

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO (UCDB)
S-INOVA BIOTECH, PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA,
UCDB

**SELEÇÃO *IN SILICO* DE CECROPINAS
COMO BIOTERAPÊUTICOS CONTRA
BACTÉRIAS RESISTENTES
PROVENIENTES DE MASTITE BOVINA E
INFECÇÕES HUMANAS**

Autor: Lucas Rodrigues de Lima

Orientador: Prof. Dr. Marlon Henrique e Silva Cardoso

Coorientador: Prof. Dr. Octávio Luiz Franco

Campo Grande

Mato Grosso do Sul

Junho-2025

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO (UCDB)
S-INOVA BIOTECH, PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA,
UCDB

SELEÇÃO *IN SILICO* DE CECROPINAS
COMO BIOTERAPÊUTICOS CONTRA
BACTÉRIAS RESISTENTES
PROVENIENTES DE MASTITE BOVINA E
INFECÇÕES HUMANAS

Autor: Lucas Rodrigues de Lima

Orientador: Prof. Dr. Marlon Henrique e Silva Cardoso

Coorientador: Prof. Dr. Octávio Luiz Franco

"Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR
EM BIOTECNOLOGIA, no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade Católica Dom Bosco -Área de concentração: Biotecnologia "

Campo Grande
Mato Grosso do Sul
Junho-2025

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço aos meus pais, leuza Rodrigues dos Santos e Severino de Lima, por todo amor, apoio incondicional e pelos valores que me ensinaram. Sem o exemplo de força, perseverança e dignidade que sempre me deram, eu não teria chegado até aqui. Aos meus amigos Gabriel Oliveira Teodoro, Max Medeiros, Melissa Alves Farias e Geovane Cândido, por me incentivar ao caminho acadêmico e pelo apoio.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marlon Henrique e Silva Cardoso, expresso minha sincera admiração e respeito. Obrigado pela confiança, pela orientação precisa e generosa, e por sempre me encorajar a buscar o melhor de mim. Seu comprometimento com a ciência e com a formação de seus orientandos é inspirador.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Octávio Luiz Franco, sou profundamente grato por ter aberto as portas do seu grupo de pesquisa, pelas discussões enriquecedoras e pelo incentivo constante ao pensamento crítico e inovador. Sua experiência e entusiasmo foram fundamentais para o amadurecimento deste trabalho.

Agradeço a Profa. Dra. Carina Elisei, por ser a primeira professora a me incentivar e me instruir no caminho científico.

Agradeço também a banca por contribuírem no aprimoramento do projeto e nesse momento importante da minha formação. Aos órgãos de fomento Fundect e INCT por tornarem a execução desse projeto financeiramente viável. E é claro a todos os meus colegas de trabalho que me auxiliaram em diversos momentos desse caminho. Muito obrigado!

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade Católica Dom Bosco

Bibliotecária Mourãmise de Moura Viana - CRB-1 3360

L732s Lima, Lucas Rodrigues de

Seleção in silico de cecropinas como bioterapêuticos
contra bactérias resistentes provenientes de mastite
bovina e infecções humanas/ Lucas Rodrigues de Lima
sob orientação do Prof. Dr. Marlon Henrique e Silva
Cardoso e do Prof. Dr. Octávio Luiz Franco. -- Campo
Grande, MS : 2025.

87 p.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Católica
Dom Bosco, Campo Grande-MS, Ano 2025
Inclui bibliografia

1. Peptídeos antimicrobianos. 2. Cecropinas. 3. Bioinformática.
4. Resistência antimicrobiana. 5. Mastite bovina.
6. Biotecnologia. I. Cardoso, Marlon Henrique e Silva.
II. Franco, Octavio Luiz. III. Título.

CDD: 660.6



UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO



**“ABORDAGENS IN SILICO NA SELEÇÃO DE CECROPINAS E SUA
APLICAÇÃO NO CONTEXTO DA SAÚDE ANIMAL E HUMANA”**

Autor: LUCAS RODRIGUES DE LIMA

Orientador: Dr. Marlon Henrique e Silva Cardoso

Coorientador: Dr. Octávio Luiz Franco

TITULAÇÃO: Doutor em Biotecnologia

Área de concentração: Biotecnologia.

APROVADA em 03 de julho de 2025.

Prof. Dr. Marlon Henrique e Silva Cardoso (orientador)

Prof. Dr. Octávio Luiz Franco (coorientador)

Prof. Dr. Sérgio Amorin de Alencar (UCB)

Prof. Dr. Nelson Gomes de Oliveira Júnior (UCB)

Profa Dra Elizabete de Souza Cândido (UCDB)

Prof. Dr. Ludovico Migliolo (UCDB)

MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO - UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO

Av. Tamandaré, 6.000 - Jardim Seminário - CEP: 79117-900
Campo Grande - MS - BRASIL CNPJ/MF: 03.226.149/0015-87

Fone: 55 67 3312-3300 - www.ucdb.br

MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO - UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO

Av. Tamandaré, 6000 - Jardim Seminário - CEP: 79117-900 - CAMPO GRANDE - MS - BRASIL
CNPJ/MF: 03.226.149/0015-87 - Fone: 55 67 3312-3300 - Fax: 55 67 3312-3301 - www.ucdb.br

SUMÁRIO	página
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Bactérias patogênicas resistentes.....	15
1.2 Mastite bovina.....	17
1.3 Resistência antimicrobiana na saúde humana.....	19
1.4 Peptídeos antimicrobianos (PAMs).....	23
1.5 Cecropinas.....	22
2. JUSTIFICATIVA E APLICABILIDADE.....	26
3. OBJETIVO GERAL.....	28
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Triagem das sequências de estudo em bancos de dados públicos e análise filogenética em cecropinas naturais.....	29
4.2 Modelagem molecular e validação estrutural.....	29
4.3 Levantamento da atividade e propriedades físico-químicas e estruturais de cecropinas naturais.....	30
4.4 Testes estatísticos de correlação de <i>Pearson</i>	31
4.5 Dinâmica molecular em solução aquosa.....	31
4.6 Dinâmica molecular em membrana de bactéria Gram positiva e Gram negativa.....	32
4.7 Síntese química das cecropinas selecionadas.....	33
4.8 Caracterização estrutural por dicroísmo circular.....	33
4.9 Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM).....	33
4.10 Avaliação da atividade hemolítica.....	34
4.11 Avaliação do potencial citotóxico.....	34
4.12 Modulação da produção de óxido nítrico.....	34
5. RESULTADOS.....	35
5.1 Análise filogenética e extração de padrões em cecropinas naturais	35
5.2 Levantamento da atividade e propriedades físico-químicas e estruturais de cecropinas naturais.....	38
5.3 Modelagem molecular e angulação das cecropinas.....	40
5.4 Testes estatísticos de correlação de <i>Pearson</i>	42
5.5 Dinâmica molecular em água das cinco cecropinas selecionadas.....	45
5.6 Dinâmica molecular em membrana de bactéria Gram-positiva e Gram-negativa das cinco cecropinas selecionadas.....	50
5.7 Caracterização estrutural por dicroísmo circular.....	57
5.8 Determinação de CIM e CBM frente a cepas clínicas isoladas de mastite (<i>Klebsiella</i> sp. e <i>S. aureus</i>), cepas clínicas humanas (<i>Acinetobacter baumannii</i> e <i>P. aeruginosa</i>) e cepas de referência ATCC (<i>E. coli</i> e <i>K. pneumoniae</i>).....	58
5.9 Ensaios hemolíticos e citotóxicos para as cinco cecropinas selecionadas.....	62
6. DISCUSSÃO.....	65
7. CONCLUSÕES	72
8. PERSPECTIVAS.....	73
9. REFERÊNCIAS	73
10. ANEXOS.....	84

LISTA DE TABELAS

página

Tabela 1. Padrões gerados no <i>PRATT 2.1</i>	38
Tabela 2. Concentração bactericida mínima (CBM) das cinco cecropinas de estudo frente as bactérias <i>S. aureus</i> , <i>Klebsiella sp.</i> , <i>A. baumannii</i> , <i>P. aeruginosa</i> , e <i>E. coli</i>	62

LISTA DE FIGURAS

página

Figura 1. Mecanismos de resistência bacteriana a antibióticos. Representação esquemática do desenvolvimento da resistência bacteriana a antimicrobianos: modificação do alvo molecular do fármaco, degradação enzimática do antibiótico, sistemas de efluxo ativo (bombas de efluxo) e formação de biofilmes protetores.....	16
Figura 2. Caracterização da mastite bovina. Infecção por bactérias patogênicas resistentes com impacto na saúde animal, na contaminação do leite e na economia. Figura do autor.....	18
Figura 3. Mecanismos de ação de PAMs na membrana plasmática e no meio intracelular de PAMs	22
Figura 4. Mecanismo de ação das cecropinas em membranas bacterianas. Representação esquemática da interação das cecropinas com a membrana plasmática bacteriana, formando poros que permitindo a passagem de íons para a despolarização da membrana e, conseqüentemente, causando a morte celular.....	24
Figura 5. Alinhamento múltiplo das 41 sequências realizado pelo servidor T-Coffee. A pontuação de alinhamento é apresentada na parte superior da figura. A coloração indica a qualidade do alinhamento, sendo o rosa associado à maior confiabilidade, o amarelo a uma qualidade intermediária e os tons de verde e roxo a regiões de baixa confiabilidade, com o roxo representando a menor qualidade.....	37
Figura 6. Análise filogenética de cecropinas naturais. Árvore de similaridade construída pelo método <i>neighbor-joining</i> (software <i>MEGA 10.2.6</i>), demonstrando a relação evolutiva entre sequências de cecropinas. A análise revelou quatro clados principais correspondentes a diferentes táxons: Lepidoptera, Diptera (dividido entre Muscidae e Culicidae) e Nematoda (com um único representante)	37
Figura 7. Perfil de atividade antimicrobiana de cecropinas contra patógenos humanos. Representação gráfica em <i>heatmap</i> (<i>GraphPad Prism 8</i>) dos valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM, em μM) de 23 cecropinas, onde a intensidade da cor reflete a potência antimicrobiana - tons de azul indicam maior atividade (CIM mais baixa) e tons vermelhos menor atividade (CIM mais elevada)	40
Figura 8. Análise estrutural comparativa de cecropinas por grupo taxonômico. Representação tridimensional das estruturas proteicas preditas pelo <i>AlphaFold2</i> e alinhadas no <i>PyMOL 2.3</i> , destacando as variações no ângulo de abertura das α -hélices entre diferentes grupos taxonômicos.....	42
Figura 9. Análise de correlação de <i>Pearson</i> (software <i>R/Rstudio</i> versão 2022.02.1) entre características físico-químicas e estruturais das cecropinas (momento	

hidrofóbico, hidrofobicidade, ângulo, flexibilidade e potencial eletrostático) e atividade antimicrobiana. Representação gráfica dos coeficientes de correlação de *Pearson* entre os valores de CIM (Concentração Inibitória Mínima) das cecropinas e seis espécies bacterianas mais testadas. Os círculos coloridos indicam a direção (azul significa correlação positiva, vermelho significa negativa) e intensidade (tamanho e saturação representam significância estatística) das relações observadas.....44

Figura 10. Análise de correlação de *Pearson* (*software R/Rstudio* versão 2022.02.1) entre características físico-químicas das cecropinas (momento hidrofóbico, hidrofobicidade, ângulo, flexibilidade e potencial eletrostático) e atividade antimicrobiana frente a *S. aureus* e *K. pneumoniae*. Representação gráfica dos coeficientes de correlação de *Pearson* para cinco cecropinas selecionadas, onde círculos azuis (positivos) e vermelhos (negativos) ilustram a direção e força das correlações (tamanho e saturação representam significância estatística).45

Figura 11. Representação por meio da raiz quadrada média do desvio (RMSD) e a raiz quadrada média da flutuação (RMSF) dos parâmetros resultantes de simulações de dinâmica molecular em água na temperatura de 310 K em tríplicas (preto, verde e vermelho) (*software GROMACS V 5.0.4*) para cecropina A2 (a), cecropina A3 (b), cecropina A6 (c), cecropina A7 (d) e cecropina Md (e)47

Figura 12. Perfil de estabilidade estrutural de cecropinas através da análise de ligações de hidrogênio. Representação da ocupância (>30% do tempo de simulação) de ligações de hidrogênio intrapeptídicas (*software VMD 1.9.3*) em dinâmica molecular (100 ns, 310 K) para cinco cecropinas: (a) A2, (b) A3, (c) A6, (d) A7 e (e) Md.....49

Figura 13. Interação da cecropina A2 com membranas bacterianas após 1.000 ns de dinâmica molecular (*software VMD 1.9.3*). Representação do *frame* final da simulação mostrando o comportamento distinto do peptídeo frente a: (a) membrana de bactéria Gram-positiva e (b) membrana de bactéria Gram-negativa.....50

Figura 14. Interação da cecropina A3 com membranas bacterianas após 1.000 ns de dinâmica molecular (*software VMD 1.9.3*). Representação do *frame* final da simulação mostrando o comportamento distinto do peptídeo frente a: (a) membrana de bactéria Gram-positiva e (b) membrana de bactéria Gram-negativa.....51

Figura 15. Interação da cecropina A6 com membranas bacterianas após 1.000 ns de dinâmica molecular (*software VMD 1.9.3*). Representação do *frame* final da simulação mostrando o comportamento distinto do peptídeo frente a: (a) membrana de bactéria Gram-positiva e (b) membrana de bactéria Gram-negativa.....52

Figura 16. Interação da cecropina A7 com membranas bacterianas após 1.000 ns de dinâmica molecular (*software VMD 1.9.3*). Representação do *frame* final da simulação mostrando o comportamento distinto do peptídeo frente a: (a) membrana de bactéria Gram-positiva e (b) membrana de bactéria Gram-negativa.....53

Figura 17. Interação da cecropina Md com membranas bacterianas após 1.000 ns de dinâmica molecular (*software VMD 1.9.3*). Representação do *frame* final da

simulação mostrando o comportamento distinto do peptídeo frente a: (a) membrana de bactéria Gram-positiva e (b) membrana de bactéria Gram-negativa.....53

Figura 18. Análise de estabilidade estrutural das cecropinas em membranas bacterianas. Representação gráfica de: (a) RMSD em membrana Gram-positiva; (b) RMSD em membrana Gram-negativa; (c) RMSF em membrana Gram-positiva; (d) RMSF em membrana Gram-negativa extraídos pelo *software* GROMACS. As cinco cecropinas estudadas são representadas por cores distintas: A2 (preto), A3 (vermelho), A6 (verde), A7 (azul) e Md (amarelo). Os dados de RMSD e RMSF foram obtidos pelo *software* GROMACS V 5.0.4.....54

Figura 19. Perfil de ligações de hidrogênio em membranas Gram-positivas para cecropinas. Análise da ocupância (>30%) de ligações de hidrogênio intrapeptídicas durante simulações de dinâmica molecular em membrana bacteriana Gram-positiva para: (a) cecropina A2, (b) A3, (c) A6, (d) A7 e (e) Md, obtidos pelo *software* VMD 1.9.3.....55

Figura 20. Perfil de ligações de hidrogênio em membranas Gram-positivas para cecropinas. Análise da ocupância (>30%) de ligações de hidrogênio intrapeptídicas durante simulações de dinâmica molecular em membrana bacteriana Gram-positiva para: (a) cecropina A2, (b) A3, (c) A6, (d) A7 e (e) Md, obtidos pelo *software* VMD 1.9.3.....56

Figura 21. Espectros de dicroísmo circular das cinco cecropinas selecionadas em diferentes soluções, incluindo água ultrapura (a), tampão fosfato de potássio (10 mM) (b), TFE 50% (c) e SDS 100 mM (d). Os espectros mostram a caracterização das estruturas secundária das cecropinas A2 (preto), A3 (vermelho), A6 (azul), A7 (verde) e Md (rosa).....58

Figura 22. Perfil de atividade antimicrobiana de cecropinas contra as bactérias *S. aureus*, *Klebsiella sp.* e *K. pneumoniae*. Representação gráfica em *heatmap* da Concentração Inibitória Mínima (CIM, 64-0,5 μ M) das cecropinas A2, A3, A6, A7 e Md frente a: (a) *S. aureus* isolado clínico de mastite, (b) *S. aureus* ATCC, (c) *Klebsiella sp.* isolado clínico de mastite e (d) *K. pneumoniae* ATCC 13883. A escala cromática azul indica baixa inibição; tons claros indicam alta inibição. C-: controle negativo.....60

Figura 23. Perfil de atividade antimicrobiana de cecropinas contra as bactérias *S. aureus*, *Klebsiella sp.* e *K. pneumoniae*. Representação gráfica em *heatmap* da Concentração Inibitória Mínima (CIM, 64-0,5 μ M) das cecropinas A2, A3, A6, A7 e Md frente a: (a) *A. baumannii* isolado clínico de humano, (b) *E. coli* ATCC e (c) *P. aeruginosa* isolado clínico de humano. A escala cromática azul indica baixa inibição; tons claros indicam alta inibição. C-: controle negativo.61

Figura 24. Análise da atividade hemolítica e efeitos celulares das cecropinas. (a) *Heatmap* da porcentagem de hemólise em diferentes concentrações (64 a 0,5 μ M), em que cores mais vermelhas indicam maior atividade hemolítica (até 80%) e cores mais brancas, menor atividade. Controles: Triton X-100 (C+, hemólise total) e solução salina (C-, baixa hemólise). (b) Viabilidade celular avaliada pelo ensaio de MTT. (c) Produção de óxido nítrico. Asteriscos (*) indicam significância estatística em relação aos controles (Triton X-100 para MTT e LPS para óxidonítrico).....64

RESUMO

O surgimento de bactérias patogênicas resistentes a medicamentos representa um dos maiores desafios atuais para a saúde humana e animal. Esses microrganismos adquirem resistência por meio de diversos mecanismos, como mutações, transferência horizontal de genes e acúmulo de múltiplos genes de resistência, resultando no surgimento das chamadas "superbactérias". Na pecuária, a mastite bovina, frequentemente causada por *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella sp.*, acarreta em prejuízos econômicos significativos, agravados pela crescente ineficácia dos antibióticos. No contexto da saúde humana, patógenos como *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* são classificados como prioritários pela Organização Mundial da Saúde (OMS), ressaltando a urgência no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. Nesse cenário, os peptídeos antimicrobianos (PAMs), especialmente as cecropinas, surgem como alternativas promissoras, devido a seus mecanismos de ação diferenciados em relação aos antibióticos convencionais e à baixa tendência de induzir resistência. Dentre os PAMs as cecropinas apresentam amplo espectro de ação mostrando atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Neste estudo, utilizamos abordagens *in silico* para identificar as cecropinas mais promissoras em bancos de dados, seguidas da aplicação de testes estatísticos de correlação de *Pearson*, que revelaram características relacionadas à atividade antimicrobiana. Cinco cecropinas foram selecionadas, sintetizadas e, posteriormente, caracterizadas por difração circular. Os dados de difração circular corroboraram com os dados de modelagem e dinâmica molecular em solução aquosa e em contato com bicamadas lipídicas. Exceto por uma (cecropina Md), todas as cecropinas inibiram o crescimento de cinco das sete cepas bacterianas testadas, com maior eficácia observada contra bactérias Gram-negativas, um comportamento previamente indicado pelas simulações de dinâmica molecular em membranas bacterianas. Duas cecropinas se destacaram por apresentarem atividade antibacteriana inferior a 2 μM contra um isolado clínico de mastite (*Klebsiella sp.*) e inferior a 1 μM contra um isolado clínico humano de (*Acinetobacter baumannii*). Além disso, essas cecropinas

demonstraram baixo índice de hemólise, baixa citotoxicidade e capacidade de modulação da produção de óxido nítrico. Assim, foi possível evidenciar características associadas à atividade das cecropinas e identificar aquelas com maior potencial antibacteriano e terapêutico.

Palavras-chave: peptídeos antimicrobianos, cecropinas, bioinformática, resistência antimicrobiana, mastite bovina

ABSTRACT

The emergence of drug-resistant pathogenic bacteria represents one of the most significant current challenges to human and animal health. These microorganisms acquire resistance through various mechanisms, including mutations, horizontal gene transfer, and the accumulation of multiple resistance genes, leading to the rise of so-called multidrug-resistant “superbugs.” In livestock, bovine mastitis — often caused by *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella sp.* — results in significant economic losses, further exacerbated by the increasing ineffectiveness of antibiotics. In human health, pathogens such as *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* have been classified as priority threats by the World Health Organization (WHO), underscoring the urgent need for new therapeutic strategies. In this context, antimicrobial peptides (AMPs), particularly cecropins, have emerged as promising alternatives due to their distinct mechanisms of action compared to conventional antibiotics and their low propensity to induce resistance. Among AMPs, cecropins stand out for their broad-spectrum activity, displaying antimicrobial effects against Gram-positive and Gram-negative bacteria. This study used *in silico* approaches to identify the most promising cecropins from public databases, followed by *Pearson* correlation analyses, which revealed physicochemical features associated with antimicrobial activity. Five cecropins were selected, synthesized, and subsequently characterized by circular dichroism spectroscopy, which corroborated the data obtained from molecular modeling and molecular dynamics in aqueous solution and in contact with membrane bilayers. Except for one (cecropin Md), all selected cecropins inhibited the growth of five out of seven tested bacterial strains, with greater effectiveness observed against Gram-negative bacteria, a trend previously indicated by molecular dynamics simulations in bacterial membranes. Two cecropins were particularly effective, exhibiting

antibacterial activity below 2 μM against a clinical isolate of *Klebsiella sp.* associated with bovine mastitis, and below 1 μM against a human clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. Furthermore, these cecropins showed low hemolytic activity, low cytotoxicity toward healthy mammalian cells, and the ability to modulate nitric oxide production. These findings allowed the identification of key features underlying cecropin activity and the selection of the most promising candidates with potent antibacterial and therapeutic potential

Keywords: antimicrobial peptides, cecropins, bioinformatics, antimicrobial resistance, bovine mastitis

1 INTRODUÇÃO

1.1 Bactérias patogênicas resistentes

O surgimento de bactérias patogênicas resistentes a medicamentos constitui um dos desafios dominantes na saúde humana e animal (GUPTA *et al*, 2019). O mecanismo de ação semelhante entre fármacos levou à evolução de resistência cruzada, por exemplo, em bactérias (KORTRIGHT *et al* 2019). As bactérias possuem a capacidade intrínseca (derivada de eras de competição) para evoluir rapidamente por meio de mutações e transferência de DNA, incluindo transferência horizontal de genes, para superar a ameaça representada por diversos agentes antibacterianos (GUPTA *et al*, 2019). Vários genes de resistência a fármacos podem ser adquiridos pela mesma cepa bacteriana, resultando no surgimento de "superbactérias" multirresistentes aos medicamentos convencionais (GUPTA *et al*, 2019). Contudo, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) possuem mecanismos diferentes dos antibióticos tradicionais sendo, assim, amplamente estudados na última década (LEI *et al*. 2019).

Bactérias resistentes a antibióticos apresentam uma gama de mecanismos evasivos. Estes são diversos e incluem (i) alteração do alvo molecular do fármaco, (ii) degradação enzimática de antibióticos, (iii) bomba de efluxo de antibióticos e (iv) formação de biofilme (AHMED, RAMAN e VEERAPPAN, 2016; FIDLER, 2016) (Figura 1). A resistência antimicrobiana tornou-se alarmante e agora é uma preocupação global. Estima-se que a resistência antimicrobiana será responsável por pelo menos 10 milhões de mortes até 2050 (O'NEILL, 2014). As opções sob investigação para abordar esta questão são numerosas. Entre outras estratégias, os PAMs têm atraído muito interesse devido à biocompatibilidade favorável e à baixa probabilidade de induzir resistência bacteriana (PARDHI *et al*, 2020).

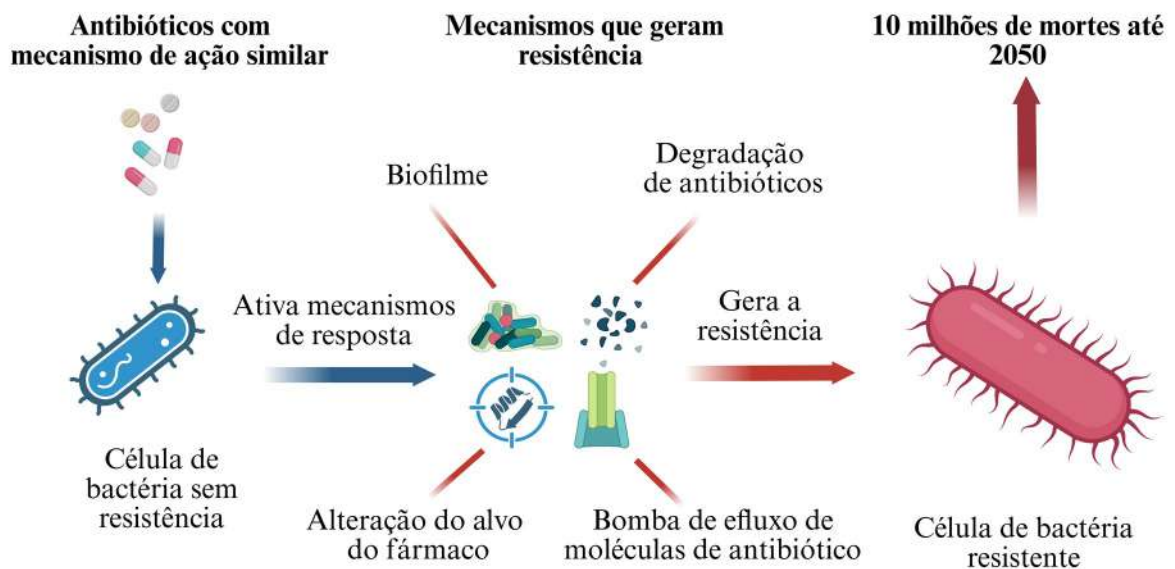


Figura 1. Mecanismos de resistência bacteriana a antibióticos. Representação esquemática do desenvolvimento da resistência bacteriana a antimicrobianos: modificação do alvo molecular do fármaco, degradação enzimática do antibiótico, sistemas de efluxo ativo (bombas de efluxo) e formação de biofilmes. Figura do autor.

O desenvolvimento de antimicrobianos que são menos suscetíveis a mecanismos de resistência evolutiva do que os antibióticos convencionais é um desafio, pois as bactérias possuem três tipos diferentes de resistência antimicrobiana: intrínseca, adquirida e resistência fenotípica ou adaptativa (OLIVARES et al., 2013; MAGANA et al., 2020). Esses compostos são considerados uma opção promissora para substituir os antibióticos que estão enfrentando um desafio crescente em sua eficácia (TRIMBLE et al., 2016; MAGANA et al., 2020). Um dos problemas mais relevantes causados por bactérias resistentes no âmbito da saúde animal é a mastite bovina, comumente causada por *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Klebsiella spp.* A mastite bovina está categorizada como a doença de maior prevalência no gado leiteiro em todo o mundo, e será abordada em detalhes no tópico a seguir (BRESER et al., 2018; ROMERO et al., 2018).

1.2 Mastite bovina

A mastite bovina é uma condição inflamatória que afeta as glândulas mamárias de vacas. Essa inflamação, também conhecida como inflamação intramamária, pode ser principalmente causada por infecções bacterianas, sendo classificada em dois tipos com base em sua epidemiologia, mastite contagiosa e mastite ambiental (GARCIA, 2004; SHARUN et al., 2021). A mastite bovina é causada predominantemente por bactérias Gram-negativas, especialmente coliformes como *E. coli*, *Klebsiella spp.* e *Enterobacter spp.* (OLIVEIRA et al., 2013; ZHENG et al. 2022). Além disso também pode ser causada por bactérias Gram-positivas como *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Mycoplasma spp.* (SHARUN et al., 2021). Essas bactérias são transmitidas de uma vaca infectada para uma vaca saudável, geralmente durante a ordenha, por meio das mãos, toalhas ou máquinas de ordenha, atuando como reservatórios bacterianos. Por outro lado, a mastite ambiental é causada por bactérias presentes principalmente fora da sala de ordenha. Nesse caso, as bactérias responsáveis pela infecção provêm do ambiente da vaca, como material de cama, solo, esterco, fezes e água estagnada (GARCIA, 2004; SHARUN et al., 2021).

A mastite bovina consiste em uma infecção prevalente em bovinos lactantes. Além disso, a mastite bovina pode ser uma patologia complexa, haja vista que pode ser influenciada por múltiplos fatores, como diferentes microrganismos, formas da doença (clínica ou subclínica), origem e forma de transmissão (contagiosa ou ambiental) (THOMPSON-CRISPI et al., 2014; DE VLIEGHER et al., 2012). A mastite bovina é considerada a doença que mais impacta economicamente a indústria de laticínios no mundo (BRESER et al., 2018) (Figura 2). Segundo Paramasivam et al. (2023), as perdas econômicas mundiais causadas pela mastite bovina ultrapassam USD 32 bilhões anuais, considerando os impactos diretos e indiretos da doença nos sistemas de produção de leite. Ademais, segundo a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), mais de 6 bilhões de pessoas no mundo consomem leite e produtos lácteos, sendo que cerca de 81% da produção mundial de leite provém do gado bovino (FAO 2023). Assim, é inegável o controle e tratamento de doenças como a mastite bovina, não só pelas perdas econômicas

geradas nos sistemas de produção de lácteos, mas também pelo impacto produzido no bem-estar animal e na segurança alimentar da população mundial.

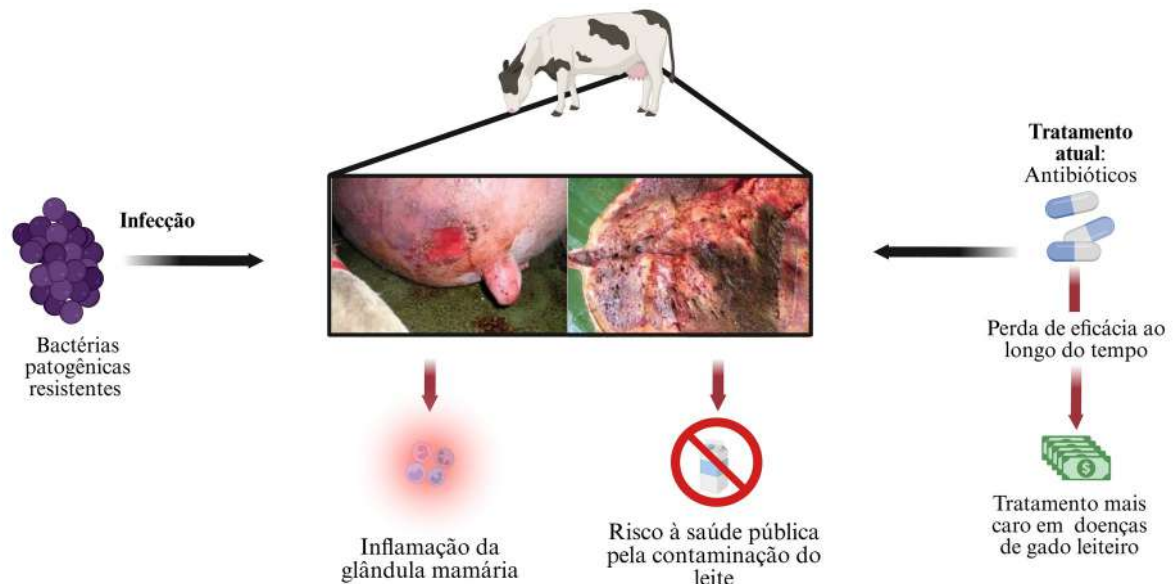


Figura 2. Caracterização da mastite bovina. Infecção por bactérias patogênicas resistentes com impacto na saúde animal, na contaminação do leite e na economia. Figura do autor.

Tanto a mastite clínica quanto a subclínica causam perda de leite, pois este deve ser descartado, além do custo do tratamento e outros custos associados (HALASA et al., 2007; KUMAR et al., 2010). A mastite subclínica causa três vezes mais perdas de produção do que a mastite clínica e, portanto, é responsável por 60-70% das perdas econômicas totais (DE VLIEGHER et al., 2012; SINHA et al., 2014; SHARUN et al., 2021). Um dos métodos de tratamento empregados para a mastite bovina envolve a utilização de antibióticos. No entanto, a eficácia da antibioticoterapia há muito tempo é comprometida no caso da mastite causada por *S. aureus*, sendo este é o agente mais desafiador a ser erradicado nos rebanhos.

Diversos estudos investigaram a sensibilidade *in vitro* a antibióticos de microrganismos isolados de mastite bovina e relataram diferentes níveis da resistência aos antibióticos entre os isolados (LÉON-GALVÁN et al., 2015; SU et al., 2016; SHAH et al., 2019; SHARUN et al., 2021). O crescimento acelerado e a expansão global da resistência antimicrobiana aprofundaram a necessidade de descoberta de novos agentes antimicrobianos. Os PAMs, por exemplo, apresentam

claras vantagens sobre os antibióticos convencionais, incluindo uma menor propensão à indução de resistência, atividades antibacteriana e antibiofilme de amplo espectro e, em alguns casos, a capacidade de modular favoravelmente a resposta imune do hospedeiro (MAGANA et al, 2020).

1.3 Resistência antimicrobiana na saúde humana

A resistência antimicrobiana (RAM) na saúde humana também se tornou alarmante e agora é uma preocupação global. Mais de 2,8 milhões de infecções resistentes a antimicrobianos ocorrem todos os anos e mais de 35.000 pacientes morrem como resultado. Em 2019, na segunda versão do relatório dos Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) sobre ameaças de resistência em bactérias, a agência categorizou as ameaças da RAM como urgentes, graves, preocupantes ou a serem observadas (FLYNN, 2023).

Em fevereiro de 2017, para focar e orientar a pesquisa e o desenvolvimento relacionados a novos antibióticos, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou sua lista de patógenos para os quais o desenvolvimento de novos antimicrobianos é urgentemente necessário. Nesta ampla lista, os patógenos ESKAPEE (*Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Enterobacter*) foram designados como “status prioritário” (DE OLIVEIRA, et al., 2020).

Entre os patógenos bacterianos, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e *E. coli* destacam-se em infecções nosocomiais e intestinais, sendo a *A. baumannii* uma das principais causas de infecções nosocomiais devido à sua facilidade na subversão das defesas naturais do corpo humano, além de adquirir facilmente resistência a antibióticos, e podendo desenvolver-se em superfícies bióticas e abióticas para a formação de biofilmes (ROY et al., 2022). Em seguida, podemos citar a *P. aeruginosa* que é uma das principais causadoras de infecções agudas graves e crônicas persistentes. Sua tolerância intrínseca e genes específicos do biofilme dificultam o tratamento, favorecendo resistência a antibióticos. Além disso, possui notável capacidade de desenvolver resistência por meio das mutações cromossômicas, evidenciada em seu resistoma altamente versátil (FERNÁNDEZ et al., 2023). Já em cepas de *E. coli*,

o mecanismo mais prevalente continua sendo a aquisição de genes de resistência por meio de transferência horizontal de genes, facilitada por elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons (NASROLLAHIAN et al., 2024). Certas cepas de *E. coli* se adaptaram ao seu ambiente e desenvolveram fatores de virulência específicos que aumentam sua capacidade de se ajustar a novos ambientes, permitindo-lhes causar uma variedade de doenças, incluindo infecções intestinais e extraintestinais (MAFOKWANE et al., 2023; MUELLER e TAINTER, 2023).

1.4 Peptídeos antimicrobianos (PAMs)

A descoberta dos PAMs remonta a 1939, quando Dubos (1939) extraiu um agente antimicrobiano de uma cepa de *Bacillus* do solo denomina do gramicidina. Desde então, diversos PAMs foram descobertos em procariotos e eucariotos (BOPARAI JK et al., 2020). Os PAMs representam um grupo de peptídeos com propriedades biológicas, divididos em muitos subgrupos com base em sua composição e arranjo de aminoácidos, estrutura, entre outras propriedades, como carga, hidrofobicidade e momento hidrofóbico (BOPARAI JK et al., 2020; TRAVKOVA, O.G et al., 2017; PERSICO, M et al., 2017). As estruturas secundárias de PAMs podem ser divididas em quatro perfis principais que incluem: (i) α -helicoidal; (ii) folhas- β , podendo ou não haver a presença de ligações dissulfeto; (iii) β -*hairpin* ou *loop*, podendo haver ligações dissulfeto e/ou ciclização da cadeia peptídica; e (iv) estruturas estendidas (BOPARAI JK et al., 2020; WANG G., 2017).

Os PAMs são encontrados em vários organismos, desde procariotos até humanos e têm uma ampla faixa de atividade antibacteriana (A ROM PARK et al., 2021; MISHRA B et al., 2017). PAMs são geralmente definidos como um pequeno grupo de peptídeos variando de 6 a 50 aminoácidos e com carga líquida positiva variando de +2 a +11 (A ROM PARK et al., 2021; PASUPULETI M et al., 2012; MAHLAPUU M et al., 2016).

As interações entre PAMs positivamente carregados com membranas bacterianas carregadas negativamente desencadeiam a disrupção ou desestabilização da bicamada lipídica, resultando na formação de poros e na eventual inviabilidade das cepas bacterianas (A ROM PARK et al., 2021;

MAHLAPUU M. et al., 2016). Além dos PAMs catiônicos, também foram descritos alguns poucos PAMs aniônicos, sendo estes menos comuns (BOPARAI J. K. et al., 2020; HARRIS F. et al., 2009). Uma característica positiva dos PAMs é sua baixa propensão para o desenvolvimento de resistência (Figura 3), que pode ser atribuída ao seu modo de ação diferenciado na membrana plasmática, onde nativamente se dobram em uma estrutura anfifílica tridimensional que causa a ruptura das células bacterianas (BOPARAI J. K. et al., 2020; DA COSTA J. P. et al., 2015).

Os PAMs, em geral, inibem o crescimento ou erradicam cepas bacterianas por meio de mecanismos associados à membrana, mas também podem atuar adentrando as células para interagir com componentes intracelulares (BENFIELD; AURÉLIE, 2020). A compreensão do mecanismo de muitos PAMs intracelulares ainda está em processo de elucidação. Recentemente, foi evidenciado que a subclasse de PAMs ricos em prolina é capaz de transpor a barreira da membrana bacteriana e destruir bactérias por meio da inibição da síntese proteica, agindo diretamente no ribossomo (GRAF; WILSON, 2019). Adicionalmente, estudos sugeriram que os PAMs têm a capacidade de atravessar a membrana celular sem criar poros, o que pode envolver processos regulados por receptores (ULMSCHNEIDER, 2019). Uma vez que essas moléculas penetram nas membranas das bactérias, podem interagir com macromoléculas e processos biológicos no interior da célula, como a replicação do DNA e a inibição da transcrição (FRIEDRICH et al., 2001; ULVATNE et al., 2004). Além disso, foi demonstrado que os PAMs desativam chaperonas bacterianas que desempenham um papel no dobramento de proteínas, resultando em efeitos bactericidas também ao interromper a síntese de proteínas (OTVOS, 2002; GRAF e WILSON, 2019; CARDOSO et al., 2019) (Figura 3).

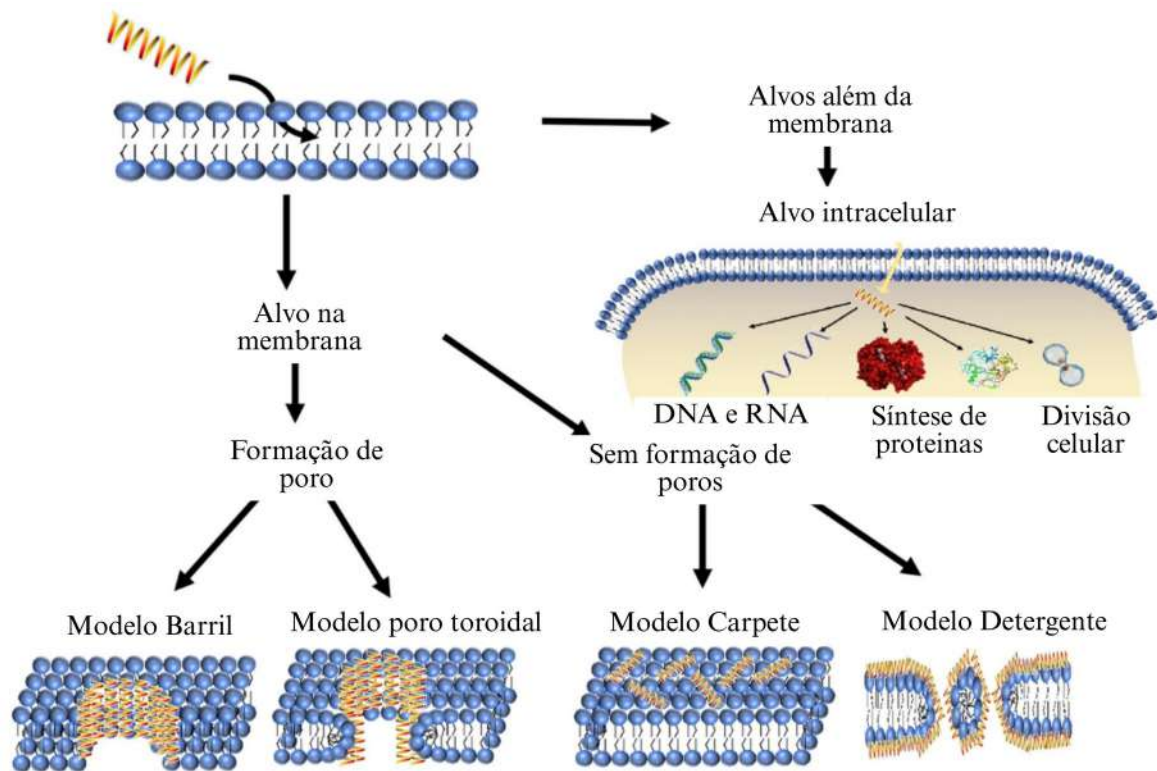


Figura 3. Principais mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos (PAMs), na membrana plasmática com formação de poros (barril e toroidal), não formação de poros (modelo carpete e detergente) e no meio intracelular (ação no DNA, RNA, síntese de proteínas e divisão celular). Adaptado de Zheng *et al*, 2025.

Alguns PAMs mostraram ser eficientes no combate à mastite bovina, como é o caso das β -defensinas, catelicidinas e bacteriocinas. As β -defensinas atuam como a primeira linha de defesa do sistema imune em gado leiteiro (GURAO *et al.*, 2017). Já as catelicidinas conseguem controlar diretamente a infecção e regular as defesas do hospedeiro, o que lhes permite ter atividade antimicrobiana de amplo espectro direcionada contra bactérias (YOUNG-SPEIRS *et al.*, 2018). Por fim, as bacteriocinas também são consideradas como um tratamento promissor (AHMAD *et al.*, 2017). A nisina e a bovicina HC5 são os dois principais exemplos de bacteriocinas com efeito terapêutico bem estabelecido contra microrganismos responsáveis pela mastite (CASTELANI *et al.*, 2019; GODOY-SANTOS *et al.*, 2019). Porém, existem alguns PAMs que ainda não foram aplicados contra a mastite bovina. Dentre eles, podemos citar as cecropinas. Um claro crescimento da pesquisa acerca dos PAMs começou na década de 80, devido à descoberta das

cecropinas de insetos por Hans Boman, defensinas humanas por Robert Lehrer e magaininas por Michael Zasloff (SELSTED et al., 1985; STEINER et al., 1981). Dito isso, a presente proposta tem como peptídeo alvo de estudo a classe das cecropinas, a qual será mais bem discutida nos tópicos a seguir.

1.5 Cecropinas

As cecropinas foram descobertas pela primeira vez nas pupas da mariposa *Cecropia* (*Hyalophora cecropia*). Esses peptídeos constituem uma família de PAMs provenientes de invertebrados, encontrados especialmente em insetos. As cecropinas são classificadas em subfamílias: A, B, C, D, E e F (HULTMARK et al., 1982). A cecropina B mostra maior efetividade contra bactérias, seguida das cecropinas A e D, tanto para bactérias Gram-positivas quanto para Gram-negativas. As cecropinas são anfipáticas e, em sua maioria, constituem peptídeos lineares altamente básicos, compostos de 31 a 39 aminoácidos, os quais podem formar α -hélices flexíveis em ambientes hidrofóbicos. Elas possuem uma parte N-terminal hidrofílica contendo resíduos carregados, associada a uma região hidrofóbica entre os resíduos 22-30, assim como uma extremidade C-terminal mais hidrofílica (PARK et al., 2021). Essas características permitem a formação de canais iônicos nas membranas plasmáticas bacterianas, dissipando o potencial de membrana devido à liberação de prótons e, conseqüentemente, levando à morte celular (CHRISTENSEN et al., 1988) (Figura 4).

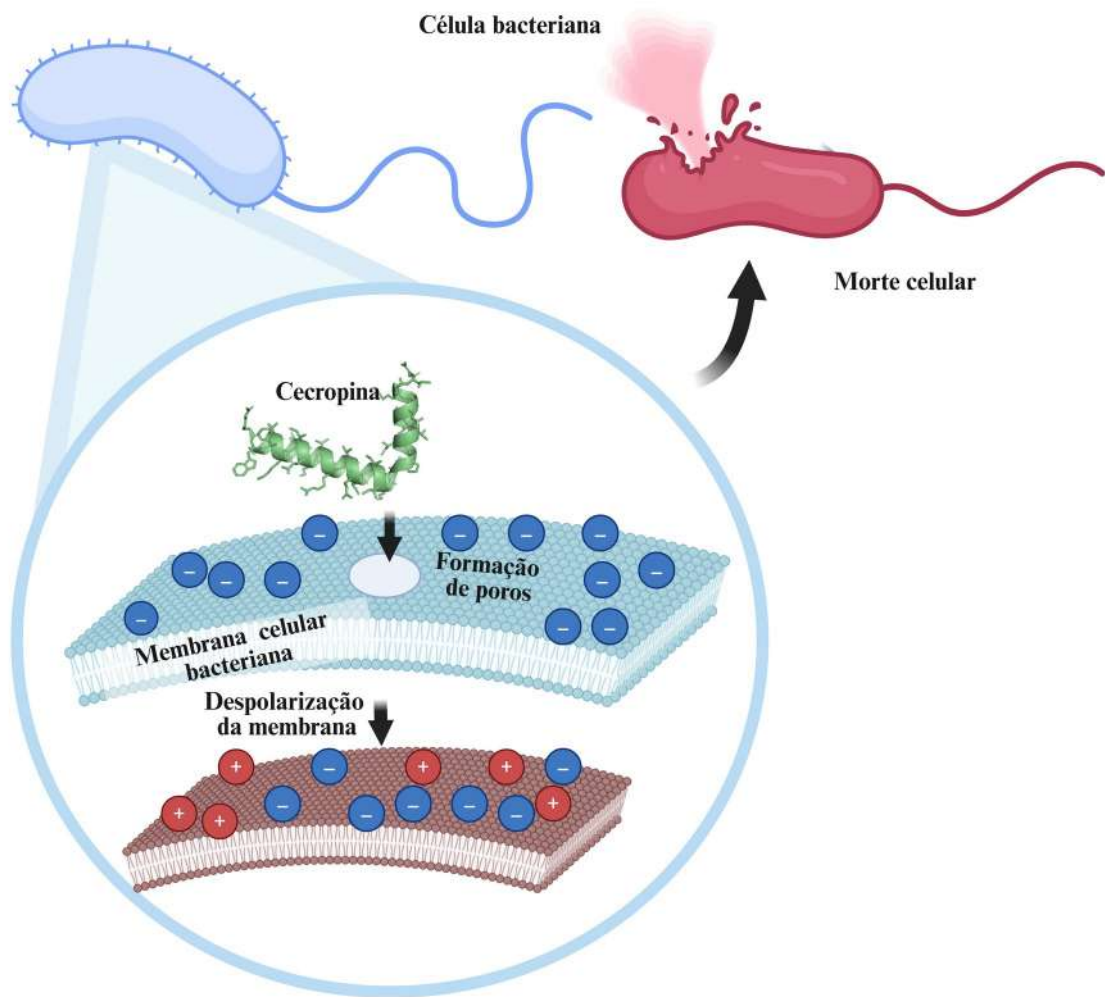


Figura 4. Mecanismo de ação das cecropinas em membranas bacterianas. Representação esquemática da interação das cecropinas com a membrana plasmática bacteriana, formando poros e permitindo a passagem de íons para a despolarização da membrana, levando a morte celular. Figura do autor.

A cecropina A (CeA) representa um PAM catiônico linear produzido pela mariposa *Hyalophora cecropia* (SILVESTRO et al., 1997). Essa cecropina é composta por 37 aminoácidos, incluindo uma região N-terminal altamente básica, uma região flexível e uma região C-terminal altamente hidrofóbica (GREGORY et al., 2008; SILVESTRO et al., 2000). A CeA demonstra atividade tanto contra bactérias Gram-positivas quanto contra bactérias Gram-negativas. Em termos de mecanismo de ação, a CeA inicialmente se liga aos lipídios de membrana carregados negativamente devido à sua carga fortemente positiva no N-terminal e, em seguida, induz a formação de poros por meio de sua região C-terminal

hidrofóbica, o que torna a membrana permeável, eventualmente levando à morte das bactérias (GREGORY et al., 2008; SILVESTRO et al., 2000). A CeA exibe uma atividade forte e rápida contra patógenos invasores e células tumorais, desempenhando um papel importante na resposta imune em insetos (WANG et al., 2019).

No trabalho de Bolouri et al. (2016), uma cecropina A de *Galleria mellonella* foi testada contra cepas de *Micrococcus luteus* (Gram-positiva). As cepas bacterianas foram eliminadas a uma concentração de 8 mM. Em um trabalho mais recente (2019), foi extraída uma cecropina de *Musca domestica*, a qual foi classificada como cecropina 4 (41 aminoácidos), variando o balanço de carga e hidrofobicidade para obter PAMs menores. O peptídeo derivado C18 (16 aminoácidos) demonstrou uma concentração inibitória mínima (CIM) de 4 mM contra o *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA).

A cecropina B natural é composta por 35 aminoácidos e é um membro da família das cecropinas com a maior atividade antibacteriana (WANG et al., 2011). A cecropina B é um tipo de PAM, sendo uma molécula com várias atividades biológicas, incluindo antimicrobiana, antitumoral e antiviral (HOSKIN et al., 2008). Essa cecropina desempenha sua função causando perturbações na membrana pela formação de poros (WANG et al., 2018). Já a cecropina C é atualmente pouco descrita na literatura no que tange suas propriedades antimicrobianas. Já a cecropina C é atualmente pouco descrita na literatura no que tange suas propriedades antimicrobianas, sendo compostas por 37 aminoácidos (ZIAJA et al., 2020).

A cecropina D, por sua vez, apresenta homologia com as cecropinas A e B, pois cada uma tem aproximadamente o mesmo tamanho (cecropina A: 37 resíduos; cecropina B: 35 resíduos; e cecropina D: 36 resíduos), e cada uma delas contém uma região amino-terminal hidrófila e um terminal carboxilo amidado hidrofóbico. No entanto, a cecropina D é menos básica (carga líquida: +3) do que as cecropinas A e B (cargas líquidas: +7 e +8, respectivamente). Além disso, a cecropina D é menos ativa contra a maioria das bactérias já testadas (FINK et al., 1989). Em 1982, pesquisadores investigaram proteínas antibacterianas de baixo peso molecular a partir da mariposa *H. cecropia*. Naquele trabalho, além das cecropinas A e B

previamente descritas, outras cecropinas foram descobertas, incluindo as cecropinas C, D, E e F (HULTMARK et al., 1982).

Existem ainda derivações dessas classificações que podem ser nomeadas dependendo do estudo. Como exemplo, em um trabalho de 2017, pesquisadores investigaram uma cecropina derivada da cecropina A de *Aedes aegypti*, denominada cecropina A2, um peptídeo catiônico com estrutura α -helicoidal composto por 36 resíduos. No entanto, apesar de compartilhar o mesmo nome, essa cecropina A2 não é necessariamente idêntica a outras cecropinas A2 descritas na literatura (ZHENG et al., 2017). Como exemplo, em outro estudo de 2017, foi testada uma cecropina A, também nomeada cecropina A2, porém extraída de *M. domestica* (DE WEI et al., 2017). Dessa forma, em ambos os trabalhos as cecropinas foram nomeadas como cecropina A2, mesmo sendo cecropinas diferentes, demonstrando assim um gargalo na classificação das cecropinas já descritas. Além disso, existem classificações que pertencem somente a um grupo, como a cecropina P1, isolada do nematoide *Ascaris suum* (GU et al., 2022).

Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo selecionar as melhores cecropinas descritas na literatura em termos de atividade e estabilidade, utilizando abordagens computacionais, e investigar seu potencial no combate às bactérias causadoras da mastite bovina e de doenças infecciosas em humanos. Portanto, os resultados deste estudo podem contribuir para gerar soluções mais eficazes no combate a bactérias relevantes para a saúde animal e humana, bem como para a compreensão e aplicação das cecropinas como bioprodutos.

2. JUSTIFICATIVA E APLICABILIDADE

A mastite bovina é o principal desafio causado por doenças na produção enfrentado pela indústria global de laticínios, sendo a doença mais cara e prevalente em gado leiteiro em todo o mundo com custo de 32 bilhões de dólares anuais. Além disso, a resistência a antimicrobianos (RAM) vem impactando a saúde humana de forma alarmante, com mais de 2,8 milhões de infecções resistentes anuais e 35.000 mortes associadas, segundo dados dos *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) dos Estados Unidos da América (EUA). Patógenos prioritários como *A. baumannii* e *P. aeruginosa* exemplificam a gravidade do

problema, com altas taxas de mortalidade e mecanismos de resistência complexos. Nesse contexto, os PAMs têm mostrado resultados promissores devido ao seu mecanismo de ação ser, usualmente, diferente daqueles exercidos por antibióticos convencionais. Vários PAMs mostraram capacidade de combater a mastite bovina e infecções em humanos (por exemplo, β -defensinas, catelicidinas e bacteriocinas). Porém, dentre as diversas classes de PAMs, as cecropinas ainda não foram amplamente aplicadas nesse contexto. As cecropinas têm se destacado em vários estudos por sua habilidade em combater uma ampla gama de microrganismos, enfatizando sua relevância na imunidade de invertebrados, notadamente em insetos. Além disso, os estudos mais recentes mostram novas cecropinas sendo descobertas, as quais apresentam atividade antibacteriana. Entretanto, o processo de descoberta e teste de novos PAMs ainda demanda muitos recursos, sendo laborioso e de alto custo. Nesse contexto, o presente projeto busca utilizar análises evolutivas, extração de padrões de aminoácidos, extração de características físico-químicas e estruturais, e análises de dinâmica molecular para selecionar, através de métodos computacionais, as melhores cecropinas disponíveis para combater a mastite bovina e cepas isoladas de infecções em humanos. Essa seleção será baseada em sequências e estruturas de todas as cecropinas naturais descritas na literatura até o momento. Além disso, com base nessas informações, será possível identificar as determinantes para uma atividade específica (por exemplo, atividade contra bactérias Gram-negativas ou Gram-positivas). Dessa forma, esperamos identificar quais cecropinas têm o melhor desempenho frente às infecções animais e humanas supracitadas.

3. OBJETIVO GERAL

Determinar através de abordagens computacionais quais as cecropinas com o maior potencial em combater bactérias de relevância na saúde animal e humana.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Identificar e extrair as cecropinas naturais depositadas nos bancos de dados públicos;
- ii. Identificar as cecropinas naturais testadas e extrair os dados de atividade antibacteriana;
- iii. Separar as cecropinas em grupos distintos com base em análise filogenética;
- iv. Extrair as propriedades físico-químicas e estruturais das cecropinas;
- v. Selecionar as melhores cecropinas com base em análises computacionais;
- vi. Analisar o comportamento das cecropinas selecionadas por meio de simulação com membrana de bactéria Gram-positiva e Gram-negativa.
- vii. Sintetizar os peptídeos selecionados;
- viii. Caracterizar as cecropinas por dicroísmo circular;
- ix. Determinar o potencial antibacteriano das cecropinas sintetizadas;
- x. Determinar o potencial hemolítico, citotóxico e de modulação de óxido nítrico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 *Triagem das sequências de estudo em bancos de dados públicos e análise filogenética em cecropinas naturais*

As sequências de cecropinas naturais foram obtidas das bases de dados *Antimicrobial Peptide Database* (APD), *Yet Another Database of Antimicrobial Peptide* (YADAMP), *Database of Antimicrobial Activity and Structure of Peptides* (DBAASP) e *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Um total de 550 sequências foi inicialmente identificado. Posteriormente, foram eliminadas as redundâncias entre os bancos de dados, resultando em 263 sequências únicas. A partir dessas sequências, foi realizado um levantamento das que apresentavam atividade biológica documentada. Do total inicial de 263 sequências, verificou-se que 107 delas possuíam atividade biológica documentada. Um alinhamento foi então conduzido utilizando o servidor *T-Coffee* e aprimorado através do servidor *TCS*, resultando em 93 sequências após a remoção das que prejudicavam o alinhamento. Com essas 93 sequências, uma árvore filogenética foi construída utilizando o servidor *IQ-TREE*. No entanto, apesar dos esforços, não foi possível extrair padrões de aminoácidos dos grupos taxonômicos através do servidor *PRATT 2.1*. Uma análise subsequente revelou que as sequências provenientes do NCBI poderiam não estar devidamente anotadas sendo, portanto, excluídas e resultando em um total de 44 sequências identificadas. Com esse conjunto de cecropinas naturais, um novo alinhamento foi realizado utilizando o servidor *T-Coffee* e seguido do refinamento pelo servidor *TCS*. Após essa etapa, obteve-se um total de 41 sequências alinhadas adequadamente. Uma árvore de similaridade foi gerada pelo método *neighbor-joining* utilizando o software *MEGA 10.2.6*, com o objetivo de classificar as sequências em grupos distintos. A partir dos resultados da árvore de similaridade, foram extraídos padrões de aminoácidos para cada grupo de sequências representado na árvore utilizando o servidor *PRATT 2.1*.

4.2 *Modelagem molecular e validação estrutural*

As estruturas tridimensionais das 40 sequências foram obtidas por meio de modelagem molecular utilizando o *software AlphaFold2*, uma ferramenta baseada em inteligência artificial projetada para prever coordenadas atômicas de peptídeos e proteínas com alta precisão (JUMPER et al., 2021). Os modelos 3D gerados foram submetidos a um processo de validação para garantir a confiabilidade e precisão das estruturas obtidas.

Inicialmente, os modelos teóricos foram verificados por meio do diagrama de Ramachandran, que avalia a conformação dos ângulos diédricos de peptídeos/proteínas, indicando se a estrutura está estereoquimicamente aceitável. Além disso, os modelos também foram avaliados pelos *g-factors* no servidor *PDBsum*, o qual mensura a qualidade do ajuste da estrutura em relação aos dados experimentais. Posteriormente, para avaliar a qualidade do dobramento dos modelos, foi realizada a medição de *z-score* no servidor *ProSA-web*. O *z-score* é um indicador estatístico que fornece uma medida da conformidade de uma estrutura de peptídeo/proteína com as estruturas esperadas para peptídeos/proteínas com estruturas resolvidas por difração de raios-X ou ressonância magnética nuclear (RMN) e depositadas no *Protein Data Bank* (PDB).

4.3 Levantamento da atividade e propriedades físico-químicas e estruturais de cecropinas naturais

Foi realizado um levantamento da atividade dessas cecropinas em μM utilizando estudos que testaram as cecropinas frente a bactérias patogênicas para humanos em um total de 22 bactérias (uma vez que não há cecropinas avaliadas frente a bactérias provenientes de animais). Após isso, as informações físico-químicas foram obtidas. Essas informações incluem a hidrofobicidade e o momento hidrofóbico, os quais foram calculados por meio do servidor *Heliquest*. Além disso, a flexibilidade foi avaliada ao somar a flexibilidade individual de cada aminoácido e extrair a média desses valores, seguindo a abordagem de Bhaskaran and Ponnusway (1988). Por fim, também foi registrado o ângulo de quebra de hélice. O ângulo de quebra de hélice foi mensurado utilizando os quatro resíduos antes e quatro resíduos depois do resíduo que se encontrava no meio da quebra de hélice. Esta medição foi realizada pelo *software PyMol* versão 2.3.

4.4 Testes estatísticos de correlação de Pearson

A partir dos dados de características físico-químicas e estruturais, foram aplicados dois testes de correlação de *Pearson* utilizando o *software R/Rstudio* versão 2022.02.1 com o objetivo de verificar se algumas das características apresentavam correlação com os dados de atividade. As características analisadas foram: momento hidrofóbico, hidrofobicidade, ângulo, flexibilidade e potencial eletrostático. No primeiro teste, foram considerados os dados de atividade para as seis bactérias mais testadas (variando entre seis e doze cecropinas), visto que, para as demais bactérias, o número de sequências testadas era insuficiente para a realização do teste estatístico. O segundo teste teve como objetivo confirmar os resultados obtidos no primeiro, sendo realizado apenas com as duas espécies de bactérias cujas cecropinas testadas apresentaram maior correlação estatística.

4.5 Dinâmica molecular em solução aquosa

A partir dos dados de atividade, foram selecionadas cinco cecropinas, incluindo as cecropinas A2 e A7 de *Anopheles gambiae*, cecropina A3 de *Ae. aegypti*, cecropina A6 de *Spodoptera litura* e cecropina Md de *M. domestica*, para simulações de dinâmica molecular em água. As simulações foram realizadas com o *software GROMACS v.5.0.4*, utilizando o campo de força GROMOS96 43a1, à temperatura de 310 K (Kelvin), por 100 ns (nanossegundos), em triplicata. As dinâmicas ocorreram em caixas cúbicas, sob força iônica de 0,15 M NaCl. A geometria das moléculas de água foi restringida pelo algoritmo *SETTLE* (MIYAMOTO & KOLLMAN, 1992), enquanto o algoritmo *LINCS* foi utilizado para restringir todos os comprimentos de ligação. O método *Particle Mesh Ewald* (PME) foi aplicado para correções eletrostáticas, com raio de corte de 1,4 nm, valor também empregado para as interações de van der Waals. A lista de vizinhos foi atualizada a cada 10 etapas de simulação de 2 fs. A minimização de energia foi realizada por meio do algoritmo de descida mais íngreme, com 50.000 passos. Após o término das simulações, foram calculados o *Root Mean Square Deviation* (RMSD) e o *Root Mean Square Fluctuation* (RMSF) de cada réplica, a fim de avaliar a estabilidade das cecropinas. Além disso, foram calculadas as ocupâncias para

identificar quais ligações de hidrogênio se mantiveram mais estáveis durante as dinâmicas moleculares (CARDOSO et al., 2022).

4.6 Dinâmica molecular em membrana de bactéria Gram positiva e Gram negativa

Para verificar como as cinco cecropinas selecionadas interagem com membranas bacterianas, foram realizadas dinâmicas moleculares em modelos de membranas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, totalizando dez simulações — cinco para cada tipo de bactéria, com uma cecropina por simulação. Os sistemas de membrana foram montados no servidor *CHARMM-GUI* utilizando proporções consensuais descritas na literatura, com 60% de POPE (fosfatidil-etanolamina), 35% de POPG (fosfatidil-glicerol) e 5% de CL (cardiolipina) para membranas Gram-positivas; e 65% de POPE, 25% de POPG e 10% de CL para as Gram-negativas. Foi utilizado o campo de força CHARMM36, e as cecropinas foram colocadas a ~27 nm das bicamadas lipídicas. As simulações foram conduzidas com o software *GROMACS* versão 5.0.4. Todas as simulações ocorreram sob força iônica de 0,15 M de NaCl. A geometria das moléculas de água foi mantida com o algoritmo *SETTLE* (MIYAMOTO, 1992), e o algoritmo *LINCS* (HESS, 1997) foi empregado para preservar a integridade dos comprimentos das ligações atômicas. Para as correções eletrostáticas, foi utilizado o método *Particle Mesh Ewald* (PME) (EWALD, 1921), com raio de corte de 1 nm, valor também aplicado às interações de van der Waals. A lista de vizinhos para cada átomo foi atualizada a cada 10 passos de simulação, com duração de 2 fs cada. A minimização de energia foi realizada pelo algoritmo de descida mais íngreme (50.000 passos). Posteriormente, os sistemas passaram por processo de equilíbrio de temperatura e pressão, sendo estabilizados em 310 K e 1 bar por 100 ps, utilizando o termostato de reescalonamento de velocidade (NVT) (BUSSI, 2007) e o barostato *Parrinello-Rahman* (NPT) (PARRINELLO, 1981), respectivamente. Após a obtenção de sistemas equilibrados e com energia minimizada, foram conduzidas simulações de dinâmica molecular com duração de 1000 ns. Após o término das dinâmicas, os dados foram analisados por RMSD, RMSF e ocupância das ligações de hidrogênio, sendo esta última extraída com o software *VMD* 1.9.3.

4.7 Síntese química das cecropinas selecionadas

As cecropinas selecionadas para ensaios biofísicos e biológicos foram adquiridas da empresa *Peptide 2.0 Incorporated* (USA), a qual realizou a síntese através da metodologia de fase sólida F-moc (9-fluorenilmetiloxycarbonilo) com 95% de pureza.

4.8 Caracterização estrutural por dicroísmo circular

As cinco cecropinas selecionadas foram caracterizadas por dicroísmo circular (DC). As análises foram realizadas com as cecropinas a 50 μM em diferentes ambientes: água ultrapura, solução tampão fosfato de potássio (10 mM), 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) a 30% (v/v) em água e dodecil sulfato de sódio (SDS) a 50 mM. Os espectros de DC foram obtidos na faixa de 185 a 260 nm no UV, a 25 °C, utilizando um espectropolarímetro JASCO (J-810/815) equipado com controlador de temperatura do tipo Peltier, com velocidade de varredura de 50 nm min⁻¹. A resolução espectral foi de 0,1 nm, com tempo de resposta de 1 s e cinco acumulações de varredura por amostra. Todos os espectros foram analisados com o algoritmo de transformada rápida de Fourier (*Fast Fourier*) da JASCO, com correção da linha de base.

4.9 Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada frente a cepas bacterianas associadas à mastite bovina e isolados clínicos humanos, incluindo cepas susceptíveis e resistentes, disponíveis no Laboratório de Microbiologia do S-Inova Biotech da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB). Os ensaios foram realizados utilizando o método de microdiluição em caldo, conforme o protocolo M7-A6 do National Committee for Clinical Laboratory Standards, em microplacas de 96 poços. As suspensões bacterianas foram previamente ajustadas para $2-5 \times 10^6$ unidades formadoras de colônias (UFC) mL⁻¹, e aplicadas nos poços contendo os peptídeos em teste entre as concentrações de 64 à 0,5 μM . As microplacas foram incubadas a 37 °C, e a leitura da densidade óptica (DO_{600 nm}) foi realizada após 24 horas. Em seguida, uma alíquota de 10 μL de células provenientes dos poços da CIM foi diluída (1:10, v/v), semeada em meio Mueller-Hinton ágar (MHA) e incubada

a 37 °C por 24 horas. Após esse período, a CBM foi definida como a menor concentração na qual não foi observada formação de colônias bacterianas viáveis em MHA.

4.10 Avaliação da atividade hemolítica

Os ensaios hemolíticos foram realizados nos laboratórios do S-Inova Biotech da UCDB sob o CEUA 008/2024, utilizando eritrócitos de murinos saudáveis. O sangue venoso fresco foi coletado por punção e armazenado em tubos contendo solução salina estéril a 0,9% (NaCl). As soluções de peptídeos foram preparadas a partir de diluições seriadas em solução salina. Para o controle negativo, foi utilizada a solução salina com eritrócitos, enquanto Triton X-100 a 1% foi empregado como controle positivo de lise total dos eritrócitos. Todas as soluções foram realizadas entre as concentrações de 64 à 0,5 μ M. Após incubação, as taxas de hemólise foram quantificadas por espectrofotometria, medindo-se a absorbância a um comprimento de onda de 415 nm.

4.11 Avaliação do potencial citotóxico

O potencial citotóxico dos peptídeos de estudo foi avaliado frente a diferentes linhagens celulares disponíveis nos laboratórios do S-Inova Biotech – UCDB. As células foram inicialmente incubadas por 24 horas para promover a aderência e tratadas com meios frescos no dia seguinte, antes da adição de peptídeos. As células com peptídeos foram incubadas por 24 horas. Após este período 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazólio brometo (MTT) foi adicionado (10 μ L; 5 mg mL⁻¹ em PBS) e as células foram incubadas por mais 4 horas. O sobrenadante foi removido, e 100 μ L de solução de isopropanol contendo HCl foram adicionados. A viabilidade celular foi aferida a 600 nm. Triton X-100 a 0,1% (v/v) foi utilizado como controle positivo.

4.12 Modulação da produção de óxido nítrico

A produção de óxido nítrico (ON) foi avaliada em macrófagos ativados com lipopolissacarídeo (LPS), na ausência ou presença dos peptídeos cecropina A2, cecropina A3, cecropina A6, cecropina A7 e cecropina Md, todos utilizados na concentração de 64 μ M. Após a ativação, os níveis de ON foram determinados por

meio da quantificação de nitrito (NO_2^-), um metabólito estável do ON, utilizando o ensaio colorimétrico de Griess. Esse método baseia-se na detecção do nitrito acumulado no sobrenadante das culturas celulares, formando um composto colorido cuja intensidade é proporcional à concentração de ON produzido. A absorbância foi medida por espectrofotometria a 540 nm (CARDOSO et al., 2022).

5. RESULTADOS

5.1 Análise filogenética e extração de padrões em cecropinas naturais

Com o objetivo de organizar as sequências e identificar padrões entre as cecropinas naturais analisadas, foram empregadas abordagens combinadas de alinhamento múltiplo, análise filogenética e detecção de padrões de aminoácidos. A partir do alinhamento feito pelo servidor *T-Coffee* e seguido do refinamento pelo servidor *TCS* (Figura 5), a análise filogenética organizou as 41 sequências de cecropinas naturais em quatro grupos taxonômicos: Lepidoptera (borboletas e mariposas), com 28 sequências; Muscidae (moscas), com sete sequências; Culicidae (mosquitos), com cinco sequências; e Nematoda, com apenas uma sequência (Figura 6). O servidor *PRATT 2.1* foi utilizado para extrair os padrões de aminoácidos dos três primeiros grupos, com exceção de Nematoda, uma vez que o *PRATT 2.1* requer, no mínimo, três sequências para gerar um padrão confiável. Além disso, foram gerados mais dois padrões: um padrão geral, a partir das 40 sequências disponíveis, e um padrão consenso, obtido pela união dos três padrões extraídos individualmente para cada grupo taxonômico. O servidor *PRATT 2.1* é uma ferramenta que permite identificar padrões de aminoácidos em um grupo específico de proteínas. Os padrões identificados podem ser interpretados da seguinte maneira: se houver um "X" em uma posição, significa que o *PRATT* não conseguiu determinar qual aminoácido ocupa aquela posição. No entanto, logo após o "X", pode haver um parêntese com um número, indicando quantos aminoácidos diferentes podem ocorrer naquela posição. Além disso, o *PRATT* pode mostrar entre chaves as letras dos aminoácidos que podem ocorrer naquela posição. Ao observar a tabela com os padrões extraídos pelo *PRATT*, podemos notar que, entre todos esses padrões, o padrão geral das 40 sequências foi considerado o melhor. Isso

ocorreu porque esse padrão se mostrou mais curto e com menor variabilidade (Tabela 1).

COFFEE, Version 11.00 (Version 11.00)
 Cedric Notredame
 SCORE=764
 *
 BAD AVG GOOD
 *
 Hyalophora cecr : 88
 Glossina morsit : 84
 Hyalophora cecr : 88
 Galleria mellon : 85
 Drosophila mela : 84
 Plutella xylost : 87
 Aedes albopictu : 92
 Bombyx mori Cec : 87
 Antheraea perny : 87
 Hyalophora cecr : 88
 Antheraea perny : 88
 Spodoptera litu : 88
 Ceratitis capit : 85
 Ceratitis capit : 85
 Drosophila Cecr : 85
 Hyalophora cecr : 96
 Oiketicus kirby : 87
 Heliothis vires : 87
 Heliothis vires : 87
 Aedes aegypti C : 92
 Anopheles gambi : 92
 Anopheles gambi : 91
 Hyalophora cecr : 87
 Bombyx mori Cec : 87
 Bombyx mori Cec : 88
 Heliothis vires : 87
 Trichoplusia ni : 88
 Spodoptera litu : 87
 Ascaris suum Ce : 75
 Papilio xuthus : 87
 Plutella xylost : 87
 Plutella xylost : 87
 Simulium bannae : 86
 Galleria mellon : 88
 Bombyx mori Cec : 88
 Antheraea perny : 81
 Aedes aegypti A : 78
 Musca domestica : 83
 Galleria mellon : 87
 Galleria mellon : 87
 Bombyx mori Cec : 88
 cons : 76
 *
 Hyalophora cecr KW - KVFFKIEKMGRRNRIRNGIVKAGPAIAVLGEAKAIL --- S
 Glossina morsit GWLKKIGKKIEKRVGONTRDATTYKG --- LEVAQQAANVAATVR
 Hyalophora cecr KW - KLFKKIEKVGONIRDGIKAGPAVAVVGOATOA --- K
 Galleria mellon E - NFFKIEIRAGORIRDAII SAAPAVETLAQAOKIKGG D
 Drosophila mela GWLRLGKKIEKRIEIRGOHTRDASIOV --- LGIAQQAANVAATR
 Plutella xylost RW - KPFFKELKVGRRNRIRNGIIVKAGPAVAVVGOATSTARPOTK
 Aedes albopictu GGLKLLGKKLEGVGRVFKASEKA --- LPVAVGKAL --- G K
 Bombyx mori Cec RW - KIFKKIEKMGRRNRIRNGIIVKAGPAIEVLGSAKAL ---
 Antheraea perny KW - KIFKKIEKVGRRNRIRNGIIVKAGPAVAVLGEAKAL ---
 Hyalophora cecr W - NPFFKIEKVGORVRDAVLSAGPAVATVAQATALA --- K
 Antheraea perny W - NPFFKIEKVGORVRDAVLSAGPAVATVAQATALA --- K
 Spodoptera litu RW - KVFFKIEKMGRRNRIRNGIIVKAGPAIEVLGSAKAL --- K
 Ceratitis capit GWLKKIGKKIEKRVGONTRDATTOT --- IAVAQQAANVAATR
 Drosophila Cecr GWLKLGGKRIEIRGOHTRDATTOT --- LGIAQQAANVAATR
 Hyalophora cecr W - NPFFKIEKVGORVRDAVLSAGP ---
 Oiketicus kirby W - KPFFKIEKAVRRVRDGVAKAGPAVAVVGOAT ---
 Heliothis vires KW - KVFFKIEKVGRRNRIRNGIIVKAGPAIAVLGOAN ---
 Heliothis vires RW - KVFFKIEKMGRRNRIRNGIIVKAGPAIEVLGOAK ---
 Aedes aegypti C GGLKLLGKKLEGAGKRVFNAAEKA --- LPVAVGAKA --- L
 Anopheles gambi GRLLKLLGKKIEGAGKRVFKAEEKA --- LPVAVGAKA --- L
 Anopheles gambi GRLLKLLGKKIEGAGKRVFKAEEKA --- LPVAVGAKAL --- G
 Hyalophora cecr KW - KVFFKIEKMGRRNRIRNGIIVKAGPAIAVLGEAKAL ---
 Bombyx mori Cec RW - KTFKKIEKVGONTRDGIIVKAGPAVAVVGOAATI ---
 Bombyx mori Cec RW - KLFKKIEKVGRRNRIRNGIIVKAGPAIAVLGOAKS --- L
 Heliothis vires RW - KVFFKIEKVGONTRDGIIVKAGPAIEVLGOAKAL ---
 Trichoplusia ni RW - KFFKKIEKVGONTRDGIIVKAGPAVAVVGOAASIT ---
 Spodoptera litu RW - KVFFKIEKVGRRNRIRNGIIVKAGPAIIVLGOAKAL ---
 Ascaris suum Ce SWLSKTAKKLENSAKK --- RISEGIAIAIOT --- GPR
 Papilio xuthus RW - KIFKKIEKVGRRNRIRNGIIVKAGPAVAVVGOAATVVK --- G
 Plutella xylost --- NPFFKIEKRVGONTRDGIIVKAGPAIEVLGOANSTARPAGK
 Plutella xylost GFGKKIEKLRGRIRDGVKAGPAVAVVGOASIM G ---
 Simulium bannae GLTKT --- DKLRGAKKALVASKVA --- PTVAAGASIA --- G
 Galleria mellon KW - KIFKKIEKAGRRNRIRNGIIVKAGPAVSVVGAATITYKT --- G
 Bombyx mori Cec RW - KIFKKIEKMGRRNRIRNGIIVKAGPAIEVLGSAKATIG --- K
 Antheraea perny KW - KFFKKIEKVGONTRDGIIVKAGPAVAVVGOATNIAK --- G
 Aedes aegypti A GGLKLLGKKLEGAGKRVFNAAEKA --- LPVAVGAKAL --- R K
 Musca domestica --- KKTGKKIEKRVGONTRDATTOT --- IAVAQQAANVAATLKG
 Galleria mellon KW - KFFKKIEKMGONTRDGIIVKAGPAVAVVGOATITYKSG ---
 Galleria mellon RW - KVFFKIEKMGONTRDGIIVKAGPAVAVVGOATITISG ---
 Bombyx mori Cec RW - KLFKKIEKVGRRNRIRNGIIVKAGPAIAVLGOAKSLG --- K

Figura 5. Alinhamento múltiplo das 41 sequências realizado pelo servidor T-Coffee. A pontuação de alinhamento é apresentada na parte superior da figura. A coloração indica a qualidade do alinhamento, sendo o rosa associado à maior confiabilidade, o amarelo a uma qualidade intermediária e os tons de verde e roxo a regiões de baixa confiabilidade, com o roxo representando a menor qualidade.

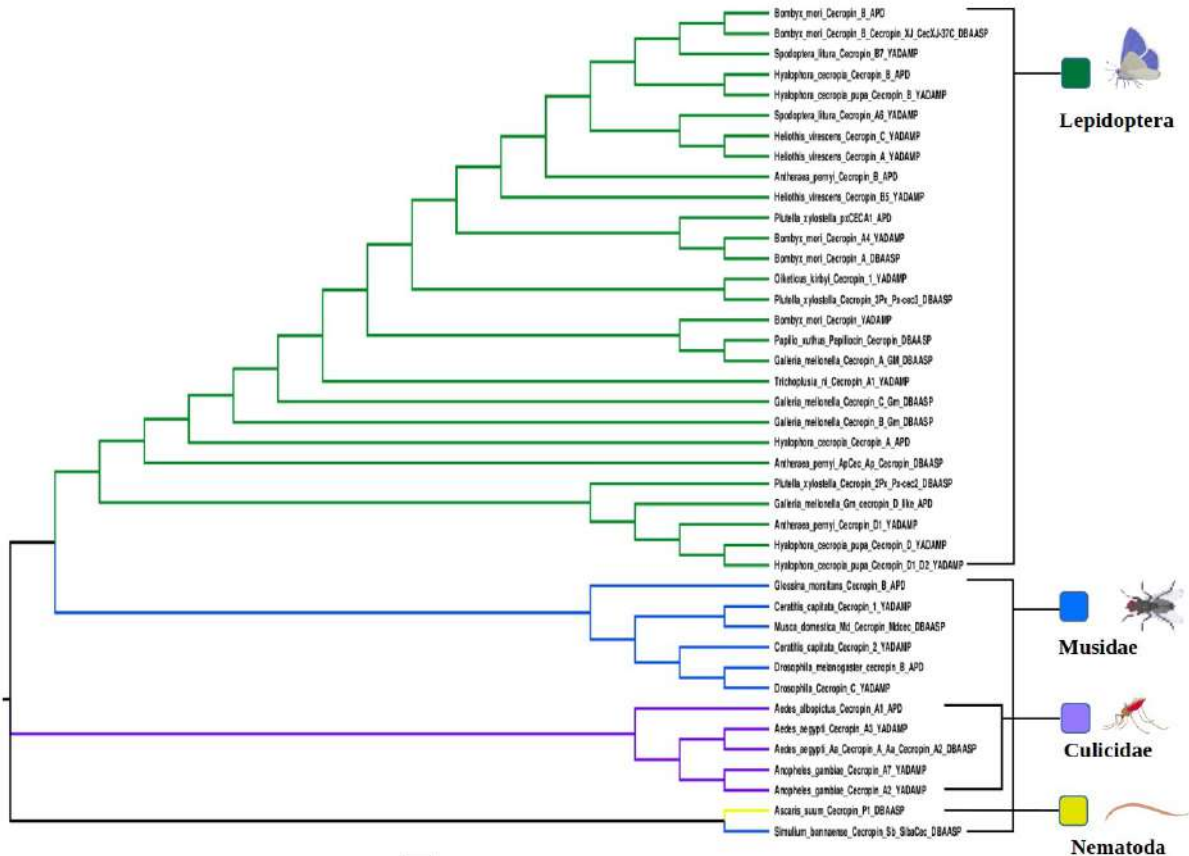


Figura 6. Análise filogenética de cecropinas naturais. Árvore de similaridade construída pelo método *neighbor-joining* (software *MEGA 10.2.6*), demonstrando a relação evolutiva entre 41 sequências de cecropinas. A análise revelou quatro clados principais correspondentes a diferentes táxons: Lepidoptera, Diptera (dividido entre Muscidae e Culicidae) e Nematoda (com um único representante).

Tabela 1. Padrões gerados no *PRATT 2.1*.

Grupos	Pré-refinamento	Pós-refinamento
Lepidóptera	R-x(5)-A-x-P	F-K-x(0,2)-E-x(2)-[GV]-x(4)-[DNR]-[ADG]-[GILV]-[AIV]-x(2)-[AG]-[GP]
Díptera Moscas	A-x(2)-A-x-N-V-A	G-K-x(2)-[EK]-[DR]-x-[GL]-x(2)-[GT]-x-[DK]-x-[AST]-[ILV]-x-[GTV]-[AIL]-[AEGS]-x-[AV]-[AQ]-[PQ]-[AI]-[AV]-[AN]-[AV]-[AG]-A-[ST]-[AILV]
Díptera Mosquitos	G-x-L-K-K-L-G-K-K-x-E-G-x-G-K-R-V-F-x-A-x-E-K-A-L-P-V-x(0,1)-V-x(0,1)-G-x-K-A-L	G-x-L-K-K-L-G-K-K-[IL]-E-G-[AV]-G-K-R-V-F-x-A-[AS]-E-K-A-L-P-V-x(0,1)-V-x(0,1)-G-[AIV]-K-A-L
Padrão geral das sequências de Lepidóptera, Moscas e Mosquito	A-x(0,2)-V-x(1,3)-A	A-x(0,2)-V-x(1,3)-A
Padrão consenso	A-I-x(0,1)-V-x(1,2)-A	K-x(3)-G-[ALV]-x-[DG]-x(2)-[ADV]-x(2)-[AG]-x(4)-[AIV]-x(2)-[ATV]-x-[AGV]

5.2 Levantamento da atividade e propriedades físico-químicas e estruturais de cecropinas naturais

Após a caracterização filogenética e estrutural das cecropinas naturais, foi realizada uma análise funcional com foco em suas atividades antibacterianas. A avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) frente a diferentes patógenos humanos permite verificar a eficácia desses peptídeos antimicrobianos (PAMs) e identificar os mais promissores em termos de potência e espectro de ação. A seguir,

são apresentados os resultados do levantamento das CIMs das 23 cecropinas analisadas.

O levantamento das atividades antibacterianas das 23 cecropinas frente a patógenos humanos revelou que a maioria apresenta CIM igual a 10 μ M (Figura 7). Essa atividade foi observada contra bactérias tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas, evidenciando o amplo espectro de ação dessa classe de PAMs. Dentre as cecropinas analisadas, destacaram-se aquelas originárias das espécies *Ae. aegypti* (cecropina A3), *A. gambiae* (cecropinas A2 e A7), *M. domestica* (cecropina Md) e *S. litura* (cecropina A6), por apresentarem as menores CIMs. As cecropinas A2 e A7 exibiram a mais alta potência, com atividade inibitória a apenas 0,1 μ M frente a *Salmonella typhimurium* (Gram-negativa) e *Streptococcus pyogenes* (Gram-positiva). A cecropina A6 também demonstrou alta eficácia, inibindo *S. typhimurium* a 0,32 μ M. A cecropina A3 apresentou CIM de 0,5 μ M frente a *Xanthomonas campestris* (Gram-negativa), enquanto a cecropina de *M. domestica* foi capaz de inibir *Pseudomonas fluorescens* (Gram-negativa) a 1 μ M.

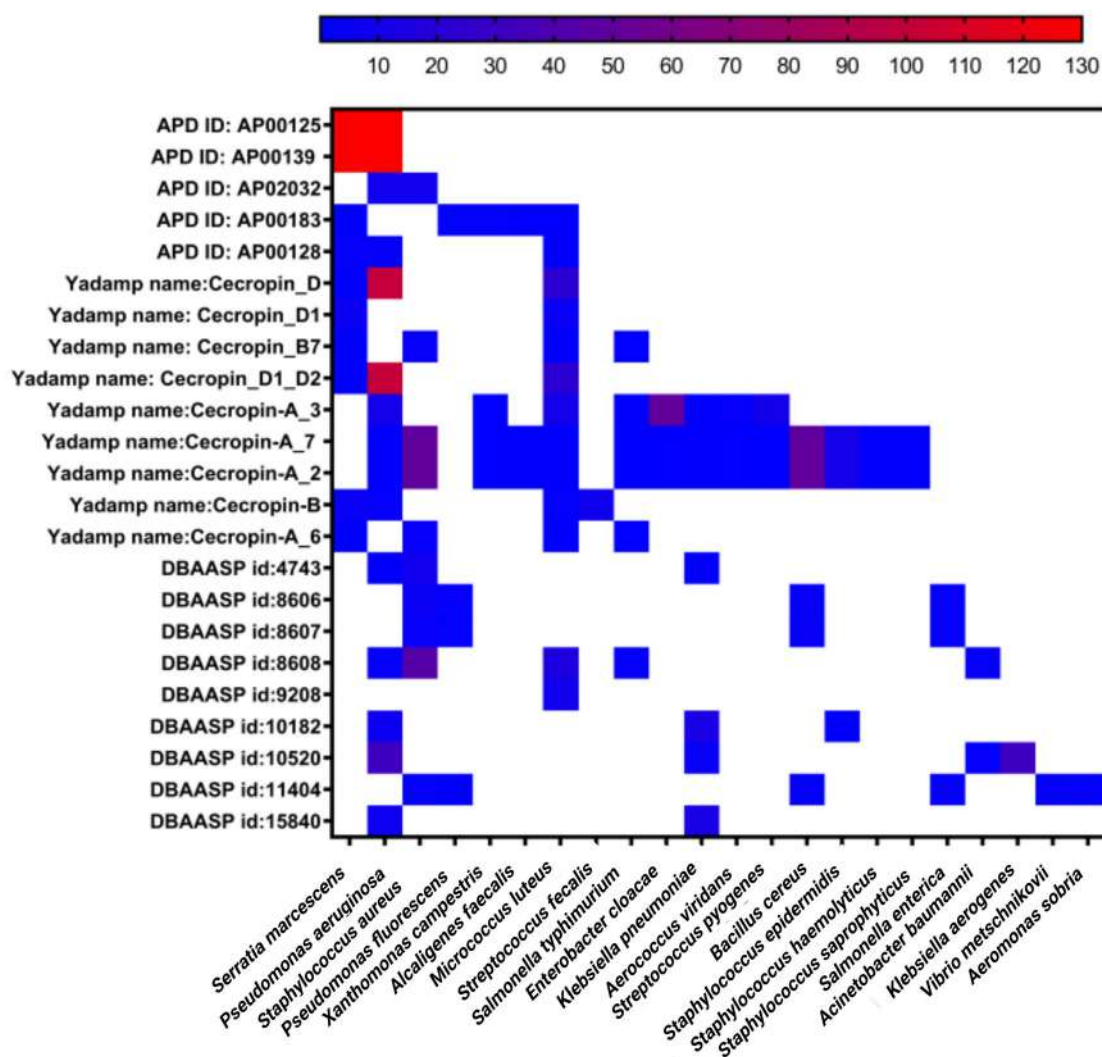


Figura 7. Perfil de atividade antimicrobiana de cecropinas contra patógenos humanos. Representação gráfica em *heatmap* (GraphPad Prism 8) dos valores de concentração inibitória mínima (CIM, em μM) de 23 cecropinas, onde a intensidade da cor reflete a potência antimicrobiana - tons de azul indicam maior atividade (CIM mais baixa) e tons vermelhos menor atividade (CIM mais elevada).

5.3 Modelagem molecular e angulação das cecropinas

Depois da modelagem tridimensional das sequências de cecropinas selecionadas, foi realizada uma etapa de validação estrutural com o intuito de verificar a qualidade e a confiabilidade dos modelos gerados. Essa análise é fundamental para assegurar que as estruturas obtidas apresentem parâmetros estereoquímicos coerentes e compatibilidade energética com proteínas reais,

permitindo, assim, sua utilização em análises funcionais e comparativas. A seguir, são descritos os resultados da avaliação estrutural e das diferenças conformacionais observadas entre os grupos taxonômicos analisados.

A validação estrutural das 40 proteínas modeladas, baseada nos valores de *G-factor* (*OVERALL AVERAGE*) obtidos por meio do servidor *PDBsum* e nos valores de *Z-score* calculados pelo *ProsaWeb*, sugere que os modelos apresentam qualidade estrutural satisfatória e estão, em sua maioria, dentro dos parâmetros aceitáveis para estruturas tridimensionais confiáveis. Os valores de *G-factor*, os quais indicam o quão usuais são os parâmetros estereoquímicos do modelo, variaram de -0,57 a 0,25, sendo que apenas um valor ficou abaixo do limiar de -0,5 (valores abaixo de -0,5 são considerados incomuns, e valores abaixo de -1,0, altamente incomuns), enquanto os demais se mantiveram dentro da faixa considerada aceitável (acima de -0,5), reforçando a adequação geométrica das estruturas. Quanto aos valores de *Z-score*, que avaliam a compatibilidade da energia do modelo com estruturas reais de peptídeos/proteínas de mesmo tamanho, a maioria também se situou em faixas compatíveis com estruturas depositadas no PDB, variando de -2,14 a 0,62. Assim, os dados indicam que as proteínas modeladas possuem características estruturais coerentes com estruturas reais depositadas em bancos de dados, evidenciando uma modelagem confiável e adequada para análises subsequentes. Como resultado da modelagem das sequências identificadas, foi observada uma diferença estrutural do ângulo de abertura das α -hélices entre as cecropinas de cada grupo taxonômico, a qual é demonstrada pelo cálculo de média e desvio padrão (Figura 8). As cecropinas de *Lepidoptera* mostram um desvio padrão maior em comparação às cecropinas de *Culicidae* e *Muscidae*. O fato de haver uma quantidade maior de cecropinas de *Lepidoptera* nesta análise pode ter influenciado as medidas de média e desvio padrão. Porém, é possível observar que, em comparação com as cecropinas de *Lepidoptera*, as demais apresentam uma variação de angulação mais restrita. Ao analisar os dados de angulação, em conjunto com os de atividade, observamos que as cecropinas que obtiveram melhor atividade também possuíam uma angulação mais aberta, como é o caso das cecropinas A2, A3 e A7 de *Culicidae* e da cecropina de *M. domestica*.

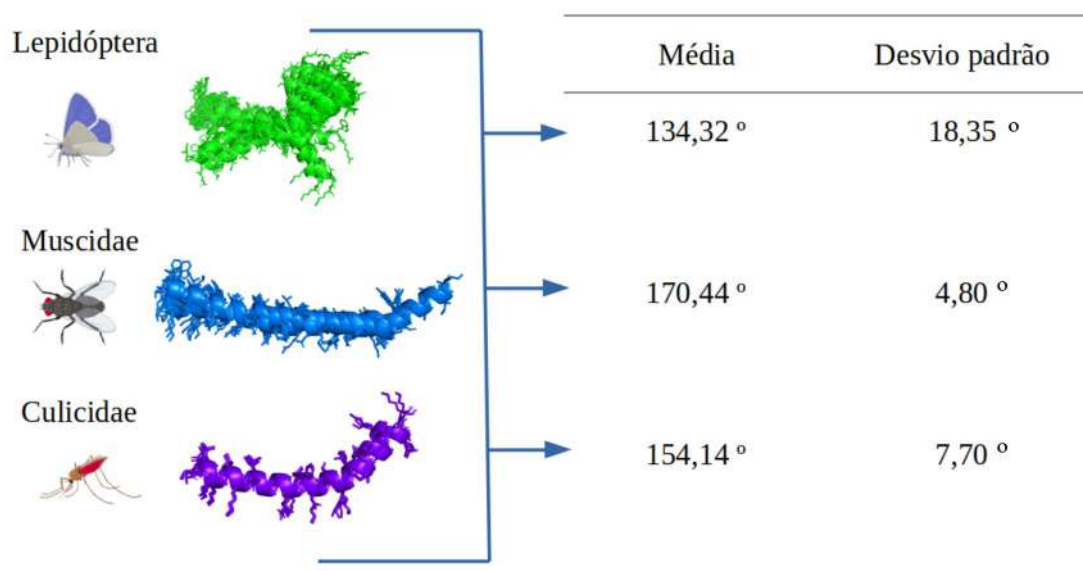


Figura 8. Análise estrutural comparativa de cecropinas por grupo taxonômico. Representação tridimensional das estruturas proteicas previstas pelo *AlphaFold2* e alinhadas no *PyMOL 2.3*, destacando as variações no ângulo de abertura das α -hélices entre diferentes grupos taxonômicos.

5.4 Testes estatísticos de correlação de Pearson

Com o intuito de investigar possíveis relações entre as propriedades físico-químicas das cecropinas e sua eficácia frente a diferentes espécies bacterianas, foram realizados testes estatísticos de correlação de *Pearson*. Essa abordagem permite identificar quais características estruturais ou funcionais dos peptídeos estão associadas à atividade antimicrobiana contra microrganismos específicos, contribuindo para a compreensão dos mecanismos de ação diferenciados entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A seguir, são apresentados os resultados das análises de correlação aplicadas às cecropinas estudadas. Os testes estatísticos de correlação de *Pearson* mostraram que nenhuma das características apresenta correlação geral, ou seja, que estivesse presente em todas ou na maioria

das espécies de bactérias utilizadas. Porém, no primeiro teste estatístico, foi mostrado que cada bactéria teve correlação com uma característica diferente das cecropinas estudadas. Dentre as características testadas, o momento hidrofóbico, a flexibilidade e o potencial eletrostático apresentaram forte correlação para duas bactérias, incluindo *S. aureus* e *K. pneumoniae* (Figura 9). Nos resultados, é possível observar uma inversão no sentido de correlação para essas espécies. O momento hidrofóbico e a flexibilidade para *S. aureus* têm uma correlação negativa, enquanto para *K. pneumoniae* apresentam correlação positiva. Isso indica uma possível diferença na ação da cecropina entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. O segundo teste estatístico focou apenas em *S. aureus* e *K. pneumoniae*, revelando correlações mais fortes e uma diferença mais evidente entre a ação das cecropinas frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. As características de flexibilidade e potencial eletrostático mostraram correlação mais forte para *S. aureus* (Gram-positiva), enquanto hidrofobicidade e ângulo apresentaram maior correlação para *K. pneumoniae* (Gram-negativa). Ademais, o momento hidrofóbico mostrou correlação forte para ambas as cepas bacterianas (Figura 10).

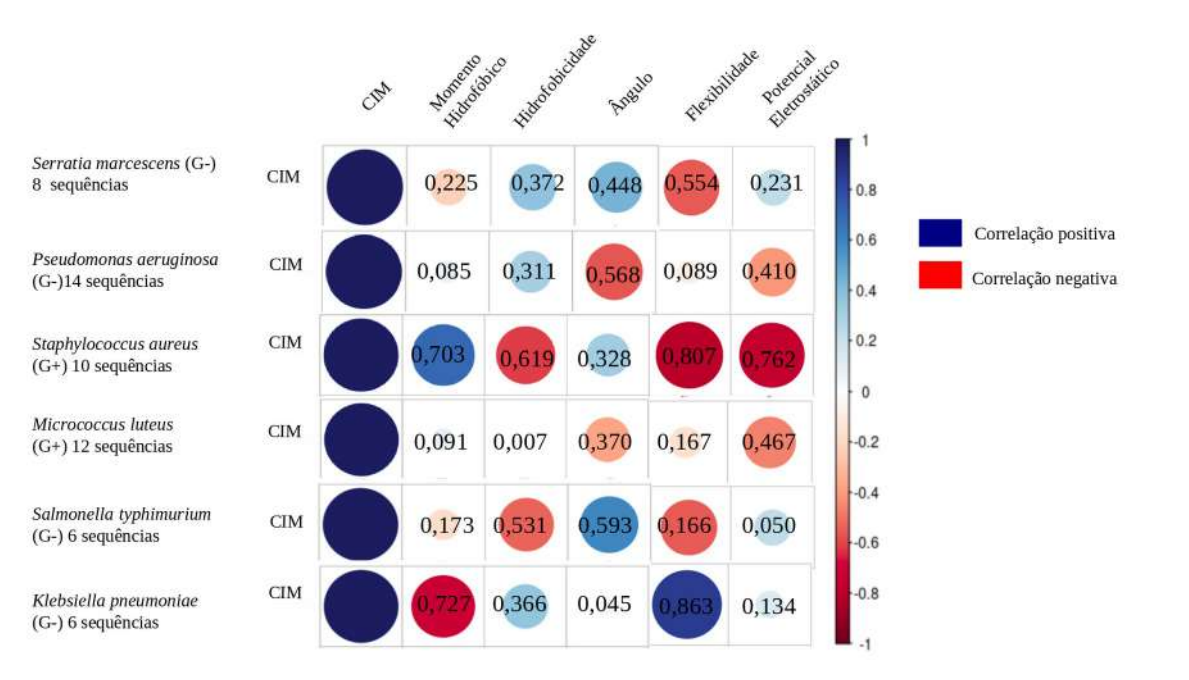


Figura 9. Análise de correlação de *Pearson* (*software R/Rstudio* versão 2022.02.1) entre características físico-químicas e estruturais das cecropinas (momento hidrofóbico, hidrofobicidade, ângulo, flexibilidade e potencial eletrostático) e atividade antimicrobiana. Representação gráfica dos coeficientes de correlação de *Pearson* entre os valores de CIM das cecropinas e seis espécies bacterianas mais testadas. Os círculos coloridos indicam a direção (azul significa correlação positiva, vermelho significa negativa) e intensidade (tamanho e saturação representam significância estatística) das relações observadas.

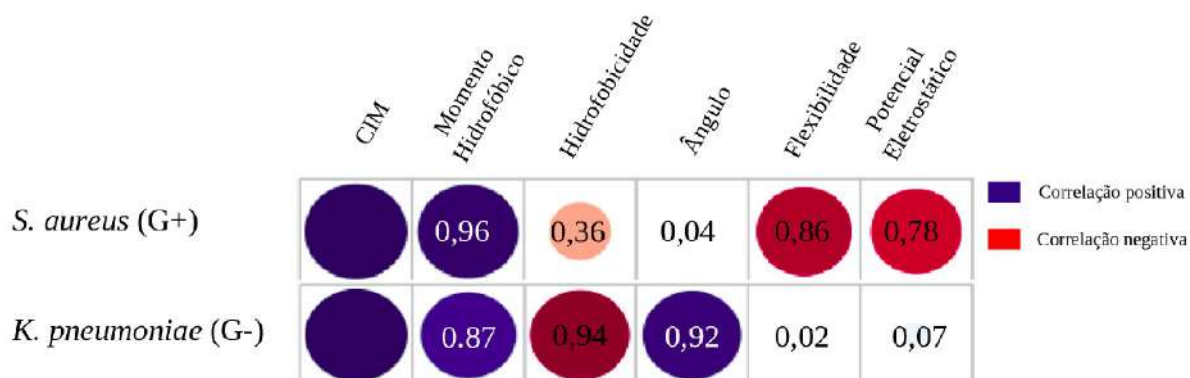


Figura 10. Análise de correlação de *Pearson* (software *R/Rstudio* versão 2022.02.1) entre características físico-químicas das cecropinas (momento hidrofóbico, hidrofobicidade, ângulo, flexibilidade e potencial eletrostático) e atividade antimicrobiana frente a *S. aureus* e *K. pneumoniae*. Representação gráfica dos coeficientes de correlação de *Pearson* para cinco cecropinas selecionadas, onde círculos azuis (positivos) e vermelhos (negativos) ilustram a direção e força das correlações (tamanho e saturação representam significância estatística).

5.5 Dinâmica molecular em água das cinco cecropinas selecionadas

Para aprofundar a avaliação da estabilidade conformacional das cecropinas selecionadas, foram realizadas simulações de dinâmica molecular em ambiente aquoso. Essa abordagem permite observar, ao longo do tempo, o comportamento estrutural dos peptídeos em solução, fornecendo métricas como o desvio padrão quadrático médio (RMSD), a flutuação por resíduo (RMSF) e a ocupância de ligações de hidrogênio. Esses parâmetros são fundamentais para inferir a flexibilidade, a estabilidade e o potencial de manutenção da estrutura nativa dos peptídeos em condições próximas às fisiológicas. A seguir, são apresentados os principais resultados obtidos a partir dessas simulações.

A partir das dinâmicas moleculares em água, foram extraídos os dados de RMSD, RMSF e ocupância das ligações de hidrogênio. Os resultados de RMSD das cecropinas A3 e A7 mostram que ambas permaneceram estáveis em todas as

três réplicas, com a cecropina A3 apresentando ligeira superioridade em estabilidade. Essa tendência também é corroborada pelos dados de RMSF, que indicam maior estabilidade da cecropina A3 quando comparada à cecropina A7 (Figura 11d). No caso das cecropinas A2 e Md, observamos resultados semelhantes, nas quais ambas mostraram pouca variação tanto nos dados de RMSD quanto nos dados de RMSF (Figuras 11a e 11e). O mesmo não se repete para a cecropina A6 que, embora tenha mostrado estabilidade nos dados de RMSD, apresentou maior instabilidade nos dados de RMSF entre os resíduos 10 e 15 (Figura 11c).

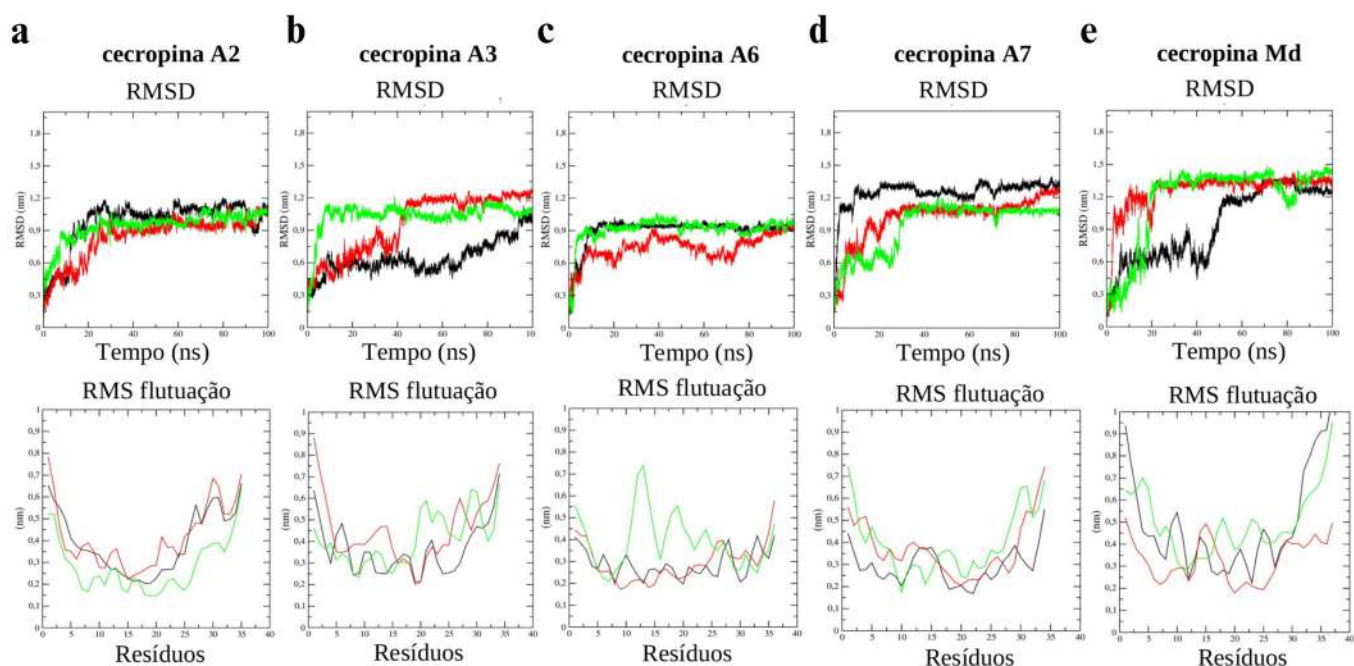


Figura 11. Representação por meio da raiz quadrada média do desvio (RMSD) e a raiz quadrada média da flutuação (RMSF) dos parâmetros resultantes de simulações de dinâmica molecular em água na temperatura de 310 K em tréplicas (preto, verde e vermelho) (*software GROMACS V 5.0.4*) para cecropina A2 (a), cecropina A3 (b), cecropina A6 (c), cecropina A7 (d) e cecropina Md (e).

Ao observar as estruturas das cecropinas após os 100 ns de dinâmica molecular, foi notado que todas as cinco cecropinas apresentaram mudança estrutural tanto na extremidade C-terminal quanto na N-terminal. Além disso foi observado que todas as cinco cecropinas mantiveram o centro de suas estruturas conservada, ou seja, com pouco ou nenhuma mudança na sua conformação. Ao extrair os dados de ocupância pôde-se constatar que os valores mais altos de ocupância (ligações de hidrogênio que se mantiveram por mais tempo durante a dinâmica molecular) são as interações pertencentes aos resíduos que estão localizadas próximos ao centro das estruturas das cecropinas, caracterizando um maior número de ligações de hidrogênio intrapeptídicas.

A partir dos dados de ocupância também foi possível inferir a estabilidade e flexibilidade das cecropinas uma vez que as ligações de hidrogênio acabam tornando a molécula mais rígida e, por sua vez, mais estável. Sendo assim quando maior o nível de ocupância mais estável e mais rígida é a molécula. Portanto, os resultados referentes à ocupância das cecropinas A3 e A7 sugerem que a cecropina A3 pode exibir maior estabilidade em ambiente aquoso do que a cecropina A7, uma vez que possui uma proporção superior de resíduos que estabelecem ligações de hidrogênio intrapeptídicas, com uma duração que ultrapassa os 30% do período total da dinâmica (Figura 11b e 11d). Por outro lado, quando comparamos a cecropina A2 com a cecropina Md, esta demonstrou maior grau de estabilidade (Figura 12a e 12e). A cecropina A6 mostrou um resultado divergente dos demais. Mesmo apresentado a região estável das outras cecropinas, os dados de ocupância indicam que nessa região a cecropina A6 é mais flexível (Figura 12c). Este resultado pode indicar que para as cecropinas em geral a flexibilidade pode ser um fator crucial para a bioatividade, corroborando com os resultados dos testes estatísticos.

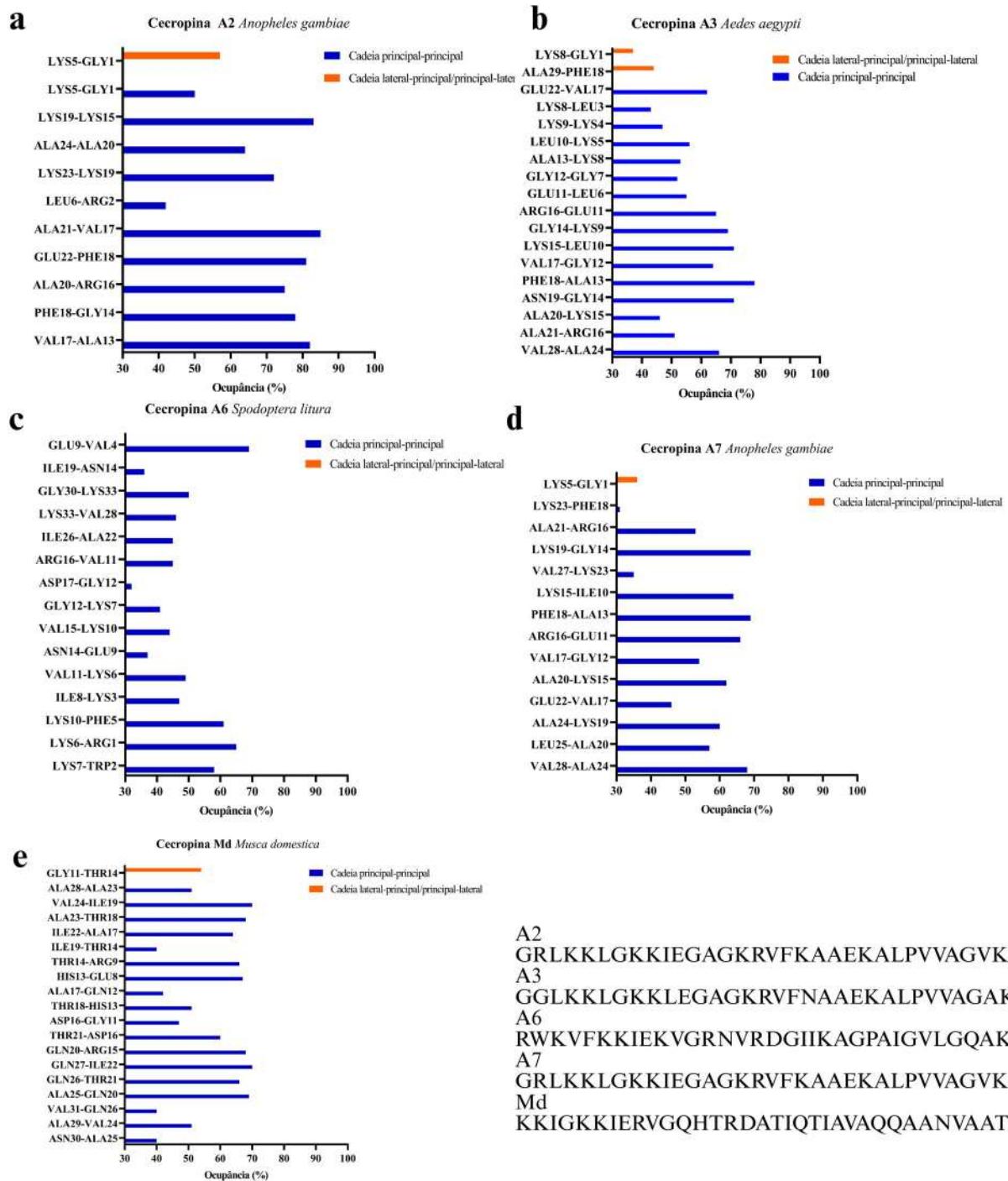


Figura 12. Perfil de estabilidade estrutural de cecropinas através da análise de ligações de hidrogênio. Representação da ocupância (>30% do tempo de simulação) de ligações de hidrogênio intrapeptídicas (*software* VMD 1.9.3) em dinâmica molecular (100 ns, 310 K) para cinco cecropinas: **(a)** A2, **(b)** A3, **(c)** A6, **(d)** A7 e **(e)** Md.

5.6 Dinâmica molecular em membrana de bactéria Gram-positiva e Gram-negativa das cinco cecropinas selecionadas

Com o objetivo de investigar o comportamento das cecropinas em ambientes que mimetizam as membranas de bactérias, foram conduzidas simulações de dinâmica molecular em bicamadas lipídicas representativas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Esse tipo de abordagem permite avaliar a inserção, estabilidade e interação dos peptídeos com as membranas-alvo, oferecendo uma visão mais realista de sua atuação em contextos fisiológicos. A análise de parâmetros como RMSD, RMSF e ocupância de ligações de hidrogênio fornece subsídios para compreender as diferenças no modo de ação das cecropinas conforme o tipo de membrana bacteriana.

A dinâmica molecular na membrana de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas revelou que a cecropina A2 interagiu principalmente com a superfície da membrana de bactérias Gram-positivas, apresentando uma inserção limitada (Figura 13a). Observaram-se variações significativas nos valores de RMSD, RMSF, especialmente nos aminoácidos localizados nas extremidades, entre os resíduos 1 e 4 e após o resíduo 20 (Figuras 18a e 18c). Além disso, as ligações de hidrogênio mais duradouras ocorreram entre os resíduos localizados no centro da estrutura da cecropina A2, como evidenciado pelos dados de ocupância (Figura 19a). Em contraste, na membrana de bactérias Gram-negativas, a cecropina A2 inseriu-se completamente na bicamada lipídica, mantendo-se estável ao longo de toda a simulação (Figura 12b). Os dados de RMSD e RMSF indicaram maior estabilidade e interação em membranas Gram-negativas, sugerindo uma preferência por esse tipo de membrana (Figuras 18b e 18d).

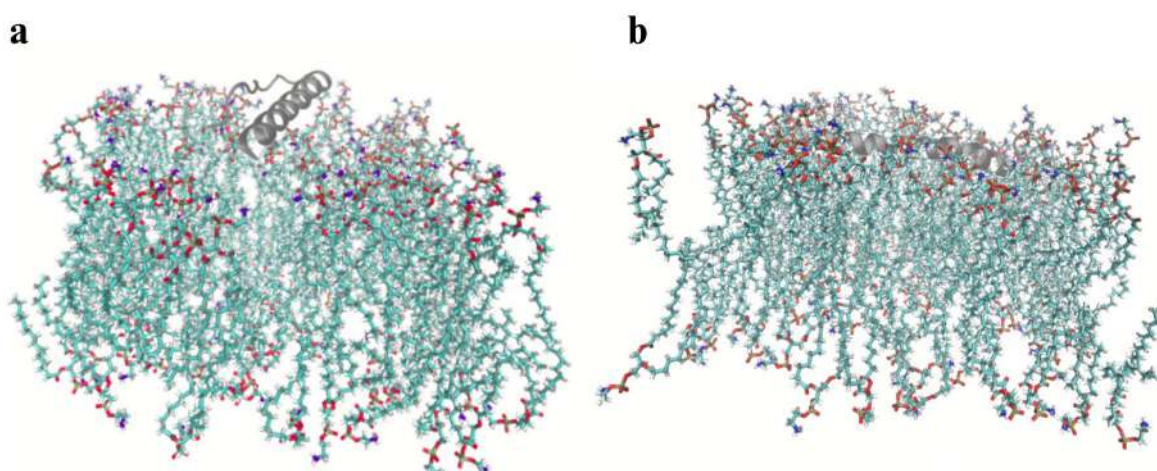


Figura 13. Interação da cecropina A2 com membranas bacterianas após 1.000 ns de dinâmica molecular (*software VMD 1.9.3*). Representação do frame final da simulação

mostrando o comportamento distinto do peptídeo frente a: **(a)** membrana de bactéria Gram-positiva e **(b)** membrana de bactéria Gram-negativa.

A cecropina A3 foi a única a se inserir totalmente na membrana Gram-positiva, demonstrando alta afinidade por esse ambiente (Figura 14a). Apresentou maior estabilidade de acordo com os valores de RMSD (Figura 18a). Quando analisados os dados de RMSF e ocupância, observou-se que a cecropina A3 apresentou menor estabilidade entre os resíduos 1 e 4, assim como após o resíduo 20 (Figuras 18c e 18b). No entanto, em membranas Gram-negativas, apresentou um desenovelamento quase completo, com menor estabilidade e afinidade (Figura 14b). Essa diferença sugere clara especificidade por bactérias Gram-positivas.

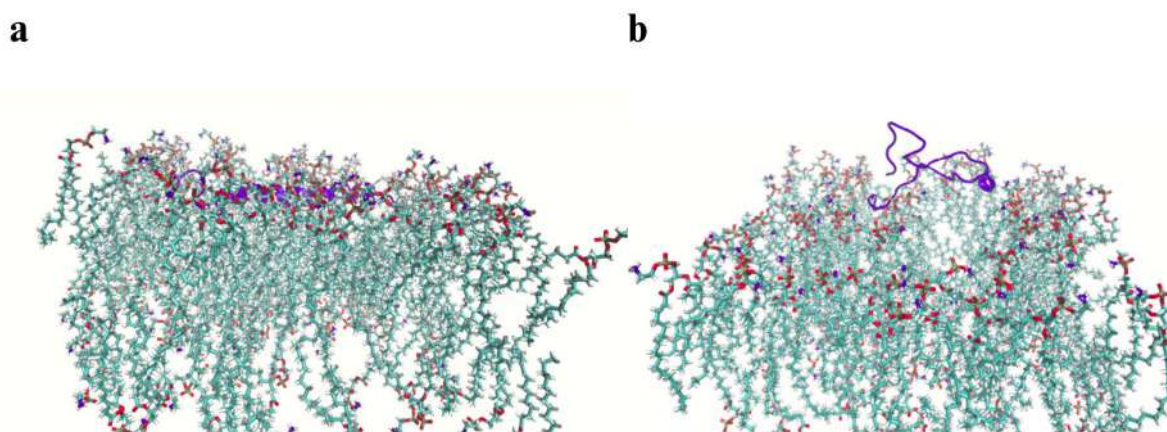


Figura 14. Interação da cecropina A3 com membranas bacterianas após 1.000 ns de dinâmica molecular (*software VMD 1.9.3*). Representação do frame final da simulação mostrando o comportamento distinto do peptídeo frente a: **(a)** membrana de bactéria Gram-positiva e **(b)** membrana de bactéria Gram-negativa.

A cecropina A6 exibiu interação limitada na superfície das membranas Gram-positivas, interagindo apenas com sua extremidade C-terminal (Figura 15a). Em Gram-negativas, também interagiu com a superfície da membrana, porém com maior variação na trajetória, indicando uma interação menos estável (Figura 15b). Seus dados de RMSD, RMSF e ocupância foram semelhantes em ambos os ambientes, embora com maior flexibilidade estrutural em Gram-positivas (Figuras 18, 18c e 19c). Enquanto isso, a cecropina A7 exibiu maior instabilidade estrutural em membranas Gram-positivas, com variações mais acentuadas após 700 ns, conforme mostrado nos valores de RMSD (Figura 18a). Em contraste, na membrana Gram-negativa, sua estrutura apresentou menor variação conforme os dados de RMSD, indicando uma interação mais estável

(Figura 18b). Além disso, os dados de ocupância revelaram ligações de hidrogênio mais duradouras em Gram-negativas, reforçando sua maior afinidade por esse ambiente (Figura 20d).

A cecropina Md apresentou comportamento quase idêntico em ambos os tipos de membrana. Em Gram-positivas, manteve uma das α -hélices pouco inseridas na bicamada (Figura 16a), enquanto em Gram-negativas demonstrou padrão semelhante, com estabilidade comparável (Figura 16b). Foi a única cecropina que não se inseriu efetivamente nas duas membranas, apresentando dados consistentes de RMSD, RMSF e ocupância em ambas as simulações (Figuras 18, 19e e 20e).

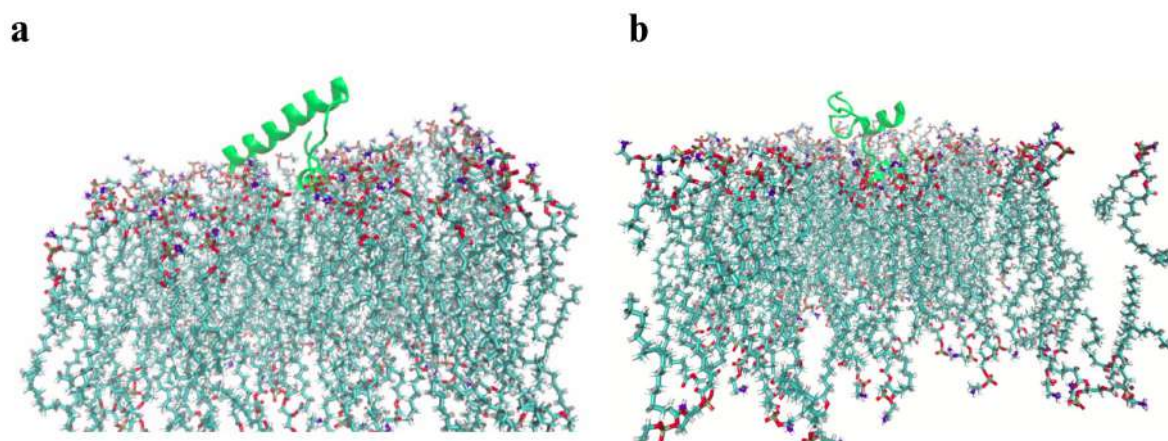


Figura 15. Interação da cecropina A6 com membranas bacterianas após 1.000 ns de dinâmica molecular (*software VMD 1.9.3*). Representação do frame final da simulação mostrando o comportamento distinto do peptídeo frente a: **(a)** membrana de bactéria Gram-positiva e **(b)** membrana de bactéria Gram-negativa.

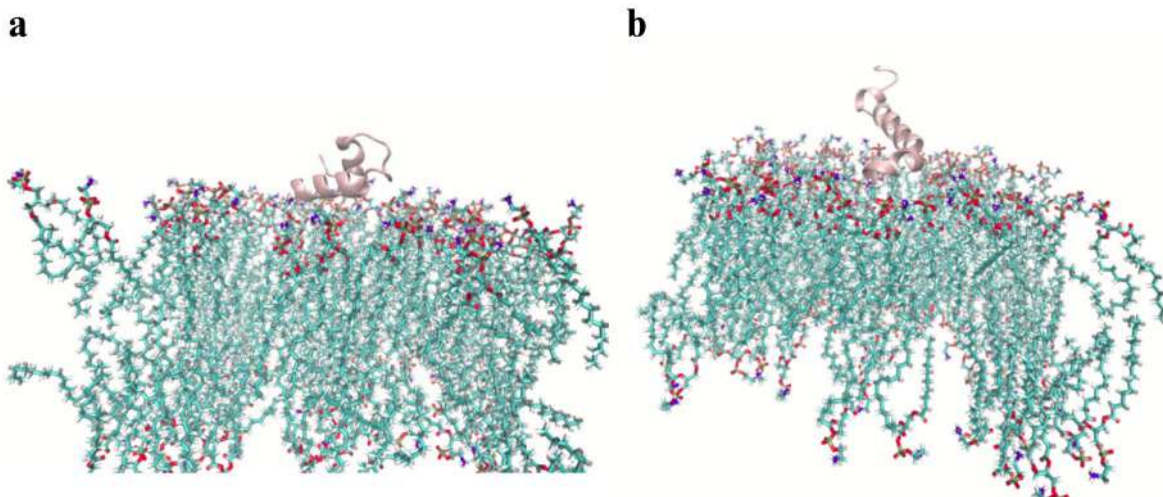


Figura 16. Interação da cecropina A7 com membranas bacterianas após 1.000 ns de dinâmica molecular (*software VMD 1.9.3*). Representação do frame final da simulação mostrando o comportamento distinto do peptídeo frente a: **(a)** membrana de bactéria Gram-positiva e **(b)** membrana de bactéria Gram-negativa.

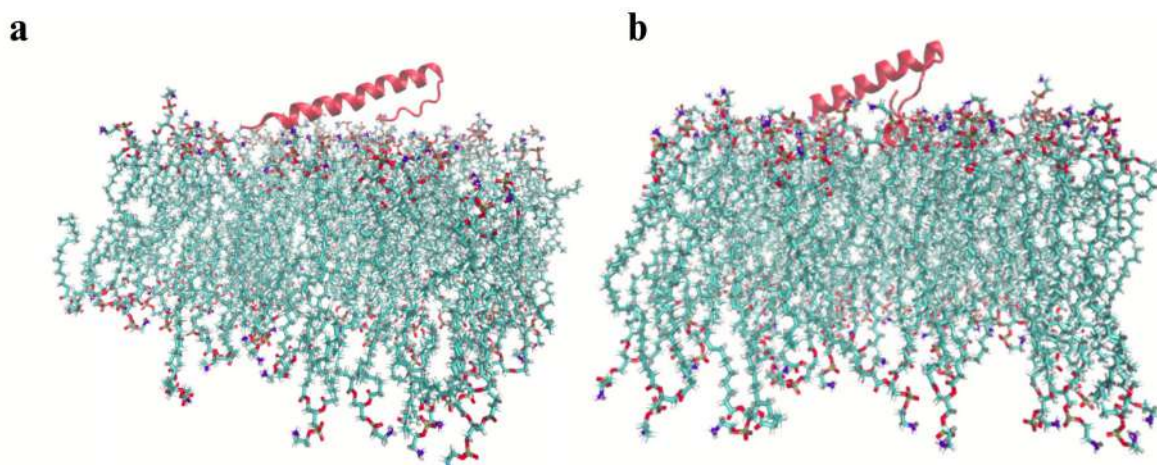


Figura 17. Interação da cecropina Md com membranas bacterianas após 1.000 ns de dinâmica molecular (*software VMD 1.9.3*). Representação do frame final da simulação mostrando o comportamento distinto do peptídeo frente a: **(a)** membrana de bactéria Gram-positiva e **(b)** membrana de bactéria Gram-negativa.

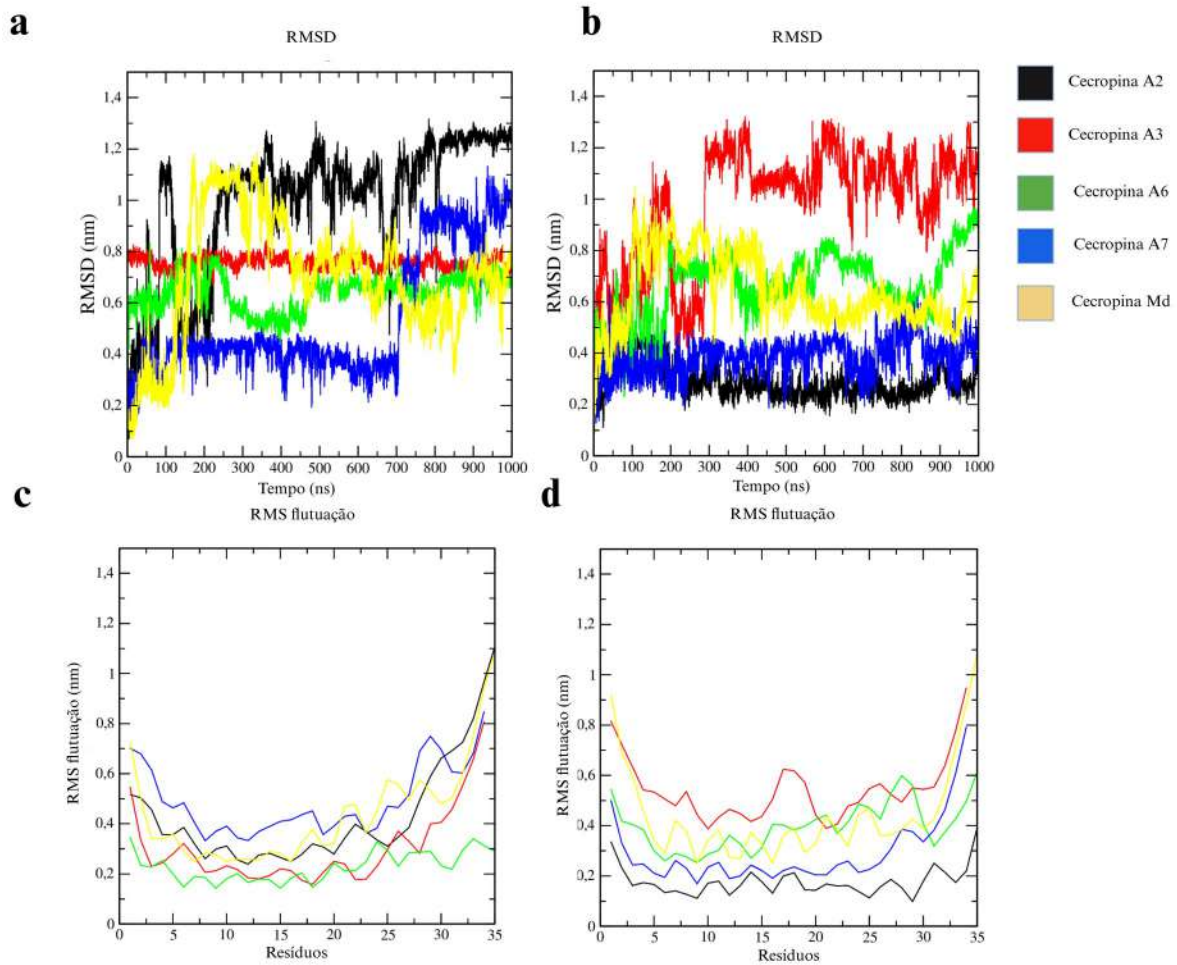


Figura 18. Análise de estabilidade estrutural das cecropinas em membranas bacterianas. Representação gráfica de: (a) RMSD em membrana Gram-positiva; (b) RMSD em membrana Gram-negativa; (c) RMSF em membrana Gram-positiva; (d) RMSF em membrana Gram-negativa extraídos pelo *software* GROMACS. As cinco cecropinas estudadas são representadas por cores distintas: A2 (preto), A3 (vermelho), A6 (verde), A7 (azul) e Md (amarelo). Os dados de RMSD e RMSF foram obtidos pelo *software* GROMACS V 5.0.4.

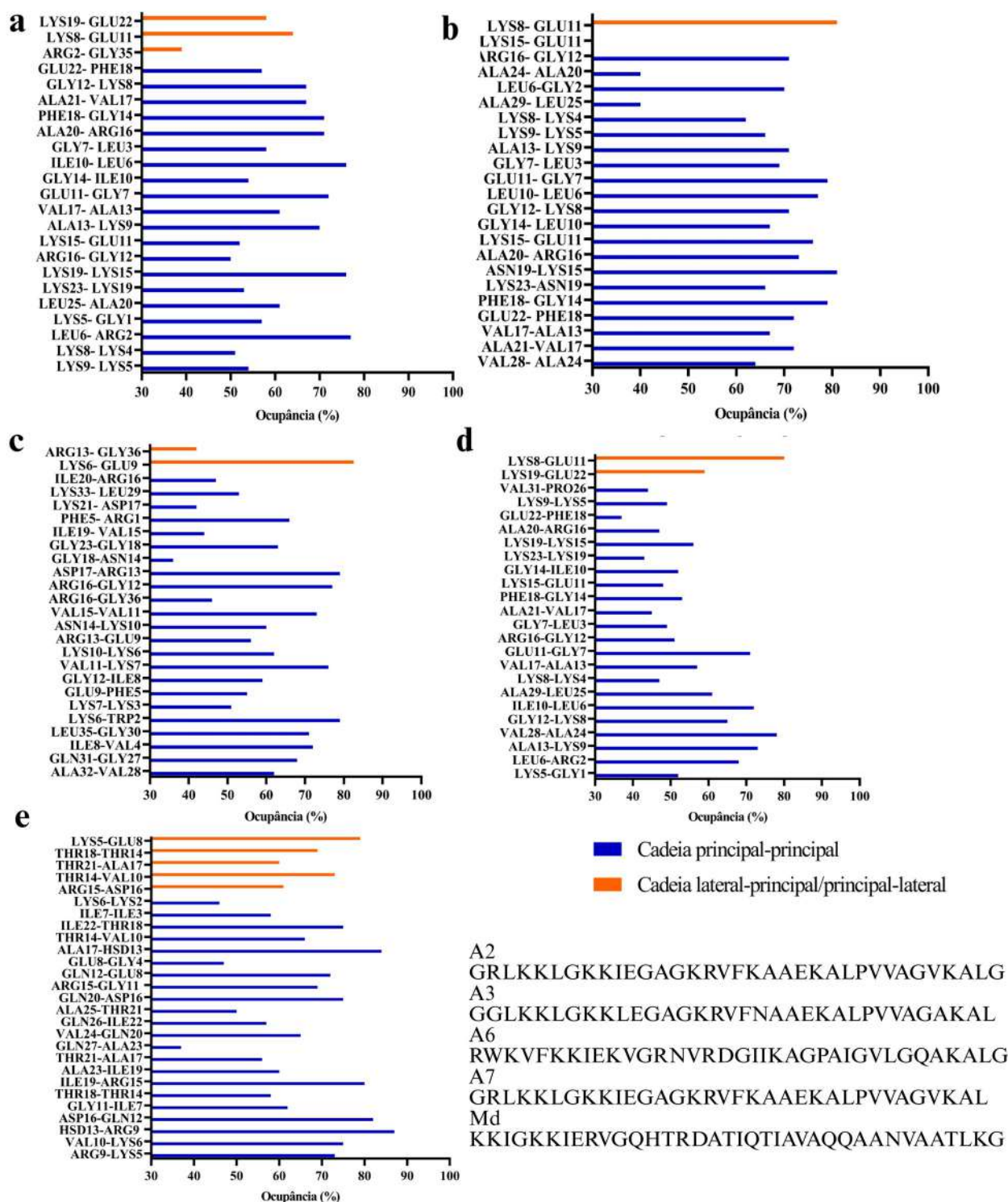


Figura 19. Perfil de ligações de hidrogênio em membranas Gram-positivas para cecropinas. Análise da ocupância (>30%) de ligações de hidrogênio intrapeptídicas durante simulações de dinâmica molecular em membrana bacteriana Gram-positiva para: (a) cecropina A2, (b) A3, (c) A6, (d) A7 e (e) Md, obtidos pelo *software* VMD 1.9.3.

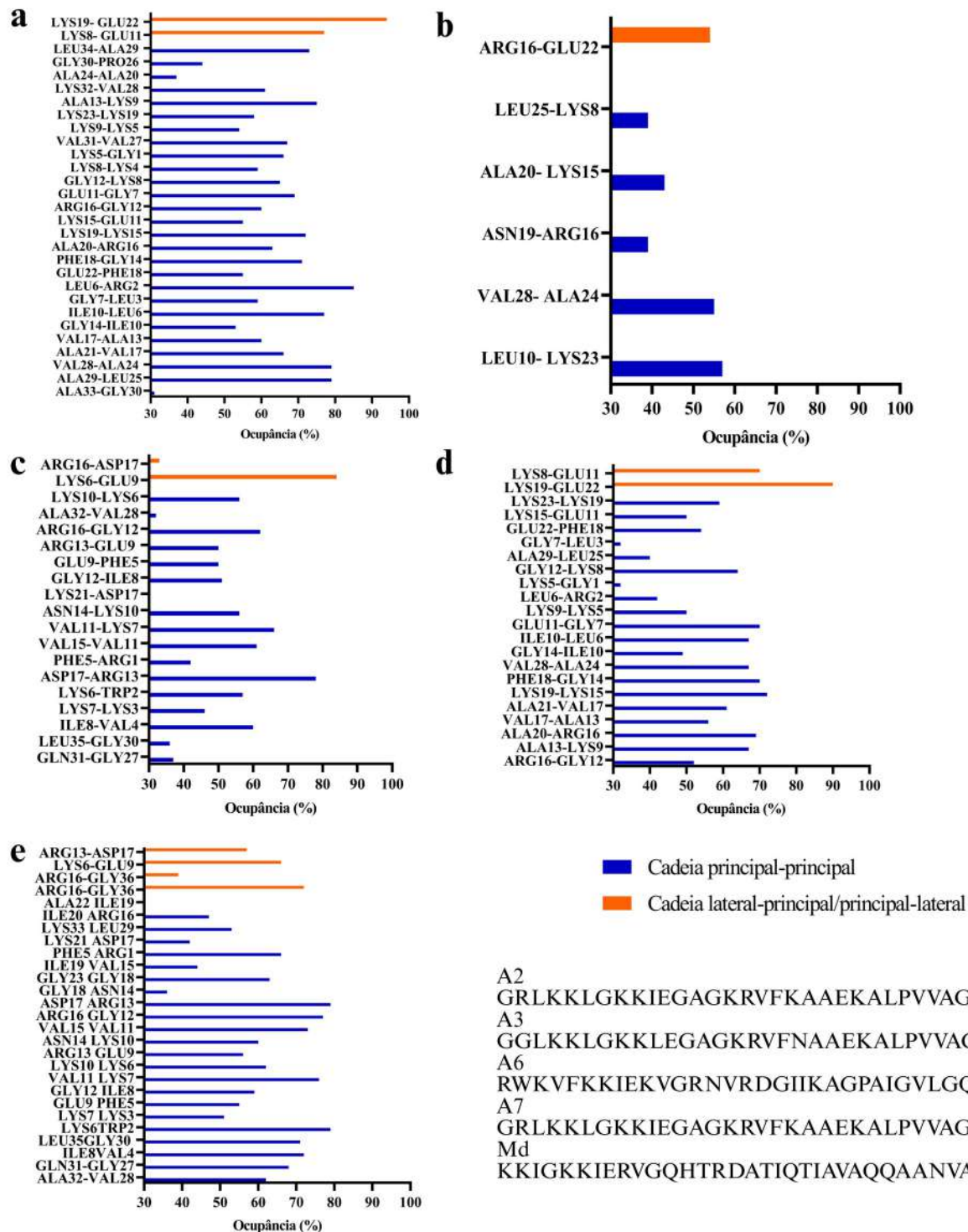


Figura 20. Perfil de ligações de hidrogênio em membranas Gram-positivas para cecropinas. Análise da ocupância (>30%) de ligações de hidrogênio intrapeptídicas durante simulações de dinâmica molecular em membrana bacteriana Gram-positiva para: (a) cecropina A2, (b) A3, (c) A6, (d) A7 e (e) Md, obtidos pelo *software* VMD 1.9.3.

5.7 Caracterização estrutural por dicroísmo circular

Para investigar a estrutura secundária adotada pelas cecropinas em diferentes ambientes, foram realizadas análises de dicroísmo circular (DC) em condições que mimetizam tanto meios aquosos quanto ambientes semelhantes a membranas. Essa técnica espectroscópica permite identificar a presença de estruturas como hélices α e folhas β com base na assinatura espectral característica dos peptídeos. Além disso, os dados obtidos por DC foram comparados aos resultados das simulações de dinâmica molecular em solução aquosa, com o objetivo de avaliar a estabilidade conformacional ao longo do tempo e verificar a coerência entre os dados experimentais e computacionais. A seguir, são apresentados os achados dessas análises integradas.

Os resultados de DC mostram que em solução de SDS, um surfactante anfifílico que mimetiza ambientes membranares, e em solução de TFE 50%, um solvente orgânico conhecido por induzir a formação de estruturas secundárias em peptídeos, as cecropinas apresentaram um espectro característico de α -hélice (Figura 21c e 21d). Os resultados sugerem que as cecropinas adotam uma conformação helicoidal em ambientes semelhantes a membranas, o que está diretamente relacionado ao seu mecanismo de ação antimicrobiano. Por outro lado, nas soluções de água e tampão, os espectros de dicroísmo circular não apresentaram os padrões característicos de α -hélice, indicando que as cecropinas podem adotar conformações mais desordenadas ou flexíveis em ambientes aquosos (Figura 20^a e 20b).

As análises de dinâmica molecular em água, avaliadas através dos parâmetros RMSD e RMSF, complementaram esses achados ao revelar padrões distintos de estabilidade entre as diferentes cecropinas. As cecropinas A3 e A7 destacaram-se por sua maior estabilidade conformacional, sendo que a A3 apresentou flutuações estruturais ainda menores que a A7, indicando uma conformação particularmente rígida. Em contraste, a cecropina A6 mostrou maior instabilidade na região dos resíduos 10-15, provavelmente devido a interações intramoleculares menos eficientes neste segmento. Já as cecropinas A2 e Md mantiveram estruturas relativamente estáveis ao longo da simulação. Curiosamente, enquanto o DC indicou perda completa da estrutura helicoidal em água, as simulações de dinâmica molecular mostraram retenção parcial desta conformação durante os 100 ns de análise. Esta aparente divergência pode ser explicada pelo fato de que as simulações capturaram estados intermediários antes do desdobramento completo, enquanto o DC refletiu o estado final de equilíbrio. Tal observação sugere que simulações mais prolongadas poderiam eventualmente mostrar a perda total da estrutura helicoidal, em concordância com os dados espectroscópicos

destacando, assim, a natureza dinâmica e dependente do tempo dessas transições conformacionais.

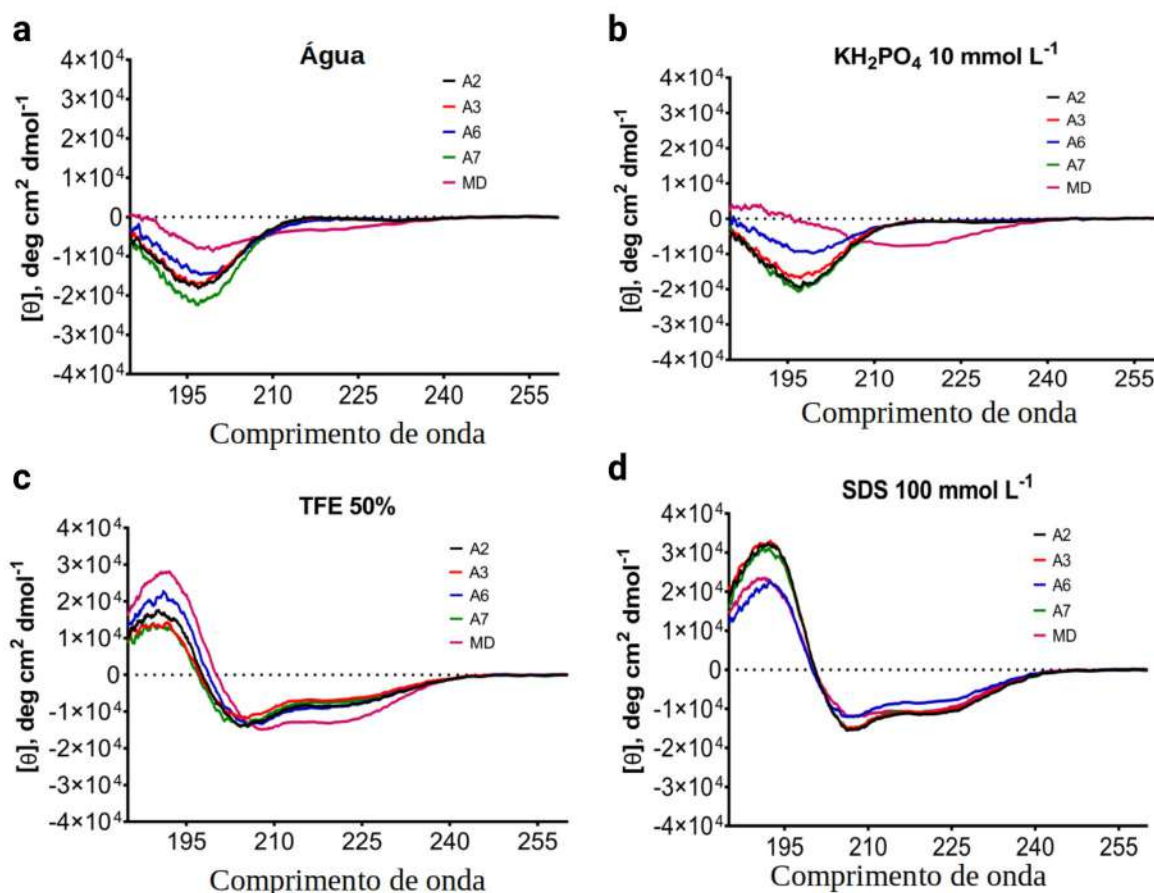


Figura 21. Espectros de DC das cinco cecropinas selecionadas em diferentes soluções, incluindo água ultrapura (a), tampão fosfato de potássio (10 mM) (b), TFE 50% (c) e SDS 100 mM (d). Os espectros mostram a caracterização das estruturas secundária das cecropinas A2 (preto), A3 (vermelho), A6 (azul), A7 (verde) e Md (rosa).

5.8 Determinação de CIM e CBM frente a cepas clínicas isoladas de mastite (*Klebsiella* sp. e *S. aureus*), cepas clínicas humanas (*Acinetobacter A. baumannii* e *P. aeruginosa*) e cepas de referência ATCC (*E. coli* e *K. pneumoniae*)

Com o intuito de avaliar a eficácia das cecropinas em um contexto mais próximo do ambiente clínico real, foram realizados testes de atividade antimicrobiana frente a cepas bacterianas isoladas de casos de mastite bovina e infecções humanas, além de cepas de referência (ATCC). Essa abordagem permite verificar a consistência da ação antimicrobiana dos peptídeos em diferentes concentrações, contribuindo para a identificação de candidatos promissores ao desenvolvimento de terapias alternativas.

Os resultados gerais mostraram que as cecropinas A2, A3, A6 e A7 apresentaram valores de CIM próximos aos do controle do meio de cultura em todas as concentrações (64 μ M a 0,5 μ M), com um aumento gradual nos valores de CIM nas concentrações mais baixas (0,5 μ M). Para as cepas de *Klebsiella* sp. isolado clínico de mastite e *K.*

pneumoniae ATCC, os peptídeos A2, A6 e A7 mantiveram valores de CIM próximos ao controle até 2 μ M para *Klebsiella* sp. e até 0,5 μ M contra *K. pneumoniae*, para A2 e A7 (Figuras 22c e 22d). Quando avaliadas contra *S. aureus* isolado clínico de mastite e *S. aureus* ATCC, nenhuma das cinco cecropinas mostrou capacidade de inibir o crescimento bacteriano em nenhuma das concentrações testadas (Figuras 22a e 22b). Por outro lado, todas as cecropinas, com exceção da cecropina Md, mantiveram valores de CIM próximos ao controle em todas as diluições frente a *A. baumannii* isolado clínico de humano (Figura 23a). Dados similares foram obtidos contra *P. aeruginosa* isolado clínico de humano (Figura 23c) e *E. coli* ATCC, onde a cecropina Md mostrou o menor desempenho (CIM = 8 μ M), a cecropina A3 apresentou valor de CIM igual a 1 μ M, enquanto as cecropinas A2, A6 e A7 inibiram o crescimento bacteriano em todas as concentrações testadas (Figura 23b).

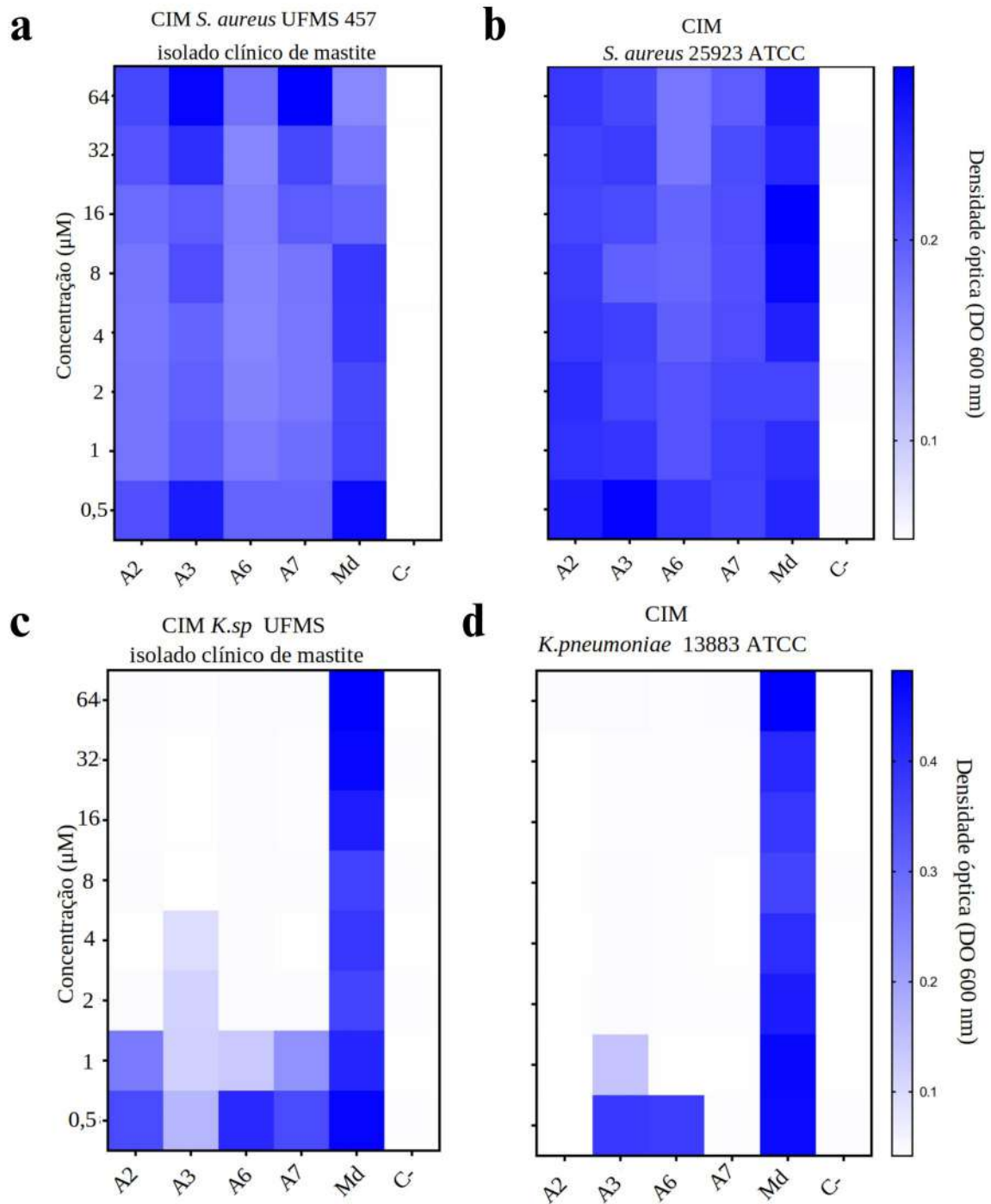


Figura 22. Perfil de atividade antimicrobiana de cecropinas contra as bactérias *S. aureus*, *Klebsiella sp* e *K. pneumoniae*. Representação gráfica em *heatmap* da concentração inibitória mínima (CIM, 64-0,5 μM) das cecropinas A2, A3, A6, A7 e Md frente a: **(a)** *S. aureus* isolado clínico de mastite, **(b)** *S. aureus* ATCC, **(c)** *Klebsiella sp*. isolado clínico de mastite e **(d)** *K. pneumoniae* ATCC 13883. A escala cromática azul indica baixa inibição; tons claros indicam alta inibição. C-: controle negativo.

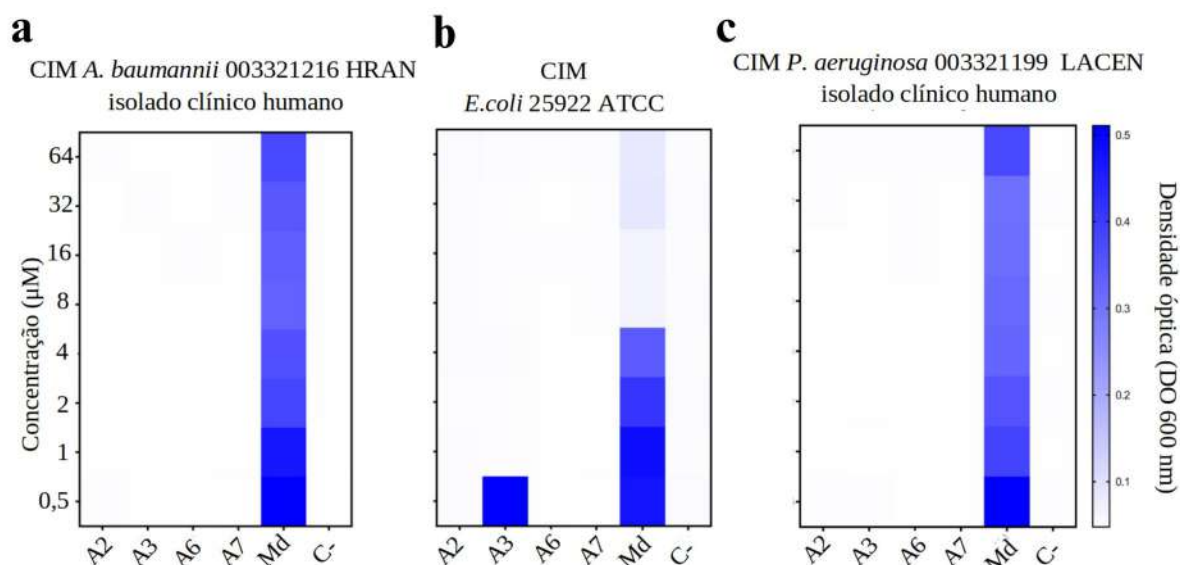


Figura 23. Perfil de atividade antimicrobiana de cecropinas contra as bactérias *S. aureus*, *Klebsiella sp* e *K. pneumoniae*. Representação gráfica em *heatmap* da concentração inibitória mínima (CIM, 64-0,5 µM) das cecropinas A2, A3, A6, A7 e Md frente a: (a) *A. baumannii* isolado clínico de humano, (b) *E. coli* ATCC e (c) *P. aeruginosa* isolado clínico de humano. A escala cromática azul indica baixa inibição; tons claros indicam alta inibição. C-: controle negativo.

Os testes de CBM avaliaram a eficácia das cecropinas A2, A3, A6, A7 e Md contra seis cepas bacterianas de relevância clínica. Entre os isolados clínicos, foram incluídos *S. aureus* e *Klebsiella sp*. provenientes de casos de mastite bovina, além de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* isolados de infecções humanas. As cepas de referência utilizadas foram *K. pneumoniae* ATCC 13883 e *E. coli* ATCC 25922. Os resultados demonstraram variações na atividade bactericida das cecropinas, com destaque para a superioridade das cecropinas A2, A7, A6 e A3 em comparação à cecropina Md.

As cecropinas A2, A3, A6 e A7 demonstraram perfis distintos de atividade antimicrobiana contra as diferentes cepas bacterianas testadas. Contra *Klebsiella sp*. isolado clínico de mastite, as cecropinas A3 e A7 apresentaram a maior potência, com concentração bactericida mínima (CBM) de 1 µM, enquanto as cecropinas A2 e A6 exibiram CBM entre 2-4 µM. Para *K. pneumoniae* ATCC, observou-se que as cecropinas A2, A6 e A7 mostraram a maior eficácia (CBM = 0,5 µM) em comparação com a cecropina A3 (CBM = 2 µM). Os resultados contra *A. baumannii* isolado clínico de humano revelaram que todas as cecropinas testadas (A2, A3, A6 e A7) apresentaram excelente atividade bactericida, com CBM de 0,5 µM. Resultado semelhante foi observado para *P. aeruginosa* isolado clínico de humano, onde todas as cecropinas exibiram CBM de 1 µM.

Contra *E. coli* ATCC, as cecropinas A2, A3 e A7 mantiveram alta potência (CBM = 0,5 μ M), enquanto a cecropina A6 mostrou atividade ligeiramente reduzida (CBM = 1 μ M).

A cecropina Md mostrou um perfil de atividade distinto, sendo ineficaz (CBM >64 μ M) contra *S. aureus*, *Klebsiella sp.*, *K. pneumoniae* ATCC, *A. baumannii* e *P. aeruginosa*. A única exceção foi observada contra *E. coli* ATCC, onde apresentou CBM de 8 μ M. Estes resultados demonstram que enquanto as cecropinas A2, A3, A6 e A7 exibem potente atividade contra uma ampla gama de bactérias Gram-negativas. A cecropina MD, por sua vez, mostrou atividade antimicrobiana substancialmente menor contra a maioria das cepas testadas, com exceção de uma moderada atividade contra *E. coli* (Tabela 2).

Tabela 2. Concentração bactericida mínima (CBM) das cinco cecropinas de estudo frente as bactérias *S. aureus*, *Klebsiella sp.*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, e *E. coli*.

Cecropinas	Concentração (μ M) por bactéria					
	<i>S. aureus</i> isolado clínico	<i>Klebsiella sp.</i> isolado clínico	<i>K. pneumoniae</i> ATCC	<i>A. baumannii</i> isolado clínico	<i>P. aeruginosa</i> isolado clínico	<i>E. coli</i> ATCC
A2	>64	2	0.5	0.5	1	0.5
A3	>64	1	2	0.5	1	0.5
A6	>64	4	0.5	0.5	1	1
A7	>64	1	0.5	0.5	1	0.5
Md	>64	>64	>64	>64	>64	8

5.9 Ensaios hemolíticos e citotóxicos para as cinco cecropinas selecionadas

Além da atividade antimicrobiana, a segurança e a biocompatibilidade das cecropinas são aspectos fundamentais para sua aplicação terapêutica. Para isso, foram conduzidos ensaios experimentais visando avaliar o potencial hemolítico, a citotoxicidade em células humanas e a capacidade de modulação da resposta inflamatória. Esses testes são essenciais para identificar peptídeos com baixa toxicidade e, ao mesmo tempo, com propriedades imunomodulatórias desejáveis. A seguir, são apresentados os resultados obtidos nos ensaios hemolítico, de viabilidade celular (MTT) e de quantificação de óxido nítrico (ON).

Os resultados obtidos no teste hemolítico demonstraram que as cecropinas A2, A3 e A6 apresentaram valores de hemólise variando entre 5% e 11%, os quais se mostraram bastante próximos aos valores observados para o controle salino em todas as concentrações testadas. Por outro lado, as cecropinas A7 e Md exibiram percentuais de hemólise mais elevados, com valores entre 12% e 28% (Figura 24a). De acordo com os critérios estabelecidos, uma porcentagem de hemólise superior a 15% é necessária para que uma substância seja considerada hemolítica. Dessa forma, os resultados indicam que com exceção da cecropinas A7 e Md as cecropinas testadas não podem ser classificadas como hemolíticas (Figura 24a).

No ensaio de viabilidade celular (MTT) todas as cecropinas testadas demonstraram uma diferença significativa em comparação ao grupo controle tratado com Triton X-100 (Figura 24b). Destacaram-se as cecropinas A2 e A7, as quais apresentaram as menores porcentagens de mortalidade celular, sugerindo uma menor toxicidade em relação às demais cecropinas analisadas. Em relação aos níveis de óxido nítrico (ON), todas as cinco cecropinas mostraram diferenças significativas quando comparadas ao grupo estimulado com LPS, um indutor clássico de resposta inflamatória (Figura 24c). As cecropinas A3 e A6 destacaram-se por apresentarem a maior diferença nos níveis de ON, sugerindo uma potencial capacidade de modular a resposta inflamatória.

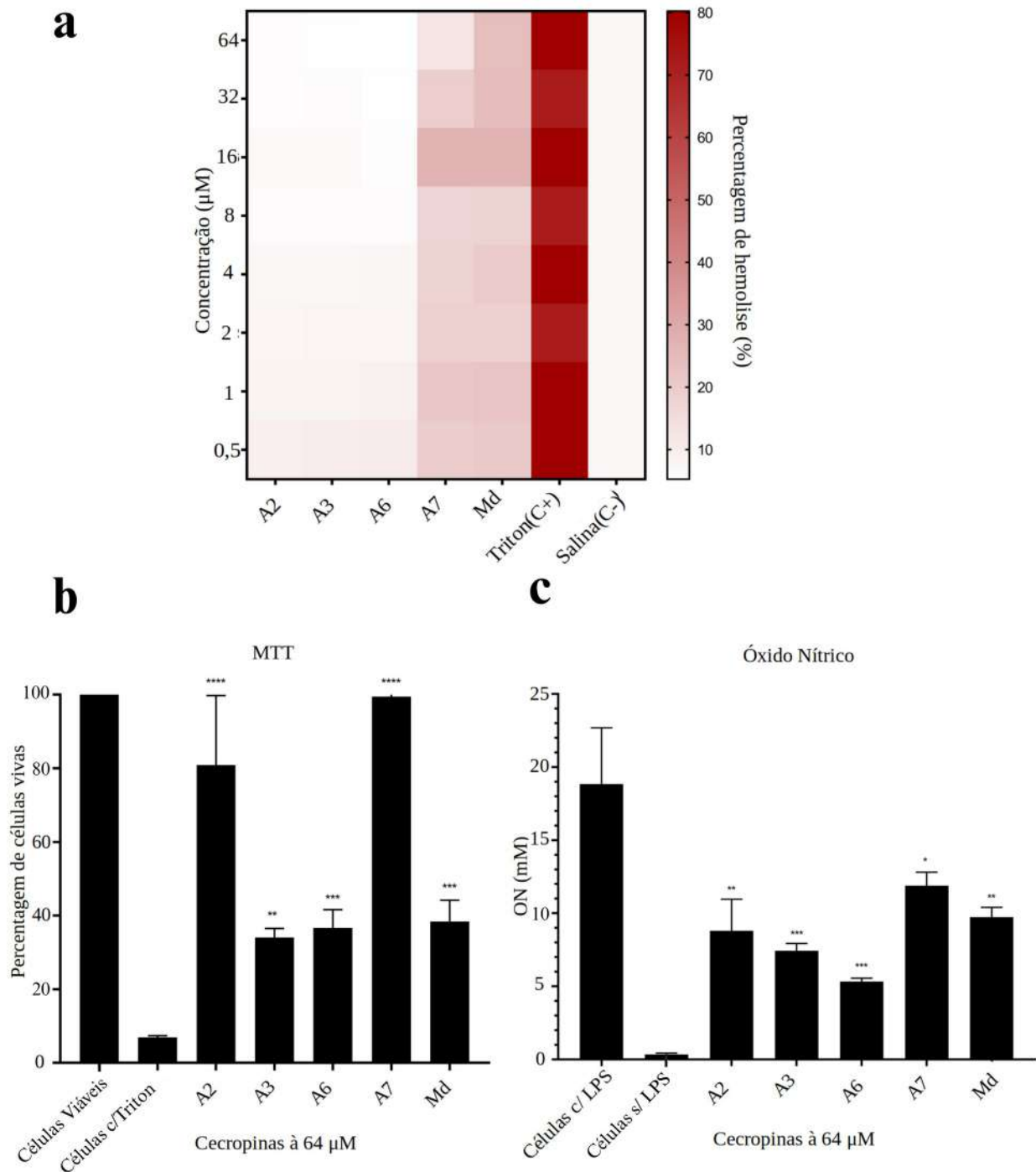


Figura 24. Análise da atividade hemolítica e efeitos celulares das cecropinas. **(a)** *Heatmap* da porcentagem de hemólise em diferentes concentrações (64 a $0,5 \mu\text{M}$), em que cores mais vermelhas indicam maior atividade hemolítica (até 80%) e cores mais brancas, menor atividade. Controles: Triton X-100 (C+, hemólise total) e solução salina (C-, baixa hemólise). **(b)** Viabilidade celular avaliada pelo ensaio de MTT. **(c)** Produção de óxido nítrico. Asteriscos (*) indicam significância estatística em relação aos controles (Triton X-100 para MTT e LPS para óxido nítrico).

6. DISCUSSÃO

No presente trabalho, selecionamos cecropinas naturais (A2, A3, A6, A7 e Md) e testamos sua atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo patógenos relevantes para mastite bovina e infecções humanas. Utilizamos análises *in silico*, como modelagem estrutural e dinâmica molecular, para avaliar a relação entre as propriedades físico-químicas desses peptídeos (momento hidrofóbico, flexibilidade, ângulo de hélice anfipática e potencial eletrostático) e sua interação com membranas bacterianas. Além disso, realizamos ensaios de concentração inibitória mínima (CIM), citotoxicidade, hemólise e modulação da resposta inflamatória para determinar seu perfil de segurança e eficácia terapêutica.

Quando analisamos a árvore de similaridade, fica evidente que as cecropinas se organizam de acordo com sua origem filogenética. Ao observar um ramo específico, é possível notar que cecropinas de diferentes tipos são semelhantes em termos de composição e distribuição dos aminoácidos, sugerindo que a classificação atual das cecropinas pode ser aprimorada, uma vez que cecropinas previamente consideradas distintas podem apresentar similaridades. Além disso, por meio do servidor *PRATT*, foram identificados padrões de aminoácidos para cada grupo taxonômico, indicando que os grupos taxonômicos possuem uma assinatura característica de aminoácidos.

As análises de DC revelaram que, em solução aquosa, as cecropinas perderam totalmente a conformação de α -hélice, indicando uma transição para estruturas mais desordenadas ou flexíveis. No entanto, os dados de dinâmica molecular em água, realizados em um período de 100 ns, mostraram que as cecropinas mantiveram parcialmente a conformação de α -hélice, especialmente na região central de suas estruturas. Essa aparente discrepância entre os resultados de DC e dinâmica molecular pode ser explicada pela diferença nos tempos de observação. Enquanto o DC reflete o estado final das cecropinas em solução aquosa após um equilíbrio completo, a dinâmica molecular em 100 ns pôde capturar um estado intermediário, no qual as cecropinas ainda não atingiram o desenovelamento total. Isso sugere que, se a simulação de dinâmica molecular fosse estendida para 1.000 ns ou mais, é possível que observássemos uma completa desestruturação das cecropinas, com a perda total da conformação de α -hélice, em concordância com os dados de DC.

As análises de dinâmica molecular em água, avaliadas através dos parâmetros RMSD e RMSF, complementaram esses achados ao revelar padrões distintos de estabilidade entre as diferentes cecropinas. As cecropinas A3 e A7 destacaram-se por sua maior estabilidade conformacional, sendo que a A3 apresentou flutuações estruturais ainda menores que a A7, indicando uma conformação particularmente rígida. Em contraste, a

cecropina A6 mostrou maior instabilidade na região dos resíduos 10-15, provavelmente devido a interações intramoleculares menos eficientes neste segmento. Já as cecropinas A2 e Md mantiveram estruturas relativamente estáveis ao longo da simulação.

Nossa análise estatística de correlação revelou correlações significativas entre as propriedades físico-químicas de momento hidrofóbico, flexibilidade e potencial eletrostático. Em um estudo realizado em 2023, foram gerados quatro modelos estruturais para o peptídeo magainina utilizando um algoritmo de predição de flexibilidade e modelagem estrutural *in silico*. Como resultado, os autores concluíram que a flexibilidade e o momento hidrofóbico são fatores determinantes nas interações destes peptídeos com membranas lipídicas específicas (BALLEZA et al, 2023).

No que diz respeito à flexibilidade, os resultados obtidos no estudo de Liu et al. (2013) demonstraram que o índice de flexibilidade é relevante. No entanto, ao contrário de outras propriedades estruturais, ela pode aumentar a atividade contra *E. coli* em peptídeos agrupados de forma rígida ou reduzir a atividade contra *E. coli* em peptídeos agrupados de forma flexível. O ponto ótimo de flexibilidade ocorre em torno de -0.5, conforme observado no presente estudo. Isso vai de encontro aos dados de atividade extraídos pelo levantamento de dados de atividade em μM , sendo que a cecropina A6 tem a flexibilidade mais próxima de 0,5 (flexibilidade = 0,45), e as demais quatro cecropinas selecionadas tem o valor de flexibilidade em torno de 0,4.

Em relação ao ângulo, o estudo realizado por Wieprecht et al. (1997) investigou a influência do ângulo formado pela face da hélice carregada positivamente na atividade da membrana. Foram utilizados seis peptídeos anfipáticos em forma de hélice, com ângulos variando entre 80° e 180°. No entanto, a hidrofobicidade, momento hidrofóbico e carga geral positiva foram projetados com base na sequência do peptídeo antibacteriano magainina 2. Os resultados revelaram que a capacidade dos peptídeos em induzir a liberação de corante de vesículas de fosfatidilglicerol (PG) carregadas negativamente diminuiu à medida que o ângulo aumentava. Entretanto, peptídeos com ângulos mais amplos (140-180°) apresentaram uma atividade permeabilizante consideravelmente maior em vesículas de fosfatidilcolina zwitteriônica (PC) e vesículas mistas de PC/PG (3:1) em comparação aos análogos que possuíam ângulos menores (80-120°). Além disso, os análogos com ângulos maiores foram mais ativos em ensaios antibacterianos e hemolíticos. Esses resultados corroboram com nossos dados de dinâmica molecular, tanto em ambiente aquoso quanto em membranas miméticas de bactérias, uma vez que mostram que a cecropina A6, a qual possui o ângulo mais estreito entre as cinco cecropinas, também apresenta menor estabilidade e atividade biológica relatada.

Em relação à hidrofobicidade, no estudo de Chen et al. (2007) foi observado que a maior hidrofobicidade está relacionada a uma maior atividade hemolítica. Além disso, foi

identificada uma faixa de hidrofobicidade ideal na qual uma alta atividade antimicrobiana pode ser alcançada. Tanto uma diminuição quanto um aumento na hidrofobicidade podem comprometer essa atividade ótima. Em um estudo mais recente de 2022, foram utilizados os modelos as-CATH4 e 5 para realizar uma análise de relação estrutura-atividade (SAR). Nesse estudo foi demonstrado que a hidrofobicidade, em vez de outras características, é o parâmetro físico-químico crítico que determina a taxa de mortalidade bacteriana dos PAMs α -helicoidais. Com o aumento da hidrofobicidade, as taxas de ação dos PAMs, a ligação bacteriana, a neutralização de LPS e a permeabilização da membrana externa e interna, também podem aumentar (ZHANG et al. 2022). Além disso, os PAMs mais hidrofóbicos, com taxas de mortalidade bacteriana aumentadas, demonstraram uma melhor potência terapêutica *in vivo* e uma menor propensão para induzir resistência bacteriana.

No que diz respeito ao potencial eletrostático, os estudos de Tong et al. (2007) e, mais recentemente, o trabalho de Teixeira (2012) demonstram que, no caso dos PAMs o potencial eletrostático influencia a eletroporação, sendo este um mecanismo em que a formação de poros nas membranas ocorre sob a influência de um campo elétrico externo. Assim, peptídeos que atuam nas membranas dos microrganismos, como as cecropinas, podem ter sua atividade afetada pelo potencial eletrostático.

No trabalho de Vizioli et al. (2000), foi descrito o isolamento de clones de cDNA e genômico que codificam o peptídeo antibacteriano cecropina do mosquito vetor da malária *A. gambiae*. Essas cecropinas isoladas foram posteriormente denominadas no banco YADAMP como cecropinas A2 e A7, as quais são as mesmas utilizadas no presente estudo. Naquele trabalho, as cecropinas foram testadas contra 12 bactérias Gram-positivas, 13 bactérias Gram-negativas, seis fungos e quatro leveduras, e observou-se uma maior especificidade por bactérias Gram-negativas. Essa seletividade foi explicada pela ausência de amidação nas cecropinas, uma vez que a cecropina amidada mostrou ser mais eficaz do que a não-amidada apenas contra duas espécies de patógenos, incluindo *Alcaligenes faecalis* e *Salmonella typhimurium*. Nossos dados de dinâmica molecular em membrana de bactéria Gram-negativa reforçam os achados desse estudo, uma vez que tanto a cecropina A2 quanto a cecropina A7 demonstraram maior estabilidade e interação com a membrana de bactéria Gram-negativa. No caso da cecropina A2, essa seletividade é ainda mais evidente, mostrando-se como a mais específica para bactérias Gram-negativas entre as cinco cecropinas selecionadas. No trabalho de Vizioli et al. (2000), a cecropina A3 foi testada com bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e mostrou maior eficácia frente às bactérias Gram-negativas, o que difere em parte dos nossos resultados de dinâmica molecular onde a cecropina A3

penetra totalmente a membrana de bactéria Gram-positiva, porém perdendo sua conformação na interação com membrana de bactéria Gram-negativa.

No trabalho de Choi et al. (2000) foram determinadas as propriedades antibacterianas e as sequências de cDNA de dois tipos de peptídeos antibacterianos da hemolinfa de lagartas comuns imunizadas, larvas de *S. litura* sendo uma delas a cecropina A6. As cecropinas de *S. litura* foram amplamente eficazes contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Os nossos dados de dinâmica molecular em membrana de bactéria Gram-positiva e Gram-negativa mostram que a cecropina A6 interage com ambas as membranas de forma similar, porém em comparação com as demais cecropinas a cecropina A6 apresentou uma menor afinidade no complexo molecular peptídeo-membrana.

Para a cecropina Md de *M. domestica* os resultados de dinâmica molecular em membrana de bactéria Gram-positiva e Gram-negativa indicam que esta é a cecropina menos seletiva dentre a cinco testadas, não conseguindo penetrar de forma eficaz em ambas as membranas. Esses resultados estão em concordância com as descobertas de Jin et al. (2006), que realizaram a clonagem do gene da cecropina Md para expressão na levedura metilotrófica *Pichia pastoris*, e conduziram testes com a cecropina Md purificada contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos. Os ensaios antimicrobianos demonstraram que a cecropina Md tinha amplo espectro de propriedades antimicrobianas, não sendo seletiva para fungos ou bactérias.

Conforme mencionado anteriormente, a mastite bovina é causada predominantemente por ação de bactérias Gram-negativas, tais como *E. coli*, *Klebsiella spp.* *Enterobacter spp.* (OLIVEIRA et al., 2013, ZHENG et al 2022) e por Gram-positivas como a *S. aureus*, *S. agalactiae* e *Mycoplasma spp.* (GARCIA, 2004, SHARUN et al., 2021). No presente trabalho, foram realizados testes de CIM com duas cepas de *S. aureus* (isolado clínico de mastite e ATCC), duas cepas de *Klebsiella* (*Klebsiella sp.* isolado clínico de mastite e *K. pneumoniae* ATCC) e uma cepa de *E. coli* ATCC, além de bactérias que de risco a saúde humana como *A. baumannii* e *P. aeruginosa* também isolados clínicos humanos. As cecropinas não demonstraram atividade inibitória contra as cepas de *S. aureus* (isolado clínico e ATCC) em nenhuma das concentrações testadas. Esse resultado pode ser explicado pela diferença entre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas na espessura da camada de peptidoglicano que envolve a membrana citoplasmática. Bactérias Gram-positivas exibem uma camada de fios de peptidoglicano que pode atingir um tamanho entre 30 e 100 nm, enquanto bactérias Gram-negativas têm uma camada de apenas alguns nanômetros o que pode ter dificultado a ação dessas cecropinas (ROHDE, 2019). Em contraste, para as cepas de *Klebsiella sp.* e *K. pneumoniae*, as cecropinas A2, A6 e A7 demonstraram atividade antimicrobiana significativa, mantendo valores de CIM

próximos ao controle em concentrações de até 2 μM para *Klebsiella sp.* e 0,5 μM para *K. pneumoniae*. Para *E. coli* ATCC, a cecropina Md mostrou capacidade de inibir o crescimento bacteriano até 8 μM , enquanto a cecropina A3 foi eficaz até 1 μM , enquanto as cecropinas A2, A6 e A7 apresentaram atividade em todas as concentrações testadas. Esses resultados indicam que as cecropinas testadas, em especial as cecropinas A2 e A7, tem capacidade de combater bactérias causadoras da mastite bovina.

Em relação a *A. baumannii*, as cecropinas A2, A6 e A7 mantiveram valores de CIM próximos ao controle em todas as concentrações testadas, indicando uma atividade antimicrobiana consistente. Esse resultado é promissor, considerando que *A. baumannii* é um patógeno frequentemente associado a infecções nosocomiais e resistência a múltiplos fármacos (MOTBAINOR, et al, 2020). Para *P. aeruginosa*, as cecropinas A2, A6 e A7 as cecropinas A2, A6 e A7 apresentaram níveis de CIM semelhantes ao controle em todas as concentrações testadas, indicando uma atividade antimicrobiana estável e eficaz. A *P. aeruginosa* é outro patógeno de grande relevância clínica, conhecido por sua resistência intrínseca a diversos antibióticos, o que dificulta o tratamento (MOTBAINOR, et al, 2020). A eficácia das cecropinas contra essa bactéria sugere que esses peptídeos podem ser uma alternativa terapêutica viável para infecções causadas por *P. aeruginosa*.

Ao comparar os dados de CIM com os resultados do teste de correlação de *Pearson*, observa-se que não há uma relação direta entre os valores absolutos das propriedades analisadas e os valores de CIM. No entanto, os dados sugerem uma relação inversa à indicada pela correlação de *Pearson*. Em *K. pneumoniae*, onde as cecropinas demonstraram atividade inibitória observa-se que, com exceção da cecropina A6, aquelas com maior momento hidrofóbico apresentam maior atividade. Contrastando com a correlação de *Pearson*, que indica uma relação positiva entre o momento hidrofóbico e os valores de CIM sugerindo que, quanto menor os valores de momento hidrofóbico maior seria atividade, ou seja, a correlação entre momento hidrofóbico e atividade antibacteriana é mostrada nos dados de CIM, porém a direção dessa correlação é diferente do sugerido pela correlação de *Pearson*.

Um comportamento semelhante é observado ao comparar os dados de hidrofobicidade e ângulo. De maneira geral, menores valores de hidrofobicidade correspondem a menores valores de CIM, o que sugere uma correlação positiva, em oposição à correlação negativa indicada pelo teste estatístico. Além disso, cecropinas com ângulos mais elevados apresentaram menores valores de CIM, o que contradiz os resultados da correlação de *Pearson*.

Os resultados revelam padrões distintos entre as diferentes propriedades analisadas. Enquanto momento hidrofóbico, hidrofobicidade e ângulo apresentaram relações inversas

às indicadas pela correlação de *Pearson*, o potencial eletrostático e a flexibilidade mostraram comportamento diferente. Para *K. pneumoniae*, tanto a flexibilidade quanto o potencial eletrostático não demonstraram influência significativa nos valores de CIM na correlação de *Pearson*, conforme confirmado pelos dados experimentais de CIM. As cecropinas apresentaram eficácia variável independentemente de seus valores de flexibilidade (que variaram entre 0,43 e 0,45) e potencial eletrostático (entre 2,11 e 2,58). Por exemplo, a cecropina A7, com baixo potencial eletrostático (2,11), foi eficaz, enquanto a A6, com alto potencial eletrostático (2,58), também mostrou atividade, indicando que esta propriedade isoladamente não determina a eficácia antimicrobiana.

Estes resultados sugerem que a atividade ótima das cecropinas depende prioritariamente da combinação equilibrada de momento hidrofóbico, hidrofobicidade e ângulo, enquanto flexibilidade e potencial eletrostático parecem ter menor influência no desempenho antimicrobiano contra *K. pneumoniae*. Esta interpretação está alinhada com a ausência de correlação estatisticamente significativa observada para estas duas propriedades nos testes de *Pearson*.

Comparando dos dados de CIM das cecropinas A2, A3, A6, A7 e Md com Ciprolac® (ciprofloxacino/ CIP) que é comumente utilizado no tratamento da mastite bovina, os resultados mostraram a CIP exibiu um espectro de ação mais amplo, com valores de CIM significativamente menores para cepas sensíveis (0,01-0,1 µg/mL ou \approx 0,03-0,3 µM para *E. coli*) (FIRSOV et al., 1998, DONG et al., 2019). No entanto, é importante destacar que cepas resistentes de *K. pneumoniae* podem apresentar CIM para CIP tão elevadas quanto 4 µg/mL (\approx 12 µM), aproximando-se da faixa de concentração onde as cecropinas demonstraram atividade (FIRSOV et al., 1998). Além disso, o presente estudo não avaliou as cecropinas em concentrações mais baixas que 0,5 µM. Contudo, as cecropinas A2 e A7, no trabalho de Vizioli et al (2000), mostraram atividade inibitória a apenas 0,1 µM frente a *Salmonella typhimurium* (Gram-negativa) e *Streptococcus pyogenes* (Gram-positiva).

Um aspecto interessante do CIP é seu efeito em concentrações subinibitórias (sub-CIM), onde demonstra capacidade de inibir a formação de biofilmes e reduzir a expressão de fatores de virulência em *E. coli* (DONG et al., 2019). Embora este efeito não tenha sido avaliado para as cecropinas no presente estudo, trabalhos com análogos estruturais (como a cecropina C18) sugerem que peptídeos antimicrobianos podem apresentar efeitos sinérgicos quando combinados com antibióticos convencionais (LI et al., 2022).

Estes resultados sugerem que as cecropinas, particularmente as variantes A2 e A7, representam alternativas promissoras para o tratamento de mastites causadas por patógenos Gram-negativos, especialmente em casos de resistência ao CIP (Dados não publicados). No entanto, sua inatividade contra *S. aureus* limita sua aplicação como

monoterapia (dados não publicados). Estudos futuros deverão explorar: (1) possíveis sinergias entre cecropinas e CIP contra patógenos bovinos, (2) o efeito das cecropinas em sub-CIM sobre a formação de biofilmes, e (3) modificações estruturais que possam ampliar seu espectro para incluir bactérias Gram-positivas (ZHENG et al., 2022; LI et al., 2022). A combinação de abordagens moleculares e farmacológicas pode representar uma estratégia inovadora no controle da mastite bovina, particularmente em cenários de resistência antimicrobiana (DONG et al., 2019; LI et al., 2022).

Quando observamos os dados de CIM e CBM em relação aos dados de dinâmica molecular em membrana é possível notar uma discrepância no comportamento das cecropinas em relação a *S. aureus* (Gram-positiva) e bactérias Gram-negativas. Enquanto a dinâmica molecular em membranas de bactérias Gram-positivas não refletiu a inefetividade das cecropinas observada nos testes de CIM e CBM contra *S. aureus* (isolado clínico e ATCC), a dinâmica molecular em membranas Gram-negativas confirmou a eficácia da cecropina A2, que penetrou e manteve-se estável na membrana, alinhando-se com seus resultados de CIM e CBM.

No teste hemolítico, observou-se que todas as cecropinas apresentaram baixa atividade hemolítica, com valores inferiores ao limiar de 50% necessário para considerar uma substância como hemolítica (CASTANO, 2000). Esses resultados sugerem um potencial maior terapêutico, uma vez que a toxicidade é uma das principais causas de falhas nos testes pré-clínicos, com estimativas indicando taxas de insucesso de até 90% (AMORIN et al., 2024)(AMORIN et al., 2024).

No ensaio de viabilidade celular todas as cecropinas mostraram diferenças significativas em relação ao controle positivo (células tratadas com Triton X-100), confirmando sua baixa citotoxicidade. Em relação ao ensaio de óxido nítrico, todas as cecropinas demonstraram capacidade de modular a resposta inflamatória, com reduções significativas nos níveis de óxido nítrico em comparação ao grupo estimulado com LPS. As cecropinas A3 e A6 destacaram-se por apresentarem as maiores reduções nos níveis de óxido nítrico, com a A6 mostrando a maior redução, sugerindo um potencial anti-inflamatório. Já as cecropinas A2, A7 e Md também mostraram atividade moduladora, porém em menor intensidade. Em conjunto, os resultados dos testes hemolíticos, de viabilidade celular e de óxido nítrico sugerem que as cecropinas A2 e A7 são as mais promissoras em termos de janela terapêutica, enquanto as cecropinas A3 e A6 destacam-se por seu maior potencial anti-inflamatório. A combinação de baixa toxicidade e atividade anti-inflamatória torna essas cecropinas candidatas para o desenvolvimento de novas terapias em conjunto.

7. CONCLUSÕES

As análises de correlação demonstraram associações significativas entre propriedades físico-químicas, momento hidrofóbico, flexibilidade e potencial eletrostático, em concordância com a literatura prévia. Esses parâmetros influenciam diretamente a interação entre peptídeos antimicrobianos e membranas lipídicas. A flexibilidade, por exemplo, apresenta um ponto ótimo em torno de -0,5 para atividade antibacteriana, enquanto o ângulo da hélice anfipática afeta a permeabilização de membranas bacterianas. Além disso, esses estudos mostram que a hidrofobicidade está associada tanto à atividade antimicrobiana quanto a efeitos hemolíticos, com uma faixa ideal para máxima eficácia. O potencial eletrostático também desempenha um papel crucial, influenciando a ligação e a eletroporação de membranas bacterianas.

Os resultados dos testes de CIM e CBM, aliados aos dados de dinâmica molecular em membranas, evidenciaram o potencial antimicrobiano das cecropinas A2, A3, A6 e A7, especialmente contra bactérias Gram-negativas. A cecropina A2 destacou-se como a mais eficaz, apresentando CIM de 0,5 μM para *K. pneumoniae* ATCC, *A. baumannii* e *E. coli* ATCC, o que foi corroborado por sua capacidade de penetrar e manter estabilidade na membrana Gram-negativa durante as simulações de dinâmica molecular. A cecropina A7 também demonstrou eficácia, com CIM de 0,5 μM para a maioria das cepas Gram-negativas. Em contraste, a cecropina Md mostrou-se ineficaz na maioria dos casos, apresentando CBM >64 μM para todas as cepas, exceto *E. coli* ATCC (8 μM). Apesar do desempenho positivo contra bactérias Gram-negativas, nenhuma das cecropinas foi eficaz contra *S. aureus*, possivelmente devido à complexidade da parede celular dessa bactéria.

Os resultados de DC confirmaram que as cecropinas adotam conformações de α -hélice em ambientes miméticos de membrana (SDS e TFE), o que está de acordo com as predições estruturais obtidas por modelagem molecular via *AlphaFold2*. A cecropina A2 novamente se destacou nos testes hemolíticos, apresentando taxas de hemólise entre 5,8% e 9,7%, além de alta viabilidade celular no ensaio de MTT e uma capacidade moderada de modular a produção de óxido nítrico. Esses achados indicam um perfil promissor para aplicações terapêuticas, combinando baixa citotoxicidade e potencial para interagir com células humanas sem causar danos significativos. As cecropinas A3 e A6 também se sobressaíram, especialmente por sua capacidade de modular a resposta inflamatória, resultando em reduções significativas nos níveis de óxido nítrico.

A cecropina A7, embora tenha apresentado maior atividade hemolítica (12% a 28%) em comparação com A2, A3 e A6, manteve alta viabilidade celular (98,4% a 100%), indicando baixa citotoxicidade. Já a cecropina Md, apesar de sua maior propensão à hemólise (18% a 28%), demonstrou potencial anti-inflamatório e estabilidade estrutural, embora em menor escala que as cecropinas A2 e A3.

Esses resultados abrem caminho para futuras investigações sobre o uso dessas moléculas em terapias antimicrobianas e anti-inflamatórias. Em particular, a cecropina A2 surge como um modelo promissor para o desenvolvimento de novas moléculas, cuja estrutura poderia ser otimizada para maior viabilidade comercial, preservando ou aprimorando suas propriedades terapêuticas.

8. PERSPECTIVAS

Com base nos resultados obtidos pretendemos realizar a elucidação estrutural das cinco cecropinas selecionadas por ressonância magnética nuclear (RMN), assim como seguir para os testes pré-clínicos em modelo animal com modelo de sepse murino, testes de toxicidade mais específicos (toxicidade aguda, subaguda e crônica, além de testes de genotoxicidade e carcinogenicidade). Buscaremos ainda melhor compreender os mecanismos de ação dessas cecropinas por microscopia de força atômica, dispersão de luz dinâmico e potencial zeta. Além disso pretendemos utilizar a cecropina A2 para gerar de variantes usando sistemas computacionais de LLMs (Large Liguage Models) Multi-Agente e testar *in vitro* essas variantes.

9. REFERÊNCIAS

- AHMAD, V.; KHAN, M. S.; JAMAL, Q. M. S.; ALZOHAIYRY, M. A.; AL KARAAWI, M. A.; SIDDIQUI, M. U. Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 49, n. 1, p. 1–11, 2017.
- AHMED, K. B.; AYAZ, T. H.; RAMAN, A.; VEERAPPAN, A. **Materials Science and Engineering: C**, v. 68, p. 939, 2016.
- AMORIM, A. M. B. et al. Advancing Drug Safety in Drug Development: Bridging Computational Predictions for Enhanced Toxicity Prediction. **Chemical Research in Toxicology**, 2024.
- AUVRAY, F.; HIRST, J. D. Unfolding Dynamics of a Photoswitchable Helical Peptide. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 124, n. 26, p. 5380–5392, 2020.

- BABRA, C. et al. The persistence of biofilm-associated antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical bovine mastitis cases in Australia. **Folia Microbiologica**, v. 58, p. 469–474, 2013.
- BALLEZA, D. Peptide Flexibility and the Hydrophobic Moment are Determinants to Evaluate the Clinical Potential of Magainins. **The Journal of Membrane Biology**, p. 1–14, 2023.
- BELDA, I. et al. ENPDA: an evolutionary structure-based de novo peptide design algorithm. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 19, p. 585–601, 2005.
- BENFIELD, A. H.; HENRIQUES, S. T. Mode-of-action of antimicrobial peptides: membrane disruption vs. intracellular mechanisms. **Frontiers in Medical Technology**, v. 2, p. 610997, 2020.
- BOLOURI MOGHADDAM, M. R. et al. The potential of the *Galleria mellonella* innate immune system is maximized by the co-presentation of diverse antimicrobial peptides. **Biological Chemistry**, v. 397, n. 9, p. 939–945, 2016.
- BOPARAI, J. K.; SHARMA, P. K. Mini Review on Antimicrobial Peptides, Sources, Mechanism and Recent Applications. **Protein & Peptide Letters**, v. 27, n. 1, p. 4–16, 2020.
- BRESER, M. L. et al. Chitosan and Cloxacillin Combination Improve Antibiotic Efficacy Against Different Lifestyle of Isolates from Chronic Bovine Mastitis. **Scientific Reports**, v. 8, p. 1–13, 2018.
- BROUILLETTE, E. et al. Persistence of a *Staphylococcus aureus* small-colony variant under antibiotic pressure in vivo. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 35–41, 2004.
- BUSSI, G.; DONADIO, D.; PARRINELLO, M. Canonical sampling through velocity rescaling. **The Journal of Chemical Physics**, v. 126, n. 1, 2007.
- CARDOSO, M. H. et al. An N-capping asparagine–lysine–proline (NKP) motif contributes to a hybrid flexible/stable multifunctional peptide scaffold. **Chemical Science**, v. 13, n. 32, p. 9410–9424, 2022.
- CARDOSO, M. H. et al. Non-lytic antibacterial peptides that translocate through bacterial membranes to act on intracellular targets. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 19, p. 4877, 2019.
- CAPELLA-GUTIERREZ, S.; SILLA-MARTINEZ, J. M.; GABALDON, T. trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. **Bioinformatics**, v. 25, n. 15, p. 1972–1973, 2009.
- CASTELANI, L. et al. Short communication: Activity of nisin, lipid bilayer fragments and cationic nisin-lipid nanoparticles against multidrug-resistant *Staphylococcus* spp.

isolated from bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 1, p. 678–683, 2019.

CASTANO, S.; DESBAT, B.; DUFOURCQ, J. Ideally amphipathic β -sheeted peptides at interfaces: structure, orientation, affinities for lipids and hemolytic activity of (KL) mK peptides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1463, n. 1, p. 65–80, 2000.

CHEN, Y. et al. Role of peptide hydrophobicity in the mechanism of action of α -helical antimicrobial peptides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 4, p. 1398–1406, 2007.

CHEN, C. H. et al. Simulation-guided rational de novo design of a small pore-forming antimicrobial peptide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 141, n. 12, p. 4839–4848, 2019.

CHOI, C. S. et al. Antibacterial properties and partial cDNA sequences of cecropin-like antibacterial peptides from the common cutworm, *Spodoptera litura*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, v. 125, n. 3, p. 287–297, 2000.

CHRISTENSEN, B. et al. Channel-forming properties of cecropins and related model compounds incorporated into planar lipid membrane. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 85, p. 5072–5076, 1988.

DA COSTA, J. P. et al. Antimicrobial peptides: an alternative for innovative medicines? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 5, p. 2023–2040, 2015.

DATHE, M. et al. Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipathic helical peptides. **FEBS Letters**, v. 403, n. 2, p. 208–212, 1997.

DUBOS, R. J. Studies on a bactericidal agent extracted from a soil bacillus: II. Protective effect of the bactericidal agent against experimental pneumococcus infections in mice. *Journal of Experimental Medicine*, v. 70, n. 1, p. 11–17, 1939.

DOMINGUES, M. M. et al. Antimicrobial protein rBPI21-induced surface changes on Gram-negative and Gram-positive bacteria. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 10, n. 3, p. 543–551, 2014.

DONG, G. et al. Effects of sub-minimum inhibitory concentrations of ciprofloxacin on biofilm formation and virulence factors of *Escherichia coli*. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 23, p. 15–21, 2019

EPAND, R. M.; EPAND, R. F. Domains in bacterial membranes and the action of antimicrobial agents. **Molecular BioSystems**, v. 5, n. 6, p. 580–587, 2009.

- EWALD, P. P. Die Berechnung optischer und elektrostatischer Gitterpotentiale. **Annalen der Physik**, v. 369, 1921.
- FAO. (2023). Dairy Market Review: Overview of global dairy market developments in 2022.
- FANG, Q. et al. Pressor and tachycardic responses to intrathecal administration of neuropeptide FF in anesthetized rats. **Peptides**, v. 31, n. 4, p. 683–688, 2010.
- FERNÁNDEZ-BILLÓN, M. et al. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Biofilm**, v. 5, p. 100129, 2023.
- FJELL, C. D. et al. Designing antimicrobial peptides: form follows function. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, n. 1, p. 37–51, 2012.
- FINK, J. et al. The chemical synthesis of cecropin D and an analog with enhanced antibacterial activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 11, p. 6260–6267, 1989.
- FIDLER, D. P. The globalization of public health: emerging infectious diseases and international relations. **Indiana Journal of Global Legal Studies**, p. 11–51, 1997.
- FISER, A.; ŠALI, A. MODELLER: Generation and Refinement of Homology-Based Protein Structure Models. **Methods in Enzymology**, v. 374, p. 461–491, 2003.
- FIRSOV, A. A. et al. MIC-based interspecies prediction of the antimicrobial effects of ciprofloxacin on bacteria of different susceptibilities in an in vitro dynamic model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 11, p. 2848–2852, 1998.
- FOX, M. A. et al. Design and characterization of novel hybrid antimicrobial peptides based on cecropin A, LL-37 and magainin II. **Peptides**, v. 33, n. 2, p. 197–205, 2012.
- FLYNN, C. E.; GUARNER, J. Emerging antimicrobial resistance. **Modern Pathology**, v. 36, n. 9, p. 100249, 2023.
- GRAF, M.; WILSON, D. N. Intracellular antimicrobial peptides targeting the protein synthesis machinery. **Antimicrobial Peptides: Basics for Clinical Application**, p. 73–89, 2019.
- GAO, B. et al. Structural and functional characterization of two genetically related meucin peptides highlights evolutionary divergence and convergence in antimicrobial peptides. **The FASEB Journal**, v. 23, n. 4, p. 1230–1245, 2009.
- GARCIA, A. Contagious vs. environmental mastitis. 2004.
- GODOY-SANTOS, F. et al. Efficacy of a ruminal bacteriocin against pure and mixed cultures of bovine mastitis pathogens. **Indian Journal of Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 304–312, 2019.
- GOMES, F. et al. Bovine Mastitis Disease/Pathogenicity: **Evidence of the Potential Role of Microbial Biofilms**. *Pathogens and Disease*, v. 74, n. 3, p. 1–19, 2016.

- GU, H. et al. Three-Dimensional Structure of the Antimicrobial Peptide Cecropin P1 in Dodecylphosphocholine Micelles and the Role of the C-Terminal Residues. **ACS Omega**, v. 7, n. 36, p. 31924–31934, 2022.
- GUPTA, A. et al. Combatting antibiotic-resistant bacteria using nanomaterials. **Chemical Society Reviews**, v. 48, n. 2, p. 415–427, 2019.
- GURAO, A.; KASHYAP, S. K.; SINGH, R. β -defensins: An innate defense for bovine mastitis. **Veterinary World**, v. 10, n. 8, p. 990–998, 2017.
- HESS, B. et al. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 18, p. 1463–1472, 1997.
- HALASA, T. et al. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. **Veterinary Quarterly**, v. 29, n. 1, p. 18–31, 2007.
- HARRIS, F. et al. Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms. **Current Protein & Peptide Science**, v. 10, n. 6, p. 585–606, 2009.
- HOLLAND, J. H. Adaptation in Natural & Artificial Systems - An Introductory Analysis with Application to Biology. **MIT Press**, 1992.
- HOLLMANN, A. et al. Antimicrobial peptides: Interaction with model and biological membranes and synergism with chemical antibiotics. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, p. 204, 2018.
- HOSKIN, D. W.; RAMAMOORTHY, A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v. 1778, n. 2, p. 357–375, 2008.
- HULTMARK, D. et al. Insect immunity: isolation and structure of cecropin D and four minor antibacterial components from *Cecropia* pupae. *European Journal of Biochemistry*, v. 127, n. 1, p. 207–217, 1982.
- JIA, L. et al. Structure based thermostability prediction models for protein single point mutations with machine learning tools. *PLoS ONE*, v. 10, n. 9, p. e0138022, 2015.
- JIN, F. et al. Expression and characterization of a housefly cecropin gene in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, v. 49, n. 1, p. 39–46, 2006.
- KATOH, K. et al. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings in Bioinformatics**, v. 20, n. 4, p. 1160–1166, 2019.
- KORTRIGHT, K. E. et al. Phage Therapy: A Renewed Approach to Combat Antibiotic-Resistant Bacteria. **Cell Host & Microbe**, v. 25, n. 2, p. 219–232, 2019.

- KOCZULLA, R. et al. An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 11, p. 1665–1672, 2003.
- KUMAR, G. S. N. et al. Study on incidence and economics of clinical mastitis. **Karnataka Journal of Agricultural Sciences**, v. 23, n. 2, p. 407–408, 2010.
- LECUN, Y. et al. Deep learning. **Nature**, v. 521, n. 7553, p. 436–444, 2015.
- LEE, E. Y. et al. Mapping membrane activity in undiscovered peptide sequence space using machine learning. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 48, p. 13588–13593, 2016.
- LEI, J. et al. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. **American Journal of Translational Research**, v. 11, n. 7, p. 3919–3931, 2019.
- LIM, S. M. S. et al. The global prevalence of multidrug-resistance among *Acinetobacter baumannii* causing hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia and its associated mortality: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Infection**, v. 79, n. 6, p. 593–600, 2019.
- LEÓN-GALVÁN, M. F. et al. Molecular detection and sensitivity to antibiotics and bacteriocins of pathogens isolated from bovine mastitis in family dairy herds of central Mexico. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.
- LIU, L. et al. Flexibility is a mechanical determinant of antimicrobial activity for amphipathic cationic α -helical antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1828, n. 11, p. 2479–2486, 2013.
- LOMBARDI, L. et al. Insights into the antimicrobial properties of hepcidins: advantages and drawbacks as potential therapeutic agents. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 6319–6341, 2015.
- LOWENBERGER, C. et al. Antimicrobial activity spectrum, cDNA cloning, and mRNA expression of a newly isolated member of the cecropin family from the mosquito vector *Aedes aegypti*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 29, p. 20092–20097, 1999.
- MAGANA, M. et al. The value of antimicrobial peptides in the age of resistance. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 20, n. 9, p. e216–e230, 2020.
- MAFOKWANE, T. et al. Gastrointestinal Infection in South African Children under the Age of 5 years: A Mini Review. **Gastroenterology Research and Practice**, v. 2023, n. 1, p. 1906782, 2023.
- MAHLAPUU, M. et al. Antimicrobial peptides: an emerging category of therapeutic agents. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6 p. 194, 2016.
- MEHER, P. K. et al. Predicting antimicrobial peptides with improved accuracy by incorporating the compositional, physico-chemical and structural features into Chou's general PseAAC. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 42362, 2017.

MIYAMOTO, S.; KOLLMAN, P. A. SETTLE: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. **Journal of Computational Chemistry**, v. 13, n. 8, p. 952–962, 1992.

MISHRA, B. et al. Host defense antimicrobial peptides as antibiotics: design and application strategies. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 38, p. 87–96, 2017.

MOLINERI, A. I. et al. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis: Systematic review and meta-analysis. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 188, p. 105261, 2021.

MOTBAINOR, Hilina; BEREDDED, Fetlework; MULU, Wondemagegn. Multi-drug resistance of blood stream, urinary tract and surgical site nosocomial infections of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* among patients hospitalized at Felegehiwot referral hospital, Northwest Ethiopia: a cross-sectional study. **BMC infectious diseases**, v. 20, p. 1-11, 2020.

MUELLER, M.; TAINTER, C. R. *Escherichia coli* infection. In: **StatPearls [Internet]**. StatPearls Publishing, 2023.

MUELLER, M. et al. Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices. **Food Chemistry**, v. 122, n. 4, p. 987–996, 2010.

NOBLE, W. S. What is a support vector machine? **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 1565–1567, 2006.

NASEEM, S. A. et al. Sustain inhibition of nitric oxide by NG-nitro-L-arginine improves myocardial function following ischemia/reperfusion in isolated perfused rat heart. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 27, n. 1, p. 419–426, 1995.

DE OLIVEIRA, D. M. P. et al. Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 3, e00181-19, 2020.

OLIVEIRA, L. et al. Characterization of clinical mastitis occurring in cows on 50 large dairy herds in Wisconsin. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 12, p. 7538–7549, 2013.

OLIVARES, J. et al. The intrinsic resistome of bacterial pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 103, 2013.

O'NEILL, J. I. M. Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. **Review on Antimicrobial Resistance**, 2014.

OSHIRO, K. G. et al. Computer-aided design of antimicrobial peptides: are we generating effective drug candidates? **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 3097, 2020.

OTVOS, L. JR. The short proline-rich antibacterial peptide family. **Cellular and**

Molecular Life Sciences, v. 59, p. 1138–1150, 2002.

PACHÓN-IBÁÑEZ, M. E. et al. Perspectives for clinical use of engineered human host defense antimicrobial peptides. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 3, p. 323–342, 2017.

PENG, J. et al. Novel cecropin-4 derived peptides against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antibiotics**, v. 10, n. 1, p. 36, 2021.

PARK, A. R. et al. Expression of Antimicrobial Peptide (AMP), Cecropin B, in a Fused Form to SUMO Tag With or Without Three-Glycine Linker in *Escherichia coli*. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, p. 1–10, 2021.

PARK, Young Kyung et al. Prevalence and antibiotic resistance of mastitis pathogens isolated from dairy herds transitioning to organic management. **Journal of veterinary science**, v. 13, n. 1, p. 103-105, 2012.

PARAMASIVAM, Ragul et al. Is AMR in dairy products a threat to human health? An updated review on the origin, prevention, treatment, and economic impacts of subclinical mastitis. **Infection and Drug Resistance**, p. 155-178, 2023.

PASCUAL, L. et al. The transcriptome of *Spodoptera exigua* larvae exposed to different types of microbes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 42, p. 557–570, 2012.

PASUPULETI, M. et al. Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 32, p. 143–171, 2012.

PARDHI, D. M. et al. Anti-bacterial activity of inorganic nanomaterials and their antimicrobial peptide conjugates against resistant and non-resistant pathogens. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 586, p. 119531, 2020.

PERSICO, M. et al. Formation of peptide layers and adsorption mechanisms on a negatively charged cation-exchange membrane. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 508, p. 488–499, 2017.

PONNUVEL, K. M. et al. Molecular evolution of the cecropin multigene family in silkworm *Bombyx mori*. **Bioinformation**, v. 5, n. 3, p. 97, 2010.

PFALZGRAFF, A. et al. Antimicrobial peptides and their therapeutic potential for bacterial skin infections and wounds. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 281, 2018.

QUESADA, H. et al. Birth-and-death evolution of the Cecropin multigene family in *Drosophila*. **Journal of Molecular Evolution**, v. 60, p. 1–11, 2005.

ROHDE, M. The Gram-positive bacterial cell wall. **Microbiology Spectrum**, v. 7, n. 3, 2019.

- ROMERO, J. et al. Assessing Financial Impacts of Subclinical Mastitis on Colombian Dairy Farms. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 5, p. 1–11, 2018.
- ROY, S. et al. Convergence of biofilm formation and antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii* infection. *Frontiers in Medicine*, v. 9, p. 793615, 2022.
- SEHRAWAT, N.; GAKHAR, S. K. Genome wide analysis of Cecropin multigene family in *Anopheles gambiae* pest strain. **Journal of Advanced Bioinformatics Applications and Research**, v. 5, p. 163–171, 2014.
- SINHA, M. K. et al. Subclinical mastitis in dairy animals: incidence, economics, and predisposing factors. *The Scientific World Journal*, v. 2014, 2014.
- SHAH, M. S. et al. Methicillin resistance genes and *in vitro* biofilm formation among **Staphylococcus aureus** isolates from bovine mastitis in India. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 64, p. 117–124, 2019.
- SHARUN, K. et al. Advances in therapeutic and managemental approaches of bovine mastitis: a comprehensive review. **Veterinary Quarterly**, v. 41, n. 1, p. 107–136, 2021..
- SIM, J. et al. Prediction of protein solvent accessibility using fuzzy k-nearest neighbor method. **Bioinformatics**, v. 21, n. 12, p. 2844–2849, 2005.
- SMALL, B. G. et al. Efficient discovery of anti-inflammatory small-molecule combinations using evolutionary computing. **Nature Chemical Biology**, v. 7, n. 21, p. 902–908, 2011.
- STAMATAKIS, A. RAXML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. **Bioinformatics**, v. 30, p. 1312–1313, 2014.
- SU, Y. et al. Fluoroquinolone-resistant and extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from the milk of cows with clinical mastitis in Southern Taiwan. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 49, n. 6, p. 892–901, 2016.
- TEIXEIRA, V. et al. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. **Progress in Lipid Research**, v. 51, n. 2, p. 149–177, 2012.
- TONG, K. I. et al. Different electrostatic potentials define ETGE and DLG motifs as hinge and latch in oxidative stress response. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, n. 21, p. 7511–7521, 2007.
- TORRES, M. D. T.; DE LA FUENTE-NUNEZ, C. Toward computer-made artificial antibiotics. **Current Opinion in Microbiology**, v. 51, p. 30–38, 2019.
- THOMPSON-CRISPI, K. et al. Bovine Mastitis: *Frontiers in Immunogenetics*. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 1–10, 2014.
- TRAVKOVA, O. G. et al. The interaction of antimicrobial peptides with membranes. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 247, p. 521–

532, 2017.

ULLAH, A. et al. Discovery of stylissatin A analogs exhibiting potent nitric oxide inhibition. **Bioorganic Chemistry**, v. 124, p. 105841, 2022.

ULMSCHNEIDER, J. P. Charged antimicrobial peptides can translocate across membranes without forming channel-like pores. **Biophysical Journal**, v. 113, n. 1, p. 73–81, 2017.

VIZIOLI, J. et al. Cloning and analysis of a cecropin gene from the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. **Insect Molecular Biology**, v. 9, n. 1, p. 75–84, 2000.

TRIMBLE, M. J. et al. Polymyxin: alternative mechanisms of action and resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 10, p. a025288, 2016.

YOUNG-SPEIRS, M. et al. Host defense cathelicidins in cattle: types, production, bioactive functions and potential therapeutic and diagnostic applications. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 51, n. 6, p. 813–821, 2018.

WANG, A. Y. et al. Antioxidative and anti-inflammatory properties of Citrus sulcata extracts. **Food Chemistry**, v. 124, n. 3, p. 958–963, 2011.

WANG, G. Antimicrobial Peptides: Discovery, Design and Novel Therapeutic Strategies. **CAB International**, 2017.

WANG, M. et al. Design, expression, and characterization of a novel cecropin A-derived peptide with high antibacterial activity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, p. 1765–1775, 2019.

WANG, S. et al. Antimicrobial peptides as potential alternatives to antibiotics in food animal industry. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 5, p. 603, 2016.

WANG, X. et al. Expression of cecropin B in *Pichia pastoris* and its bioactivity *in vitro*. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 2, n. 4, p. 655–660, 2011.

WANG, X. et al. An enhanced anti-tumor effect of apoptin-cecropin B on human hepatoma cells by using bacterial magnetic particle gene delivery system. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 496, n. 2, p. 719–725, 2018.

WATTS, J. L. Etiological agents of bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 41–66, 1988.8.

WEI, R. Y. et al. Anti-inflammatory activity of cecropin-A2 from *Musca domestica*. **Microbial Pathogenesis**, v. 110, p. 637–644, 2017.

WIEPRECHT, T. et al. Modulation of membrane activity of amphipathic, antibacterial peptides by slight modifications of the hydrophobic moment. **FEBS Letters**, v. 417, n. 1, p. 135–140, 1997.

WIEPRECHT, T. et al. Influence of the angle subtended by the positively charged helix face on the membrane activity of amphipathic, antibacterial peptides. **Biochemistry**, v. 36, n. 42, p. 12869–12880, 1997.

XIAO, X. et al. iAMP-2L: a two-level multi-label classifier for identifying antimicrobial peptides and their functional types. **Analytical Biochemistry**, v. 436, n. 2, p. 168–177, 2013.

ZHANG, M. et al. Hydrophobicity determines the bacterial killing rate of α -helical antimicrobial peptides and influences the bacterial resistance development. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 65, n. 21, p. 14701–14720, 2022.

ZAATOUT, N. et al. *Staphylococcus aureus* persistence properties associated with bovine mastitis and alternative therapeutic modalities. **Journal of Applied Microbiology**, v. 129, n. 5, p. 1102–1119, 2020.

ZHAO, Y. et al. Antimicrobial activity and stability of the D-amino acid substituted derivatives of antimicrobial peptide polybia-MPI. **AMB Express**, v. 6, p. 1–11, 2016.

ZIAJA, M. et al. Cecropins in cancer therapies-where we have been? **European Journal of Pharmacology**, v. 882, p. 173317, 2020.

ZHENG, Z. et al. Synergistic efficacy of *Aedes aegypti* antimicrobial peptide cecropin A2 and tetracycline against *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 7, e00686-17, 2017.

ZHENG, Z. et al. Whole-genome analysis of *Klebsiella pneumoniae* from bovine mastitis milk in the US. **Environmental Microbiology**, v. 24, n. 3, p. 1183–1199, 2022.

10. ANEXOS

Artigo de pesquisa publicado na *ACS Omega*, compartilhando a primeira autoria.



Open Access

This article is licensed under [CC-BY 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

<http://pubs.acs.org/journal/acsofd>

Article

Discovery of Five Classes of Bacterial Defensins: Ancestral Precursors of Defensins from Eukarya?

Marlon H. Cardoso,^{*,○} Lucas R. de Lima,[○] Allan S. Pires,[○] Mariana R. Maximiano, Peta J. Harvey, Camila G. Freitas, Rosiane A. Costa, Isabel C. M. Fensterseifer, Pietra O. Rigueiras, Ludovico Migliolo, William F. Porto, David J. Craik, and Octávio L. Franco^{*}



Cite This: *ACS Omega* 2024, 9, 45297–45308



Read Online

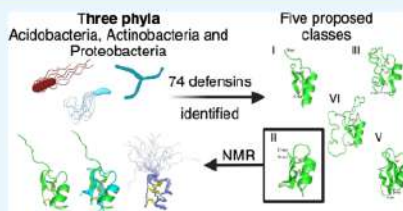
ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: Defensins are present in many organisms and are divided into two evolutionary groups, termed *cis*- and *trans*-defensins. *Cis*-defensins have only recently been reported in bacteria, and knowledge of these defensins is limited, with no family classification. Here, we describe the identification of 74 *cis*-defensins from bacteria and propose five classes for their classification. We also report the first NMR structure determination of a *Myxococcus xanthus* defensin, as well as its *in silico* expression analysis. Xanthusin-1 has a unique structure among the published defensins, which could indicate that the proposed class II peptides constitute a separate group of defensins. Xanthusin-1 gene expression was observed in casitone-based and *Streptomyces coelicolor* coculture-grown media. Our results demonstrate a wider distribution of defensins outside the Eukarya domain, shedding light on the origin and distribution of defensins. The sharing of three disulfide defensins between bacteria and eukaryotes points to a possible prokaryotic origin of the CSa β motif. Moreover, the identification of defensins in Gram-positive and Gram-negative bacteria indicates an early origin but with many gene losses during the evolutionary process, similar to findings for eukaryotic defensins.



Artigo de revisão publicado na revista *Current Bioinformatics (Bentham Science)*, compartilhando a primeira autoria do artigo.

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.net

Current Bioinformatics, XXXX, XX, X-X

1

REVIEW ARTICLE

Advances in Peptide/Protein Structure Prediction Tools and their Relevance for Structural Biology in the Last Decade

Samilla B. Rezende¹, Lucas R. Lima¹, Maria L. R. Macedo², Octávio L. Franco^{1,3} and Marlon H. Cardoso^{1,2,3,*}

¹S-Inova Biotech, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco Avenida Tamandaré 6000, Campo Grande – MS, 79117900, Brazil; ²Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Cidade Universitária, 79070900, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil; ³Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, SGAN 916 Módulo B, Asa Norte, Brasília – DF, 70790160, Brazil

ARTICLE HISTORY

Received: October 21, 2022
Revised: February 05, 2023
Accepted: February 16, 2023

DOI:
10.2174/1574893618666230412080702

Abstract: Peptides and proteins are involved in several biological processes at a molecular level. In this context, three-dimensional structure characterization and determination of peptides and proteins have helped researchers unravel the chemical and biological role of these macromolecules. Over 50 years, peptide and protein structures have been determined by experimental methods, including nuclear magnetic resonance (NMR), X-ray crystallography, and cryo-electron microscopy (cryo-EM). Therefore, an increasing number of atomic coordinates for peptides and proteins have been deposited in public databases, thus assisting the development of computational tools for predicting unknown 3D structures. In the last decade, a race for innovative methods has arisen in computational sciences, including more complex biological activity and structure prediction algorithms. As a result, peptide/protein theoretical models have achieved a new level of structure prediction accuracy compared with experimentally determined structures. Machine learning and deep learning approaches, for instance, incorporate fundamental aspects of peptide/protein geometry and include physical/biological knowledge about these macromolecules' experimental structures to build more precise computational models. Additionally, computational strategies have helped structural biology, including comparative, threading, and ab initio modeling and, more recently, prediction tools based on machine learning and deep learning. Bearing this in mind, here we provide a retrospective of protein and peptide structure prediction tools, highlighting their advances and obstacles and how they have assisted researchers in answering crucial biological questions.

Keywords: Molecular modelling, computational science, peptide science, protein science, structural biology, NMR.

Artigo de pesquisa publicado na *Scientific Reports (Nature Portfolio)*.

www.nature.com/scientificreports

scientific reports

OPEN

Antimicrobial potential of a ponericin-like peptide isolated from *Bombyx mori* L. hemolymph in response to *Pseudomonas aeruginosa* infection

Jannatun Nesa^{1,17}, Swapan Kumar Jana^{2,17}, Abdul Sadat³, Kinkar Biswas⁴, Ahmet Katı⁵, Ozge Kaya⁶, Rittick Mondal¹, Paulami Dam¹, Mintu Thakur⁴, Anoop Kumar⁷, Maidul Hossain⁸, Lucas R. Lima⁹, Samilla B. Rezende⁹, Debjoy Bhattacharjya¹⁰, Debnirmalya Gangopadhyay¹¹, Suvankar Ghorai¹², Sevdal Altuntas⁵, Amiya Kumar Panda⁸, Pinak Chakrabarti⁷, Shambhu Swarnakar¹³, Joydeep Chakraborty¹², Berfin Yilmaz⁵, Maria L. R. Macedo¹⁴, Octávio L. Franco^{9,15}, Marlon H. Cardoso^{9,14,15} & Amit Kumar Mandal^{1,16}✉

The main effectors in the innate immune system of *Bombyx mori* L. are antimicrobial peptides (AMPs). Here, we infected *B. mori* with varied inoculum sizes of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25668 cells to investigate changes in morpho-anatomical responses, physiological processes and AMP production. Ultraviolet-visible spectra revealed a sharp change in λ_{max} from 278 to 285 nm (bathochromic shift) in the hemolymph of infected *B. mori* incubated for 24 h. Further, Fourier Transform Infra Red studies on the hemolymph extracted from the infected *B. mori* showed a peak at 1550 cm^{-1} , indicating the presence of α -helical peptides. The peptide fraction was obtained through methanol, a cetic acid and water mixture (90:1:9) extraction, followed by peptide purification using Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography. The fraction exhibiting antibacterial properties was collected and characterized by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight. A linear α -helical peptide with flexible termini (LLKELWTKMKGAGKAVLGKIKGL) was found, corresponding to a previously described peptide from ant venom and here denominated as *Bm*-ponericin-L1. The antibacterial activity of *Bm*-ponericin-L1 was determined against ESKAPE pathogens. Scanning electron microscopy confirmed the membrane disruption potential of *Bm*-ponericin-L1. Moreover,

Artigo de pesquisa publicado na *Cell Reports Physical Sciences* (Cell Press).

Cell Reports
Physical Science

CellPress
OPEN ACCESS



Article

Defensins identified through molecular de-extinction

Adryan F.L. Ferreira,^{1,9} Karen O. Osiro,^{2,9} Kamila B.S. de Oliveira,^{1,9} Marlon H. Cardoso,^{1,2,3} Lucas R. de Lima,¹ Harry M. Duque,² Maria L.R. Macedo,³ Céline Landon,⁴ Cesar de la Fuente-Nunez,^{5,6,7,8,*} and Octavio L. Franco^{1,2,10,*}

SUMMARY

Molecular de-extinction is an emerging field that identifies potentially useful molecules throughout evolution. Here, we computationally mine genomes, searching for molecules called defensins, which play a role in host immunity. Our approach leads to the discovery of six undescribed β -defensins, five of which are derived from two different extinct bird species and one from a mammalian species. These organisms included an extinct moa species (*Anomalopteryx didiformis*) that inhabited New Zealand and the extinct Spix's macaw (*Cyanopsitta spixii*), which was endemic to Brazil, as well as the black rhino (*Diceros bicornis minor*). Evolutionary and structural analyses of the β -defensins are performed to further characterize these molecules. This study identifies molecules from extinct organisms, revealing defensins and opening new avenues for antibiotic discovery.

¹S-Inova Biotech, Pós-graduação Em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil