN	1.24	-0,777	Poor	5.09	0.11	-0.50
APIDTKPQTHAGYLGLF	0.38	-0,135	Poor	7.09	0.37	0.50
FYAPDKRL	2.46	-0,789	Good	8.93	0.68	1.00
FVPKQPNMIL	-0.14	0,310	Poor	9.11	0.49	1.00
DPPNPHIG	1.77	-1,363	Good	5.09	0.18	-0.50
NSWDPPNPHI	2.28	-1,570	Poor	5.09	0.14	-0.50
SWDPPNPHIGINVN	1.39	-0,779	Poor	5.09	0.10	-0.50
DPPNPHIGIN	1.58	-0,990	Good	5.09	0.14	-0.50
RLADGLAFF	0.36	0,933	Poor	6.19	0.27	0.00

SWNKFVPKQPNMILQG	1.02	-0,619	Poor	10.02	0.61	2.00
FSWNKFVPKQPNM	1.43	-0,885	Poor	10.02	0.66	2.00
VSFSWNKFVPK	0.74	-0,127	Poor	10.02	0.67	2.00
SWNKFVPK	1.47	-0,950	Good	10.02	0.92	2.00
RNSWDPPNP	4.22	-2,389	Good	6.19	0.27	0.00
PPNPHIG	0.77	-1,057	Poor	7.10	0.21	0.50
LAPIDTKPQTHAGYLGLF	0.08	0,083	Poor	7.09	0.35	0.50
KFVPKQPNMIL	0.37	-0,073	Poor	10.02	0.78	2.00
PPNPHIGI	0.06	-0,363	Poor	7.10	0.18	0.50
WKNKFVPKQPNMILQ	0.99	-0,621	Poor	10.02	0.70	2.00
WKNKFVPK	1.19	-0,971	Good	10.02	1.05	2.00
PPNPHIGIN	0.79	-0,711	Poor	7.10	0.16	0.50
RNSWDPPNPHIGI	2.45	-1,238	Good	7.10	0.30	0.50
APDTKRLADGLAFF	1.3	0,036	Good	6.31	0.44	0.00
NSWDPPNPHIGINV	1.39	-0,779	Poor	5.09	0.10	-0.50
SWNKFVPKQPNM	1.8	-1,192	Poor	10.02	0.72	2.00
NSWDPPNPHIGINVNSIR	2.19	-0,844	Poor	7.10	0.22	0.50
RNSWDPPNPHIGIN	2.75	-1,400	Good	7.10	0.28	0.50
KRLADGLAFF	0.88	0,450	Good	9.10	0.61	1.00
NKFVPKQPNMIL	0.89	-0,358	Poor	10.02	0.72	2.00
STPIHIW	-0.22	0,257	Poor	7.10	0.21	0.50
FTFYAPDTKRL	1.98	-0,455	Good	8.93	0.56	1.00
RNSWDPPNPH	4.26	-2,470	Good	7.10	0.39	0.50
SLPEWVRIGFS	0.76	0,255	Poor	6.36	0.34	0.00
EFDTFR	4.51	-1,100	Good	4.38	0.62	-1.00
NSWDPPNPHIGINVN	1.74	-0,960	Poor	5.09	0.10	-0.50
RNSWDPPNPHIG	3.06	-1,717	Good	7.10	0.33	0.50
FYAPDTKRLA	2.03	-0,530	Good	8.93	0.61	1.00
SLPEWVRIG	0.88	0,089	Good	6.36	0.41	0.00
SWNKFVPKQPNMILQGD	1.47	-0,788	Poor	8.94	0.58	1.00
APIDTKPQTHAGYLGL	0.59	-0,319	Poor	7.09	0.40	0.50
WSFASNLPHASSNIDPL	0.97	-0,147	Poor	5.09	0.09	-0.50
RNSWDPPNPHI	3.42	-1,836	Good	7.10	0.35	0.50
SWDLANNKVAKVL	0.97	-0,031	Good	8.94	0.56	1.00
FYAPDTKR	3.38	-1,363	Good	8.93	0.77	1.00
SWNKFVPKQ	1.92	-1,233	Good	10.02	0.95	2.00
TPIHIW	-0.82	0,433	Good	7.10	0.24	0.50
LPEWVRIGFS	0.5	0,360	Poor	6.36	0.37	0.00
YSTPIHIW	-0.17	0,063	Poor	7.09	0.18	0.50
TSLPEWVRIGF	0.68	0,264	Poor	6.36	0.34	0.00
SLPEWVRIGFSA	0.54	0,383	Poor	6.36	0.31	0.00
WSFASNLPHAS	0.69	-0,127	Poor	7.10	0.13	0.50
FYAPDTKRLADGL	1.78	-0,415	Good	6.31	0.47	0.00
DPPNPHIGINVN	1.54	-0,767	Poor	5.09	0.12	-0.50
FVPKQPNMILQ	0.36	-3,636	Poor	9.11	0.56	1.00

YAPDTKRL	3.14	-1,238	Good	8.93	0.77	1.00
FYAPDTKRLADGLAF	1.23	-0,053	Good	6.31	0.41	0.00
PNPHIGIN	0.89	-0,600	Poor	7.10	0.18	0.50
KFVPKQPNMILQ	0.8	-0,358	Poor	10.02	0.82	2.00
SLPEWVR	1.97	-0,471	Good	6.36	0.53	0.00
PEWVRIG	1.35	-0,314	Good	6.36	0.53	0.00
APDTKRL	3.57	-1,229	Good	9.10	0.87	1.00
SFASNLPHASSNIDPL	1.18	-0,100	Poor	5.09	0.09	-0.50
LAPIDTKPQTHAGYLGL	0.26	-0,076	Poor	7.09	0.37	0.50
FSWNKFVPKQPN	1.74	-1,117	Poor	10.02	0.72	2.00
ASSNIDPL	1.31	-0,013	Good	3.80	0.00	-1.00
LPEWVRIG	0.57	0,200	Good	6.36	0.47	0.00
VEFDTR	3.28	-0,343	Good	4.38	0.53	-1.00
SWDLANNK	2.73	-1,313	Good	6.19	0.46	0.00
ALYSTPIHIW	-0.81	0,610	Poor	7.09	0.14	0.50
TFYAPDTKRL	2.47	-0,780	Good	8.93	0.61	1.00
RNSWDPPNPHIGINVN	2.56	-1,181	Poor	7.10	0.24	0.50
LPEWVRIGFSA	0.28	0,491	Poor	6.36	0.34	0.00

Tabela S2: Atividade anticâncer predita para os peptídeos obtidos pela hidrólise consecutiva HAP.

Cancer type	Cell lineage	Peptides with anticâncer activity
Breast	BT-549	TFYAPDTKRL (5.369), TSLPEWVRIGF (5.083), TPIHIW (5.009), VEFDTFR (5.372), VSFSWNKFVPK (5.125), APDTKRLADGLAFF (5.429), WNKFVPKQPNMIL (5.469), WNKFVPKQPNMILQ (5.618), WNKFVPK (5.390), WSFASNLPHAS (5.169), NKFVPKQPNMIL (5.828), LPEWVRIGFSA (5.294), LPEWVRIGFS (5.420), LPEWVRIGF (5.233), LPEWVRIG (5.305), YAPDTKRL (5.311), FTFYAPDTKRL (5.059), FVPKQPNMILQ (5.912), FVPKQPNMIL (5.700), FYAPDTKRLA (5.409), FYAPDTKRL (5.411), FYAPDTKR (5.446), FSWNKFVPKQPNMIL (5.347), FSWNKFVPKQPNMILQ (5.534), FSWNKFVPK (5.110), FSWNKFVP (5.264), EFDTFR (5.010), KFVPKQPNMIL (5.713), KFVPKQPNMILQ (6.016), KRLADGLAFF (5.588), RLADGLAFF (5.441), STPIHIW (5.009), SWNKFVPKQPNMIL (5.412), SWNKFVPKQPNMILQ (5.623), SWNKFVPKQ (5.410), SWNKFVPK (5.380), SWNKFVP (5.511), SWDLANNKVAKVL (5.431), SWDLANNK (5.166), SLPEWVRIGFS (5.336), SLPEWVRIGFSA (5.257), SLPEWVRIGF (5.144), SLPEWVRIG (5.271), SLPEWVR (5.204), SFSWNKFVPKQPNMIL (5.312), SFSWNKFVPKQPNMILQ (5.488), PEWVRIG (5.041)
	HS ₅₇₈ T	TPIHIW (5.017), APDTKRLADGLAFF (5.112), WNKFVPKQPNMIL (5.195), WNKFVPKQPNMILQ (5.377), NKFVPKQPNMIL (5.111), FSWNKFVPKQPNMIL (5.384), FSWNKFVPKQPNMILQ (5.388), KFVPKQPNMILQ (5.153), STPIHIW (5.135), SWNKFVPKQPNMIL (5.405), SWNKFVPKQPNMILQ (5.477), SFSWNKFVPKQPNMIL (5.432), SFSWNKFVPKQPNMILQ (5.417)
	MDA_M B_231_ ATCC	TFYAPDTKRL (5.244), TSLPEWVRIGF (5.214), TPIHIW (5.022), VEFDTFR (5.12), VSFSWNKFVPK (5.171), WNKFVPKQPNMIL (5.223), WNKFVPKQPNMILQ (5.211), WNKFVPK (5.310), WSFASNLPHAS (5.002), NKFVPKQPNMIL (5.207), LPEWVRIGFSA (5.162), LPEWVRIGFS (5.111), LPEWVRIGF (5.196), FTFYAPDTKRL (5.038), FVPKQPNMILQ (5.168), FYAPDTKRLA (5.078), FYAPDTKRL (5.094), FSWNKFVPKQPNMIL (5.174), FSWNKFVPKQPNMILQ (5.180), FSWNKFVPK (5.328), FSWNKFVP (5.254), EFDTFR (5.176), KFVPKQPNMIL (5.209), KFVPKQPNMILQ (5.222), KRLADGLAFF (5.140), RLADGLAFF (5.188), STPIHIW (5.112), SWNKFVPKQPNMIL (5.230), SWNKFVPKQPNMILQ (5.181), SWNKFVPKQ (5.154), SWNKFVPK (5.275), SWNKFVP (5.185), SWDLANNKVAKVL (5.007), SLPEWVRIGFS (5.126), SLPEWVRIGFSA (5.116), SLPEWVRIGF (5.212), SLPEWVRIG (5.045), SLPEWVR (5.067), SFSWNKFVPKQPNMIL (5.215), SFSWNKFVPKQPNMILQ (5.191), SFSWNKFVPK (5.275)
	MDA_M B_468	TFYAPDTKRL (5.981), TSLPEWVRIGF (6.144), TPIHIW (6.378), VEFDTFR (6.102), VSFSWNKFVPK (6.023), ALYSTPIHIW (6.391), ASSNIDPL (6.207), APDTKRLADGLAFF (5.906), APDTKRL (5.891), WNKFVPKQPNMIL (6.316), WNKFVPKQPNMILQ (5.942), WNKFVPK (6.102), WSFASNLPHAS (5.885), NKFVPKQPNMIL (6.230), LPEWVRIGFSA (5.838), LPEWVRIGFS (5.983), LPEWVRIGF (6.146), LPEWVRIG (5.985), YAPDTKRL (6.008), YSTPIHIW (6.393), FTFYAPDTKRL (5.913), FVPKQPNMILQ (5.944), FVPKQPNMIL (6.332), FYAPDTKRLA (5.718), FYAPDTKRL (6.049), FYAPDTKR (5.913), FSWNKFVPKQPNMIL (6.375), FSWNKFVPKQPNMILQ (6.025), FSWNKFVPK (6.112), FSWNKFVP (6.126), EFDTFR (6.112), KFVPKQPNMIL (6.201), KFVPKQPNMILQ (5.805), KRLADGLAFF (6.024), RLADGLAFF (6.095), STPIHIW (6.577), SWNKFVPKQPNMIL (6.375), SWNKFVPKQPNMILQ (5.996), SWNKFVPKQ (6.057), SWNKFVPK (6.082), SWNKFVP (6.014), SWDLANNKVAKVL (6.170), SWDLANNK (6.312), SLPEWVRIGFS (5.870), SLPEWVRIGFSA (5.705), SLPEWVRIGF (6.222), SLPEWVRIG (5.949), SLPEWVR (6.320), SFSWNKFVPKQPNMIL (6.441), SFSWNKFVPKQPNMILQ (6.079), SFSWNKFVPK (6.082), PEWVRIG (6.007)
	T_47D	TPIHIW (5.071), VEFDTFR (5.034), VSFSWNKFVPK (5.025), APDTKRLADGLAFF (5.558), APDTKRL (5.023), WNKFVPKQPNMIL (5.572), WNKFVPKQPNMILQ (5.561), WNKFVPK (5.246), NKFVPKQPNMIL (6.134), LPEWVRIGFSA (5.086), YAPDTKRL (5.176), FTFYAPDTKRL (5.104), FVPKQPNMILQ (6.125), FVPKQPNMIL (6.204), FYAPDTKRLA (5.171), FYAPDTKRL (5.087), FYAPDTKR (5.104), FSWNKFVPKQPNMIL (5.504), FSWNKFVPKQPNMILQ (5.512), FSWNKFVPK (5.088), FSWNKFVP (5.030), KFVPKQPNMIL (6.067), KFVPKQPNMILQ (6.107), KRLADGLAFF (5.139), RLADGLAFF (5.037), STPIHIW (5.135), SWNKFVPKQPNMIL (5.580), SWNKFVPKQPNMILQ (5.589), SWNKFVPKQ (5.060), SWNKFVPK (5.172), SWNKFVP (5.210), SWDLANNKVAKVL (5.087), SFSWNKFVPKQPNMIL (5.405), SFSWNKFVPKQPNMILQ (5.408)
Central nervous	SF_295	TFYAPDTKRL (5.005), TSLPEWVRIGF (5.118), APDTKRLADGLAFF (5.164), WNKFVPKQPNMIL (5.039), WNKFVPKQPNMILQ (5.228), WSFASNLPHAS (5.141), LPEWVRIGFSA (5.060), LPEWVRIGFS (5.165), LPEWVRIGF (5.068), FTFYAPDTKRL (5.193),

system (CSN)		FSWNKFVPKQPNMILQ (5.021), SWNKFVPKQPNMIL (5.118), SWNKFVPKQPNMILQ (5.209), SWNKFVPKQ (5.001), SLPEWVRIGFS (5.177), SLPEWVRIGFSA (5.085), SLPEWVRIGF (5.105), SFSWNKFVPKQPNMILQ (5.003)
	SF 539	NKFVPKQPNMIL (5.001), FVPKQPNMIL (5.110)
	SNB_75	ASSNIDPL (5.044), APDTKRL (5.088), NKFVPKQPNMIL (5.294), YAPDTKRL (5.151), FVPKQPNMILQ (5.255), FVPKQPNMIL (5.430), KFVPKQPNMIL (5.334), KFVPKQPNMILQ (5.315)
	U251	APDTKRLADGLAFF (5.004)
	XF_498	TFYAPDTKRL (5.270), TSLPEWVRIGF (5.276), TPIHIW (5.075), VEFDTFR (5.115), VSFSWNKFVPK (5.206), ALYSTPIHIW (5.077), ASSNIDPL (5.196), APDTKRLADGLAFF (5.275), APDTKRL (5.255), WSFASNLPHAS (5.191), YAPDTKRL (5.226), FTFYAPDTKRL (5.290), FYAPDTKRLA (5.094), FYAPDTKRL (5.052), FYAPDTKR (5.051), EFDTFR (5.112), STPIHIW (5.081), SWNKFVPKQPNMILQ (5.015), SWDLANNKVAKVL (5.373), SWDLANNK (5.121), SLPEWVRIGFS (5.215), SLPEWVRIGFSA (5.287), SLPEWVRIG (5.152), SLPEWVR (5.113), SFSWNKFVPKQPNMIL (5.345), SFSWNKFVPKQPNMILQ (5.389), SFSWNKFVPK (5.128)
Colon	DLD_1	VEFDTFR (5.139), ASSNIDPL (5.539), APDTKRL (5.054), NKFVPKQPNMIL (5.328), YAPDTKRL (5.525), FVPKQPNMILQ (5.286), FVPKQPNMIL (5.249), KFVPKQPNMIL (5.333), KFVPKQPNMILQ (5.368), KRLADGLAFF (5.256), RLADGLAFF (5.057), SWDLANNKVAKVL (5.620), SWDLANNK (5.382)
	HCT_11 6	ALYSTPIHIW (5.020), FSWNKFVPKQPNMIL (5.045), FSWNKFVPKQPNMILQ (5.031), SWNKFVPKQPNMIL (5.021), SWNKFVPKQPNMILQ (5.029), SFSWNKFVPKQPNMIL (5.077), SFSWNKFVPKQPNMILQ (5.051)
	KM20L2	NKFVPKQPNMIL (5.018), FVPKQPNMILQ (5.021), FVPKQPNMIL (5.012), KFVPKQPNMIL (5.003), KFVPKQPNMILQ (5.013)
	SW 620	APDTKRLADGLAFF (5.059)
Leukimia	P388_A DR	TFYAPDTKRL (5.805), TSLPEWVRIGF (5.976), TPIHIW (5.135), VEFDTFR (6.246), VSFSWNKFVPK (5.476), ALYSTPIHIW (5.444), ASSNIDPL (5.394), APDTKRLADGLAFF (6.089), APDTKRL (5.493), WNKFPKQPNMIL (5.130), WSFASNLPHAS (5.730), LPEWVRIGFSA (6.026), LPEWVRIGFS (6.081), LPEWVRIGF (5.860), LPEWVRIG (5.869), YAPDTKRL (5.686), YSTPIHIW (5.445), FTFYAPDTKRL (5.662), FYAPDTKRLA (5.799), FYAPDTKRL (5.831), FYAPDTKR (5.994), FSWNKFVPK (5.345), FSWNKFVP (5.606), EFDTFR (6.161), KRLADGLAFF (5.925), RLADGLAFF (6.013), STPIHIW (5.318), SWNKFVPKQ (5.538), SWNKFVPK (5.517), SWNKFVP (5.699), SWDLANNKVAKVL (5.724), SWDLANNK (6.050), SLPEWVRIGFS (6.124), SLPEWVRIGFSA (6.010), SLPEWVRIGF (5.952), SLPEWVRIG (6.011), SLPEWVR (6.251), SFSWNKFVPK (5.543), PEWVRIG (5.488)
	P388	TFYAPDTKRL (5.735), TSLPEWVRIGF (5.397), TPIHIW (5.701), VEFDTFR (6.197), ASSNIDPL (6.419), APDTKRLADGLAFF (5.929), APDTKRL (6.257), WNKFPKQPNMIL (5.068), WNKFPKQPNMILQ (5.287), WNKFPKQPNMIL (5.357), NKFVPKQPNMIL (6.389), LPEWVRIGFSA (5.338), LPEWVRIGFS (5.503), LPEWVRIGF (5.381), LPEWVRIG (5.783), YAPDTKRL (6.224), YSTPIHIW (5.132), FTFYAPDTKRL (5.592), FVPKQPNMILQ (6.604), FVPKQPNMIL (6.674), FYAPDTKRLA (5.771), FYAPDTKRL (5.764), FYAPDTKR (5.708), FSWNKFVPKQPNMIL (5.129), FSWNKFVPKQPNMILQ (5.377), FSWNKFVP (5.388), EFDTFR (6.173), KFVPKQPNMIL (6.301), KFVPKQPNMILQ (6.368), KRLADGLAFF (5.704), RLADGLAFF (6.121), STPIHIW (5.457), SWNKFVPKQPNMIL (5.218), SWNKFVPKQPNMILQ (5.414), SWNKFVPK (5.120), SWNKFVP (5.841), SWDLANNKVAKVL (5.373), SWDLANNK (5.388), SLPEWVRIGFS (5.526), SLPEWVRIGFSA (5.401), SLPEWVRIGF (5.360), SLPEWVRIG (5.639), SLPEWVR (5.960), SFSWNKFVPKQPNMIL (5.156), SFSWNKFVPKQPNMILQ (5.402), PEWVRIG (5.813)
	RPMI_8 226	TFYAPDTKRL (5.121), TSLPEWVRIGF (5.228), VEFDTFR (5.138), ALYSTPIHIW (5.182), APDTKRLADGLAFF (5.202), WNKFPKQPNMIL (5.174), WNKFPKQPNMILQ (5.377), WNKFPKQPNMIL (5.213), WSFASNLPHAS (5.157), NKFVPKQPNMIL (5.281), LPEWVRIGFSA (5.237), LPEWVRIGFS (5.309), LPEWVRIGF (5.423), LPEWVRIG (5.110), YSTPIHIW (5.124), FTFYAPDTKRL (5.385), FVPKQPNMILQ (5.238), FVPKQPNMIL (5.100), FYAPDTKRLA (5.118), FYAPDTKRL (5.130), FYAPDTKR (5.088), FSWNKFVPKQPNMILQ (5.215), FSWNKFVPK (5.141), FSWNKFVP (5.387), EFDTFR (5.081), KFVPKQPNMIL (5.195), KFVPKQPNMILQ (5.312), KRLADGLAFF (5.179), RLADGLAFF (5.139), SWNKFVPKQPNMIL (5.205), SWNKFVPKQPNMILQ (5.372), SWNKFVPKQ (5.272), SWNKFVPK (5.139), SWNKFVP (5.214), SWDLANNKVAKVL (5.303), SLPEWVRIGFS (5.245), SLPEWVRIGFSA (5.228), SLPEWVRIGF (5.307), SLPEWVRIG (5.142), SFSWNKFVPKQPNMIL (5.022), SFSWNKFVPKQPNMILQ (5.216)

	SR	TPIHIW (5.142), VSFSWNKFVPK (5.155), WNKFVPKQPNMIL (5.211), WNKFVPKQPNMILQ (5.270), WNKFVPK (5.647), NKFVPKQPNMIL (5.314),LPEWVRIG (5.200), YSTPIHIW (5.065), FVPKQPNMILQ (5.751), FVPKQPNMIL (5.733), FYAPDTKRLA (5.043), FYAPDKR (5.037), FSWNKFVPK (5.159), FSWNKFVP (5.547), KFVPKQPNMIL (5.443), KFVPKQPNMILQ (5.503), KRLADGLAFF (5.030), RLADGLAFF (5.027), STPIHIW (5.194), SWNKFVPKQPNMIL (5.179), SWNKFVPKQPNMILQ (5.229), SWNKFVPKQ (5.418), SWNKFVPK (5.555), SWNKFVP (5.857), SWDLANNKVAKVL (5.415), SWDLANNK (5.615), SLPEWVRIG (5.187), SLPEWVR (5.046), SFSWNKFVPK (5.138), PEWVRIG (5.313)
Melanoma	LOX _{IM} VI	ALYSTPIHIW (5.246), WSFASNLPHAS (5.127), YSTPIHIW(5.154), FSWNKFVP (5.059)
	M14	ASSNIDPL (5.034), APDKR (5.017), WSFASNLPHAS (5.170), FTFYAPDKR (5.050), SLPEWVRIGFS (5.146), SLPEWVRIGFSA (5.051)
	MALME _3M	TFYAPDKR (5.016), TSLPEWVRIGF (5.098), VSFSWNKFVPK (5.057), ALYSTPIHIW (5.062), APDKRLADGLAFF (5.150), WSFASNLPHAS (5.128), NKFVPKQPNMIL (5.124), YSTPIHIW (5.039), FTFYAPDKR (5.173), FVPKQPNMILQ (5.032), FVPKQPNMIL (5.018), FSWNKFVPKQPNMIL (5.127), FSWNKFVPKQPNMILQ (5.101), KFVPKQPNMIL (5.045), KFVPKQPNMILQ (5.105), SWNKFVPKQPNMIL (5.161), SWNKFVPKQPNMILQ (5.135), SWDLANNKVAKVL (5.031), SLPEWVRIGFS (5.012), SLPEWVRIGFSA (5.108), SFSWNKFVPKQPNMIL (5.200), SFSWNKFVPKQPNMILQ (5.190)
	MDA_N	FVPKQPNMIL (5.056)
	SK_ME L_28	VSFSWNKFVPK (5.120), NKFVPKQPNMIL (5.059), FVPKQPNMILQ (5.463), FVPKQPNMIL (5.160), FSWNKFVPKQPNMILQ (5.011), KFVPKQPNMIL (5.092), KFVPKQPNMILQ (5.447), SWNKFVPKQPNMILQ (5.010), SFSWNKFVPKQPNMILQ (5.148), SFSWNKFVPK (5.094)
	SK_ME L_5	NKFVPKQPNMIL (5.111), FVPKQPNMILQ (5.107), KFVPKQPNMIL (5.038), KFVPKQPNMILQ (5.101)
	UACC_2 57	WNKFVPKQPNMIL (5.055), WNKFVPKQPNMILQ (5.093), WSFASNLPHAS (5.105), YSTPIHIW (5.253), KFVPKQPNMILQ (5.010), SWNKFVPKQPNMIL (5.090), SWNKFVPKQPNMILQ (5.102)
Non Small Cell Lung	A549 ATCC	TSLPEWVRIGF (5.097), VEFDTFR (5.036), VSFSWNKFVPK (5.045), ALYSTPIHIW (5.046), WSFASNLPHAS (5.163), LPEWVRIGFSA (5.105), LPEWVRIGFS (5.073), LPEWVRIGF (5.053), FVPKQPNMILQ (5.172), FVPKQPNMIL (5.135), FYAPDKR (5.043), FSWNKFVPK (5.023), FSWNKFVP (5.112), KFVPKQPNMIL (5.074), KFVPKQPNMILQ (5.022), SWNKFVPKQ (5.194), SWNKFVP (5.030), SWDLANNKVAKVL (5.025), SWDLANNK (5.189), SLPEWVRIGFS (5.104), SLPEWVRIGFSA (5.146), SLPEWVRIGF (5.023), SLPEWVRIG (5.089), SFSWNKFVPK (5.089)
	HOP_18	ALYSTPIHIW (5.010), NKFVPKQPNMIL (5.184), FVPKQPNMILQ (5.270), FVPKQPNMIL (5.260), KFVPKQPNMIL (5.154), KFVPKQPNMILQ (5.244), KRLADGLAFF (5.102)
	HOP_92	VSFSWNKFVPK (5.186), ALYSTPIHIW (5.562), APDKRLADGLAFF (5.117), WNKFVPKQPNMIL (5.047), WNKFVPKQPNMILQ (5.113), WSFASNLPHAS (5.250), NKFVPKQPNMIL (5.348), LPEWVRIGFSA (5.098), LPEWVRIGF (5.118), YSTPIHIW (5.415), FTFYAPDKR (5.149), FVPKQPNMILQ (5.304), FVPKQPNMIL (5.078), FSWNKFVPK (5.273), FSWNKFVP (5.420), KFVPKQPNMIL (5.371), KFVPKQPNMILQ (5.331), SWNKFVPKQPNMIL (5.087), SWNKFVPKQPNMILQ (5.043), SLPEWVRIGFS (5.043), SLPEWVRIGFSA (5.303), SFSWNKFVPK (5.201)
	LXFL_5 29	TFYAPDKR (5.564), TSLPEWVRIGF (5.275), TPIHIW (5.339), VEFDTFR (5.622), ASSNIDPL (5.170), APDKRLADGLAFF (5.674), APDKR (5.187), WNKFVPK (5.273), WSFASNLPHAS (5.019), NKFVPKQPNMIL (5.555), LPEWVRIGFSA (5.284), LPEWVRIGFS(5.257), LPEWVRIGF (5.263), LPEWVRIG (5.749), YAPDKR (5.852), FTFYAPDKR (5.412), FVPKQPNMILQ (5.559), FVPKQPNMIL (5.591), FYAPDKR (5.607), FYAPDKR (5.564), FYAPDKR (5.594), FSWNKFVPK (5.050), EFDTR (5.556), KFVPKQPNMIL (5.587), KFVPKQPNMILQ (5.645), KRLADGLAFF (5.570), RLADGLAFF (5.594), STPIHIW (5.411), SWNKFVPKQPNMIL (5.054), SWNKFVPKQPNMILQ (5.021), SWNKFVPKQ (5.239), SWNKFVPK (5.351), SWNKFVP (5.180), SWDLANNKVAKVL (5.546), SWDLANNK (5.704), SLPEWVRIGFS (5.297), SLPEWVRIGFSA (5.314), SLPEWVRIGF (5.237), SLPEWVRIG (5.749), SLPEWVR (5.629), PEWVRIG(5.654)
	NCI_H5 22	TFYAPDKR (5.125), TSLPEWVRIGF (5.025), TPIHIW (5.051), APDKRLADGLAFF (5.163), WNKFVPKQPNMIL (5.582), WNKFVPKQPNMILQ (5.564), NKFVPKQPNMIL (5.600), FTFYAPDKR (5.101), FVPKQPNMILQ (5.486), FVPKQPNMIL (5.481), FYAPDKR (5.019), FSWNKFVPKQPNMIL (5.513), FSWNKFVPKQPNMILQ (5.425), FSWNKFVP (5.090), KFVPKQPNMIL (5.443), KFVPKQPNMILQ (5.695), KRLADGLAFF (5.207), RLADGLAFF (5.138), SWNKFVPKQPNMIL (5.578), SWNKFVPKQPNMILQ (5.551), SWDLANNKVAKVL (5.287), SFSWNKFVPKQPNMIL (5.450), SFSWNKFVPKQPNMILQ (5.394)
Ovarian	IGROV1	WSFASNLPHAS (5.040)

	OVCAR_4	NKFVFPKQPNMIL (5.042), FVPKQPNMILQ (5.128), FVPKQPNMIL (5.075), KFVFPKQPNMIL (5.086), KFVFPKQPNMILQ (5.044)
	SK_OV_3	WNKFVFPKQPNMILQ (5.024), SWNKFVFPKQPNMILQ (5.029)
Prostate	PC_3	WNKFVFPKQPNMIL (5.005), WNKFVFPK (5.045), NKFVFPKQPNMIL (5.079), FVPKQPNMILQ (5.131), FVPKQPNMIL (5.160), FSWNKFVFPK (5.019), FSWNKFVP (5.017), KFVFPKQPNMIL (5.092), KFVFPKQPNMILQ (5.138)
Renal	786_0	WNKFVFPKQPNMIL (5.053), WNKFVFPKQPNMILQ (5.064), NKFVFPKQPNMIL (5.356), FVPKQPNMILQ (5.217), FVPKQPNMIL (5.100), KFVFPKQPNMIL (5.241), KFVFPKQPNMILQ (5.395), SWNKFVFPKQPNMIL (5.019), SWNKFVFPKQPNMILQ (5.030), SFSWNKFVFPKQPNMILQ (5.002)
	ACHN	WNKFVFPKQPNMIL (5.045), WNKFVFPKQPNMILQ (5.133), FVPKQPNMIL (5.022), FSWNKFVFPKQPNMIL (5.150), FSWNKFVFPKQPNMILQ (5.183), KFVFPKQPNMILQ (5.006), SWNKFVFPKQPNMIL (5.123), SWNKFVFPKQPNMILQ (5.147), SWDLANNKVAKVL (5.132), SFSWNKFVFPKQPNMIL (5.300), SFSWNKFVFPKQPNMILQ (5.363)
	RFX_39_3	WNKFVFPKQPNMIL (5.085), WNKFVFPKQPNMILQ (5.135), FSWNKFVFPKQPNMIL (5.204), FSWNKFVFPKQPNMILQ (5.302), SWNKFVFPKQPNMIL (5.131), SWNKFVFPKQPNMILQ (5.222), SFSWNKFVFPKQPNMIL (5.276), SFSWNKFVFPKQPNMILQ (5.326)
	RFX_63_1	TFYAPDTKRL (5.390), TSLPEWVRIGF (5.045), VSFSWNKFVFPK (5.225), ALYSTPIHIW (5.451), APDTKRLADGLAFF (5.310), WNKFVFPKQPNMIL (5.514), WNKFVFPKQPNMILQ (5.513), NKFVFPKQPNMIL (5.632), LPEWVRIGFSA (5.002), LPEWVRIG (5.004), YAPDTKRL (5.490), YSTPIHIW (5.108), FTFYAPDTKRL (5.373), FVPKQPNMILQ (5.671), FVPKQPNMIL (5.593), FYAPDTKRLA (5.452), FYAPDTKRL (5.446), FYAPDTKR (5.355), FSWNKFVFPKQPNMIL (5.657), FSWNKFVFPKQPNMILQ (5.899), KFVFPKQPNMIL (5.681), KFVFPKQPNMILQ (5.737), KRLADGLAFF (5.142), RLADGLAFF (5.018), SWNKFVFPKQPNMIL (5.565), SWNKFVFPKQPNMILQ (5.680), SWDLANNKVAKVL (5.550), SWDLANNK (5.208), SLPEWVRIGFSA (5.136), SLPEWVRIG (5.100), SFSWNKFVFPKQPNMIL (5.863), SFSWNKFVFPKQPNMILQ (5.942)
	SN12K1	TFYAPDTKRL (5.663), TSLPEWVRIGF (5.145), VEFDTFR (5.223), ALYSTPIHIW (5.195), ASSNIDPL (5.230), APDTKRLADGLAFF (5.789), WNKFVFPKQPNMIL (5.200), WNKFVFPKQPNMILQ (5.458), NKFVFPKQPNMIL (6.175), LPEWVRIGFSA (5.056), LPEWVRIGFS (5.032), YAPDTKRL (5.092), FTFYAPDTKRL (5.537), FVPKQPNMILQ (6.410), FVPKQPNMIL (6.458), FYAPDTKRLA (5.418), FYAPDTKRL (5.382), FYAPDTKR (5.010), FSWNKFVFPKQPNMIL (5.270), FSWNKFVFPKQPNMILQ (5.447), EFDTR (5.118), KFVFPKQPNMIL (6.155), KFVFPKQPNMILQ (6.173), KRLADGLAFF (5.178), RLADGLAFF (5.411), SWNKFVFPKQPNMIL (5.485), SWNKFVFPKQPNMILQ (5.707), SWDLANNKVAKVL (5.483), SLPEWVRIGFS (5.145), SLPEWVRIGFSA (5.148), SLPEWVRIGF (5.039), SLPEWVRIG (5.015), SLPEWVR (5.048), SFSWNKFVFPKQPNMIL (5.533), SFSWNKFVFPKQPNMILQ (5.627)
	UO_31	TSLPEWVRIGF (5.090), WSFASNLPHAS (5.016), LPEWVRIGFSA (5.171), LPEWVRIGFS (5.225), LPEWVRIGF (5.137), LPEWVRIG (5.117), FTFYAPDTKRL (5.051), FSWNKFVP (5.046), SWNKFVFPKQPNMILQ (5.005), SWNKFVP (5.016), SLPEWVRIGFS (5.241), SLPEWVRIGFSA (5.175), SLPEWVRIGF (5.099), SLPEWVRIG (5.084)
Small Cell Lung	DMS_11_4	APDTKRLADGLAFF (5.082), SWDLANNKVAKVL (5.023)
	DMS_27_3	TFYAPDTKRL (5.370), TSLPEWVRIGF (5.658), VSFSWNKFVFPK (5.084), ALYSTPIHIW (5.023), APDTKRLADGLAFF (5.957), APDTKRL (5.561), WNKFVFPKQPNMIL (5.337), WNKFVFPKQPNMILQ (5.439), WNKFVFPK (5.076), NKFVFPKQPNMIL (6.290), LPEWVRIGFSA (5.758), LPEWVRIGFS (5.700), LPEWVRIGF (5.421), LPEWVRIG (5.397), YAPDTKRL (5.265), YSTPIHIW (5.035), FTFYAPDTKRL (5.235), FVPKQPNMILQ (6.183), FVPKQPNMIL (6.037), FYAPDTKRLA (5.402), FYAPDTKRL (5.344), FYAPDTKR (5.160), FSWNKFVFPKQPNMIL (5.121), FSWNKFVFPKQPNMILQ (5.255), FSWNKFVFPK (5.096), FSWNKFVP (5.258), KFVFPKQPNMIL (6.129), KFVFPKQPNMILQ (6.245), KRLADGLAFF (5.233), SWNKFVFPKQPNMIL (5.325), SWNKFVFPKQPNMILQ (5.432), SWNKFVFPKQ (5.227), SWNKFVFPK (5.058), SWNKFVP (5.123), SWDLANNKVAKVL (5.964), SWDLANNK (5.020), SLPEWVRIGFS (5.777), SLPEWVRIGFSA (5.844), SLPEWVRIGF (5.523), SLPEWVRIG (5.576), SLPEWVR (5.043), SFSWNKFVFPKQPNMIL (5.116), SFSWNKFVFPKQPNMILQ (5.253), SFSWNKFVFPK (5.063), PEWVRIG (5.102)