

## ESTUDO *IN SILICOE IN VITRO* DA ATIVIDADE DA ENZIMA DPP-IV NA PRESENÇA DO PEPTÍDEO KD

Ticianilde Alves de Sousa Santos<sup>1</sup>  
Josefa de Souza Oliveira Caldas<sup>2</sup>  
Wdaã Hércules da Silva Pereira<sup>3</sup>  
Rosângela Gomes de Sena<sup>4</sup>  
Márcia de Oliveira Abreu<sup>5</sup>

### RESUMO

O Diabetes Mellitus do tipo 2 (DM) contribui para o aumento da morbidade e da mortalidade por doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) como colesterol, e problemas cardiovasculares. No Brasil, o feijão caupi é tratado principalmente no sertão semi-árido da região Nordeste, e em pequenas áreas na Amazônia. A sincretinas GIP e GLP-1 fazem parte da família do peptídeo semelhante ao glucagon, de modo que existe alguma correlação da sequência de aminoácidos entre esses peptídeos. Esses peptídeos ligam-se a seis receptores específicos de GIP e GLP-1 e são rapidamente metabolizados pela enzima dipeptidil peptidase-IV (DPP-IV). O objetivo desse estudo é comparar por várias ferramentas *in silico* a ligação da enzima DPP-IV com peptídeo KD e como também a bioatividade através dos sites Biopep. Por meio das análises *in-silico* e *in vitro*, espera-se que o peptídeo KD se ligue à enzima DPP-IV da proteína do feijão, fazendo com que haja inibição da glicemia em pacientes com diabetes do tipo 2. Dessa forma as análises, têm a importância de gerar resultados exploratório de fácil acesso e menor custo financeiro. Resultados e Discussão, conclusão.

**Palavras-chaves:** Diabetes Mellitus do tipo 2. Feijão Caupi. Dipeptidil peptidase-IV DPP-IV.

### ABSTRACT

Type 2 Diabetes Mellitus (DM) contributes to increased morbidity and mortality from chronic non-communicable diseases (NCDs) such as cholesterol and cardiovascular problems. In Brazil, cowpea is cultivated mainly in the semi-arid sertão of the Northeast region, and in small areas in the Amazon. The syncretins GIP and GLP-1 are part of the glucagon-like peptide family, so there is some correlation in the amino acid sequence between these peptides. These peptides bind to six specific GIP and GLP-1 receptors and are rapidly metabolized by the enzyme dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV). The objective of this study is to compare, using various *in silico* tools, the binding of the DPP-IV enzyme to peptide KD and also the bioactivity through the Biopep sites. Through *in-silico* and *in vitro* analyses, the KD peptide is expected to bind to the DPP-IV enzyme of the bean protein, causing glycemia inhibition in patients with type 2 diabetes. Therefore, the analyses are important for generating easily accessible and cost-effective exploratory results. Results and Discussion, Conclusion.

**Keywords:** Type 2 Diabetes Mellitus. Cowpea. Dipeptidyl peptidase-IV DPP-IV

<sup>1</sup>Ticianilde Alves de Sousa Santos, Formada em Licenciatura em Química no IFMA; Nutrição Universidade Guarauapes Recife; Pós Graduada em Gestão da Qualidade e Segurança Alimentar; Mestrando em Ciências da Educação da World University Ecumenical – WUE – email: ticianenutri@outlook.com

<sup>2</sup>Josefa de Souza Oliveira Caldas, Mestrando em Ciências da Educação da World University Ecumenical – WUE – email: josefaoliveiracaldas@gmail.com

<sup>3</sup>Wdaã Hércules da Silva Pereira, World University Ecumenical /WUE – email: wdaãhércules@hotmail.com

<sup>4</sup>Rosângela Gomes de Sena, Mestrando em Ciências da Educação da World University Ecumenical – WUE – email: zansags@hotmail.com

<sup>5</sup>Márcia de Oliveira Abreu - World University Ecumenical /WUE – email: marcia2015julio@gmail.com.

## 1 INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus do tipo 2 (DM) contribui para o aumento da morbidade e da mortalidade por doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) como colesterol, e problemas cardiovasculares dentre outros. A relação entre o DM e as doenças cardiovasculares leva à possibilidade do coletivo, ou seja, as duas estão associados o mesmo tipo genético e mesmos antecedentes ambientais, sendo a resistência insulínica classificada como um dos principais possíveis antecedentes (CERIELLO; MOTZ, 2004).

No Brasil, o feijão caupi é tratado principalmente no sertão semiárido da região Nordeste e em pequenas áreas na Amazônia (FROTA; MAIA, 1996). Nesse caso no Nordeste, a fabricação e a produtividade são de 429.375 toneladas e 303,5 kg.ha<sup>-1</sup>, nesta ordem. As maiores produção são os Estados do Ceará, Piauí, Bahia e Maranhão, assim como tem os maiores terrenos plantadas (IBGE, 2008). A produtividade dos grãos, secos ou verdes, é reservada prioritariamente para o consumo da população para manutenção de uma alimentação nutritiva, na forma de conserva ou desidratado (EMBRAPA, 2003).

Dessa forma a Justificativa desse trabalho de conclusão de curso, e estudar e analisar a potencialidade da atividade de inibição da enzima DPP-IV na presença de peptídeo do feijão caupi.

A aminopeptidil peptidase (DPP-IV) altera a atividade de vários peptídeos reguladores por remoção seletiva de dois aminoácidos do terminal amina. A actividade insulínica do GLP-1 em circulação é rapidamente perdida (t<sub>1/2</sub> 1-2min) pela clivagem por esta enzima (ALVES; MEDINA ; NEVES ;2007)

A enzima dipeptidil peptidase IV (DPP-IV) tem se tornado um grande alvo para o tratamento da DM2, essa enzima é responsável pela degradação do *GLP-1*, Peptídeo 1 semelhante ao glucagon. Com isso o GLP-1 deu se por seu efeito na célula  $\beta$  do pâncreas. Com isso, as incretinas são produzidas pelo trato gastrointestinal e atuam aumentando a secreção de insulina quando da ingestão de alimentos, porém sua ação é inibida em pouco tempo pela ação de enzimas como a DPP-IV ( FERREIRA V.A; CAMPOS, 2014).

Os 2 principais hormônios incretinas são polipeptídeo no qual fazem a inibição gástrica do GIP, Polipeptídeo Inibitório Gástrico e GLP-1, esse peptídeo faz parte semelhante ao glucagon de modo que, existe alguma correlação da sequencia da estrutura dos aminoácidos essenciais, dentre os peptídeos, o glucagon, além de haver entre GIP e GLP-1. 5,6 GIP é um peptídeo de 42 aminoácidos, clivado de seu peptídeo precursor, ProGIP, em contrapartida o GLP-1 é clivado

do precursor de pró-glucagon e inclui peptídeos de 30 e 31 aminoácidos. GIP e GLP-1 são secretados pelo trato gastrointestinal. Dessa forma, o GIP é absorvido pelas células K do nosso organismo, situadas especialmente no duodeno e na parte proximal do jejuno. GLP-1 é secretado pelas células L, encontradas principalmente no íleo e no cólon. Após a liberação das incretinas logo após o consumo oral de nutriente, como os carboidratos, lipídios e proteínas, as que mais estimula a secreção do hormônio GIP, são os carboidratos, especificamente (CHACRA ;ARODA; HENRY, 2006). Dessa forma, quando esses peptídeos fazem a ligação de seus seis receptores específicos de GIP e GLP-1, tem a facilidade de realizar o metabolismo da enzima dipeptidil peptidase-IV (DPP-IV) (MOLLER, 2001).

Dessa maneira, questiona-se: Qual o efeito do peptídeo KD na enzima DPP-4 e sua consequente atuação como tratamento medicamentoso para pacientes com diabetes tipo 2.

A hipótese inicial aponta para a ligação da enzima DPP-4 no peptídeo KD, atuando assim como tratamento e prevenção do diabetes tipo 2.

Desse modo, o objetivo geral deste estudo é Determinar a capacidade de inibição da enzima DPP-IV pelo peptídeo KD e sua possível bio-atividade.

Estudos recentes indicam que a proteína alimentar não tem somente a função construtora e energética, mas como também executa um papel importante na bioatividade dos precursores de peptídeos biologicamente ativos no qual desempenham papel fisiológico funcional (CORREA I.N; POLTRONIERI F; MARQUES 2016).

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 O FEIJÃO CAUPI

O feijão caupi pode restabelecer o ajustamento de alguns minerais como ferro e zinco (CRUZ, 2000), especialmente porque estes micronutrientes apontam funções primordiais por serem constituinte do sangue e de enzimas envolvidas na transferência de elétrons, além da síntese de proteína e ácidos nucleicos, do metabolismo de carboidratos, entre outros (CAIRO et al., 2002; RIOS, K.KING, SHAMES; WOODHOUSE, 2000).

Estudos bioquímicos de sementes de plantas domesticadas e a produção contínua de novas cultivares obtidas através de técnicas de melhoramento genético têm demonstrado importantes mudanças na composição química das sementes e mesmo na expressão de proteínas

envolvidas na defesa da planta (CHRISPEELS, RAIKHEL, 1991), Tornando-as aptas ao consumo humano, com sabor e condições nutricionais para uma alimentação saudável.

O feijão caupi cultivado no Brasil, principalmente no sertão semiárido da região Nordeste e em pequenas áreas da Amazônia .sendo os maiores produtores estar destacado os Estados do Ceará, Piauí, Bahia e Maranhão. No qual produção dessa leguminosa é destinada para o consumo humano de forma in natura, como também na forma em conservas ou desidratados. Com isso através das análises centesimal da farinha do feijão caupi, no qualestáem forma de matéria-prima é uma excelente fonte proteica, para o qual obteve 36,47 % de sua composição centesimal (CORREA I.N; POLTRONIERI F; MARQUES 2016).

Segundo Salgado *et al.* (2005),foi identificado que no feijão caupi pronto para consumo, tem um quantitativo de 29,3% de carboidratos totais. Já oaspecto qualitativo, constatou-se que 9,1% da fibra alimentar total, (SALGADO *et al.*, 2005).

Na cultivar BRS-Milênio encontrou-se percentual de 27,4% do total de carboidratos referente ao conteúdo de fibra alimentar total, e 14,2% sendo 14% são de fibra são representadas pelas solúveis. Sendo assim os resultados demonstra que o feijão caupi tem um alto teor de fibras, alimentares, além de aumentar a absorção de água no cólon, prevenindo a constipação, e essencial na prevenção e promoção da saúde, podendo contribuir na diminuição dos risco de doenças crônicas não transmissíveis, tais como câncer, doenças cardiovasculares e diabetes mellitus (FROTA K. M. G *et al.*, 2009,,-FAIVRE, BONITHON-KOPP, 1999; FELDHEIM; WISKER, 2000).

As condições e tratamento dos solos podem aumentar a produtividade do feijão-caupi, principalmente quando observado o clima, manejo de irrigação, tratos culturais, adubação e efeito residual do adubo , no qual observaram incremento de 25% da produtividade de vagens e 50% da produtividade de grãos, foi utilizado 100% acima do indicado das doses de nitrogênio, fósforo e potássio. Sendo observado que a produtividade de vagens foi influenciada pela de irrigação criteriosa, atingindo a máxima eficiência técnica para produtividade de 8395,5 kg ha-1 com a lâmina 87% da evapotranspiração de referência (ROCHA; *et al* 2019).

Com ciclo de vida curto a espécie do feijão estudada pode apresentar cultivares tardias e precoces, baixa exigência hídrica, rusticidade e através da simbiose com as bactérias do gênero *Rhizobium* fixam o nitrogênio do ar. Sua facilidade de desenvolvimento vegetativo permite que seja cultivada em regiões com indices pluviométricos entre 250 a 500 mm e temperaturas de 18 a 34<sup>0</sup>C em seu ciclo. A fenologia tem como função acompanhar as mudanças periódicas na aparência e constituição das plantas no ambiente, sob determinadas condições oferecidas (PINHEIRO*et al*, 2019)

## 2.2. PEPTÍDEOS BIOATIVOS

Na busca para melhorar a qualidade de vida do ser humano, foram desenvolvidos diversos estudos sobre as proteínas de origem vegetal, encontradas em leguminosas tais como tremoço, soja, lentilha e feijão caupi, com grande possibilidade reduzir riscos, no controle ou prevenção de doenças cardiovasculares, produzido seu efeito hipocolesterolêmico (BARBANA C, BOUCHER A.C, BOYE JI 2011; DURANTI M, 2006; FROTA K.M.G, SOARES, R.A.M, ARÊAS JÁ, 2008; FONTANARI G *et al* 2012).

Nos estudos foram identificado que os efeitos benéficos estão relacionados por enzimas peptídeos bioativos, resultado da hidrólise dessas proteínas, tendo uma grande importância na regulação e modulação metabólica do colesterol. Os peptídeos oferecem esses benefícios quando se relacionam com a modulação, inibição ou regulação de alguns genes de transportadores ou enzimas relacionados à inibição da síntese endógena e absorção intestinal do colesterol (MACARULLA, *et al.*, 2001 ; MARCHESI, *et al.*, 2008).

Os Peptídeos bioativos são capazes de ser desenvolvida a partir da proteína precursora por enzimas digestivas durante a ingestão, processamentos maturação fermentação, cozimento, armazenamento ou hidrólise *in vitro* por enzimas proteolíticas. Como os Peptídeos bioativos são sequências pequenas de proteínas alimentares, compostas principalmente de 2-20 resíduos de aminoácidos, no qual tem efeitos fisiológicos positivos na saúde dos seres humanos. Os peptídeos bioativos contribui para uma variedade de alvos, dentre eles estão destacados os sistemas imunológicos, cardiovasculares, digestivos e endócrinos no corpo humano (SILVA, 2020).

As leguminosas são produzidas consumidas pelo homem, em muitos países há milhares de anos, mas a descoberta das qualidades benéficas das enzimas somente foram identificadas em estudos de – 20 a 30 anos atrás – esse interesse em estudos acadêmicos e de pesquisas como um alimento com efeitos funcionais data de 20 anos atrás. Atualmente foi reconhecido que a proteína alimentar não só possui uma grande função construtora com também energética, devendo produzir uma estrutura bioativa e/ou com possibilidade ser o futuro, para o desenvolvimento de peptídeos biologicamente ativos, que desempenham na estrutura fisiológica funcional (DURANTI, 2001), considerando que a idéia principal é saber se um peptídeo tem efeito de melhorar a qualidade de vida da humanidade, quer na parte alimentar, energética e principalmente na preventiva contra doenças crônicas.

Em relação ao valor alimentar, a composição centesimal, expressa em porcentagem de peso seco, mostrou que as sementes de feijão-caupi possuem, em média, 22,01% de proteína, 60,57% de carboidratos, 2,75% de lipídios, 2,07% de cinzas e 12,41% de umidade. Mostrou

também que as sementes de feijão-caupi têm os oito aminoácidos essenciais, Treonina (1,24 mg/kg), Valina (1,22 mg/kg), Leucina (1,42 mg/kg), Isoleucina (1,37 mg/kg), Metionina (1,15 mg/kg), Fenilalanina (1,75 mg/kg), Lisina (1,58 mg/kg), Triptofano (0,17 mg/kg) (ARAÚJO, COSTA, 1997).

Durante os estudos foi observado como as proteínas e os peptídeos apresentam ampla diversidade química e funcional. Contudo, são moléculas pequenas, apresentando de dois a dezenas de resíduos de aminoácidos. Os peptídeos ativos foram descobertos e tiveram suas estruturas químicas determinadas a partir da década de 1950. Desde então, com o conhecimento sobre essas moléculas, foram sendo desenvolvidas técnicas para o seu isolamento, análise, purificação, identificação e quantificação, as quais foram sendo aprimoradas. Com isto, surgiu a necessidade de sintetizar essas moléculas e análogos destas, em diferentes escalas, permitindo a realização de estudos sobre o papel biológico dos peptídeos naturais. Em conjunto, também foram sendo desenvolvidas técnicas para a manipulação, síntese e clonagem de genes que expressassem essas proteínas/peptídeos (MACHADO *et al.*, 2004).

Diversas estratégias têm sido aplicadas visando o melhoramento na produção e para a redução do metabolismo de peptídeos, juntamente com as vias de administração, levando ao aumento da comercialização dessas drogas. Os peptídeos terapêuticos podem ser obtidos a partir de diferentes fontes, tais como extração de fontes naturais; síntese em animais ou plantas transgênicas; síntese em solução ou clássica; síntese em fase sólida; síntese enzimática; síntese pela tecnologia do DNA recombinante (SOUZA, 2017).

### 2.3.O METABOLISMO DA DPP-IV E SEU PAPEL DA DIABETES TIPO 2

Está sendo considerado como a epidemia do nosso século o diabetes, pois em 2010 cerca de 285 milhões de indivíduos em todo o mundo apresentavam a doença e a estimativa é que até 2030, o número de pessoas com diabetes chegue a 435 milhões. Tendo em vista a relação à tolerância a glicose reduzida característica de quadro pré-diabético os números em 2010 chegaram a 344 milhões, sendo que se espera a marca de 472 milhões de casos diagnosticados em Um dos alvos biológicos envolvidos no estudo do diabetes é a enzima dipeptidil peptidase-4 (DPP-4), Os inibidores de DPP-4 devem diminuir ou potenciar os efeitos dos peptídeos utilizados em diversas patologias como lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatóide, depressão, esquizofrenia, anorexia nervosa, fibromialgia, síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e até rejeição de enxertos de acordo com o contexto do distúrbio e sua fase de evolução, pois esta enzima possui vários substratos localizados em diversos locais

biológicos, atuando na regulação do metabolismo de hormônios peptídicos, também na resposta imunológica do organismo humano(PANTALEÃO, 2014).

Durante o desenvolvimento dos estudos criou-se uma base teórica dos Inibidores da DPP-4 no controle do diabetes tipo 2, quando foi observado que as incretinas produziam ações fisiológicas benéficas durante a atividade de controle glicêmico, com grande potencial no tratamento do tipo 2 (NAUCK *et al.*, 2004), pois é uma doença crônica existente no mundo. Foram identificados que as incretinas são hormônios sintetizados no trato gastrointestinal e secretados mediante a entrada de nutrientes no intestino (DOYLE, EGAN 2007;JANG *et al.*,2007), tendo um importante papel na homeostase da glicose sanguínea por estimular a secreção de insulina de maneira glicose-dependente (DRUCKER , NAUCK 2006, ;VILSBØLL, HOLST, 2004;). O hormônio incretina predominante é o peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1), e estudos demonstraram que o GLP-1 foi capaz de melhorar a homeostase da glicose, incluindo a potencialização da secreção de insulina de maneira glicose-dependente e a inibição da secreção de glucagon (DOYLE ;EGAN, 2007).

O primeiro hormônio GIP incretina foi descrito, é um único peptídeo com 42 aminoácidos. Circula em baixos níveis no sangue, mas em resposta à ingestão de glicose ou gordura, os níveis aumentam consideravelmente, estimulando a produção de insulina endógena. Paralelamente o GIP também exerce influência sobre o metabolismo da gordura nos adipócitos, estimulando a atividade de lipase de lipoproteínas, estimulando a proliferação das células beta. A sitagliptina sendo o primeiro inibidor de DPP-4 utilizado na prática clínica, licenciado em 2006, é bastante seletivo para a enzima DPP-4 atingindo a concentração plasmática estável após três dias de aplicação. Os níveis máximos no plasma são alcançados entre uma e duas horas após ingestão do comprimido, com tempo de meia vida de 8 a 14h, sua biodisponibilidade é de 85%( FERREIRA V.A; CAMPOS, 2014).

De acordo com estas informações projetou-se, utilizar o GLP-1, de forma inicial como medida terapêutica no diabetes tipo 2, durante o processo, estudos informaram que a secreção deste hormônio no estado de diabetes fica ausente ou mesmo comprometida, favorecendo para a deficiência na secreção de insulina (NAUCK *et al.*, 2004). Em estudos e pesquisas posteriores admitiram então que o uso terapêutico do GLP-1 como agente antidiabético era inviável devido à sua meia-vida ser relativamente curta como resultado de sua rápida inativação pela enzima Dipeptidil Peptidase-4 (DPP-4) (DRUCKER D. J, NAUCK M.A, 2006; DEACON *et al.*, 2008). O GLP-1 é rapidamente metabolizado pela DPP-4, com uma meia-vida ativa de apenas 1 a 2 minutos (ANDUKURI *et al.*, 2009). dificultando o seu emprego no tratamento do tipo 2. Anteriormente já havia sido demonstrado em estudos que a DPP-4 é também encontrada no

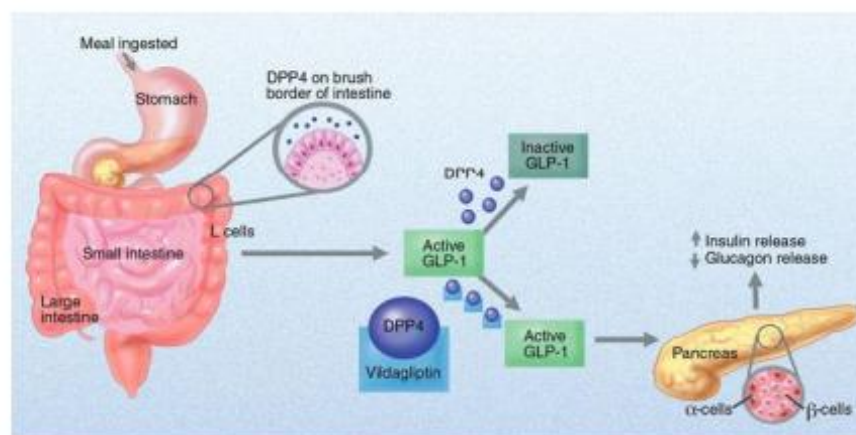
endotélio de capilares que drenam a mucosa intestinal, onde as células secretoras de GLP-1 estão situadas (GAUTIER *et al.*, 2008), o que indica que a maior parte do GLP-1 é inativado quase imediatamente após sua secreção (LOTFY; SINGH; KALÁSZ *et al.*, 2011).

Conhecida como CD26 a dipeptidil peptidase 4 (DPP4), é uma glicoproteína transmembrana que está quase totalmente presente na superfície de muitas células, incluindo células epiteliais e endoteliais de muitos tecidos e em células do sistema imunológico. Desempenhando um papel importante na regulação do sistema imunológico a DPP4, promovendo a ativação e proliferação de células T, regulando a função de outras células imunológicas e estimulando a produção de citocinas próinflamatórias. A DPP4 está presente na circulação de forma solúvel, onde mantém sua atividade enzimática. A DPP4 degrada o peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1) fisiologicamente e desempenha um papel no metabolismo da glicose. possuindo muitos outros substratos, incluindo citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento. Atuando como um ligante para proteínas de ligação e fatores extracelulares, DPP4 é uma serina protease amplamente distribuída em tecidos humanos e funciona como uma proteína multifuncional. Do trato respiratório inferior, rins, fígado, intestino delgado e próstata, DPP4, está presente na placenta, fibroblastos pulmonares e lesões na pele, músculos e sistema nervoso central (Mota *et al.*, 2022).

Sendo de um grupo de enzimas existentes na circulação e na superfície de múltiplos tecidos, como no fígado, pâncreas, baço, rins, endotélio vascular, etc, (GREEN *et al.*, 2006), sua atividade consiste em clivar cadeias peptídicas nas quais está presente a prolina ou a alanina como o segundo aminoácido a partir da extremidade N-terminal, incluindo citocinas, fatores de crescimento, neuropeptídeos e hormônios incretinas (POSPISILIK *et al.*, 2002).

Sua estrutura compreende 4 domínios: um domínio citoplasmático curto (1-6), um domínio transmembrana (TMD) (7-28), um segmento de haste flexível (29-39) e um domínio extracelular (40-766), que pode ser ainda dividido em uma região altamente glicosilada, uma região rica em cisteína e a região catalítica (ROHRBORN *et al.*, 2015), as incretinas são liberadas pelo intestino após a ingestão de alimentos e exercem uma série de efeitos fisiológicos no pâncreas que poderiam culminar com a liberação de insulina para homeostase glicêmica, caso não fossem rapidamente degradados pela ação da DPP-4. Os inibidores dessa enzima estendem à meia-vida das incretinas, prolongando assim seus efeitos fisiológicos nas células alfa e beta pancreáticas (Figura 1)

**Figura 1** Ações fisiológicas dos inibidores de DPP-4



Fonte: Banerjee *et al.*, 2009

Sendo a dipeptidil peptidase IV (DPPIV) um produto do conjunto proliloligopeptidase de serina proteases. DPPIV remove dipeptídeos do terminal N de substratos, incluindo muitas quimiocinas, neuropeptídeos e hormônios peptídicos. A inibição específica de DPPIV está sendo investigada em ensaios humanos para o tratamento de diabetes tipo 2. Os determinantes moleculares subjacentes à catálise enzimática e especificidade do substrato, relata as estruturas cristalinas de DPPIV na forma livre e em complexo com os 10 primeiros resíduos do substrato fisiológico, Neuropeptídeo. Possui uma estrutura cristalina de forma livre da enzima revela dois canais potenciais através dos quais os indicadores podem acessar o sítio ativo - a chamada abertura da hélice e a abertura lateral (AERTGEERTS *et al.*, 2004).

### 2.2.1 ANÁLISES *IN SILICO*

Com o desenvolvimento do genoma humano foi possível descobrir uma grande quantidade de dados contidos no ácido ribonucleico (RNA), sendo de grande importância o seu armazenamento e estudos constantes. Com o desenvolvimento humano no controle das tecnologias e estudos acadêmicos relacionado diretamente à biologia molecular e genoma foi necessário a criação de uma área da ciência, a bioinformática. Utilizada no uso de pesquisa com fins diagnósticos preventivos e terapêuticos caracterizando a aplicação biomédica (PROSDOCIMI F, *et al.*, 2002).

Utilizando a experimentação computacional, denominada análise *in silico*, possibilita construir e simular sistemas voltados para a predição de propriedades e comportamentos biológicos. Para funcionar corretamente, uma célula, depende de que todos os seus componentes participem de reações bioquímicas intracelulares e interajam entre si. O metabolismo celular pode ser reproduzido como uma rede formada por diferentes tipos de

interações, **tais como** exemplo: interação gene-gene, proteína-proteína, geneproteína, gene-metabólito e assim por diante . A construção de uma rede é feita a partir de complexos modelos matemáticos e computacionais que identificam e caracterizam as relações de dependência de cada gene (OLIVEIRA,2014).

Durante as pesquisas de bioinformática, identificada como análise *in silico*, facilita simular sistemas e construção químicas das enzimas, para a identificação de propriedades e comportamentos biológicos (PALSSON B, 2000).A produção de abordagens *in silico* facilita o tempo e os gastos necessários para trazer um medicamento para o mercado. Demonstrando os perfis de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) previsíveis, resultando em um processo rápido de descoberta de medicamentos. Estes parâmetros farmacocinéticos são e avaliado pelo Admet-SAR (Dias, 2014).

Nosso sistema humano para funcionar corretamente, precisa de células saudáveis, pois dependem de que todos os seus componentes participem de reações bioquímicas intracelulares e interajam entre si para produzir enzimas saudáveis, que formaram as ligações do metabolismo celular, que também podem ser reproduzido como uma rede formada por diferentes tipos de interações, como por exemplo: interação gene-gene, proteína-proteína, geneproteína, gene-metabólito e assim por diante . Produção de uma rede é feita a partir de complexos modelos matemáticos e utilizando a bioinformática para identificarem e caracterizam as relações de dependência de cada gene e/ou enzima contida na célula. (RYBARCZYK-FILHO J.L, 2011).

Sendo o estudo *in silico* um método aplicado por meio de análise de dados em uma determinada espécie ou gênero, um auxílio ao diagnóstico através da análise molecular diversos bancos de dados informatizados e programas que avaliam a toxicidade pela determinação de relação estrutura-atividade, por exemplo o QuantitationStructureActivityRelationship (QSAR), processo pelo qual o protocolo relaciona a estrutura físico-química de uma substância com sua toxicidade. Esses processos de estudos têm por objetivo principal obter metodologias rápidas, baratas, de fácil execução e reprodutibilidade que possam ser padronizadas e validadas, situação imprescindível para que os métodos *in vitro* alcancem a aceitação científica internacional (BAGLEY, et al).

Com a utilização da técnica de HQSAR (do inglês, HologramQuantitativeStructureActivityRelationships) produzindo um parametro que correlaciona o holograma molecular (fragmentos derivados da estrutura 2D e suas respectivas contribuições) com a atividade biológica, a partir da associação da distinção dos fragmentos. Com a finalidade de geração dos fragmentos moleculares, alguns parâmetros são variados ao longo das análises, tais como a distinção dos fragmentos utilizando informações sobre os

descritores: átomos (A); ligações (B); conexões (C); átomos de hidrogênio (H); quiralidade (Ch) e/ou grupos aceitadores e doadores de ligações de hidrogênio (DA); e também o tamanho do fragmento (definido em número de átomos) e o comprimento do holograma (definido em bins, em quantidade de descritores binários referente à contagem de fragmentos). Os hologramas moleculares são representações matemáticas dos fragmentos de cada composto e são relacionados com a resposta biológica a partir do emprego de técnicas de análise multivariada de dados (PANTALEÃO, 2014).

Peptídeos têm inúmeras vantagens sobre moléculas pequenas que incluem alta atividade biológica, alta especificidade, baixo custo de produção e alta penetração. No entanto, toxicidade, imunogenicidade e estabilidade continuam sendo as principais preocupações no desenvolvimento de medicamentos à base de peptídeos. A estabilidade dos peptídeos pode ser aumentada de várias maneiras, incluindo a incorporação de D-aminoácidos (tornando os peptídeos resistentes à protease), alterando a química do esqueleto, ciclização e incorporação de  $\alpha$ -aminoxiaminoácidos. Da mesma forma, existem inúmeras ferramentas *in silico*, que podem prever a imunogenicidade dos peptídeos mas dificilmente existe uma maneira/método de prever a toxicidade dos peptídeos. Métodos computacionais para prever a toxicidade de peptídeos não apenas economizam tempo e dinheiro, mas também facilitam o projeto de melhores peptídeos terapêuticos com baixa toxicidade, mantendo as funcionalidades. Os estudos *in silico* tem como vantagem a rapidez na execução, custo operacionais baixos e principalmente não necessita de animais para testes de toxicidade, para a segurança de sua utilização em humanos.

### 2.2.2 ANÁLISES *IN VITRO*

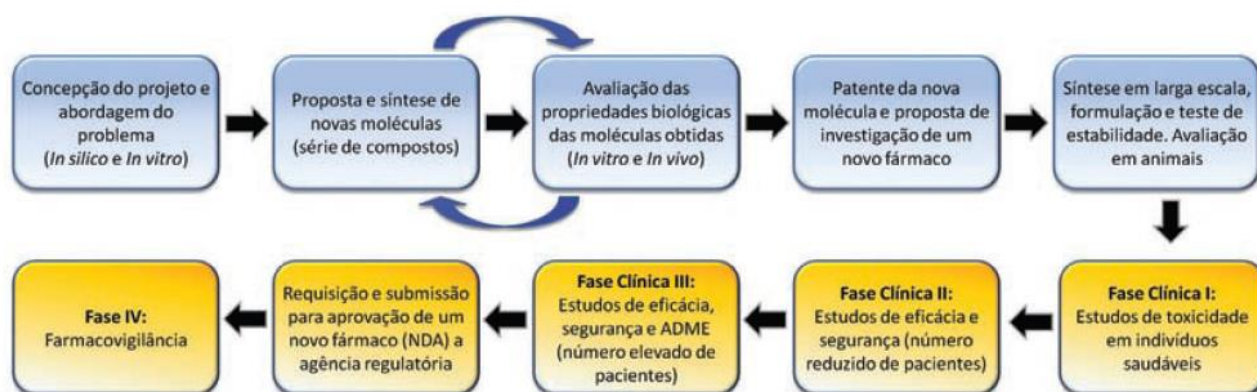
O diagnóstico *in vitro* é um dos grande processos utilizados por médicos e pesquisadores pois trata-se de um procedimento mais comuns nos estudos acadêmicos e laboratorial principalmente na área da saúde humana não ser necessário a utilização de “*in vivos*” que seria necessário a execução dos procedimentos em pessoas ou animais, uma das primeiras metodologias descritas para avaliação *in vitro* foi sugerido o teste da biocompatibilidade para avaliar plásticos empregados em artigos médico-hospitalares. No ensaio os materiais eram colocados diretamente sobre uma monocamada de células de mamífero e após 24 horas estas células eram observadas, quanto à presença ou não de algum efeito tóxico (MOSMANN, 1983).

O principal propósito era, de se encontrar um protocolo que substituísse os ensaios *in vivo* vários outros modelos foram desenvolvidos, dentre eles os chamados organotípicos, os quais empregam órgãos isolados do animal, mantidos por curto período de tempo *in vitro* preservando suas funções fisiológicas e bioquímicas. Com foco de encontrar um protocolo que substituísse os ensaios *in vivo* vários outros modelos foram desenvolvidos, dentre eles os chamados organotípicos, os quais empregam órgãos isolados do animal, mantidos por curto

período de tempo *in vitro* preservando suas funções fisiológicas e bioquímicas. A importância da validação, pré-validação, do conceito três Rs (3 Rs), redução, refinamento e substituição, na regulamentação dos testes toxicológicos “*in vitro*”. A validação deve ser vista como uma etapa essencial no desenvolvimento do teste e sua aceitação não deve ser observada como obstáculo, mas sim uma grande processo para acelerar o uso dos testes *in vitro* na avaliação de risco dos produtos de uso humano ou que possam causar danos no meio ambiente (CRUZ *et al*, 2004).

É fundamental a validação do alvo molecular selecionado por uma série de razões que envolvem desde o estabelecimento de sua relevância no processo fisiopatológico em estudo até a caracterização do impacto de sua modulação seletiva no tratamento ou na cura de doenças ou disfunções em humanos. As moléculas bioativas (ou ligantes, do inglês *hits*) podem ser identificadas a partir de triagens reais (por exemplo, biológicas, bioquímicas) ou virtuais (por exemplo, computacionais) de produtos naturais, compostos sintéticos ou coleções combinatórias, e também mediante planejamento racional. Lembrando contudo que, em todos os casos, as propriedades biológicas devem ser determinadas experimentalmente, sendo necessário o desenvolvimento de ensaios padronizados e validados com alta qualidade, a figura 2 demonstra as etapas envolvidas no processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos (ADME – absorção, distribuição, metabolismo e excreção; NDA – solicitação para um novo fármaco, do inglês *new drug application*) (GUIDO; ANDRICOPULO ; OLIVA, 2010).

**Figura 2:** Etapas envolvidas no processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos (ADME – absorção, distribuição, metabolismo e excreção; NDA – solicitação para um novo fármaco, do inglês *new drug application*).



Fonte: (GUIDO; ANDRICOPULO ; OLIVA,2010)

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

O universo da Ciência é compreendido como um conjunto de substância que tratam do levantamento, estabelecido pela organização do conhecimento científico. Isto pode envolver desde questões internas, tais como método científico e relação entre procedimento experimental e teoria, até outras externas, como a influência de elementos sociais, culturais, religiosos e políticos na aceitação ou rejeição de idéias científicas (MOURA, 2014).

De acordo com as autoras Lakatose Marconi (2003), pesquisar é entendido como “averiguar algo de forma minuciosa, é investigar”. As autoras relatam que o significado do termo investigação “não é homogênea, pois há muitas definições sobre o termo nos diferentes campos de entendimento. No entanto, o ponto de partida da pesquisa reside no problema que deverá se definir, avaliar, analisar uma solução para depois ser tentada uma solução” (LAKATOS; MARCONI, 2003).

O método científico baseia-se em um grupo de etapas ordenadamente dispostas a serem executadas que tenham por objetivo a investigação de fenômenos para a obtenção de aprimorar as aprendizagem (JUNG, 2009).

Nessa pesquisa exploratório tem por objetivo aperfeiçoar hipóteses, autenticar instrumentos e possibilitar familiaridade com o campo de estudo. Estabelece a primeira fase de um estudo mais amplo, no qual é bastante utilizada em pesquisas cujo tema foi pouco explorado, sendo capaz de ser aplicada em estudos iniciais para se obter uma visão geral em relação a um determinado fato (GIL, 2002).

Trata-se de pesquisa básica, de caráter *in silico*, e *in vitro* de abordagem exploratória, sendo, do ponto de vista dos procedimentos técnicos, científico, utilizando como instrumentos para coleta de dados, uma revisão de literatura em bancos de dados de periódicos científicos na língua portuguesa e inglesa, desenvolvida a partir de material já elaborado, constituído em livros e artigos, para análises *in silico* e descartando artigos voltados para animais e *in vitro*, focando apenas em humanos adultos. Os artigos pesquisados sobre a temática foram acessados nas bases de dados da Scielo, dissertações de mestrado e doutorado, PubMed, no qual compreendem publicações entre os anos de 2000 a 2019.

#### 3.1. MODELAGEM MOLECULAR DO TIPO “DOCKING”

Para a realização dos testes, foi utilizado as ferramentas digitais PepCalc, PepDraw e Pepsite2 que são encontradas em website de fácil acesso e gratuito.

Na ferramenta PepCalc, encontrada no site pepcalc.com, primeiramente digitou-se no quadro informado como sequência o código em letra, KD, em seguida clicando-se no quadro amarelo (calcular), assim, foi obtido suas propriedades físico-químicas. Para melhor entendimento, é possível realizar a tradução da página, que originalmente se abre em idioma inglês, para o português pela própria ferramenta do Google (INNOVAGEN, 2015)

No PepDraw, encontrado no site pepdraw.com, de início colocou-se a sequência KD no quadro exigido, e clicar em seguida no quadro identificado como: desenhar peptídeo. Obtendo-se por fim, o resultado de sua estrutura da forma molecular e suas propriedades peptídicas. Traduzindo-se a página para o português, para melhor entendimento (THOMAS, 2015)

O HPEPDOCK, disponível no site huanglab.phys.hust.edu, de início para fazer análise foi preciso digitar o código 1R9M, que é uma estrutura Cristal da Dipeptidil Peptidase IV Humana, sendo seu Formato FASTA, que encontra-se na plataforma RCSBPDB, que é um Banco de dados de Proteínas em que fornece informações sobre as formas 3D de proteínas, ácidos nucleicos e montagens complexas. Feito isso, deve copiar o código e colocar na área “Entrada do receptor” que fica na parte inicial da ferramenta HPEPDOCK, logo após colocou-se a sequência KD na parte de “Entrada de peptídeo” e para finalizar o teste clicou-se no botão “Enviar” e dentro de alguns segundos os resultados foram exibidos. Sendo assim com o estudo *in silico* o intuito e prever a ligação de uma determinada estrutura proteica (ZHOU, 2018).

No site Pepsite2, inicialmente para fazer análise foi necessário digitar o código 1R9M após iremos digitar a sequência KD, para ser obtido a visualização interativa onde mostrou a estrutura da proteína e um ponto de ligação de peptídeo previsto. Logo depois selecionamos no PDB1R9M, para se obter a Estrutura Cristal da Dipeptidil Peptidase IV Humana (AERTGEERTS, *et al*, 2004)

Para identificar a toxicidade do peptídeo KD utilizou-se a ferramenta TOXINPRED disponível em: (<https://webs.iiitd.edu.in/raghava/toxinpred/index.html>). onde obtemos a Toxicidade e hidrofobia do peptídeo KD, para verificar se não é tóxico para humanos.

Para utilizar o software PyMol, Primeiramente vai no menu PDB e seleciona o código 1R9M da enzima DPP-IV, ir na opção FASTA e copiar o código e adicionar na ferramenta HPEPDOCK, os resultados vão chegar no E-mail em 24 horas, após para deve baixar em PDF os resultados, e selecionar a 1 classificação de encaixe - 72,967, após copiar abrir a plataforma do PyMol, e selecionar o peptídeo, KD, logo após seleciona a enzima 1R9M, essa ferramenta nos permite obter, o sitio de ligação como também a análise de interações ligante-alvo

molecular, e a distância entre os átomos, da enzima DPP-IV e o peptídeo ácido aspártico e a lisina, entretanto não consegue fazer as ligações hidrofóbicas e metálicas.

Quando o objetivo biológico selecionado (por exemplo, proteína, DNA ou RNA) pode ter a sua estrutura tridimensional (3D) conhecida ou não, fato que determina a priorização de estratégias de planejamento. Os grandes avanços da genômica e proteômica, aliados à evolução das técnicas de cristalografia de raios-X e ressonância magnética nuclear (RMN) proporcionam um aumento significativo no número de alvos moleculares com estruturas 3D disponíveis no Banco de Dados de Proteínas (PDB, do inglês Protein Data Bank). O auxílio de métodos de química medicinal, é possível explorar o imenso espaço químico delineando o trabalho de identificação, seleção e otimização de moléculas capazes de interagir com alta afinidade e seletividade com o alvo molecular selecionado (por exemplo, enzima, receptor), o qual representa o espaço biológico. Diversas estratégias podem ser utilizadas para a investigação do espaço químico-biológico como: a organização de bases de dados, a aplicação de filtros moleculares, o emprego de triagens biológicas automatizadas em alta escala (HTS, do inglês *high-throughput screening*) e o uso da triagem virtual (VS, do inglês *virtual screening*) (GUIDO; ANDRICOPULO ; OLIVA, 2010).

Utilizando método de predição de afinidade de ligação (AutoDock 4.0) ao processo de se posicionar o ligante em várias informações no sítio ativo do receptor e, usualmente, em diferentes conformações, com o intuito de se obter a melhor interação, identificados pela designação em inglês docking, que pode-se traduzir como “docagem” ou “ancoragem”. Este procedimento permite o estabelecimento de uma classificação entre os compostos de maior e de menor afinidade a um determinado receptor, possuindo vários outros programas de docking, dentre eles o DOCK, AutoDock, GOLD, FlexX , que realizam esta ordenação de forma automática. A simulação **tem** dois procedimentos: a busca conformacional por diferentes modos de ligação do ligante no sítio ativo do receptor, e a avaliação da afinidade de cada um deste modos de ligação usando uma função de scoring. No presente trabalho, utilizamos o programa PyMol, o site Pepsite2, HPEPDOCK, dentre outros, que é amplamente utilizado em estudos de ancoragem de pequenas moléculas em macromoléculas protéicas, além de ser gratuito. (ALENCAR,2010).

### 3.2. AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA ENZIMA DPP-IV *in vitro*

O Fabricante do Kit da DPP-IV foi o Enzo Life Sciences. O DPPIV Drug Discovery Kit é um sistema de ensaio completo projetado para rastrear inibidores de DPPIV, fornecendo material suficiente para realizar pelo menos 96 ensaios. DPPIV (DPP4, CD26) é um membro

da classe de proteases conhecidas como prolil peptidases, que clivam proteínas após resíduos de prolina e acredita-se que desempenhe papéis no diabetes, câncer e doenças autoimunes, tornando-se um alvo para a descoberta de drogas. O kit contém um substrato cromogênico (H-Gly-Pro-pNA;  $K_m = 114 \mu\text{M}$ ) e um substrato fluorogênico (H-Gly-Pro-AMC;  $K_m = 50 \mu\text{M}$ ). A clivagem da p-nitroanilina (pNA) do substrato colorimétrico aumenta a absorvância a 405 nm. O ensaio fluorimétrico é baseado na clivagem da porção 7-amino-4-metilcumarina (AMC) do terminal C do substrato peptídico, o que aumenta sua intensidade de fluorescência em 460 nm. Nome alternativo: CD26, Dipeptidil Peptidase IV, DPP4. Aplicações: detecção colorimétrica, detecção fluorescente, ensaio de atividade HTS.

Na análise *in vitro*, foi determinado a quantidade de da enzima, substrato e peptídeo, onde foi realizado os cálculos, para a concentração de cada substancia. Primeiramente foi descongelado e montado em em gelo; Após foi diluído o inibidor de 1/10, 3,5ml inibidor /31,5ml Tampão ;

Em seguida foi diluído substrato (Gly – do/pna) – 1/50, 37ml substrato com 1813ul Tampão, com um Volume final de 100ml;

Após foi diluído a enzima DPP-IV numvol (35ml) 0,867 mL, no qual foi Centrifugado antes, com uma solução Estoque de 9,97ul DPP-IV mais 490,03ul de Tampão, Foi mantida na forma diluída ou concentrada, por vários horas no gelo. Pois , a enzima DPPIV é estável por pelo menos 5 congelamento / descongelamento ciclos, para minimizar o número de ciclos de congelamento / descongelamento, alíquota do DPPIV em tubos, foi separados e armazenar a - 80 ° C. Não foi adicionado a enzima DPP-IV nos brancos, somente no controle/inibidor/amostras.

Dessa forma foi adicionado 0,26ml por pocinho de DPP-IV, com 10mL de inibidor (diluído), e Incubado por 10min a temperatura ambiente;

Após o Início da análise foi adicionado 50 mLdo substrato diluído (Gly – do/pna) 37°C;

Logo em após foi observado a leitura de 2 em 2 minuto para um total de 10 minutos;

Em seguida foi realizado o procedimento experimental, utilizando uma análise através da técnica de espectrofotômetro, com isso foi determinado a atividade da DPP-VI como também o tempo de inibição do peptídeo KD apos a adição do tampão, enzima DPP-VI e o substrato.

Ao final do procedimento, foi anotado todos os resultados experimentais.

Para determinar o percentual parcial e final da Atividade DPP-IV, foi utilizado uma formula matemática, % Atividade DPP-IV- Na presença do inibidor = ( Amostra/ Controle) x 100.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 MODELAGEM MOLECULAR *in silico*

Nos estudos realizados os peptídeos e as proteínas terapêuticos apresentam especificidade e eficácia elevadas em baixas concentrações, neste momento tornam se indispensáveis no tratamento de diversas doenças . Os peptídeos, em comparação com as proteínas tem grande vantagem por serem pequenos, demonstram maior capacidade de penetrar mais profundamente o tecido alvo. também os peptídeos com atividade terapêutica apresentam a vantagem de serem menos imunogênicos e mais econômicos para serem fabricados segundo os parâmetros de qualidade exigidos, relacionados às proteínas e anticorpos (SOUZA, 2017).

Com a descoberta de moléculas bioativas, a química medicinal também incorpora os estudos do metabolismo e das relações entre a estrutura química e atividade, ficando claro o estabelecimento de interfaces fundamentais entre as ciências químicas, biológicas, farmacêuticas, médicas, físicas e computacionais. Para os estudos dos processos evolutivos de reconhecimento molecular em sistemas biológicos assumem grande importância, além constituem as bases fundamentais para o entendimento de propriedades como potência, afinidade e seletividade (GUIDO; ANDRICOPULO ; OLIVA, 2010).

Nesse estudo *in silico* vamos trabalhar com o peptídeo, no qual é constituído por dois resíduos sendo eles: Lisina (Lys-1 K) e Acido aspártico (Asp-2 D). Apresentando um pH levemente ácido. Apresenta uma boa solubilidade em água, favorecendo com esse resultado uma boa expectativa de reações, proporcionando uma fácil interação com o ambiente do sistema digestório.

Na ferramenta Pepcalc INOVAGEN foi possível ter os dados das propriedades físico-química do Peptídeo KD. Informações como Peso molecular, Coeficiente de extinção, ponto isoelétrico, Carga líquida em pH 7, Solubilidade estimada, dados esses mostrados na tabela 1.

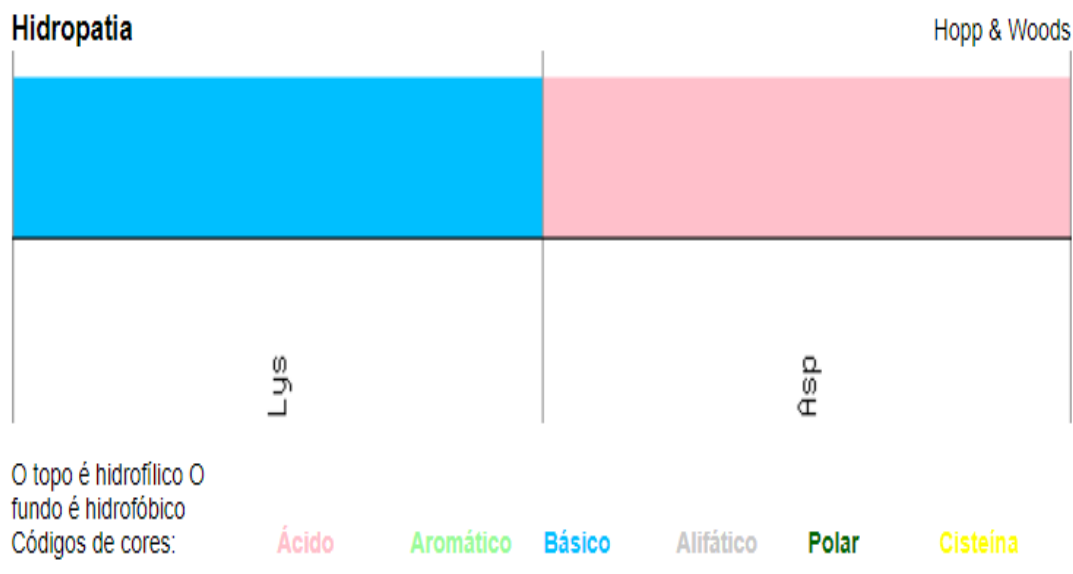
Tabela 1: Propriedades físico-químicas do peptídeo KD

Propriedades físico-químicas	
Número de resíduos:	2
Peso molecular:	261,28 g / mol
Coeficiente de extinção:	0 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>
Ponto isoelétrico:	pH 6,43

<b>Carga líquida em pH 7:</b>	0
<b>Solubilidade estimada:</b>	Boa solubilidade em água.

Fonte:Próprio Autor

Imagem 1: Hidropata do peptídeo KD



Fonte: PepCalc.com

Com o PepDraw foi possível visualizar a estrutura do peptídeo KD, ilustrado as suas propriedades peptídicas mostradas na tabela 2.

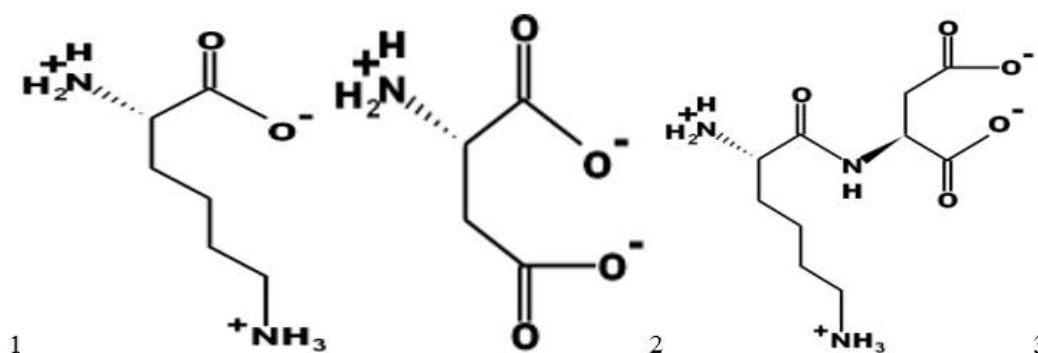
Tabela 2:Propriedades peptídicas do peptídeo KD

<b>Propriedades peptídicas</b>	
<b>Sequência</b>	KD
<b>Comprimento</b>	2
<b>Massa</b>	261,1321
<b>Ponto Isoelétrico (pI)</b>	6,44
<b>Carga líquida</b>	0
<b>Hidrofobicidade</b>	+14,34 Kcal * mol <sup>-1</sup>
<b>Coefficiente de extinção 1</b>	0 M <sup>-1</sup> * cm <sup>-1</sup>
<b>Coefficiente de extinção 2</b>	0 M <sup>-1</sup> * cm <sup>-1</sup>

Fonte: Próprio Autor

No PepDraw, também pode se observar o desenho linear do peptídeo e reação de condensação entre o grupo  $\alpha$ -amino de um resíduo de aminoácido com o grupo  $\alpha$ -carboxila de outro resíduo de aminoácido, e com isso tem a formação da nova ligação peptídica KD (Imagem 2).

Imagem 2: 1. Peptídeo Lys-1 (K) ; 2:Peptídeo Asp-2 (D) ; 3 Peptídeo KD

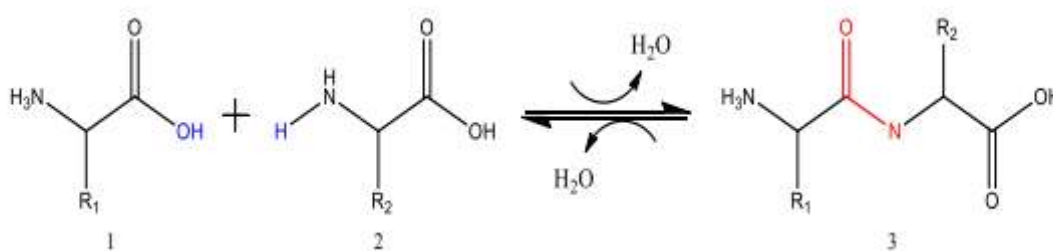


1. Formula Molecular:  $C_6H_{14}N_2O_2$ , 2. Formula Molecular:  $C_4H_7NO_4$ , 3. Formula Molecular:  $C_{10}H_{21}N_3O_6$

Fonte: <https://www.pepdraw.com>

Segundo os autores Nelson; Cox, 2008., os peptídeos são biomoléculas formadas pela união de dois ou mais aminoácido. O termo “resíduo de aminoácido” ou apenas “resíduo” é utilizado para indicar que os aminoácidos estão unidos pela ligação peptídica . A ligação peptídica é formada por uma reação de condensação entre o grupamento  $\alpha$ -carboxila (1) de aminoácido com o grupamento  $\alpha$ -amino (2) de outro aminoácido por uma ligação covalente que forma uma ligação amida substituída Figura 2.

Figura 3:Ligação Peptídica

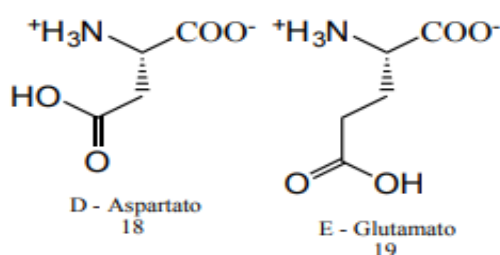


NELSON; COX, 2008

Na Figura 3,4 - Formação de um peptídeo pela junção de dois resíduos de aminoácidos. Representa a reação de condensação entre o grupo  $\alpha$ -amino de um resíduo de aminoácido com o grupo  $\alpha$ carboxila de outro resíduo de aminoácido

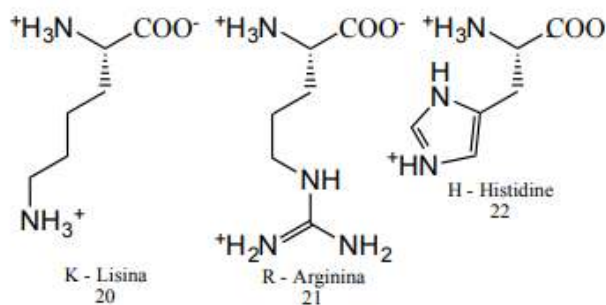
Com isso os aminoácidos essenciais são classificados em 5 grupos de acordo com o radical da cadeia lateral (R) do carbono  $\alpha$ , os alifáticos não polares, os aromáticos, os não carregados polares, os carregados positivamente e os carregados negativamente (NELSON ; COX, 2008).

Figura 4:Grupo R Carregados Negativamente



NELSON; COX, 2008

Figura 5:Grupo R Carregados Positivamente



NELSON; COX, 2008

Algumas sequências peptídicas desempenham ações importantes nos sistemas biológicos e são comumente utilizadas como fármacos importantes (Figura 5) (NELSON ; COX, 2008).

Tabela 3:Algumas das principais seqüências peptídicas e suas aplicações nos sistemas biológicos

Nome	Seqüência	Função
Angiotensina II	N-R-V-Y-I-H-P-F	Hormônio hipertensor.
$\alpha$ -Conotoxina lml	ciclo(2-8,3-14)G-C-C-S-N-P-R- C-A-TW-R-C-NH <sub>2</sub>	Bloqueador do receptor nicotínico de acetilcolina no sistema nervoso central.
Oxitocina	ciclo(1-6)C-Y-I-G-N-C-P-L-G	Estimula contrações uterinas e o processo de lactação.
Encefalinas	T-G-G-F-M T-G-G-G-L	Indução de analgesia em células do cérebro.
Grelina	G-S-S-F-L-S-P-E-H-Q-R-V-Q-Q- R-K-Q-S-K-K-Q-Q-P-P-A-L-K-E- P-R	Hormônio gastrointestinal estimulador da liberação do hormônio de crescimento e relacionado ao controle da ingestão de alimentos.
Vasopressina*	ciclo(1-6)C-Y-I-G-N-C-P-R-G	Ação anti-diurética.
Insulina	G-I-V-E-Q-C-C-T-S-I-C-S-L-Y-Q- L-E-N-I-C-N	Controle da glicose
Glucagon	H-S-Q-G-T-F-T-S-D-I-S-K-Y-L-D- S-R-R-A-Q-D-F-V-Q-W-L-M-N-T	

Fonte:NELSON; COX, 2008

Existem três análogos da vasopressina. A arginina-vasopressina (AVP) é encontrada em humanos, a lisina-vasopressina (LVP) é encontrada em hipopótamos e a fenilpressina (FVP) é encontrada em araras australianas e todas desempenham a mesma função.

O ToxinPred apresentou propriedades físico-químicas do peptídeo KD, e também previu a toxicidade e escore SVM (Máquina de Vetores de Suporte), mostrado na tabela 3.

Tabela 4:Toxicidade e hidrofobia do peptídeo KD

Toxicidade	SVM score	Hidrofobicidade	Hidropatia	Hidrofobicidade
Não tóxico	- 0,80	- 0,91	-3,70	3,00

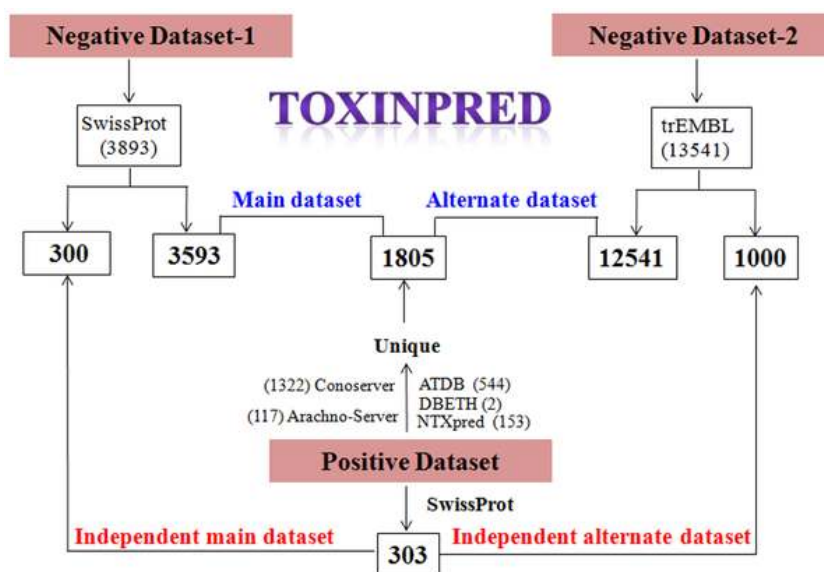
Próprio Autor

A **introdução** de um novo medicamento no mercado pode ser demorada e dispendiosa até que se prove sua eficácia e segurança. **Sendo o** desenvolvimento de abordagens in silico **facilita** o tempo e os gastos necessários para trazer um medicamento para o mercado. Tornando os perfis de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) Absorção,

distribuição, metabolização e excreção, previsíveis, obtido em um processo rápido de descoberta de medicamentos. Todos os experimentos toxicológicos têm por objetivo pré-dizer os níveis de ingestão das substâncias e os possíveis efeitos colaterais, que podem desenvolver no homem após sua administração. Por este motivo, que tais estudos são indispensáveis nos processos investigativos. A citotoxicidade em eritrócitos é um dos modelos experimentais da toxicidade *in vitro* usado como método de triagem (screening) para toxicidade de substâncias, permitindo estimar o nível de dano que pode ser induzido *in vivo* (DIAS, 2014).

Para treinamento o conjunto principal de dados usado e teste de modelos SVM foi gerado a partir de peptídeos tóxicos validados experimentalmente (obtidos de vários bancos de dados) e peptídeos/proteínas não-toxinas bem anotados obtidos do SwissProt. Inclui 1805 péptidos tóxicos como exemplos positivos e 3593 péptidos não tóxicos como exemplos negativos. Por este motivo também geramos um conjunto de dados alternativo, igual ao conjunto de dados principal, exceto exemplos negativos. Consiste em 1805 peptídeos/proteínas tóxicos como exemplos positivos e 12541 peptídeos/proteínas não-toxinas obtidos de TrEMBL (em vez de SwissProt). Os peptídeos/proteínas tóxicos e não tóxicos acima foram utilizados para produzir vários conjuntos de dados para treinamento, teste e avaliação de nossos modelos desenvolvidos para prever a toxicidade de peptídeos, ilustrado na Figura 6. (KAPOOR *et al*, 2013).

Figura 6: para prever a toxicidade de peptídeos



Fonte : KAPOOR *et al*, 2013

O resultado do HPEPDOCK é apresentado os 10 melhores modelos em ordem de pontuação decrescente, pontuação essa mostrada na tabela 4.

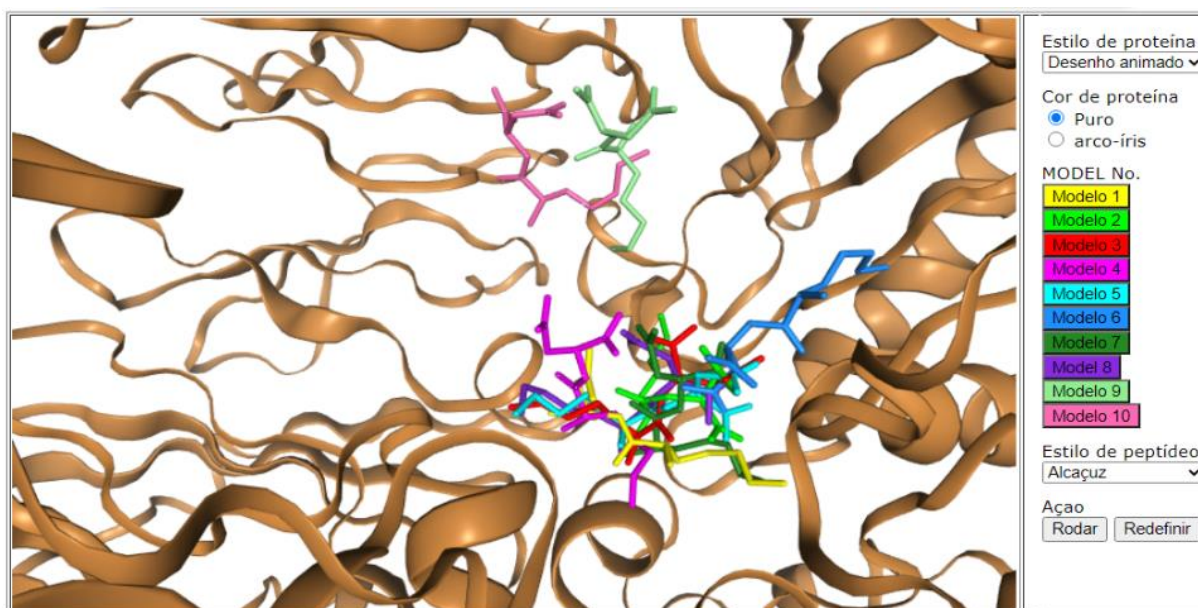
Tabela 5: Classificação por energia de acoplamento entre KD e DPP-IV.

Classificação	Pontuação de encaixe
1	- 72,967
2	- 65,015
3	- 63,229
4	- 63,069
5	- 62,194
6	- 61,876
7	- 61,733
8	- 61,278
9	- 60,514
10	- 59,942

Próprio Autor

Nas imagens é possível visualizar as 10 posições que o peptídeo KD pode se ligar com a DPP-IV, sendo cada cor representando uma posição de ligamento Figura 5.

Figura 7 :10 posições que o peptídeo KD



Fonte: HPEPDOCK

Os resultados do Pepsite2 foram possíveis prever a ligação do peptídeo KD na superfície da proteína DPP-IV. O site apresenta as nove melhores posições em que o peptídeo pode ligar na proteína DPP-IV. Mostrada na Tabela 6.

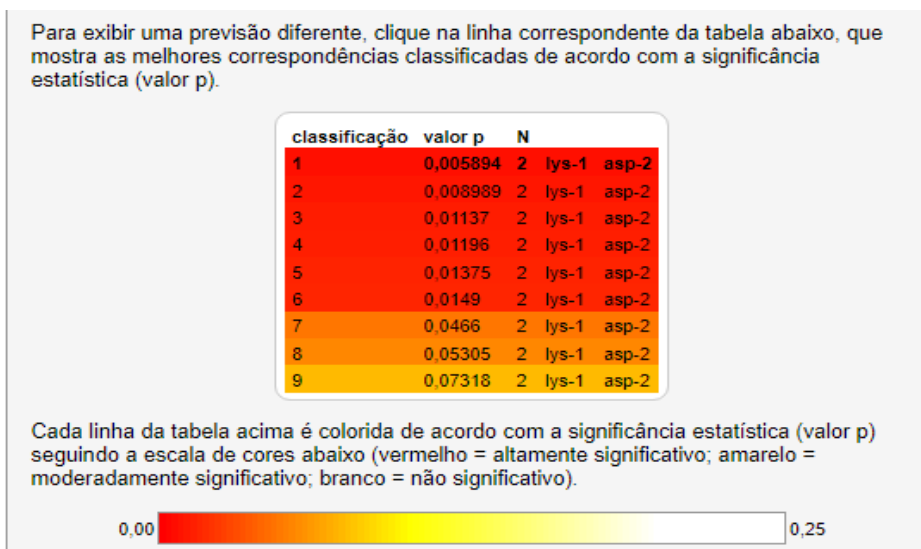
Tabela 6: Resultados das 6 melhores correspondências classificadas de acordo com a significância estatística (valor p).

<b>Classificação sequência KD</b>	<b>Aminoácidos ativos</b>	<b>P*</b>	<b>Aminoácidos potencialmente ligados na enzima DPP-4 (PDB: 1R9M)</b>
1°	Lys-1, Asp-2	0,005894	TRP627, TRP629, TYR752
2°	Lys-1, Asp-2	0,008989	TRP627, TRP629, TYR752
3°	Lys-1, Asp-2	0,01137	ARG125, GLU205, GLU206, TYR547, TYR666
4°	Lys-1, Asp-2	0,01196	TYR547, SER630, TYR631, TYR662, TYR666
5°	Lys-1, Asp-2	0,01375	TRP627, TRP629, GLY741, ALA743, TYR752
6°	Lys-1, Asp-2	0,0149	TYR48, TRP627, TRP629, HIS748, TYR752

Fonte: Pepsite2

Na imagem 8, é possível ver os resultados obtidos no pepsite2, a classificação de acordo com a significância 1 a 9, cada posição é colorida de acordo com a significância, o site classifica como vermelha: Altamente significativa; Amarelo: moderadamente significativo; Branco: não significativo.

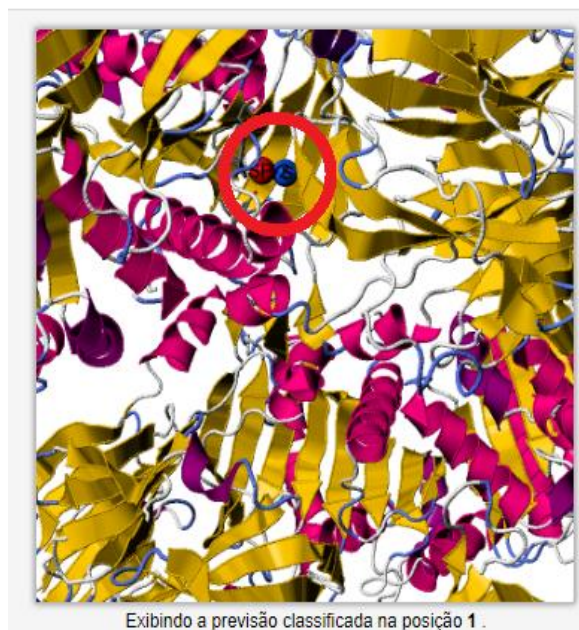
Figura 8:Classificação de acordo com a significância 1 a 9



Fonte: Próprio Autor

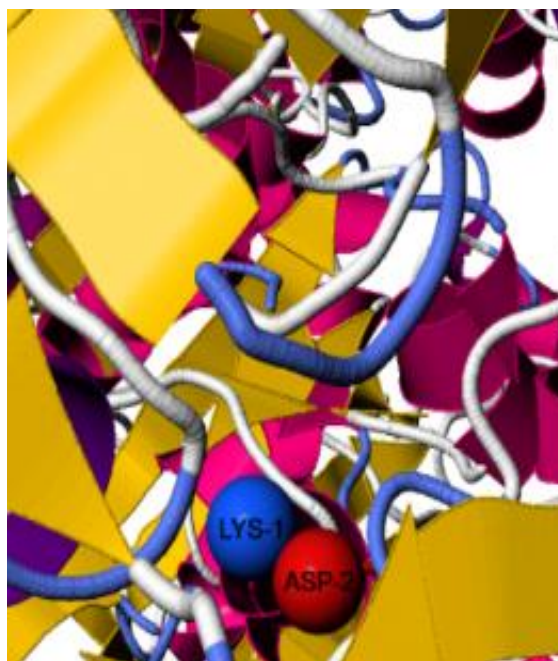
Com o pepste2 é possível visualizar a Previsão da ligação do peptídeo KD na superfície da proteína de PDB 1r9m, cadeia (dipeptidil peptidase), A visualização interativa abaixo mostra a estrutura da proteína e um ponto de ligação de peptídeo previsto.mostra a estrutura em 3D da posição de 1 a 9 onde o peptídeo se liga na proteína DPP-IV , (Figura 7,8).

**Figura 9:**Exibindo a previsão classificada na posição 1



Fonte: Próprio Autor

**Figura 10:**Exibindo a previsão 3D da classificada na posição 1



Fonte: Próprio Autor

Na plataforma do PyMol, essa ferramenta do nos permitiu obter, o sitio de ligação como também a análise de interações ligante-alvo molecular, e a distancia entre os átomos, da enzima DPP-IV e o peptídeo KD, (Figuras,10,11,12). Onde é possível observar a estrutura terciária da

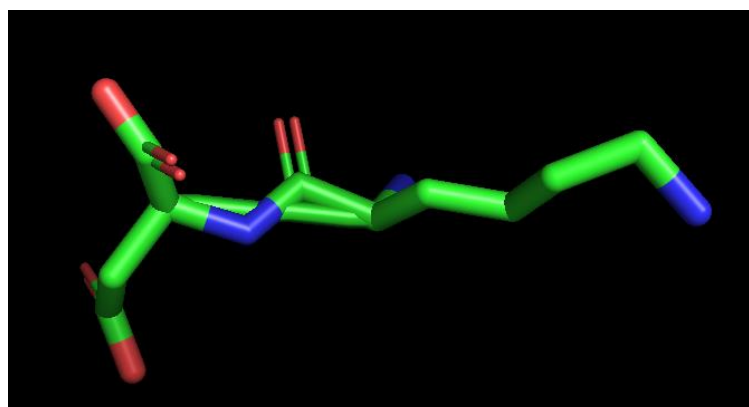
DPP-4 referente ao código PDB 1R9M, onde em amarelo têm-se as folhas- $\beta$ , em vermelho as  $\alpha$ -hélices e em verde a região dos loops, pode-se verificar a superfície de potencial hidrofóbico

**Figura 11:**Represente a superfície da enzima 1R9M



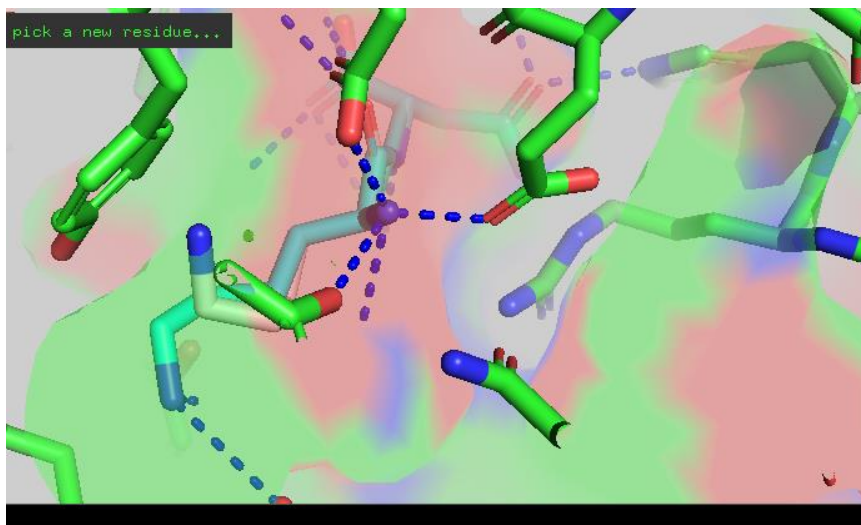
Fonte: Próprio Autor

**Figura 12:**Represente a superfície do peptídeo KD



Fonte: Próprio Autor

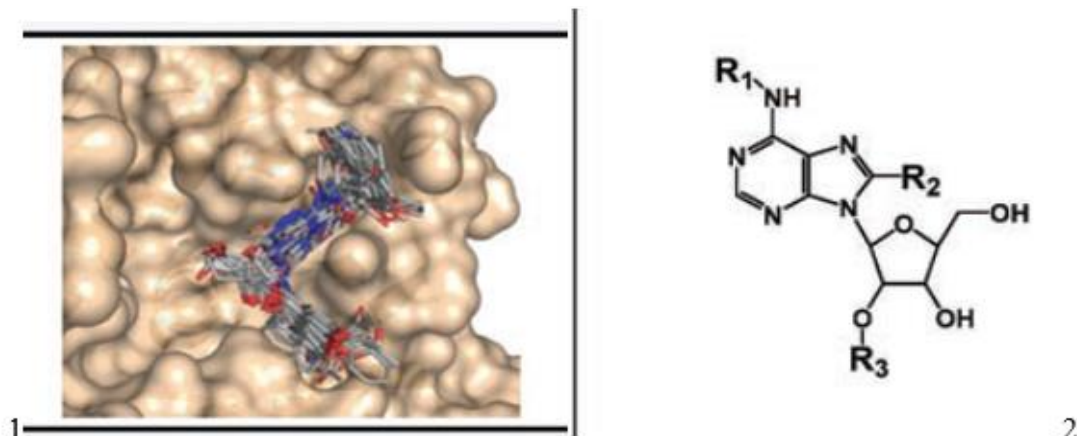
**Figura 13:** Interações ligante-alvo molecular



Fonte: Próprio Autor

Utilizando o conjunto de dados na geração dos modelos de QSAR 3D, (Quantitative Structure-Activity Relationship) aplicando modelos matemáticos e computacionais na estrutura química de substâncias para prever, de forma qualitativa ou quantitativa, propriedades físico-químicas, toxicológicas e ecotoxicológicas, que servem para avaliação de possíveis efeitos adversos (TAVARES, 2004), a (Figura 13) informando os preditivos era constituído de 70 derivados de adenosina e a Estrutura geral da série de inibidores da LmGAPDH, derivados de adenosina, que foram idealizados com base nas diferenças estruturais significativas entre os sítios ativos das enzimas do parasita *Leishmania mexicana* e do seu homólogo humano. Com isso as propriedades moleculares foram quantitativamente relacionadas à potência inibitória, empregando os métodos de análise comparativa dos campos moleculares (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010).

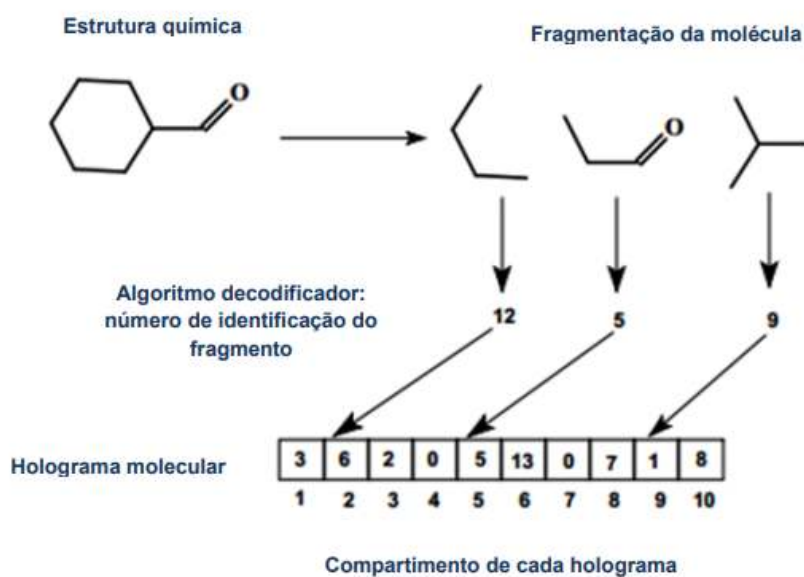
**Figura 14:**1, Alinhamento estrutural dos 70 inibidores; 2, Estrutura geral da série de inibidores da LmGAPDH, derivados de adenosina.



Fonte: GUIDO; ANDRICOPULO ; OLIVA, 2010

Podem ser os hologramas convertidos graficamente em mapas utilizando uma escala de cores específica, sendo as regiões coloridas de verde e amarelo indicativas de fragmentos que contribuem positivamente para a atividade biológica; já áreas em vermelho e laranja contribuem negativamente para tal parâmetro. Assim, o método de HQSAR permite uma inspeção visual das regiões da molécula que podem/devem ser preservadas. O Ancoramento molecular é um método *in silico* que prevê a orientação de um composto (ligante) no possível sítio ativo do alvo biológico, formando um complexo estável entre ligante/receptor. Esta técnica avalia desta forma o encaixe da molécula considerando a energia de interação e sua geometria, o que pode ser considerada uma ferramenta importante na Química Medicinal, principalmente na projeção racional de novos candidatos a fármacos. Vários trabalhos foram encontrados na literatura e mencionavam o uso da técnica de ancoramento molecular considerando somente a estrutura da tríade catalítica como flexível e ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas da tríade catalítica, no caso de proteínas como a DPP-4, as quais contribuiriam exclusivamente para a ligação do substrato ao sítio de ligação da enzima, a (Figura 14) Demonstra a A representação esquemática do funcionamento da técnica de HQSAR, (PANTALEÃO, 2014).

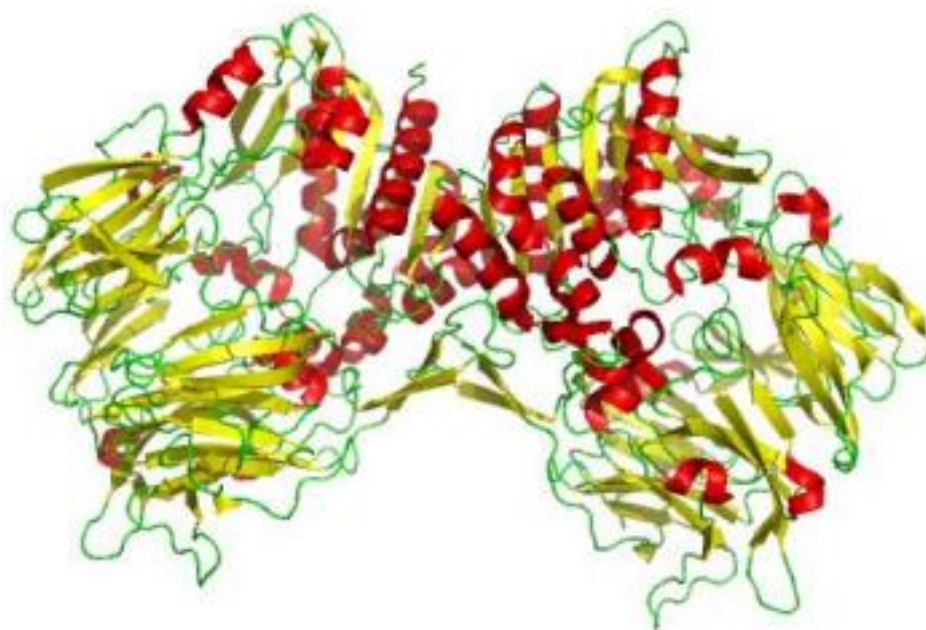
**Figura 15:** A representação esquemática do funcionamento da técnica de HQSAR



Fonte : (PANTALEÃO, 2014).

A partir da Figura 14, é possível observar a estrutura terciária da DPP-4 referente ao código PDB 4A5S, onde em amarelo têm-se as folhas- $\beta$ , em vermelho as  $\alpha$ -hélices e em verde a região dos loops, pode-se verificar a superfície de potencial hidrofóbico. (PANTALEÃO, 2014).

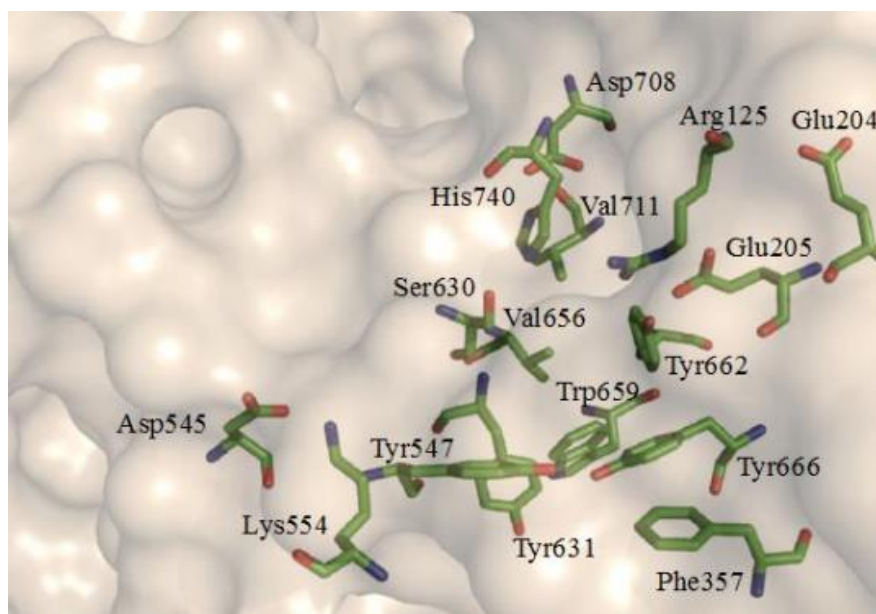
**Figura 16:** Estrutura da DPP-4 (PDB 4A5S) 2



Fonte : (PANTALEÃO, 2014).

A seguir, na (Figura 16), pode-se verificar a disposição dos aminoácidos que compõem o sítio ativo da enzima DPP-4

**Figura 17:** Representação do sítio ativo da enzima DPP-4 (PDB 4A5S 25,26 ), indicando os principais aminoácidos que compõem a região catalítica.



Fonte : (PANTALEÃO, 2014).

Os resultados obtidos no HPEPDOCK, a classificação 1 mostrada na tabela 3, indica que quanto menor o valor da pontuação de encaixe, melhor será a pontuação de energia de acoplamento. Assim, a pontuação de (-72.967) tem melhor resultado. Significando que nessa posição o peptídeo KD mostrou-se capaz de se ligar ao sítio ativo do receptor da DPP-IV. Assim, como o HPEPDOCK o Pepsite2 e o PyMol, também indicaram que é possível a ligação ente o peptídeo KD com a enzima DPP-IV, a ferramenta mostra os aminoácidos potencialmente ligados na enzima DPP-4 como no caso da posição 1 com o valor P\* de (0,005894) nessa posição o peptídeo KD se liga em três aminoácido da cadeia D sendo eles TRP627, TRP629 e TYR752. Nessa posição também é mostrado na tabela, com a cor vermelha, que indica que a interação do peptídeo KD com DPP-IV é altamente significativa.

#### 4.2 ANÁLISES *IN VITRO*

Nos estudos *in vitro* os peptídeos terapêuticos também demonstram várias vantagens, em comparação às pequenas moléculas orgânicas que compõe os fármacos tradicionais, uma vez que, muitas vezes são constituídos da menor parte funcional de uma proteína, distribuindo

maior eficácia, especificidade e seletividade. Nos estudos dos resultados peptídeos apresentam menos interações medicamentosas, pelo fato dos produtos de degradação peptídica serem constituídos por aminoácidos. Assim, tendo em vista que apresentam curto tempo de meia vida, poucos peptídeos se acumulam nos tecidos, reduzindo os riscos de complicações causados por seus metabólitos (SOUZA, 2017).

Com os estudos em andamento uma grande produção incontável de peptídeos biologicamente ativos foram sintetizados nos últimos cinquenta anos. Na grande maioria das partes produtiva refere-se a sintéticos obtidos pelos métodos químicos (em solução ou em fase sólida), enzimático ou combinação de ambos (semi-síntese) na realização de pesquisa científica em diferentes áreas, ao uso terapêutico, alimentar, à produção de vacinas ou, ainda, como blocos construtivos de outras moléculas com ação biológica. Por este motivo os estudos e produção na fármacos os peptídeos sintéticos passaram a servir como provas inequívocas das identidades químicas e dos papéis biológicos dos peptídeos naturais. (MACHADO *et al*, 2004)

Durante o experimento foi utilizado todos os requisitos básicos que estão relacionados ao desempenho do método e equipamento que envolve: exatidão, recuperação, robustez, precisão, medida de branco da reação, sensibilidade, limite de detecção, interferência e valor de referência.

Primeiramente, para determinar a concentração de cada substância foi feito um cálculo matemático, ( $C \cdot V_2 = C \cdot V$ ), para a obtenção da concentração da amostra, Tampão, DPP-IV e substrato, e com a ajuda de uma pipeta foi adicionada toda a substância em uma lâmina para análise através da técnica de espectrofotômetro, com o decorrer das análises foi necessário fazer algumas adequações, no qual no inibidor na primeira replicada foi acrescentado 5 u/l e ao final ficou 35 u/l para uma cubeta de 0,7 u/l e no tampão ficou zero, já na segunda replicada o inibidor foi 35 u/l para 17,5 u/l como também o Tampão, e a cubeta de 3,35 u/l.

Dessa forma, nesse estudo *in vitro* foi analisado com precisão a Atividade da Enzima na Presença do Peptídeo KD, após a análise do controle, sem a reação do inibidor, e com a reação do inibidor, em seguida foi calculado a média e desvio padrão de cada uma delas utilizando um cálculo matemático.

Para identificar o percentual da atividade da DPP-VI como também o tempo de inibição do peptídeo KD após a adição do tampão, enzima DPP-VI e o substrato, foi realizada uma análise através da técnica de espectrofotômetro, onde determinar os valores de transmitância (luz transmitida) e absorvância (luz absorvida) de uma solução em um ou mais comprimentos de onda. Ele mede a quantidade de fótons (a intensidade da luz) absorvida depois de passar pela amostra.

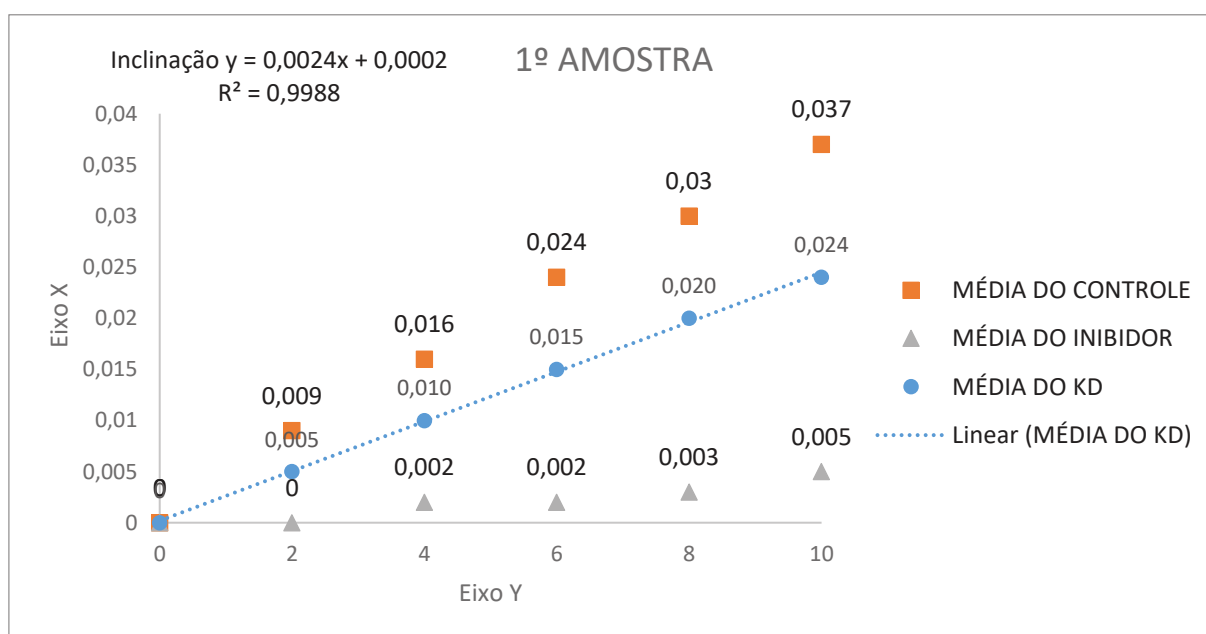
O controle foi de grande importância, pois permitiu quantificar por comparação os resultados obtidos da atividade da DPP-VI. As modificações foram comprovadas em análises de espectrofotômetro.

Na síntese enzimática ou biocatalisada a formação da ligação peptídica não ocorre por um reagente químico, mas sim por uma enzima em sua forma livre ou imobilizada. Da mesma forma que ocorre na síntese química, a síntese enzimática pode requerer várias etapas durante o processo da síntese total (MACHADO et al., 2004).

Por isso foi de grande satisfação fazer a replicada das amostras selecionadas, pois determinou o resultado final positivo, no (Gráfico 2), ilustra a inclinação da media da reação do inibidor da atividade do peptídeo KD na enzima DPP-IV em um determinado tempo, comparado com a media do controle, sendo assim podemos observar que o ponto de inclinação do peptídeo fica mais próximo a media do controle.

O controle de qualidade tem como conceito definido, como técnicas e atividades operacionais utilizadas para monitorar a execução dos requisitos da qualidade especificados. O controle externo da qualidade, também compreende a avaliação do desempenho de sistemas analíticos por meio de ensaios de proficiência, análise de padrões certificados e comparações interlaboratoriais. Também o controle interno de qualidade são procedimentos conduzidos em conjunto de amostras de a fim de verificar se o sistema analítico está atuando dentro dos limites de tolerância pré-definidos( SANTOS A.P.S;ZANUSSO JUNIOR, 2015).

Gráfico 1:Inclinação do controle, inibidor, e o KD.

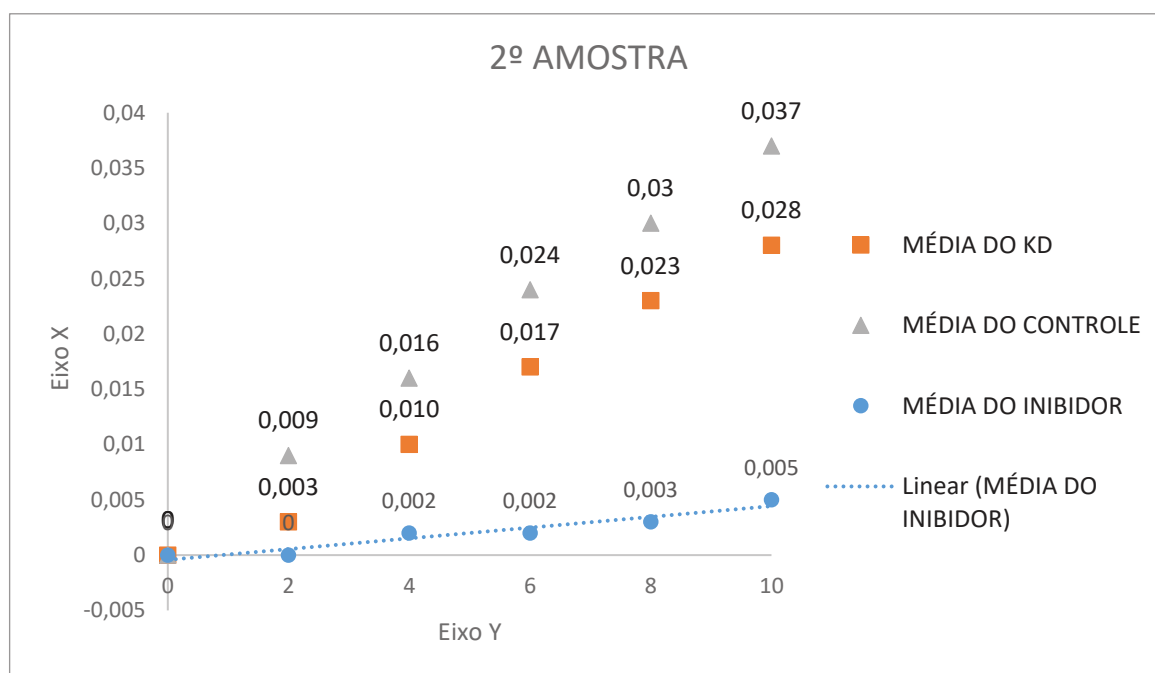


Fonte: Próprio Autor

Nessa segunda amostra, o gráfico também mantém a atividade enzimática aparte do tempo de após os 6 minutos, porem a inibição foi menor comparada a primeira amostra, deve ter sido por conta da quantidade das amostras que foi reduzida. Pois na segunda replicada o inibidor foi 35 u/l para 17,5 u/l como também o Tampão, e a cubeta de 3,35 u/l, (Gráfico 3).

Foi identificado que uma “ amostragem otimizada” não é obtida tendo-se como base apenas o juízo de valor e a experiência prática do coletador, mas sim quanto maior a precisão requerida, maior o custo envolvido. Alguns erros de amostragem e de análise existem em algum momento, devendo ser balanceados entre si em relação ao valor intrínseco do material, principalmente em relação ao custo proveniente da consequência dos erros. A alteração de uma amostra ou característica a ser analisada, por exemplo, quando o parâmetro de interesse é a umidade, e o coletor deixa a amostra exposta a uma fonte de calor ou de umidade, pode influenciar no resultado final (GÓES ; LUZ ; POSSA,2004).

Gráfico 2. Inclinação do controle, inibidor, e o KD

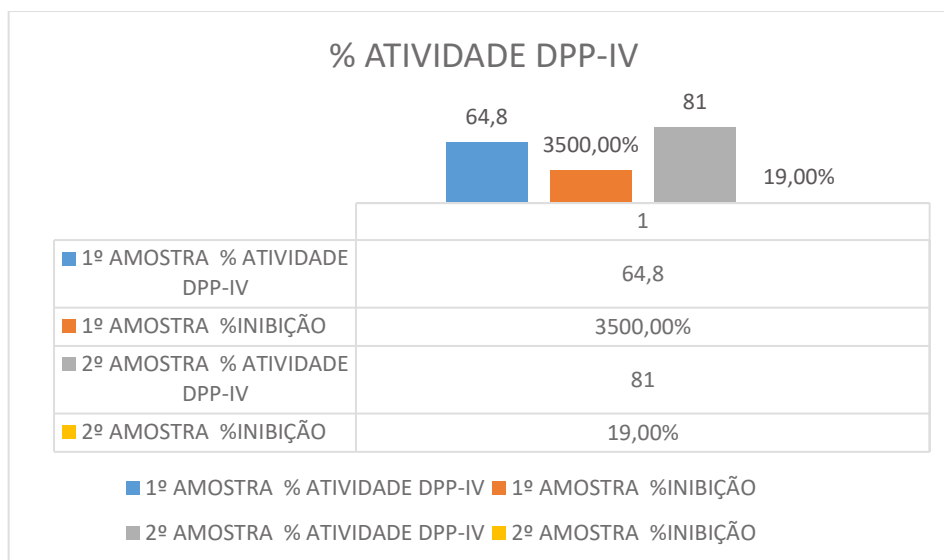


Fonte: Próprio Autor

Nessa primeira amostra o gráfico mantém-se a atividade enzimática aparte do tempo de após os 6 minutos, quando chegou em 10 minutos houve uma inibição consideravelmente da atividade da DPP-VI, pois obteve um resultado parcial de 64,8% e resultado final com uma inibição de 35%. Já nos resultados da segunda amostra não foram preciso comparado a primeira

amostra, pois os resultados parcial foram de 81% e resultado final com uma inibição de 19% de inibição da atividade da DPP-VI, (Gráfico 4).

Gráfico 3. % Da Atividade da DPP-IV.



Fonte: Próprio Autor

Essa metodologia oferece vantagens em relação à síntese química, como também a elevada estereo; ausência de racemização e de outras reações secundárias típicas da síntese química; proteção parcial dos substratos; tolerância à presença de água nos meios reacionais; possibilidade de emprego de reatores para a produção em larga escala e menor custo. Por outro lado, o fato de não existir uma enzima universal faz com que a metodologia não seja geral ou aplicável a qualquer sequência peptídica (MACHADO *et al.*, 2004).

Pois a formação de uma ligação peptídica catalisada por uma enzima baseia-se em simples inversão da reação de hidrólise, aminólise de amidas (também chamada de transpeptidação) e aminólise de ésteres. Sendo que a inversão da hidrólise e a aminólise de amidas são reversíveis e, portanto, são termodinamicamente controladas. A aminólise de ésteres é irreversível, podendo assim ser considerada cineticamente controlada (SOUZA, 2017).

No estudo *in vitro* os gráficos demonstra a atividade enzimática aparte do tempo de após os 6 minutos, quando chegou em 10 minutos houve uma inibição consideravelmente da atividade da DPP-VI. Nos resultados da primeira amostra foram preciso, pois foram bem próximos do valor mínimo do controle.

Dessa forma com os estudos *in silico* houve a ligação do peptídeo KD com a enzima DPP-IV, com isso as análises *in vitro* obteve uma inibiçãosignificativa da DPP-IV com a adição do peptídeo. A

partir desses resultados positivos, pode-se haver mais estudos para a comprovação de 100% da inibição da atividade da DPP-IV.

Tendo tornado-se o estudo da bioinformática e quimio-informática cada vez mais necessárias para a exploração do potencial farmacológico das substâncias, através da seleção de alvos de ancoragem, como exemplo, para identificar relações entre as ações reveladas nos alvos e os efeitos terapêuticos. Os modelos *in silico* são utilizados como um procedimento de triagem (screening), identificando o efeito de um fármaco estímulo em células, tecidos, norteando a investigação experimental e os estudos clínicos, no entanto são dados teóricos até serem validados. Os modelos *in silico* são úteis, mas não possuem as características biofísicas humanas (DIAS, 2014).

## 5 CONCLUSÃO

Conclui-se, que da análise *in silico*, com o uso de todas essas ferramentas, foi possível destacar os resultados bastantes relevantes. Com todos esses resultados da interação do peptídeo KD extraído do feijão caupi, com o sítio ativo da DPP-IV, mostra que há grande possibilidade de inibição da proteína DPP-IV através do peptídeo KD. Possibilitando o GLP-1 aumentar a insulino-secreção, melhorando o controle da glicemia em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2. E através da análise *in vitro*, foi possível observar a inibição da atividade do peptídeo KD após um determinado tempo, tendo em vista esses resultados positivos, deve-se realizar mais testes *in vitro* para que se possa desenvolver os peptídeos sintéticos em sequências corretas. Esse fator essencial para a obtenção de resultados confiáveis na avaliação em ensaios de pesquisa. Além disso, em âmbito clínico, a pureza do fármaco ou um suplemento é um quesito obrigatório, exigido por unidades reguladoras competentes.

## 6 REFERÊNCIAS

- ALENCAR S.A. **Utilização de ferramentas computacionais para o estudo do impacto funcional e estrutural de nsSNPs em genes codificadores de proteínas**. Belo Horizonte Instituto de Ciências Biológicas Universidade Federal de Minas Gerais 2010. Disponível em: <http://www.pgbioinfo.icb.ufmg.br/defesas/52D.PDF>. Pag 28
- AERTGEERTS, K.Y.S; TENNANT, M.G; COLLINS, B; ROGERS, J; SANG, B.C; SKENE, R, J; WEBB, A.R; PRASAD, G.S. **Pepsite2**. 2004. Disponível em: <http://pepsite2.russelllab.org/match?molvis=jsmol&pdb=1R9M&chain=&ligand=kd>. Acesso

em: 21 Nov. 2021

AERTGEERTS K; YE S; TENNANT M.G; KRAUS M.L; ROGERS J; SANG B.C; SKENE R.J; WEBB D.R ;PRASAD G.S. **A estrutura cristalina da dipeptidil peptidase IV humana em complexo com um decapeptídeo revela detalhes sobre a especificidade do substrato e a formação do intermediário tetraédrico.** 2004 ProteinSci **13** : 412-421. Disponível em: <https://www.rcsb.org/structure/1R9M>. Acesso em: 09 Maç. 2022

ALVES, M. ;MEDINA, J. L.; NEVES, C. Incretinas e Tratamento da Diabetes. **Revista Portuguesa de Diabetes.** 2007.2 (4): 22-25. Disponível em: <http://www.revportdiabetes.com/wp-content/uploads/2017/10/RPD-Vol-2-n%C2%BA-4-Dezembro-2007-Artigo-Revis%C3%A3o-p%C3%A1g-22-25.pdf>. Acesso em: 29Out. 2021.

ANDUKURI, R.; DRINCIC, A.; RENDELL, M. Alogliptin: a new additiontotheclassof DPP-4 inhibitors.**DiabetesMetabSyndrObes**, v. 2, p. 117-26, Jul 2009. ISSN 1178- 7007. Availableat:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21437125><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3048010/pdf/dms0-2-117.pdf>.Acessoem: 20 Nov 2021

AERTGEERTS, K., YE, S., TENNANT, M.G., COLLINS, B., ROGERS, J., SANG, B.C., SKENE, R.J., WEBB, D.R., PRASAD, G.S.**Full wwPDB X-ray Structure Validation Report** 2020. Disponível em:[https://files.rcsb.org/pub/pdb/validation\\_reports/r9/1r9m/1r9m\\_full\\_validation.pdf](https://files.rcsb.org/pub/pdb/validation_reports/r9/1r9m/1r9m_full_validation.pdf). Acesso em:20 Set. 2021

ARANZÁZU, M.D. ; CHÁVARRI, M. ; MACARULLA, M.T, MEDINA C. **Effectsofthewholeseedand a proteinisolateoffababean (Vicia faba) onthecholesterolmetabolismofhypercholesterolaemicrats.** B J Nutr.2001; 85(5):607-614.Disponível em: <file:///C:/Users/CCE-PC/Downloads/BJN2000330.pdf>. Acesso em: 22Nov 2021

ARÊAS JAG.; BATISTUTI JP.; CRUZ RJ. ; FONTANARI, G. ; SALDIVA, B.H.N., **Cholesterol-loweringeffectofwholelupin (Lupinusalbus) seed and its proteinisolate.** Food Chemistry. 2012; 132(3):1521-1526.Acesso em:30 Out. 2021

ARÊAS JA. ; FROTA, K.M.G. ; SOARES RAM. **Composição química do feijão-caupi (Vigna unguiculata L. Walp)**, cultivar BRS-Milênio. Cienc Tecol Aliment. 2008;28(2):470-476. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/cta/v28n2/a31v28n2.pdf>. Acesso em: 10 Out. 2020

ARNOLDI, A. ; CHIESA, G. ; CORNELLI L. ; DIANI E. ; MARCHESI, M. ; PAROLINI C. ; RIGAMONTI E. ; SIRTORI, C.R. **Hypolipidaemic and antiatherosclerotic effects of flupin proteins in a rabbit model**. British J Nutr. 2008;100(4):707-710. Disponível em: <http://www.sciepub.com/reference/279609>. Acesso em: 19 Nov 2021

ARAÚJO, F. M. M. C. ; COSTA. de. **Caracterização bioquímica de sementes de cultivares de feijão-caupi (Vigna unguiculata (L.) Walp.)**. 1997. 84p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1997. Disponível em: <https://www.creape.org.br/wp-content/uploads/2020/10/CADERNO-SEMIARIDO-17-FEIJAO-CAUPI.pdf>. Acesso em: 04 Nov. 2021

BARBANA, C. ; BOUCHER, A. C. ; BOYE, J. I. In vitro binding bile acids salts by lentil flours, lentil protein concentrates and lentil protein hydrolysates. **Food Research International**. 2011;44(1):174-180. Disponível em: <https://europepmc.org/article/agr/ind44587411>. Acesso em: 30 Out. 2021

BANERJEE, M. ; YOUNIS, N. ; SORAN, H. **Vildagliptin in clinical practice: a review of literature**. Expert Opin Pharmacother, v. 10, n. 16, p. 2745-57, Nov 2009. ISSN 1744-7666 (Electronic) 1465-6566 (Linking). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19874253>. Acesso em: 20 Nov 2021

BAILEY, C. J. ; FLATT, P. R. ; GREEN, B. D. **Dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) inhibitors: A newly emerging drug class for the treatment of type 2 diabetes**. Diab Vasc Dis Res, v. 3, n. 3, p. 159-65, Dec 2006. ISSN 1479-1641 (Print) 1479-1641 (Linking). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17160910>. Acesso em: 28 Set. 2021

BALLER, B. ; MEIER, J. J. ; NAUCK, M. A. . **Gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide-1 in the pathogenesis of type 2 diabetes**. Diabetes, v. 53 Suppl 3, p.

S190-6, Dec 2004. ISSN 0012-1797. Available at: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15561910> >. Acesso em: 28 Set. 2021

**BAGLEY, D.M. et al. Irritação ocular: banco de dados de produtos químicos de referência**

. Toxicol. In Vitro, 6: 487-91, 1992. Disponível em:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20732149/>. Acesso em: 14 Jan. 2022

BONITHON-KOPP, C ; FROTA K. M. G *et al.* ; FAIVRE, J . **Diets, fibers, and colon cancer.**  
Advances in

Experimental Medicine and Biology, New York, v. 472, p. 199-206, 1999. Disponível  
em: <https://www.scielo.br/pdf/cta/v28n2/a31v28n2.pdf> . Acesso em: 10 Out. 2020

CAIRO, G. et al. **The iron regulatory proteins:** targets and modulators of free radical  
reactions and oxidative damage. Free Radical Biology & Medicine, San Diego, v. 32, n. 12, p.  
1237-1243, 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12057761/>. Acesso em: 25  
Out. 2021

CERIELLO, A.; MOTZ E. Oxidative stress  
the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease?  
**The common soil hypothesis revised.** Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004; 24(5):816-  
23. Disponível  
em: <https://www.ahajournals.org/doi/full/10.1161/01.ATV.0000122852.22604.78>. Acesso  
em: 18 Out. 2021

CHACRA, A.R.; ARODA MA, HENRY RR. **Incretin hormones in diabetes and  
metabolism.** Accessed March 1, 2006. Disponível em  
: [http://www.unirv.edu.br/conteudos/fckfiles/files/ACFrOgBm75SzSoQXHH\\_6IzX7Ytd2G4qyyOx6z1EAPPGYW8hd6X45PvXLgUk6kkD0NFjw4J4EfuPSAL5b8FzkcWVDknMcxZ70QX8PWLA5Qxp8xu7Cw4Jt-WVfXz0w\\_s=.pdf](http://www.unirv.edu.br/conteudos/fckfiles/files/ACFrOgBm75SzSoQXHH_6IzX7Ytd2G4qyyOx6z1EAPPGYW8hd6X45PvXLgUk6kkD0NFjw4J4EfuPSAL5b8FzkcWVDknMcxZ70QX8PWLA5Qxp8xu7Cw4Jt-WVfXz0w_s=.pdf). Acesso em: 15 Set. 2021

CHOUKEM, ; GAUTIER, J. F.; S. P.; GIRARD, J. **Physiology of incretins (GIP and GLP1)  
and abnormalities in type 2 diabetes.** Diabetes Metab, v. 34 Suppl 2, p. S65-72, Feb 2008.

ISSN 1262-3636 (Print) 1262-3636 (Linking). Available at:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18640588>. Acesso em: 20 Nov 2021

CHRISPEELS, M. J.; RAIKHEL, N. V. **Lectins, lectins genes and their role in plant defence**. In: VAND DRIESSCHE, E.; KILPATRICK, D.; BOG-HANSEN, T. C. (Eds.). St. Louis: **Lectins Reviews**, 1991. Cap. 6, p. 183-194.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC159974/pdf/030001.pdf>. Acesso em: 30 Out. 2021

COUTINHO, G. ; MARTINS, A.C, *et al.* ; NINNECW, E. ; OLIVEIRA A. D. Z.

; PROSDOCIMI F, ; REIS, A.N. ; SILVA AF. Bioinformática: manual do usuário.

**Biociência Desenvolv.** 2002;29:12–25. Disponível

em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/142883/000866990.pdf?sequence=1>. Acesso em: 28 Out. 2021

CORREA I.N; POLTRONIERI F; MARQUES, MR, *et al* 2016. **Ação hipocolesterolêmica das proteínas de leguminosas**. RASBRAN - Revista da Associação Brasileira de Nutrição. São Paulo, SP, Ano 7, n. 2, p. 79-90, Jul-Dez. 2016 - ISSN 2177-7527. Disponível em: <file:///C:/Users/Usu%C3%A1rio/Downloads/189-Texto%20do%20artigo-1588-1668-10-20170125.pdf>. Acesso em: 21 Nov 2021

CRUZ, J. A. A. Dietary habits and nutritional status in adolescents over Europe-Southern Europe. **European Journal of Clinical Nutrition, London**, v. 54, p. 29-35, 2000. Suplemento 1. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10805034/>. Acesso em: 25 Agt. 2021

CRUZ, A.S; Maria Luisa BARBOSA, Terezinha de Jesus Andreoli PINTO. Testes in vitro como alternativa aos testes in vivo de Draize. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 63(1):1-9, 2004. Disponível em: <file:///C:/Users/Usu%C3%A1rio/Downloads/34734-Texto%20do%20artigo-34046-1-10-20210318.pdf>. Acesso em: 14 Jan. 2022

DEACON, C. F.; CARR, R. D.; HOLST, J. J. **DPP-4 inhibitor therapy: new directions in the treatment of type 2 diabetes**. Front Biosci, v. 13, p. 1780-94, Jan 2008. ISSN 1093- 9946. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17981667>. Acesso em: 30 Out. 2021

DIAS G.T. **Avaliação da Toxicidade In Silico e aas Atividades Hemólítica, Antioxidante E Antibacteriana In Vitro Das Formas Óleo Essencial E Óleo Essencial Microencapsulado De LippiaPedunculosa.** João Pessoa 2018.Disponível em: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/bitstream/123456789/17643/1/GTD11092018.pdf>. Acesso em 08-Maç-22

DESTRO D. *et al*, LIENER, I. E. **Implicationsofantinutritionalcomponents in soybeanfoods.** Critical Reviews in AnalyticalChemistry, London, v. 34, n. 1, p. 31-67, 2013.[https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1984-70332013000300007](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-70332013000300007). Acesso em: 25 Out.. 2021

DOYLE, M. E.; EGAN, J. M. **Mechanismsofactionof glucagon-like peptide 1 in thepancreas.** PharmacolTher, v. 113, n. 3, p. 546-93, Mar 2007. ISSN 0163-7258. Availableat: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17306374>. Acesso em:30 Out. 2021

DRUCKER, D. J.; NAUCK, M. A. **The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes.** Lancet, v. 368, n. 9548, p. 1696-705, Nov 2006. ISSN 1474-547X. Availableat:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17098089>. 25 Set. 2021

DURANTI, M. **Grain legume protein and nutraceuticalproperties.** Fitoterapia. 2006;77(2):67-82.Disponível em:<http://europepmc.org/article/med/16406359>.25 Set. 2021

ECKEL, J.; RÖHRBORN, D.; WRONKOWITZ, N. **DPP4 in Diabetes.** Front Immunol, v. 6, p. 386, 2015. ISSN 1664-3224. Availableat: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26284071>. 29 Out. 2021

EMBRAPA MEIO-NORTE. **Cultivo de feijão caupi.** Jul/2003. Disponível em: <http://www.cpamn.embrapa.br/pesquisa/graos/FeijaoCaupi/referencias.htm>. Acesso em:20Nov.2021

FROTA, K. M. G *et al*. FELDHEIM, W.; WISKER, E. **Studiesontheimprovementofdietaryfibreintake.** Deutsche Lebensmittel-Rundschau, Hamburg, v. 96, n. 9, p. 327-330, 2000.Disponível em:<https://www.scielo.br/pdf/cta/v28n2/a31v28n2.pdf>. Acesso em: 25 Out. 2021

FROTA, K.M.G. ;MAIA, F. M. M. Composição e caracterização nutricional de três cultivares de *Vigna unguiculata* (L.) Walp: EPACE-10, Olho de ovelha e IPA-206. Fortaleza, 1996. 87 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Vegetal), Universidade Federal do Ceará. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/cta/v28n2/a31v28n2.pdf>. Acesso em: 29 Out. 2021

FERREIRA V.A; CAMPOS S.M.B. **Avanços Farmacológicos no Tratamento Dodiabetes Tipo 2**. Vol.8,n.3,pp.72-78 Set - Nov 2014. Disponível em:  
[https://www.mastereditora.com.br/periodico/20141101\\_221529.pdf](https://www.mastereditora.com.br/periodico/20141101_221529.pdf).

GIL, A. C .**Como Elaborar Projetos de Pesquisa**. 4. ed. São Paulo: Atlas, 2002. Disponível em:[http://www.uece.br/nucleodelinguasitaperi/dmdocuments/gil\\_como\\_elaborar\\_projeto\\_de\\_pesquisa.pdf](http://www.uece.br/nucleodelinguasitaperi/dmdocuments/gil_como_elaborar_projeto_de_pesquisa.pdf). Acesso em: 30 Out. 2021

GUIDO R.V.C; ANDRICOPULO A.D; OLIVA G. **Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal**: aplicações em doenças infecciosas. estudos avançados 24 (70), 2010 . Disponível em:<https://www.scielo.br/j/ea/a/mXZ9PsJTF5r9qrp4xFtTCVv/?lang=pt>. Acesso em: 07 Maç. 2022

GÓES M.A.C; LUZ A.B; POSSA M.V.**Amostragem**. Centro de Tecnologia Mineral Ministério da Ciência e Tecnologia. Rio de Janeiro Dezembro/2004. Disponível em: [https://www.ufjf.br/baccan/files/2011/05/Amostragem\\_CT2004-180-00.pdf](https://www.ufjf.br/baccan/files/2011/05/Amostragem_CT2004-180-00.pdf)

HOPUSU-HAVU, V. K.; GLENNER, G. G. **A new dipeptidylaminohydrolase hydrolyzing glycyl-prolyl-beta-naphthylamide**. Histochemie, v. 7, n. 3, p. 197-201, 1966. ISSN 0018- 2222 (Print) 0018-2222 (Linking). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5959122> .Acesso em: 30 Out. 2021

HOLST, J. J. ;VILSBØLL, T. **Incretins, insulin secretion and Type 2 diabetes mellitus**. Diabetologia, v. 47, n. 3, p. 357-366, Mar 2004. ISSN 0012-186X. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14968296> . Acesso em: 29 Set. 2021

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. v. 5, n. 12, 1993; v. 6, n. 12, 1994; v. 7, n. 12, 1995; v. 8, n. 12, 1996; v. 9, n. 12, 1997; v. 10, n. 12, 1998; v. 11, n. 12, 1999; v. 12, n. 12, 2000; v. 13, n. 12, 2008. Rio de Janeiro: 2001. Disponível em:

[https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/6/lspa\\_pesq\\_2008\\_jan.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/6/lspa_pesq_2008_jan.pdf). Acesso em: 18 Set. 2021

INNOVAGEN. **PepCalc.com - Calculadora de propriedades peptídicas**. Disponível em: <https://pepcalc.com/>. Acesso em: 16 Out. 2021.

JANG, H. J. et al. **Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1**. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 104, n. 38, p. 15069-74, Sep 2007. ISSN 0027-8424. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17724330>. Acesso em: 30 Jan. 2021

JUNG C. F., **Metodologia Científica e Tecnológica**. Edição 2009 Material para Fins Didáticos – carlosfernandojung@gmail.com, Disponível em: 30 Set. 2021  
<http://www.dsce.fee.unicamp.br/~antenor/mod4.pdf>

KHATTAK, N. A.; MIR, A.; NAQSH E ZAHRA, S. **Comparative modeling and docking studies of p16ink4/cyclin D1/Rb pathway genes in lung cancer revealed functionally interactive residue of RB1 and its functional partner E2F1**. *Theoretical biology & medical modelling*, v. 10, n. 1, p. 1, 2013. Acesso em: 28 Set. 2021

KAPOOR G.S, CHAUDHARY K, GAUTAM A, KUMAR R, et al. **In Silico Approach for Predicting Toxicity of Peptides and Proteins**. *PLOS ONE* 8(9): e73957. 2013. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0073957&type=printable>. Acesso em: 09 Maç 22.

LAKATOS, E. M.; MARCONI, Marina de Andrade. **Fundamentos de metodologia científica**. 5. ed. São Paulo: Atlas, 2003. Disponível em file:///C:/Users/CCE-PC/Downloads/LAKATOS%20-%20MARCONI%20-%20FUNDAMENTOS%20DE%20METODOLOGIA%20CIENTIFICA.pdf. Acesso em: 29 Out. 2021

LOTIFY, M. et al. **Medicinal Chemistry and Applications of Incretins and DPP-4 Inhibitors in the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus**. *Open Med Chem J*, v. 5, n. Suppl 2,

p. 82-92, 2011. ISSN 1874-1045 (Electronic). Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21966329>. Acesso em: 29 Out. 2021

MENCION, J. P.; VAN DER POEL, A. F. B. **Process technology and antinutritional factors: principles, adequacy and process optimization**. In: 1993.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10725143>. Acesso em: 18 Out. 2021

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65: 55-63, 1983. Disponível em: [https://e-tarjome.com/storage/btn\\_uploaded/2019-07-16/1563261481\\_9720-etarjome-English.pdf](https://e-tarjome.com/storage/btn_uploaded/2019-07-16/1563261481_9720-etarjome-English.pdf). Acesso em: 14 Jan. 2022

MOURA, B. A. O que é natureza da Ciência e qual sua relação com a História e Filosofia da Ciência. **Revista Brasileira de História da Ciência**, Rio de Janeiro, v. 7, n. 1, p. 32-46, jan | jun 2014. Disponível em [file:///C:/Users/CCE-](file:///C:/Users/CCE-PC/Downloads/sbhc%202014_Breno%20Arsioli%20Moura.pdf)

[PC/Downloads/sbhc%202014\\_Breno%20Arsioli%20Moura.pdf](file:///C:/Users/CCE-PC/Downloads/sbhc%202014_Breno%20Arsioli%20Moura.pdf). Acesso em: 18 Agt. 2021

Mota *et al.* **orrelação da enzima DPP4 com a infecção por SARS-CoV-2**. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 13, e415101321361, 2021. Disponível em:

<file:///C:/Users/Usu%C3%A1rio/Downloads/21361-Article-258500-1-10-20211017.pdf>.

Acesso em 08-Maç-22

MOLLER, D. E. **New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome**. *Nature*. 2001;414:821-827. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11742415/>. Acesso em: 18 Out. 2021

MACHADO, A.; LIRIA, C.W.; PROTI, P.B.; REMUZGO, C.; MIRANDA, M.T.M.

**Síntese química e enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações**. *Química Nova*, v.27, n.5, p.781-789, 2004. Disponível em:

[https://www.researchgate.net/publication/26395249\\_Sintese\\_quimica\\_e\\_enzimatica\\_de\\_peptideos\\_principios\\_basicos\\_e\\_aplicacoes](https://www.researchgate.net/publication/26395249_Sintese_quimica_e_enzimatica_de_peptideos_principios_basicos_e_aplicacoes). Acesso em: 14 Jan. 2022

NELSON D L; COX M M. **Lehninger Principles of biochemistry**. ed. 5, New York: W. H. Freeman, 2008. Disponível em:

[file:///C:/Users/Usu%C3%A1rio/Downloads/Lehninger\\_Principles\\_of\\_Biochemistry.pdf](file:///C:/Users/Usu%C3%A1rio/Downloads/Lehninger_Principles_of_Biochemistry.pdf).

Acesso em: 14 Jan. 2022

POSPISILIK, J. A. et al. **Long-term treatment with the dipeptidyl peptidase IV inhibitor P32/98 causes sustained improvements in glucose tolerance, insulin sensitivity, hyperinsulinemia, and beta-cell glucose responsiveness in VDF (fa/fa) Zucker rats**.

Diabetes, v. 51, n. 4, p. 943-50, Apr 2002. ISSN 0012-1797 (Print) 0012-1797 (Linking).

Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11916911> .Acesso em: 29 Out.2021

PINHEIRO R.A.;SANTOS D.R.;CABRAL M.J.S.;SILVA R.A.;BARROS R.P. **Atributos biológicos do feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp., fabaceae) cultivado em vasos com diferentes fontes de adubação orgânica.** Revista da Universidade Estadual de Alagoas/UNEAL e-ISSN 2318-454X, Ano 11, Vol. 11(3), 2019. Disponível em: <file:///C:/Users/Usu%C3%A1rio/Downloads/161-Texto%20do%20artigo-307-331-10-20191223.pdf>. Acesso em 08-Maç-22

PANTALEÃO S.Q. Análise das Relações entre Estrutura e Atividade de Inibidores da DPP-4 Candidatos para o Tratamento de Diabetes mellitus Tipo II. UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E HUMANAS Programa de Pós-Graduação em Ciência & Tecnologia /Química. Dissertação de Mestrado. 2014. Disponível em: [file:///C:/Users/Usu%C3%A1rio/Downloads/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20de%20Mestrado%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Usu%C3%A1rio/Downloads/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20de%20Mestrado%20(1).pdf). Acesso em:09-Maç-22

PALSSON B. **The challenges of in silico biology.** Nat Biotechnol [Internet]. 2000 Nov [cited 2014 Jun 27];18(11):1147–50. Disponível em:<http://complex.upf.es/~andreea/2006/Bib/Palsson.InSilicoBiology.pdf>. Acesso em: 27Out.2021

PAULA, Janaína do N. L. M. de. **O uso potencial do inibidor de  $\alpha$ -amilase de trigo 0.53 no controle de bruquídeos.** 2006. 87 f. Dissertação. (Mestrado em Ciências) –Departamento de Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, Brasília, 2006. Disponível em <https://repositorio.unb.br/handle/10482/2538>. Acesso em: 29 Out. 2021

PERRONE G.C, RYBARCZYK-FILHO JL. **Medidas de performance metabólica usando a expressão gênica de genoma completo** [Internet]. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/78437/000899513.pdf?sequence=12011>. p. Acesso em: 29 Out. 2021

RIOS K. R.KING, J. C.; SHAMES, D. M.; WOODHOUSE, L. Zinc homeostasis in humans. **Journal of Nutrition, Bethesda**, v. 130, n. 5, p.1360-1366, 2000. Disponível em: [http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/256230/1/Rios\\_KarinaRibeiro\\_M.pdf](http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/256230/1/Rios_KarinaRibeiro_M.pdf) .Suplemento. Acesso em: 29 Agt. 2021

Rocha D.F;Oliveira G.M; Almeida L.R.C ;Pereira A.V.A ; Santos G.V.S. Desempenho do feijão-caupi a densidades de plantas na região Norte da Bahia. Agropecuária Técnica, Areia-PB, v.

40, n. 3-4, p. 48–54, 2019. Disponível em: [file:///C:/Users/Usu%C3%A1rio/Downloads/ftcb-45554%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/Usu%C3%A1rio/Downloads/ftcb-45554%20(2).pdf)

SALGADO, S. M. et al. **Caracterização físico-química do grânulo do amido do feijão caupi**. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 25, n. 3, p. 525-530, 2005. Disponível em: Acesso em: 05 Nov.. 2021

SOUZA D.P.V. **Síntese e Estudo da Atividade Biológica do Peptídeo Bioativo Era17p**. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – Uenf Campos dos Goytacazes Março, 2017. Disponível em:  
[https://ead.uenf.br/moodle/pluginfile.php/27549/mod\\_resource/content/22/2017-Daniela%20Pereira%20Vieira%20Souza-%20doutorado.pdf](https://ead.uenf.br/moodle/pluginfile.php/27549/mod_resource/content/22/2017-Daniela%20Pereira%20Vieira%20Souza-%20doutorado.pdf)

SALES, P. M. **Estudo biomonitorado do epicarpo do fruto de Pouteria torta (Mart.) Raldk por ensaio de atividade de inibição da alfa-amilase**. 2012. 165 f. Tese. (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília, Brasília, 2012. Disponível em [https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/10852/1/2012\\_PalomaMichellededeSales.pdf](https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/10852/1/2012_PalomaMichellededeSales.pdf). Acesso em: 29 Out. 2021

SILVA, A. G. M. **Caracterização bioquímica de amêndoas cruas e torradas de chicha (Sterculia striata A. St. Hill & Naudin)**. 2009. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009. Disponível em <http://livros01.livrosgratis.com.br/cp108771.pdf>. Acesso em: 29 Out. 2021

SILVA L.A; SAQUETI B.H.F; ARTILHA C.A.F; SILVA D.M.B; SOUSA L.C.S; SCAPIM M.R.S; VISENTAINER J.V. **Proteínas vegetais como alimentos funcionais .Braz. J. of Develop.**, Curitiba, v. 6, n. 2, p. 5869-5879, feb. 2020. ISSN 2525-8761. Disponível em: <file:///C:/Users/Usu%C3%A1rio/Downloads/6670-17665-1-PB.pdf>. Acesso em: 21 Nov 2021

SANTOS A.P.S; ZANUSSO JUNIOR G. **CONTROLE DE QUALIDADE EM LABORATÓRIOS CLÍNICOS**. Vol.45, pp.60-67, Jul - Set 2015. Disponível em: [https://www.mastereditora.com.br/periodico/20150924\\_075713.pdf](https://www.mastereditora.com.br/periodico/20150924_075713.pdf)

THOMAS C. F. **PepDraw**. Disponível em: <http://pepdraw.com/>. 2015. Acesso em: 23 Out. 2021.

ZHOU P, JIN B, LI H, HUANG SY. **HPEPDOCK: um servidor web para acoplamento cego de peptídeo-proteína baseado em um algoritmo hierárquico.** NucleicAcidsResearch, doi: 10.1093 / nar / gky357, 2018. Acesso em: 28 Out. 2021.

Disponível em :[huanglab.phys.hust.edu](http://huanglab.phys.hust.edu)

TOXINPRED. **Projeto e previsão de peptídeos tóxicos.** Disponível

em:<https://webs.iiitd.edu.in/raghava/toxinpred/index.html>. Acesso em: 13 Jan. 202.

TAVARES L.C. QSAR. a abordagem de Hansch. Quím. Nova 27 (4) • Ago 2004. Disponível em:  
<https://www.scielo.br/j/qn/a/GzGGqkKzC6m9p968RCCxRyL/?lang=pt>

OLIVEIRA A.D.Z. ANÁLISE IN SILICO INDICA SIMILARIDADE DA EXPRESSÃO GÊNICA NA REDE DE INTERAÇÃO DO RECEPTOR DE VITAMINA D NA SÍNDROME CLINICAMENTE ISOLADA E ESCLEROSE MÚLTIPLA. BOTUCATU/SP 2014. Disponível em.

<https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/142883/000866990.pdf?sequence=1>.

Acesso em 08-Maç-22