

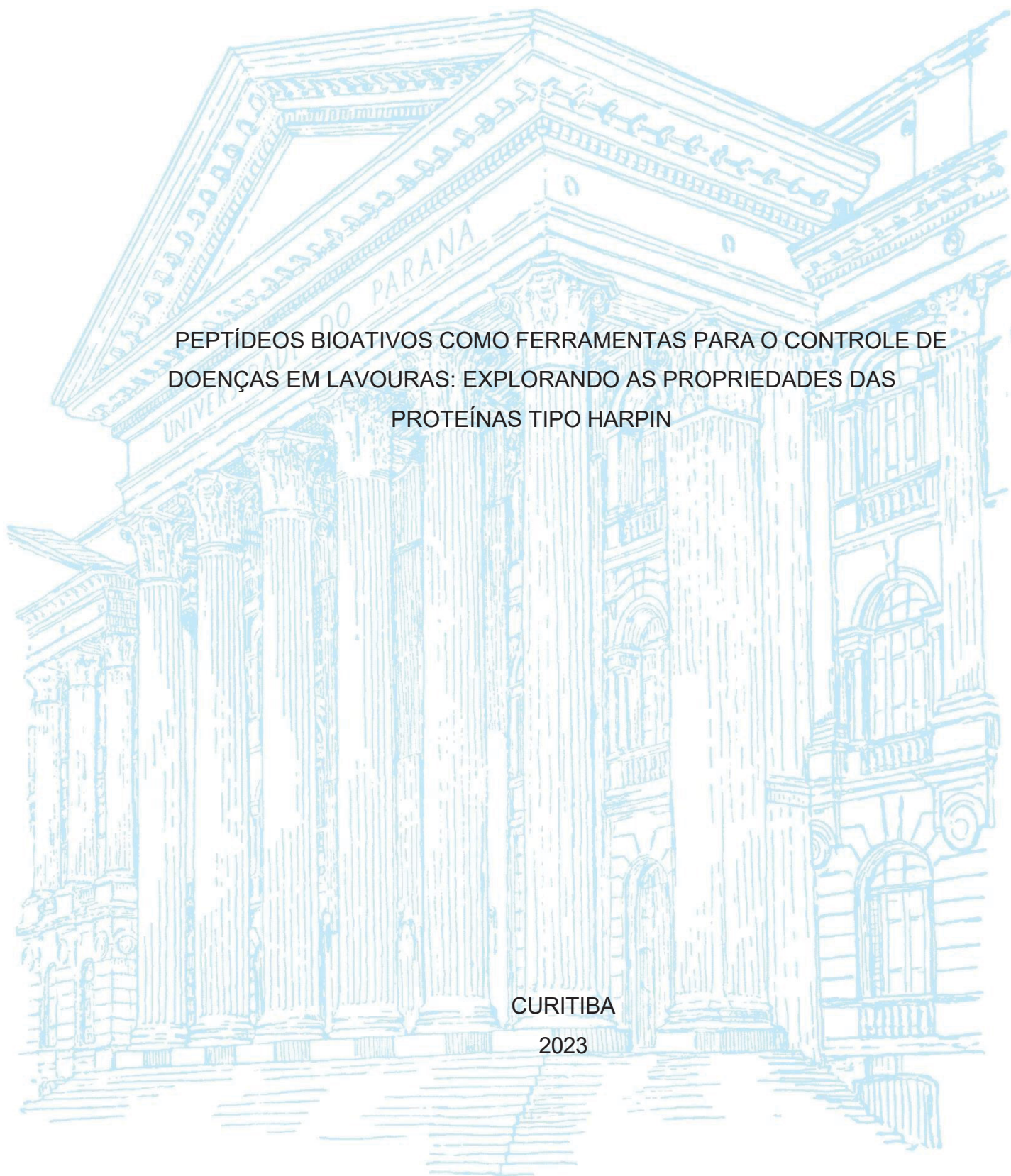
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NAYARA COSTA DE CARVALHO SOUSA OKUMOTO

PEPTÍDEOS BIOATIVOS COMO FERRAMENTAS PARA O CONTROLE DE
DOENÇAS EM LAVOURAS: EXPLORANDO AS PROPRIEDADES DAS
PROTEÍNAS TIPO HARPIN

CURITIBA

2023



NAYARA COSTA DE CARVALHO SOUSA OKUMOTO

PEPTÍDEOS BIOATIVOS COMO FERRAMENTAS PARA O CONTROLE DE
DOENÇAS EM LAVOURAS: EXPLORANDO AS PROPRIEDADES DAS
PROTEÍNAS TIPO HARPIN

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. Carlos Ricardo Soccol
Coorientadora: Dr^a. Vanete Thomaz Soccol

CURITIBA
2023

F

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Okumoto, Nayara Costa de Carvalho Sousa

Peptídeos bioativos como ferramentas para o controle de doenças em lavouras: explorando as propriedades das proteínas tipo Harpin / Nayara Costa de Carvalho Sousa Okumoto. – Curitiba, 2023.

1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Carlos Ricardo Soccol

Coorientador: Vanete Thomaz Soccol

1. Peptídeos bioativos. 2. Pragas agrícolas – Controle Biológico. 3. Soja. I. Universidade Federal do Paraná. II. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. III. Soccol, Carlos Ricardo. IV. Soccol, Vanete Thomaz. V. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE
BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA - 40001016036P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **NAYARA COSTA DE CARVALHO SOUSA OKUMOTO** intitulada: **PEPTÍDEOS BIOATIVOS COMO FERRAMENTAS PARA O CONTROLE DE DOENÇAS EM LAVOURAS: EXPLORANDO AS PROPRIEDADES DAS PROTEÍNAS TIPO HARPIN**, sob orientação do Prof. Dr. CARLOS RICARDO SOCCOL, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 27 de Outubro de 2023.

Assinatura Eletrônica

03/11/2023 16:21:52.0

CARLOS RICARDO SOCCOL

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

03/11/2023 08:23:51.0

MANUEL HOSPINAL SANTIANI

Avaliador Externo (OUROFINO SAUDE ANIMAL)

Assinatura Eletrônica

31/10/2023 15:39:42.0

SUSAN GRACE KARP

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

DEDICATÓRIA

Dedico essa pesquisa primeiramente a Deus, por me dar conhecimento, discernimento, sabedoria e foco para concretizar este trabalho. Aos meus pais, pela forma que me educaram, com liberdade de criar e imaginar, com o princípio de que tudo é possível, se não desistir, sempre reinventar e em Deus descansar com fé, pois tudo cooperarás para o bem!

AGRADECIMENTOS

Através dessa presente dissertação de mestrado, deixo registrado todo meu amor as pessoas que estão presentes em minha vida, meu respeito e gratidão aos que passaram por ela, a Jesus por ser o grande EU SOU, por este título de Mestre, conquistado com muita dedicação, noites em claro, choro, desespero, pois assim é a vida de um pesquisador “risos”, “persistência e amor pela pesquisa” como diz uma grande amiga Amanda B. Santos.

No entanto, me dedicar a pesquisa neste 1 ano e 6 meses, me trouxeram grandes aprendizados, descobri que consigo ir além do que eu acreditava ser capaz, me reinventei os 25 anos, larguei minha profissão de Esteticista Cosmetóloga e Empresária, para acompanhar meu marido nas suas transferências profissionais. Então iniciei o curso de Agronomia no IFRS, onde me descobri pesquisadora, no penúltimo ano do curso engravidei, tivemos um lindo filho prematuro em plena pandemia, mas terminei com zelo minha graduação, e iniciei minha jornada na pesquisa na UNICAMP-SP com RNAi em 2021, mas por vontade de Deus, nosso filho com 1 ano e 2 meses quando iniciou a escolinha, teve bronquiolite por VSR-B e ficou entubado por 8 dias quase o perdemos e depois 20 dias de uti para recuperar, com isso nos mudamos para Curitiba, eu poderia ter desistido de fazer pesquisa, mas não, eu fiz o processo seletivo do PPGEBB, e passei, e agora descobri que se eu estou sendo uma boa profissional eu estou sendo uma mãe e esposa ruim e vice-versa, isso na visão de uma grande maioria, quero dizer a todos vocês que pensam assim: vocês estão errados... Pelo meu filho e marido sou capaz de tudo, por eles eu consegui! Sendo uma mãe nada dentro do esperado, contarei um pouco para vocês: chegando em Curitiba nosso filho começou a piorar, só no ano de 2022 ele internou 22 vezes e as internações duravam de 7 a 12 dias, desesperador não é mesmo!?!

Mesmo com todos os motivos do mundo para desistir, eu não desisti por você filho, pois, eu sei que através deste título terei a oportunidade de voar mais alto, e chegar até naquele ponto que a mamãe sempre diz para você e o papai, eu vou fazer a diferença no mundo filho e só tenho que agradecer a Jesus por ter te deixado conosco, e ao papai por sempre me apoiar e entender o quanto fazer pesquisa me faz

bem. Se vale um conselho: nunca desistam de seus sonhos, só corra atrás sem data para realizar, pois, um dia a vitória vem!

Agradeço a toda a minha família e amigos, mas em especial, ao meu marido, Hugo H. K. Okumoto e filho Henrique K. S. Okumoto que enfrentaram este processo de criação junto a mim e me deram forças para continuar, obrigada, Hugo por ficar todo o tempo ao meu lado, nos momentos mais difíceis, que não foram poucos nos últimos anos, sempre me fazendo acreditar que eu ia conseguir, te amo. A minha cunhada Bruna Grando que é minha inspiração como mãe e mulher e minha melhor amiga, aos meus irmãos Icaro C. C. Sousa um exemplo de homem, profissional e pai, também um ótimo implicante irmão, Vitor C. C. Sousa um exemplo de profissional, empresário e o irmão mais blogueiro do mundo, ao meu pai Altair José de Sousa um homem espetacular, inteligente, honesto criativo divertido e trabalhador, a minha mãe Joelma M. C. C. Sousa uma mulher guerreira, trabalhadora e sonhadora que conquista tudo o que deseja, aos meus melhores amigos Anderson Camargo; Amanda B. Santos, Esteffany H. Candeo, Leticia Maders, Laryssa Marroni Martins, Marcela M. Albuquerque, Rafael N. Barros, Renato L. Souza, Sabrina Vieira, por sempre me ouvirem, me apoiarem e me aceitarem da forma que sou e por sempre me aconselharem bem. Este título não é só meu, é de todos nós!

Ao Dr. Carlos Ricardo Soccol, por acreditar na minha ideia de projeto e me dado a oportunidade de realizá-lo, e poder contribuir com a ciência e uma agricultura sustentável em um programa de pós-graduação que é referência. E por toda a compreensão em relação à doença do meu filho, que me afastou diversas vezes do laboratório, mas o senhor nunca me questionou, confiou em minha palavra, que eu entregaria o que prometi, e hoje estamos aqui, com uma patente e um belo artigo.

À Dra. Vanete Thomaz Soccol, por aceitar me coorientar neste trabalho. E por ter assim como o Sr. Dr. Soccol, me apoiado nesta jornada, acreditado em mim e com sabedoria entender a minha realidade quanto mãe atípica.

A todos os Professores Doutores do departamento e a secretaria, por terem me compreendido e ajudado de forma direta e indireta em toda a trajetória do mestrado. Desejo sucesso e muita saúde a todos vocês.

RESUMO

O presente estudo teve por objetivo explorar o uso de peptídeos bioativos derivados de proteínas Harpin para controle de doenças em plantas. Para atingir o objetivo proposto foi inicialmente realizado estudo in silico para a seleção dos peptídeos, posteriormente foram realizadas mutações e feita a síntese química desses peptídeos. Para completar o estudo foi estudada sua estabilidade e eficácia no controle de doenças em soja. Além de avaliar o impacto dos peptídeos na resistência de plantas a doenças, foi testada sua capacidade antimicrobiana. Os peptídeos bioativos demonstraram potencial para melhorar a resistência das plantas, mostrando 89% de indução de resistência (HR). A ação antimicrobiana mostrou resultados acima de 65% de atividade. Os resultados revelaram que os peptídeos bioativos demonstraram potencial para fortalecer a resistência das plantas, exibindo alta indução de resistência e atividade antimicrobiana, especialmente os peptídeos P2 e P3. Estes dois se destacaram, gerando lesões uniformes nas plantas e rápida resposta imune, indicando potencial para revolucionar a agricultura moderna. Os resultados obtidos mostram a promessa desses peptídeos como novas moléculas para controlar doenças nas plantações, seja como indutores de resistência ou bactericidas, resultando na proteção de suas sequências para possível patente. A pesquisa realizada oferece uma análise aprofundada do uso de peptídeos bioativos derivados das proteínas como uma alternativa sustentável e eficaz no controle de doenças fúngicas e bacterianas em soja como, antracnose, pústula bacteriana, entre outras, destacando seu potencial para revolucionar a agricultura moderna e promover práticas agrícolas mais sustentáveis e amigas do ambiente.

Palavras-chave: peptídeos bioativos; controle de doença; agricultura; antimicrobiano; indutor de resistência

ABSTRACT

The aim of this study was to explore the use of bioactive peptides derived from Harpin proteins to control plant diseases. In order to achieve the proposed objective, an in-silico study was initially carried out to select the peptides, then mutations were made and the chemical synthesis of these peptides was carried out. Their stability and efficacy in disease control in crops were investigated to complete the study. In addition to evaluating the impact of peptides on plant disease resistance, their antimicrobial capacity was tested. Bioactive peptides demonstrated the potential to enhance plant resistance, showing 89% induction of resistance (HR). For antimicrobial action, it presented results above 65% activity. The conducted research provides an in-depth analysis of bioactive peptides derived from proteins as a sustainable and effective alternative for disease control in crops, highlighting their potential to revolutionize modern agriculture and promote more sustainable and environmentally friendly farming practices.

Keywords: bioactive peptides; disease control; agriculture; antimicrobial; resistance inducer

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.2	PRINCIPAIS DOENÇAS DA SOJA.....	15
2.1.1	DOENÇAS ABORDADAS NESTA PESQUISA	16
2.3	MECANISMO DE DEFESA DAS PLANTAS - RESPOSTA HIPERSENSÍVEL (HR) E RESISTÊNCIA SISTÊMICA ADQUIRIDA (SAR).....	28
2.6	USO DE PEPÍDEOS BIOATIVOS DERIVADOS DE PROTEÍNAS HARPIN NA AGRICULTURA.....	40
	BIOATIVOS.....	41
3	OBJETIVOS.....	43
3.1	OBJETIVO GERAL.....	43
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
4	METODOLOGIA.....	44
4.1	PROSPECÇÃO DE NOVAS SEQUÊNCIAS PEPTÍDICAS, CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E 3D	44
4.1.1	BUSCA DE POTENCIAIS PROTEÍNAS E SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS.....	44
4.1.2	ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS	45
4.1.3	ANÁLISE ESTRUTURAL E FUNCIONAL.....	45
4.1.4	SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS PROSPECTADOS EM FASE SÓLIDA-LÍQUIDA NO EQUIPAMENTO RESPEP SL DA INTAVIS	46
4.2	CULTIVO DOS MICRORGANISMOS USADOS NOS EXPERIMENTOS.....	49
4.3	CULTIVOS DAS PLANTAS QUE FORAM EXPOSTAS A TESTES DE HR.....	50
4.4	AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA ANTIMICROBIANA DOS PEPTÍDEOS.....	53
4.5	ANÁLISE DA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA.....	55
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA VALIDAR OS RESULTADOS OBTIDOS.....	56
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1	PROSPECÇÃO DE NOVAS SEQUÊNCIAS PEPTÍDICAS, CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E 3D	57
5.1.1	PEPTÍDEO CONTROLE P1 – PRODUTO COMERCIAL SAORI.....	57
5.2	AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA ANTIMICROBIANA DOS PEPTÍDEOS.....	62
5.2.2	ENSAIO POR HALO DE INIBIÇÃO	72
5.3	ANÁLISE DA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA.....	82
5.3.1	ANÁLISE DA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA	92
6	CONCLUSÃO	93
7	REFERÊNCIAS	96

7	ANEXOS.....	104
---	-------------	-----

1 INTRODUÇÃO

Segundo previsões da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), em 2050 o mundo terá mais de 9 bilhões de habitantes, o que exigirá aumento de cerca de 70% no volume de produção de grãos, frutas, verduras, cereais, de modo que supra a demanda por alimentos em todos os países. Neste cenário, o Brasil tem um papel importante na subsistência da população mundial. De acordo com FAO-STAT, no período de 2000 a 2020, com destaque no último ano, o Brasil foi classificado como o quarto maior produtor de grãos (arroz, cevada, soja, milho e trigo) do mundo, representando 7,8% da produção mundial, e no âmbito da exportação o Brasil é o segundo no ranking mundial, com 19% do mercado internacional.

Em 2020, foram produzidas 239 milhões, e exportadas 123 milhões, de toneladas de grãos. Em 20 anos a exportação brasileira chegou a mais de 1,1 bilhão de toneladas, que representa 12,6% do volume total exportado mundialmente. Segundo Elisio Contini, pesquisador da área de inteligência estratégica da Embrapa, os dados fornecidos a partir da plataforma FAO-STAT, mostram a evolução do agro brasileiro perante o mercado internacional, com destaque para soja, milho, algodão e carnes, que são os produtos com crescente demanda externa. Há perspectiva para que haja continuidade na evolução do Brasil em relação a exportação de grãos e carnes. O cenário atual, mediante ao crescimento populacional, e a elevação da renda no mundo, são consideradas as forças motrizes para demanda mundial de alimentos, na Ásia, com destaque a China, e em breve a Índia (CONTINI, 2020).

Em paralelo à demanda de alimentos, cresce a necessidade de que haja uma produção sustentável, com a preocupação mundial em relação ao impacto da agricultura no meio ambiente. Este novo tipo de demanda qualificada traz uma necessidade de criação de novas tecnologias que auxiliem na agricultura com baixo impacto ambiental (KOMÁREK et al., 2010; BUARQUE, 2011).

A produção de alimentos enfrenta diversas adversidades tanto endógenas quanto exógenas. Para que uma planta expresse seu melhor potencial produtivo, é necessário que ela esteja em condições favoráveis. Mas no campo, esta planta é desafiada pelo clima, por plantas invasoras, por insetos pragas e doenças. Na agricultura hoje, os meios usados para mitigar o estresse causado na lavoura por situações adversas é através do uso da agricultura de precisão, plantas geneticamente modificadas, defensivos agrícolas, entre outros (VILASBÔAS, 2009).

A busca por práticas agrícolas mais sustentáveis e eficientes tem despertado um crescente interesse na pesquisa de produtos biológicos para o manejo de doenças e pragas na agricultura mundial (KOMÁREK et al., 2010; BUARQUE, 2011). A preocupação com os impactos ambientais, vem ganhando força pautas sustentáveis para o agro, denominado movimento verde, que visa os riscos associados ao uso indiscriminado de produtos químicos e outras práticas agrícolas nocivas ao meio ambiente. Este movimento tem impulsionado a pesquisa, que vem buscando alternativas inovadoras que possam garantir o futuro agrícola com mais sustentabilidade e saúde (VILASBÔAS, 2009). Pensando em proporcionar uma agricultura sustentável, o mercado vem criando tecnologias denominadas Técnicas Inovadoras de Melhoramento de Precisão (T.I.M.P), que não têm efeito residual para o ambiente, tornando-as mais interessantes pois essa técnica trabalha com alvos individuais para cada objetivo (NBT PLATAFORM; 2019).

Nesse contexto, os peptídeos bioativos, particularmente de proteínas harpin, emergiram como uma classe promissora de moléculas capazes de desempenhar papel fundamental no controle de doenças em lavouras (REDDY et al., 2004; HOLASKOVA et al., 2015).

As doenças causadas por micro-organismos fitopatogênicos representam as principais ameaças à produção agrícola global, resultando em perdas significativas de colheitas e impactos econômicos consideráveis (CASTRO E FONTES, 2005; TALAMINI E NUNES, 2018). Tradicionalmente, o controle dessas doenças tem se baseado no uso extensivo de agrotóxicos químicos. No entanto, essa abordagem apresenta desafios substanciais, como a resistência dos patógenos a esses produtos e os potenciais efeitos negativos na saúde humana e no meio ambiente (FONES et al., 2017; SHARMA E CHOWDHARY, 2017). No entanto, a pesquisa em busca de

métodos alternativos e sustentáveis de manejo de doenças tem se concentrado no desenvolvimento e aplicação de compostos biológicos, como os peptídeos bioativos (ZHU et al., 2017; CAMPOS et al., 2018).

Os peptídeos bioativos são moléculas curtas de aminoácidos que desempenham uma variedade de funções biológicas em organismos vivos (MAHLAPUU et al., 2016). Na agricultura, eles têm atraído a atenção dos pesquisadores devido à sua capacidade de atuar como ativadores de respostas de defesa nas plantas, induzindo mecanismos de resistência que tornam os cultivos mais robustos contra agentes patogênicos (MAHLAPUU et al., 2016). Entre esses peptídeos, as proteínas *harpin* têm se destacado como potentes indutores de resistência, além de apresentarem propriedades antimicrobianas que podem contribuir para o controle direto de patógenos (CAMPOS et al., 2018).

Este trabalho teve como objetivo explorar as propriedades das proteínas harpin para obtenção de peptídeos bioativos para o controle de doenças em plantas de lavoura. A cultura escolhida para este estudo foi a soja [*Glycine max* (L.) Merr.] pois é uma das espécies vegetais mais exploradas em todos os segmentos de atividade agrícola no Brasil e no mundo. Por sua versatilidade e rentabilidade, destaca-se no mercado mundial, sendo uma das principais commodities econômicas do país, além do seu grande consumo e movimentação de exportações (CASTRO et al., 2015).

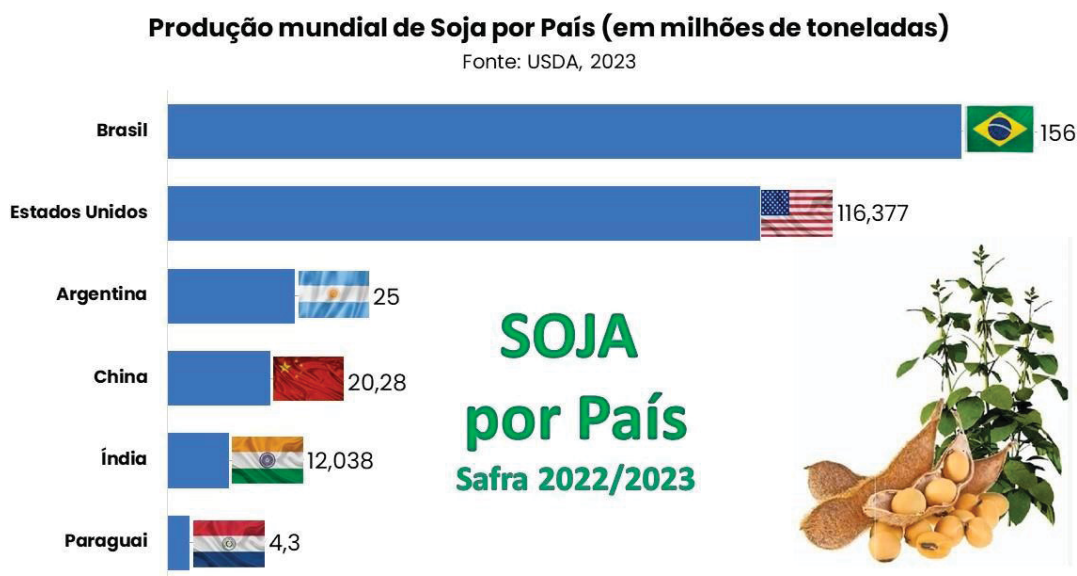
Na revisão bibliográfica desse trabalho foram abordados aspectos relacionados à estrutura e função das proteínas harpin, bem como os mecanismos subjacentes à sua atividade indutora de resistência e ação antimicrobiana. Além disso, foram discutidos os avanços na aplicação prática das proteínas harpin em sistemas agrícolas, destacando seus benefícios e desafios potenciais. Por fim, esta revisão e este trabalho visam contribuir para o entendimento do papel das proteínas harpin no manejo integrado de doenças em lavouras e para a promoção de práticas agrícolas mais sustentáveis e ecologicamente viáveis.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A CULTURA DA SOJA [*Glycine max* (L.)]

A cultura da soja é uma das mais importantes commodities agrícolas no Brasil e no mundo. Desempenha um papel significativo na agricultura global, como na alimentação animal, produção de óleo vegetal entre outros. O Brasil é um dos maiores produtores e exportadores de soja do mundo. Na safra 2022/2023, o país liderou o *ranking* com produção de 154.566,3 milhões de toneladas, área plantada de 44.062,6 milhões de hectares e produtividade de 3.508 kg/ha, tornando-se o principal produtor mundial de soja, superando os Estados Unidos (FIGURA 1) (USDA/PSD, 2023; CONAB,2023).

FIGURA 1-PAÍSES DESTAQUES NA PRODUÇÃO DE SOJA (EM MILHÕES DE TONELADAS)



Fonte: agroadvance.com.br

Portanto, a cultura da soja desempenha um papel crucial na agricultura e na economia global. Contudo, o aumento acelerado de área plantada levanta questões sobre sustentabilidade e impactos ambientais que precisam ser analisados, para que haja um futuro agrícola sustentável.

2.2 PRINCIPAIS DOENÇAS DA SOJA

A cultura da soja está sujeita a várias doenças que podem afetar significativamente o rendimento das safras. Em virtude do aumento da área plantada e o surgimento de variedades cada vez mais precoces, e monocultura em algumas regiões, as doenças estão se tornando de difícil controle. No Brasil já foram identificadas mais de 40 doenças causadas por fungos, bactérias, nematoides e vírus (EMBRAPA, 2021).

As principais doenças bacterianas da soja são: o crestamento bacteriano (*Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*); fogo selvagem (*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*); mancha bacteriana marrom (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*); pústula bacteriana (*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*) (EMPRAPA, 2014).

As principais doenças fúngicas que afetam a cultura da soja são: ferrugem (*Phakopsora pachirhizi*); antracnose (*Colletotrichum truncatum*); mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*); podridão radicular de *Phytophthora* (*Phytophthora sojae*); cancro da haste [*Diaporthe aspalathi* (sin. *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis*) e *Diaporthe caulivora* (sin. *D. phaseolorum* var. *caulivora*)]; crestamento foliar e mancha púrpura (*Cercospora kikuchii*); mancha parda (*Septoria glycinis*); mela ou requeima (*Rhizoctonia solani*); míldio (*Peronospora manchurica*); oídio (*Microsphaera diffusa*) Mancha-alvo (*Corynespora cassicola*); Mancha foliar de (*Ascochyta*, *Ascochyta sojae*); Mancha foliar (*Myrothecium*, *Myrothecium roridum*), Mancha olho-de-rã (*Cercospora*, *sojina*), Podridão-de-carvão (*Macrophomina phaseolina*); Tombamento e morte em reboleira (*Rhizoctonia*, *Rhizoctonia solani*); Podridão parda da haste (*Cadophora gregata*); Podridão radicular (*Rosellinia*, *Rosellinia necatrix*); Seca da haste e da vagem (*Phomopsis* spp.); Podridão vermelha da raiz (*Fusarium brasiliense*, *F. tucumaniae*, *F. crassistipitatum* - de acordo com o Mycobank, devem ser tratadas como *Neocosmospora phaseoli*) (EMBRAPA, 2014).

As doenças causadas por nematoides são: nematoide de cisto (*Heterodera glycinis*); nematoide das lesões (*Pratylenchus brachyurus*); nematoide de galhas (*Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita*); nematoide reniforme (*Rotylenchukus reniformis*) (EMPRAPA, 2014).

As principais doenças causadas por vírus são: mosaico cálico (*Alfalfa Mosaic Virus- AMV*); queima do broto (*Tobacco Streak Virus – TSV*); mosaico comum da soja (*Soybean Mosaic Virus – SMV*); mosaico do feijão (*Bean Pod Mottle Virus – BPMV*); necrose da haste (*Cowpea Mild Mottle Virus – TSV*) (EMPRAPA, 2014).

2.1.1 DOENÇAS ABORDADAS NESTA PESQUISA

Os microrganismos causadores das doenças testadas nesse trabalho foram fornecidos por uma licitação de compra direta com a Embrapa Soja localizada em Londrina PR, a depender da disponibilidade em banco de preservação, aptas para venda. Foram obtidos 10 microrganismos causadores de doenças que acometem a soja, dentre elas três bactérias e sete fungos. Abaixo são listadas as cepas obtidas e nomeadas a seguir com o número do exemplar cadastrado pela Embrapa.

- *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*: isolado CMES 2406 Londrina-PR
16/02/2022 23°11'40,86''S 51°10'59,41''W

A bactéria *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* causa a doença denominada crestamento bacteriano da soja. Essa bactéria é específica da soja e não afeta outras culturas. A doença pode causar prejuízos significativos nas lavouras, reduzindo o rendimento das safras se não for devidamente controlada (EMBRAPA, 2014).

Os sintomas do crestamento bacteriano da soja são: aparecimento de manchas foliares que iniciam com pequenas lesões de aparência translúcida circundadas por um halo de coloração verde-amarelada. Mais tarde, estas manchas ficam escuras e aparecem áreas maiores de tecido necrosado, a largura do halo está diretamente ligada à temperatura ambiente (halo largo em temperaturas amenas, halo estreito ou quase inexistente em temperaturas mais altas) como mostra a (FIGURA 2). Em casos mais severos, a infecção pode se espalhar para os caules, vagens e raízes da planta (EMBRAPA, 2014).

A transmissão da bactéria *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* pode ser transmitida por meio de sementes infectadas, água de irrigação contaminada e respingos de chuva. As lesões presentes nas plantas, muitas vezes causadas por

ventos fortes, insetos e práticas agrícolas, como o uso de equipamentos contaminados, também podem facilitar a entrada da bactéria (EMBRAPA, 2014).

O controle do crestamento bacteriano da soja é limitado em quesito produto bactericida, atualmente no mercado só se tem dois produtos registrados para a doença: oxiclureto de cobre e óxido cuproso (AEGRO, 2023). Logo o manejo da doença gira em torno de estratégias, como o uso de sementes livres de patógenos, rotação de culturas e seleção de variedades resistentes (EMBRAPA, 2014).

FIGURA 2 – FOLHA DE SOJA COM SINTOMAS DE CRESTAMENTO BACTERIANO CAUSADO PELA *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*.



Fonte imagem 1: [Daren Mueller, Iowa State University, Bugwood.org](#) Fonte imagem 2: [Daren Mueller, Iowa State University, Bugwood.org](#) Fonte imagem 3: [Howard F. Schwartz, Colorado State University, Bugwood.org](#)

- *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*: isolado CMES 1652
Guarapuava-PR 10/02/2012

A mancha bacteriana marrom, causada pela bactéria *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, é uma doença que afeta a cultura da soja.

Os sintomas da mancha bacteriana marrom iniciam com pequenas manchas cloróticas de cor bege e marrom nas folhas, evoluindo para formato oval ou alongado entre as nervuras, podendo ter halo amarelo (FIGURA 3) (EMBRAPA, 2014).

A transmissão do patógeno ocorre principalmente por meio de sementes contaminadas. O controle é feito pelo uso de sementes certificadas e livres de patógenos e é uma medida importante para prevenir a disseminação da doença. Ainda

não se tem bactericida no mercado, registrado para controle da doença (EMBRAPA, 2014).

FIGURA 3 – FOLHA DE SOJA COM SINTOMAS DE MANCHA BACTERIANA MARROM CUSADO PELA *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*.



Fonte: Manual de identificação de doenças de soja 5ª edição Embrapa.

- *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*: isolado CMES 2162 Londrina-PR 17/11/2015 23°11'28,24''S 51°10'59,68''W

A pústula bacteriana, causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, é uma doença que afeta a cultura da soja. Essa doença pode causar danos significativos nas lavouras, resultando em perdas de rendimento se não for adequadamente controlada (EMBRAPA, 2014).

Os sintomas da pústula bacteriana geralmente começam a aparecer nas folhas da soja. Inicialmente, pequenas manchas verde-amarelas, formando uma elevação no centro da mancha de cor amarelo-palha. As manchas tornam-se necróticas com um halo amarelo ao redor (FIGURA 4) (EMBRAPA, 2014).

A bactéria responsável pela pústula bacteriana pode ser transmitida principalmente por meio de água de irrigação contaminada, respingos de chuva, vento e contato direto entre plantas. A disseminação da doença é favorecida por condições de alta umidade e temperaturas moderadas (EMBRAPA, 2014).

O controle eficaz da pústula bacteriana da soja envolve uma série de medidas preventivas e de manejo e uso de variedades de soja resistentes, até o momento não há bactericida registrado para essa doença (EMBRAPA, 2014).

FIGURA 4 – FOLHA DE SOJA COM SINTOMAS DE PÚSTULA BACTERIANA CAUSADO PELA *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*



Fonte imagem 1 e 2: [Daren Mueller, Iowa State University, Bugwood.org](#); Fonte imagem 3: [Alison Robertson, Bugwood.org](#)

- *Cercospora* spp.: isolado CMES 1643 Brasília-DF 23/03/2016 15°37'14''S 47°39'07''W

O crestamento foliar e mancha púrpura, causado pelo fungo *Cercospora* spp., são doenças foliares que afetam a cultura da soja. Ambas as doenças podem causar danos significativos nas lavouras, reduzindo o rendimento e a qualidade dos grãos (EMBRAPA, 2014). Os sintomas incluem o aparecimento de manchas circulares ou ovais nas folhas, que inicialmente são de cor verde claro e, com o tempo, tornam-se amareladas com um centro necrótico. As manchas podem coalescer, formando lesões maiores que afetam a capacidade da planta de realizar a fotossíntese (FIGURA 5) (EMBRAPA, 2014).

A disseminação ocorre principalmente por meio de esporos do fungo dispersos pela água, vento e contato direto. O controle eficaz do crestamento foliar e da mancha púrpura envolve medidas preventivas e de manejo. O uso de sementes certificadas e resistentes a doenças é uma medida importante. A aplicação de fungicidas de acordo com as regulamentações, pode ajudar a controlar a doença em períodos críticos (EMBRAPA, 2014).

FIGURA 5 – FOLHA DE SOJA COM SINTOMAS DE CRESTAMENTO FOLIAR CAUSADO PELO FUNGO *Cercospora* spp.



Fonte: Manual de identificação de doenças de soja 5ª edição Embrapa.

- *Corynespora cassiicola*: isolado CMES 1494 Nova Xavantina-MT 28/02/2014

Mancha Alvo causada pelo fungo *Corynespora cassiicola*, provoca manchas circulares nas folhas da soja. Embora raramente cause grandes perdas de rendimento, pode ser um problema em regiões com condições climáticas favoráveis (EMBRAPA, 2014).

Os sintomas da Mancha Alvo na soja incluem o aparecimento de lesões com pontuações pardas contendo halo amarelado, posteriormente ficando grandes e circulares, de coloração castanho-clara a castanho-escuro, podendo apresentar pontuação escura no centro, o fungo também infecta as raízes (FIGURA 6) (EMBRAPA, 2014).

A transmissão é principalmente por meio de esporos dispersos pelo vento e pela água, com maior frequência em condições de alta umidade e temperaturas moderadas, que favorecem o desenvolvimento do fungo (EMBRAPA, 2014).

O controle eficaz da Mancha Alvo envolve medidas preventivas e de manejo junto a rotação de cultura, uso de sementes de soja certificadas e resistentes a doenças é uma estratégia importante. Quando necessário, a aplicação de

fungicidas pode ser considerada, especialmente em condições climáticas favoráveis à doença (EMBRAPA, 2014).

FIGURA 6 – FOLHA DE SOJA COM SINTOMAS DE MANCHA ALVO CAUSADOS PELO FUNGO *Corynespora cassicola*.



Fonte: Manual de identificação de doenças de soja 5ª edição Embrapa.

- *Colletotrichum truncatum*: isolado CMES 1080 Boa Vista-RR 01/01/2004

Antracnose é uma doença causada pelo fungo *Colletotrichum truncatum* que afeta diversas culturas, incluindo a soja. Esta doença é uma preocupação para os agricultores, pois pode resultar em perdas significativas na produção e qualidade das plantas afetadas (EMBRAPA, 2014).

Os sintomas da antracnose na soja podem variar, mas frequentemente incluem o aparecimento de manchas circulares a irregulares na nervura das folhas, vagens e caules. As manchas podem ter cores variadas, incluindo marrom, preto ou vermelho, com um centro necrótico. Nas folhas, as manchas podem ser acompanhadas por descoloração e desfiliação. Nas vagens, podem ocorrer manchas escuras que afetam a qualidade e a comercialização dos grãos (FIGURA 7) (EMBRAPA, 2014).

A transmissão da antracnose ocorre por meio da liberação de esporos pelo fungo, que podem ser transportados pelo vento, respingos de chuva e contato

direto entre plantas. O fungo também pode sobreviver em restos de plantas infectadas, sementes e solo contaminado (EMBRAPA, 2014).

O controle da antracnose na soja envolve estratégias preventivas e de manejo, uso de sementes certificadas e livres do patógeno, aplicação de fungicidas quando necessário, seguindo as recomendações locais e apropriadas (EMBRAPA, 2014).

FIGURA 7 – FOLHA DE SOJA E VAGENS COM SINTOMAS DE ANTRACNOSE CAUSADOS PELO FUNGO *Colletotrichum truncatum*.



Fonte: Manual de identificação de doenças de soja 5ª edição Embrapa. Fonte imagem 2: [Daren Mueller, Iowa State University, Bugwood.org](#)

- *Macrophomina phaseolina*: isolado CMES 2318 Formoso do Araguaia-TO 29/09/2019 11°51'6,638''S 49°45'29,858''W

A Podridão-de-carvão, causada pelo fungo *Macrophomina faseolina*, é uma doença que afeta diversas culturas, incluindo a soja. Essa doença é uma preocupação para os agricultores, pois pode causar sérios danos às plantas e reduzir significativamente o rendimento das safras (EMBRAPA, 2014).

Os sintomas da podridão de carvão na soja incluem a morte de tecido em várias partes da planta, incluindo caules, raízes e vagens. As lesões causadas pelo fungo podem ser inicialmente pequenas e escuras, mas crescem à medida que a infecção se espalha. O tecido afetado frequentemente se torna seco e carbonizado, daí o nome "podridão de carvão". Nas raízes, o

fungo pode formar estruturas escuras semelhantes a escleródios, que são uma característica distintiva da infecção por *Macrophomina phaseolina* (FIGURA 8) (EMBRAPA, 2014).

Esse fungo pode sobreviver por longos períodos no solo como escleródios, uma estrutura de resistência. A infecção geralmente ocorre quando as plantas entram em contato com o fungo no solo. Condições de estresse, como períodos prolongados de seca e temperaturas elevadas, podem aumentar a suscetibilidade das plantas à doença (EMBRAPA, 2014).

O controle eficaz da podridão de carvão envolve estratégias preventivas e de manejo: Práticas de rotação de culturas para reduzir a carga do fungo no solo. Melhorias no manejo de irrigação para evitar estresse hídrico excessivo nas plantas. Uso de sementes certificadas e tratadas para minimizar a introdução do fungo na lavoura. Monitoramento regular das lavouras para detecção precoce de sintomas. Práticas de manejo integrado de pragas e doenças. Quando necessário, a aplicação de fungicidas pode ser considerada, seguindo as recomendações locais e apropriadas (EMBRAPA, 2014).

FIGURA 8 – FOLHA DE SOJA COM SINTOMAS DE PODRIDÃO-DE-CARVÃO CAUSADOS PELO FUNGO *Macrophomina phaseolina*.



Fonte: Manual de identificação de doenças de soja 5ª edição Embrapa

- *Neocosmospora phaseoli*: isolado CMES 25 Ponta Grossa-PR 17/03/2000

Podridão vermelha da raiz, causada pelo fungo *Neocosmospora phaseoli* é uma doença que afeta as raízes das plantas, incluindo a soja. Essa doença pode ter um impacto significativo nas lavouras, uma vez que afeta o

sistema radicular, prejudicando a absorção de nutrientes e água pelas plantas (EMBRAPA, 2014).

Os sintomas da podridão vermelha da raiz incluem o escurecimento e a podridão das raízes da soja. O fungo pode formar escleródios de coloração avermelhada nas raízes infectadas, que são uma característica distintiva da doença. À medida que a infecção progride, as raízes afetadas se tornam necróticas e podem se romper facilmente. A planta pode mostrar sinais de deficiência de nutrientes e água devido aos danos causados ao sistema radicular (FIGURA 9) (EMBRAPA, 2014).

O fungo pode persistir no solo por longos períodos, como escleródios ou micélio. A infecção geralmente ocorre quando as raízes das plantas entram em contato com o fungo no solo contaminado (EMBRAPA, 2014).

O controle eficaz da podridão vermelha da raiz envolve várias estratégias preventivas e de manejo: Práticas de rotação de culturas para reduzir a pressão da doença no solo. Uso de sementes de soja certificadas e tratadas para minimizar a introdução do fungo na lavoura. Monitoramento regular das raízes e das plantas para detecção precoce de sintomas. Práticas de manejo de solo que promovam a drenagem adequada e evitem o acúmulo de água ao redor das raízes. Quando necessário, a aplicação de fungicidas pode ser considerada, seguindo as recomendações locais e apropriadas (EMBRAPA, 2014).

FIGURA 9 – FOLHA DE SOJA COM SINTOMAS DE PODRIDÃO VERMELHA DA RAIZ CAUSADO PELO FUNGO *Neocosmospora phaseoli*.



Fonte: Manual de identificação de doenças de soja 5ª edição Embrapa.

- *Sclerotinia sclerotiorum*: isolado CMES 2392 Iaras-SP 27/01/2022
22°49'55,12''S 49°6'3,46''W

A doença da soja Mofo Branco, causada pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, é uma das doenças mais prejudiciais para a cultura da soja e pode causar perdas significativas de rendimento e qualidade dos grãos.

Os sintomas do Mofo Branco na soja incluem o aparecimento de lesões necróticas circulares nas folhas, caules e vagens da planta. O fungo produz estruturas de resistência chamadas escleródios, que são pequenas, escuras e duras, semelhantes a sementes, que se desenvolvem nos tecidos da planta infectada. A doença pode levar à desfolha precoce e ao apodrecimento das vagens, resultando em perdas de rendimento e qualidade (FIGURA 10) (EMBRAPA, 2014).

A transmissão do fungo ocorre por meio de esporos liberados durante a germinação dos escleródios. Condições de alta umidade e temperaturas moderadas favorecem a disseminação da doença (EMBRAPA, 2014).

O controle eficaz do Mofo Branco envolve várias estratégias preventivas e de manejo: Práticas de rotação de culturas para reduzir a pressão da doença no solo, pois o fungo pode persistir nos escleródios. Plantio de variedades resistentes. Monitoramento regular das lavouras para detecção precoce de sintomas. Práticas de manejo de irrigação que evitem umidade excessiva nas folhas e vagens. Aplicação de fungicidas quando necessário, seguindo as recomendações locais e apropriadas.

FIGURA 10 – FOLHA DE SOJA COM SINTOMAS DE MOFO BRANCO CAUSADO PELO FUNGO *Sclerotinia sclerotiorum*.



Fonte: Manual de identificação de doenças de soja 5ª edição Embrapa.

- *Phytophthora sojae*: isolado CMES 526 Passo Fundo-RS 05/02/2007

Podridão Radicular de *Phytophthora* é uma doença que afeta as raízes e pode causar a morte prematura das plantas de soja. É especialmente problemática em solos úmidos (EMBRAPA, 2014).

Os sintomas da podridão radicular de *Phytophthora* na soja incluem o escurecimento e apodrecimento das raízes da planta. As raízes afetadas podem apresentar uma aparência escura e descolorida, com áreas necróticas. À medida que a infecção progride, as raízes podem se tornar encharcadas e macias, dificultando a absorção de água e nutrientes. As plantas podem mostrar sintomas de murcha, amarelecimento, crescimento deficiente e desfolha prematura (FIGURA 11) (EMBRAPA, 2014).

A infecção por *Phytophthora* ocorre principalmente através do contato direto das raízes das plantas com o patógeno no solo, especialmente em condições de solo encharcado ou excessivamente úmido (EMBRAPA, 2014).

O controle eficaz da podridão radicular de *Phytophthora* envolve estratégias preventivas e de manejo: Práticas de drenagem adequada do solo para evitar o acúmulo de água ao redor das raízes. Rotação de culturas para reduzir a pressão da doença no solo. Monitoramento regular das raízes e das plantas para detecção precoce de sintomas e aplicação de fungicidas (EMBRAPA, 2014).

FIGURA 11 – FOLHA DE SOJA COM SINTOMAS DE PRODRIDÃO RADICULAR DE PHYTOPHTHORA CAUSADOS PELO FUNGO *Phytophthora sojae*.



Fonte: Manual de identificação de doenças de soja 5ª edição Embrapa.

O manejo eficaz das doenças da soja geralmente envolve uma combinação de práticas agrícolas preventivas, como a rotação de culturas, o uso de sementes resistentes ou tolerantes e, quando necessário, a aplicação de fungicidas ou bactericidas. O monitoramento constante das plantações para detectar sinais precoces de infecção é fundamental para minimizar os danos causados por essas doenças (EMBRAPA, 2014). Vendo o cenário que as estratégias de controle atualmente ainda não são suficientes, o este projeto de mestrado tem o compromisso de trazer um princípio ativo biológico, para mitigar os danos nas lavouras por estes patógenos.

2.3 MECANISMO DE DEFESA DAS PLANTAS - RESPOSTA HIPERSENSÍVEL (HR) E RESISTÊNCIA SISTÊMICA ADQUIRIDA (SAR)

Os mecanismos de defesa das plantas desempenham um papel crucial na proteção contra patógenos, como vírus, bactérias, fungos e insetos. Dois desses mecanismos de defesa são: a Resposta Hipersensível (HR) e a Resistência Sistêmica Adquirida (SAR):

- Resposta Hipersensível (HR):

A HR é uma resposta de defesa específica que ocorre localmente nas células da planta após a detecção de um patógeno. Esse mecanismo é ativado quando a planta reconhece a presença de patógenos invasores (FIGURA 13) (AGRIOS, 2004; EMBRAPA, 2009).

- Reconhecimento do patógeno: A planta possui receptores que podem detectar componentes do patógeno, como proteínas, lipopolissacarídeos ou ácidos nucleicos. Quando o patógeno é reconhecido, inicia-se a HR (EMBRAPA, 2009).

- Morte celular programada: Em resposta ao reconhecimento do patógeno, a planta induz a morte celular programada nas células próximas ao local da infecção. Isso cria uma zona de células mortas conhecida como "lesão hipersensível" e formação de cancrios. A morte dessas células impede a disseminação do patógeno (FIGURA 12) (EMBRAPA, 2009).

- Produção de moléculas de sinalização: Durante a HR, a planta produz moléculas de sinalização, como espécies reativas de oxigênio (ROS), que têm um papel importante na eliminação do patógeno (EMBRAPA, 2009).

FIGURA 12 – FOLHA DE SOJA COM SINTOMAS DE RESPOSTA HIPERSENSÍVEL.



Fonte: Mecanismos de defesa de plantas contra o ataque de agentes fitopatogênicos EMBRAPA.

- Resistência Sistêmica Adquirida (SAR):

A SAR é um mecanismo de defesa mais amplo e duradouro que ocorre em toda a planta, não apenas localmente na área da infecção (FIGURA 13) (EMBRAPA, 2009).

- Reconhecimento do patógeno: Similar à HR, a planta precisa reconhecer a presença do patógeno para iniciar a SAR. Isso pode envolver a detecção de moléculas específicas do patógeno ou padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (EMBRAPA, 2009).

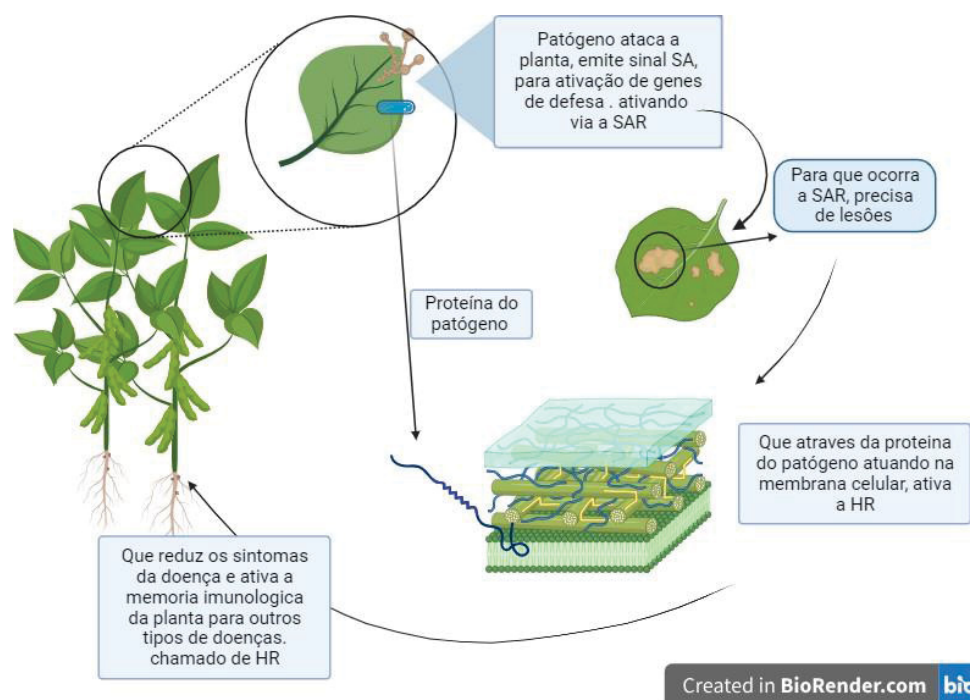
- Ativação da resposta: Quando o patógeno é reconhecido, a planta desencadeia uma resposta sistêmica que envolve a ativação de uma série de genes relacionados à defesa (EMBRAPA, 2009).

- Proteção a longo prazo: A principal característica da SAR é que ela fornece proteção duradoura à planta. Isso significa que, mesmo que o patógeno seja removido ou a infecção seja controlada localmente, a planta permanecerá em estado de alerta e pronta para responder rapidamente a futuras infecções pelo mesmo patógeno ou patógenos relacionados (EMBRAPA, 2009).

- Acúmulo de moléculas de defesa: Durante a SAR, a planta acumula moléculas de defesa, como fitoalexinas e proteínas antifúngicas, que ajudam a combater os patógenos (EMBRAPA, 2009).

Na tabela 1 é dada a diferença entre HR e SAR e resume suas características.

FIGURA 13 – ILUSTRAÇÃO DOS MECANISMOS DE DEFESA DAS PLANTAS SAR E HR



Fonte: (EMBRAPA, 2009). Figura: O autor (2023).

TABELA 1: DIFERENÇA ENTRE RESPOSTA HIPERSENSÍVEL (HR) E A RESISTÊNCIA SISTÊMICA ADQUIRIDA (SAR) EM PLANTAS.

Característica	Resposta Hipersensível (HR)	Resistência Sistêmica Adquirida (SAR)
Tipo de Resposta	Resposta de defesa localizada, ocorre no local da infecção.	Resposta de defesa sistêmica, afeta a planta inteira.

Característica	Resposta Hipersensível (HR)	Resistência Sistêmica Adquirida (SAR)
Ativação	Iniciada imediatamente após o reconhecimento direto do patógeno.	Ativada após o reconhecimento do patógeno, mas pode levar horas a dias para se desenvolver completamente.
Morte Celular	Resulta na morte programada das células próximas ao local da infecção, criando uma lesão hipersensível.	Não envolve necessariamente a morte celular em larga escala, como na HR.
Proteção Duradoura	Proteção localizada, eficaz contra o patógeno específico que a induziu.	Proteção sistêmica, duradoura e eficaz contra uma variedade de patógenos.
Tipo de Patógenos Afetados	Eficaz contra patógenos biotróficos (que obtêm nutrientes das células vivas da planta) e alguns necrotróficos (que matam as células da planta).	Eficaz contra uma ampla variedade de patógenos, incluindo biotróficos e necrotróficos.
Sinalização Molecular	Envolve a ativação de cascatas de sinalização localizadas no local da infecção.	Envolve a produção de moléculas de sinalização que se movem sistemicamente pela planta.
Indução	Induzida pela detecção direta do patógeno ou pelo reconhecimento de componentes patogênicos.	Induzida pela presença do patógeno e pode ser reforçada por substâncias sinalizadoras.
Aplicações Práticas em Agricultura	Usada em pesquisa para estudar a interação planta-patógeno.	Uma estratégia explorada para melhorar a resistência de culturas a uma variedade de patógenos, com aplicações na agricultura.

Fonte: SILVA,2014 e EMBRAPA,2009.

Tanto a HR quanto a SAR são importantes componentes da resposta de defesa das plantas contra patógenos. Elas representam estratégias eficazes para proteger as plantas contra infecções e garantir sua sobrevivência e crescimento saudável (SILVA, 2014).

2.4 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS (PAMs ou AMPs)

Os Peptídeos Antimicrobianos (AMPs) são pequenas moléculas proteicas que desempenham papel importante na defesa do sistema imunológico de muitos organismos, incluindo plantas, animais e humanos, contra infecções causadas por micro-organismos patogênicos, como bactérias, fungos, vírus e até mesmo alguns parasitos (TABELA 2). Eles também são conhecidos como "peptídeos antimicrobianos" devido à sua capacidade de matar ou inibir o crescimento de microrganismos (SANTOS, 2022).

No entanto, é importante notar que os AMPs não são totalmente seletivos e podem afetar tanto microrganismos patogênicos quanto microrganismos benéficos. Portanto, a pesquisa contínua na busca por AMPs eficazes que tenham baixa toxicidade para as células hospedeiras e alto potencial terapêutico é fundamental. Abaixo são listadas algumas características dos AMPs (SANTOS, 2022).

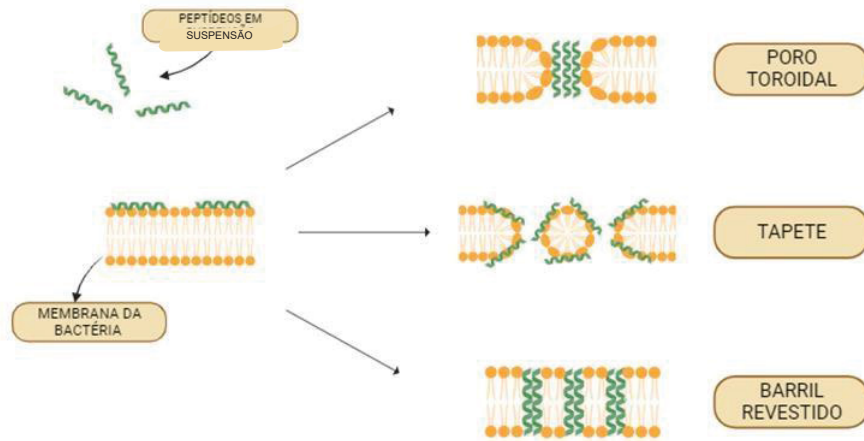
1. **Função Antimicrobiana:** A principal função dos AMPs se dá em combater microrganismos patogênicos. Eles podem lisar as bactérias, inibir o crescimento de fungos, desestruturar vírus e, em alguns casos, até mesmo atacar parasitas (SANTOS, 2022).
2. **Composição:** Os AMPs são proteínas pequenas ou peptídeos, geralmente com menos de 100 aminoácidos. Eles são caracterizados por sua alta proporção de aminoácidos carregados positivamente (como arginina e lisina) e a presença de uma estrutura tridimensional que permite penetrar nas membranas dos microrganismos (TABELA 2) (FIGURA 14) (SANTOS, 2022).

TABELA 2: MECANISMO DE AÇÃO DOS AMPs

Modelo de Ação	Descrição
Modelo Carpete	Os peptídeos antimicrobianos cobrem a superfície da membrana celular como um "carpete", interagindo com os grupos fosfolipídicos da membrana. Isso perturba a integridade da membrana, causando vazamento de íons e moléculas essenciais.
Modelo Shai-Huang-Matsuzaki (SHM)	Os peptídeos formam poros transmembranares inserindo-se nas membranas celulares. Esses poros permitem a saída de íons e moléculas vitais, levando à morte do micro-organismo.
Modelo Barril	Os peptídeos antimicrobianos formam estruturas de barril que atravessam a membrana. Esses canais transmembranares permitem a passagem de moléculas e levam à ruptura da membrana celular do micro-organismo.
Modelo Poro Toroidal	Nesse modelo, os peptídeos causam uma perturbação nas bicamadas lipídicas da membrana, fazendo com que a própria membrana forme um poro. O AMP e os lipídios da membrana cooperam para criar esse poro.

Fonte: (SHAI, 2002; SANTOS, 2022)

FIGURA 14 – ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DE MODELOS DE PERMEABILIZAÇÃO DE MEMBRANA POR AMPs



Created in BioRender.com bio

Fonte: Adaptada de (MAHLAPUU et al 2016; SANTOS, 2022). Figura: O autor (2023).

3. **Atividade de Amplo Espectro:** Muitos AMPs têm atividade de amplo espectro, o que significa que são eficazes contra uma variedade de microrganismos, em vez de serem específicos para um único tipo de patógeno (SANTOS, 2022).
4. **Modo de Ação:** O mecanismo de ação dos AMPs envolve a ruptura das membranas celulares dos microrganismos. Eles podem se inserir nas membranas, formar poros e causar a lise das células patogênicas (SANTOS, 2022).
5. **Produção Induzida:** A produção de AMPs é frequentemente induzida em resposta à presença de microrganismos patogênicos. Isso faz parte da resposta imunológica do organismo (SANTOS, 2022).

6. Presença em Diversos Organismos: AMPs são encontrados em uma ampla variedade de organismos, desde bactérias e insetos até plantas, animais e humanos (SANTOS, 2022).
7. Papel em Plantas: Em plantas, os AMPs desempenham um papel na resistência a patógenos, protegendo contra infecções bacterianas e fúngicas. Alguns AMPs também podem ter funções adicionais, como a regulação do crescimento das raízes (SANTOS, 2022).
8. Potencial Terapêutico: Os AMPs têm sido estudados por seu potencial terapêutico em medicina, incluindo o desenvolvimento de antibióticos alternativos e tratamentos antifúngicos (SANTOS, 2022).

TABELA 3: EXEMPLOS DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS (AMPs)

Peptídeo Antimicrobiano (AMP)	Extraídos de:
LL-37	Humano
Defensinas	Humanos, animais e plantas
Cecropinas	Insetos
Magaininas	Sapos
Dermicidina	Humanos
Cathelicidinas	Humanos e animais
Nisin	<i>Lactococcus lactis</i>
Plantaricina	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Polimixina	<i>Bacillus</i>
Bactenecina	Bovinos
Apidaecina	Abelhas
Lactoferricina	Leite de mamíferos
Casocidina	Leite de mamíferos
Shivaína	Cobra
Escorpião	Peçonha de escorpião

FONTE: Síntese e determinação da estrutura de peptídeos antimicrobianos intragênicos de proteínas humanas - (SANTOS, 2022).

TABELA 4: TABELA COMPARATIVA DESTACANDO AS PRINCIPAIS DIFERENÇAS ENTRE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS (AMPs) E PEPTÍDEOS INDUTORES DE RESISTÊNCIA (PIRs) EM PLANTAS.

Característica	Peptídeos Antimicrobianos (AMPs)	Peptídeos Indutores de Resistência (PIRs)
Função	Moléculas que têm a capacidade de matar ou inibir o crescimento de patógenos microbianos, como bactérias, fungos e vírus.	Moléculas de sinalização que desempenham um papel na ativação da Resposta Hipersensível (HR) e no fortalecimento das defesas da planta contra patógenos.
Origem	Produzidos pela planta como parte de sua resposta imune contra patógenos.	Produzidos pela planta em resposta à presença de patógenos ou danos, como parte de sua resposta de defesa.
Alvo	Direcionados especificamente contra patógenos microbianos.	Não têm como alvo diretamente os patógenos, mas sim desencadeiam respostas de defesa nas plantas.
Ativação	Ativados diretamente pela presença de patógenos microbianos ou por estímulos relacionados à infecção.	Ativados pela detecção de patógenos ou outros estímulos de estresse, iniciando a ativação das respostas de defesa.
Mecanismo de Ação	Matam ou inibem a multiplicação de patógenos por meio de vários mecanismos, como perfuração da membrana ou interferência na síntese de componentes celulares.	Funcionam como moléculas de sinalização que alertam a planta sobre a presença de patógenos, desencadeando respostas de defesa.
Efeito a Longo Prazo	Podem oferecer proteção de curto a médio prazo contra patógenos, mas não conferem uma resistência duradoura.	Podem induzir a Resistência Sistêmica Adquirida (SAR) nas plantas, proporcionando proteção de longo prazo contra uma variedade de patógenos.
Especificidade	Geralmente têm uma alta especificidade para tipos específicos de patógenos.	Podem induzir resistência sistêmica contra uma variedade de patógenos, sendo menos específicos em comparação com os AMPs.
Exemplos	Exemplos incluem defensinas e tiozininas.	Exemplos incluem PEP-13, PIP1, e outros PIRs específicos.
Aplicações Práticas em Agricultura	Usados em pesquisa para desenvolver plantas transgênicas com resistência a patógenos.	Usados em pesquisa para entender e melhorar a resistência das plantas a patógenos, com potencial para aplicações em agricultura sustentável.

Fonte: Adaptado de SANTOS, 2022; SILVA, 2014 e EMBRAPA, 2009.

2.5 PEPTÍDEOS INDUTORES DE RESISTENCIA (HR) EM PLANTAS (PIRs OU IRPs)

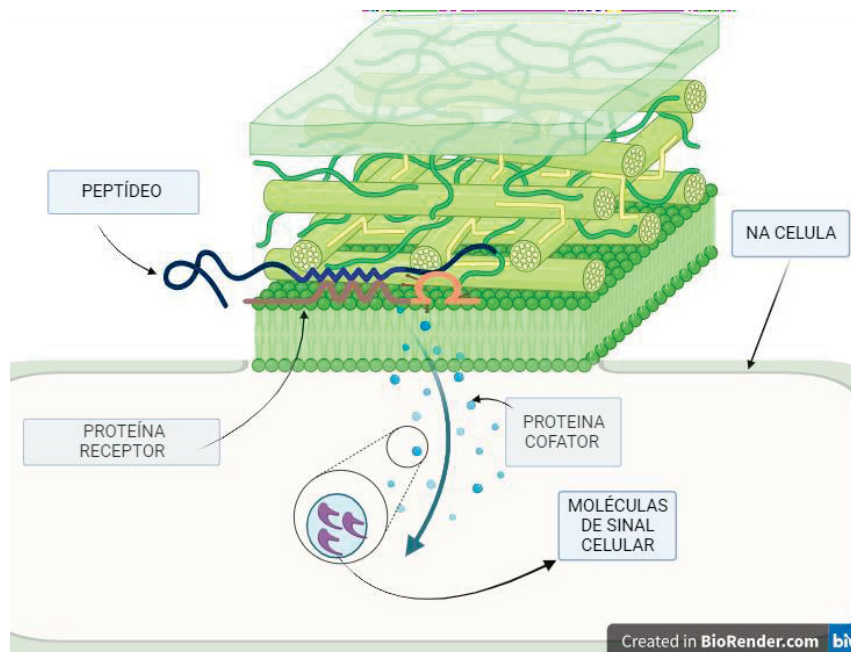
Peptídeos indutores de resistência (PIRs) são moléculas de sinalização que desempenham um papel fundamental na ativação da Resposta Hipersensível em plantas. Esses peptídeos são reconhecidos por receptores específicos nas células das plantas e desencadeiam uma série de respostas de defesa quando a planta detecta a presença de patógenos invasores (EMBRAPA, 2009).

- Função dos Peptídeos Indutores de Resistência (PIRs):

- Reconhecimento de patógenos: Os PIRs são produzidos pelas plantas em resposta à presença de patógenos, como vírus, bactérias, fungos e insetos. Esses peptídeos funcionam como sinalizadores para alertar a planta sobre a ameaça iminente (EMBRAPA, 2009).

- Ativação da Resposta Hipersensível (HR): A interação entre os PIRs e seus receptores nas células das plantas desencadeia a ativação da HR. A HR é uma resposta de defesa localizada que resulta na morte programada das células próximas à área de infecção, impedindo a disseminação do patógeno (FIGURA 15) (EMBRAPA, 2009).

FIGURA 15 - ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DE MODELOS DE ATIVAÇÃO DA INDUÇÃO DE HR



Fonte: (PLANT HEALTH CARE, 2022). Figura: O autor (2023).

- Produção de moléculas de sinalização: Além de induzir a HR, os PIRs também podem estimular a produção de moléculas de sinalização, como espécies reativas de oxigênio (ROXs) e fitoalexinas. Essas moléculas ajudam a combater o patógeno invasor (EMBRAPA, 2009).

- Amplificação da resposta de defesa: Os PIRs podem amplificar a resposta de defesa das plantas, ativando genes relacionados à resistência e à produção de compostos químicos que são tóxicos para os patógenos (EMBRAPA, 2009).

Em resumo, os peptídeos indutores de resistência (PIRs) desempenham um papel fundamental na ativação da Resposta Hipersensível (HR) em plantas, desencadeando respostas de defesa contra patógenos. Essas moléculas de sinalização são uma parte importante da estratégia de defesa das plantas contra infecções e têm potencial para aplicações na agricultura sustentável (SILVA, 2014).

Os peptídeos indutores de resistência (PIRs) em plantas são moléculas de sinalização que desempenham um papel crucial na ativação da Resposta Hipersensível (HR) e no fortalecimento do sistema de defesa das plantas. Existem vários PIRs conhecidos em diferentes organismos, e eles podem variar em estrutura e função (TABELA 5) (SANTOS, 2022).

TABELA 5: PEPTÍDEOS INDUTORES DE RESISTENCIA EM PLANTAS E SUA FUNÇÃO.

Peptídeo Indutor de Resistência (PIR)	Fonte da Planta	Função
PEP-13	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Induz a HR e a expressão de genes relacionados à resistência
PIP1	Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	Induz a HR e fortalece a resistência à bactéria causadora do cancro bacteriano
Systemin	Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	Atua como sinalizador em resposta a danos causados por herbívoros ou patógenos
CAPIP1	Pimentão (<i>Capsicum annuum</i>)	Induz a HR e fortalece a resistência a patógenos como <i>Phytophthora capsici</i>
MaPep1	Maçã (<i>Malus domestica</i>)	Atua na ativação da HR e na resistência ao oídio (<i>Podosphaera leucotricha</i>)
Ácido Salicílico (SA)	Produzido pela própria planta	Ativa a resistência sistêmica adquirida (SAR)
Elicitina	Patógenos	Ativa a resposta de defesa das plantas
Harpin	Bactérias fitopatogênicas	Induz a expressão de genes de resistência
Systemin	Danos mecânicos	Ativa a produção de proteínas de defesa
Defensinas	Plantas e microrganismos	Possuem propriedades antimicrobianas
Fitocistatinas	Plantas	Inibem protease de patógenos

Fonte: SILVA, 2014 e EMBRAPA, 2009.

As características físico-químicas dos PIRs podem variar, de acordo com o tipo de organismo que foi selecionado, no geral existem certas características invariáveis que estão na tabela a seguir (TABELA 6).

TABELA 6: CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E ESTRUTURAIS DOS PEPTÍDEOS INDUTORES DE RESISTÊNCIA

Característica	Descrição
Tamanho	Geralmente pequenos, variando de 10 a 25 aminoácidos de comprimento.
Carga Elétrica	Podem ser carregados positivamente (catiônicos), neutros ou carregados negativamente (aniônicos).
Estrutura Secundária	Muitos PIRs têm uma estrutura secundária bem definida, como alfa-hélices ou folhas beta.
Hidrofobicidade	A hidrofobicidade pode variar, com alguns PIRs sendo mais hidrofílicos e outros mais hidrofóbicos.
Especificidade de Aminoácidos	A sequência de aminoácidos varia entre os PIRs e determina suas funções e interações com receptores.
Produção Induzida	A produção de PIRs é geralmente induzida pela planta em resposta à presença de patógenos, danos ou estímulos de estresse.
Modificações Pós-Traducionais	Alguns PIRs podem sofrer modificações pós-traducionais, como fosforilação ou glicosilação.
Interação com Receptores	Os PIRs interagem com receptores específicos nas células das plantas, desencadeando respostas de defesa.

Fonte: SANTOS, 2022; SILVA, 2014.

É importante notar que a diversidade de PIRs de plantas, bactérias e fungos é significativa, e diferentes organismos podem produzir PIRs com características físico-químicas únicas. Além disso, a pesquisa vem expandindo o conhecimento sobre os PIRs e sua função na ativação da HR e na resistência das plantas a patógenos (SANTOS, 2022).

2.6 USO DE PEPITÍDEOS BIOATIVOS DERIVADOS DE PROTEÍNAS HARPIN NA AGRICULTURA

O uso de peptídeos bioativos derivados de proteínas harpin na agricultura tem um grande potencial para o controle de doenças em plantas e melhoria da produtividade agrícola (KLOEPPER et al. 2004; WANG et al. 2019). Isso se deve principalmente às suas propriedades indutoras de resistência, que permitem às plantas reconhecerem e responderem de forma mais rápida e eficiente a patógenos e estresses ambientais (WEI et al. 2018).

Uma das principais vantagens do uso de proteínas harpin é a sua natureza não-tóxica e ambientalmente segura. Ao contrário de muitos produtos químicos usados na agricultura, as proteínas harpin são produzidas naturalmente pelas plantas e não apresentam riscos significativos de contaminação ambiental ou toxicidade para os consumidores finais dos produtos agrícolas (WEI et al. 2018).

Outra vantagem importante é a capacidade das proteínas harpin de induzir uma resposta imune duradoura em plantas, permitindo que elas se tornem mais resistentes a patógenos e estresses ambientais ao longo do tempo (CHEN et al. 2018). Isso significa que o uso de proteínas harpin pode levar a uma redução significativa no uso de produtos químicos nocivos na agricultura, tornando-a mais sustentável e amiga do meio ambiente (YANG et al. 2016).

Além disso, as proteínas harpin têm a capacidade de induzir uma resposta imunológica em uma ampla gama de plantas, o que significa que elas podem ser aplicadas em diversas culturas agrícolas para o controle de doenças e melhoria da produtividade (YANG et al. 2016).

A compreensão dos PIRs e seu papel na ativação da HR nas plantas tem aplicações importantes na agricultura. A pesquisa agrícola vem explorando o uso de PIRs para melhorar a resistência das plantas a doenças e pragas, reduzindo a necessidade de pesticidas químicos. Essa abordagem, conhecida como "indução de resistência sistêmica" ou "elicitación de defesa", envolve a aplicação de PIRs ou compostos semelhantes às plantas para fortalecer seu sistema de defesa (ZHOU et al. 2019).

É importante notar que a pesquisa sobre PIRs está em constante evolução, e

novos PIRs estão sendo descobertos em diferentes plantas à medida que a compreensão dos mecanismos de defesa das plantas se aprofunda (YANG et al. 2016). O estudo dessas moléculas de sinalização desempenha um papel fundamental no desenvolvimento de estratégias para fortalecer a resistência das plantas a doenças e pragas, contribuindo para a agricultura sustentável e a segurança alimentar (SCHOLZ. et al. 2018).

Nos últimos tempos, várias empresas vêm explorando o uso de peptídeos como ferramentas para o controle agrícola, especificamente para o manejo de doenças em lavouras. Seguem algumas empresas que estão nesta linha de pesquisa, na tabela 7:

TABELA 7- EMPRESAS E SEUS PRODUTOS DERIVADOS DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS

Empresa	Produto	Aplicação
Andermatt Biocontrol AG	Mikrocount® Nematodes	Utilização de peptídeos para aprimorar a eficácia de nematoides benéficos no controle de pragas de solo, como nematoides parasitas de plantas.
EdenShield	NettProtect™	Desenvolvimento de um revestimento de peptídeos derivados de extratos de plantas para proteger as plantas de insetos-praga e repelir insetos voadores.
Marrone Bio Innovations	Regalia®	Peptídeos ativos derivados de cepas de bactérias que induzem as defesas naturais das plantas, auxiliando no controle de doenças fúngicas.
Novozymes	Stargus®	Produtos à base de peptídeos para melhorar a resistência das plantas a doenças, incluindo patógenos fúngicos.
Syngenta	Actigard®	Substância ativa de natureza peptídica que atua como indutora de resistência em plantas, auxiliando na proteção contra doenças.
BASF	Pepino®	Solução à base de peptídeos que auxilia as plantas a resistirem a estresses bióticos e abióticos.

Em resumo, o potencial do uso de proteínas harpin na agricultura é significativo e pode ajudar a reduzir a dependência de produtos químicos nocivos, tornando a agricultura mais sustentável e segura para o meio ambiente e para os consumidores, o objetivo deste projeto é selecionar sequências de peptídeos eficientes no controle de doenças em plantas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho é prospectar sequências indutoras de resistência e avaliar o potencial dos peptídeos como antimicrobianos e indutores de resistência como abordagens inovadoras para o controle de doenças em plantas cultivadas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Prospecção de novas sequências peptídicas, com características físico-químicas e 3D;
2. Síntese dos peptídeos prospectados em fase sólida-líquida no equipamento RESpep SL da Intavis;
3. Cultivar os microrganismos a serem usados nos experimentos;
4. Cultivar plantas que serão expostas a testes de HR frente a peptídeos selecionados no presente trabalho;
5. Avaliação da eficácia antimicrobiana dos peptídeos;
6. Análise da Indução de Resistência;
7. Análise estatística para validar os resultados obtidos.

Ao alcançar esses objetivos, esta pesquisa busca contribuir para um melhor entendimento da viabilidade e eficácia dos peptídeos antimicrobianos e indutores de resistência como alternativas promissoras para o controle de doenças em plantas cultivadas. Além disso, visa fornecer insights valiosos para o desenvolvimento de estratégias sustentáveis de manejo de doenças que minimizem o uso de produtos químicos sintéticos e promovam a saúde das culturas agrícolas.

4 METODOLOGIA

4.1 PROSPECÇÃO DE NOVAS SEQUÊNCIAS PEPTÍDICAS, CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E 3D

4.1.1 BUSCA DE POTENCIAIS PROTEÍNAS E SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS

A prospecção iniciou com a pesquisa em bancos de dados genômicos e proteômicos de organismos de interesse, como plantas e microrganismos. As sequências selecionadas foram obtidas a partir de proteínas depositadas nos bancos de dados: The Universal Protein Resource, UniProt e National Center for Biotechnology Information (NCBI). Foram realizadas buscas e avaliadas sequências da família *harpin3 secretion system effector*.

Pesquisas detalhadas da Biblioteca de Peptídeos foram realizadas visando descartar possíveis peptídeos já patenteados nas proteínas escolhidas. As foram feitas usando o software BLAST das sequências selecionadas e buscas de anterioridade nos sites Orbit e Google patentes. A seguir uma sequência peptídica do produto comercial, da empresa Plant Health Care Insumos Agrícolas LTDA, do produto Saori, registrado para a ferrugem asiática da soja (TABELA 8) foi usada como controle positivo nos testes de atividades. A sequência está disponível na rede através do licenciamento do produto na Resolução-RE nº2.514, DE 24/0621 (DOU de 26/06/21).

Para efeito de depósito de patente, todas as sequências aqui tratadas, com exceção a do peptídeo comercial denominado P1 usado como controle positivo, não foram descritas.

4.1.2 ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS

As sequências de proteínas selecionadas foram analisadas em programas de bioinformática para identificar sequências peptídicas candidatas usando parâmetros específicos, como: sequências de aminoácidos ricas em resíduos carregados positivamente, presença de domínios funcionais conhecidos ou a expressão em tecidos relevantes.

As sequências de peptídeos foram submetidas ao algoritmo Protein BLAST no banco de dados Patented protein sequences (pataa), localizado no NCBI. O alinhamento local foi realizado contra cada sequência disponível nos seguintes depósitos de patentes, o documento de patente BR112019024647- 9 A2 e BR112014022195-2 A2a fim de tornar o projeto assertivo.

As sequências de proteínas escolhidas no banco de dados no NCBI foram submetidas ao Software *Facilities to analyse NPS@'s data: AnTheProt and MPSA*, para a obtenção das sequências de peptídeos.

4.1.3 ANÁLISE ESTRUTURAL E FUNCIONAL

As proteínas candidatas foram analisadas para observar suas estruturas tridimensionais, obtendo percepções positivas para geração de peptídeos bioativos. Além disso, a função das proteínas foi explorada para determinar seu potencial na produção de peptídeos com atividades desejadas. Para a modelagem e visualização das estruturas 3D dos peptídeos selecionados, foi utilizado o programa SWISS-MODEL (SCHWEDE et al., 2003) e PEP-FOLD3 (LAMIABLE A et al., 2016). Em tais programas as sequências foram modeladas e comparadas com outros modelos já existentes de sequências patenteadas no banco de dados do google patentes. Para análise físico-química foi utilizado o site PepCalc.com - Peptide property calculator, para análise de membrana foi usado a interface Mol* 3D Viewer data: BCSB-PDB protein data bank.

4.1.4 SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS PROSPECTADOS EM FASE SÓLIDA-LÍQUIDA NO EQUIPAMENTO RESPEP SL DA INTAVIS

Os peptídeos selecionados para o projeto têm característica solúvel, desde o P1 (controle positivo) seguido por ordem numérica até P6. Eles foram sintetizados em escala de 10 μ mol no sintetizador automatizado ResPep SL (Intavis®) (FIGURA 12). Os aminoácidos foram pesados e diluídos em NMP, ativados com uma solução 1:1 de Oxima Pura e dissopropilcarbodiimida (DIC 17,033%). Em seguida, os aminoácidos ativados foram incorporados às resinas TentaGel (Intavis). A desproteção da Fmoc foi realizada repetidamente até que a síntese de cada peptídeo fosse completada utilizando 4- Metilpiperidina 25% (25% v/v em DMF). Os peptídeos foram então extraídos da resina usando tratamento com uma solução contendo Trifluoroacético (92,5%), água (2,5%), Triispropilsilano (2,5%) e Beta-mercaptoetanol (2,5%) em três horas, sob agitação. Os peptídeos foram precipitados com uma solução fria de metil-tercbutil e liofilizados, a pureza ficou em torno de 95-98% (TABELA 8).

Após a liofilização foi feita a diluição em Tris-HCl 20 mM (pH 8,0), para solução estoque e posteriormente os peptídeos foram diluídos em três concentrações 5; 15; 30 μ M (segundo KIM, 2004).

FIGURA 15 - Sintetizador automático de peptídeos INSTRUMENTO BIOANALÍTICO INTAVIS AG. ResPep SL .



Fonte: http://www.intavis.com/en/Automated_Peptide_Synthesis/ResPep_SL/index.php.

TABELA 8 – LISTA DOS PEPTÍDEOS SELECIONADOS E SINTETIZADOS PELO RespPep SL - Sintetizador automático.

Nome seqüências	Seqüências para Síntese	Número de resíduos	Ponto isoeletrico	Solubilidade	Massa molar	Faixa de pH 7	Coefficiente de extinção
P1 CONTROLE peptideo patente - <i>Erwinia amylovora</i>	QQPIDEETIEQMAQLLAQ LLESLLSPQR	29	pH 3.44	Solúvel	3350.75 g/mol	-0.4	0 M ⁻¹ cm ⁻¹
P2 mutante - <i>Erwinia oleae</i>	X ₁X ₁₆21	21	pH 9.81	Solúvel	2636.91 g/mol	1	5690 M ⁻¹ cm ⁻¹
P3 mutante - <i>Erwinia oleae</i>	X ₁X ₁₆21	21	pH 9.75	Solúvel	2574.95 g/mol	2	5690 M ⁻¹ cm ⁻¹
P4 <i>Erwinia oleae</i>	X ₁X ₁₆19	19	pH 11.12	Solúvel	2137.4 g/mol	2	0 M ⁻¹ cm ⁻¹
P5 <i>Erwinia oleae</i>	X ₁X ₁₆17	17	pH 4.54	Solúvel	1965.17 g/mol	0.1	0 M ⁻¹ cm ⁻¹
P6 <i>Curtobacterium glycinis</i>	X ₁X ₁₆22	22	pH 6.76	Solúvel	2582.93 g/mol	0	0 M ⁻¹ cm ⁻¹

Legenda: os peptídeos, estão protegidos pois serão patenteados. Fonte: O autor (2023).

4.2 CULTIVO DOS MICRORGANISMOS USADOS NOS EXPERIMENTOS

No experimento foram usadas 10 estirpes de microrganismos, dentre eles três bactérias e sete fungos patogênicos de soja (TABELA 9).

Os microrganismos foram repicados em placas com meio sólido e em tubos contendo meio líquido. Posteriormente foram feitos repiques para a conservação e composição do banco de microrganismos do laboratório de microbiologia do departamento de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Para as bactérias foram usados meios Mueller Hinton com e sem ágar, que foram incubados a 20°C sem agitação, em placas esterilizadas de 60 cm e tubos de vidro de 10 mL. Os fungos foram cultivados em meios V8 e BDB, em Erlenmeyer de 50 mL com 30 mL de meio líquido, foram incubados a 27°C em agitação de 109 rpm.

TABELA 9 – MICRORGANISMOS QUE FORAM TESTADOS AO LONGO DO TRABALHO

Isolado	Tipo de Material
Fungo <i>Cercospora</i> spp. ¹	CMES 1643; Brasília-DF 23/03/2016 15°37'14''S 47°39'07''W
Fungo <i>Corynespora cassiicola</i>	CMES 1494; Nova Xavantina-MT 28/02/2014
Fungo <i>Colletotrichum graminicola</i> ²	CMES 1904; Campo Mourão-PR 01/01/2004
Fungo <i>Colletotrichum truncatum</i> ³	CMES 1080; Boa Vista-RR 01/01/2004
Fungo <i>Macrophomina phaseolina</i>	CMES 2318; Formoso do Araguaia-TO 29/09/2019, 11°51'6,638 49°45'29,858''W
Fungo <i>Neocosmospora phaseoli</i> ⁴	CMES 25 Ponta Grossa-PR 17/03/2000
Fungo <i>Macrophomina phaseolina</i>	CMES 1871 Cachoeira do Sul-RS 27/03/2017 30° 4' 41,88''S 52° 52' 1,99''W
Fungo <i>Pyricularia grisea</i> ⁵	CMES 1603 Cambé-PR 07/08/2012
Fungo <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	CMES 2392 Iaras-SP 27/01/2022 22°49'55,12''S 49°6'3,46''W
Chromista <i>Phytophthora sojae</i>	CMES 526 Passo Fundo-RS 05/02/2007
Bactéria <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	CMES 1652 Guarapuava-PR 10/02/2012

Bactéria *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*

CMES 2406 Londrina-PR 16/02/2022
23°11'40,86''S 51°10'59,41''W

Bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*

CMES 2162 Londrina-PR 17/11/2015
23°11'28,24''S 51°10'59,68''W

¹Isolado obtido de semente com mancha-púrpura. Em função de trabalhos sugerindo mais de uma espécie associada ao sintoma estamos preferindo tratar assim "spp."

²Isolado identificado pela Embrapa Milho e Sorgo.

³Identificação de acordo com: ROGERIO, F. et al. Phylogeny and variability of *Colletotrichum truncatum* associated with soybean anthracnose in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, p. 402-415, 2016.

⁴Nome atual, de acordo com o Mycobank, do agente causal da podridão vermelha da raiz, antes atribuído a várias espécies de *Fusarium*.

⁵Isolado obtido de espiga de trigo com sintomas de brusone.
Fonte: EMBRAPA SOJA - 2023.

4.3 CULTIVOS DAS PLANTAS QUE FORAM EXPOSTAS A TESTES DE

HR

As sementes de soja foram concedidas pelo departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da UFPR, com as seguintes características:

Variedade Soja	INTACTA RR2 PRO
Proteção	Contra as principais lagartas da cultura da soja, tolerância ao glifosato, potencial de produtividade aumentado.
Localização	Lagoa Bonita Sementes NS5933IPRO
Lote	20138/22
Peneira	P1
Safra	2021/2022
Pureza	99,9%
Germinação	96%
Teste de germinação Val.	fev/23
Amostra	3kg

Paralelamente ao cultivo das sementes já foram realizados os testes de germinação e algumas sementes foram tratadas com os peptídeos, descritos na seção 5 de resultados.

4.3.1 Germinação das sementes

As sementes foram primeiramente sanitizadas com hipoclorito 5% e posteriormente colocadas em folhas de papel Germitest umedecidos com água destilada para o teste de germinação. Isso foi realizado conforme as recomendações da literatura (BRASIL, 2009). Para o teste, foram utilizadas 48 sementes em cada rolo de papel, método esse recomendado para a cultura da soja. Foram realizadas quatro

repetições, totalizando 192 sementes utilizadas para cada tratamento. Para que as folhas de papel Germitest fossem umedecidas corretamente com água destilada, foi realizado o cálculo multiplicando o peso do papel por 2,5, o que resulta em aproximadamente 54,5 mL de água destilada. Após a disposição das sementes as bordas foram dobradas e as pontas amarradas. Os rolos de papel foram colocados verticalmente em um Becker de 1000 mL completado com 50 mL de água da torneira para manter a umidade do papel e levados a uma câmara de germinação do tipo BOD, a uma temperatura constante de 25° C, sem luz (FIGURAS 17 e 17.1).

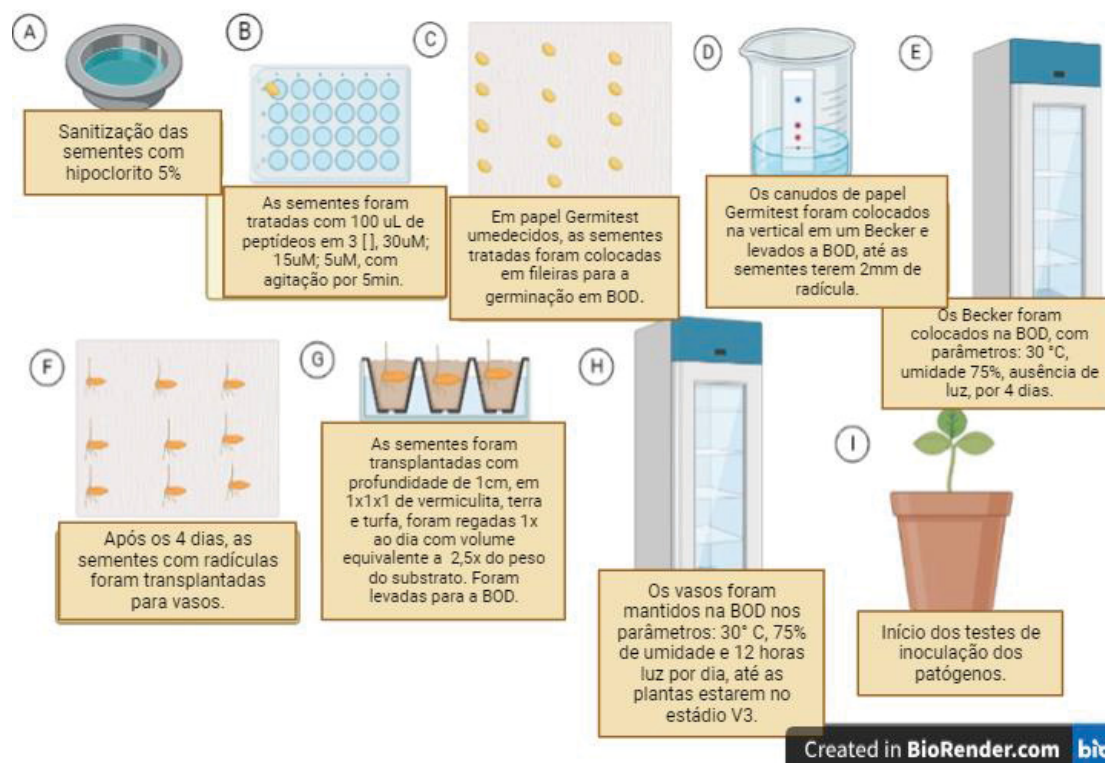
Os rolos foram abertos todos os dias, ao mesmo horário as 18h, para contabilizar as sementes que já haviam germinado, ou seja, as que já haviam emitido 2 milímetros de radícula. Este processo ocorreu até o oitavo dia em que foram classificadas em plântulas normais e anormais, segundo metodologia proposta por (BRASIL, 2009). Juntamente com o teste de germinação, realizou-se o tratamento de sementes com os peptídeos em três concentrações, 5; 15; 30 μ M, e ainda foram comparados a germinação em sementes tratadas e não tratadas (TABELA 8). Com o número de sementes germinadas em cada tratamento, calculou-se a porcentagem de germinação, para qual o número de sementes germinadas foi dividido pelo número total de sementes postas a germinar, multiplicando por 100, para a obtenção de porcentagem.

FIGURA 17 – ENSAIO DE GERMINAÇÃO



A- forma que as sementes foram sanitizadas e posteriormente tratadas com os seus respectivos peptídeos: 1- P1; 2- P2; 3- P3; 4- P4; 5- P5; 6- P6; 7- água. B – Forma em que as sementes foram dispostas no papel Germitest, para germinação. C- Forma que os rolos de papel Germitest, foram colocados na BOD, para germinação. Fonte: O autor (2023).

FIGURA 17.1 – ILUSTRAÇÃO TESTE DE GERMINAÇÃO DE SEMENTE COM TRATAMENTO PARA CADA PEPTÍDEO: RESPOSTA HIPERSENSIVEL HR



Fluxograma das etapas de preparo das sementes soja e o cultivo das plantas. Fonte: O autor (2023).

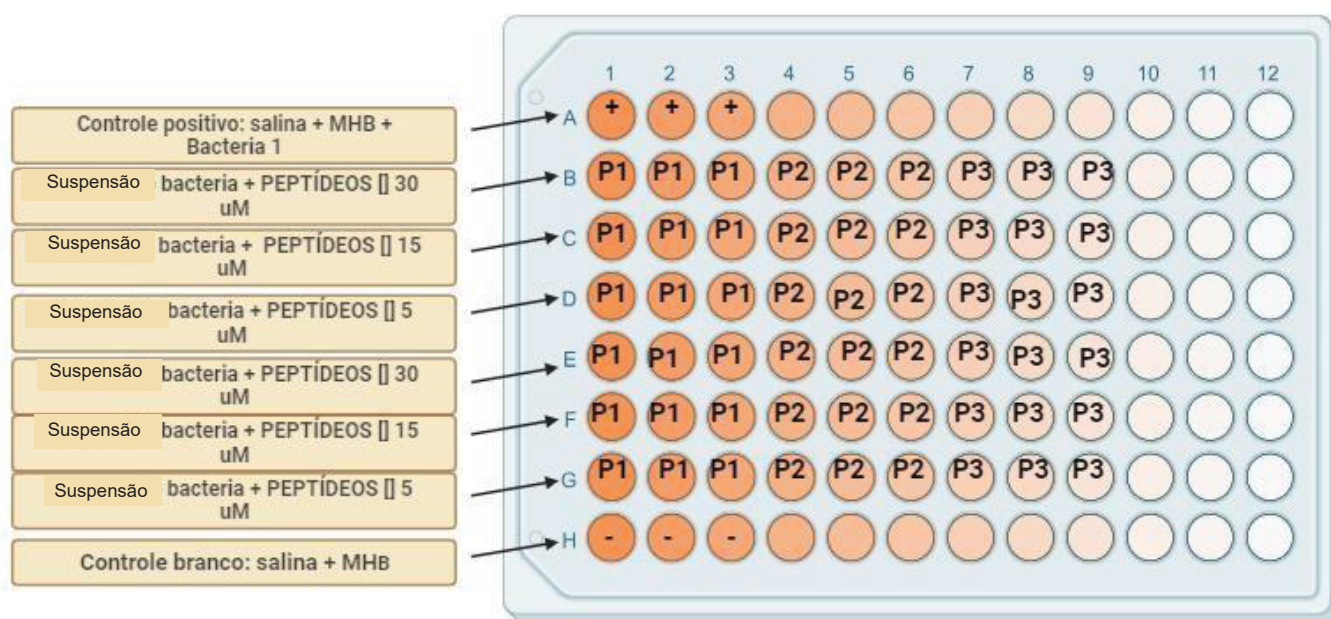
4.3.2 Transplante das sementes germinadas para vasos

Após a germinação das sementes elas foram transplantadas para vasos de 5 x 7 cm, preenchidos com 1:1:1 de terra preparada RIGA SNIKERS, turfa natural GARDEN PLUS e vermiculita DIMY, enterradas com 1 cm de profundidade, e colocadas na BOD com temperatura 30°C, 12 h de luz/dia e umidade controlada. O volume de rega foi feito equivalente 2,5x ao peso do substrato, onde posteriormente foram inoculadas com os 10 organismos patogênicos para ver a resposta de hipersensibilidade HR.

4.4 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA ANTIMICROBIANA DOS PEPTÍDEOS

4.4.1 Ensaio de inibição em Densidade Ótica (D.O. 600)

Ensaio antimicrobianos foram feitos de acordo com HÖNG K et al. (2021). Os organismos testados foram: *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (CMES 2406), *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*: (CMES 1652), *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (CMES 2162). As bactérias foram cultivadas em 5 mL de meio líquido Mueller Hinton durante a noite a 20°C. As culturas foram centrifugadas por 10 minutos a 6026 rcf/ força g e suspensas novamente em triptona a 1% antes do teste. As bactérias foram diluídas para uma D.O. 600 nm de 0,05 em 1% de triptona antes de usá-las para o teste. Os peptídeos, nas concentrações 5, 15 e 30 µM, foram pipetados em 100 µL em uma placa de 96 poços (PS, TC, F-bottom com tampa, Greiner Bio-One) e foram adicionados 100 µL de cultura bacteriana. Para o controle positivo foram pipetados 100 µL de salina e 100 µL de cultura bacteriana (FIGURA 18). Para o branco foram pipetados 100 µL de salina e 100 µL de meio sem bactérias. A D.O. 600 foi medida em um leitor de microplacas. As microplacas foram incubadas no escuro a 30°C e medidas novamente após 1 h até completarem 13 h. Posteriormente foram feitas medidas em 20 h e 24 h. A percentagem de inibição do crescimento foi calculada $[(\text{absorbância controle positivo} - \text{absorbância com tratamento}) / \text{absorbância controle positivo}] \times 100$. Todas as avaliações foram feitas em triplicatas, para cada patógeno e respectivas concentrações de peptídeos gerando um total de 54 amostras para cada bactéria mais 3 amostras controle positivo e 3 amostras controle negativo.

FIGURA 18 – ILUSTRAÇÃO ENSAIO EM MICROPLACA DE 96 POÇOS

Created in BioRender.com

Esquema de como os poços da microplaca foram preenchidos com os organismos e os tratamentos.

Fonte: O autor (2023).

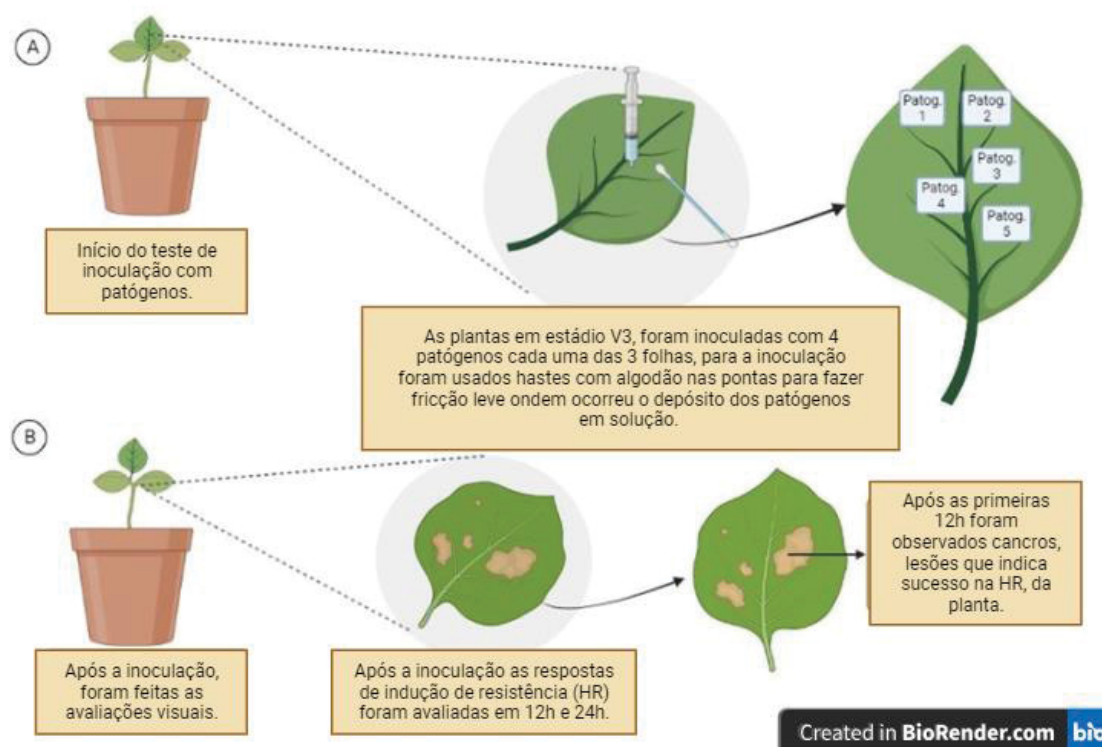
4.4.2 Ensaio em placa de Petri para avaliação por halo de Inibição

O teste de halo de inibição foi realizado em placas descartáveis estéreis, com meio Mueller Hinton Ágar, inoculado com 100 µL de solução bacteriana, para cada uma das três bactérias testadas, contendo 2×10^8 UFC/mL. Nas placas de cada uma das cepas testadas foram dispostos seis discos de papel Germes estéreis, por placa, após a disposição dos discos, foram pipetados 100 µL das soluções dos peptídeos em suas respectivas concentrações, cada placa conteve somente um peptídeo. Foram preparadas em triplicatas, tanto para cada bactéria quando para cada peptídeo.

4.5 ANÁLISE DA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

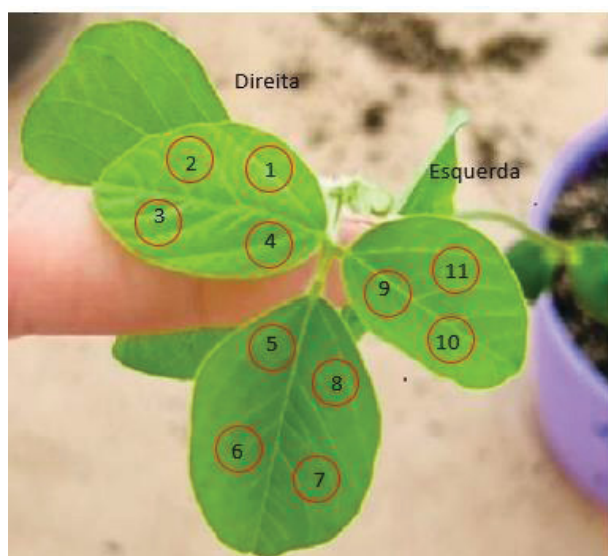
Após a germinação das sementes elas foram transplantadas para vasos de 5 x 7 cm, conforme descrito na figura 17. A inoculação das plantas aconteceu em estágio V2 e V3, simultaneamente com os 10 microrganismos patogênicos (WANG et al. 2007). Foram feitos esfregaços nas folhas de forma suave com hastes flexíveis de algodão estéril nas pontas, posteriormente inoculadas com gotículas dos microrganismos testados. Esses foram preparados do seguinte modo: os esporos de fungos diluídos em meio PDB contendo 2×10^4 esporos/mL, as bactérias foram preparadas em suspensão de salina contendo 2×10^8 UFC/mL (FIGURA 19) (TABELA 8). As plantas inoculadas foram mantidas a 25-30°C em estufa BOD. O desenvolvimento dos sinais, tanto em plantas tratadas e não tratadas, foi avaliado em 24 h e quatro dias após a inoculação para identificar a formação de cancro (morte celular), que mostra os sinais de HR. As folhas foram destacadas para análise. Todos os testes foram feitos em quintuplicata para cada uma das três concentrações de cada peptídeo (FIGURA 19) (WANG et al. 2007).

FIGURA 19- ILUSTRAÇÃO DO TESTE DE RESPOSTA HIPERSENSIVEL HR



Fluxograma de como foi feita a inoculação nas folhas de soja com os patógenos. Fonte: O autor (2023).

TABELA 10 - LOCALIZAÇÃO DO DEPÓSITO DOS MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS NAS FOLHAS DE SOJA



- 1-Salina/branco;
- 2-1643/ *Cercospora* spp;
- 3-1494/ *Corynespora cassicola*;
- 4-1080/ *Colletotrichum truncatum*;
- 5-1871/ *Macrophomina phaseolina*;
- 6-25/ *Neocosmospora phaseoli*;
- 7-2392/ *Sclerotinia sclerotiorum*;
- 8-526/ *Phytophthora sojae*;
- 9-1652/ *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *Flaccumfaciens*;
- 10-2406/ *Pseudomonas savastanoi* pv. *Glycinea*;
- 11-2162/ *Xanthomonas axonopodis* pv. *Glycines*;

Para a inoculação os patógenos foram preparados: fungos diluídos em meio PDB contendo 2×10^4 esporos/mL, bactérias em suspensão de salina contendo 2×10^8 UFC/mL Fonte: O autor (2023).

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA VALIDAR OS RESULTADOS OBTIDOS

Os resultados foram avaliados pelo teste ANOVA de dois fatores e teste de Tukey *post hoc*. Os testes levaram em consideração a comparação de médias entre os tratamentos ao nível de significância 5 % ($\alpha=0,05$) e apontaram as diferenças significativas. Todas as análises estatísticas foram feitas utilizando o *software* Microsoft® Excel® com o suplemento StatPlus.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PROSPECÇÃO DE NOVAS SEQUÊNCIAS PEPTÍDICAS, CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E 3D

As sequências prospectadas em bancos de dados de bioinformática como mencionados no item 4.1.1 e descritas na tabela 8, tiveram as sequências trabalhadas por programas de bioinformática para demonstrar suas características 3D, físico-químicas e teste de membrana, conforme elucidado a seguir, lembrando que todas as sequências analisadas e escolhidas foram aquelas que apresentavam estrutura helicoidal e caráter anfipático, características de peptídeos antimicrobianos e indutores de resistência por atuarem na membrana plasmática das células (CHEN et al., 2007; YANG et al., 2016; SUN et al., 2016; CHEN et al., 2018). As figuras dos peptídeos P4 ao P6 então em anexos na seção ANEXO I.

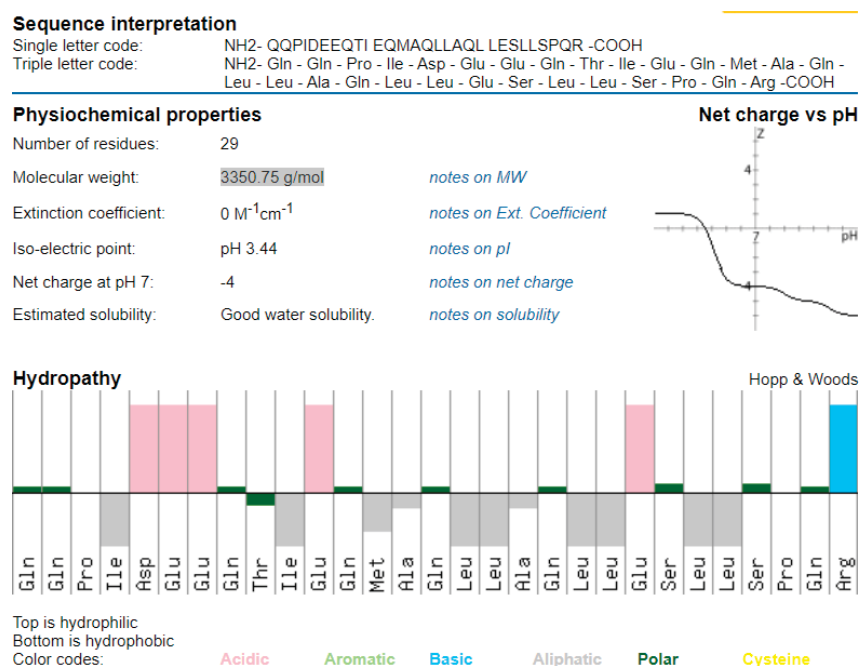
5.1.1 PEPTÍDEO CONTROLE P1 – PRODUTO COMERCIAL SAORI

O peptídeo usado como controle positivo, cuja sequência QQPIDEEQTIEQMAQLLAQLLESLLSPQR foi obtida de proteína harpin da bactéria *Erwinia amylovora*, teve sua sequência testada no site pepcalc.com para mostrar suas características físico-químicas.

A figura 20 gerada pelo PEPCALCULETOR expressa o gráfico teórico da carga total do peptídeo em função do pH da solução. Essa sequência possui carga de -4 em pH 7, a curva teórica mostra o ponto isoelétrico que é 3.44, indica a solubilidade da sequência que é solúvel, um ponto importante para uso do peptídeo na área agrícola e fornece a distribuição dos resíduos hidrofílicos e hidrofóbicos da cadeia peptídica. Os peptídeos antimicrobianos e comumente indutores de resistência, são normalmente formados por aminoácidos hidrofóbicos, hidrofílicos e catiônicos, em grande maioria estes peptídeos são catiônicos com carga líquida +1 a +9, no entanto não é uma regra. Seu arranjo espacial geralmente é anfipático e helicoidal com carga catiônica e uma proporção significativa de resíduos hidrofóbicos, promove seletividade para interações eletrostáticas com as membranas das plantas e de patógenos, facilitando a interação com as cadeias de ácidos graxos, como mostram os estudos

de (Ciumac et al., 2019; Donghyeok, 2019). Por mais que o peptídeo P1, não esteja catiônico ele se comporta como tal, mostrando seu efeito inibitório contra patógenos da soja e indução de resistência.

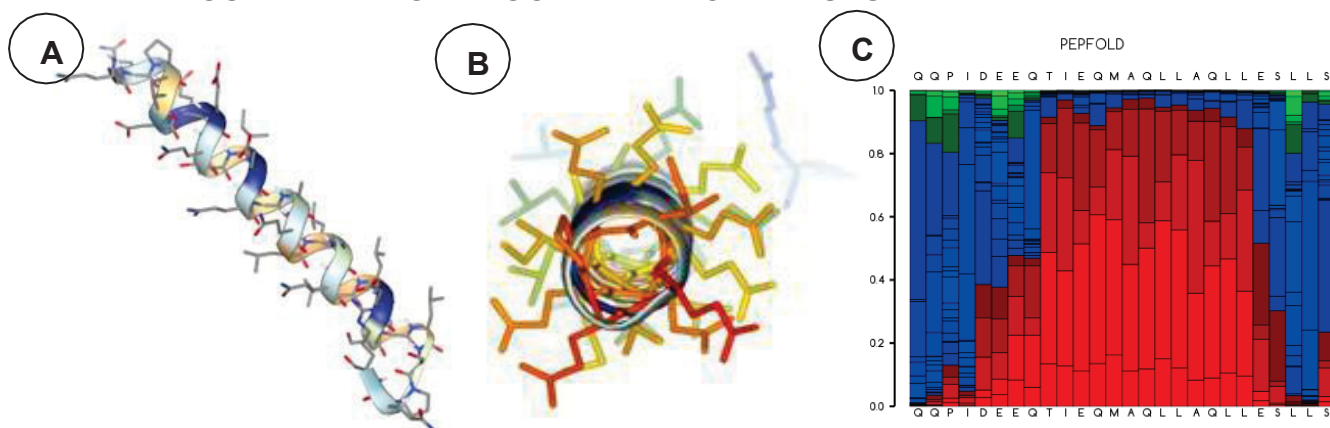
FIGURA 20 - QUADRO DE INFORMAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS DO PEPTÍDEO P1



Fonte: O autor (2023).

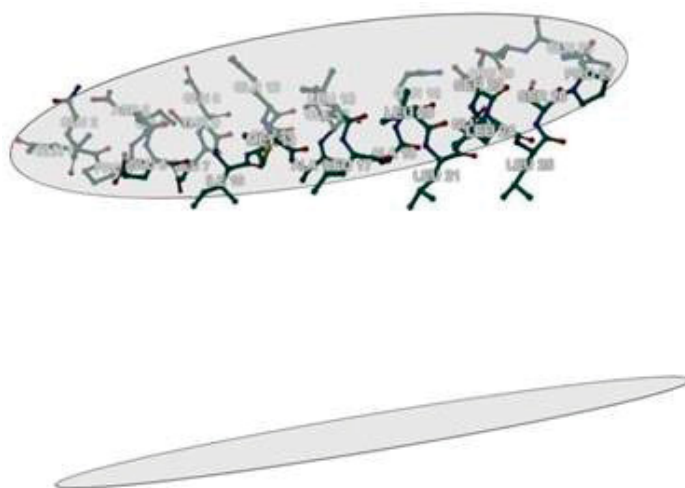
O diagrama em hélice representado na figura 21 mostra a distribuição de resíduos de aminoácidos por posição ao longo de uma estrutura helicoidal. A codificação de cores indica as características dos aminoácidos: hidrofóbicos (amarelo e verde), polar sem carga (rosa e roxo), aminoácidos especiais (cinza), aminoácidos ácidos (vermelho), aminoácidos básicos (azul) pelo servidor heliquet.

FIGURA 22 – MODELO MOLECULAR DO PEPTÍDEO P1, ESTRUTURA SECUNDÁRIA E GRÁFICO ALFABETO ESTRUTURAL



A imagem A – representa a estrutura helicoidal do peptídeo 1. B- Representa a estrutura secundária do peptídeo 1. C- E o gráfico que corresponde as probabilidades de cada Alfabeto Estrutural (SA) - letras SA correspondem a fragmentos de comprimento de 4 resíduos. As representações foram feitas no programa PEP-FOLD3. Fonte: O autor (2023).

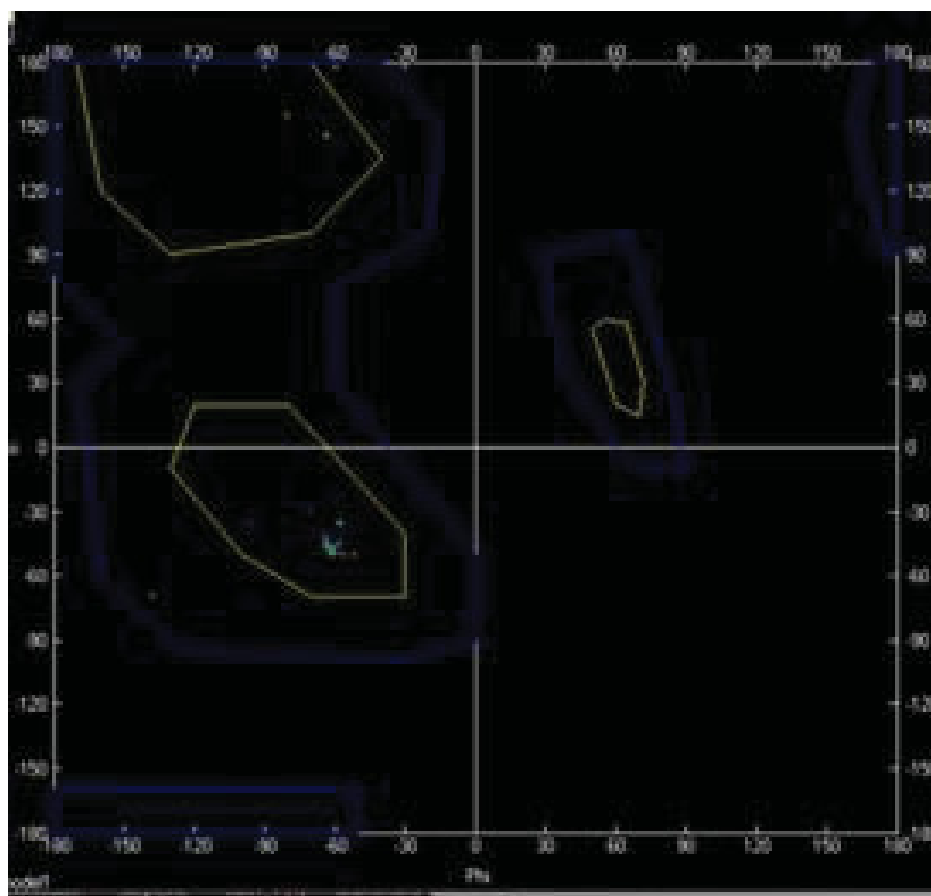
FIGURA 23 – MODELO DE MEMBRANA DO PEPTÍDEO 1



Representação da membrana, o peptídeo P1 ultrapassa parcialmente a membrana, Mol* 3D Viewer data: BCSB-PDB protein data bank. Fonte: O autor (2023).

O diagrama de Ramachandran é uma das ferramentas *in silico* usadas para validação de estruturas tridimensionais geradas a partir de dados de cristalografia de raios-X e de RMN. A análise é feita por comparação dos diagramas de Ramachandran com as simulações de sistemas semelhantes (RAMACHANDRAN et al., 1963). O gráfico de Ramachandran apresentado na Figura 24 foi avaliado quanto a sua qualidade estereoquímica, mostrando que a maioria dos resíduos se encontra em regiões favorecidas ou permitidas, indicando uma boa qualidade das estruturas calculadas. Os poucos resíduos observados em regiões não permitidas são aqueles localizados próximos a extremidade N-terminal, sendo a parte não estruturada do peptídeo em α -hélice, porém com pouca estabilidade. A combinação dos ângulos diedros ϕ e ψ foram um importante indicador de qualidade estrutural para o peptídeo, pois baseando-se em considerações estéricas por (Ramachandran, Ramakrishnan, & Sasisekharan, 1963), mostraram que a combinação dos ângulos ϕ e ψ dos resíduos de aminoácidos em uma cadeia polipeptídica está restrita a certos intervalos, podendo ser visualizados no chamado gráfico de Ramachandran. Gráfico foi feito no programa SWISS-MODEL e Swiss-PdbViewer. O gráfico de Ramachandran, para as seis estruturas obtidas (Figura 24 e ANEXO I), mostrou que a família das estruturas calculadas apresenta boa qualidade, pois mais de 85% dos ângulos ϕ e ψ se localizaram em regiões favorecidas, características de α -hélice de sentido horário, ou seja, apresentam conformações sem impedimento estérico. O peptídeo assume conformações energeticamente favoráveis, ou seja, o modelo não possui ligações peptídicas com ângulos de torção incompatíveis com a estrutura. Como mostram estudos feitos por (HALE & HANCOCK, 2007).

FIGURA 24 - GRÁFICO DE RAMACHANDRAN PEPTÍDEO P1



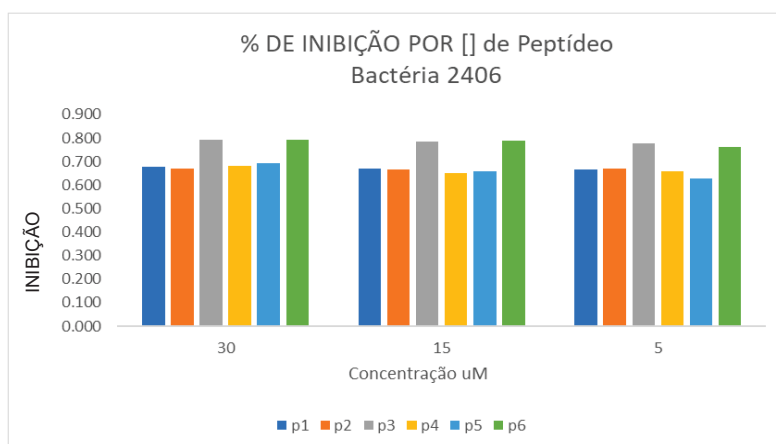
Legenda: As áreas circuladas em amarelo indicam conformações sem impedimento estérico e são denominadas de regiões favorecidas; as regiões circuladas em azul indicam conformações menos estáveis, com aproximação de átomos; e a região em preto indica estruturas pouco flexíveis, conforme o programa Swiss-PdbViewer. Fonte: O autor (2023).

5.2 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA ANTIMICROBIANA DOS PEPTÍDEOS

5.2.1 ENSAIO DE INIBIÇÃO POR DO₆₀₀

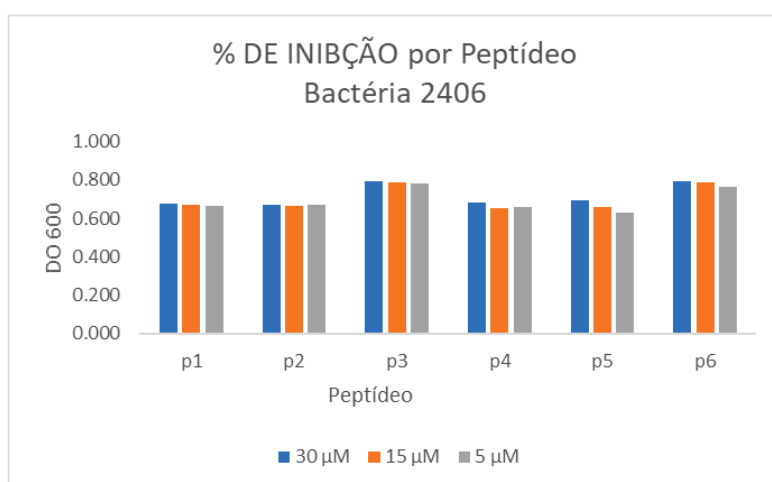
Os testes de inibição para a bactéria 2406 com os peptídeos P1, P2, P3, P4, P5 e P6, estão representados no gráfico abaixo (FIGURAS 25 e 25.1). O peptídeo P1, foi usado como controle positivo e base comparativa dos testes.

FIGURA 25 – HISTOGRAMA DE INIBIÇÃO DA BACTÉRIA 2406 POR CONCENTRAÇÃO



Fonte: O autor (2023).

FIGURA 25.1 – HISTOGRAMA DE INIBIÇÃO DA BACTÉRIA 2406 POR PEPTÍDEO

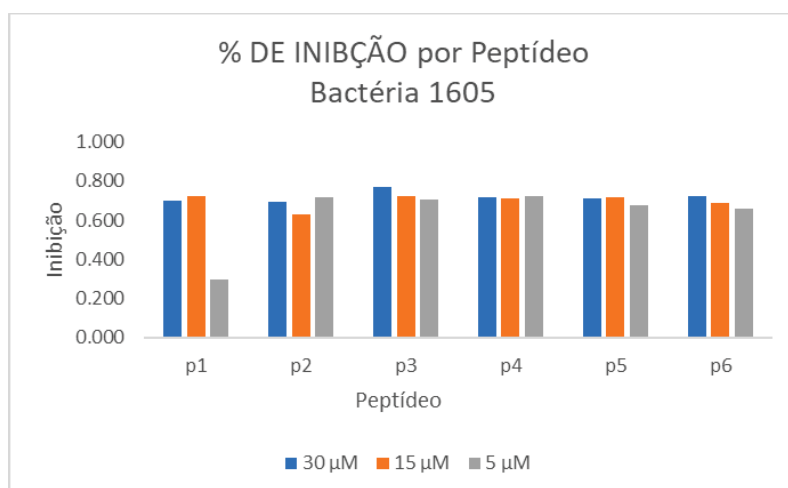


Fonte: O autor (2023).

Foi observado efeito inibitório em todos os microrganismos testados em todos os tratamentos com peptídeos e concentrações. Para o peptídeo P1 testado contra a bactéria *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* 2406, o maior percentual de inibição foi na concentração 30 µM com 67.7%, na concentração 15 µM foi de 67.2% e com a concentração 5 µM, 66.7%. Os testes realizados para o peptídeo mutante denominado de P2, nas três concentrações e avaliando atividade antimicrobiana, mostraram inibição acima de 65%, nas três concentrações testadas. Para o peptídeo mutante P3, as três concentrações 30, 15, e 5 µM apresentou inibição acima de 75%. Para os peptídeos P4, P5, as três concentrações 30, 15, 5 µM, apresentaram inibição acima de 65%. A exceção foi para o P5 na concentração de 5 µM que inibiu em 62% na concentração 5 µM. Para o peptídeo P6, as três concentrações 30, 15, e 5 µM apresentaram inibição acima de 70%.

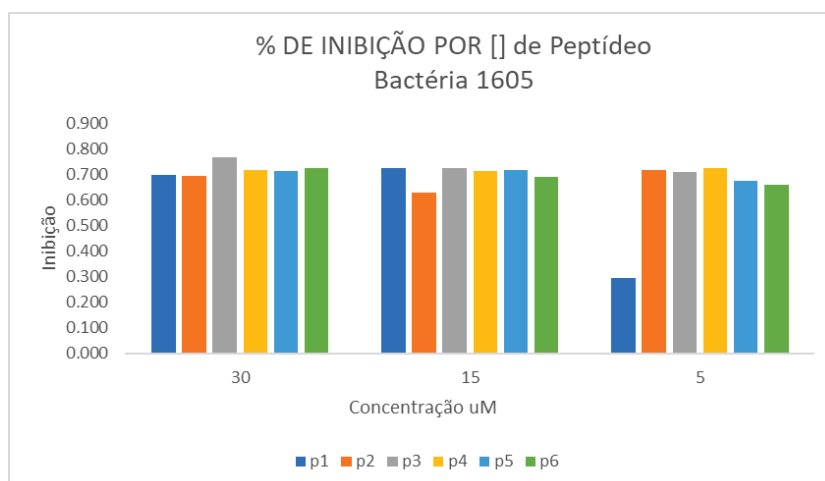
Os testes de inibição para a bactéria 1652 com os peptídeos P1, P2, P3, P4, P5 e P6, estão representados no gráfico abaixo (FIGURAS 26 e 26.1). O peptídeo P1, foi usado como controle positivo, foi usado como base comparativa dos testes.

FIGURA 26 – HISTOGRAMA DE INIBIÇÃO DA BACTÉRIA 1652 POR PEPTÍDEO



Fonte: O autor (2023).

FIGURA 26.1 – HISTOGRAMA DE INIBIÇÃO DA BACTÉRIA 1652 POR CONCENTRAÇÃO



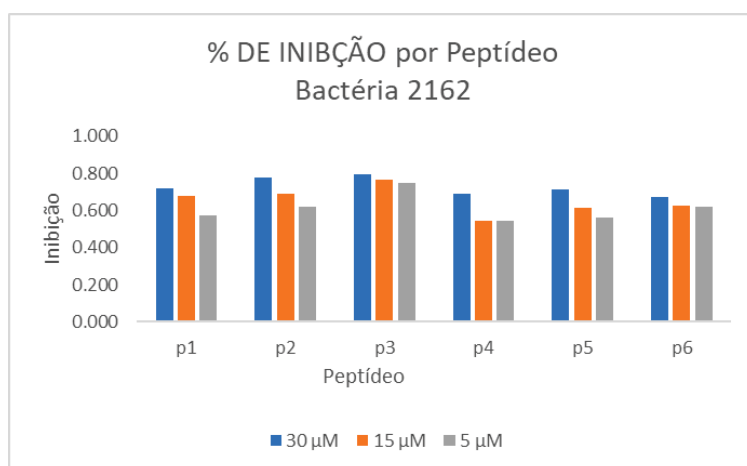
Fonte: O autor (2023).

Foi observado efeito inibitório em todos os microrganismos testados em todos os tratamentos com peptídeos e concentrações. Para a bactéria *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* 1652, a inibição em 30 µM foi de 69.9%, na concentração 15 µM foi de 72.4% e na concentração de 5 µM foi de 29.4%; para esta

bactéria a menor concentração não teve efeito inibitório significativo. Os testes realizados para o peptídeo mutante denominado de P2, nas três concentrações e avaliando atividade antimicrobiana, mostraram inibição acima de 65% para as concentrações 30 μ M e 5 μ M, e de 62% para 15 μ M. Esta variação pode ser explicada por erro de pipetagem ou leitura imprecisa do aparelho. Para o peptídeo mutante P3, as três concentrações 30, 15, e 5 μ M apresentaram inibição acima de 70%. Para os peptídeos P4 e P5, as três concentrações 30, 15, 5 μ M, para as três bactérias, apresentaram inibição acima de 70%. Para o peptídeo P6, na concentração 30 μ M, a inibição foi de 72% e nas concentrações 15, e 5 μ M foi acima de 65%. De acordo com o teste estatístico o fator Scheffe fator concentração não teve efeito significativo quando comparados peptídeos e concentrações com um $P>0.05$ para o gráfico inibição por concentração de peptídeo (FIGURA 26.1).

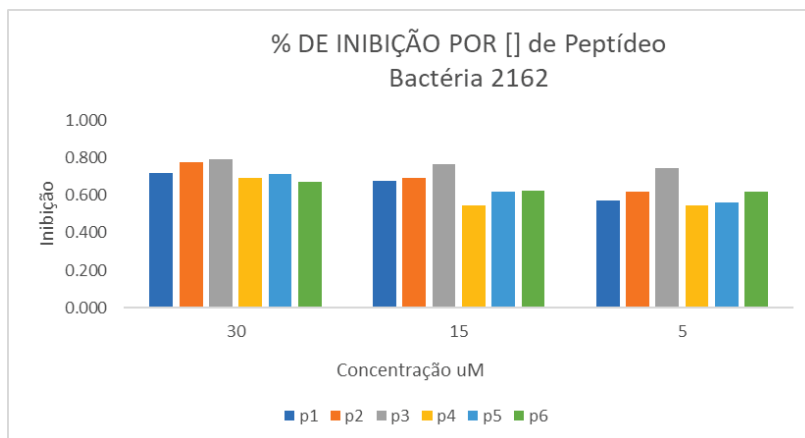
Os testes de inibição para a bactéria 2162 com os peptídeos P1, P2, P3, P4, P5 e P6, estão representados no gráfico abaixo (FIGURAS 27 e 27.1). O peptídeo P1, foi usado como controle positivo, foi usado como base comparativa dos testes.

FIGURA 27 – HISTOGRAMA DE INIBIÇÃO DA BACTÉRIA 2162 POR PEPTÍDEO



Fonte: O autor (2023).

FIGURA 27.1 – HISTOGRAMA DE INIBIÇÃO DA BACTÉRIA 2162 POR CONCENTRAÇÃO



Fonte: O autor (2023).

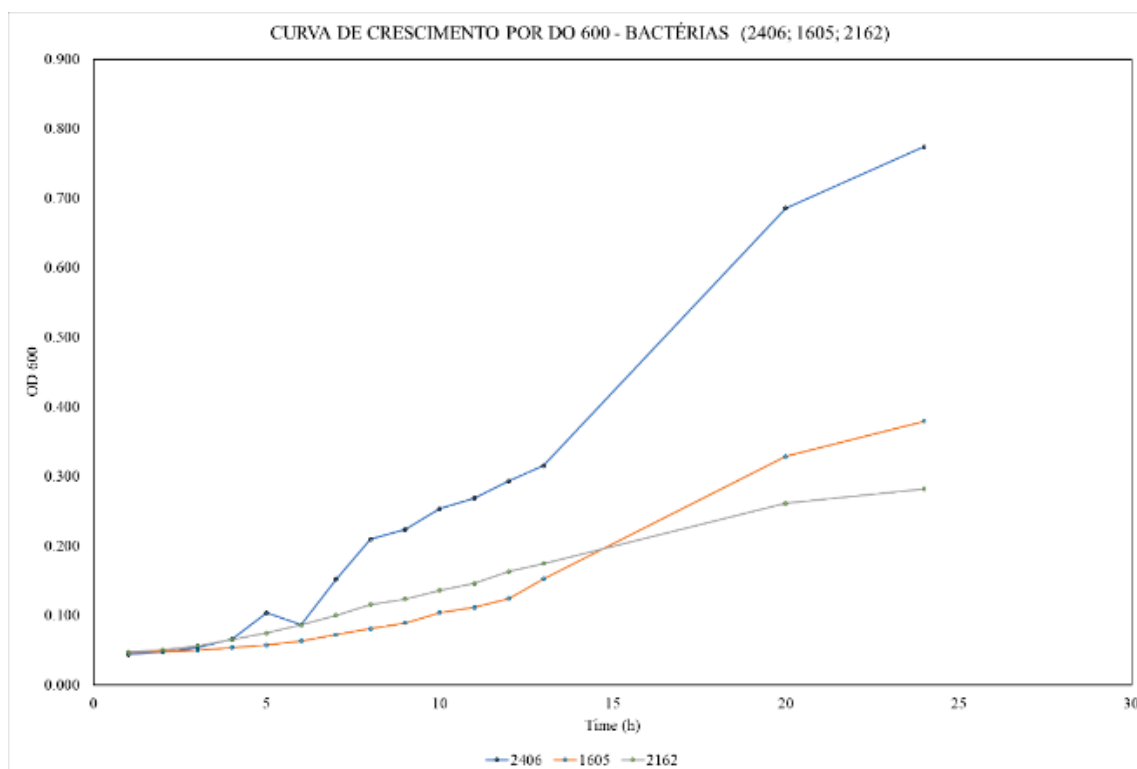
Para o peptídeo P1 para a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* 2162, os percentuais de inibição foram 71.9% para a concentração 30 μ M, 67.7% para a concentração 15 μ M e 57.4% para a concentração 5 μ M. Para uso como produto comercial no controle de bactérias na agricultura, a concentração 5 μ M não foi satisfatória. Os testes realizados para o peptídeo mutante denominado de P2, nas três concentrações e avaliando atividade antimicrobiana, mostraram inibição de 77% para concentração 30 μ M, 69% para 15 μ M e de 61% para 5 μ M, para uso como produto comercial no controle de bactérias na agricultura, a concentração 5 uM não foi satisfatória. Para o peptídeo mutante P3, as três concentrações 30, 15, e 5 μ M para as três bactérias apresentaram inibição acima de 70%. Para os peptídeos P4, P5 e P6, as três concentrações 30, 15, 5 μ M, apresentaram inibição acima de 65%. Com as exceções, P4 inibiu 54.6% e P5 inibiu 61.7% para a concentração 15uM; P6 na concentração 5 μ M inibiu 62.6%. Quanto ao P4, induziu inibição de 54.4%, enquanto para P5 foi de 56.4% na concentração 5 μ M. E para o P6 a inibição foi de 61.8%, na concentração 5 μ M. Para o gráfico inibição por concentração de peptídeo, de acordo com o teste estatístico o fator Scheffe fator concentração teve efeito significativo quando comparado entre os peptídeos p1 vs p3; p3 vs p6; p3 vs p5; p3 vs p4; p4 vs p5; p2 vs p4 e d 30 uM e 5uM, com um $P < 0.02$ (FIGURA 27.1).

Desta forma, foram obtidas inibições acima de 65% para todas as bactérias na concentração 30 μ M, o que mostra o potencial dos peptídeos para o controle das doenças causadas por bactérias na soja. Os dados de cada teste em suas respectivas bactérias foram analisados no programa de estatística do excel StarPlus com nível de significância de 95%. Para a bactéria 2406, a ANOVA confirma que houve variação

no fator 1 concentração com $P < 0.02$ e para o fator 2 peptídeos $P < 0.01$. Para a bactéria 1652, a ANOVA confirma que não houve variação no fator 1 (concentração) com $P > 0.05$. Para a bactéria 2152, a ANOVA confirma que houve variação no fator 1 concentração com $P < 0.02$ e para o fator 2 peptídeos $P < 0.01$. A taxa de inibição observada para as três bactérias é de grande interesse pois a inibição de bactérias Gram-negativas desta classe de AMPs são satisfatórias de acordo com (GARCIA OLMEDO et al., 2001). Os fitopatógenos avaliados afetam culturas comerciais significativamente. Contudo, houve peptídeos com mais seletividade de inibição para uma bactéria específica (1652) como mostrou as análises, esta especificidade dos peptídeos por determinado patógeno já foi descrita e caracterizada por (REDDY et al., 2004). A utilização de AMPs como ingredientes ativos em defensivos agrícolas apresenta potencial promissor para combater esses patógenos, assim como outros de relevância econômica. Além disso, é importante notar que vários AMPs podem agir de maneira cooperativa ou cumulativa conforme observado por (GIACOMETTI et al., 2005), e diferentes peptídeos presentes em frações enriquecidas podem atuar em conjunto, demonstrando maior eficácia inibitória no controle de determinadas doenças vegetais.

O estudo da curva de crescimento das bactérias *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* 2406, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* 1652 e *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* 2162 foi realizado por leitura de densidade ótica 600 nm. Nesta metodologia o dado de inibição que se torna atrativo para fins agrícolas é a partir de 65% de inibição (EMBRAPA, 2023), comparando os tratamento com e sem peptídeo, a fim de avaliar se houve inibição no crescimento das bactérias. Nas FIGURAS 24 são comparadas as cinéticas de crescimento bacteriano das estirpes 2406, 1652 e 2152.

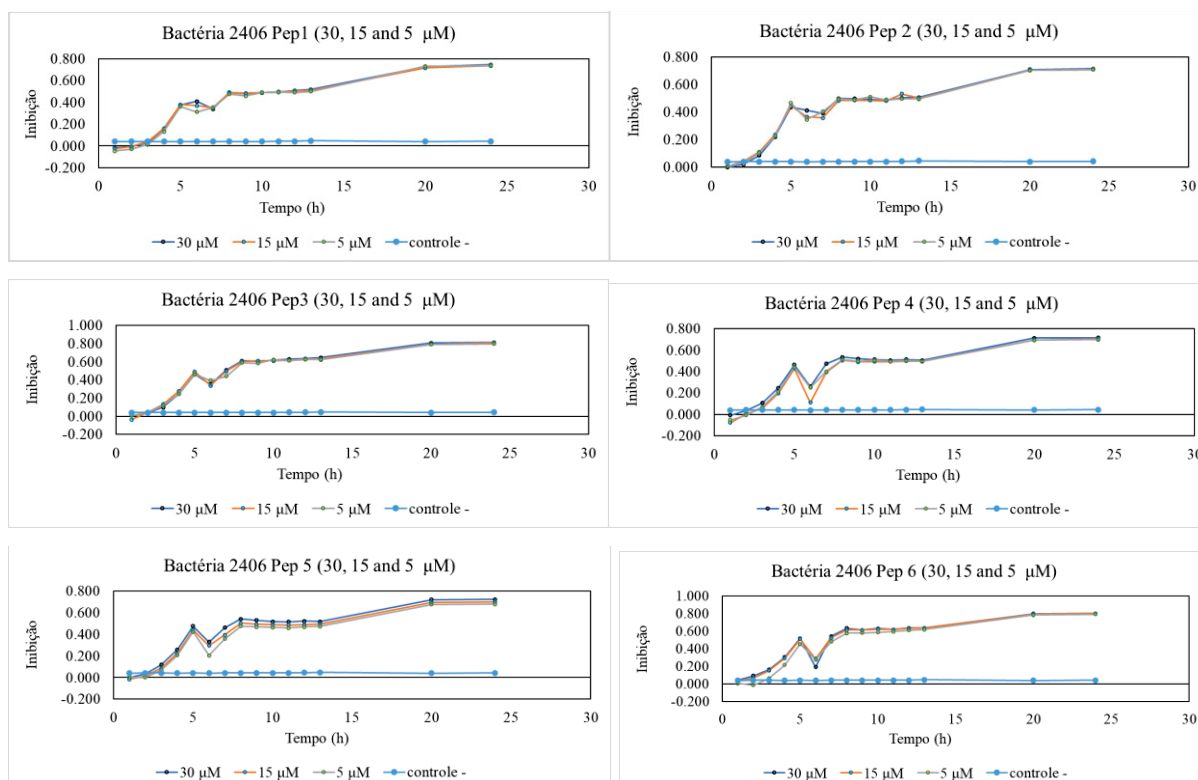
FIGURA 24 - CURVA PADRÃO DO CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS 2406, 1652 e 2152



Fonte: O autor (2023).

O ensaio realizado para testar o poder de inibição de *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* da estirpe 2406 mostrou que os diferentes peptídeos possuem ação inibitória sendo na maioria das vezes dose dependente a seguir as figuras serão enumeradas como: (FIGURAS 28, 29 E 29,1). De acordo com o teste estatístico de *Scheffe* os fatores peptídeo e concentração tiveram efeito significativo quando comparados entre as concentrações e peptídeos, p1 vs p3; p1 vs p6; p2 vs p3; p2 vs p6; p3 vs p4; p3 vs p5; p4 vs p6; p5 vs p6, com um $P < 0.02$.

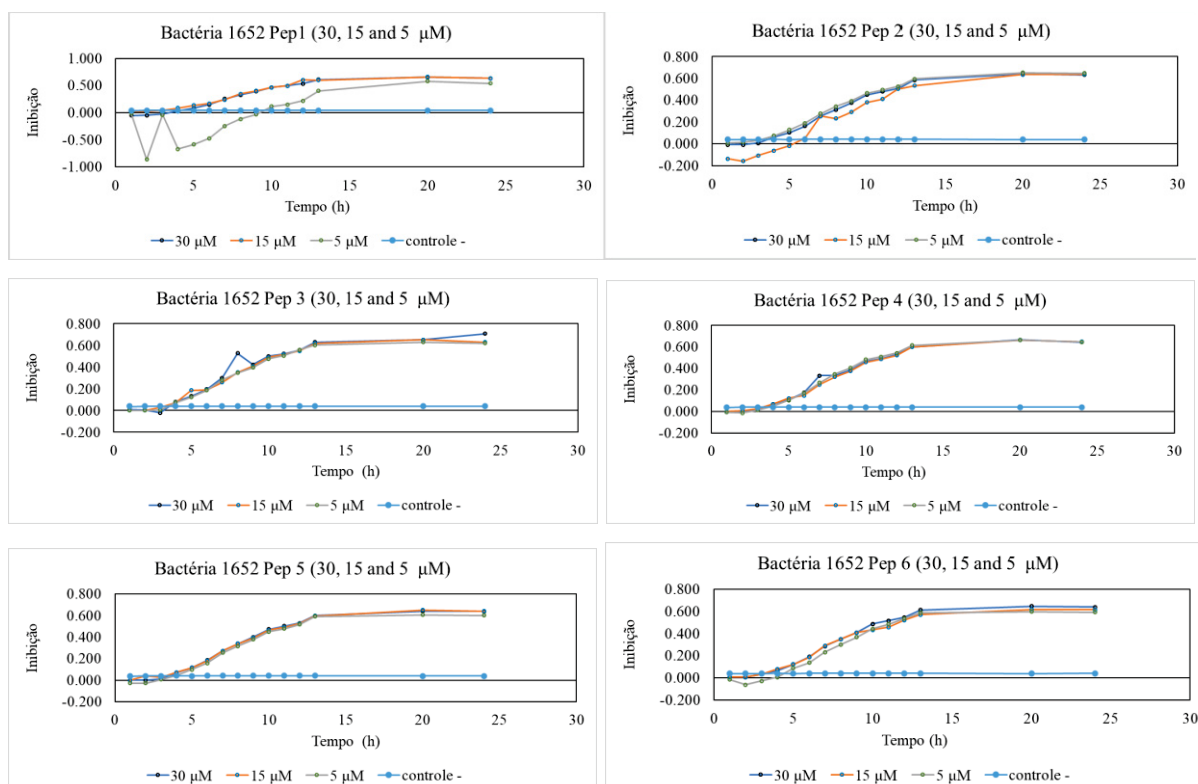
FIGURA 28 – CURVA DE INIBIÇÃO DA BACTÉRIA 2406 PARA CADA PEPTÍDEO EM TODOS OS PONTOS DE COLETA



Fonte: O autor (2023).

No ensaio para testar a atividade inibitória dos peptídeos frente a *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* estirpe 1652 verificou-se inibição nas concentrações de 15 e 30 μM com exceção do P1 (FIGURA 28).

FIGURA 29 – CURVA DE INIBIÇÃO DA BACTÉRIA 1652 PARA CADA PEPTÍDEO EM TODOS OS PONTOS DE COLETA

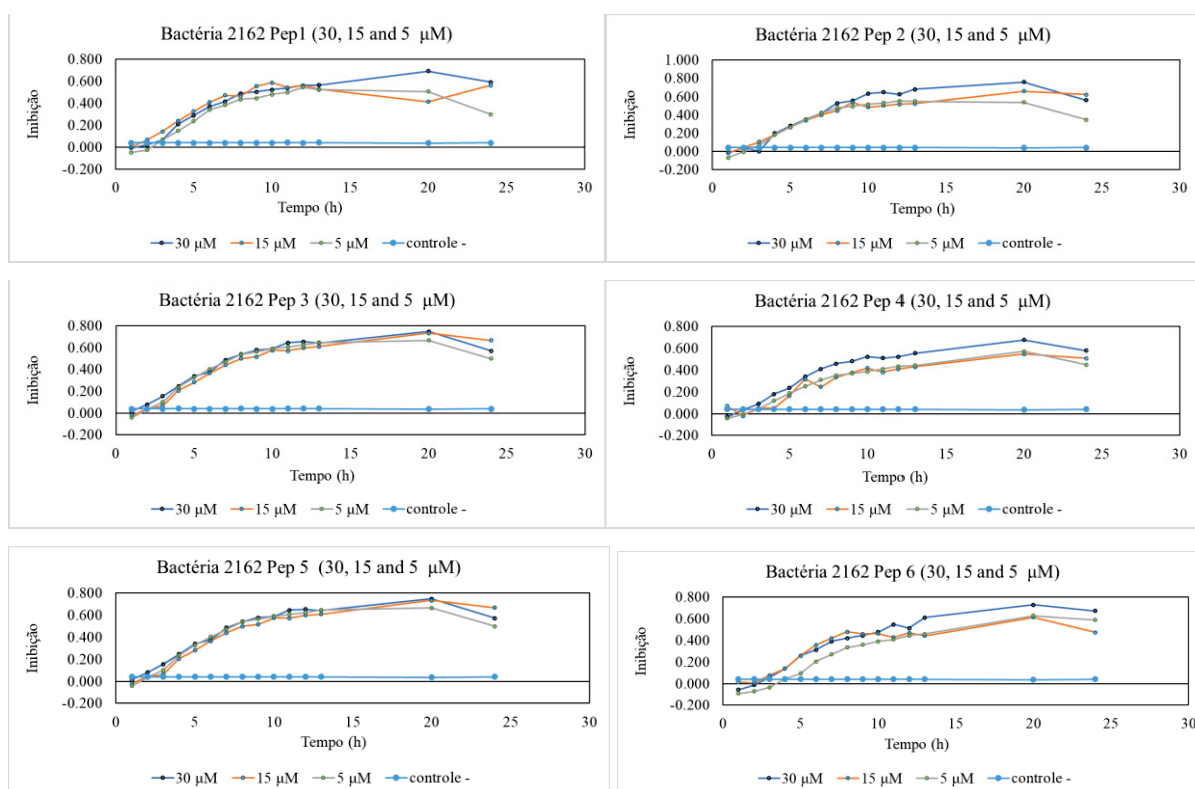


Fonte: O autor (2023).

De acordo com o teste estatístico de Scheffe os fatores peptídeo e concentração não tiveram efeito significativo quando comparados entre as concentrações e peptídeos com um $P < 0.05$. Comparação de concentração do peptídeo também demonstrou significância quando comparado 5 e 15 μM ; 5 e 30 μM com $P < 0.05$.

Para o ensaio com *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* estirpe 2162 o tempo de melhor atividade foi entre 10 e 20 horas (FIGURA 30).

FIGURA 30 – CURVA DE INIBIÇÃO DA BACTÉRIA 2162 PARA CADA PEPTÍDEO EM TODOS OS PONTOS DE COLETA



Fonte: O autor (2023).

De acordo com o teste estatístico de *Scheffe* os fatores peptídeo e concentração tiveram relevância quando comparados entre as concentrações e peptídeos, com um $P < 0.02$

5.2.2 ENSAIO POR HALO DE INIBIÇÃO

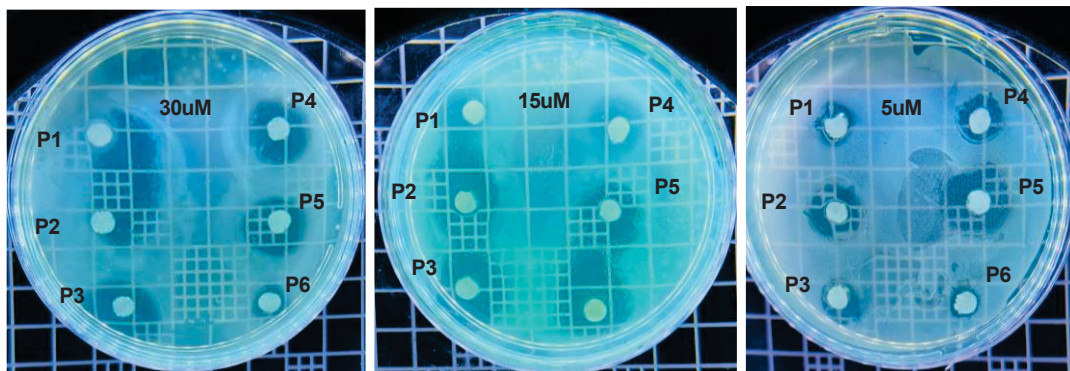
Os seis peptídeos sintetizados foram submetidos a testes de inibição em placa com os microrganismos: *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* 2406, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* 1652; *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* 2162. Os resultados são mostrados na TABELA 9 e FIGURAS 30, 30.1 até 30.8. Em todos os testes houve formação de halo de inibição, independentemente da concentração usada, validando em segunda etapa o teste de inibição feito por DO_{600} . Os dados de cada teste foram analisados no programa de estatística do excel StarPlus com nível de significância de 95%. Para a bactéria 2406 a ANOVA confirma que não houve variação no fator 1 concentração com $P > 0.05$ e para o fator 2 peptídeos $P > 0.05$. Para a bactéria 1652 a ANOVA confirma que houve variação no fator 1 concentração dos peptídeos com $P < 0.02$ e no fator 2 peptídeos $P < 0.02$. Para a bactéria 2152 a ANOVA confirma que não houve variação no fator 1 concentração com $P > 0.05$ e para o fator 2 peptídeos $P > 0.05$.

TABELA 10 – SENSIBILIDADE DOS MICRORGANISMOS FRENTE AOS PEPTÍDEOS TESTADOS

PRESENÇA (+) E AUSÊNCIA (-) DE HALO DE INIBIÇÃO						
Bactérias	2406; 1652; 2162					
Horas	12			24		
□	30 uM	15 uM	5 uM	30 uM	15 uM	5 uM
Peptídeos						
P1	+	+	+	+	+	+
P2	+	+	+	+	+	+
P3	+	+	+	+	+	+
P4	+	+	+	+	+	+
P5	+	+	+	+	+	+
P6	+	+	+	+	+	+

Fonte: O autor (2023).

FIGURA 29 – HALO DE INIBIÇÃO *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*2406

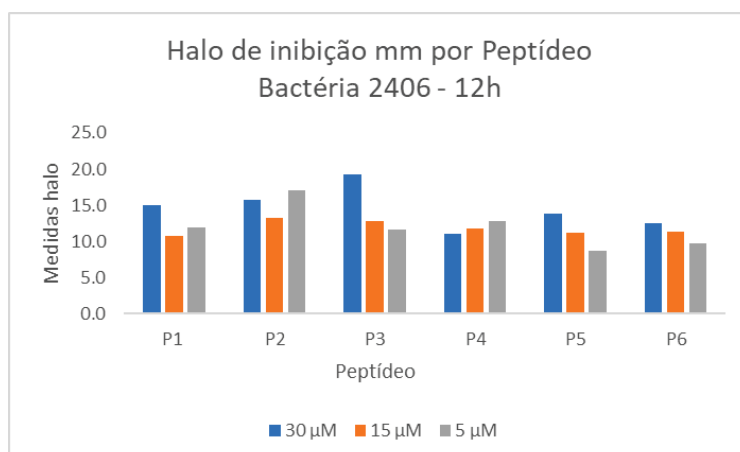


Legenda: avaliação em 12h; Fonte: O autor (2023).

- ANÁLISE GRÁFICA DOS HALOS DE INIBIÇÃO

De acordo com o teste estatístico de *Scheffe* os fatores peptídeo e concentração tiveram significância quando comparados entre as concentrações e peptídeos, $P < 0.02$.

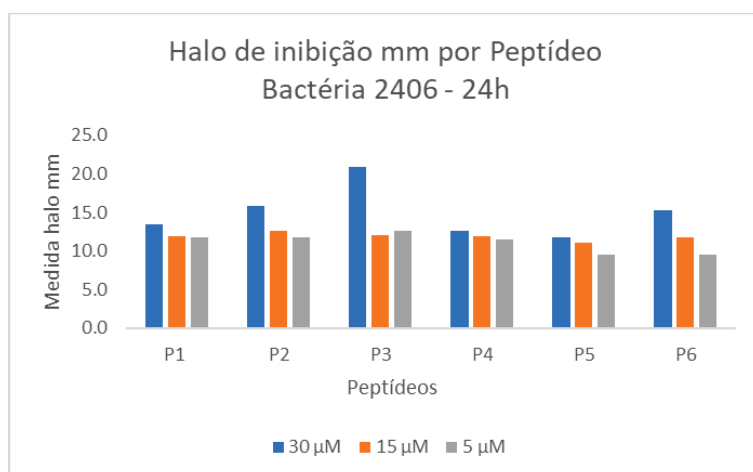
FIGURA 29.1 – HISTOGRAMA DE FORMAÇÃO DO HALO DE INIBIÇÃO EM MILÍMETROS PARA BACTÉRIA 2406 APÓS 12 h



Fonte: O autor (2023).

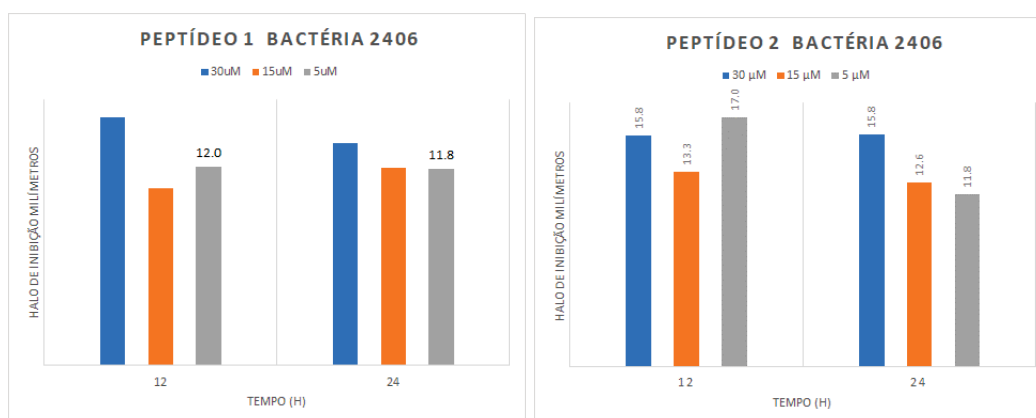
De acordo com o teste estatístico de *Scheffe* os fatores peptídeo e concentração tiveram significância quando comparados entre as concentrações e peptídeos $P < 0.02$ (FIGURA 29.2).

FIGURA 29.2 – HISTOGRAMA DE FORMAÇÃO DO HALO DE INIBIÇÃO EM MILÍMETROS PARA BACTÉRIA 2406 APÓS 24h



Fonte: O autor (2023).

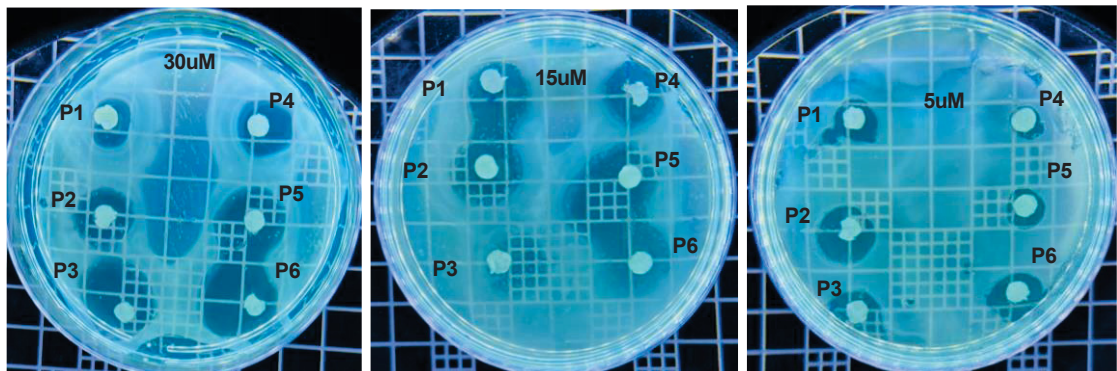
FIGURA 29.3 – HISTOGRAMA DE FORMAÇÃO DO HALO DE INIBIÇÃO EM MILÍMETROS POR PEPTÍDEO APÓS 12h E 24h PARA BACTÉRIA 2406





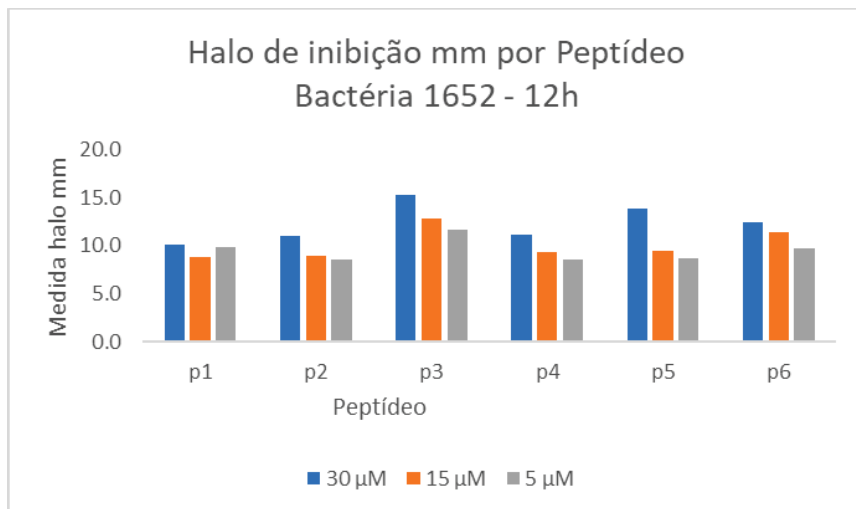
Fonte: O autor (2023).

FIGURA 30 – HALO DE INIBIÇÃO *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* 1652 APÓS 12h



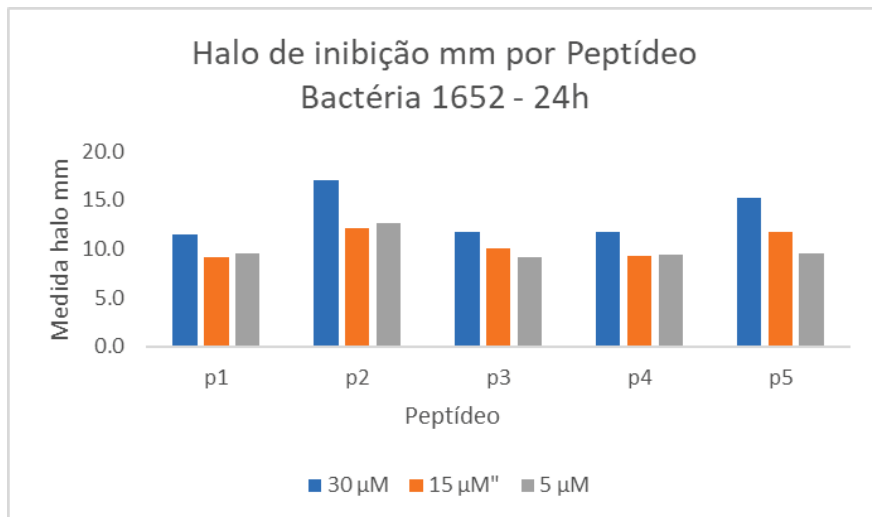
Fonte: O autor (2023).

FIGURA 30.1 - HISTOGRAMA DE FORMAÇÃO DO HALO DE INIBIÇÃO EM MILÍMETROS PARA BACTÉRIA 1652 APÓS 12 h



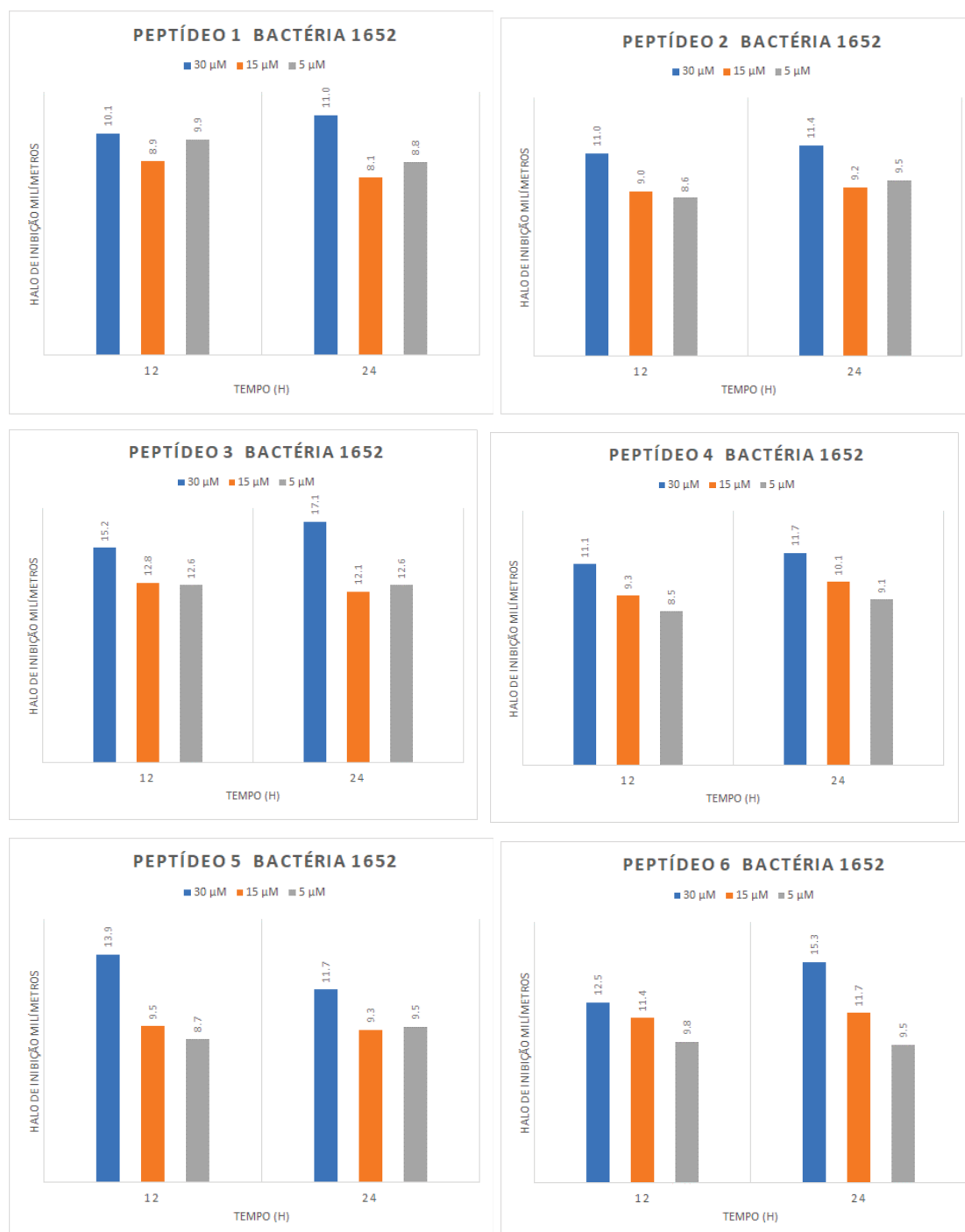
Fonte: O autor (2023).

FIGURA 30.2 - HISTOGRAMA DE FORMAÇÃO DO HALO DE INIBIÇÃO EM MILÍMETROS PARA BACTÉRIA 1652 APÓS 24h



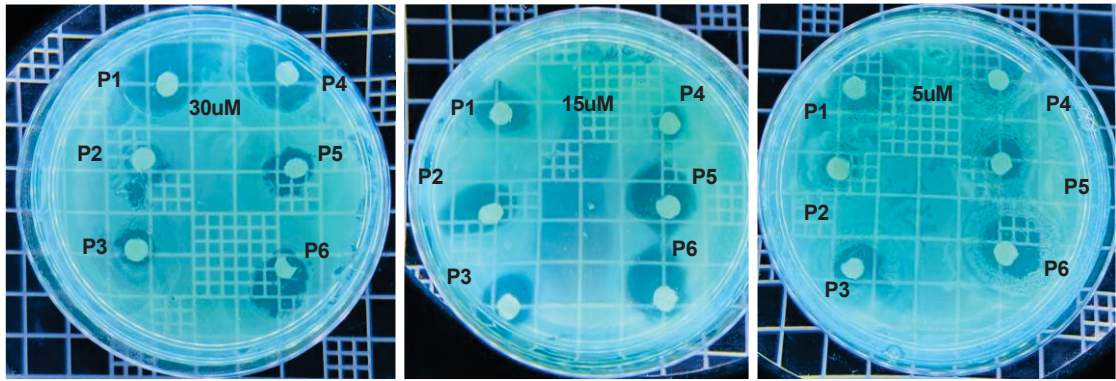
Fonte: O autor (2023).

FIGURA 30.3 - HISTOGRAMA DE FORMAÇÃO DO HALO DE INIBIÇÃO EM MILÍMETROS POR PEPTÍDEO APÓS 12h E 24h PARA BACTÉRIA 1652



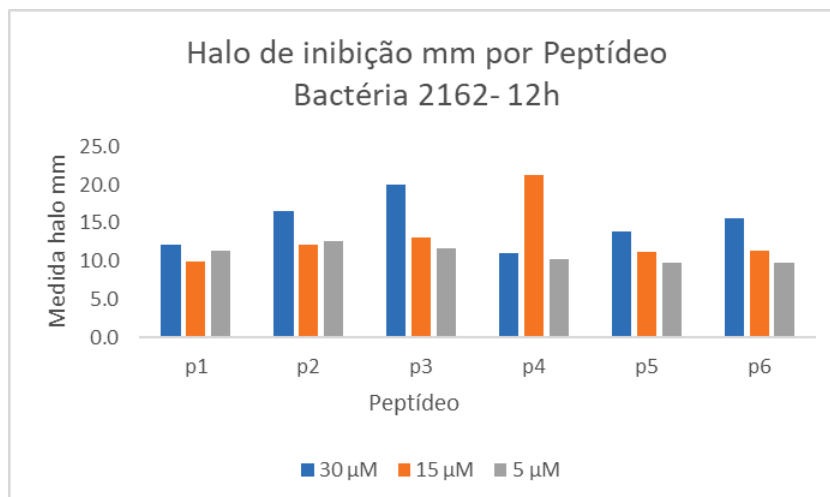
O autor (2023).

FIGURA 30.4 – HALO DE INIBIÇÃO *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* 2162 APÓS 12h



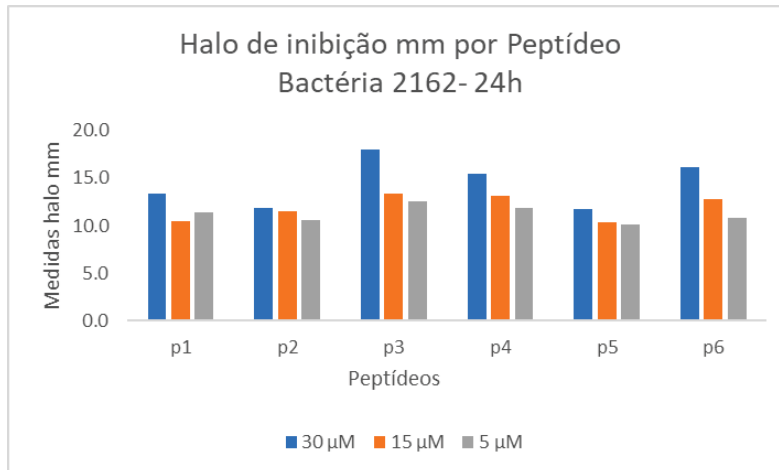
Fonte: O autor (2023).

FIGURA 30.5 - HISTOGRAMA DE FORMAÇÃO DO HALO DE INIBIÇÃO EM MILÍMETROS PARA BACTÉRIA 2152 APÓS 12 h



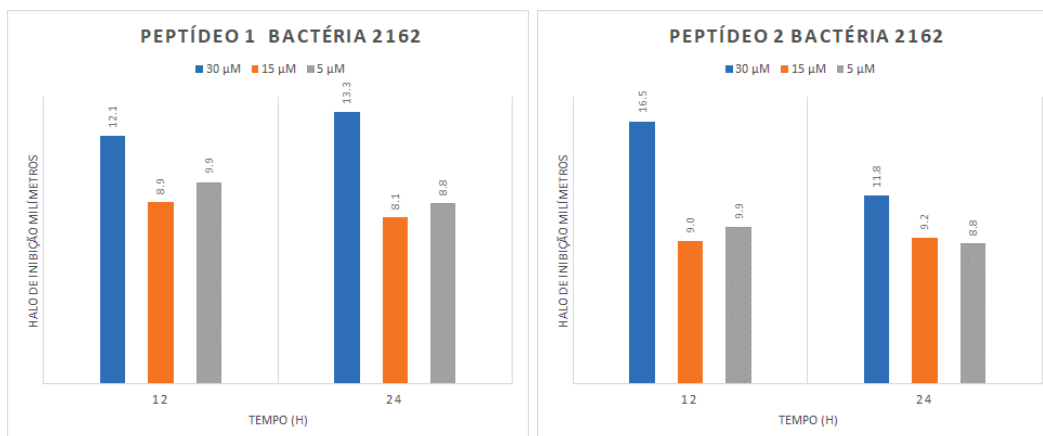
Fonte: O autor (2023).

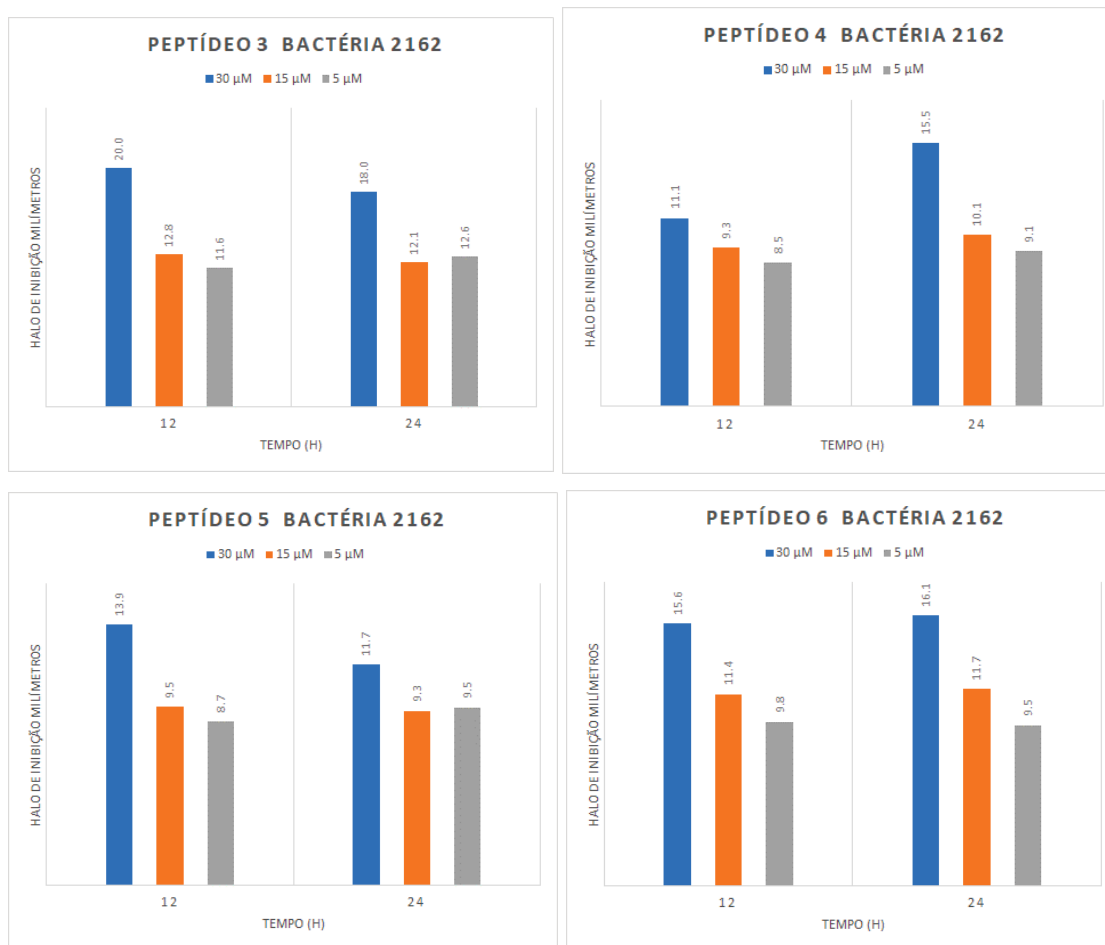
FIGURA 30.6 - HISTOGRAMA DE FORMAÇÃO DO HALO DE INIBIÇÃO EM MILÍMETROS PARA BACTÉRIA 2152 APÓS 24h



Fonte: O autor (2023).

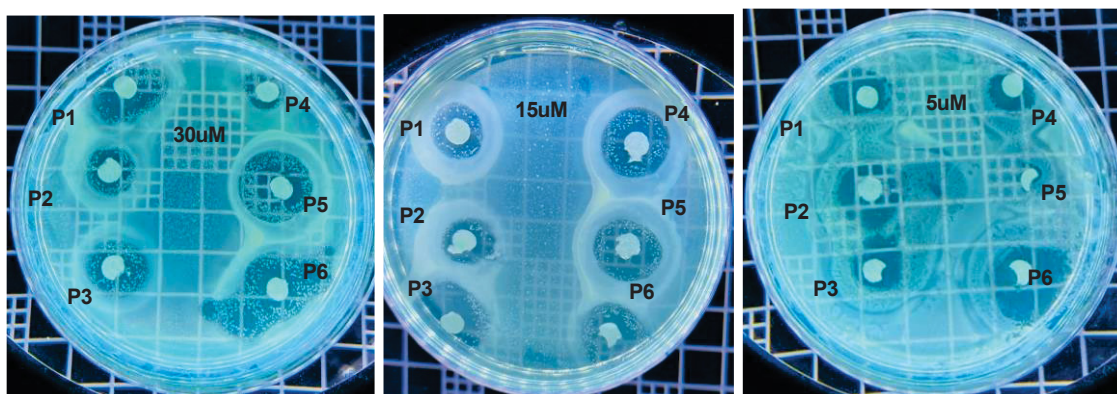
FIGURA 30.7 - HISTOGRAMA DE FORMAÇÃO DO HALO DE INIBIÇÃO EM MILÍMETROS POR PEPTÍDEO APÓS 12h E 24h PARA BACTÉRIA 2152





Legenda: avaliação em 12h; Fonte: O autor (2023).

FIGURA 31 – HALO DE INIBIÇÃO bactérias 2406, 1652 e 2152 APÓS 24h



Fonte: O autor (2023).

Nos últimos anos estudos têm evidenciado a capacidade de peptídeos em restringir o crescimento de diferentes fitopatógenos (Wang et al., 2004; Cruz et al., 2010; Asano et al., 2013; Wu et al., 2013). Por exemplo, estudos demonstraram que a defensina NaD1, isolada de *Nicotiana alata*, inibiu cerca de 50% do crescimento dos

fungos *F. oxysporum* e *Leptosphaeria maculans* a uma concentração de 1 μ M, enquanto os fungos *Thielaviopsis basicola*, *Verticillium dahliae* e *Aspergillus nidulans* tiveram seu crescimento inibido em 65%. Quando a concentração da defensina foi aumentada para 5 μ M, o crescimento dos fungos filamentosos foi reduzido em mais de 90% (VAN DER WEERDEN et al. 2008).

Por outro lado, resultados obtidos por Yang et al. (2006) revelaram que uma lipoproteína (LTP) extraída de sementes de *Leonurus japonicus Houtt* (LjAMP2) exibiu atividade antimicrobiana contra diversos fungos e bactérias, mas não inibiu o patógeno *Agrobacterium radiobacter*. Essas descobertas sugerem que os peptídeos antimicrobianos (AMPs) apresentam ação variável em relação à concentração, ao tipo de peptídeo e ao microrganismo em análise.

Logo, conclui-se que os peptídeos selecionados tem grande potencial para controle de bactérias patogênicas da cultura da soja, sendo assim uma alternativa aos agroquímicos.

5.3 ANÁLISE DA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

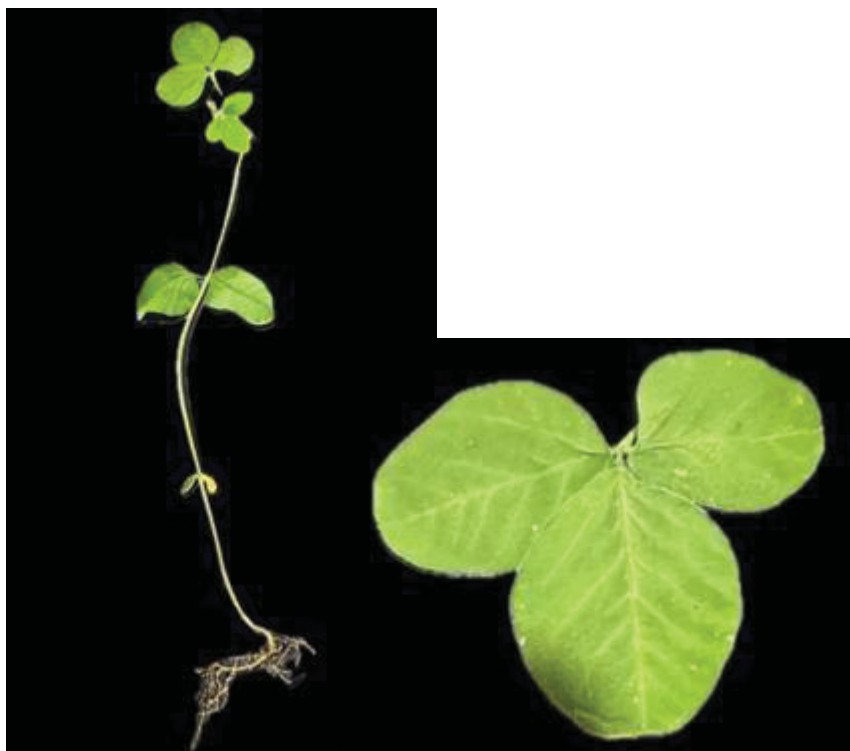
O controle positivo P1 induziu resistência (formação de cancro) dentro das primeiras 24 h após a inoculação, nas três concentrações avaliadas. Nas concentrações 30 e 15 μM , houve indução de HR para os 10 patógenos avaliados. Na concentração 5 μM , ocorreu indução de HR para sete dos patógenos testados, não havendo indução de resistência para as bactérias 2406, 1652, 2162, e, portanto, essas plantas foram suscetíveis a infecção (TABELA 10) (FIGURA 34). O peptídeo P6 gerou formação de cancro, caracterizado por lesões necróticas nas folhas no local de inoculação, para todos os patógenos em todas as concentrações testadas, com formação de lesões bem definidas dentro das 24 h após a inoculação (TABELA 10 e FIGURA 39). Os peptídeos P4 e P5, geraram formação de cancro para todos os patógenos em todas as concentrações testadas, dentro das primeiras 24 h após a inoculação. No entanto, os tamanhos das lesões não foram bem definidos quanto nos outros peptídeos, mostrando assim uma reação hipersensível atenuada, no entanto, mantendo as plantas defendidas dos patógenos (TABELA 9) (FIGURAS 37 e 38). Os peptídeos P2 e P3 se destacaram dos demais na avaliação quanto à capacidade de indução de HR em soja. Estes, inicialmente comparativamente ao controle positivo, apresentaram 100% de resposta HR, para todos os patógenos testados em todas as concentrações, e ao contrário do que foi observado no peptídeo P1, apresentaram formação de lesões bem definidas e uniformes, com áreas de amputação foliar no local da lesão, independente da concentração usada. Isso se justifica pela rapidez do sinal emitido pelo peptídeo na planta, pois a reação de HR iniciou nas primeiras 12 h após a inoculação (TABELA 10 e FIGURA 35 e 36). De acordo com os testes realizados por (WANG et al. 2007), os resultados obtidos no presente estudo são similares. Estudos feitos por (SCHNEIDER et al., 2011), demonstraram que a inoculação de plantas de soja com patógenos hospedeiros leva um tempo de resposta hipersensível, caracterizada por uma expressão diferencial de genes responsivos iniciada nas primeiras 12 horas em plantas com resistência. Um período silencioso ocorre em torno de 24 a 48 horas depois da inoculação, continua a desenvolver-se, mas não elicitava respostas hospedeiras, o que condiz com os resultados obtidos no presente estudo. Em estudos feitos por (Liu et al. 2006) são mostrados dois tipos de resposta de hipersensibilidade,

macro-HR e micro-HR, em plantas tratadas com harpin. A macro-HR produz sintomas visíveis quando os peptídeos harpin se infiltram nas folhas das plantas.

A ativação eficaz das respostas de defesa em plantas desempenha um papel crucial em sua capacidade de resistir a patógenos. Em muitos casos, essas respostas são desencadeadas quando as moléculas sinalizadoras produzidas pelos patógenos são reconhecidas pela planta hospedeira. Este estudo se concentrou em investigar peptídeos bioativos, derivadas de proteínas que têm a capacidade de iniciar a chamada "Resposta de Hipersensibilidade" (HR) e as respostas de defesa relacionadas formando os cancrios. Além disso, examinamos diferentes versões mutantes de peptídeos, com efeito comparativo nas sequências nativas. Os resultados do nosso estudo contribuem significativamente para uma melhor compreensão do papel dos peptídeos bioativos e suas funções na relação entre patógenos e plantas.

5.3.1 Análise de indução de resistência por formação de cancos nas folhas – morte celular – HR

FIGURA 32 - PLANTAS SEM TRATAMENTO, CONTROLE SEM INOCULAÇÃO PATÓGENOS E PEPTÍDEOS



Fonte: O autor (2023).

FIGURA 33 - PLANTA SEM TRATAMENTO CONTROLE COM INOCULAÇÃO DE PATÓGENOS.



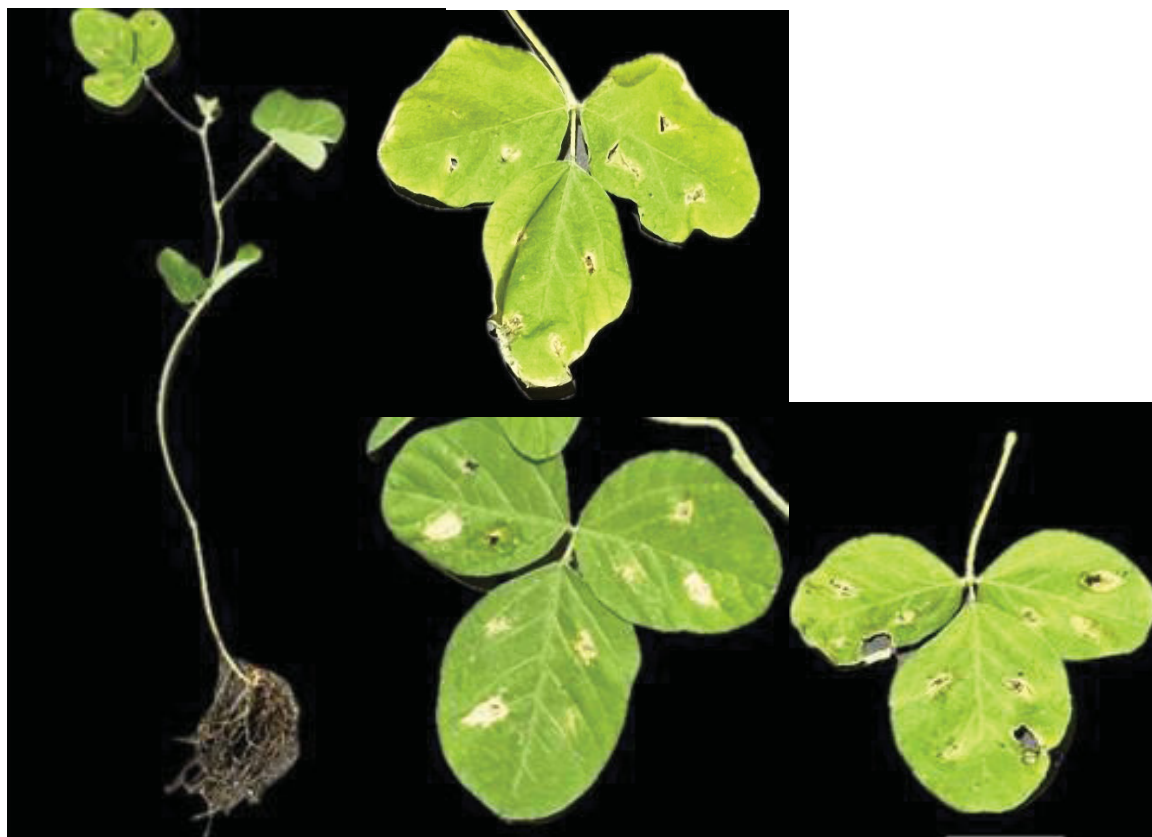
Fonte: O autor (2023).

FIGURA 34 - PEPTÍDEO 1 USADO COMO CONTROLE POSITIVO: PLANTAS INOCULADAS COM PATÓGENOS



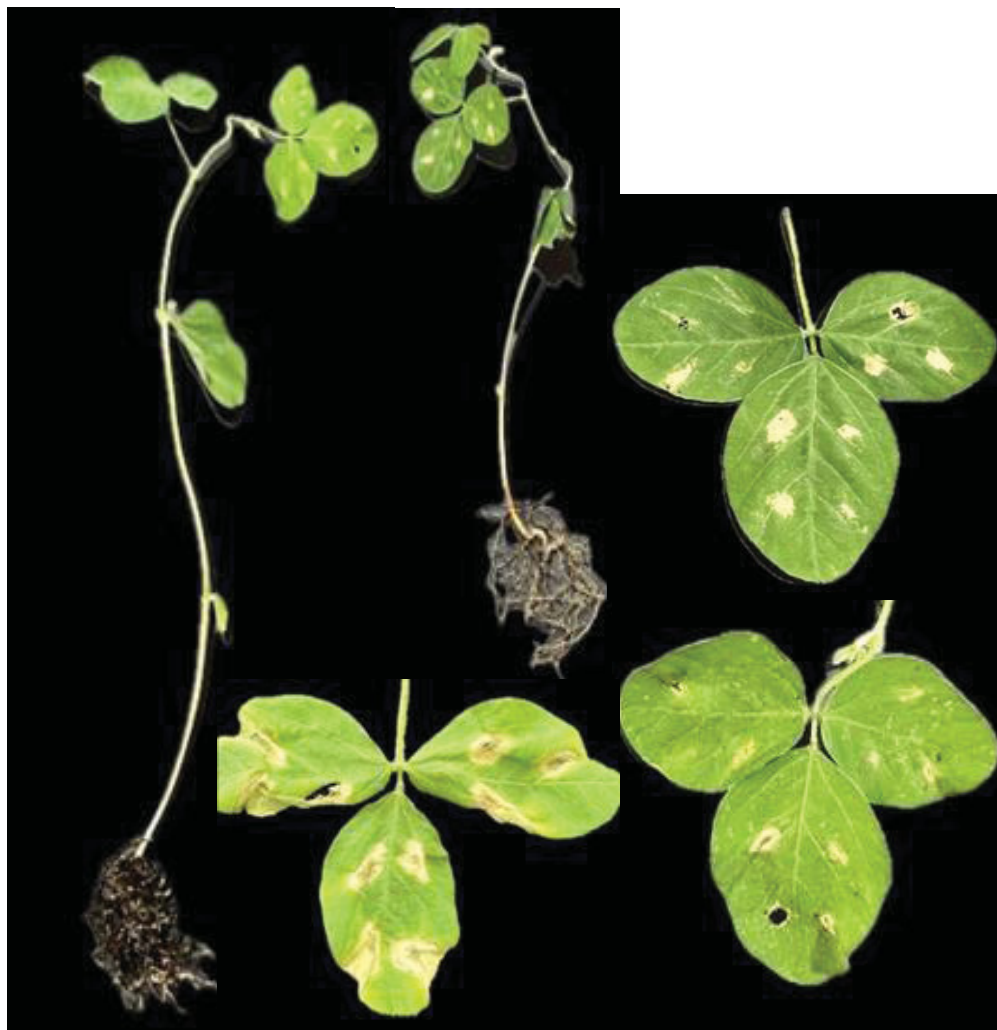
Fonte: O autor (2023).

FIGURA 35 - PEPTÍDEO 2 MUTANTES: PLANTAS INOCULADAS COM PATÓGENOS



Fonte: O autor (2023).

FIGURA 36 - PEPTÍDEO 3 MUTANTES: PLANTAS INOCULADAS COM PATÓGENOS



Fonte: O autor (2023).

FIGURA 37 - PEPTÍDEO 4: PLANTAS INOCULADAS COM PATÓGENOS



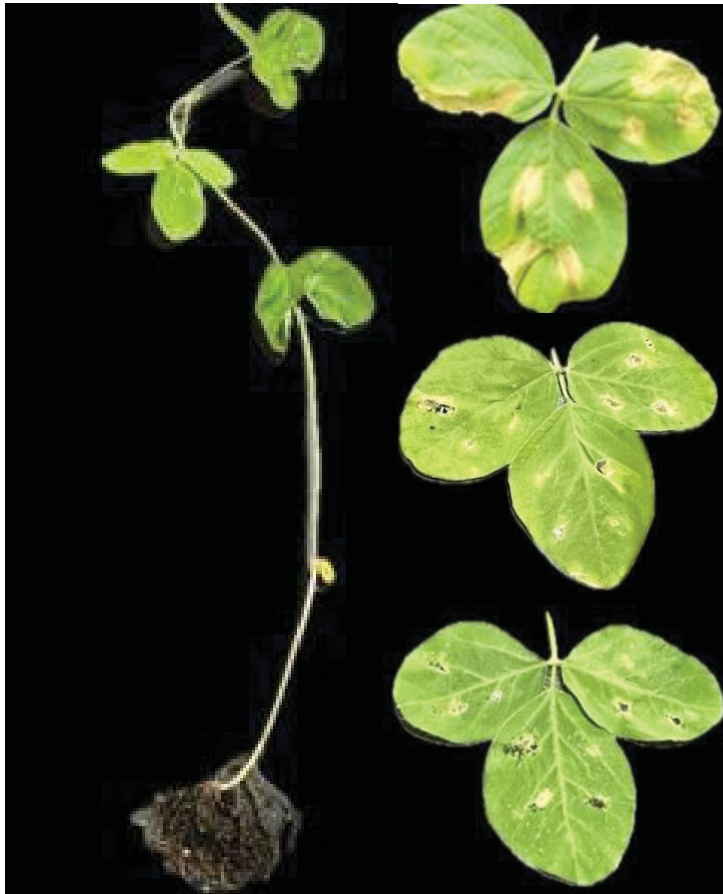
Fonte: O autor (2023).

FIGURA 38 - PEPTÍDEO 5: PLANTAS INOCULADAS COM PATÓGENOS



Fonte: O autor (2023).

FIGURA 39 - PEPTÍDEO 6: PLANTAS INOCULADAS COM PATÓGENOS



Fonte: O autor (2023).

5.3.1 ANÁLISE DA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

TABELA 11 – OCORRÊNCIA DE REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE (HR) EM FOLHAS DE SOJA PARA DIFERENTES PATÓGENOS

Planta		Soja																
PEPTÍDEOS	P1 controle	P1 controle	P1 controle	P2	P2	P2	P3	P3	P3	P4	P4	P4	P5	P5	P5	P6	P6	PST
	□ 30uM	□ 15uM	□ 5uM	□ 30uM	□ 15uM	□ 5uM	□ 30uM	□ 15uM	□ 5uM	□ 30uM	□ 15uM	□ 5uM	□ 30uM	□ 15uM	□ 5uM	□ 30uM	□ 15uM	□ 5uM
Patógenos																		
Salina	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	S
1623	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	S
1494	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	S
1080	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	S
1871	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	S
25	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	S
2392	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	S
526	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	S
2406	HR	HR	HR	HR	HR	HR	S	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	S
1652	HR	HR	HR	HR	HR	HR	S	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	S
2162	HR	HR	HR	HR	HR	HR	S	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	HR	S

O autor (2023). HR, Reação de Hipersensibilidade; B, não inoculado; S, suscetível a doença; os patógenos podem ser identificados quanto seus respectivos nomes na tabela 6. Fonte: O autor (2023)

6 CONCLUSÃO

O estudo alcançou resultados altamente satisfatórios em todos os objetivos estabelecidos. A prospeção de peptídeos resultou em cinco sequências promissoras para o controle de doenças e indução de resistência em plantas. A síntese dos peptídeos transcorreu conforme planejado, atingindo rendimento máximo e demonstrando sucesso nos testes propostos. O cultivo das plantas em BOD foi fundamental para os testes de indução de resistência, proporcionando um crescimento padrão nas plântulas. Os resultados dos testes de resistência mostraram que os peptídeos P2 a P6 induziram resistência eficaz contra os dez patógenos testados, destacando-se P2 e P3 por suas atividades superiores na formação de lesões uniformes e rápidas respostas imunes.

Os testes antimicrobianos revelaram que esses peptídeos mantiveram uma taxa de inibição acima de 65%, evidenciando seu potencial como agentes de controle de bactérias em ambientes agrícolas. No entanto, o peptídeo comercial P1 proporcionou indução de resistência contra os dez patógenos somente nas concentrações 30 μM e 15 μM . Na concentração 5 μM não induziu resistência contra as três bactérias testadas, no entanto seu reconhecimento da infecção foi dentro das 24 h após a inoculação, que o do tempo esperado. Já os peptídeos de P2 a P6, apresentaram indução de resistência aos dez patógenos em todas as três concentrações. Os peptídeos P2 e P3 mostraram atividades superiores, no quesito formação de cancos, com lesões uniformes e evidentes e com amputação foliar no local da infecção. Isso se justifica pela rapidez do sinal emitido pelo peptídeo na planta, pois a reação de HR iniciou nas primeiras 12 h após a inoculação. Já os peptídeos P4 e P5 apresentaram cancos menores e não tão definidos, mostrando assim uma reação hipersensível atenuada. No entanto, mantiveram as plantas imunes dos patógenos. O peptídeo P6 teve as formações de cancro dentro do esperado dentro das primeiras 24 h após a inoculação.

Nos testes antimicrobianos, para o peptídeo P1 testado contra a bactéria 2406, o maior percentual de inibição foi na concentração 30 μM com 67.7% e com a concentração 5 μM atingiu 66.7%. Já para a bactéria 1652, a inibição em 30 μM foi de 69.9%, e na concentração de 5 μM foi de 29.4%. Logo, a menor concentração não teve efeito inibitório significativo, o que pode correlacionar com a não indução de

resistência. Para a bactéria 2162, os percentuais de inibição foram 71.9% para a concentração 30 μM , e 57.4% para a concentração 5 μM , a nível de produto agrícola não é adequado esta taxa de controle, e nas concentrações 15 μM manteve sempre acima de 65%, para controle de bactérias a concentração 5 μM não foi satisfatória, o que pode correlacionar com a não indução de resistência. Os testes realizados para o peptídeo mutante denominado de P2, nas três concentrações na avaliação de atividade antimicrobiana, mostraram inibição acima de 65% para a bactéria 2406, nas três concentrações testadas. Para a bactéria 1652 nas três concentrações e avaliando atividade antimicrobiana, mostraram inibição acima de 65% para as concentrações 30 μM e 5 μM , e de 62% na 15 μM , esta variação pode ser explicada por erro de pipetagem ou leitura imprecisa do aparelho. Para a bactéria 2152 nas três concentrações e avaliando atividade antimicrobiana, mostraram inibição de 77% para concentração 30 μM , 69% para 15 μM e de 61% para 5 μM , para uso como produto comercial no controle de bactérias na agricultura, a concentração 5 μM não foi satisfatória. Para o peptídeo mutante P3, as três concentrações 30, 15, e 5 μM apresentou inibição acima de 75% para a bactéria 2406. Para a bactéria 1652, as três concentrações 30, 15, e 5 μM apresentaram inibição acima de 70%. Já para a bactéria 2152, três concentrações 30, 15, e 5 μM para as três bactérias apresentaram inibição acima de 70%. Para os peptídeos P4, P5, as três concentrações 30, 15, 5 μM , para a bactéria 2406, apresentaram inibição acima de 65%. A exceção foi para o P5 na concentração de 5 μM que inibiu em 62% na concentração 5 μM . Para a bactéria 1652, as três concentrações 30, 15, 5 μM , para as três bactérias, apresentaram inibição acima de 70%. Para o peptídeo P6, as três concentrações 30, 15, e 5 μM apresentaram inibição acima de 70% para a bactéria 2406. Para a bactéria 1652, na concentração 30 μM , apresentou inibição de 72% e nas concentrações 15, e 5 μM apresentaram inibição acima de 65%. Para os peptídeos P4, P5 e P6, as três concentrações 30, 15, 5 μM , para a bactéria 2152, apresentaram inibição acima de 65%. Com as exceções, P4 inibiu 54.6% e P5 inibiu 61.7% para a concentração 15 μM ; P6 na concentração 5 μM inibiu 62.6%. Quanto ao P4, induziu inibição de 54.4%, e P5 foi de 56.4% na concentração 5 μM .

Os resultados deste estudo apontam que os peptídeos prospectados têm potencial para se tornarem novas moléculas de grande utilidade no controle de doenças nas plantações, seja como indutores de resistência ou como agentes bactericidas. Especificamente, os peptídeos P2 e P3 demonstraram promessa significativa em comparação com o peptídeo controle P1, justificando a proteção de suas sequências

para fins de depósito de patente. Esta pesquisa abre caminho para avanços inovadores na agricultura, oferecendo soluções eficazes e promissoras para a proteção das plantas contra patógenos.

7 REFERÊNCIAS

AEGRO. Como identificar e manejar o cretamento bacteriano na soja. Tatiza Barcellos - 4 de maio de 2021; Atualizado em 18 de maio de 2023. [Home page]. Disponível em: <https://blog.aegro.com.br/crestamento-bacteriano-na-soja/>. Acesso em: 28 set. 2023.

AGRIOS, G.N. Plant pathology. 5. ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. 922 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: MAPA/ACS, 2009. 395 p.

BUARQUE, D. População mundial chega a 7 bilhões, diz ONU. Disponível em: <http://g1.globo.com/mundo/noticia/2011/10/populacao-mundial-chega-7-bilhoes-de-pessoas-diz-onu.html>. Atualizado em 26/10/2011.

CAMPOS, M.L., LIÃO, L.M., ALVES, E.S.F., MIGLIOLO, L., DIAS, S.C., FRANCO, O.L. A structural perspective of plant antimicrobial peptides, 2018. *Biochem J.* 2018 Nov 9;475(21):3359-3375. doi: 10.1042/BCJ20180213. PMID: 30413680.

Carcla-Olmedo F, Rodriguez-Palenzuela P, Molina A. Alamillo JM. López-Solanilla E.

CASTRO, L. S.; MIRANDA, M. H.; LIMA, J. E. Indicadores sociais de desenvolvimento e a produção de soja: uma análise multivariada nos 150 maiores municípios produtores brasileiros. *Revista Brasileira de Gestão e Desenvolvimento Regional*, Taubaté, v. 11, n. 1, p. 69-87, 2015.

CASTRO, M. S., FONTES, W. Plant defense and antimicrobial peptides. *Protein and Peptide Letters*, 12, 11-16, 2005.

CHEN, Y., YAN, F., CHAI, Y., LIU, H., KOLTER, R., LOSICK, R., & GUO, J. H. Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments

depends on conserved genes mediating biofilm formation. *Environmental Microbiology*, 20(12), 4674-4690, 2018.

CHEN, Y.; GUARNIERI, M. T.; VASIL, A. I.; VASIL, M. L.; MANT, C. T.; HODGES, R. S. 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.

CIUMAC, D. et al. Membrane targeting cationic antimicrobial peptides. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 537, p. 163–185, 2019.

CONAB. Acompanhamento da Safra brasileira de grãos. Décimo primeiro levantamento, safra 2022/23, v. 10, n° 11, agosto 2023.

CONTINI, E. Negócios: Brasil é o maior produtor e exportador de soja, café e carne bovina. 2 de junho de 2021; *Revista Rural*. Disponível em: <https://www.revistarural.com.br/2021/06/02/brasil-e-o-maio-produtor-e-exportador-de-soja-cafe-e-carne-bovina/>.

DONGHYEOK, G. & WOOK, K.; Hee-Sung P. Cyclic Peptides: Promising Scaffolds for Biopharmaceuticals. *Genes*, 9(11):557, 2019.

EMBRAPA SOJA. Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2022/2023: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Circular Técnica 195. Londrina, PR, Junho, 2023.

EMBRAPA. Agência de Informação Embrapa. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/>. Acesso em: 28 set. 2023.

EMBRAPA. Agência de Informação Embrapa. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/soja/producao/doencas-da-soja>. Acesso em: 28 set. 2023.

EMBRAPA. Manual de identificação de doenças de soja. 5ª edição. Autoria: HENNING, A. A.; ALMEIDA, A. M. R.; GODOY, C. V.; SEIXAS, C. D. S.; YORINORI, J. T.; COSTAMILAN, L. M.; FERREIRA, L. P.; MEYER, M. C.; SOARES, R. M.; DIAS, W. P. 2014.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO- EMBRAPA. História da soja. Londrina, PR, 2019. Disponível em: <www.embrapa.br/web/portal/soja/cultivos/soja1/história>. Acesso em: 05 dez. de 2019.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA NA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Mecanismos de defesa de plantas contra o ataque de agentes fitopatogênicos: histórico de 2009. Rondônia: Embrapa Floresta, 2009. Document 133 p.: il.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA NA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Seleção de linhagens de soja da Embrapa para resistência a doenças: histórico de 2008 a 2014. Londrina: Embrapa Soja, 2016. 41 p.: il.

ESTADOS UNIDOS. Department of Agriculture. *USDA.gov - United States Department of Agriculture*. Disponível em: <http://www.usda.gov>. Acesso em: 26 set. 2023.

FONES, H.N., FISHER, M.C., GURR, S.J. Emerging Fungal Threats to Plants and Animals Challenge Agriculture and Ecosystem Resilience. *Microbiol Spectr*, 2017.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. [S. l.: s.n.]. Disponível em: <http://www.fao.org/countryprofiles/index/en/?lang=es&iso3=PRY>. Acesso em: 14 abr. 2023.

Garcia-Olmedo F, Rodriguez Palenzuela P, Molina A, Alamillo JM, López-Solanilla E, Bertocal-Lobo M, Poza-Canión C. (2001) Antibiotic activities, hydrogen peroxide and peroxynitrite in plant defense. *FEB5 Lex* 198:210-222.

Giacometti, A.; Cirioni, O.; Kamysz, W.; D'Amalo, G.; Silvestri, C.; Licci, A.; Nadolski, P.; Riva, A.; Lukasiak, J.; Scalise, G. In vitro activity of MSI-78 alone and in combination with antibiotics against bacteria responsible for bloodstream infections in neutropenic patients, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 26: 235-240, 2005.

GUEx, N. and PEITSCH, M.C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, v. 18, p. 2714-2723, 1997.

Hale, J. D. F., & Hancock, R. E. W. (2007). Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria, 951–959.

HOLASKOVA, E., GALUSZKA, P., FREBORT, I., OZ, M. T. Antimicrobial peptide production and plant-based expression systems for medical and agricultural biotechnology. *Biotechnology Advances*, v. 33, p. 1005-1023, 2015.

HÖNG K, AUSTERLITZ T, BOHLMANN T, BOHLMANN H. A família da tionina de peptídeos antimicrobianos. *PLoS UM*, v. 16, n. 7, e0254549, 2021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0254549>.

KIM, J. G.; JEON, E.; OH, J.; MOON, J. S.; HWANG, I. Mutational analysis of *Xanthomonas harpin HpaG* identifies a key functional region that elicits the hypersensitive response in nonhost plants. *J Bacteriol*, v. 186, n. 18, p. 6239-6247, 2004. DOI: 10.1128/JB.186.18.6239-6247.2004. PMID: 15342594; PMCID: PMC515154.

KLOEPPER, J. W.; RYU, C. M.; ZHANG, S. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus spp.* *Phytopathology*, v. 94, n. 11, p. 1259-1266, 2004. DOI: 10.1094/PHYTO.2004.94.11.1259.

KOMÁREK, M.; ČADKOVÁ, E.; CHRASTNÝ, V.; BORDAS, F.; BOLLINGER, J. C. Contamination of vineyard soils with fungicides: a review of environmental and toxicological aspects. *Environment international*, v. 36, p. 138-151, 2010.

Liu AX, Li DC, Dong HS, Wang JS (2006) Harpin Xoo induziu morte celular hipersensível: acúmulo de H₂O₂ e expressão gênica relacionada. *Acta Fitopatho Sin* 36:163–168.

MAHLAPUU, M.; HÅKANSSON, J.; RINGSTAD, L.; BJÖRN, C. Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Front Cell Infect Microbiol*, v. 6, p. 1-12, 2016.

NBT PLATFORM: New Breeding Technologies Factsheets, 2013. Publicação disponível em: <https://www.nbtplatform.org/documentation>. Acesso em 26 de outubro de 2019.

PepCalc. <https://pepcalc.com/>. Acesso em: [data de acesso].

POSTIC, G.; ANDREANI, J.; MARCOUX, J.; REYS, V.; GUEROIS, R.; REY, J.; MOUTON-BARBOSA, E.; VANDENBROUCK, Y.; CIANFERANI, S.; BURLET-SCHILTZ, O.; LABESSE, G.; TUFFÉRY, P. Proteo3Dnet: a web server for the integration of structural information with interactomics data. *Nucleic Acids Res*, v. 49, n. W1, p. W567-W572, 2021. DOI: 10.1093/nar/gkab347.

[PRABI - Plate-Forme d'Analyse et de Recherche en Informatique, Biologie Intégrative et Modélisation](#)

RAMACHANDRAN, G. N.; RAMAKRISHNAN, C. et al. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J Mol Biol*, v. 7, p. 95-99, 1963.

[RCSB Protein Data Bank 3D View](#)

REDDY, K. V. R.; YEDERY, R. D.; ARANHA, C. Antimicrobial peptides: premises and promises. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 24, p. 536-547, 2004.

Reddy, K. V. R.; Yedery, R. D.; Aranha, C. Antimicrobial peptides: premises and promises, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24: 536-547, 2004.

SANTOS, Michele Avila dos. Síntese e Determinação da Estrutura de Peptídeos Antimicrobianos Intragênicos de Proteínas Humanas. Tese (Doutorado em Química) — Universidade de Brasília, Brasília, 2022.

Schneider, K.T., van de Mortel, M., Bancroft, T.J., Braun, E., Nettleton, D., Nelson, R.T., Frederick, R.D., Baum, T.J., Graham, M.A., and Whitham, S.A. 2011. Biphasic gene expression changes elicited by *Phakopsora pachyrhizi* in soybean correlate with fungal penetration and haustoria formation. *Plant Physiol.* 157(1):355-71.

SCHOLZ, S. S.; REICHELT, M.; MEKONNEN, D. W.; LUDEWIG, F.; MITHÖFER, A. Insect herbivory-elicited GABA accumulation in plants is a wound-induced, direct, systemic, and jasmonate-independent defense response. *Frontiers in Plant Science*, v. 9, 2018. DOI: 10.3389/fpls.2018.01543.

SENTHILKUMAR, M.; SWARNALAKSHMI, K.; GOVINDASAMY, V.; LEE, Y. K.; ANNAPURNA, K. Biocontrol potential of soybean bacterial endophytes against charcoal rot fungus, *Rhizoctonia bataticola*. *Current Microbiology*, New York, v. 58, n. 4, p. 288-293, Abr. 2009.

SHAFI, J.; TIAN, H.; JI, M. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, Abingdon, v. 1, n. 1, p. 446-459, Abr. 2017.

SHARMA, C.; CHOWDHARY, A. Molecular Bases of Antifungal Resistance in Filamentous Fungi. Elsevier B.V., 607-616p, 2017.

SILVA, Francilene Lopes da. Análise da Associação e do Secretoma da Interação Entre *Trichoderma* spp. de Solo do Cerrado com Feijoeiro Comum, *Phaseolus vulgaris* L. Dissertação (Mestrado em Biologia Microbiana) — Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

SOBRAL, J. K. A. Comunidade Endofítica e Epifítica de Soja (*Glycine Max*) e Estudo da Interação Endofíticos-Planta. Tese (Doutorado em Agronomia. Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz," Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

SUN, S.; ZHAO, G.; HUANG, Y.; CAI, M.; SHAN, Y.; WANG, H.; CHEN, Y. Specificity and mechanism of action of alpha-helical membrane-active peptides interacting with model and biological membranes by single-molecule force spectroscopy. *Scientific Reports*, v. 6, p. 29145, 2016.

SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>).

TALAMINI, V., NUNES, M.U.C. Estratégias de controle das principais doenças do tomateiro orgânico na região central de Sergipe, 2018.

TORRES, M. J.; BRANDAN, C. P.; SABATÉ, D. C.; PETROSELLI, G.; ERRABALSELLS, R.; AUDISIO, M. C. Biological activity of the lipopeptide-producing *Bacillus amyloliquefaciens* PGPBacCA1 on common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) pathogens. *Biological Control*, San Diego, v. 105, p. 93-99, Feb. 2017.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. 6ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

Van der Weerden, N. L., Lay, F. T., Anderson, M. A. (2008) The plant defensin, NaD1, enters the cytoplasm of *Fusarium oxysporum* hyphae. *Journal of Biological Chemistry*, 283:14445-14452.

VAN LOON, L. C.; BAKKER P. A. H. M.; PIETERSE C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, v. 36, p. 453-483, 1998.

VILASBÔAS, F. DA S. Seleção de biocontroladores de *Pseudomonas savastanoi* pv. *Glycinea* em soja. Universidade De Passo Fundo, Passo Fundo, 2009.

Wang XY, Li M, Zhang JH, Zhang Y, Zhang GY, Wang J (2007) Identification of a key functional region in harpins from *Xanthomonas* that suppresses protein aggregation and mediates harpin expression in *E. coli*. *Mol Biol Rep* 34(3):189–198.

WANG, H., LI, Y., WU, L., FAN, Y., & WU, J. Harpin Protein Application Delays Flowering and Enhances Plant Resistance to Cold Stress in Tomato. *Frontiers in Plant Science*, v. 11, 2020.

Wang, S. Y., Wu, J. H., Ng, T. B., Ye, X. Y., Rao, P. F. (2004) A non-specific lipid transfer protein with antifungal and antibacterial activities from the mung bean. *Peptides*, 8:1235-42.

WEI, Z., YANG, X., YIN, S., SHEN, Q., & RAN, W. Harpin in Plant Growth, Development, and Stress Responses. *Journal of Experimental Botany*, v. 69, n. 9, p. 1969-1981, 2018.

Wu, T., Tang, D., Chen, W., Huang, H., Wang, R., Chen, Y. (2013) Expression of antimicrobial peptides thanatin (S) in transgenic *Arabidopsis* enhanced resistance to phytopathogenic fungi and bacteria. *Gene*, 527:235-242.

YANG, J., & KLOEPPER, J. W. Ryu, C-M. Rhizosphere Microbes as Inducers of Systemic Plant Responses. *Symbiosis*, v. 68, n. 1-3, p. 1-14, 2016.

Yang, X., Li, J., Li, X., She, R., Pei, Y. (2006) Isolation and characterization of a novel thermostable non-specific lipid transfer protein-like antimicrobial protein from motherwort (*Leonurus japonicus* Houtt) seeds. *Peptides*, 27:3122-3128.

ZHOU, J., WU, F., ZHANG, R., SUN, X., & WEI, Z. Harpin proteins and their role in plant defense. *Frontiers in Plant Science*, v. 10, 1343, 2019.

ZHU, M., LIU, P., Niu, Z.W. A perspective on general direction and challenges facing antimicrobial peptides. *Chinese Chemical Letters*, v. 28, p. 703–708, 2017.

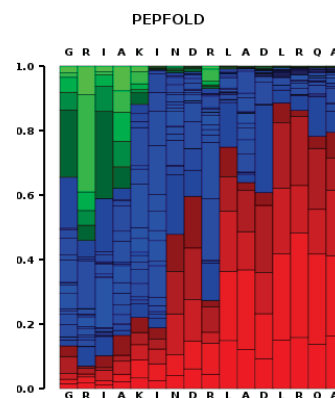
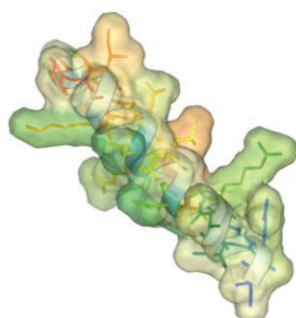
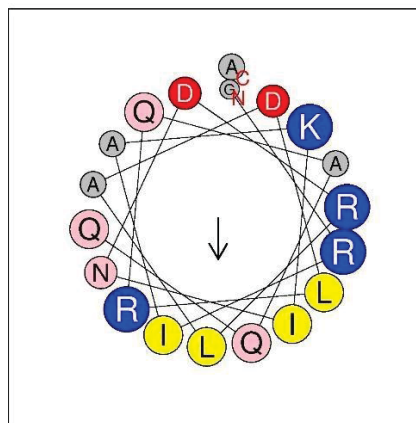
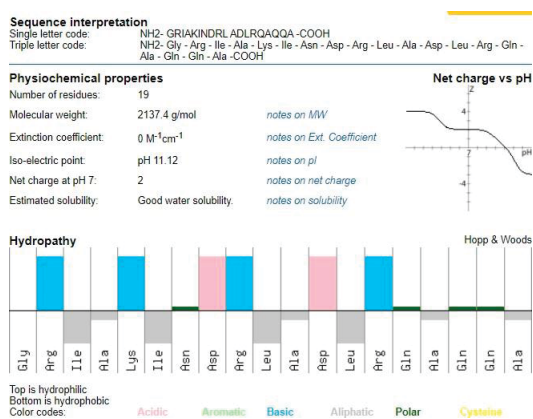
7 ANEXOS

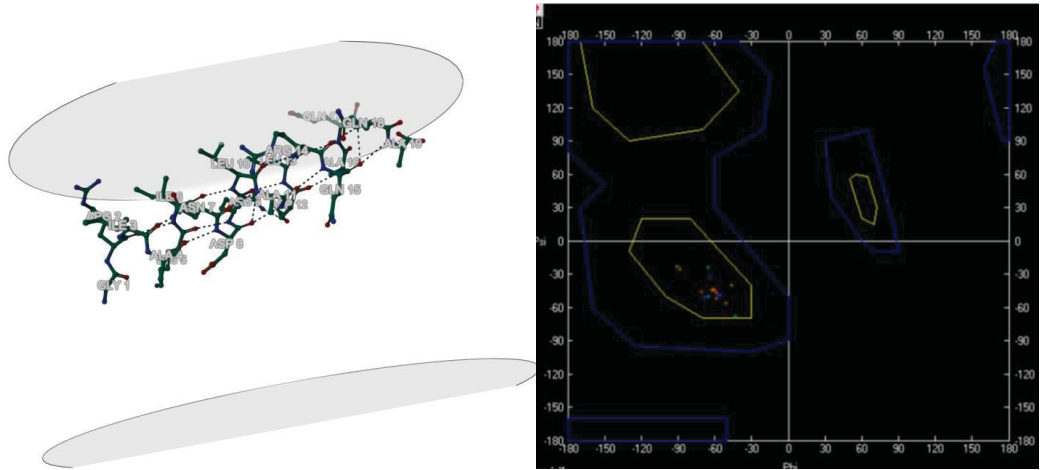
7.1 ANEXO I – DADOS DE RESULTADOS E DISCUSSÃO TÓPICO 5.1.

Todos os peptídeos sofreram as mesmas análises que o peptídeo modelo p1, podendo ser consultadas ao longo deste trabalho.

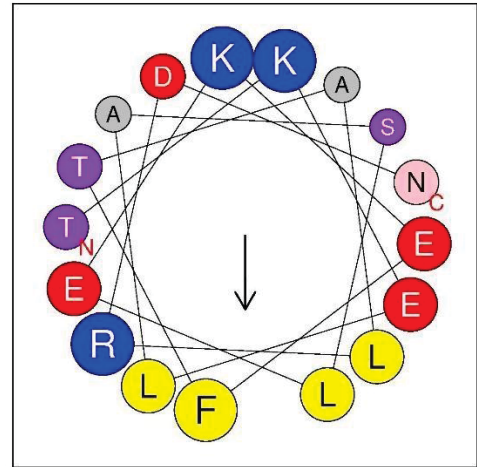
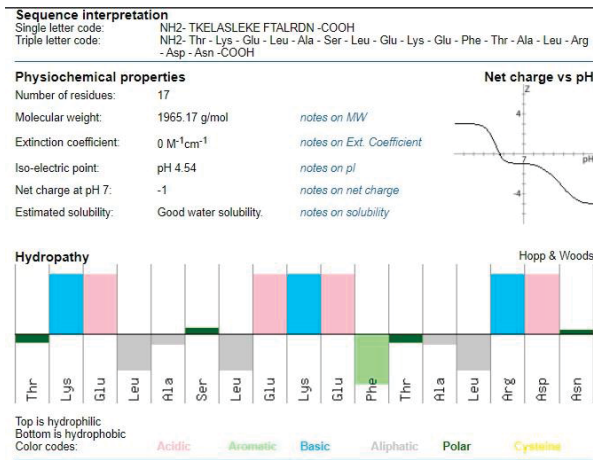
7.1.1 Prospecção de novas sequências peptídicas, com físico-químicas e 3D Peptídeos Mutantes P2 e P3, por motivos de patente não serão expostas suas análises.

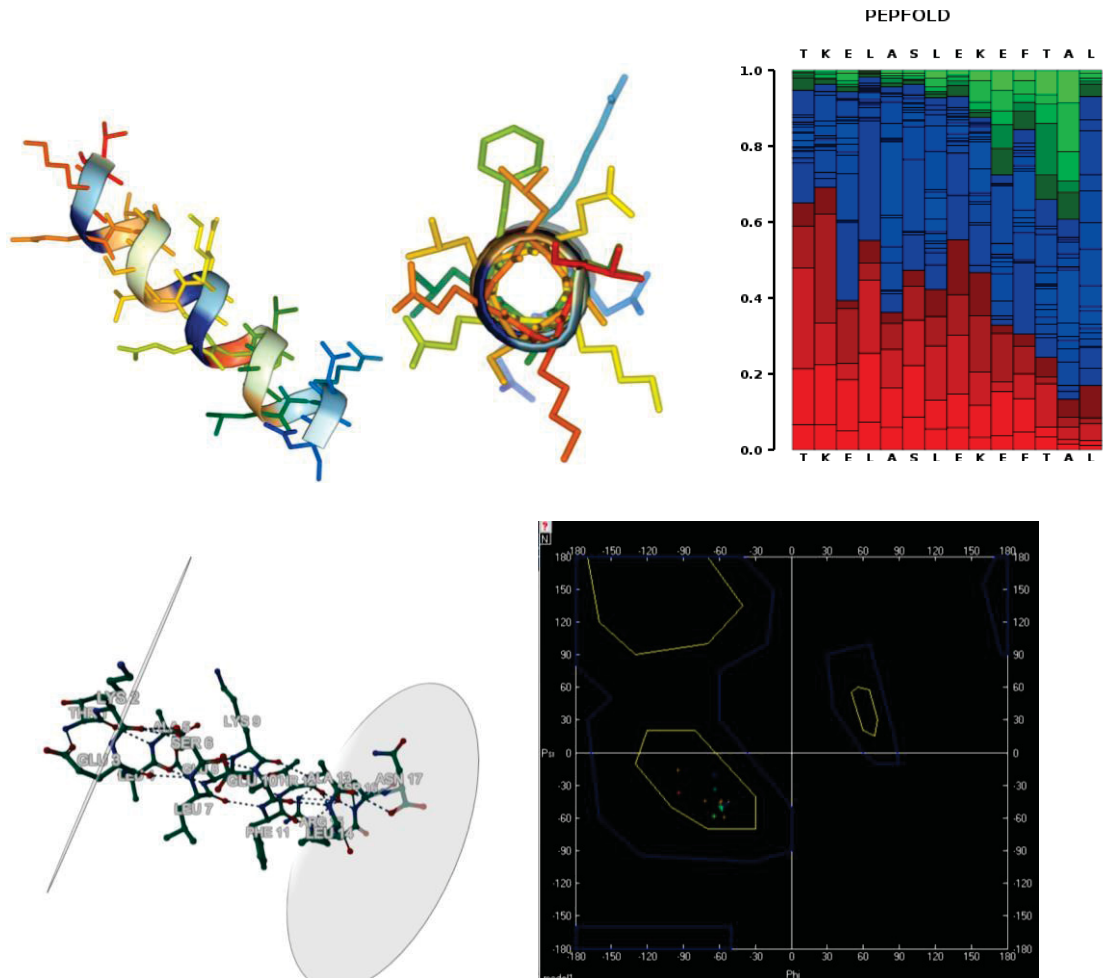
- Peptídeo P4 sequência



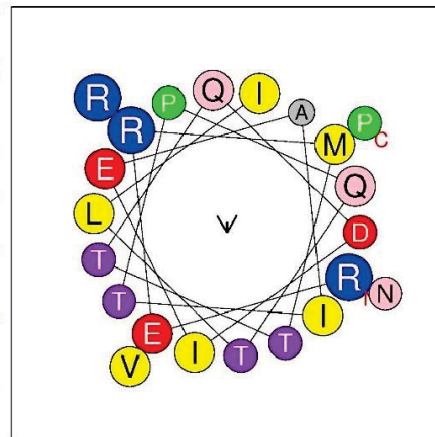
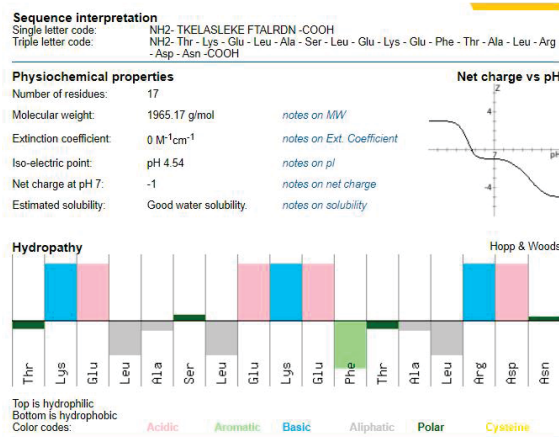


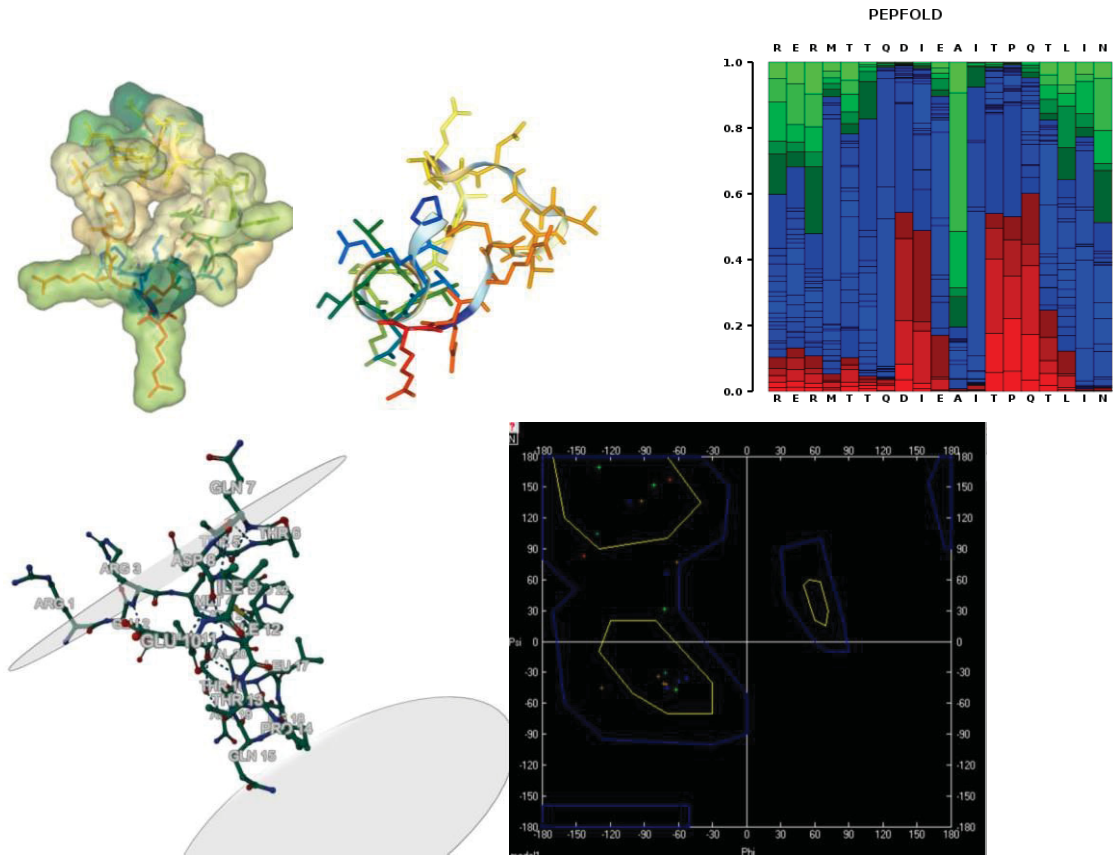
- Peptídeo P5 sequência





- Peptídeo P6 sequência





7.2 ANEXO II – REFERENTE AO TÓPICO 5.2: ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS LEITURAS DE DO₆₀₀

7.2.1 ENSAIO DE INIBIÇÃO POR DO₆₀₀

7.2.1.1 Ensaios com a bactéria 2406

• ANOVA

Source of Variation	SS	d.f.	MS	F	p-value	F crit	Omega Sqr.
Factor #1 (concentração)	0.0019	2	0.0009	6.3314	0.0167	4.1028	#N/D
Factor #2 (peptídeo)	0.0556	5	0.0111	74.3246	1.4020E-7	3.3258	#N/D
Within Groups	0.0015	10	0.0001				
Total	0.0590	17	0.0035				

Comparação entre grupos (Fator 1 - concentração)

Teste Scheffe

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	-0.0103	-0.0295	0.0088	1.4635	0.3675
5 vs 30	-0.0250	-0.0442	-0.0058	3.5408	0.0105
15 vs 30	-0.0147	-0.0338	0.0045	2.0773	0.1501

Teste Tukey B

Groups	Difference	Test Statistic	p-value	Significant
15 vs 5 (df = 2)	-0.0103	2.0697	0.2610	No
30 vs 5 (df = 3)	-0.0250	5.0074	0.0136	Yes
15 vs 30 (df = 2)	-0.0147	2.9377	0.1046	No

Comparação entre grupos (Fator 2 - peptídeo)

Teste Scheffe

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
p1 vs p2	0.0027	-0.0367	0.0420	0.2671	0.9999
p1 vs p3	-0.1150	-0.1543	-0.0757	11.5171	4.2805E-6
p1 vs p4	0.0067	-0.0327	0.0460	0.6677	0.9925
p1 vs p5	0.0117	-0.0277	0.0510	1.1684	0.9192
p1 vs p6	-0.1097	-0.1490	-0.0703	10.9829	7.1284E-6
p2 vs p3	-0.1177	-0.1570	-0.0783	11.7841	3.3403E-6
p2 vs p4	0.0040	-0.0353	0.0433	0.4006	0.9993
p2 vs p5	0.0090	-0.0303	0.0483	0.9013	0.9717
p2 vs p6	-0.1123	-0.1517	-0.0730	11.2500	5.5107E-6
p3 vs p4	0.1217	0.0823	0.1610	12.1847	2.3219E-6
p3 vs p5	0.1267	0.0873	0.1660	12.6855	1.4938E-6
p3 vs p6	0.0053	-0.0340	0.0447	0.5341	0.9973

p4 vs p5	0.0050	-0.0343	0.0443	0.5007	0.9980
p4 vs p6	-0.1163	-0.1557	-0.0770	11.6506	3.7791E-6
p5 vs p6	-0.1213	-0.1607	-0.0820	12.1513	2.3925E-6

Fator 1 (concentração) = 5

Teste Scheffe

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
p1 vs p2	-0.0030	-0.0712	0.0652	0.1735	1.0000
p1 vs p3	-0.1140	-0.1822	-0.0458	6.5916	0.0011
p1 vs p4	0.0060	-0.0622	0.0742	0.3469	0.9997
p1 vs p5	0.0360	-0.0322	0.1042	2.0815	0.5309
p1 vs p6	-0.0960	-0.1642	-0.0278	5.5508	0.0047
p2 vs p3	-0.1110	-0.1792	-0.0428	6.4181	0.0014
p2 vs p4	0.0090	-0.0592	0.0772	0.5204	0.9976
p2 vs p5	0.0390	-0.0292	0.1072	2.2550	0.4496
p2 vs p6	-0.0930	-0.1612	-0.0248	5.3773	0.0060
p3 vs p4	0.1200	0.0518	0.1882	6.9385	0.0007
p3 vs p5	0.1500	0.0818	0.2182	8.6731	8.2385E-5
p3 vs p6	0.0180	-0.0502	0.0862	1.0408	0.9486
p4 vs p5	0.0300	-0.0382	0.0982	1.7346	0.7000
p4 vs p6	-0.1020	-0.1702	-0.0338	5.8977	0.0029
p5 vs p6	-0.1320	-0.2002	-0.0638	7.6323	0.0003

Fator 1 (concentração) = 15

Teste Scheffe

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
p1 vs p2	0.0050	-0.0632	0.0732	0.2891	0.9999
p1 vs p3	-0.1140	-0.1822	-0.0458	6.5916	0.0011
p1 vs p4	0.0200	-0.0482	0.0882	1.1564	0.9223
p1 vs p5	0.0150	-0.0532	0.0832	0.8673	0.9760
p1 vs p6	-0.1170	-0.1852	-0.0488	6.7650	0.0009
p2 vs p3	-0.1190	-0.1872	-0.0508	6.8807	0.0008
p2 vs p4	0.0150	-0.0532	0.0832	0.8673	0.9760
p2 vs p5	0.0100	-0.0582	0.0782	0.5782	0.9961
p2 vs p6	-0.1220	-0.1902	-0.0538	7.0541	0.0006
p3 vs p4	0.1340	0.0658	0.2022	7.7480	0.0002
p3 vs p5	0.1290	0.0608	0.1972	7.4589	0.0004
p3 vs p6	-0.0030	-0.0712	0.0652	0.1735	1.0000
p4 vs p5	-0.0050	-0.0732	0.0632	0.2891	0.9999
p4 vs p6	-0.1370	-0.2052	-0.0688	7.9214	0.0002
p5 vs p6	-0.1320	-0.2002	-0.0638	7.6323	0.0003

Fator 1 (concentração) = 30

Teste Scheffe

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
p1 vs p2	0.0060	-0.0622	0.0742	0.3469	0.9997
p1 vs p3	-0.1170	-0.1852	-0.0488	6.7650	0.0009
p1 vs p4	-0.0060	-0.0742	0.0622	0.3469	0.9997
p1 vs p5	-0.0160	-0.0842	0.0522	0.9251	0.9684
p1 vs p6	-0.1160	-0.1842	-0.0478	6.7072	0.0009
p2 vs p3	-0.1230	-0.1912	-0.0548	7.1120	0.0006
p2 vs p4	-0.0120	-0.0802	0.0562	0.6938	0.9911
p2 vs p5	-0.0220	-0.0902	0.0462	1.2721	0.8892
p2 vs p6	-0.1220	-0.1902	-0.0538	7.0541	0.0006
p3 vs p4	0.1110	0.0428	0.1792	6.4181	0.0014
p3 vs p5	0.1010	0.0328	0.1692	5.8399	0.0031
p3 vs p6	0.0010	-0.0672	0.0692	0.0578	1.0000
p4 vs p5	-0.0100	-0.0782	0.0582	0.5782	0.9961
p4 vs p6	-0.1100	-0.1782	-0.0418	6.3603	0.0015
p5 vs p6	-0.1000	-0.1682	-0.0318	5.7821	0.0034

Comparação entre grupos 1 (concentração) dentro de cada fator 2 (peptídeo) nível

Fator 2 (peptídeo) = p1

Scheffe

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	-0.0070	-0.0539	0.0399	0.4047	0.9218
5 vs 30	-0.0120	-0.0589	0.0349	0.6938	0.7890
15 vs 30	-0.0050	-0.0519	0.0419	0.2891	0.9592

Fator 2 (peptídeo) = p2

Scheffe

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	0.0010	-0.0459	0.0479	0.0578	0.9983
5 vs 30	-0.0030	-0.0499	0.0439	0.1735	0.9851
15 vs 30	-0.0040	-0.0509	0.0429	0.2313	0.9737

Fator 2 (peptídeo) = p3

Scheffe

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	-0.0070	-0.0539	0.0399	0.4047	0.9218

5 vs 30	-0.0150	-0.0619	0.0319	0.8673	0.6928
15 vs 30	-0.0080	-0.0549	0.0389	0.4626	0.8992

Fator 2 (peptídeo) = p4

Scheffe

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	0.0070	-0.0399	0.0539	0.4047	0.9218
5 vs 30	-0.0240	-0.0709	0.0229	1.3877	0.4042
15 vs 30	-0.0310	-0.0779	0.0159	1.7924	0.2333

Fator 2 (peptídeo) = p5

Scheffe

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	-0.0280	-0.0749	0.0189	1.6190	0.2988
5 vs 30	-0.0640	-0.1109	-0.0171	3.7005	0.0077
15 vs 30	-0.0360	-0.0829	0.0109	2.0815	0.1491

Fator 2 (peptídeo) = p6

Scheffe

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	-0.0280	-0.0749	0.0189	1.6190	0.2988
5 vs 30	-0.0320	-0.0789	0.0149	1.8503	0.2140
15 vs 30	-0.0040	-0.0509	0.0429	0.2313	0.9737

2.1.2 Ensaios com a bactéria 1652

ANOVA

Source of Variation	SS	d.f.	MS	F	p-value	F crit	Omega Sqr.
Factor#1(concentração)	0.0186	2	0.0093	0.7765	0.4859	4.1028	#N/D
Factor #2 (peptídeo)	0.0449	5	0.0090	0.7486	0.6054	3.3258	#N/D
Within Groups	0.1200	10	0.0120				
Total	0.1835	17	0.0108				

Comparação entre grupos 1 (concentração) dentro de cada fator 2 (peptídeo) nível

Fator 2 (peptídeo) = p1

Scheffe

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	-0.4299	-0.8502	-0.0095	2.7748	0.0447
5 vs 30	-0.4053	-0.8257	0.0151	2.6161	0.0597
15 vs 30	0.0246	-0.3958	0.4450	0.1587	0.9875

Fator 2 (peptídeo) = p2

Scheffe

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	0.0908	-0.3296	0.5112	0.5863	0.8437
5 vs 30	0.0243	-0.3961	0.4447	0.1569	0.9878
15 vs 30	-0.0665	-0.4869	0.3539	0.4295	0.9124

Fator 2 (peptídeo) = p3**Scheffe**

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	-0.0171	-0.4375	0.4033	0.1102	0.9940
5 vs 30	-0.0590	-0.4793	0.3614	0.3806	0.9305
15 vs 30	-0.0419	-0.4623	0.3785	0.2704	0.9642

Fator 2 (peptídeo) = p4**Scheffe**

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	0.0107	-0.4097	0.4311	0.0691	0.9976
5 vs 30	0.1426	-0.2778	0.5630	0.9206	0.6622
15 vs 30	0.1319	-0.2885	0.5523	0.8515	0.7019

Fator 2 (peptídeo) = p5**Scheffe**

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	-0.0417	-0.4621	0.3787	0.2689	0.9646
5 vs 30	-0.0388	-0.4592	0.3816	0.2502	0.9692
15 vs 30	0.0029	-0.4175	0.4233	0.0187	0.9998

Fator 2 (peptídeo) = p6**Scheffe**

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	-0.0417	-0.4621	0.3787	0.2689	0.9646
5 vs 30	-0.0388	-0.4592	0.3816	0.2502	0.9692
15 vs 30	0.0029	-0.4175	0.4233	0.0187	0.9998

Comparação entre grupos 2 (peptídeo) dentro de cada fator 1 (concentração) nível**Fator 1 (concentração) = 5****Scheffe**

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
p1 vs p2	-0.4246	-1.0351	0.1858	2.7412	0.2603

p1 vs p3	-0.4145	-1.0250	0.1959	2.6759	0.2818
p1 vs p4	-0.4299	-1.0403	0.1806	2.7748	0.2497
p1 vs p5	-0.3801	-0.9906	0.2304	2.4537	0.3643
p1 vs p6	-0.3656	-0.9761	0.2448	2.3603	0.4032
p2 vs p3	0.0101	-0.6003	0.6206	0.0654	1.0000
p2 vs p4	-0.0052	-0.6157	0.6053	0.0336	1.0000
p2 vs p5	0.0445	-0.5659	0.6550	0.2876	0.9999
p2 vs p6	0.0590	-0.5515	0.6695	0.3809	0.9995
p3 vs p4	-0.0153	-0.6258	0.5951	0.0990	1.0000
p3 vs p5	0.0344	-0.5760	0.6449	0.2222	1.0000
p3 vs p6	0.0489	-0.5616	0.6593	0.3156	0.9998
p4 vs p5	0.0498	-0.5607	0.6602	0.3212	0.9998
p4 vs p6	0.0642	-0.5462	0.6747	0.4145	0.9992
p5 vs p6	0.0145	-0.5960	0.6249	0.0934	1.0000

Fator 1 (concentração) = 15

Scheffe

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
p1 vs p2	0.0960	-0.5144	0.7065	0.6199	0.9947
p1 vs p3	-0.0017	-0.6122	0.6087	0.0112	1.0000
p1 vs p4	0.0107	-0.5998	0.6212	0.0691	1.0000
p1 vs p5	0.0081	-0.6024	0.6186	0.0523	1.0000
p1 vs p6	0.0338	-0.5766	0.6443	0.2185	1.0000
p2 vs p3	-0.0978	-0.7082	0.5127	0.6312	0.9942
p2 vs p4	-0.0853	-0.6958	0.5251	0.5509	0.9969
p2 vs p5	-0.0879	-0.6984	0.5225	0.5677	0.9965
p2 vs p6	-0.0622	-0.6727	0.5483	0.4015	0.9993
p3 vs p4	0.0124	-0.5980	0.6229	0.0803	1.0000
p3 vs p5	0.0098	-0.6006	0.6203	0.0635	1.0000
p3 vs p6	0.0356	-0.5749	0.6460	0.2297	1.0000
p4 vs p5	-0.0026	-0.6131	0.6079	0.0168	1.0000
p4 vs p6	0.0231	-0.5873	0.6336	0.1494	1.0000
p5 vs p6	0.0257	-0.5847	0.6362	0.1662	1.0000

Fator 1 (concentração) = 30

Scheffe

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
p1 vs p2	0.0049	-0.6055	0.6154	0.0317	1.0000
p1 vs p3	-0.0682	-0.6787	0.5423	0.4403	0.9989
p1 vs p4	0.1180	-0.4924	0.7285	0.7619	0.9864
p1 vs p5	-0.0136	-0.6241	0.5969	0.0878	1.0000
p1 vs p6	-0.0255	-0.6359	0.5850	0.1643	1.0000
p2 vs p3	-0.0731	-0.6836	0.5373	0.4721	0.9985
p2 vs p4	0.1131	-0.4974	0.7236	0.7301	0.9887
p2 vs p5	-0.0185	-0.6290	0.5920	0.1195	1.0000
p2 vs p6	-0.0304	-0.6408	0.5801	0.1961	1.0000
p3 vs p4	0.1862	-0.4242	0.7967	1.2022	0.9100
p3 vs p5	0.0546	-0.5558	0.6651	0.3525	0.9996

p3 vs p6	0.0428	-0.5677	0.6532	0.2760	0.9999
p4 vs p5	-0.1316	-0.7421	0.4788	0.8496	0.9780
p4 vs p6	-0.1435	-0.7539	0.4670	0.9262	0.9682
p5 vs p6	-0.0119	-0.6223	0.5986	0.0766	1.0000

2.1.3 Ensaios com a bactéria 2162

ANOVA

Source of Variation	SS	d.f.	MS	F	p-value	F crit	Omega Sqr.
Factor #1 (concentração)	0.0418	2	0.0209	20.5156	0.0003	4.1028	#N/D
Factor #2 (peptídeo)	0.0560	5	0.0112	11.0107	0.0008	3.3258	#N/D
Within Groups	0.0102	10	0.0010				
Total	0.1080	17	0.0064				

Comparação entre grupos (Fator 1 - concentração)

Scheffe

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	-0.0433	-0.0932	0.0067	2.3481	0.0956
5 vs 30	-0.1167	-0.1667	-0.0667	6.3353	5.7537E-5
15 vs 30	-0.0734	-0.1234	-0.0235	3.9872	0.0044

Comparação entre grupos (Fator 2 - peptídeo)

Scheffe

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
p1 vs p2	-0.0389	-0.1415	0.0638	1.4921	0.8088
p1 vs p3	-0.1121	-0.2147	-0.0094	4.3032	0.0293
p1 vs p4	0.0631	-0.0396	0.1657	2.4214	0.3775
p1 vs p5	0.0253	-0.0773	0.1280	0.9725	0.9611
p1 vs p6	0.0178	-0.0849	0.1204	0.6828	0.9917
p2 vs p3	-0.0732	-0.1759	0.0294	2.8111	0.2387
p2 vs p4	0.1019	-0.0007	0.2046	3.9135	0.0520
p2 vs p5	0.0642	-0.0385	0.1669	2.4647	0.3599
p2 vs p6	0.0567	-0.0460	0.1593	2.1749	0.4865
p3 vs p4	0.1752	0.0725	0.2778	6.7246	0.0009
p3 vs p5	0.1374	0.0348	0.2401	5.2757	0.0070
p3 vs p6	0.1299	0.0272	0.2325	4.9860	0.0107
p4 vs p5	-0.0377	-0.1404	0.0649	1.4488	0.8262
p4 vs p6	-0.0453	-0.1479	0.0574	1.7386	0.6981
p5 vs p6	-0.0075	-0.1102	0.0951	0.2898	0.9999

Comparação entre grupos 2 (peptídeo) dentro de cada fator 1 (concentração) nível

Fator 1 (concentração) = 5**Scheffe**

<i>Group vs. Group (Contrast)</i>	<i>Difference</i>	<i>95% Confidence Interval</i>		<i>Test Statistic</i>	<i>p-value</i>
p1 vs p2	-0.0437	-0.2215	0.1341	0.9692	0.9616
p1 vs p3	-0.1715	-0.3493	0.0063	3.8017	0.0612
p1 vs p4	0.0302	-0.1476	0.2080	0.6692	0.9924
p1 vs p5	0.0102	-0.1676	0.1880	0.2250	1.0000
p1 vs p6	-0.0440	-0.2218	0.1338	0.9749	0.9607
p2 vs p3	-0.1278	-0.3056	0.0500	2.8325	0.2324
p2 vs p4	0.0739	-0.1039	0.2517	1.6383	0.7451
p2 vs p5	0.0539	-0.1239	0.2317	1.1941	0.9123
p2 vs p6	-0.0003	-0.1781	0.1775	0.0058	1.0000
p3 vs p4	0.2017	0.0239	0.3795	4.4708	0.0229
p3 vs p5	0.1817	0.0039	0.3595	4.0266	0.0441
p3 vs p6	0.1275	-0.0503	0.3053	2.8267	0.2341
p4 vs p5	-0.0200	-0.1978	0.1578	0.4442	0.9989
p4 vs p6	-0.0742	-0.2520	0.1036	1.6441	0.7424
p5 vs p6	-0.0541	-0.2319	0.1237	1.1999	0.9107

Fator 1 (concentração) = 15**Scheffe**

<i>Group vs. Group (Contrast)</i>	<i>Difference</i>	<i>95% Confidence Interval</i>		<i>Test Statistic</i>	<i>p-value</i>
p1 vs p2	-0.0156	-0.1934	0.1622	0.3461	0.9997
p1 vs p3	-0.0888	-0.2666	0.0890	1.9672	0.5866
p1 vs p4	0.1312	-0.0466	0.3090	2.9075	0.2112
p1 vs p5	0.0596	-0.1182	0.2374	1.3211	0.8732
p1 vs p6	0.0505	-0.1273	0.2283	1.1192	0.9315
p2 vs p3	-0.0731	-0.2509	0.1047	1.6210	0.7529
p2 vs p4	0.1468	-0.0310	0.3246	3.2536	0.1333
p2 vs p5	0.0752	-0.1026	0.2530	1.6672	0.7318
p2 vs p6	0.0661	-0.1117	0.2439	1.4653	0.8197
p3 vs p4	0.2199	0.0421	0.3977	4.8747	0.0126
p3 vs p5	0.1484	-0.0294	0.3262	3.2882	0.1271
p3 vs p6	0.1393	-0.0385	0.3171	3.0863	0.1671
p4 vs p5	-0.0716	-0.2494	0.1062	1.5864	0.7684
p4 vs p6	-0.0807	-0.2585	0.0971	1.7883	0.6742
p5 vs p6	-0.0091	-0.1869	0.1687	0.2019	1.0000

Factor 1 (concentração) = 30**Scheffe**

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
p1 vs p2	-0.0573	-0.2351	0.1205	1.2691	0.8901
p1 vs p3	-0.0760	-0.2538	0.1018	1.6845	0.7237
p1 vs p4	0.0279	-0.1499	0.2057	0.6173	0.9948
p1 vs p5	0.0062	-0.1716	0.1840	0.1385	1.0000
p1 vs p6	0.0469	-0.1309	0.2247	1.0384	0.9491
p2 vs p3	-0.0187	-0.1965	0.1591	0.4154	0.9992
p2 vs p4	0.0851	-0.0927	0.2629	1.8864	0.6263
p2 vs p5	0.0635	-0.1143	0.2413	1.4076	0.8422
p2 vs p6	0.1041	-0.0737	0.2819	2.3075	0.4261
p3 vs p4	0.1039	-0.0739	0.2817	2.3018	0.4287
p3 vs p5	0.0822	-0.0956	0.2600	1.8230	0.6574
p3 vs p6	0.1229	-0.0549	0.3007	2.7229	0.2662
p4 vs p5	-0.0216	-0.1994	0.1562	0.4788	0.9984
p4 vs p6	0.0190	-0.1588	0.1968	0.4211	0.9991
p5 vs p6	0.0406	-0.1372	0.2184	0.8999	0.9719

Comparação entre grupos 1 (concentração) dentro de cada fator 2 (peptídeo) nível

Fator 2 (peptídeo) = p1

Scheffe

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	-0.1026	-0.2250	0.0199	2.2729	0.1086
5 vs 30	-0.1445	-0.2669	-0.0220	3.2017	0.0201
15 vs 30	-0.0419	-0.1643	0.0805	0.9288	0.6575

Fator 2 (peptídeo) = p2

Scheffe

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	-0.0744	-0.1969	0.0480	1.6499	0.2863
5 vs 30	-0.1580	-0.2804	-0.0355	3.5017	0.0113
15 vs 30	-0.0836	-0.2060	0.0389	1.8518	0.2135

Fator 2 (peptídeo) = p3

Scheffe

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	-0.0198	-0.1422	0.1027	0.4384	0.9089
5 vs 30	-0.0489	-0.1714	0.0735	1.0845	0.5677
15 vs 30	-0.0292	-0.1516	0.0933	0.6461	0.8139

Fator 2 (peptídeo) = p4

Scheffe

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	-0.0016	-0.1240	0.1209	0.0346	0.9994

5 vs 30	-0.1468	-0.2692	-0.0244	3.2536	0.0182
15 vs 30	-0.1452	-0.2677	-0.0228	3.2190	0.0195

Fator 2 (peptídeo) = p5

Scheffe

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	-0.0531	-0.1755	0.0693	1.1768	0.5156
5 vs 30	-0.1484	-0.2708	-0.0259	3.2882	0.0171
15 vs 30	-0.0953	-0.2177	0.0272	2.1114	0.1421

Fator 2 (peptídeo) = p6

Scheffe

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	-0.0081	-0.1305	0.1144	0.1788	0.9842
5 vs 30	-0.0536	-0.1761	0.0688	1.1884	0.5092
15 vs 30	-0.0455	-0.1680	0.0769	1.0095	0.6108

8 ANEXO III - ENSAIO DE HALO INIBIÇÃO

8.1.1 Ensaios com a bactéria 2406 análise em 12h

ANOVA

Source of Variation	SS	d.f.	MS	F	p-value	F crit	Omega Sqr.
Factor #1 (concentração)	28.1333	2	14.0667	3.4045	0.0745	4.1028	#N/D
Factor #2 (peptídeo)	46.4211	5	9.2842	2.2470	0.1292	3.3258	#N/D
Within Groups	41.3174	10	4.1317				
Total	115.8718	17	6.8160				

Comparação entre grupos 2 (peptídeo) dentro de cada fator 1 (concentração) nível

Fator 1 (concentração) = 5

Scheffe

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
p1 vs p2	-5.0167	-16.3448	6.3115	1.7452	0.6950
p1 vs p3	0.3500	-10.9781	11.6781	0.1218	1.0000
p1 vs p4	-0.8767	-12.2048	10.4515	0.3050	0.9998
p1 vs p5	3.2667	-8.0615	14.5948	1.1364	0.9274
p1 vs p6	2.2333	-9.0948	13.5615	0.7769	0.9851
p2 vs p3	5.3667	-5.9615	16.6948	1.8669	0.6359
p2 vs p4	4.1400	-7.1881	15.4681	1.4402	0.8296
p2 vs p5	8.2833	-3.0448	19.6115	2.8815	0.2184
p2 vs p6	7.2500	-4.0781	18.5781	2.5221	0.3374
p3 vs p4	-1.2267	-12.5548	10.1015	0.4267	0.9991
p3 vs p5	2.9167	-8.4115	14.2448	1.0146	0.9537
p3 vs p6	1.8833	-9.4448	13.2115	0.6552	0.9931
p4 vs p5	4.1433	-7.1848	15.4715	1.4413	0.8292
p4 vs p6	3.1100	-8.2181	14.4381	1.0819	0.9401
p5 vs p6	-1.0333	-12.3615	10.2948	0.3595	0.9996

Fator 1 (concentração) = 15

Scheffe

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
p1 vs p2	-2.6333	-13.9615	8.6948	0.9161	0.9697
p1 vs p3	-2.0667	-13.3948	9.2615	0.7189	0.9895
p1 vs p4	-1.0800	-12.4081	10.2481	0.3757	0.9995
p1 vs p5	-0.5333	-11.8615	10.7948	0.1855	1.0000
p1 vs p6	-0.7167	-12.0448	10.6115	0.2493	0.9999

p2 vs p3	0.5667	-10.7615	11.8948	0.1971	1.0000
p2 vs p4	1.5533	-9.7748	12.8815	0.5404	0.9972
p2 vs p5	2.1000	-9.2281	13.4281	0.7305	0.9887
p2 vs p6	1.9167	-9.4115	13.2448	0.6668	0.9925
p3 vs p4	0.9867	-10.3415	12.3148	0.3432	0.9997
p3 vs p5	1.5333	-9.7948	12.8615	0.5334	0.9974
p3 vs p6	1.3500	-9.9781	12.6781	0.4696	0.9986
p4 vs p5	0.5467	-10.7815	11.8748	0.1902	1.0000
p4 vs p6	0.3633	-10.9648	11.6915	0.1264	1.0000
p5 vs p6	-0.1833	-11.5115	11.1448	0.0638	1.0000

Fator 1 (concentração) = 30

Scheffe

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
p1 vs p2	-0.8333	-12.1615	10.4948	0.2899	0.9999
p1 vs p3	-4.3500	-15.6781	6.9781	1.5132	0.8000
p1 vs p4	3.8667	-7.4615	15.1948	1.3451	0.8649
p1 vs p5	1.1000	-10.2281	12.4281	0.3827	0.9995
p1 vs p6	2.4833	-8.8448	13.8115	0.8639	0.9764
p2 vs p3	-3.5167	-14.8448	7.8115	1.2233	0.9040
p2 vs p4	4.7000	-6.6281	16.0281	1.6350	0.7466
p2 vs p5	1.9333	-9.3948	13.2615	0.6726	0.9922
p2 vs p6	3.3167	-8.0115	14.6448	1.1538	0.9230
p3 vs p4	8.2167	-3.1115	19.5448	2.8583	0.2249
p3 vs p5	5.4500	-5.8781	16.7781	1.8959	0.6216
p3 vs p6	6.8333	-4.4948	18.1615	2.3771	0.3960
p4 vs p5	-2.7667	-14.0948	8.5615	0.9624	0.9627
p4 vs p6	-1.3833	-12.7115	9.9448	0.4812	0.9984
p5 vs p6	1.3833	-9.9448	12.7115	0.4812	0.9984

Comparação entre grupos do fator 1 (concentração) entre o fator 2 (peptídeo) nível

Fator 2 (peptídeo) = p1

Scheffe

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	1.3000	-6.5011	9.1011	0.4522	0.9034
5 vs 30	-2.9667	-10.7678	4.8345	1.0320	0.5978
15 vs 30	-4.2667	-12.0678	3.5345	1.4843	0.3578

Fator 2 (peptídeo) = p2

Scheffe

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	3.6833	-4.1178	11.4845	1.2813	0.4589
5 vs 30	1.2167	-6.5845	9.0178	0.4232	0.9148
15 vs 30	-2.4667	-10.2678	5.3345	0.8581	0.6981

Factor 2 (peptídeo) = p3**Scheffe**

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	-1.1167	-8.9178	6.6845	0.3885	0.9277
5 vs 30	-7.6667	-15.4678	0.1345	2.6670	0.0544
15 vs 30	-6.5500	-14.3511	1.2511	2.2786	0.1076

Fator 2 (peptídeo) = p4**Scheffe**

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	1.0967	-6.7045	8.8978	0.3815	0.9301
5 vs 30	1.7767	-6.0245	9.5778	0.6181	0.8281
15 vs 30	0.6800	-7.1211	8.4811	0.2366	0.9725

Fator 2 (peptídeo) = p5**Scheffe**

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	-2.5000	-10.3011	5.3011	0.8697	0.6915
5 vs 30	-5.1333	-12.9345	2.6678	1.7857	0.2356
15 vs 30	-2.6333	-10.4345	5.1678	0.9161	0.6648

Fator 2 (peptídeo) = p6**Scheffe**

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	-1.6500	-9.4511	6.1511	0.5740	0.8496
5 vs 30	-2.7167	-10.5178	5.0845	0.9451	0.6481
15 vs 30	-1.0667	-8.8678	6.7345	0.3711	0.9338

8.1.2 Ensaios com a bactéria 2406 análise em 24h

ANOVA

Source of Variation	SS	d.f.	MS	F	p-value	F crit	Omega Sqr.
Factor #1 (concentração)	48.9911	2	24.4956	8.1366	0.0080	4.1028	#N/D
Factor #2 (peptídeo)	33.7969	5	6.7594	2.2452	0.1294	3.3258	#N/D
Within Groups	30.1053	10	3.0105				
Total	112.8934	17	6.6408				

Comparação entre grupos (Factor 1 - concentração)**Scheffe**

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	-0.7750	-3.4935	1.9435	0.7736	0.7457
5 vs 30	-3.8222	-6.5408	-1.1037	3.8155	0.0062
15 vs 30	-3.0472	-5.7658	-0.3287	3.0419	0.0272

Comparação entre grupos 2 (peptídeo) dentro de cada fator 1 (concentração) nível

Fator 1 (concentração) = 5

Scheffe

<i>Group vs. Group (Contrast)</i>	<i>Difference</i>	<i>95% Confidence Interval</i>		<i>Test Statistic</i>	<i>p-value</i>
p1 vs p2	0.0333	-9.6364	9.7031	0.0136	1.0000
p1 vs p3	-0.7667	-10.4364	8.9031	0.3124	0.9998
p1 vs p4	0.3167	-9.3531	9.9864	0.1291	1.0000
p1 vs p5	2.3667	-7.3031	12.0364	0.9645	0.9624
p1 vs p6	2.2833	-7.3864	11.9531	0.9305	0.9676
p2 vs p3	-0.8000	-10.4697	8.8697	0.3260	0.9998
p2 vs p4	0.2833	-9.3864	9.9531	0.1155	1.0000
p2 vs p5	2.3333	-7.3364	12.0031	0.9509	0.9645
p2 vs p6	2.2500	-7.4197	11.9197	0.9170	0.9695
p3 vs p4	1.0833	-8.5864	10.7531	0.4415	0.9989
p3 vs p5	3.1333	-6.5364	12.8031	1.2769	0.8877
p3 vs p6	3.0500	-6.6197	12.7197	1.2430	0.8982
p4 vs p5	2.0500	-7.6197	11.7197	0.8354	0.9796
p4 vs p6	1.9667	-7.7031	11.6364	0.8015	0.9830
p5 vs p6	-0.0833	-9.7531	9.5864	0.0340	1.0000

Fator 1 (concentração) = 15

Scheffe

<i>Group vs. Group (Contrast)</i>	<i>Difference</i>	<i>95% Confidence Interval</i>		<i>Test Statistic</i>	<i>p-value</i>
p1 vs p2	-0.6500	-10.3197	9.0197	0.2649	0.9999
p1 vs p3	-0.2167	-9.8864	9.4531	0.0883	1.0000
p1 vs p4	0.0000	-9.6697	9.6697	0.0000	1.0000
p1 vs p5	0.7667	-8.9031	10.4364	0.3124	0.9998
p1 vs p6	0.1833	-9.4864	9.8531	0.0747	1.0000
p2 vs p3	0.4333	-9.2364	10.1031	0.1766	1.0000
p2 vs p4	0.6500	-9.0197	10.3197	0.2649	0.9999
p2 vs p5	1.4167	-8.2531	11.0864	0.5773	0.9962
p2 vs p6	0.8333	-8.8364	10.5031	0.3396	0.9997
p3 vs p4	0.2167	-9.4531	9.8864	0.0883	1.0000
p3 vs p5	0.9833	-8.6864	10.6531	0.4007	0.9993
p3 vs p6	0.4000	-9.2697	10.0697	0.1630	1.0000
p4 vs p5	0.7667	-8.9031	10.4364	0.3124	0.9998
p4 vs p6	0.1833	-9.4864	9.8531	0.0747	1.0000
p5 vs p6	-0.5833	-10.2531	9.0864	0.2377	0.9999

Fator 1 (concentração) = 30**Scheffe**

<i>Group vs. Group (Contrast)</i>	<i>Difference</i>	<i>95% Confidence Interval</i>		<i>Test Statistic</i>	<i>p-value</i>
p1 vs p2	-2.4333	-12.1031	7.2364	0.9917	0.9578
p1 vs p3	-7.4500	-17.1197	2.2197	3.0361	0.1787
p1 vs p4	0.8500	-8.8197	10.5197	0.3464	0.9997
p1 vs p5	1.6833	-7.9864	11.3531	0.6860	0.9915
p1 vs p6	-1.8500	-11.5197	7.8197	0.7539	0.9870
p2 vs p3	-5.0167	-14.6864	4.6531	2.0445	0.5488
p2 vs p4	3.2833	-6.3864	12.9531	1.3381	0.8674
p2 vs p5	4.1167	-5.5531	13.7864	1.6777	0.7269
p2 vs p6	0.5833	-9.0864	10.2531	0.2377	0.9999
p3 vs p4	8.3000	-1.3697	17.9697	3.3825	0.1115
p3 vs p5	9.1333	-0.5364	18.8031	3.7221	0.0687
p3 vs p6	5.6000	-4.0697	15.2697	2.2822	0.4374
p4 vs p5	0.8333	-8.8364	10.5031	0.3396	0.9997
p4 vs p6	-2.7000	-12.3697	6.9697	1.1003	0.9359
p5 vs p6	-3.5333	-13.2031	6.1364	1.4400	0.8297

Comparação entre grupos 1 (concentração) dentro de cada fator 2 (peptídeo) nível**Fator 2 (peptídeo) = p1****Scheffe**

<i>Group vs. Group (Contrast)</i>	<i>Difference</i>	<i>95% Confidence Interval</i>		<i>Test Statistic</i>	<i>p-value</i>
5 vs 15	-0.0833	-6.7424	6.5757	0.0340	0.9994
5 vs 30	-1.5833	-8.2424	5.0757	0.6453	0.8144
15 vs 30	-1.5000	-8.1591	5.1591	0.6113	0.8315

Fator 2 (peptídeo) = p2**Scheffe**

<i>Group vs. Group (Contrast)</i>	<i>Difference</i>	<i>95% Confidence Interval</i>		<i>Test Statistic</i>	<i>p-value</i>
5 vs 15	-0.7667	-7.4257	5.8924	0.3124	0.9525
5 vs 30	-4.0500	-10.7091	2.6091	1.6505	0.2860
15 vs 30	-3.2833	-9.9424	3.3757	1.3381	0.4293

Fator 2 (peptídeo) = p3**Scheffe**

<i>Group vs. Group (Contrast)</i>	<i>Difference</i>	<i>95% Confidence Interval</i>		<i>Test Statistic</i>	<i>p-value</i>
5 vs 15	0.4667	-6.1924	7.1257	0.1902	0.9821
5 vs 30	-8.2667	-14.9257	-1.6076	3.3689	0.0146
15 vs 30	-8.7333	-15.3924	-2.0743	3.5591	0.0101

Fator 2 (peptídeo) = p4**Scheffe**

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	-0.4000	-7.0591	6.2591	0.1630	0.9868
5 vs 30	-1.0500	-7.7091	5.6091	0.4279	0.9130
15 vs 30	-0.6500	-7.3091	6.0091	0.2649	0.9656

Fator 2 (peptídeo) = p5**Scheffe**

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	-1.6833	-8.3424	4.9757	0.6860	0.7932
5 vs 30	-2.2667	-8.9257	4.3924	0.9237	0.6604
15 vs 30	-0.5833	-7.2424	6.0757	0.2377	0.9722

Fator 2 (peptídeo) = p6**Scheffe**

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	-2.1833	-8.8424	4.4757	0.8898	0.6799
5 vs 30	-5.7167	-12.3757	0.9424	2.3297	0.0986
15 vs 30	-3.5333	-10.1924	3.1257	1.4400	0.3787

8.1.3 Ensaios com a bactéria 1652 análise em 12h**ANOVA**

Source of Variation	SS	d.f.	MS	F	p-value	F crit	Omega Sqr.
Factor #1 (concentração)	25.6848	2	12.8424	16.1273	0.0007	4.1028	#N/D
Factor #2 (peptídeo)	30.7505	5	6.1501	7.7232	0.0033	3.3258	#N/D
Within Groups	7.9631	10	0.7963				
Total	64.3985	17	3.7881				

Comparação entre grupos (Fator 1 - concentração)**Scheffe**

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	-0.6278	-2.0259	0.7704	1.2185	0.4927
5 vs 30	-2.7889	-4.1871	-1.3907	5.4131	0.0003
15 vs 30	-2.1611	-3.5593	-0.7629	4.1946	0.0030

Comparação entre (Fator 2 - peptídeo)

Scheffe

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
p1 vs p2	0.1000	-2.7713	2.9713	0.1372	1.0000
p1 vs p3	-3.5944	-6.4657	-0.7232	4.9333	0.0116
p1 vs p4	-0.0222	-2.8935	2.8490	0.0305	1.0000
p1 vs p5	-1.0722	-3.9435	1.7990	1.4716	0.8171
p1 vs p6	-1.5944	-4.4657	1.2768	2.1883	0.4802
p2 vs p3	-3.6944	-6.5657	-0.8232	5.0705	0.0095
p2 vs p4	-0.1222	-2.9935	2.7490	0.1677	1.0000
p2 vs p5	-1.1722	-4.0435	1.6990	1.6088	0.7584
p2 vs p6	-1.6944	-4.5657	1.1768	2.3256	0.4182
p3 vs p4	3.5722	0.7010	6.4435	4.9028	0.0121
p3 vs p5	2.5222	-0.3490	5.3935	3.4617	0.0997
p3 vs p6	2.0000	-0.8713	4.8713	2.7449	0.2591
p4 vs p5	-1.0500	-3.9213	1.8213	1.4411	0.8293
p4 vs p6	-1.5722	-4.4435	1.2990	2.1578	0.4945
p5 vs p6	-0.5222	-3.3935	2.3490	0.7167	0.9896

Comparação entre grupos 2 (peptídeo) dentro de cada fator 1 (concentração) nível

Factor 1 (concentração) = 5

Scheffe

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
p1 vs p2	1.2667	-3.7065	6.2398	1.0037	0.9557
p1 vs p3	-1.7833	-6.7565	3.1898	1.4131	0.8401
p1 vs p4	1.3667	-3.6065	6.3398	1.0829	0.9398
p1 vs p5	1.1333	-3.8398	6.1065	0.8980	0.9721
p1 vs p6	0.1000	-4.8732	5.0732	0.0792	1.0000
p2 vs p3	-3.0500	-8.0232	1.9232	2.4168	0.3794
p2 vs p4	0.1000	-4.8732	5.0732	0.0792	1.0000
p2 vs p5	-0.1333	-5.1065	4.8398	0.1057	1.0000
p2 vs p6	-1.1667	-6.1398	3.8065	0.9245	0.9685
p3 vs p4	3.1500	-1.8232	8.1232	2.4960	0.3475
p3 vs p5	2.9167	-2.0565	7.8898	2.3112	0.4245
p3 vs p6	1.8833	-3.0898	6.8565	1.4923	0.8087
p4 vs p5	-0.2333	-5.2065	4.7398	0.1849	1.0000
p4 vs p6	-1.2667	-6.2398	3.7065	1.0037	0.9557
p5 vs p6	-1.0333	-6.0065	3.9398	0.8188	0.9813

Fator 1 (concentração) = 15**Scheffe**

<i>Group vs. Group (Contrast)</i>	<i>Difference</i>	<i>95% Confidence Interval</i>		<i>Test Statistic</i>	<i>p-value</i>
p1 vs p2	-0.0833	-5.0565	4.8898	0.0660	1.0000
p1 vs p3	-3.8833	-8.8565	1.0898	3.0771	0.1692
p1 vs p4	-0.4667	-5.4398	4.5065	0.3698	0.9995
p1 vs p5	-0.6167	-5.5898	4.3565	0.4886	0.9983
p1 vs p6	-2.5333	-7.5065	2.4398	2.0074	0.5669
p2 vs p3	-3.8000	-8.7732	1.1732	3.0111	0.1846
p2 vs p4	-0.3833	-5.3565	4.5898	0.3038	0.9998
p2 vs p5	-0.5333	-5.5065	4.4398	0.4226	0.9991
p2 vs p6	-2.4500	-7.4232	2.5232	1.9414	0.5993
p3 vs p4	3.4167	-1.5565	8.3898	2.7074	0.2713
p3 vs p5	3.2667	-1.7065	8.2398	2.5885	0.3125
p3 vs p6	1.3500	-3.6232	6.3232	1.0697	0.9427
p4 vs p5	-0.1500	-5.1232	4.8232	0.1189	1.0000
p4 vs p6	-2.0667	-7.0398	2.9065	1.6376	0.7454
p5 vs p6	-1.9167	-6.8898	3.0565	1.5188	0.7977

Fator 1 (concentração) = 30**Scheffe**

<i>Group vs. Group (Contrast)</i>	<i>Difference</i>	<i>95% Confidence Interval</i>		<i>Test Statistic</i>	<i>p-value</i>
p1 vs p2	-0.8833	-5.8565	4.0898	0.7000	0.9907
p1 vs p3	-5.1167	-10.0898	-0.1435	4.0544	0.0423
p1 vs p4	-0.9667	-5.9398	4.0065	0.7660	0.9860
p1 vs p5	-3.7333	-8.7065	1.2398	2.9583	0.1978
p1 vs p6	-2.3500	-7.3232	2.6232	1.8621	0.6382
p2 vs p3	-4.2333	-9.2065	0.7398	3.3545	0.1159
p2 vs p4	-0.0833	-5.0565	4.8898	0.0660	1.0000
p2 vs p5	-2.8500	-7.8232	2.1232	2.2583	0.4481
p2 vs p6	-1.4667	-6.4398	3.5065	1.1622	0.9208
p3 vs p4	4.1500	-0.8232	9.1232	3.2884	0.1270
p3 vs p5	1.3833	-3.5898	6.3565	1.0961	0.9369
p3 vs p6	2.7667	-2.2065	7.7398	2.1923	0.4784
p4 vs p5	-2.7667	-7.7398	2.2065	2.1923	0.4784
p4 vs p6	-1.3833	-6.3565	3.5898	1.0961	0.9369
p5 vs p6	1.3833	-3.5898	6.3565	1.0961	0.9369

Comparação entre grupos 1 (concentração) dentro de cada fator 2 (peptídeo) nível

Fator 2 (peptídeo) = p1

Scheffe

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	0.9833	-2.4415	4.4081	0.7792	0.7426
5 vs 30	-0.2667	-3.6915	3.1581	0.2113	0.9780
15 vs 30	-1.2500	-4.6748	2.1748	0.9905	0.6218

Fator 2 (peptídeo) = p2

Scheffe

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	-0.3667	-3.7915	3.0581	0.2905	0.9588
5 vs 30	-2.4167	-5.8415	1.0081	1.9150	0.1939
15 vs 30	-2.0500	-5.4748	1.3748	1.6244	0.2966

Fator 2 (peptídeo) = p3

Scheffe

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	-1.1167	-4.5415	2.3081	0.8848	0.6828
5 vs 30	-3.6000	-7.0248	-0.1752	2.8526	0.0388
15 vs 30	-2.4833	-5.9081	0.9415	1.9678	0.1787

Fator 2 (peptídeo) = p4

Scheffe

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	-0.8500	-4.2748	2.5748	0.6735	0.7997
5 vs 30	-2.6000	-6.0248	0.8248	2.0602	0.1543
15 vs 30	-1.7500	-5.1748	1.6748	1.3867	0.4047

Fator 2 (peptídeo) = p5

Scheffe

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	-0.7667	-4.1915	2.6581	0.6075	0.8334
5 vs 30	-5.1333	-8.5581	-1.7085	4.0676	0.0038
15 vs 30	-4.3667	-7.7915	-0.9419	3.4601	0.0123

Fator 2 (peptídeo) = p6**Scheffe**

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	-1.6500	-5.0748	1.7748	1.3075	0.4451
5 vs 30	-2.7167	-6.1415	0.7081	2.1527	0.1328
15 vs 30	-1.0667	-4.4915	2.3581	0.8452	0.7054

Ensaios com a bactéria 1652 análise em 24h**ANOVA**

Source of Variation	SS	d.f.	MS	F	p-value	F crit	Omega Sqr.
Factor #1 (concentração)	37.6228	2	18.8114	22.5422	0.0002	4.1028	#N/D
Factor #2 (peptídeo)	44.7673	5	8.9535	10.7292	0.0009	3.3258	#N/D
Within Groups	8.3450	10	0.8345				
Total	90.7351	17	5.3374				

Comparação entre grupos (Fator 1 - concentração)**Scheffe**

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	-0.2417	-1.6730	1.1896	0.4582	0.9010
5 vs 30	-3.1806	-4.6118	-1.7493	6.0305	9.7854E-5
15 vs 30	-2.9389	-4.3702	-1.5076	5.5723	0.0002

Comparação entre grupos (Fator 2 - peptídeo)**Scheffe**

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
p1 vs p2	-0.7389	-3.6782	2.2004	0.9906	0.9580
p1 vs p3	-4.6222	-7.5615	-1.6829	6.1970	0.0019
p1 vs p4	-1.0111	-3.9504	1.9282	1.3556	0.8612
p1 vs p5	-0.8500	-3.7893	2.0893	1.1396	0.9266
p1 vs p6	-2.8722	-5.8115	0.0671	3.8508	0.0570
p2 vs p3	-3.8833	-6.8226	-0.9440	5.2064	0.0078
p2 vs p4	-0.2722	-3.2115	2.6671	0.3650	0.9996
p2 vs p5	-0.1111	-3.0504	2.8282	0.1490	1.0000
p2 vs p6	-2.1333	-5.0726	0.8060	2.8602	0.2244
p3 vs p4	3.6111	0.6718	6.5504	4.8414	0.0132
p3 vs p5	3.7722	0.8329	6.7115	5.0574	0.0096
p3 vs p6	1.7500	-1.1893	4.6893	2.3462	0.4092
p4 vs p5	0.1611	-2.7782	3.1004	0.2160	1.0000
p4 vs p6	-1.8611	-4.8004	1.0782	2.4952	0.3478
p5 vs p6	-2.0222	-4.9615	0.9171	2.7112	0.2700

Comparação entre grupos 2 (peptídeo) dentro de cada fator 1 (concentração) nível

Fator 1 (concentração) = 5

Scheffe

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
p1 vs p2	-0.7000	-5.7910	4.3910	0.5418	0.9972
p1 vs p3	-3.7667	-8.8577	1.3243	2.9156	0.2090
p1 vs p4	-0.3000	-5.3910	4.7910	0.2322	1.0000
p1 vs p5	-0.6333	-5.7243	4.4577	0.4902	0.9982
p1 vs p6	-0.7167	-5.8077	4.3743	0.5547	0.9968
p2 vs p3	-3.0667	-8.1577	2.0243	2.3738	0.3974
p2 vs p4	0.4000	-4.6910	5.4910	0.3096	0.9998
p2 vs p5	0.0667	-5.0243	5.1577	0.0516	1.0000
p2 vs p6	-0.0167	-5.1077	5.0743	0.0129	1.0000
p3 vs p4	3.4667	-1.6243	8.5577	2.6834	0.2792
p3 vs p5	3.1333	-1.9577	8.2243	2.4254	0.3759
p3 vs p6	3.0500	-2.0410	8.1410	2.3609	0.4029
p4 vs p5	-0.3333	-5.4243	4.7577	0.2580	0.9999
p4 vs p6	-0.4167	-5.5077	4.6743	0.3225	0.9998
p5 vs p6	-0.0833	-5.1743	5.0077	0.0645	1.0000

Fator 1 (concentração) = 15

Scheffe

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
p1 vs p2	-1.0333	-6.1243	4.0577	0.7999	0.9831
p1 vs p3	-4.0000	-9.0910	1.0910	3.0962	0.1649
p1 vs p4	-1.9833	-7.0743	3.1077	1.5352	0.7907
p1 vs p5	-1.1500	-6.2410	3.9410	0.8902	0.9731
p1 vs p6	-3.6000	-8.6910	1.4910	2.7866	0.2461
p2 vs p3	-2.9667	-8.0577	2.1243	2.2964	0.4310
p2 vs p4	-0.9500	-6.0410	4.1410	0.7354	0.9884
p2 vs p5	-0.1167	-5.2077	4.9743	0.0903	1.0000
p2 vs p6	-2.5667	-7.6577	2.5243	1.9867	0.5770
p3 vs p4	2.0167	-3.0743	7.1077	1.5610	0.7796
p3 vs p5	2.8500	-2.2410	7.9410	2.2061	0.4720
p3 vs p6	0.4000	-4.6910	5.4910	0.3096	0.9998
p4 vs p5	0.8333	-4.2577	5.9243	0.6450	0.9936
p4 vs p6	-1.6167	-6.7077	3.4743	1.2514	0.8956
p5 vs p6	-2.4500	-7.5410	2.6410	1.8964	0.6214

Fator 1 (concentração) = 30**Scheffe**

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
p1 vs p2	-0.4833	-5.5743	4.6077	0.3741	0.9995
p1 vs p3	-6.1000	-11.1910	-1.0090	4.7217	0.0158
p1 vs p4	-0.7500	-5.8410	4.3410	0.5805	0.9961
p1 vs p5	-0.7667	-5.8577	4.3243	0.5934	0.9956
p1 vs p6	-4.3000	-9.3910	0.7910	3.3284	0.1202
p2 vs p3	-5.6167	-10.7077	-0.5257	4.3476	0.0275
p2 vs p4	-0.2667	-5.3577	4.8243	0.2064	1.0000
p2 vs p5	-0.2833	-5.3743	4.8077	0.2193	1.0000
p2 vs p6	-3.8167	-8.9077	1.2743	2.9543	0.1988
p3 vs p4	5.3500	0.2590	10.4410	4.1412	0.0372
p3 vs p5	5.3333	0.2423	10.4243	4.1283	0.0380
p3 vs p6	1.8000	-3.2910	6.8910	1.3933	0.8475
p4 vs p5	-0.0167	-5.1077	5.0743	0.0129	1.0000
p4 vs p6	-3.5500	-8.6410	1.5410	2.7479	0.2582
p5 vs p6	-3.5333	-8.6243	1.5577	2.7350	0.2623

Comparação entre grupos 1 (concentração) dentro de cada fator 2 (peptídeo) nível**Fator 2 (peptídeo) = p1****Scheffe**

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	0.7000	-2.8059	4.2059	0.5418	0.8647
5 vs 30	-2.1333	-5.6393	1.3726	1.6513	0.2857
15 vs 30	-2.8333	-6.3393	0.6726	2.1932	0.1242

Fator 2 (peptídeo) = p2**Scheffe**

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	0.3667	-3.1393	3.8726	0.2838	0.9606
5 vs 30	-1.9167	-5.4226	1.5893	1.4836	0.3581
15 vs 30	-2.2833	-5.7893	1.2226	1.7674	0.2420

Fator 2 (peptídeo) = p3**Scheffe**

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	0.4667	-3.0393	3.9726	0.3612	0.9371
5 vs 30	-4.4667	-7.9726	-0.9607	3.4575	0.0123
15 vs 30	-4.9333	-8.4393	-1.4274	3.8187	0.0061

Fator 2 (peptídeo) = p4**Scheffe**

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	-0.9833	-4.4893	2.5226	0.7612	0.7526
5 vs 30	-2.5833	-6.0893	0.9226	1.9996	0.1699
15 vs 30	-1.6000	-5.1059	1.9059	1.2385	0.4818

Fator 2 (peptídeo) = p5**Scheffe**

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	0.1833	-3.3226	3.6893	0.1419	0.9900
5 vs 30	-2.2667	-5.7726	1.2393	1.7545	0.2466
15 vs 30	-2.4500	-5.9559	1.0559	1.8964	0.1995

Fator 2 (peptídeo) = p6**Scheffe**

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	-2.1833	-5.6893	1.3226	1.6900	0.2706
5 vs 30	-5.7167	-9.2226	-2.2107	4.4250	0.0019
15 vs 30	-3.5333	-7.0393	-0.0274	2.7350	0.0481

8.1.4 Ensaios com a bactéria 2152 análise em 12h**ANOVA**

Source of Variation	SS	d.f.	MS	F	p-value	F crit	Omega Sqr.
Factor #1 (concentração)	46.4663	2	23.2332	2.1318	0.1694	4.1028	#N/D
Factor #2 (peptídeo)	34.7706	5	6.9541	0.6381	0.6763	3.3258	#N/D
Within Groups	108.9839	10	10.8984				
Total	190.2208	17	11.1895				

Comparação entre grupos 2 (peptídeo) dentro de cada fator 1 (concentração) nível

Fator 1 (concentração) = 5

Scheffe

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
p1 vs p2	-1.2833	-19.6814	17.1148	0.2749	0.9999
p1 vs p3	-0.2167	-18.6148	18.1814	0.0464	1.0000
p1 vs p4	1.1000	-17.2981	19.4981	0.2356	1.0000
p1 vs p5	1.6667	-16.7314	20.0648	0.3570	0.9996
p1 vs p6	1.6667	-16.7314	20.0648	0.3570	0.9996
p2 vs p3	1.0667	-17.3314	19.4648	0.2285	1.0000
p2 vs p4	2.3833	-16.0148	20.7814	0.5105	0.9979
p2 vs p5	2.9500	-15.4481	21.3481	0.6319	0.9942
p2 vs p6	2.9500	-15.4481	21.3481	0.6319	0.9942
p3 vs p4	1.3167	-17.0814	19.7148	0.2820	0.9999
p3 vs p5	1.8833	-16.5148	20.2814	0.4034	0.9993
p3 vs p6	1.8833	-16.5148	20.2814	0.4034	0.9993
p4 vs p5	0.5667	-17.8314	18.9648	0.1214	1.0000
p4 vs p6	0.5667	-17.8314	18.9648	0.1214	1.0000
p5 vs p6	0.0000	-18.3981	18.3981	0.0000	1.0000

Fator 1 (concentração) = 15

Scheffe

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
p1 vs p2	-2.1167	-20.5148	16.2814	0.4534	0.9988
p1 vs p3	-3.0500	-21.4481	15.3481	0.6533	0.9932
p1 vs p4	-11.3000	-29.6981	7.0981	2.4204	0.3779
p1 vs p5	-1.1500	-19.5481	17.2481	0.2463	0.9999
p1 vs p6	-1.4000	-19.7981	16.9981	0.2999	0.9998
p2 vs p3	-0.9333	-19.3314	17.4648	0.1999	1.0000
p2 vs p4	-9.1833	-27.5814	9.2148	1.9670	0.5867
p2 vs p5	0.9667	-17.4314	19.3648	0.2071	1.0000
p2 vs p6	0.7167	-17.6814	19.1148	0.1535	1.0000
p3 vs p4	-8.2500	-26.6481	10.1481	1.7671	0.6845
p3 vs p5	1.9000	-16.4981	20.2981	0.4070	0.9993
p3 vs p6	1.6500	-16.7481	20.0481	0.3534	0.9996
p4 vs p5	10.1500	-8.2481	28.5481	2.1741	0.4869
p4 vs p6	9.9000	-8.4981	28.2981	2.1205	0.5122
p5 vs p6	-0.2500	-18.6481	18.1481	0.0535	1.0000

Fator 1 (concentração) = 30**Scheffe**

<i>Group vs. Group (Contrast)</i>	<i>Difference</i>	<i>95% Confidence Interval</i>		<i>Test Statistic</i>	<i>p-value</i>
p1 vs p2	-4.3833	-22.7814	14.0148	0.9389	0.9664
p1 vs p3	-7.8667	-26.2648	10.5314	1.6850	0.7235
p1 vs p4	1.0333	-17.3648	19.4314	0.2213	1.0000
p1 vs p5	-1.7333	-20.1314	16.6648	0.3713	0.9995
p1 vs p6	-3.4500	-21.8481	14.9481	0.7390	0.9881
p2 vs p3	-3.4833	-21.8814	14.9148	0.7461	0.9876
p2 vs p4	5.4167	-12.9814	23.8148	1.1602	0.9213
p2 vs p5	2.6500	-15.7481	21.0481	0.5676	0.9965
p2 vs p6	0.9333	-17.4648	19.3314	0.1999	1.0000
p3 vs p4	8.9000	-9.4981	27.2981	1.9063	0.6165
p3 vs p5	6.1333	-12.2648	24.5314	1.3137	0.8757
p3 vs p6	4.4167	-13.9814	22.8148	0.9460	0.9653
p4 vs p5	-2.7667	-21.1648	15.6314	0.5926	0.9957
p4 vs p6	-4.4833	-22.8814	13.9148	0.9603	0.9630
p5 vs p6	-1.7167	-20.1148	16.6814	0.3677	0.9996

Comparação entre grupos 1 (concentração) dentro de cada fator 2 (peptídeo) nível**Fator 2 (peptídeo) = p1****Scheffe**

<i>Group vs. Group (Contrast)</i>	<i>Difference</i>	<i>95% Confidence Interval</i>		<i>Test Statistic</i>	<i>p-value</i>
5 vs 15	1.4167	-11.2532	14.0865	0.3034	0.9551
5 vs 30	-0.7000	-13.3699	11.9699	0.1499	0.9888
15 vs 30	-2.1167	-14.7865	10.5532	0.4534	0.9030

Fator 2 (peptídeo) = p2**Scheffe**

<i>Group vs. Group (Contrast)</i>	<i>Difference</i>	<i>95% Confidence Interval</i>		<i>Test Statistic</i>	<i>p-value</i>
5 vs 15	0.5833	-12.0865	13.2532	0.1249	0.9922
5 vs 30	-3.8000	-16.4699	8.8699	0.8139	0.7232
15 vs 30	-4.3833	-17.0532	8.2865	0.9389	0.6516

Fator 2 (peptídeo) = p3**Scheffe**

<i>Group vs. Group (Contrast)</i>	<i>Difference</i>	<i>95% Confidence Interval</i>		<i>Test Statistic</i>	<i>p-value</i>
5 vs 15	-1.4167	-14.0865	11.2532	0.3034	0.9551
5 vs 30	-8.3500	-21.0199	4.3199	1.7885	0.2346
15 vs 30	-6.9333	-19.6032	5.7365	1.4851	0.3574

Fator 2 (peptídeo) = p4**Scheffe**

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	-10.9833	-23.6532	1.6865	2.3525	0.0949
5 vs 30	-0.7667	-13.4365	11.9032	0.1642	0.9866
15 vs 30	10.2167	-2.4532	22.8865	2.1883	0.1252

Fator 2 (peptídeo) = p5**Scheffe**

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	-1.4000	-14.0699	11.2699	0.2999	0.9562
5 vs 30	-4.1000	-16.7699	8.5699	0.8782	0.6866
15 vs 30	-2.7000	-15.3699	9.9699	0.5783	0.8476

Fator 2 (peptídeo) = p6**Scheffe**

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	-1.6500	-14.3199	11.0199	0.3534	0.9397
5 vs 30	-5.8167	-18.4865	6.8532	1.2459	0.4778
15 vs 30	-4.1667	-16.8365	8.5032	0.8925	0.6784

8.1.5 Ensaios com a bactéria 2162 análise em 24h**ANOVA**

Source of Variation	SS	d.f.	MS	F	p-value	F crit	Omega Sqr.
Factor #1 (concentração)	33.4356	2	16.7178	14.7568	0.0010	4.1028	#N/D
Factor #2 (peptídeo)	34.2710	5	6.8542	6.0502	0.0078	3.3258	#N/D
Within Groups	11.3289	10	1.1329				
Total	79.0354	17	4.6491				

Comparação entre grupos (Fator 1 - concentração)**Scheffe**

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	-0.7028	-2.3704	0.9649	1.1436	0.5342
5 vs 30	-3.1778	-4.8454	-1.5101	5.1712	0.0005
15 vs 30	-2.4750	-4.1427	-0.8073	4.0276	0.0041

Comparação entre grupos (Fator 2 - peptídeo)

Scheffe					
Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		T _{est} Statistic	p-value
p1 vs p2	0.4444	-2.9803	3.8692	0.5114	0.9978
p1 vs p3	-2.9278	-6.3525	0.4969	3.3689	0.1136
p1 vs p4	-1.7500	-5.1747	1.6747	2.0137	0.5638
p1 vs p5	1.0167	-2.4080	4.4414	1.1699	0.9188
p1 vs p6	-1.5111	-4.9358	1.9136	1.7388	0.6980
p2 vs p3	-3.3722	-6.7969	0.0525	3.8803	0.0546
p2 vs p4	-2.1944	-5.6192	1.2303	2.5251	0.3362
p2 vs p5	0.5722	-2.8525	3.9969	0.6584	0.9930
p2 vs p6	-1.9556	-5.3803	1.4692	2.2502	0.4518
p3 vs p4	1.1778	-2.2469	4.6025	1.3552	0.8613
p3 vs p5	3.9444	0.5197	7.3692	4.5388	0.0207
p3 vs p6	1.4167	-2.0080	4.8414	1.6301	0.7488
p4 vs p5	2.7667	-0.6580	6.1914	3.1835	0.1466
p4 vs p6	0.2389	-3.1858	3.6636	0.2749	0.9999
p5 vs p6	-2.5278	-5.9525	0.8969	2.9086	0.2109

Comparação entre grupos 2 (peptídeo) dentro de cada fator 1 (concentração) nível

Fator 1 (concentração) = 5

Scheffe					
Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		T _{est} Statistic	p-value
p1 vs p2	0.8667	-5.0651	6.7984	0.5758	0.9962
p1 vs p3	-1.1500	-7.0818	4.7818	0.7640	0.9862
p1 vs p4	-0.3833	-6.3151	5.5484	0.2547	0.9999
p1 vs p5	1.3000	-4.6318	7.2318	0.8636	0.9764
p1 vs p6	0.6000	-5.3318	6.5318	0.3986	0.9993
p2 vs p3	-2.0167	-7.9484	3.9151	1.3398	0.8668
p2 vs p4	-1.2500	-7.1818	4.6818	0.8304	0.9801
p2 vs p5	0.4333	-5.4984	6.3651	0.2879	0.9999
p2 vs p6	-0.2667	-6.1984	5.6651	0.1772	1.0000
p3 vs p4	0.7667	-5.1651	6.6984	0.5093	0.9979
p3 vs p5	2.4500	-3.4818	8.3818	1.6276	0.7499
p3 vs p6	1.7500	-4.1818	7.6818	1.1626	0.9207
p4 vs p5	1.6833	-4.2484	7.6151	1.1183	0.9317
p4 vs p6	0.9833	-4.9484	6.9151	0.6533	0.9932
p5 vs p6	-0.7000	-6.6318	5.2318	0.4650	0.9986

Factor 1 (concentração) = 15**Scheffe**

<i>Group vs. Group (Contrast)</i>	<i>Difference</i>	<i>95% Confidence Interval</i>		<i>Test Statistic</i>	<i>p-value</i>
p1 vs p2	-1.0167	-6.9484	4.9151	0.6754	0.9921
p1 vs p3	-2.9167	-8.8484	3.0151	1.9377	0.6011
p1 vs p4	-2.6833	-8.6151	3.2484	1.7827	0.6770
p1 vs p5	0.1667	-5.7651	6.0984	0.1107	1.0000
p1 vs p6	-2.3333	-8.2651	3.5984	1.5501	0.7843
p2 vs p3	-1.9000	-7.8318	4.0318	1.2623	0.8923
p2 vs p4	-1.6667	-7.5984	4.2651	1.1072	0.9343
p2 vs p5	1.1833	-4.7484	7.1151	0.7861	0.9843
p2 vs p6	-1.3167	-7.2484	4.6151	0.8747	0.9751
p3 vs p4	0.2333	-5.6984	6.1651	0.1550	1.0000
p3 vs p5	3.0833	-2.8484	9.0151	2.0484	0.5469
p3 vs p6	0.5833	-5.3484	6.5151	0.3875	0.9994
p4 vs p5	2.8500	-3.0818	8.7818	1.8934	0.6229
p4 vs p6	0.3500	-5.5818	6.2818	0.2325	1.0000
p5 vs p6	-2.5000	-8.4318	3.4318	1.6609	0.7347

Fator 1 (concentração) = 30**Scheffe**

<i>Group vs. Group (Contrast)</i>	<i>Difference</i>	<i>95% Confidence Interval</i>		<i>Test Statistic</i>	<i>p-value</i>
p1 vs p2	1.4833	-4.4484	7.4151	0.9854	0.9589
p1 vs p3	-4.7167	-10.6484	1.2151	3.1335	0.1569
p1 vs p4	-2.1833	-8.1151	3.7484	1.4505	0.8256
p1 vs p5	1.5833	-4.3484	7.5151	1.0519	0.9464
p1 vs p6	-2.8000	-8.7318	3.1318	1.8602	0.6392
p2 vs p3	-6.2000	-12.1318	-0.2682	4.1189	0.0385
p2 vs p4	-3.6667	-9.5984	2.2651	2.4359	0.3715
p2 vs p5	0.1000	-5.8318	6.0318	0.0664	1.0000
p2 vs p6	-4.2833	-10.2151	1.6484	2.8456	0.2286
p3 vs p4	2.5333	-3.3984	8.4651	1.6830	0.7244
p3 vs p5	6.3000	0.3682	12.2318	4.1854	0.0349
p3 vs p6	1.9167	-4.0151	7.8484	1.2733	0.8888
p4 vs p5	3.7667	-2.1651	9.6984	2.5024	0.3450
p4 vs p6	-0.6167	-6.5484	5.3151	0.4097	0.9993
p5 vs p6	-4.3833	-10.3151	1.5484	2.9120	0.2100

Comparação entre grupos 1 (concentração) dentro de cada fator 2 (peptídeo) nível**Fator 2 (peptídeo) = p1****Scheffe**

<i>Group vs. Group (Contrast)</i>	<i>Difference</i>	<i>95% Confidence Interval</i>		<i>Test Statistic</i>	<i>p-value</i>
5 vs 15	0.9667	-3.1183	5.0516	0.6422	0.8159
5 vs 30	-1.8667	-5.9516	2.2183	1.2401	0.4809
15 vs 30	-2.8333	-6.9183	1.2516	1.8823	0.2039

Fator 2 (peptideo) = p2**Scheffe**

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	-0.9167	-5.0016	3.1683	0.6090	0.8326
5 vs 30	-1.2500	-5.3349	2.8349	0.8304	0.7138
15 vs 30	-0.3333	-4.4183	3.7516	0.2214	0.9758

Fator 2 (peptideo) = p3**Scheffe**

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	-0.8000	-4.8849	3.2849	0.5315	0.8694
5 vs 30	-5.4333	-9.5183	-1.3484	3.6096	0.0092
15 vs 30	-4.6333	-8.7183	-0.5484	3.0781	0.0254

Fator 2 (peptideo) = p4**Scheffe**

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	-1.3333	-5.4183	2.7516	0.8858	0.6822
5 vs 30	-3.6667	-7.7516	0.4183	2.4359	0.0821
15 vs 30	-2.3333	-6.4183	1.7516	1.5501	0.3281

Fator 2 (peptideo) = p5**Scheffe**

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	-0.1667	-4.2516	3.9183	0.1107	0.9939
5 vs 30	-1.5833	-5.6683	2.5016	1.0519	0.5864
15 vs 30	-1.4167	-5.5016	2.6683	0.9412	0.6503

Factor 2 (peptideo) = p6**Scheffe**

Group vs. Group (Contrast)	Difference	95% Confidence Interval		Test Statistic	p-value
5 vs 15	-1.9667	-6.0516	2.1183	1.3065	0.4456
5 vs 30	-5.2667	-9.3516	-1.1817	3.4989	0.0114
15 vs 30	-3.3000	-7.3849	0.7849	2.1923	0.1244