



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
CURSO DE GRADUAÇÃO
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS COM ÂNFASE EM CIÊNCIAS
AMBIENTAIS

RIKELME CARMO DA CRUZ

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTERIOCINAS COM DOMÍNIO
PEPTIDASE M23 NO GÊNERO XANTHOMONAS**

Recife

2025

RIKELME CARMO DA CRUZ

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTERIOCINAS COM DOMÍNIO
PEPTIDASE M23 NO GÊNERO XANTHOMONAS**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado ao Bacharelado em Ciências Biológicas com ênfase em Ciências Ambientais da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel.

Orientador (a): Ana Maria Benko Iseppon

Coorientador (a): Ricardo Salas Roldan Filho

Recife

2025

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Carmo da Cruz, Rikelme.

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTERIOCINAS COM
DOMÍNIO PEPTIDASE M23 NO GÊNERO XANTHOMONAS / Rikelme
Carmo da Cruz. - Recife, 2025.

53 : il., tab.

Orientador(a): Ana Maria Benko Iseppon

Coorientador(a): Ricardo Salas Roldan Filho

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Biociências, Ciências Biológicas /Ciências
Ambientais - Bacharelado, 2025.

Inclui referências, apêndices.

1. Antimicrobiano. 2. Bioinformática. 3. Dinâmica Molecular. 4. Peptídeo.
5. Modelagem 3D. I. Benko Iseppon, Ana Maria. (Orientação). II. Salas Roldan
Filho, Ricardo. (Coorientação). IV. Título.

570 CDD (22.ed.)

RIKELME CARMO DA CRUZ

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTERIOCINAS COM DOMÍNIO
PEPTIDASE M23 NO GÊNERO XANTHOMONAS**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado ao Bacharelado em Ciências Biológicas com ênfase em Ciências Ambientais da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel.

Aprovada em: 31/07/2025

COMISSÃO EXAMINADORA

Dra. Ana Maria Benko Iseppon (orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

M.Sc. Ayug Bezerra Lemos (Membro interno)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

M.Sc. Wilson Dias de Oliveira (Membro interno)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Recife

2025

Aos meus pais, Rosiene Carmo e Eraldo Cruz, e ao meu irmão Caio, por todo amor, carinho, dedicação, apoio, incentivo e confiança que recebi em toda minha vida. Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo cuidado, ensino e direção que tem me dado, por ser meu consolador, pai, irmão e amigo, por ser minha calmaria em meio às tempestades e sempre estar comigo, te agradeço SENHOR, por tudo.

Aos meus pais Rosiene Pedro do Carmo e Eraldo José Cesar da Cruz Filho, por terem cuidado de mim e me educado, pelos conselhos e repreensões, por me apoiarem, incentivarem e acreditarem em mim. Amo muito vocês. Ao meu irmão Caio Carmo da Cruz, que amo de paixão, espero vê-lo também cursando uma graduação quando chegar seu tempo.

Ao amor de minha vida, noiva e futura esposa (se Deus quiser), Ana Carolina da Rocha Oliveira, o meu refúgio, minha parceira e melhor amiga, por apoiar meus planos doidos e estar sempre ao meu lado, por me fazer amadurecer e sempre me ajudando a melhorar. Meu par perfeito, alma gêmea. Agradeço também à sua família pelo apoio e carinho que eles têm comigo.

A toda minha família que me apoiou e me ajudou a permanecer na universidade, por todo conselho e experiência que ganhei com vocês.

Aos meus amigos da graduação: Ana Beatriz Leonardo Felix, Ingrid Coriolano Barbosa, Inaldo Henrique Pereira da Silva, Karen Milleny Madruga Lima de Macêdo, Luiz Henrique de Oliveira Euzébio, Michele Raiza de Souza Nascimento e Miguel Gomes da Silva.

Agradeço à equipe do Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva – LABBE, por ter me acolhido por dois anos e me apresentar o maravilhoso mundo da genética e bioinformática, em especial ao professor Marco Jacinto Katzenberger Baptista Novo, Osmar dos Reis Filho e Heide Lacerda Alves da Cruz.

Ao meu coorientador Ricardo Salas Roldan Filho que me ingressou no Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal – LGBV, pelo auxílio na pesquisa e escrita, apoio moral e incentivo e a minha colega de iniciação científica Evellyn Monique de Aceno Lima Lira. Também a minha orientadora Dr. Ana Maria Benko Iseppon por ter me recebido e acreditado em mim e ao professor João Pacifico que me ajudou muito neste trabalho. A todo laboratório LGBV, e as amizades que fiz lá.

Aos meus amigos e colegas do ensino médio, que fizeram parte de minha vida, guardo nossa amizade e me recordo dos bons momentos que tivemos em sala

de aula. Aos professores que tive ao longo da vida, vocês foram cruciais para minha chegada a vida acadêmica, agradeço a todos.

Aos órgãos de fomento à pesquisa CNPq, PROPESQI, FACEPE e CAPES, por me conceder bolsas de PIBIC/PIBITI e principalmente ao programa PE no CAMPUS e a PROAES, sem a ajuda de vocês, eu não teria conseguido dar continuidade à minha graduação. Espero retribuir como um profissional, dando a mesma assistência a outros, como um dia vocês me deram.

“Porque dele, e por meio dele, e para ele são todas as coisas.
A ele, pois, a glória eternamente. Amém!”

Romanos 11:36 ARA

RESUMO

A resistência bacteriana a antibióticos é um dos principais desafios enfrentados nos setores da saúde pública, agropecuária e meio ambiente. Nesse contexto, as bacteriocinas, macromoléculas antimicrobianas produzidas naturalmente por bactérias, surgem como alternativas promissoras por apresentarem atividade bactericida. Entre elas destaca-se a família de peptidases M23, enzimas hidrolases do peptidoglicano que participam de processos vitais como divisão celular e virulência, além de apresentarem potencial para a descontaminação de superfícies e o controle de biofilmes. Este trabalho teve como objetivo a prospecção *in silico* de peptidases M23 no gênero *Xanthomonas*, um grupo bacteriano de interesse fitossanitário e biotecnológico. Foram analisados cem genomas (incluindo trinta e cinco gerados pelo Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal - LGBV) pertencentes a treze espécies, todos disponíveis no banco de dados NCBI. Para isso, foi desenvolvido um *script* de mineração, que identificou noventa sequências contendo o domínio “peptidase M23” contendo sete arquiteturas distintas. A caracterização das propriedades físico-químicas e da atividade antimicrobiana predita *in silico* foi realizada inicialmente por meio das ferramentas *Protein Isoelectric Point Calculator*, *Peptide Property Calculator*, *Antifungal Peptide Prediction* e *ToxinPred*. As análises revelaram uma variação significativa no ponto isoelétrico e na carga líquida das peptidases M23, características que influenciam diretamente a atividade antimicrobiana das proteínas e são fundamentais no desenvolvimento de peptídeos antimicrobianos racionalmente modificados RAMPs (*Rationally Modified Antimicrobial Peptides*). Além disso, foram identificadas regiões com possível toxicidade contra bactérias, reforçando o potencial dessas enzimas como candidatas à engenharia de peptídeos antimicrobianos. Na etapa seguinte, foram realizados alinhamentos múltiplos, modelagem estrutural e análise fenética utilizando os softwares Clustal Omega, AlphaFold3 e MEGA v11.0.13, respectivamente. Os resultados revelaram alta similaridade estrutural com outras peptidases conhecidas da mesma família, como por exemplo: *Lysostaphin*, *Staphyloyisin* e *Zoocin A*, fortalecendo o potencial biotecnológico dessas moléculas. Os resultados obtidos comprovam a eficácia do *script* desenvolvido para a prospecção de bacteriocinas em genomas bacterianos, possibilitando a identificação de moléculas bioativas com alto

valor biotecnológico. O estudo também contribui para o avanço na compreensão estrutural e funcional das peptidases M23, destacando seu papel como potentes agentes antimicrobianos, com aplicações potenciais na saúde humana e animal, agricultura e na indústria. Assim, o trabalho apresenta contribuições relevantes ao oferecer uma ferramenta computacional eficiente, revelar novos alvos moleculares com potencial terapêutico/bactericida, e abrir caminhos para o desenvolvimento racional de novos peptídeos antimicrobianos, frente ao cenário crescente de resistência bacteriana.

Palavras-chave: Antimicrobiano, Bioinformática, Dinâmica Molecular, Peptídeo, Modelagem 3D.

ABSTRACT

Bacterial antibiotic resistance is one of the main challenges facing public health, agriculture, and the environment. In this context, bacteriocins — antimicrobial macromolecules naturally produced by bacteria — are emerging as promising alternatives due to their bactericidal activity. Among these, the M23 peptidase family stands out, which are peptidoglycan hydrolase enzymes that participate in vital processes such as cell division and virulence, in addition to having potential for surface decontamination and biofilm control. This study aimed to conduct *in silico* prospection of M23 peptidases in the genus *Xanthomonas*, a bacterial group of phytosanitary and biotechnological interest. One hundred genomes (including thirty-five from the Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal - LGBV group) from thirteen species, all available in the NCBI database, were analyzed. A mining script was developed and identified ninety sequences containing the "M23 peptidase" domain organized into seven distinct architectures. The characterization of the physicochemical properties and predicted *in silico* antimicrobial potential was initially performed using the Protein Isoelectric Point Calculator, Peptide Property Calculator, Antifungal Peptide Prediction, and ToxinPred tools. The analyses revealed significant variation in the isoelectric point and net charge of M23 peptidases, characteristics that directly influence the antimicrobial activity of proteins and are fundamental in the development of rationally modified antimicrobial peptides (RAMPs). Furthermore, regions with potential toxicity against bacteria were identified, reinforcing the potential of these enzymes as candidates for antimicrobial peptide engineering. In the next step, multiple alignments, structural modeling, and phenetic analysis were performed using Clustal Omega, AlphaFold3, and MEGA v11.0.13 software, respectively. The results revealed high structural similarity to other known peptidases of the same family, such as Lysostaphin, Staphylolysin, and Zoocin A, strengthening the evidence for the biotechnological potential of these molecules. The results obtained demonstrate the effectiveness of the script developed for prospecting bacteriocins in bacterial genomes, enabling the identification of bioactive molecules with high biotechnological value. The study also contributes to the advancement of the structural and functional understanding of M23 peptidases, highlighting their role as potent antimicrobial agents, with potential applications in human and animal health,

agriculture, and industry. Thus, the work presents relevant contributions by offering an efficient computational tool, revealing new molecular targets with therapeutic/bactericidal potential, and paving the way for the rational development of new antimicrobial peptides, given the growing scenario of bacterial resistance.

Keywords: 3D Modeling, Antimicrobial, Bioinformatics, Peptide, Molecular Dynamics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Colônias de <i>Xanthomonas</i> sp.	20
Figura 2 –	Microscopia eletrônica de transmissão de <i>Xanthomonas</i> <i>oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	21
Figura 3 –	Ciclo de vida de <i>Xanthomonas</i>	22
Figura 4 –	Peptidoglicano hidrolase LytM, membro da família peptidase M23.	25
Figura 5 –	Modelo estrutural de uma proteína precursora Zoocin A da cepa 4881 de <i>Streptococcus zooepidemicus</i> (GENBANK: AAC46072.1).	30
Figura 6 –	Modelo estrutural de uma proteína precursora Zoocin A com domínios LysM e Peptidase M23 de <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>phaseoli</i> var. <i>Fuscans</i>	31
Figura 7 –	Modelo estrutural de uma proteína precursora Zoocin A com domínios OapA, Csd3 e Peptidase M23 de <i>Xanthomonas arboricola</i>	32
Figura 8 –	Modelo estrutural de uma proteína precursora Zoocin A com domínios PcsB e Peptidase M23 de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>raphani</i>	33
Figura 9 –	Modelo estrutural de uma proteína precursora Zoocin A com domínios PcsB e Peptidase M23 de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	33
Figura 10 –	Modelo estrutural de uma proteína precursora Zoocin A com domínios PcsB e Peptidase M23 de <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>anacardii</i>	34
Figura 11 –	Árvore fenética Neighbor-Joining baseada em 194 sequências da família de peptidases M23.	37
Figura 12 –	Alinhamento de peptidase M23 de <i>Xanthomonas</i> do cluster I.	38
Figura 13 –	Alinhamento de peptidase M23 de <i>Xanthomonas</i> do cluster II.	38

Figura 14 – Alinhamento de peptidase M23 de <i>Xanthomonas</i> do cluster V (Xar_4) e VI.	39
Figura 15 – Alinhamento de peptidase M23 de <i>Xanthomonas</i> do cluster V (Xar_4) e VI.	39
Figura 16 – Alinhamento de peptidase M23 de <i>Xanthomonas</i> do cluster VII.	39
Figura 17 – Alinhamento de peptidase M23 de <i>Xanthomonas</i> do cluster VIII.	39
Figura 18 – Alinhamento de peptidase M23 de <i>Xanthomonas</i> do cluster IX.	40
Figura 19 – Backbone estrutural das peptidases M23 de diferentes representantes.	38
Figura 20 – Modelagem tridimensional de um representante de peptidase M23 de cada cluster identificado na árvore fenética.	39
Figura 21 – Análise de Ramachandran dos representantes de peptidase M23 de cada um dos clusters identificados na árvore fenética.	39
Figura 22 – Estrutura típica do peptidoglicano estreptocócico.	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPs	<i>Antimicrobial Peptides</i> / Peptídeos Antimicrobianos
CC	Domínio <i>coiled-coil</i>
GenBank/NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
GlcNac	N-acetilglucosamina
LysM	<i>Lysin motif</i>
MurNAc	N-acetilmurâmico
NIpD	Nova lipoproteína D
OapA	<i>Opacity-associated protein A</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
pLDDT	Teste de diferença de distância local prevista
TRD	<i>Target Recognition Domain</i>
RAMPs	<i>Rationally Modified Antimicrobial Peptides</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	OBJETIVOS.....	18
2.1	GERAL.....	18
2.1.1	ESPECÍFICO.....	18
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3.1	RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	19
3.2	<i>Xanthomonas</i>, fitopatogenicidade e sistema de defesa.....	19
3.2.1	GÊNERO XANTHOMONAS	20
3.2.2	ECOLOGIA DE VIDA E FITOPATOGENICIDADE DO GÊNERO XANTHOMONAS.....	21
3.3	SISTEMA DE DEFESA DO GÊNERO XANTHOMONAS.....	23
3.4	BACTERIOCINAS: CONCEITO, CLASSES E APLICAÇÕES....	24
3.4.1	PEPTIDASE M23.....	25
4	METODOLOGIA.....	27
4.1	MINERAÇÃO DE BACTERIOCINAS.....	27
4.2	PREDIÇÃO DE CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS.....	27
4.3	ANÁLISE FENÉTICA.....	28
4.4	MODELAGEM ESTRUTURAL.....	28
5	RESULTADOS.....	29
5.1	MINERAÇÃO DE BACTERIOCINAS.....	29
5.2	PREDIÇÃO DE CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS.....	30
5.3	ANÁLISE FENÉTICA.....	35
5.4	MODELAGEM ESTRUTURAL.....	37
6	DISCUSSÃO.....	40
6.1	DIVERSIDADE FUNCIONAL DA PEPTIDASE M23.....	40
6.2	POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DA PEPTIDASE M23.....	41
7	CONCLUSÃO.....	43
8	REFERÊNCIAS.....	44
	APÊNDICE A - TABELA - CARACTERIZAÇÃO PEPTIDASE M23.....	53

1 INTRODUÇÃO

A resistência de microrganismos aos antibióticos figura entre os maiores desafios enfrentados pela saúde pública mundial (Teixeira *et al.*, 2019; Rojas & Ulate, 2017), com impactos significativos também nos setores agropecuário e ambiental (Guo *et al.*, 2021; Hossain *et al.*, 2022; Schwarz, Loeffler, Kadlec, 2017). A principal causa desse fenômeno tem sido atribuída ao uso incorreto e descontrolado de antibióticos (Campos & Neto, 2024), especialmente nas áreas de saúde pública, pecuária, avicultura e piscicultura, resultando em prejuízos consideráveis. A Organização Mundial da Saúde (OMS) e outras entidades internacionais têm publicado periodicamente listas de microrganismos prioritários com elevada ameaça à saúde pública (“Resistência antimicrobiana - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde”, 2024), com destaque para o agravamento do problema durante a pandemia de COVID-19 (OPAS/OMS, 2021).

O avanço nas áreas de genômica, engenharia genética, biologia estrutural e biotecnologia tem impulsionado a prospecção e o desenvolvimento de biomoléculas, destacando seu potencial como alternativas aos antibióticos convencionais e como agentes de interesse industrial. Nesse cenário, cresce o interesse por uma compreensão mais aprofundada dos mecanismos de ação, biossíntese e resistência dessas moléculas, com o objetivo de garantir sua eficácia e segurança em aplicações em larga escala (D. Bauman *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2021).

Nesse contexto, as bacteriocinas surgem como importantes candidatas à substituição ou complementação dos antibióticos tradicionais, por apresentarem atividade antimicrobiana de amplo espectro, incluindo ação antibacteriana, antiviral e antifúngica (Huan *et al.*, 2020). Entre os diversos tipos de proteínas antimicrobianas, que são moléculas de defesa naturais produzidas por diferentes organismos (Koehbach & Craik, 2019), destacam-se, entre as classes de bacteriocinas, as peptidases M23. Essas enzimas hidrolisam o peptidoglicano da parede celular bacteriana, desempenhando funções essenciais na fisiologia das bactérias, como crescimento, divisão celular e virulência (Razew *et al.*, 2022). Além disso, essas proteínas demonstraram atividade antibacteriana relevante, com potencial aplicação na descontaminação de superfícies e no controle de biofilmes (Kaus-Drobek *et al.*, 2025).

Entre os grupos bacterianos de interesse, as bactérias Gram-negativas do gênero *Xanthomonas* têm atraído atenção devido à sua relevância fitossanitária, econômica e biotecnológica. Com cerca de 68 espécies descritas (LPSN, 2025), esse clado é reconhecido por sua patogenicidade em aproximadamente 400 culturas agrícolas, incluindo mandioca, banana, feijão, tomate, arroz, trigo, pimenta e frutas cítricas (Jacques *et al.*, 2016; Ryan *et al.*, 2011). Apesar do foco predominante na patogenicidade, estudos recentes de prospecção de compostos bioativos têm destacado o potencial biotecnológico de *Xanthomonas*, especialmente por sua capacidade de sintetizar AMPs (*Antimicrobial Peptides*). Um exemplo notável é a glicinecina A, codificada no genoma de *X. campestris* pv. *glycines*, que demonstrou atividade contra *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Heu *et al.*, 2001; Minsavage *et al.*, 1990) além de conter o domínio peptidase M23, presente em algumas proteínas essenciais para a separação das células-filhas (Pena *et al.*, 2024).

Com a crescente demanda por novos agentes antimicrobianos nos setores da saúde, agricultura e pecuária, os estudos voltados à identificação e caracterização de AMPs tornaram-se cada vez mais representativos. A descoberta destas moléculas serve como referência para a aplicação no desenho racional, permitindo o desenvolvimento de peptídeos bioativos inéditos, com possibilidade de produção em sistemas procarióticos ou em plantas geneticamente transformadas. Além disso, esses compostos podem atuar sinergicamente com antibióticos convencionais, contribuindo para mitigar o avanço da resistência microbiana. Diante desse cenário, o presente trabalho buscou a prospecção *in silico* de peptidases M23 em espécies do gênero *Xanthomonas*, com o objetivo de levantar potenciais candidatos com atividade antimicrobiana para mitigar a problemática dos microrganismos resistentes.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Identificar e caracterizar proteínas com domínio peptidase M23 com potencial antimicrobiano em genomas de bactérias Gram-negativas do gênero *Xanthomonas*, avaliando as moléculas candidatas quanto ao seu potencial antimicrobiano, citotóxico e alergênico com o uso de estratégias *in silico*.

2.1.1 ESPECÍFICO

- Identificar proteínas da classe das bacteriocinas com domínio peptidase M23 através de prospecção *in silico* nos genomas de *Xanthomonas*, selecionando candidatos com os domínios e assinaturas conservados;
- Predizer características físico-químicas das sequências candidatas;
- Gerar modelos tridimensionais teóricos dos candidatos com o apoio de ferramentas de inteligência artificial e, se necessário, por modelagem comparativa;
- Avaliar a partir de predição *in silico* o potencial antimicrobiano (antibacteriano e antifúngico) das sequências selecionadas, bem como seu potencial citotóxico e alergênico.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 RESISTÊNCIA BACTERIANA

A resistência bacteriana a antibióticos é uma ameaça crescente à saúde pública, segundo a OMS, e compromete os 'Objetivos de Desenvolvimento Sustentável' ("Resistência antimicrobiana - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde", 2024). Esse processo, que ocorre de modo natural, está cada vez mais acelerado em razão do uso inadequado de antibióticos na saúde humana e animal (Li *et al.*, 2023). No setor agropecuário, por exemplo, os antimicrobianos são utilizados tanto na prevenção de doenças quanto na promoção do crescimento de animais destinados à alimentação humana. Nos Estados Unidos estima-se que cerca de 80% do consumo anual de antimicrobianos seja proveniente do setor pecuário (Van Boekel *et al.*, 2015), enquanto no Chile aproximadamente 380 toneladas de antibióticos foram utilizados na aquicultura em 2016 (Miranda; Godoy; Lee, 2018). Entre 30% e 90% dos antibióticos administrados são excretados do organismo por meio das fezes e urina, poluindo o meio ambiente, alcançando o solo e a água, promovendo assim a resistência dos microrganismos presentes nestes ecossistemas (Li *et al.*, 2023; Tian *et al.*, 2021).

Embora em menor escala quando comparado à pecuária, o uso de antimicrobianos na agricultura também vem crescendo e contribuindo para a resistência bacteriana (Islam *et al.*, 2024). Antibióticos como o ácido oxolínico e a validamicina-A foram aplicados em campos de morango na Coreia do Sul para o controle de *Xanthomonas fragariae* (Kim *et al.*, 2016). Já cepas da espécie *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, que afeta a cultura do arroz, foram identificadas com resistência à estreptomicina na China (Xu; Luo; Zhou, 2013).

Considerando a presença de antibióticos no meio ambiente e o surgimento de cepas resistentes, torna-se essencial aprofundar o conhecimento sobre a ecologia bacteriana, visando à prospecção de compostos naturais com atividade antibacteriana. Nesse contexto, destaca-se o gênero *Xanthomonas*, devido à sua ampla distribuição, ao impacto que causa em culturas agrícolas de importância econômica e a produção de compostos antimicrobianos.

3.2 XANTHOMONAS, FITOPATOGENICIDADE E SISTEMA DE DEFESA

3.2.1 GÊNERO XANTHOMONAS

Com cerca de 68 espécies conhecidas (LPSN, 2025), o gênero *Xanthomonas* é amplamente reconhecido por sua patogenicidade em aproximadamente 400 culturas agrícolas, incluindo mandioca, banana, feijão, tomate, arroz, trigo, pimenta e frutas cítricas (Jacques *et al.*, 2016; Ryan *et al.*, 2011). Essas bactérias podem aderir a uma ampla variedade de agentes dispersores, como sementes, restos de plantas, solo, equipamentos agrícolas, insetos, aves e água, até alcançarem uma planta hospedeira sob condições favoráveis à infecção (An *et al.*, 2020; Bashan, 1986).

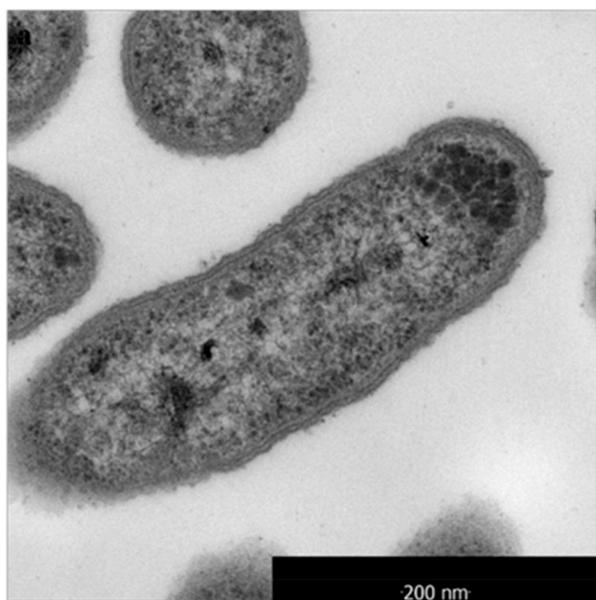
O gênero *Xanthomonas* comprehende microrganismos aeróbicos obrigatórios, pertencentes ao grupo das bactérias Gram-negativas da classe Gammaproteobacteria. São caracterizados pela formação de colônias com pigmentação amarelada (Fig. 1), morfologia bacilar (em bastonete) (Fig. 2) e, geralmente, pela presença de um único flagelo polar.

Figura 1. Colônias de *Xanthomonas* sp.



Fonte: Kałużna *et al.* (2013).

Figura 2. Microscopia eletrônica de transmissão de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.



Fonte: Huang *et al.* (2018).

Além de sua importância fitopatogênica, o gênero também possui relevância biotecnológica, principalmente pela produção do polissacarídeo extracelular xantana. A xantana é um exopolissacarídeo solúvel em água, não tóxico, amplamente utilizado na indústria alimentícia como agente espessante e de suspensão, presente em produtos como polpas de frutas, chocolates, laticínios e molhos. Seu uso também se estende às indústrias petrolífera, química e farmacêutica (Palaniraj & Jayaraman, 2011).

Devido à sua patogenicidade e à especificidade de interação com os hospedeiros, as espécies do gênero *Xanthomonas* podem ser classificadas em patovares, de acordo com a planta hospedeira que infectam. Por exemplo, a espécie *Xanthomonas campestris* possui diversos patovares, como: *X. campestris* pv. *secalis*, pv. *tamarindi*, pv. *passiflorae*, pv. *musacearum*, pv. *malvacearum*, pv. *manihotis*, entre outros. Essa divisão também se aplica a outras espécies do gênero (Hayward, 1993; An *et al.*, 2020; Büttner & Bonas, 2010).

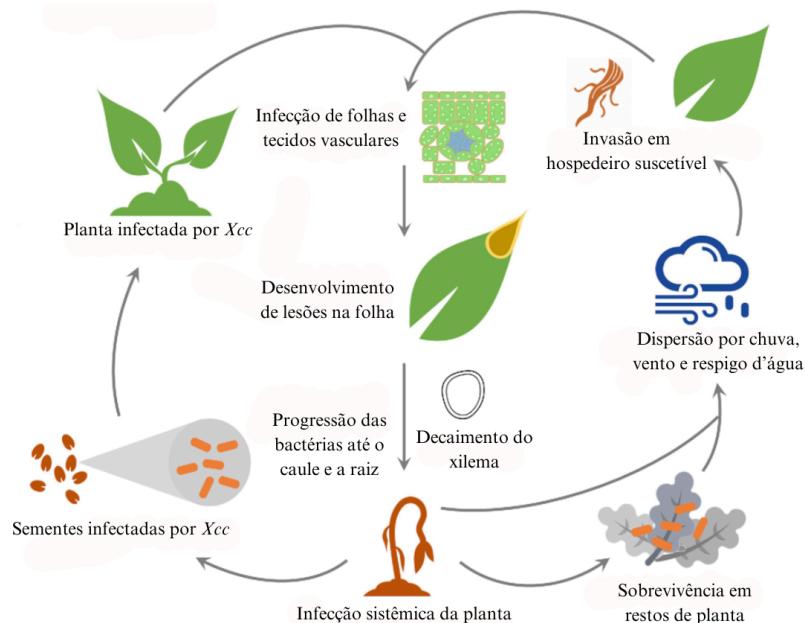
3.2.2 ECOLOGIA DE VIDA E FITOPATOGENICIDADE DO GÊNERO *XANTHOMONAS*

As bactérias do gênero *Xanthomonas* apresentam dois estágios durante o processo de infecção: epifítico e endofítico (Fig. 3). Na fase epifítica, a bactéria

coloniza partes aéreas da planta, como folhas, frutos e flores, até encontrar condições favoráveis para penetrar no tecido vegetal. A entrada ocorre geralmente por meio de aberturas naturais, como estômatos, ou por lesões. Uma vez no interior da planta, inicia-se o estágio endofítico, caracterizado pela colonização dos tecidos do hospedeiro (Zárate-Chaves *et al.*, 2021).

Quando a população bacteriana atinge níveis elevados, as colônias podem ressurgir na superfície foliar, de onde são disseminadas pelo vento, chuva, animais, equipamentos agrícolas, podendo ainda permanecer em folhas caídas e no solo, bem como em sementes, quando partes reprodutivas da planta são colonizadas, aguardando condições para reiniciar o ciclo infectivo na planta hospedeira (An *et al.*, 2020).

Figura 3. Ciclo de vida de *Xanthomonas*.



Fonte: An *et al.* (2020).

Durante a infecção endofítica, bactérias do gênero *Xanthomonas* utilizam diferentes sistemas de secreção para promover a colonização e infecção da planta hospedeira. Acredita-se que o sistema de secreção tipo II, responsável por secretar toxinas, proteases, lipases e outras enzimas, atue na degradação da parede celular vegetal, facilitando a invasão tecidual. Já o sistema de secreção tipo VI injeta proteínas efetoras tóxicas diretamente nas células procarióticas e eucarióticas, de forma dependente de contato (Bayer-Santos *et al.*, 2019; Timilsina *et al.*, 2024).

No Brasil, *Xanthomonas spp.* têm sido responsáveis por importantes perdas econômicas em diversas culturas. Entre os registros estão: surtos em plantações de tomate na região Centro-Oeste (Quizado-Duval *et al.*, 2004); infecções em videiras no Vale do Rio São Francisco, na Bahia e em Pernambuco (1998), e posteriormente em Tupi Paulista, São Paulo (2009) (Ferreira *et al.*, 2019; Rodrigues Neto *et al.*, 2011); perdas em lavouras de milho no Paraná (Leite *et al.*, 2019).

Diversas doenças causadas por *Xanthomonas* têm impacto significativo na agricultura. Entre elas destacam-se: a ferrugem bacteriana do arroz, causada por *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Niones *et al.*, 2022); a murcha bacteriana da bananeira e do enset (*Ensete ventricosum*), provocada por *Xanthomonas vasicola* pv. *musacearum* (Nakato *et al.*, 2021); e a podridão negra, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Greer *et al.*, 2023), entre outras fitopatologias relevantes (Greer *et al.*, 2025).

3.3 SISTEMA DE DEFESA DO GÊNERO XANTHOMONAS E PRODUÇÃO DE BACTERIOCINAS

Xanthomonas utiliza diferentes sistemas de secreção de macromoléculas não apenas como estratégia de infecção da planta hospedeira, mas também como mecanismo de defesa contra microrganismos concorrentes no ambiente (Alvarez-Martinez *et al.*, 2021). O sistema de secreção do tipo I é utilizado para a defesa da bactéria e transporta desde pequenas bacteriocinas (<10 kDa) até proteínas com massa superior a 1 MDa (Smith; Sondermann; O'Toole, 2018). Já o sistema de secreção do tipo III facilita a infecção da planta hospedeira (Timilsina *et al.*, 2024) por injetar proteínas efetoras no citosol da célula hospedeira para manipular processos celulares vegetais, como a defesa basal, em benefício do patógeno (Büttner; Bonas, 2010). O sistema do tipo IV, por sua vez, é responsável pela secreção de macromoléculas diretamente em células procarióticas e eucarióticas. Esse sistema foi identificado em *Xanthomonas citri*, conferindo-lhe a capacidade de matar outras bactérias Gram-negativas de forma dependente de contato (Sgro *et al.*, 2019).

Espécies de *Xanthomonas* utilizam diferentes sistemas de secreção de macromoléculas não apenas como estratégia de infecção da planta hospedeira, mas também como mecanismo de defesa contra outros microrganismos presentes no

ambiente. Esses sistemas permitem a liberação de moléculas tóxicas no meio extracelular ou diretamente no interior de células bacterianas competidoras. Entre essas moléculas destacam-se as bacteriocinas, proteínas e pequenos peptídeos antimicrobianos produzidos por diversas bactérias como forma de inibir o crescimento de cepas da mesma espécie ou de diferentes espécies (Lahiri *et al.*, 2022).

Em *Xanthomonas*, a produção de bacteriocinas tem sido observada em condições controladas, por meio de ensaios de antagonismo bacteriano. Um exemplo é a espécie *Xanthomonas perforans*, isolada de campos de tomate na Flórida, que demonstrou capacidade de produzir bacteriocinas eficazes contra *Xanthomonas euvesicatoria*, um patógeno da mesma cultura (Klein-Gordon *et al.*, 2021). Além disso, foi observada a produção da bacteriocina glicinecina A, codificada no genoma de *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*, a qual apresentou atividade inibitória contra *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Heu *et al.*, 2001).

3.4 BACTERIOCINAS: CONCEITO, CLASSES E APLICAÇÕES

As bacteriocinas podem ser classificadas em duas grandes categorias: aquelas produzidas por bactérias Gram-positivas e as produzidas por bactérias Gram-negativas (Negash & Tsehai, 2020; Solis-Balandra & Sanchez-Salas, 2024). Ambas apresentam subdivisões com base em características estruturais e propriedades físico-químicas.

No grupo das bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas, destacam-se três classes principais (Kaur & Kaur, 2015): **Classe I** (Lantibióticos): moléculas termoestáveis com peso molecular inferior a 5 kDa, subdivididas em: **Ia**: com carga positiva e **Ib**: com carga neutra ou negativa. **Classe II** (peptídeos que não contém lantionina): com peso molecular inferior a 10 kDa, são subdivididas em: **IIa**: com atividade anti-*Listeria*, **IIb**: diméricos que atuam de forma sinérgica, **IIc**: com estrutura circular e **IId**: peptídeos lineares que não apresentam atividade contra *Listeria*. **Classe III**: proteínas termolábeis com peso molecular superior a 30 kDa. Podem incluir bacteriocinas de Gram-negativas. Nessa classe, a estrutura da proteína está relacionada à sua função.

No grupo das bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-negativas, as principais subclasses são: **Colicinas**: com peso molecular entre 30 e 80 kDa,

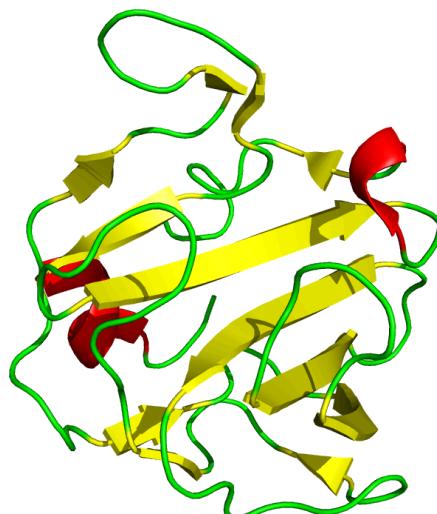
geralmente produzidas por *Escherichia coli*, **Microcinas**: menores, com peso molecular entre 1 e 10 kDa (Urszula & Jagoda, 2016) e **Bacteriocinas semelhantes a cauda de fago**: moléculas que apresentam atividade antimicrobiana com base em sua estrutura (Solis-Balandra & Sanchez-Salas, 2024).

As bacteriocinas apresentam uma ampla gama de aplicações biotecnológicas, incluindo a promoção do crescimento de animais de produção, como aves e suínos (Ben Lagha *et al.*, 2017), a conservação de alimentos por meio da inibição de patógenos bacterianos (Anacarso *et al.*, 2014), e o estímulo ao crescimento vegetal (Nazari; Yaghoubian; Smith, 2022), entre outras aplicações emergentes nas áreas médica, agrícola e ambiental (Sugrue; Ross; Hill, 2024).

3.4.1 PEPTIDASE M23

O domínio peptidase M23 pertence a uma família de metaloendopeptidases do tipo exolisina, dependentes do íon zinco como cofator. Essa família é caracterizada por dois motivos catalíticos conservados, HxxxD e HxH, em que "X" representa qualquer aminoácido. A topologia é marcada por um núcleo conservado de 1 folha beta composta por aproximadamente 5 fitas beta (Fig. 4). Atualmente, dezoito representantes desse domínio estão registrados no banco de dados de peptidases e enzimas proteolíticas MEROPS (Rawlings *et al.*, 2008).

Figura 4. Peptidoglicano hidrolase LytM, membro da família peptidase M23. As estruturas secundárias de alfa hélice, fitas beta e coil estão destacadas em vermelho, amarelo e verde, respectivamente.



Fonte: O autor (2025).

As exolisinhas, hidrolases do peptidoglicano, são moléculas secretadas com a finalidade de eliminar outras células bacterianas presentes no mesmo nicho ecológico (Vermassen *et al.*, 2019). Além da atividade endopeptidase — ou seja, a clivagem interna do peptidoglicano — essas enzimas também desempenham papéis importantes no crescimento e divisão celular, na determinação da morfologia bacteriana, na maturação de esporos, na virulência, no ciclo fagolítico e na atuação como bacteriocinas (Razew *et al.*, 2022).

Estudos com domínios da família peptidase M23 destacam seu potencial como agentes antibacterianos. Por exemplo, a enzima LytM, uma autolisina de *Staphylococcus aureus*, ao ser fundida a um domínio de ligação à parede celular proveniente da enzima bacteriocina ssLys, demonstrou um aumento expressivo em sua atividade antibacteriana. Essa modificação resultou em um ganho de até 540 vezes na cinética de lise bacteriana em relação à forma nativa, além de conferir à proteína quimérica a capacidade de inibir biofilmes e reduzir a concentração mínima inibitória (MIC - *Minimum Inhibitory Concentration*) a níveis compatíveis com os de antibióticos convencionais (Osipovitch & Griswold, 2015).

De forma semelhante, a enzima LytU, também pertencente à família M23 e recém-identificada como autolisina de *S. aureus*, foi expressa heterologamente em *E. coli*. Embora sua forma nativa tenha apresentado baixa atividade contra cepas de *S. aureus*, a fusão com o domínio SH3b, responsável por ancorar enzimas à parede celular, resultou na proteína quimérica LytU–SH3b, que exibiu atividade antimicrobiana 421 vezes superior à versão não modificada. Os testes incluíram ensaios de lise em placa, redução de turbidez e determinação de MIC, (Taheri-Anganeh *et al.*, 2019). Estes resultados reforçam o papel promissor das peptidases M23 como base para o desenvolvimento de biomoléculas com potencial antimicrobiano.

4 METODOLOGIA

4.1 MINERAÇÃO DE BACTERIOCINAS

Foram utilizados cem genomas de bactérias do gênero *Xanthomonas* depositados no NCBI – incluindo 35 genomas sequenciados pelo Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal (LGBV-UFPE) – para a mineração *in silico* via servidor Bagel4 (Van Heel *et al.*, 2018). No entanto, forneceu poucas sequências candidatas. Uma segunda alternativa de mineração foi realizada pelo servidor AntiSmash (Blin *et al.*, 2023), todavia também forneceu poucas sequências. Assim, uma nova abordagem de mineração foi desenvolvida e implementada localmente na *workstation* do LGBV, empregando script em linguagem Python e método de busca via BLASTp (*Basic Local Alignment Search Tool*, direcionado a proteínas).

O script foi desenvolvido para realizar até 10 substituições de acordo com ambiguidades encontradas nos genomas, bem como a tradução de sequências de nucleotídeos para proteínas (aminoácidos). Sequências-sonda (*seed-sequences*) retiradas do Bagel4 foram incluídas no *script* juntamente com o BLASTp para identificação de bacteriocinas.

4.2 PREDIÇÃO DE CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

Foram realizadas previsões de características a partir da sequência de aminoácidos dos candidatos, destacando-se o ponto isoelétrico e massa molecular (ambos pelo servidor *Protein isoelectric point calculator* - IPC), porcentagem de resíduos hidrofóbicos e carga líquida (ambos pelo *Antimicrobial Peptides Database* – APD3 e *Peptide Property Calculator* 3.1) (Kozlowski, 2021; Wang, Li & Wang, 2016).

Para previsão *in silico* do potencial antimicrobiano seguiu-se um pipeline de análises desenvolvido pelo nosso grupo (Santos-Silva *et al.* 2020) incluindo bancos de dados curados e modelos de aprendizagem supervisionada de maior reproduzibilidade como CAMPr4 (*Collection of Antimicrobial Peptides*), *Antimicrobial Peptide Scanner* vr.2 e Antifp (*Antifungal peptide Prediction*) (Agrawal *et al.*, 2018; Gawde *et al.*, 2023; Thomas *et al.*, 2010). A avaliação da toxicidade foi conduzida usando ferramentas do TOXINPRED 3 (Rathore *et al.*, 2024).

4.3 ANÁLISE FENÉTICA

As sequências passaram por uma análise de redundância com o objetivo de identificar sequências únicas nos genomas de cada espécie. Em seguida, foi realizada uma nova análise de redundância para identificar sequências únicas entre os diferentes genomas. Com esse resultado, às sequências foram submetidas a uma busca BLASTp no NCBI, utilizando como parâmetro o táxon Bacteria (taxonid: 2, também conhecido como Domínio Bacteria ou Eubacteria) e excluindo-se sequências do gênero *Xanthomonas* (taxonid: 338), a fim de selecionar, para cada sequência, pelo menos três correspondências com baixo e-value e alto percentual de identidade. Então, foi construída uma árvore fenética com a abordagem de Neighbor-Joining pelo software MEGA v11.0.13, a partir de 1.000 réplicas de *bootstrap* e pelo método Dayhoff de substituição de aminoácidos. A visualização da árvore foi feita por meio da plataforma iTOL (*Interactive Tree Of Life*) (Letunic & Bork, 2024). Um alinhamento múltiplo foi realizado para cada *cluster* de peptidases M23 de *Xanthomonas* a fim de observar os motivos compartilhados.

4.4 MODELAGEM ESTRUTURAL

A estrutura tridimensional dos candidatos sucedeu-se por inteligência artificial do algoritmo AlphaFold3 (Abramson *et al.*, 2024). "Foram selecionados nove sequências candidatas que representassem cada um dos clusters formados na análise fenética, comparando o domínio peptidase M23 encontrado com os descritos na literatura, observando o teste de diferença de distância local prevista (pLDDT), uma medida de confiança local por resíduo. Os modelos teóricos foram avaliados quanto à qualidade estereoquímica através do plot de Ramachandran (Laskowski *et al.*, 1993).

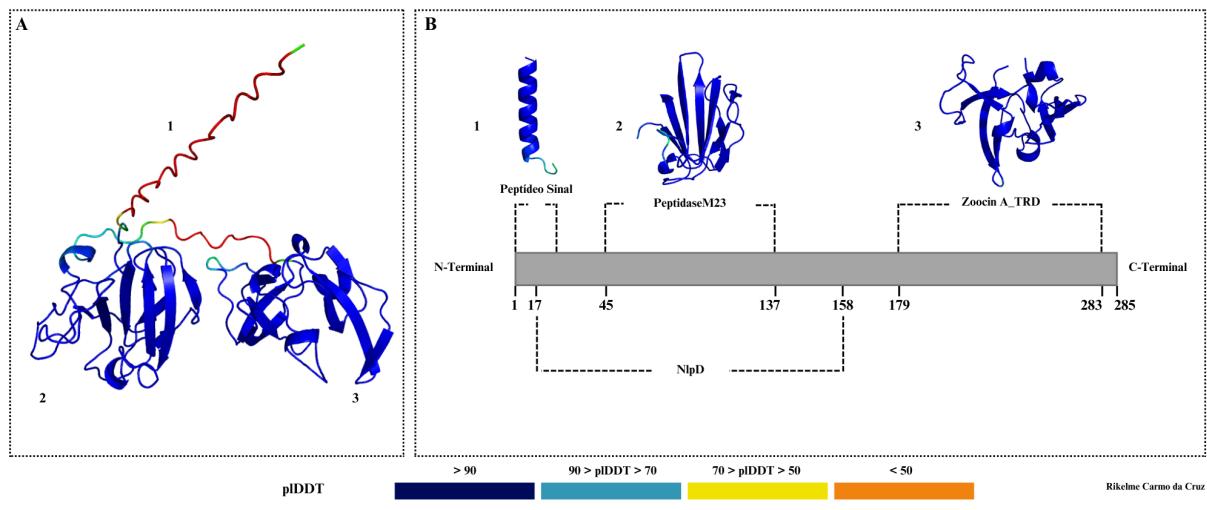
5 RESULTADOS

5.1 MINERAÇÃO DE BACTERIOCINAS

Os cem genomas analisados pertencem a treze espécies do gênero *Xanthomonas*, distribuídas da seguinte forma: *Xanthomonas arboricola* (1), *Xanthomonas vasicola* pv. *arecae* (1), *Xanthomonas vasicola* pv. *musacearum* (1), *Xanthomonas citri* pv. *anacardii* (3), *Xanthomonas citri* pv. *vignicola* (3), *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* (4), *Xanthomonas campestris* pv. *raphani* (6), *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* (8), *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* (8), *Xanthomonas citri* pv. *glycines* (9), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (10), *Xanthomonas citri* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (13) e *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (33), selecionados considerando vinte genomas completos depositados no NCBI e oitenta provenientes de trabalhos anteriores do LGBV.

Após a mineração genômica, o script identificou trinta e seis categorias distintas de bacteriocinas (dados não mostrados). Dentre essas, apenas uma apresentou a presença da peptidase M23: a categoria *Zoocin A*, que contém dois domínios funcionais — um domínio de reconhecimento de alvo (TRD – *Target Recognition Domain*) e um domínio catalítico (Peptidase M23) (Fig. 5). Foram identificadas noventa sequências de aminoácidos relacionadas a essa categoria, distribuídas entre as treze espécies analisadas.

Figura 5. **A.** Modelo estrutural de uma proteína precursora *Zoocin A* da cepa 4881 de *Streptococcus zooepidemicus* (GENBANK: AAC46072.1). O modelo da proteína precursora foi gerado pelo AlphaFold3 utilizando a sequência completa. **B.** Divisão da proteína em peptídeo sinal (1) e domínios peptidase M23 (2) e TRD (3), de acordo com o Interpro e CDSearch. O modelo foi colorido de acordo com o índice de confiabilidade pIDDT (Azul escuro: Muito alto, >90; Azul claro: Confiante, 90 > pIDDT > 70; Amarelo: Baixo, 70 > pIDDT > 50 e Laranja: Muito baixo, < 50).

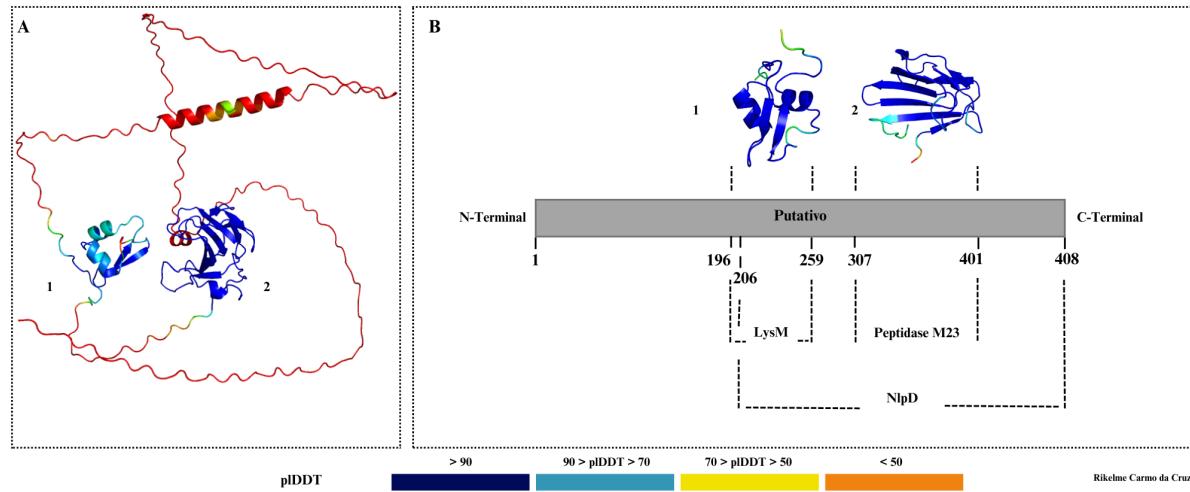


Fonte: O autor (2025).

5.2 PREDIÇÃO DE CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

As noventa sequências foram submetidas às ferramentas InterPro e CD-Search para a verificação da presença, posição e tamanho do domínio peptidase M23. Durante a análise, também foram identificados outros domínios e superfamílias de proteínas associados a algumas das sequências. Foram observadas sete arquiteturas distintas, descritas a seguir: LysM-M23-Zoocin A-Like (Fig. 6), proteína similar a *Zoocin A*, porém com domínios invertidos, apresenta LysM (Lysin motif) na região N-terminal; este é um domínio de ligação à parede celular que reconhece o amino monossacarídeo N-acetilglucosamina (GlcNac) presente no peptidoglicano (Razew *et al.*, 2022) e o domínio peptidase M23 na região C-terminal. Ao todo, foram identificadas treze sequências com essa arquitetura.

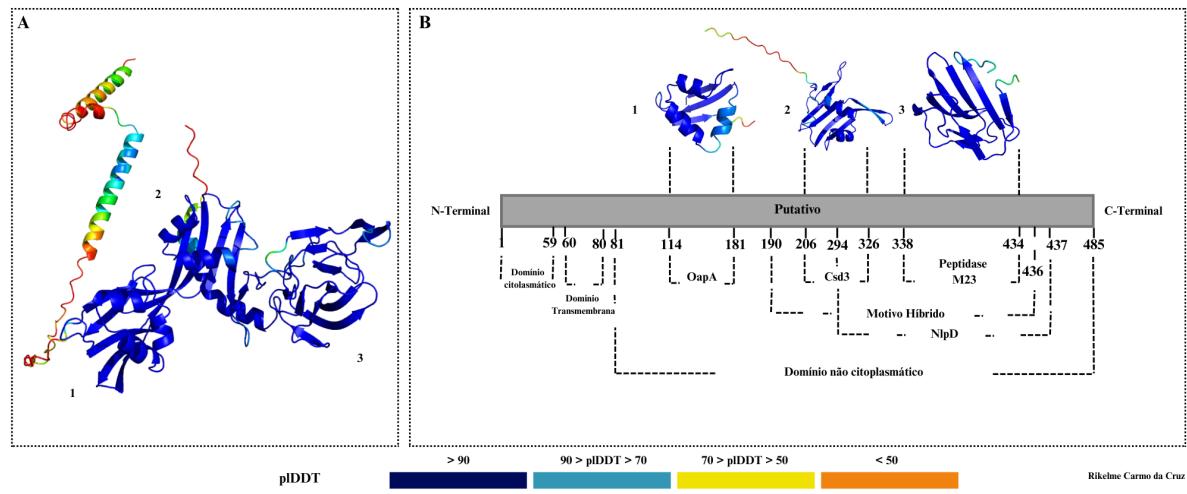
Figura 6. **A.** Modelo estrutural de uma proteína precursora *Zoocin A* com domínios LysM e Peptidase M23 de *Xanthomonas citri* pv. *phaseoli* var. *Fuscans*. O modelo da proteína precursora foi gerado pelo AlphaFold3 utilizando a sequência completa. **B.** Divisão dos domínios em LysM (1) e peptidase M23 (2) de acordo com o Interpro e CDSearch, com as sequências isoladas. O modelo foi colorido de acordo com o índice de confiabilidade pIDDT(Azul escuro: Muito alto, >90; Azul claro: Confiante, 90 > pIDDT > 70; Amarelo: Baixo, 70 > pIDDT > 50 e Laranja: Muito baixo, < 50).



Fonte: O autor (2025).

As proteínas precursoras OapA–Csd3–M23–Zoocin A-like (n= 18) (Fig. 7) apresentam dois domínios N-terminais que antecedem a M23. O primeiro, OapA (Opacity-associated protein A), originalmente descrito em *Haemophilus influenzae* (Prasadarao *et al.*, 1999), é funcionalmente semelhante ao domínio LysM, com capacidade de se ligar ao esqueleto do peptidoglicano, independentemente da presença de peptídeos-tronco (Jorgenson & Young, 2018). O segundo domínio, Csd3, corresponde a uma enzima bifuncional com atividade de D,D-endopeptidase, capaz de clivar a ligação peptídica entre o quarto resíduo D-alanina (D-Ala⁴) e o terceiro resíduo ácido meso-diaminopimélico (m-DAP³) em tetrapeptídeos muramil reticulados e pentapeptídeos. Além disso, também atua como D,D-carboxipeptidase, clivando o D-Ala⁵ terminal dos pentapeptídeos muramil em *Helicobacter pylori* (An *et al.*, 2015).

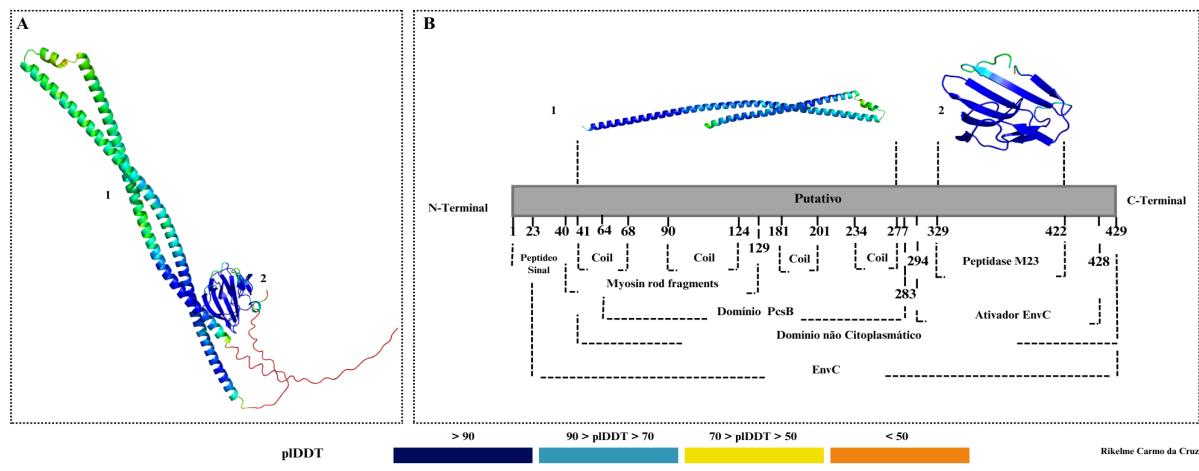
Figura 7. **A.** Modelo estrutural de uma proteína precursora *Zoocin A* com domínios OapA, Csd3 e Peptidase M23 de *Xanthomonas arboricola*. O modelo da proteína precursora foi gerado pelo AlphaFold3 utilizando a sequência completa. **B.** Divisão dos domínios em OapA (1), Csd3 (2) e peptidase M23 (3) de acordo com o Interpro e CDSearch, com as sequências isoladas. O modelo foi colorido de acordo com o índice de confiabilidade pIDDT (Azul escuro: Muito alto, >90; Azul claro: Confiante, 90 > pIDDT > 70; Amarelo: Baixo, 70 > pIDDT > 50 e Laranja: Muito baixo, < 50).



Fonte: O autor (2025).

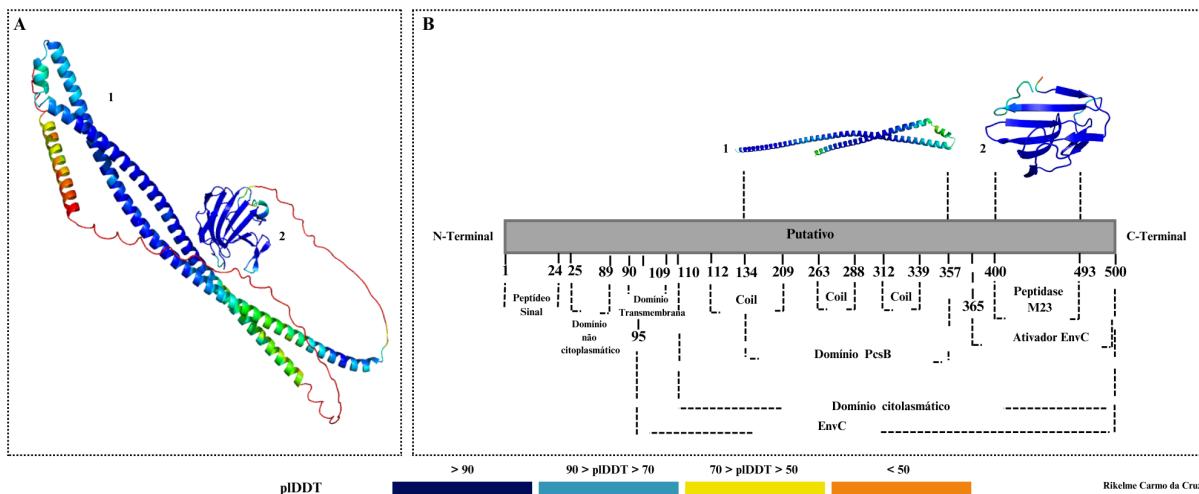
As proteínas precursoras PcsB–M23–Zoocin A-like ($n= 5$) apresentam um domínio *coiled-coil* (CC) N-terminal, associado ao domínio PcsB (Protein required for cell wall separation of group B *Streptococcus*). Essa proteína se localiza no septo de divisão celular, onde atua na separação das células-filhas. O domínio CC abrange uma região catalítica responsável pela clivagem do peptidoglicano (Bartual *et al.*, 2014). Essa arquitetura apresenta três variações distintas (Fig. 8–10).

Figura 8. **A.** Modelo estrutural de uma proteína precursora *Zoocin A* com domínios PcsB e Peptidase M23 de *Xanthomonas campestris* pv. *raphani*. O modelo da proteína precursora foi gerado pelo AlphaFold3. **B.** Divisão dos domínios em PcsB (1) e peptidase M23 (2) de acordo com o Interpro e CDSearch, com as sequências isoladas. O modelo foi colorido de acordo com o índice de confiabilidade pIDDT(Azul escuro: Muito alto, >90; Azul claro: Confiante, 90 > pIDDT > 70; Amarelo: Baixo, 70 > pIDDT > 50 e Laranja: Muito baixo, < 50).



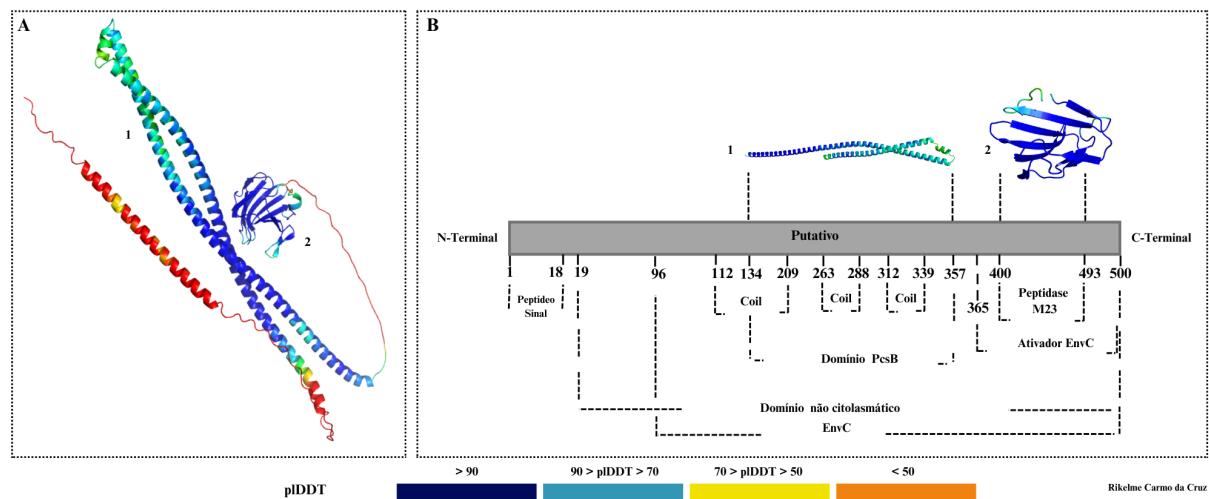
Fonte: O autor (2025).

Figura 9. **A.** Modelo estrutural de uma proteína precursora *Zoocin A* com domínios PcsB e Peptidase M23 de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. O modelo da proteína precursora foi gerado pelo AlphaFold3. **B.** Divisão dos domínios em PcsB (1) e Peptidase M23 (2) de acordo com o Interpro e CDSearch, com as sequências isoladas. O modelo foi colorido de acordo com o índice de confiabilidade pIDDT(Azul escuro: Muito alto, >90; Azul claro: Confiante, 90 > pIDDT > 70; Amarelo: Baixo, 70 > pIDDT > 50 e Laranja: Muito baixo, < 50).



Fonte: O autor (2025).

Figura 10. **A.** Modelo estrutural de uma proteína precursora *Zoocin A* com domínios PcsB e Peptidase M23 de *Xanthomonas citri* pv. *anacardii*. O modelo da proteína precursora foi gerado pelo AlphaFold3. **B.** Divisão dos domínios em PcsB (1) e Peptidase M23 (2) de acordo com o Interpro e CDSearch, com as sequências isoladas. O modelo foi colorido de acordo com o índice de confiabilidade pIDDT(Azul escuro: Muito alto, >90; Azul claro: Confiante, 90 > pIDDT > 70; Amarelo: Baixo, 70 > pIDDT > 50 e Laranja: Muito baixo, < 50).



Fonte: O autor (2025).

As sequências restantes não apresentaram arquiteturas claras com domínios N-terminais bem definidos. Quarenta e uma sequências continham apenas o domínio peptidase M23, sem a presença de outros domínios associados. Outras treze sequências exibiram domínios adicionais, incluindo aminoacil-tRNA sintetase classe II, PksD (domínio de aciltransferase presente em enzimas do tipo policetídeo sintase) e PRK10118 (proteína FliK, envolvida no controle do comprimento do gancho flagelar). No entanto, esses domínios apresentaram valores altos de *e-value*, indicando baixa confiabilidade na predição. Apenas o domínio peptidase M23 mostrou *e-value* baixo ($E \leq 1e-5$), sendo considerado estatisticamente significativo.

Todas as peptidases M23 tiveram suas propriedades físico-químicas calculadas, incluindo peso molecular, ponto isoelétrico, carga líquida em pH 7,4 e hidrofobicidade. O ponto isoelétrico variou de 5,37 a 9,9, a carga líquida oscilou entre -4,4 e +7, enquanto a hidrofobicidade variou de 36,46% a 45,54% entre as sequências analisadas (apêndice). Em seguida, foi realizada uma análise *in silico* do potencial antimicrobiano, na qual as sequências demonstraram potencial antibacteriano, mas não apresentaram potencial antifúngico. Adicionalmente, o software ToxinPred3 identificou regiões com potencial toxicidade contra bactérias nas peptidases analisadas (dados não mostrados).

5.3 ANÁLISE FENÉTICA

Com o objetivo de verificar a redundância de sequências entre as espécies nos genomas analisados, foi realizado um BLAST do tipo tBLASTn contra os genomas de *Xanthomonas*, a fim de confirmar se as noventa sequências identificadas eram únicas em cada genoma. Dos noventa peptídeos analisados, oitenta e um se mostraram como sequências únicas em cada genoma (Tab. 1).

Tabela 1. Peptidases M23 por espécies do gênero *Xanthomonas* em ordem decrescente.

Espécies de <i>Xanthomonas</i>	Número de Peptidases M23 encontradas
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Campestris</i>	11
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Raphani</i>	9
<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>Citri</i>	9
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>phaseoli</i> var. <i>Fuscans</i>	8
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>Vignicola</i>	7
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>Aurantifolii</i>	6
<i>Xanthomonas arboricola</i>	6
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>Anacardii</i>	5
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>Fuscans</i>	5
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>Glycines</i>	5
<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>Malvacearum</i>	5
<i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>Musacearum</i>	4
<i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>Arecae</i>	1
TOTAL:	81

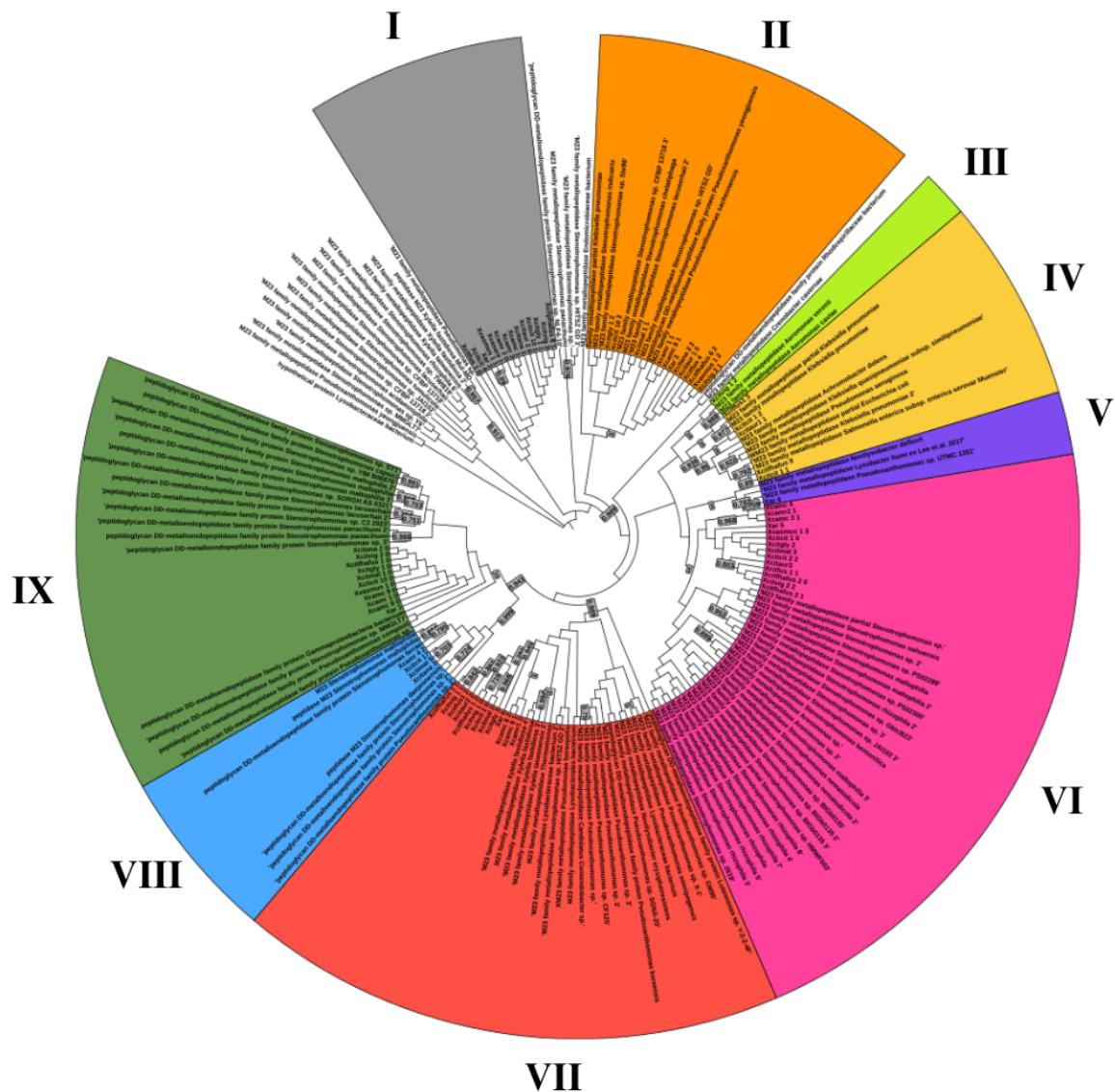
Fonte: O autor (2025).

Para a construção da árvore fenética, foi realizada uma nova análise de redundância com o objetivo de verificar se as oitenta e uma sequências eram idênticas entre os cem genomas analisados. Após a filtragem, constatou-se que apenas 75 sequências eram únicas. Em seguida, foi realizado um BLAST utilizando esse quantitativo de sequências, resultando na seleção de 225 sequências com o

domínio peptidase M23. Após nova análise de redundância, 119 sequências únicas foram selecionadas. Em seguida, a árvore fenética foi construída (Fig. 11) com base no alinhamento das 194 sequências finais — sendo 75 do gênero *Xanthomonas* e 119 de outros representantes bacterianos como *Stenotrophomonas*, *Pseudoxanthomonas*, *Xylella*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Salmonella enterica*, *Lysobacter*, *Aeromonas*, *Arenimonas*, *Thermomonas*, *Escherichia coli*, *Candidatus Contendobacter*, *Endomicrobiaceae bacterium*, *Novilysobacter*, *Crenobacter*, *Rhodospirillaceae bacterium*, *Achromobacter dolens*, *Luteimonas*, *Gammaproteobacteria bacterium*, *Lysobacteraceae bacterium* e *Lysobacterales bacterium*, todos disponíveis no banco de dados NCBI.

A análise revelou a formação de nove agrupamentos principais (*clusters*), denominados de I a IX, evidenciando diversidade de sequências. Com exceção do *cluster* '*Xanthomonas M23-I*', os demais grupos apresentaram bom suporte estatístico de bootstrap que variou entre 70-100%.

Figura 11. Árvore fenética Neighbor-Joining baseada em 194 sequências da família de peptidases M23. As sequências candidatas de *Xanthomonas* foram divididas em nove grupos principais (*clusters*). Os valores de suporte (bootstrap) dos agrupamentos variam de 0,70 a 1,00.



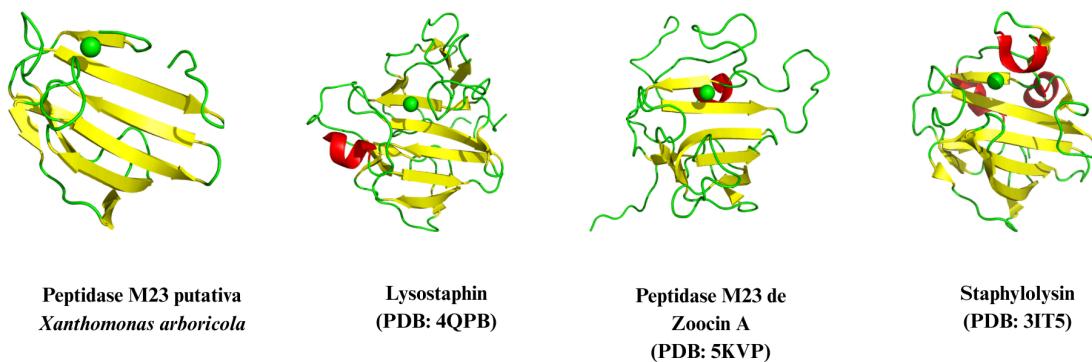
Fonte: O autor (2025).

Foi realizado um alinhamento múltiplo (dados não mostrados) das sequências de peptidases M23 de representantes do gênero *Xanthomonas* de cada cluster identificado. Os clusters I à VII, apresentaram alta conservação, já os clusters VIII e IX não conservaram os motivos catalíticos típicos das peptidases M23, indicando possível divergência funcional ou estrutural.

5.4 MODELAGEM ESTRUTURAL

Com o objetivo de comparar as peptidases M23 identificadas nos genomas de *Xanthomonas* com aquelas previamente descritas na literatura, foi realizada a modelagem estrutural preditiva por meio da plataforma AlphaFold3. Uma sequência representativa de *Xanthomonas arboricola* foi selecionada e comparada com outros membros da família M23, incluindo: *Lysostaphin* (PDB: 4QPB), o domínio catalítico da *Zoocin A* (PDB: 5KVP) e *Staphylocolysin* (PDB: 3IT5) (Fig. 12). De modo geral, observou-se uma conservação estrutural nas regiões compostas por fitas beta, características dessa família.

Figura 19. Backbone estrutural das peptidases M23 de diferentes representantes. As estruturas secundárias de alfa hélice, fitas beta e coil estão destacadas em vermelho, amarelo e verde, respectivamente.

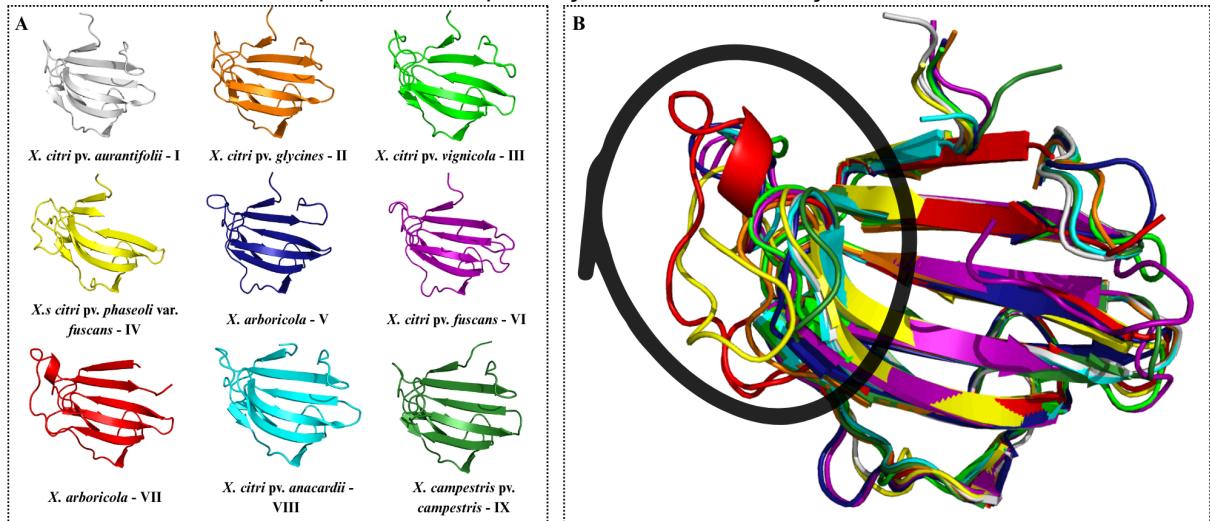


Fonte: O autor (2025).

Um representante de peptidase M23 de *Xanthomonas* foi selecionado de cada um dos nove agrupamentos (clusters) identificados e submetido à modelagem estrutural na plataforma AlphaFold3 (Fig. 13), seguida da análise Ramachandran (Fig. 14) para verificar a qualidade dos modelos. Os representantes de cada cluster apresentaram as seguintes porcentagens de resíduos favoráveis à torção: Cluster I, 90.8%; cluster II, 89.5%; cluster III, 94.7%; cluster IV, 91.8%; cluster V, 90.4%; cluster VI, 90.1%; cluster VII, 92.6%; cluster VIII, 90.5%; cluster IX, 92.3%. As estruturas modeladas mantiveram o centro conservado de folha beta, característica típica da família M23. Observou-se que o representante do cluster IV (Xcitphafus_9) apresentou uma fita beta central mais curta (última fita da estrutura) em comparação aos demais, enquanto o do cluster VII exibiu uma pequena alfa hélice na região coil entre os aminoácidos D36 e G40. Além disso, o alinhamento dos modelos revelou a presença

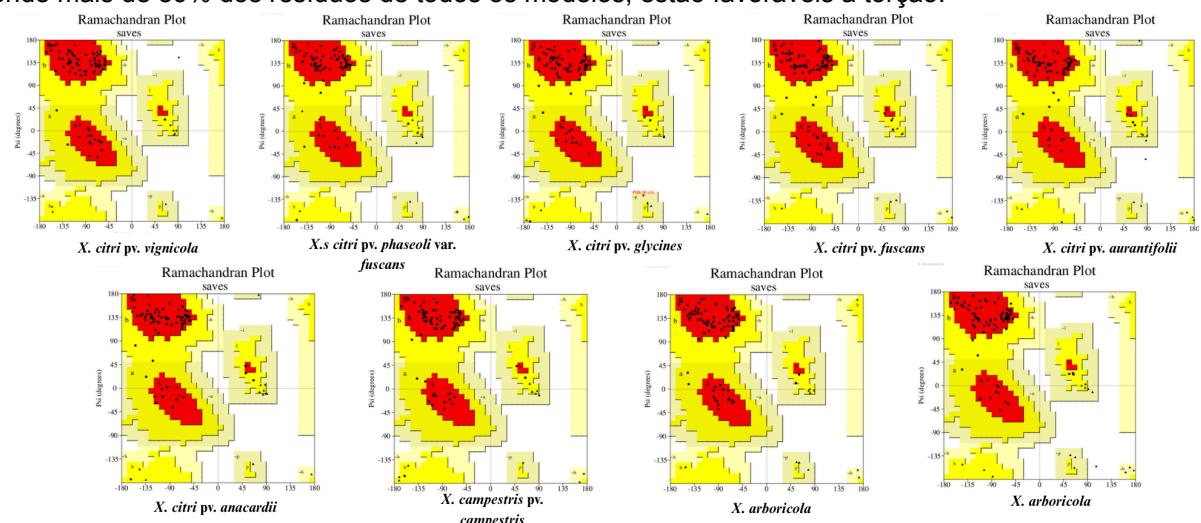
de uma região desordenada em conformação coil, sugerindo variações estruturais que podem estar relacionadas à sua funcionalidade.

Figura 20. **A.** Modelagem tridimensional de um representante de peptidase M23 de cada cluster identificado na árvore fenética. **B.** Alinhamento estrutural dos nove modelos representativos. A região destacada com um círculo preto indica a presença de uma conformação em coil.



Fonte: O autor (2025).

Figura 21. Análise de Ramachandran dos representantes de peptidase M23 de cada um dos clusters, onde mais de 89% dos resíduos de todos os modelos, estão favoráveis à torção.



Fonte: O autor (2025).

6 DISCUSSÃO

O gênero *Xanthomonas* apresenta um ciclo de vida dinâmico, interagindo com diversas outras bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Essas interações frequentemente envolvem competição por espaço e recursos, o que favorece a produção de bacteriocinas como um mecanismo natural de defesa (Riley & Wertz, 2002). Diante da crescente demanda por biomoléculas com potencial antimicrobiano, as bacteriocinas têm se destacado por seu amplo espectro de ação e especificidade, tornando-se alvos promissores em estratégias alternativas aos antibióticos convencionais. Nesse cenário, a aplicação de ferramentas *in silico* torna-se essencial para uma triagem mais eficiente e direcionada dessas moléculas.

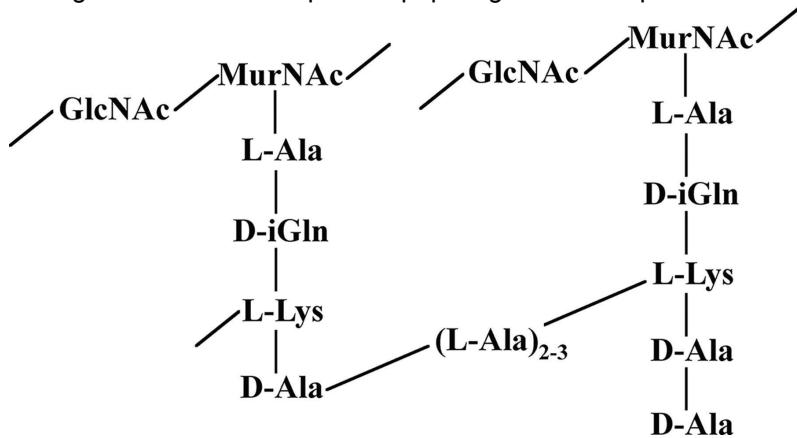
No presente estudo, evidenciou-se a eficiência das ferramentas utilizadas, uma vez que o script desenvolvido foi capaz de identificar noventa sequências de peptidases M23, mesmo com a aplicação de apenas três sondas do BAGEL4, destacando a diversidade e o potencial biotecnológico do gênero *Xanthomonas*. Além da diversidade observada nas sequências, as peptidases M23 conservaram sua estrutura central e apresentam regiões com potencial atividade antimicrobiana.

6.1 DIVERSIDADE FUNCIONAL DA PEPTIDASE M23

Segundo Razew *et al.* (2022) hidrolases do peptidoglicano, proteínas que contém o domínio peptidase M23 podem se combinar com outros diferentes domínios catalíticos e domínios de ligação à parede celular. Essas características refletem os processos evolutivos envolvidos na diversificação funcional das proteínas.

Na bacteriocina *Zoocin A*, a peptidase M23 atua clivando o peptidoglicano na ponte cruzada do tetrapeptídeo (também chamado de peptídeo tronco), o qual está ancorado a uma cadeia formada por repetições dos amino monossacarídeos N-acetilglucosamina (GlcNAc) e ácido N-acetilmurâmico (MurNAc). O peptídeo tronco é constituído, verticalmente, pelos seguintes aminoácidos: L-alanina (L-Ala), D-isoGlutamina (D-iGln), L-lisina (L-Lys) e D-alanina (D-Ala). A ponte cruzada se forma quando dois ou três resíduos de L-Ala se ligam à D-Ala de um peptídeo tronco e à L-Lys do peptídeo adjacente, promovendo a reticulação da parede celular (Fig. 22) (Gargis *et al.* 2009).

Figura 22. Estrutura típica do peptidoglicano estreptocócico.



Fonte: Gargis *et al.* (2009)

Outro aspecto interessante observado nos modelos PcsB–M23–Zoocin A-like é que a peptidase M23 está associada à ativação de EnvC, um fator ortólogo de LytM, assim como NlpD (nova lipoproteína D) em outros modelos. Tanto EnvC quanto NlpD são conhecidos por ativar N-acetilmuramil-L-alanina amidases periplasmáticas do tipo LytC, como AmiA e AmiB (ativadas por EnvC) e AmiC (ativada por NlpD), que atuam hidrolisando a mureína durante o processo de separação das células-filhas (Heidrich *et al.*, 2001). Esses achados sugerem que a peptidase M23 pode atuar não apenas diretamente na clivagem do peptidoglicano, mas também participar da ativação de outras enzimas hidrolíticas, potencializando sua ação antimicrobiana.

Apesar da diversidade nas sequências de aminoácidos, na qual a análise fenética revelou a formação de 9 clusters de peptidases M23, os modelos estruturais teóricos indicaram uma topologia similar e conservada. Uma hipótese para essa diversidade na sequência é que a peptidase M23 pode atuar em contextos funcionais distintos: em algumas espécies, como hidrolase do peptidoglicano, integrando a maquinaria de divisão celular, cuja regulação é estritamente controlada pela bactéria (Vermassen *et al.*, 2019); em outras, pode atuar como bacteriocina (Gargis *et al.*, 2009), com função especializada na inibição de bactérias competidoras.

6.2 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DA PEPTIDASE M23

As análises realizadas com o ToxinPred3 revelaram regiões das peptidases M23 de *Xanthomonas* com potencial toxicidade contra bactérias (dados não mostrados). Essas regiões podem ser exploradas em conjunto com as análises físico-químicas, que evidenciaram ampla variação na carga líquida e no ponto isoeletírico das sequências, parâmetros fundamentais para a escolha mais assertiva no desenvolvimento de peptídeos antimicrobianos racionalmente modificados (RAMPs – *Rationally Modified Antimicrobial Peptides*). Essas características, especialmente as relacionadas às interações eletrostáticas e à hidrofobicidade, desempenham papel direto na eficácia antimicrobiana dos peptídeos (Du *et al.*, 2024; Jiang *et al.*, 2008). Tais informações fornecem base para futuras avaliações experimentais *in vitro* do potencial antimicrobiano dessas moléculas.

Os resultados desta pesquisa evidenciam o potencial do *script* desenvolvido para prospecção de bacteriocinas, destacando as peptidases M23 como candidatos a novos agentes antimicrobianos, bem como sua aplicabilidade na engenharia de RAMPs, com vistas à otimização da síntese peptídica para uso biotecnológico.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo, evidenciou o potencial biotecnológico do gênero *Xanthomonas* na prospecção *in silico* de peptidase M23 com potencial antimicrobiano. Os resultados demonstram que as proteínas encontradas possuem características diversas, reveladas pela fenética e alinhamento dos clusters, porém mantendo um centro de folha beta, típico dessa família. Os resultados do ToxinPred3, revelaram amplo potencial antimicrobiano em todas as sequências. Tais achados contribuem para a compreensão estrutural e funcional dessas enzimas e abrem perspectivas para estudos futuros voltados à engenharia de novos agentes antimicrobianos. Assim, para os próximos trabalhos pretende-se realizar simulações de dinâmica molecular para avaliar o comportamento estrutural dos modelos, identificando os candidatos mais promissores. A partir desses, será planejada a produção heteróloga ou produção sintética para posterior avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- ABRAMSON, J. *et al.* Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. **Nature**, [s. l.], v. 630, n. 8016, p. 493–500, 2024.
- AGRAWAL, P. *et al.* In Silico Approach for Prediction of Antifungal Peptides. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 9, 2018. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2018.00323/full>. Acesso em: 9 jul. 2025.
- ALVAREZ-MARTINEZ, C. E. *et al.* Secrete or perish: The role of secretion systems in *Xanthomonas* biology. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, [s. l.], v. 19, p. 279–302, 2021.
- AN, S.-Q. *et al.* Mechanistic insights into host adaptation, virulence and epidemiology of the phytopathogen *Xanthomonas*. **FEMS Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 44, n. 1, p. 1–32, 2020.
- AN, D. R. *et al.* Structure of Csd3 from *Helicobacter pylori*, a cell shape-determining metallopeptidase. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, [s. l.], v. 71, n. 3, p. 675–686, 2015.
- ANACARSO, I. *et al.* A bacteriocin-like substance produced from *Lactobacillus pentosus* 39 is a natural antagonist for the control of *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in fresh salmon fillets. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 55, n. 2, p. 604–611, 2014.
- BARTUAL, S. G. *et al.* Structural basis of PcsB-mediated cell separation in *Streptococcus pneumoniae*. **Nature Communications**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 3842, 2014.
- BASHAN, Y. Field dispersal of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, and *Alternaria* macrospora by animals, people, birds, insects, mites, agricultural tools, aircraft, soil particles, and water sources. **Canadian Journal of Botany**, [s. l.], v. 64, n. 2, p. 276–281, 1986.
- BAYER-SANTOS, E. *et al.* Distribution, Function and Regulation of Type 6 Secretion Systems of Xanthomonadales. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 10, 2019. Disponível em:

<https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2019.01635/full>. Acesso em: 17 jun. 2025.

BEN LAGHA, A. *et al.* Antimicrobial potential of bacteriocins in poultry and swine production. **Veterinary Research**, [s. l.], v. 48, n. 1, p. 22, 2017.

BLIN, K. *et al.* antiSMASH 7.0: new and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualisation. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 51, n. W1, p. W46–W50, 2023.

BÜTTNER, D.; BONAS, U. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. **FEMS Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 107–133, 2010.

CAMPOS, J. M. M. da S.; NETO, A. R. da S. Atenção farmacêutica na dispensação de antimicrobianos, em farmácias comunitárias e drogarias, no combate a Resistência Antimicrobiana. **Research, Society and Development**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. e8813345292–e8813345292, 2024.

D. BAUMAN, K. *et al.* Genome mining methods to discover bioactive natural products. **Natural Product Reports**, [s. l.], v. 38, n. 11, p. 2100–2129, 2021.

DU, K. *et al.* Optimized Charge/Hydrophobicity Balance of Antimicrobial Peptides Against Polymicrobial Abdominal Infections. **Macromolecular Bioscience**, [s. l.], v. 24, n. 5, p. 2300451, 2024.

FERREIRA, M. A. S. V. *et al.* *Xanthomonas citri* pv. *viticola* Affecting Grapevine in Brazil: Emergence of a Successful Monomorphic Pathogen. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 10, 2019. Disponível em:

<https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2019.00489/full>. Acesso em: 18 jun. 2025.

GARGIS, S. R. *et al.* Use of 4-Sulfophenyl Isothiocyanate Labeling and Mass Spectrometry To Determine the Site of Action of the Streptococcolytic Peptidoglycan Hydrolase Zoocin A. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 75, n. 1, p. 72–77, 2009.

GAWDE, U. *et al.* CAMPR4: a database of natural and synthetic antimicrobial peptides. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 51, n. D1, p. D377–D383, 2023.

GREER, S. F. *et al.* The current status, challenges, and future perspectives for managing diseases of brassicas. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 14, 2023.

Disponível em:

<https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2023.1209258/full>. Acesso em: 18 jun. 2025.

GREER, S. F. *et al.* The potential of bacteriocins and bacteriophages to control bacterial disease of crops with a focus on *Xanthomonas* spp. **Journal of the Royal Society of New Zealand**, [s. l.], v. 55, n. 2, p. 302–326, 2025.

GUO, K. *et al.* The Influencing Factors of Bacterial Resistance Related to Livestock Farm: Sources and Mechanisms. **Frontiers in Animal Science**, [s. l.], v. 2, 2021.

Disponível em:

<https://www.frontiersin.org/journals/animal-science/articles/10.3389/fanim.2021.650347/full>. Acesso em: 9 jul. 2025.

HAYWARD, A. C. The hosts of *Xanthomonas*. In: SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. (org.). **Xanthomonas**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1993. p. 1–119. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-94-011-1526-1_1. Acesso em: 13 jul. 2025.

HEIDRICH, C. *et al.* Involvement of N-acetylmuramyl-l-alanine amidases in cell separation and antibiotic-induced autolysis of *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 167–178, 2001.

HEU, S. *et al.* gly Gene Cloning and Expression and Purification of Glycinecin A, a Bacteriocin Produced by *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* 8ra. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 67, n. 9, p. 4105–4110, 2001.

HOSSAIN, A. *et al.* Antibiotics, antibiotic-resistant bacteria, and resistance genes in aquaculture: risks, current concern, and future thinking. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 29, n. 8, p. 11054–11075, 2022.

HUAN, Y. *et al.* Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 11, 2020.

Disponível em:

<https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2020.582779/full>. Acesso em: 9 jul. 2025.

HUANG, D. *et al.* Identification, Characteristics and Mechanism of 1-Deoxy-N-acetylglucosamine from Deep-Sea *Virgibacillus dokdonensis* MCCC 1A00493. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 52, 2018.

- ISLAM, T. *et al.* Antibiotic Resistance in Plant Pathogenic Bacteria: Recent Data and Environmental Impact of Unchecked Use and the Potential of Biocontrol Agents as an Eco-Friendly Alternative. **Plants**, [s. l.], v. 13, n. 8, p. 1135, 2024.
- JACQUES, M.-A. *et al.* Using Ecology, Physiology, and Genomics to Understand Host Specificity in *Xanthomonas*. **Annual Review of Phytopathology**, [s. l.], v. 54, n. Volume 54, 2016, p. 163–187, 2016.
- JIANG, Z. *et al.* Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic α -helical cationic antimicrobial peptides. **Peptide Science**, [s. l.], v. 90, n. 3, p. 369–383, 2008.
- JORGENSEN, M. A.; YOUNG, K. D. YtfB, an OapA Domain-Containing Protein, Is a New Cell Division Protein in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 200, n. 13, p. 10.1128/jb.00046-18, 2018.
- KAŁUŻNA, M. *et al.* Detection, isolation, and preliminary characterization of bacteria contaminating plant tissue cultures. **Acta Agrobotanica**, [s. l.], v. 66, n. 4, p. 81–92, 2013.
- KAUR, Sumanpreet; KAUR, Sukhraj. Bacteriocins as Potential Anticancer Agents. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 6, 2015. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/pharmacology/articles/10.3389/fphar.2015.00272/full>. Acesso em: 7 jul. 2025.
- KAUS-DROBEK, M. *et al.* From discovery to potential application: engineering a novel M23 peptidase to combat *Listeria monocytogenes*. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 15628, 2025.
- KIM, D.-R. *et al.* Epidemiology and Control of Strawberry Bacterial Angular Leaf Spot Disease Caused by *Xanthomonas fragariae*. **The Plant Pathology Journal**, [s. l.], v. 32, n. 4, p. 290–299, 2016.
- KLEIN-GORDON, J. M. *et al.* Assessing Changes and Associations in the *Xanthomonas perforans* Population Across Florida Commercial Tomato Fields Via a Statewide Survey. **Phytopathology®**, [s. l.], v. 111, n. 6, p. 1029–1041, 2021.
- KOEHBACH, J.; CRAIK, D. J. The Vast Structural Diversity of Antimicrobial Peptides. **Trends in Pharmacological Sciences**, [s. l.], v. 40, n. 7, p. 517–528, 2019.

- KOZLOWSKI, L. P. IPC 2.0: prediction of isoelectric point and pKa dissociation constants. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 49, n. W1, p. W285–W292, 2021.
- LAHIRI, D. *et al.* Bacteriocin: A natural approach for food safety and food security. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 10, 2022. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/bioengineering-and-biotechnology/articles/10.3389/fbioe.2022.1005918/full>. Acesso em: 18 jun. 2025.
- LASKOWSKI, R. A. *et al.* PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, [s. l.], v. 26, n. 2, p. 283–291, 1993.
- LEITE, R. P. *et al.* First Report of the Occurrence of Bacterial Leaf Streak of Corn Caused by *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* in Brazil. **Plant Disease**, [s. l.], v. 103, n. 1, p. 145–145, 2019.
- LETUNIC, I.; BORK, P. Interactive Tree of Life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 52, n. W1, p. W78–W82, 2024.
- LI, T. *et al.* Bacterial resistance to antibacterial agents: Mechanisms, control strategies, and implications for global health. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 860, p. 160461, 2023.
- LPSN. *Xanthomonas*. Disponível em: <https://lpsn.dsmz.de/genus/xanthomonas>. Acesso em: 15 jul. 2025.
- MINSavage, G. V. Gene-For-Gene Relationships Specifying Disease Resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*- Pepper Interactions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 41, 1990.
- MIRANDA, C. D.; GODOY, F. A.; LEE, M. R. Current Status of the Use of Antibiotics and the Antimicrobial Resistance in the Chilean Salmon Farms. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 9, 2018. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2018.01284/full>. Acesso em: 10 jun. 2025.
- NAKATO, G. V. *et al.* SNP-based genotyping and whole-genome sequencing reveal previously unknown genetic diversity in *Xanthomonas vasicola* pv. *musacearum*, causal agent of banana xanthomonas wilt, in its presumed Ethiopian origin. **Plant Pathology**, [s. l.], v. 70, n. 3, p. 534–543, 2021.

NAZARI, M.; YAGHOUBIAN, I.; SMITH, D. L. The stimulatory effect of Thuricin 17, a PGPR-produced bacteriocin, on canola (*Brassica, napus L.*) germination and vegetative growth under stressful temperatures. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 13, 2022. Disponível em:

<https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2022.1079180/full>. Acesso em: 18 jun. 2025.

NEGASH, A. W.; TSEHAI, B. A. Current Applications of Bacteriocin. **International Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 2020, n. 1, p. 4374891, 2020.

NIONES, J. T. *et al.* Dynamics of bacterial blight disease in resistant and susceptible rice varieties. **European Journal of Plant Pathology**, [s. l.], v. 163, n. 1, p. 1–17, 2022.

OPAS/OMS. A RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS, FOMENTADA PELA PANDEMIA DE COVID-19. INFORME DE POLÍTICA, NOVEMBRO DE 2021 | ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. [S. l.], 2022. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/documentos/resistencia-aos-antimicrobianos-fomentada-pela-pandemia-covid-19-informe-politica>. Acesso em: 15 jul. 2025.

OSIPOVITCH, D. C.; GRISWOLD, K. E. Fusion with a cell wall binding domain renders autolysin LytM a potent anti-*Staphylococcus aureus* agent. **FEMS Microbiology Letters**, [s. l.], v. 362, n. 2, p. 1–7, 2015.

PALANIRAJ, A.; JAYARAMAN, V. Produção, recuperação e aplicações da goma xantana por *Xanthomonas campestris*. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 106, n. 1, p. 1–12, 2011.

PENA, M. M. *et al.* EnvC Homolog Encoded by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* Is Necessary for Cell Division and Virulence. **Microorganisms**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 691, 2024.

PRASADARAO, N. V. *et al.* Opacity-Associated Protein A Contributes to the Binding of *Haemophilus influenzae* to Chang Epithelial Cells. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 67, n. 8, p. 4153–4160, 1999.

QUEZADO-DUVAL, A. M. *et al.* Outbreaks of Bacterial Spot Caused by *Xanthomonas gardneri* on Processing Tomato in Central-West Brazil. **Plant Disease**, [s. l.], v. 88, n. 2, p. 157–161, 2004.

- RATHORE, A. S. *et al.* ToxinPred 3.0: An improved method for predicting the toxicity of peptides. **Computers in Biology and Medicine**, [s. l.], v. 179, p. 108926, 2024.
- RAWLINGS, N. D. *et al.* MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 36, n. suppl_1, p. D320–D325, 2008.
- RAZEW, A. *et al.* One fold, many functions—M23 family of peptidoglycan hydrolases. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 13, 2022. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2022.1036964/full>. Acesso em: 4 jul. 2025.
- RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA - OPAS/OMS | ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. [s. l.], 2024. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/resistencia-antimicrobiana>. Acesso em: 10 jun. 2025.
- RILEY, M. A.; WERTZ, J. E. Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application. **Annual Review of Microbiology**, [s. l.], v. 56, n. Volume 56, 2002, p. 117–137, 2002.
- RODRIGUES NETO, J. *et al.* Grapevine bacterial canker in the State of São Paulo, Brazil: detection and eradication. **Tropical Plant Pathology**, [s. l.], v. 36, p. 42–44, 2011.
- ROJAS, G. C.; UDATE, L. A. Resistencia antimicrobiana: microorganismos más resistentes y antibióticos con menor actividad. **Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica**, [s. l.], v. 73, n. 621, p. 757–763, 2017.
- RYAN, R. P. *et al.* Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium–plant interactions. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 344–355, 2011.
- SANTOS-SILVA, C. A. dos *et al.* Plant Antimicrobial Peptides: State of the Art, In Silico Prediction and Perspectives in the Omics Era. **Bioinformatics and Biology Insights**, [s. l.], 2020. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1177932220952739>. Acesso em: 9 jul. 2025.
- SCHWARZ, S.; LOEFFLER, A.; KADLEC, K. Bacterial resistance to antimicrobial agents and its impact on veterinary and human medicine. In: ADVANCES IN VETERINARY DERMATOLOGY. [s. l.]: John Wiley & Sons, Ltd, 2017. p. 95–110. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781119278368.ch5.1>. Acesso em: 9 jul. 2025.

- SGRO, G. G. *et al.* Bacteria-Killing Type IV Secretion Systems. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 10, 2019. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2019.01078/full>. Acesso em: 16 jun. 2025.
- SMITH, T. J.; SONDERMANN, H.; O'TOOLE, G. A. Type 1 Does the Two-Step: Type 1 Secretion Substrates with a Functional Periplasmic Intermediate. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 200, n. 18, p. 10.1128/jb.00168-18, 2018.
- SOLIS-BALANDRA, M. A.; SANCHEZ-SALAS, J. L. Classification and Multi-Functional Use of Bacteriocins in Health, Biotechnology, and Food Industry. **Antibiotics**, [s. l.], v. 13, n. 7, p. 666, 2024.
- SUGRUE, I.; ROSS, R. P.; HILL, C. Bacteriocin diversity, function, discovery and application as antimicrobials. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 22, n. 9, p. 556–571, 2024.
- TAHERI-ANGANEH, M. *et al.* LytU-SH3b fusion protein as a novel and efficient enzybiotic against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Molecular Biology Research Communications**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 151–158, 2019.
- TEIXEIRA, A. R.; FIGUEIREDO, A. F. C.; FRANÇA, R. F. RESISTÊNCIA BACTERIANA RELACIONADA AO USO INDISCRIMINADO DE ANTIBIÓTICOS. **Revista Saúde em Foco**, [s. l.], 2019.
- THOMAS, S. *et al.* CAMP: a useful resource for research on antimicrobial peptides. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 38, n. suppl_1, p. D774–D780, 2010.
- TIAN, M. *et al.* Pollution by Antibiotics and Antimicrobial Resistance in LiveStock and Poultry Manure in China, and Countermeasures. **Antibiotics**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 539, 2021.
- TIMILSINA, S. *et al.* *Xanthomonas* as a Model System for Studying Pathogen Emergence and Evolution. **Phytopathology®**, [s. l.], v. 114, n. 7, p. 1433–1446, 2024.
- URSZULA, B.; JAGODA, M. (2016). Bacteriocins of Gram-negative bacteria - structure, mode of action and potential applications. **Postepy Mikrobiologii**. 55. 157-171.

VAN BOECKEL, T. P. *et al.* Global trends in antimicrobial use in food animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 112, n. 18, p. 5649–5654, 2015.

VAN HEEL, A. J. *et al.* BAGEL4: a user-friendly web server to thoroughly mine RiPPs and bacteriocins. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 46, n. W1, p. W278–W281, 2018.

VERMASSEN, A. *et al.* Cell Wall Hydrolases in Bacteria: Insight on the Diversity of Cell Wall Amidases, Glycosidases and Peptidases Toward Peptidoglycan. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 10, 2019. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2019.00331/full>. Acesso em: 4 jul. 2025.

WANG, G.; LI, X.; WANG, Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 44, n. D1, p. D1087–D1093, 2016.

WU, Z. *et al.* Microbial production of small peptide: pathway engineering and synthetic biology. **Microbial Biotechnology**, [s. l.], v. 14, n. 6, p. 2257–2278, 2021.

XU, Y.; LUO, Q.; ZHOU, M. Identification and Characterization of Integron-Mediated Antibiotic Resistance in the Phytopathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. e55962, 2013.

ZÁRATE-CHAVES, C. A. *et al.* Cassava diseases caused by *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* and *Xanthomonas cassavae*. **Molecular Plant Pathology**, [s. l.], v. 22, n. 12, p. 1520–1537, 2021.

APÊNDICE A - TABELA – CARACTERIZAÇÃO DA PEPTIDASE M23

Peptidase M23	#	Nº de resíduos	Ponto isoeletírico	Peso molecular	Carga líquida no pH = 7,4 (citoplasma)	Porcentagem de resíduos hidrofóbicos
Xar_1		95	8.64	10,10 kDa	1.9	42.11
Xar_2		97	9.3	10,46 kDa	7	41.24
Xar_3		96	06.04	9,97 kDa	-2	43.75
Xar_4		99	6.77	10,37 kDa	0	41.41
Xar_5		105	5.37	11,57 kDa	-4.4	42.86
Xar_6		101	6.39	10,54 kDa	-0.9	43.56
Xcanc_1		97	9.26	10,42 kDa	7	40.21
Xcanc_3_1		102	6.17	11,33 kDa	-1.5	44.12
Xcanc_4		95	6.61	10,29 kDa	-0.5	45.26
Xcanc_8_0		95	8.64	10,10 kDa	1.9	42.11
Xcanc_8_1		96	06.04	10,00 kDa	-2	43.75
Xcanc_8_2		100	06.09	10,33 kDa	-1.9	44
Xcanc_9_0		96	8.64	10,23 kDa	1.9	41.67
Xcanc_9_1		100	06.09	10,30 kDa	-1.9	43
Xcamr_1_0		95	8.64	10,13 kDa	1.9	42.11
Xcamr_1_1		96	06.04	10,00 kDa	-2	43.75
Xcamr1_2		100	6.44	10,21 kDa	-0.9	44
Xcamr_2_0		97	9.26	10,45 kDa	7	40.21
Xcamr2_1		102	6.16	11,31 kDa	-1.5	44.12
Xcamr_3		97	9.26	10,42 kDa	7	40.21
Xcamr_4_2		94	6.55	9,73 kDa	-0.1	42.55
Xcitana_1		97	9.26	10,43 kDa	7	40.21
Xcitana_2_0		101	7.73	10,77 kDa	0.9	40.59
Xcitana_2_2		96	06.04	9,97 kDa	-2	43.75
Xcitana_3		94	6.55	9,73 kDa	-0.1	42.55
Xcitaur_1_0		96	06.04	9,97 kDa	-2	43.75
Xcitaur1_1		95	8.8	9,89 kDa	4	43.16
Xcitaur_2_0		97	9.26	10,43 kDa	7	40.21
Xcitaur2_2		101	06.01	10,48 kDa	-1.9	45.54
Xcitaur3		102	5.79	11,23 kDa	-2.5	42.16
Xcitcit_1_0		94	5.73	10,23 kDa	-2.4	43.62
Xcitcit_1_1		95	7.82	9,90 kDa	1	40
Xcitcit_1_2		95	8.8	9,82 kDa	4	44.21
Xcitcit_2_0		100	6.77	10,50 kDa	0.1	42
Xcitcit_2_2		94	5.73	10,21 kDa	-2.4	43.62
Xcitcit_4		97	9.9	10,36 kDa	6	40.21
Xcitcit_10_0		95	8.64	10,15 kDa	1.9	40
Xcitcit_10_1		97	9.26	10,43 kDa	7	40.21
Xcitcit_10_2		96	06.04	9,97 kDa	-2	42.71
Xcitcit_17		94	6.55	9,75 kDa	-0.1	42.55
Xcitfus_1_0		87	8.74	9,29 kDa	5	42.53
Xcitfus_1_1		102	5.79	11,24 kDa	-2.5	42.16
Xcitfus1_2		101	06.01	10,48 kDa	-1.9	45.54
Xcitfus1_3		90	6.2	9,45 kDa	-1	37.78
Xcitfus_4		96	06.04	9,97 kDa	-2	43.75
Xcitgly_1_0		95	8.64	10,15 kDa	1.9	40
Xcitgly_1_1		97	9.26	10,43 kDa	7	40.21
Xcitgly_1_2		96	06.04	9,97 kDa	-2	42.71
Xcitgly_2		94	5.73	10,20 kDa	-2.4	43.62
Xcitgly_3		100	8.39	10,44 kDa	1.1	42
Xcitmal_1_0		95	8.64	10,15 kDa	1.9	40
Xcitmall_1		96	06.04	9,94 kDa	-2	42.71
Xcitmal_2		100	6.77	10,50 kDa	0.1	42
Xcitmal_3		97	5.51	10,50 kDa	-3.4	42.27
Xcitmal_5		94	6.55	9,75 kDa	-0.1	42.55
Xcitthafus_1_0		95	8.64	10,13 kDa	1.9	41.05
Xcitthafus_1_1		101	6.29	10,53 kDa	-0.9	44.55
Xcitthafus_1_2		101	06.01	10,48 kDa	-1.9	45.54
Xcitthafus_2_0		102	5.79	11,24 kDa	-2.5	42.16
Xcitthafus_2_1		102	5.79	11,25 kDa	-2.5	42.16
Xcitthafus_6_1		97	9.26	10,43 kDa	7	40.21
Xcitthafus_6_2		96	06.04	9,97 kDa	-2	43.75
Xcitthafus_9		95	7.82	9,90 kDa	1	40
Xcitvig_1_0		100	6.28	10,46 kDa	-0.9	44
Xcitvig_1_1		101	06.01	10,48 kDa	-1.9	45.54
Xcitvig_1_2		96	8.17	9,85 kDa	1	36.46
Xcitvig_2_0		95	8.64	10,13 kDa	1.9	41.05
Xcitvig_2_1		96	06.04	9,97 kDa	-2	43.75
Xcitvig_2_2		102	5.79	11,24 kDa	-2.5	42.16
Xcitvig_3		97	9.26	10,43 kDa	7	40.21
Xvasare_1		97	8.76	10,49 kDa	5	40.21
Xvasmus_1_0		95	8.64	10,12 kDa	1.9	41.05
Xvasmus_1_1		97	09.09	10,44 kDa	6	41.24
Xvasmus_1_2		96	5.77	10,03 kDa	-3	43.75
Xvasmus_1_3		102	5.56	11,21 kDa	-3.4	42.16